Aus der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig

Etablierung eines Hypoxie-/Reoxygenierungsmodells zur Untersuchung des Einflusses von Erythropoietin (EPO) und carbamyliertem Erythropoietin-Fc (cEPO-Fc) auf die intrazellulären Vorgänge in neuronalen Zellkulturen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Laura Timbul

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: PD Dr. med. Florian Simon Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer Drittgutachter: PD Dr. med. Alexander Gombert Meinen Eltern

Kongressbeiträge zur vorliegenden Dissertationsschrift

05/2017	Spring Meeting der European Society of Vascular Surgery, Leiden (Niederlande)		
	"Der Einfluss von EPO und c-EPO-Fc auf Hypoxie und Reoxygenierung in neuronalen Zelllinien" Poster Präsentation durch Timbul, L.		
03/2016	International Vascular Workshop, Going am Wilden Kaiser (Österreich)		
	<i>"Etablierung eines Hypoxiemodells in neuronalen Zelllinien"</i> Vortrag durch Timbul, L.		
10/2015	Chirurgische Forschungstage, Würzburg		
	<i>"Etablierung eines Hypoxiemodells in neuronalen Zelllinien"</i> Vortrag durch Timbul, L.		
09/2015	Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin, Münster		
	Verleihung des Promotionsstipendiums 2015 der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin e.V. (DGG) an Timbul, L.		
03/2014	Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin		
	"Der Einfluss von Erythropoietin (EPO) und carbamyliertem Erythropoietin (cEPO) auf Hypoxie und Reoxygenierung in neuronalen Zelllinien" Vortrag durch Timbul, L.		

Zusammenfassung

Thorakale Aortenpathologien wie Aortenaneurysmata und -dissektionen treten in der Bevölkerung mit einer Inzidenz von 5,9 bzw. 6 pro 100.000 Patientenjahre auf und sind häufig asymptomatische Erkrankungen, die jedoch unbehandelt zur Ruptur und damit zum Versterben des Betroffenen führen können. Daher wurde in den letzten Jahren das Screening hierauf erweitert, um eine rechtzeitige Therapie zu ermöglichen. Eine gefürchtete Komplikation bei invasiven Therapien von thorakalen Aortenpathologien ist eine Paraplegie oder Paraparese. In mehreren Tier- und Zellkulturexperimenten hatten sich Erythropoietin (EPO) und sein modifiziertes carbamyliertes Derivat cEPO-Fc als zytoprotektive Substanzen herauskristallisiert. Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines zuverlässigen, reproduzierbaren Modells für neuronale Zelllinien, in dem die klinische Sequenz von Ischämie und Reperfusion in Form von Hypoxie und Reoxygenierung nachgestellt werden kann. Zudem wurde der Einfluss von EPO und cEPO-Fc auf das hier etablierte Modell untersucht. Zur Vorbereitung des Zellkulturmediums, der Hypoxieinduktion und -aufrechterhaltung wurde eine Hypoxiebank genutzt. Hier wurde eine konstante, leicht reproduzierbare Hypoxie in der Atmosphäre und im Zellkulturmedium erreicht. Die Hypoxietoleranz der neuronalen humanen Zelllinien IMR-32, SH-SY5Y und der murinen Zelllinie Neuro-2A wurde mittels morphologischer Aspekte, Viabilitätsassay und Western Blot bestimmt und über einen Zeitraum von 48, respektive 72 und 24 Stunden analysiert. Diese Aspekte, insbesondere die Analyse von apoptoserelevanten Proteinen im Western Blot, wurden auch unter Zugabe von 0,2 und 20 IU/ml EPO oder 0,2 und 20 µg/ml cEPO-Fc evaluiert. Es stellte sich heraus, dass die Viabilität während Hypoxie und Reoxygenierung in IMR-32 und Neuro-2A signifikant abfiel. In den SH-SY5Y war keine signifikante Veränderung der Viabilität messbar. EPO zeigte keinen Einfluss, cEPO-Fc bewirkte dosisunabhängig eine signifikant verminderte Viabilität in den Neuro-2A unter Hvpoxie und Reoxygenierung. Der vorherig in vivo und in vitro gezeigte zytoprotektive Effekt der beiden Substanzen konnte auch im Western Blot nicht reproduziert werden. Ursächlich für die sich teilweise widersprechenden bzw. unerwarteten Ergebnisse der pro- und antiapoptotischen Proteine im Gegensatz zum physiologischen Modell könnte das veränderte Proliferationsverhalten der hier genutzten Zelllinien sein, die aus Tumorgewebe stammen. Zudem wurde nicht zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden. Ein Großteil der Zellen könnte bereits in einer Nekrose untergegangen sein, was zu unkontrollierter Freisetzung von Proteinen und somit deren Nachweis führen würde. Diese Arbeit dient als Grundlage für weitere Untersuchungen mit den neuronalen Zellkulturen. Das Hypoxiemodell und -protokoll sollte nach weiterführender Analyse, beispielsweise mittels FACS (fluorescenceactivated cell sorting) zur Differenzierung von Apoptose und Nekrose, weiterentwickelt und gegebenenfalls die Sauerstoffkonzentration in der Hypoxiebank an die daraus resultierenden Ergebnisse angepasst werden.

Abstract

Thoracic pathologies of the aorta, such as aneurysm or dissection have an incidence of 5.9 and 6 per 100,000 patient years. Often, they are asymptomatic; however there is a risk of rupture and consequently death. That is why screening methods had been promoted within the last years to enable an early therapy. Paraplegia and paraparesis are highly feared complications during invasive therapies on aortic pathologies. Multiple animal- and cell culture experiments have proven erythropoietin (EPO) and its modified derivate carbamylated erythropoietin-Fc (cEPO-Fc) to be cytoprotective substances. A reliable, easily replicable model for neuronal cell lines should now be developed, in which the clinical sequence of ischemia and reperfusion in the form of hypoxia and reoxygenation can be modeled. Subsequently, the influence of EPO and cEPO-Fc was analysed. A hypoxic workstation was used for the preparation of the cell culture medium, as well as the induction and maintenance of hypoxic conditions. That way a constant, easily replicable hypoxia was achieved in atmosphere and medium. The hypoxic tolerance of the neuronal human tumor cell lines IMR-32, SH-SY5Y, and murine Neuro-2A was determined by morphology, viability assay and Western Blot, and was set to 48, 72, and 24 hours respectively, followed by 24 hours of reoxygenation. These aspects, especially the Western Blot analysis of relevant proteins in apoptosis, were also evaluated after adding 0.2 and 20 IU/ml EPO or 0.2 and 20 µl/ml cEPO-Fc. A significant reduction in viability in IMR-32 and Neuro-2A during hypoxia and reoxygenation was shown. In SH-SY5Y no significant difference was measurable. EPO did not show any influence in any cell line, cEPO-Fc led to a dose-independent reduction in viability in Neuro-2A during hypoxia and reoxygenation. The cytoprotective effect previously shown in vivo and in vitro of both substances could not be reproduced. An explanation for the partially contradicting or unexpected results of the pro- and anti-apoptotic proteins could be altered proliferation behavior of cell lines that originate from tumor tissue. Additionally, there was no differentiation between apoptosis and necrosis. A large part of the cells could already have undergone necrosis, which would lead to an uncontrolled release of proteins and consequently the proteins' detection. This work serves as the basis for further investigation with neuronal cell cultures. After further analysis, for example using FACS (fluorescence-activated cell sorting) to differentiate apoptosis and necrosis, the hypoxia model and protocol should be reevaluated and, if necessary, the oxygen concentration in the hypoxia bank adjusted.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
C°	Grad Celsius
hð	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
A. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
A./Aa.	Arteria/Arteriae
Abb.	Abbildung
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
ΑΜΡΚ-β	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase $\boldsymbol{\beta}$
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ASA	Arteria spinalis anterior
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BAA	Bauchaortenaneurysma
Bax	Bcl-2-assoziiertes X Protein
Bcl	B-cell Follicular Lymphoma-2
Bcl _{xL}	B-cell Follicular Lymphoma extra Large
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CAD	Caspase aktivierte Desoxyribonuklease
Caspasen	Cysteinyl-aspartate specific protease
cEPO	carbamyliertes Erythropoietin
c-IAP	Cellular Inhibitor of Apoptosis
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d. h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	Death Domain, Todesdomäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und
	Zellkulturen
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Eryhtropoietin
EPO-R	EPO-Rezeptor
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERKs	Extracellular Signal-related Kinases

et al.	<i>et alii/aliae,</i> und andere		
EVAR	Endovascular Aortic Repair		
Fa.	Firma		
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting		
FADD	Fas Associated Death Domain		
Fas	Fatty Acid Synthetase		
FBS	fetales bovines Serum		
Fc	Fragment, cristallizable		
h	Stunde/n		
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure		
HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor 1α		
HV	Heidelberger Verlängerung		
I	Ischämie		
IAP	Inhibitor of Apoptotic Proteins		
lgG	Immunglobulin G		
IRD	Ischemia-Reperfusion-Disease		
IU	International Unit, Internationale Einheit		
Jak2	Janus-Tyrosinkinase 2		
kDa	Kilo-Dalton		
Μ	Mol		
mA	Milliampere		
MEM	Minimum Essential Medium		
Min.	Minute/n		
mind.	mindestens		
ml	Milliliter		
mM	Millimolar		
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure		
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid		
N ₂	Stickstoff		
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium/Kalium-Adenosin-5'-Triphosphatase		
NEAA	Non Essential Aminoacids, Nicht-essenzielle Aminosäuren		
NFĸB	Nekrosefaktor κB		
ng	Nanogramm		
Nm	Nanometer		
o. g.	oben genannt		
O ₂	Sauerstoff		
OGD	Oxygen-Glucose-Deprivation, Sauerstoff-Glucose-Entzug		
R	Reperfusion		
rhEPO	rekombinantes humanes Erythropoietin		
ROS	reaktive Sauerstoffspezies		
rpm	Rounds per minute, Runden pro Minute		
RPMI	Roswell Memorial Park Institute		
RT	Raumtemperatur		
S.	siehe		

SD	Standard Deviation, Standardabweichung	
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	
smac/DIABLO	Second mitochondrial activator of caspases/direct inhibitor of apoptotic proteins binding protein of low isoelectric point	
ST	Schwenktisch	
STAT	Signaltranducer and Activator of Transcription	
ТАА	thorakales Aortenaneurysma	
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1	
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α	
TRADD	TNFR1-assoziierte-DD	
u. a.	unter anderem	
USA	United States of America, Vereinigte Staaten von Amerika	
V	Volt	
v/v	Volumen pro Volumen	
vgl.	vergleiche	
VS.	versus	
w/v	Gewicht pro Volumen	
x-IAP	X linked Inhibitor of Apoptosis	
z. B.	zum Beispiel	
ZNS	zentrales Nervensystem	
βcR	Common-ß-Rezeptor	

Inhaltsverzeichnis

1.	Einle	eitur	là	1
	1.1	Klin	ischer Hintergrund / Ischämie des Rückenmarks	1
	1.2	Mol	ekularbiologische Vorgänge während Ischämie und Reperfusion	5
	1.3	Арс	ptose	7
	1.4	Nek	rose	11
	1.5	Exp	erimentelle Herangehensweise	12
	1.5.	1	In-Vitro Hypoxiemodelle	12
	1.5.2	2	EPO und cEPO-Fc	14
	1.6	Ziel	setzung der Arbeit	19
2.	Mate	erial	und Methoden	21
	2.1	Mat	erialien	21
	2.1.	1	Zelllinien und damit assoziierte Materialien	21
	2.1.	2	Antikörper und Reagenzien	22
	2.1.3	3	Geräte und damit assoziierte Materialien	25
	2.1.4	4	Verbrauchsmaterialien	27
	2.1.	5	Verarbeitungsprogramme	28
	2.2	Met	hoden	29
	2.2.	1	Kultivierung der Zellen	29
	2.2.2	2	Auftauen der Zellen	30
	2.2.3	3	Entwicklung des Hypoxiemodells	30
	2.2.4	4	Viabilitätsassay	37
	2.2.	5	Protein Bradford und Western Blot	39
	2.2.	6	Statistik	46
3.	Erge	ebnis	sse	48
	3.1	Etal	blierung des Modells	48
	3.1.	1	Desoxygenierung des Mediums durch Spritzenzug	48
	3.1.	2	Desoxygenierung des Mediums in der Hypoxiekammer	50
	3.1.3	3	Desoxygenierung des Mediums in der Hypoxiebank	51
	3.1.4	4	Ermittlung der Hypoxiezeit	52
	3.2	Vial	pilitätsassay	60
	3.3	We	stern Blot	65
	3.3.	1	HIF-1α	66
	3.3.2	2	ΑΜΡΚ-β	68
	3.3.3	3	Bax	71
	3.3.4	4	Bcl-2	74

	3.3.	5	Bcl _{xL}	77
	3.3.	6	Caspase 3	80
	3.3.	7	Caspase 9	82
	3.3.	8	Cleaved Caspase 9	85
	3.3.	9	c-IAP	88
	3.3.	10	x-IAP	91
	3.3.	11	Cytochrom C	94
	3.3.	12	smac/DIABLO	97
4.	Disł	cussi	ion	100
4	.1	Ent	wicklung des Hypoxiemodells	101
4	4.2 Veränderungen nach Hypoxie und Reoxygenierung 104			
4	4.3 Einfluss von EPO und cEPO-Fc auf die Proteinexpression 110			
4	4.4 Schlussfolgerung 11		115	
4	.5	Aus	blick	116
5.	Lite	ratur	- und Quellenverzeichnis	118
6.	a. Anhang 126			

1. Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund / Ischämie des Rückenmarks

Diese Dissertation behandelt die *in vitro* Vorgänge in Nervenzellen während Sauerstoffmangels (Hypoxie) und anschließender Sauerstoffzufuhr (Reoxygenierung). Klinischer Hintergrund für diese Untersuchung sind Erkrankungen der Aorta, vor allem des thorakoabdominellen Übergangs, die in gefäßchirurgischen Abteilungen operativ behandelt werden. Als primär relevante Pathologien der Aorta sind folgende Erkrankungen zu nennen:

- Aortenaneurysma (80 %): eine längliche oder sackförmige Erweiterung des Gefäßlumens aufgrund einer Gefäßwandschwäche
- Aortensyndrom (20 %): das Aortensyndrom setzt sich im Einzelnen aus der klassischen Aortendissektion, dem intramuralen Hämatom, einer lokal umschriebenen Dissektion, dem penetrierenden Aortenulkus und der traumatischen bzw. iatrogenen Dissektion zusammen

Beide Erkrankungen unterliegen einer genaueren Klassifikation nach Form und/oder Lokalisation. So unterscheidet man bei den Aortenaneurysmen thorakale (25 %) von abdominellen (75 %) und dort supra- von juxta-, para- und infrarenalen Aneurysmen. Bei einer Dissektion als Teil des Aortensyndroms wird üblicherweise neben der DeBakey-Klassifikation auch die Stanford-Klassifikation genutzt, wobei Stanford Typ A den primären Intimadefekt (*Entry*) im Bereich der *Aorta ascendens* bis einschließlich *Arteria subclavia sinistra* definiert und Typ B den Eintritt distal der linken *Arteria subclavia* verortet.

Die Epidemiologie der Aortenpathologien in Bezug auf die Lokalisation ist teilweise sehr unterschiedlich, wie zu sehen z. B. beim Aortenaneurysma, das im thorakalen Bereich (TAA) seltener zu finden ist als im abdominellen Bereich (BAA) [1]. Die Prävalenz eines TAA liegt bei 6 pro 100.000 Einwohner pro Jahr [2].

In bis zu 30-40 % der Fälle ist die *Aorta descendens* mit betroffen, jedoch am häufigsten die *Aorta ascendens* [3]. Die Prävalenz des BAAs steigt mit zunehmendem Alter. In der Altersgruppe von 50-54 Jahren liegt sie bei Männern und Frauen bei 0,6 bzw. 0,5 %. In der Altersgruppe von 60-64 Jahren liegt die Prävalenz bei 1,4 bzw. 0,9 % und steigt in der Gruppe der > 80-Jährigen auf bis zu 8,9 bzw. 4,8 % [4]. Für beide Aneurysmataformen gelten Atherosklerose, Nikotinabusus, Hypercholesterinämie und arterielle Hypertonie neben weiteren

Aspekten als Hauptrisikofaktoren [4-6]. Symptomatisch werden TAA und BAA am ehesten durch die Kompression umgebender Strukturen. Dadurch kann es zu Rücken-, Brust- oder Bauchschmerzen, thorakalem Engegefühl sowie Schluckstörungen oder Atemproblemen kommen [3, 7, 8]. Als akute und stark lebensbedrohliche Situation kann die Ruptur eines Aneurysmas mit einer massiven Blutung aus der Aorta klinisch durch plötzlich einsetzende Schmerzen und Kreislaufversagen auffällig werden.

Das Rupturrisiko eines TAA liegt zwischen 46 % und 74 % [3], das eines BAA zwischen 39 % und 64 % [1]. In beiden Fällen ist das Risiko abhängig von Größe und Größenprogredienz des Aneurysmas. Eine Ruptur ist die Hauptursache dafür, dass mehr als 70 % der Patienten mit einem TAA innerhalb von zwei Jahren versterben [3]. Aus diesem Grund ist es von höchster Relevanz, das Aneurysma entweder mittels eines offenen oder eines endovaskulären Verfahrens auszuschalten.

Eine primär elektive operative oder interventionelle Ausschaltung des abdominellen Aneurysmas sollte nach der aktuellen S3-Leitlinie (2018) ab einer Größe von über 5,5 cm, einer Größenprogredienz von 0,7 cm in 6 Monaten bzw. von 1 cm in einem Jahr oder bei symptomatischen Aneurysmen erfolgen. Bei Patienten mit asymptomatischen Aneurysmen, geringer Progredienz und Größe, reichen regelmäßige Kontrolluntersuchungen sowie Reduzierung der Risikofaktoren aus [4]. Beim thorakalen Aneurysma und der Aortendissektion sowie den weiteren Pathologien des Aortensyndroms wird die Indikation zur invasiven Therapie in Abhängigkeit von der Lokalisation, den betroffenen Abgangsarterien, der bestehenden Symptomatik und Akuität sowie den individuellen Risikofaktoren des Patienten gestellt [8, 9].

Die operativen Therapieoptionen der oben genannten Aortenpathologien (Aortenaneurysma und Aortensyndrom) sind folgende:

- Endovaskuläre Stentgraft-Implantation mittels Kathetertechnik
- Offene Rekonstruktion mittels Rohr- oder Y-Prothese (letztere bei Beteiligung der Arteriae (Aa.) iliacae) aus unterschiedlichen Kunststoffen

Beim endovaskulären Eingriff (*Endovascular Aortic Repair*, EVAR) werden über die Leistenschlagadern (*Arteriae femorales*) spezielle Katheter unter röntgenologischer Bildgebung bis über die Läsion vorgeschoben, über die ein oder mehrere Stents zur Abdeckung der Läsion in der Aorta platziert werden können. Beim offenen Verfahren wird über einen Bauchschnitt (Längs-Laparotomie) die pathologische Veränderung der Aorta dargestellt, proximal und distal davon abgeklemmt (*Cross-Clamping*) und der betroffene Teil durch eine Kunststoffprothese ersetzt.

EVARs gehen mit geringeren intraoperativen Komplikationen, wie beispielsweise Blutverlust einher. In einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2020 ergab sich nach EVAR eine geringere 30-Tages- und Hospitalletalität gegenüber der offenen Operation [10]. Die 30-Tage-Mortalität beim offenen Verfahren wird in der Literatur zwischen 0,6 und 4,6 % [4, 11] und beim endovaskulären Eingriff zwischen 0,5-1,8 % angegeben [4, 11-13]. Die Meta-Analyse zeigte in Bezug auf die Gesamtmortalität nach bis zu 15 Jahren keinen signifikanten Unterschied. Allerdings war das Risiko für einen Sekundärschaden (Re-Intervention, Ruptur und Versterben durch Aneurysmaruptur) nach EVAR erhöht [10]. Die Entscheidung der operativen Versorgung ist somit vom individuellen Risikoprofil und Präferenz des Patienten abhängig [4].

Die operative Versorgung, sowohl offen als auch endovaskulär, ist jedoch nicht risikoarm. Dazu zählt neben den allgemeinen Operationsrisiken, wie Nachblutungen oder Infektionen, das Risiko einer Querschnittslähmung, die passager oder permanent sein kann. Die Paraparese (unvollständige Lähmung) oder im extremen Fall auch Paraplegie (vollständige Lähmung) beruht auf einer Minderdurchblutung (Ischämie) des Rückenmarks, wodurch es dort unter anderem zum Untergang der α-Motoneuronen kommen kann. Abhängig vom Schweregrad der Grunderkrankung liegt die Paraplegie- oder -pareserate (passager oder dauerhaft) zwischen 1,7 [14] und 11,4 % [15-19]. Die Minderdurchblutung des Rückenmarks kann zum einen durch das Cross-Clamping beim offenen Verfahren bedingt sein, zum anderen aber auch durch das Verlegen von Gefäßlumina durch den Stent beim EVAR. Dadurch werden die Organe, die aus diesem Gefäßabschnitt versorgt werden, nur inadäquat durchblutet. Bei der thorakalen Aorta sind die zahlreichen Aa. intercostales posteriores betroffen, wohingegen bei der Aorta abdominalis die Aa. lumbales gefährdet sind. Sowohl die Interkostal- als auch die Lumbalarterien sind maßgeblich für die Rückenmarksdurchblutung verantwortlich. Diese wird hauptsächlich, wie im Folgenden beschrieben, durch longitudinal und transversal verlaufende Arterien gewährleistet [20-22]: Die longitudinalen Gefäße entstammen den Aa. vertebrales und sind zum einen die singuläre Arteria spinalis anterior (ASA), die im Sulcus medialis anterior verläuft, und die paarigen Aa. spinales posteriores, die an den

Eintrittsstellen der Hinterwurzeln gelegen sind. Während die ASA für die Versorgung der ventralen zwei Drittel verantwortlich ist, versorgen die Aa. spinales posteriores das dorsale Drittel der jeweiligen Seite. Ihre kleinsten Segmentarterien bilden keine relevanten Anastomosen, es handelt sich somit um funktionelle Endarterien. Die transversalen Gefäße sind von segmentalem Charakter. Sie entstammen der Aorta als Aa. intercostales posteriores oder Aa. lumbales, von denen Rami spinales jeweils durch die Foramina intervertebralia in den Wirbelkanal eintreten. Diese versorgen vor allem die Spinalnervenwurzeln. Sie zweigen sich T-förmig auf und anastomosieren mit den vertikal verlaufenden Arterien. Häufig entstammt am thorakolumbalen Übergang, zu 80 % linksseitig zwischen den Segmenten Th8-L3, ein größerkalibriger Ramus spinalis aus einer der Interkostalarterien, die Arteria radicularis magna (Adamkiewicz), die im Wirbelkanal auf die ASA trifft [20]. Sie gilt als anatomische Normvariante, die radiologisch in 80,2 % bis 89,8 % darstellbar ist [23, 24]. Durch ihre Anastomose mit der ASA ist sie besonders relevant für die Durchblutung des kaudalen Rückenmarks, vor allem bei Minderperfusion der Aa. intercostales, wie es bei oben genannter Aortenrekonstruktion vorkommen kann.

Aufgrund der schwerwiegenden Folgen für den Patienten gilt es diese Komplikation möglichst zu vermeiden. Klinisch kamen bereits präventive Maßnahmen zum Einsatz: beispielsweise wurden mittels Hypothermie des Epiduralraums der zelluläre Grundumsatz und die Menge an excitotoxischen Neurotransmittern, wie Glutamat, reduziert [25-27]. Außerdem nutzte man selektive Bypassverfahren zur Durchblutungsüberbrückung oder überwachte motorisch- und somatosensorischevozierte Potentiale [18, 28] als intraoperative Methode, um frühzeitig Schäden am Rückenmark zu erkennen. Die genannten Verfahren konnten das Risiko eines Rückenmarksschadens jedoch nur gering senken.

Zusätzlich sei erwähnt, dass eine Ischämie des Rückenmarks jedoch noch weitere, vielfältige Gründe haben kann, die in dieser Arbeit jedoch nachrangig behandelt werden. Sowohl traumatische Ursachen [29], Embolien [30], weniger häufig auch mediane Bandscheibenvorfälle [31], als auch seltenere Erkrankungen, wie Vaskulitiden [32], können eine ischämisch bedingte Paraparese verursachen. Das dabei entstehende klinische Bild wird als *"Spinalis Anterior* Syndrom" bezeichnet.

1.2 Molekularbiologische Vorgänge während Ischämie und Reperfusion

Unter Ischämie (I) versteht man in in vivo Modellen die Mangeldurchblutung und damit konsekutive Minderversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff (O2) eines Gewebes sowie den eingeschränkten Abtransport anfallender Metabolite, wodurch vorübergehende oder bleibende Schäden bis hin zum regulierten Zelltod (Apoptose, s. Kapitel 1.3) entstehen können. Reperfusion (R) in vivo bedeutet die Wiederdurchblutung des zuvor minderdurchbluteten Gewebes. Dadurch gelangen sowohl Substrate als auch Sauerstoff erneut zu den Zellen und anfallende bzw. die bereits angefallenen Stoffwechselprodukte werden wieder abtransportiert. Der zunächst positiv erscheinende Effekt der Reperfusion kann jedoch ebenfalls zu einem weiteren Gewebeschaden, unter anderem durch Bildung von Radikalen, wie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), beitragen. Die Abfolge von Ischämie und Reperfusion schadet folglich, abhängig von ihrer Dauer, in unterschiedlichem Maße. Es handelt sich hierbei um ein komplexes Konstrukt aus intra- und extrazellulären Faktoren. Sie werden als Ischämie-Reperfusionsschaden (Ischemia-Reperfusion-Disease, IRD) zusammengefasst. Zu den intrazellulären Vorgängen zählen die Dysfunktion der Mitochondrien, Einbruch des Elektrolythaushalts und die Entstehung freier Radikale [33]. Der entscheidende extrazelluläre Vorgang ist die Einwanderung immunologisch aktiver Zellen, die, getriggert durch Interleukin-1 und Interleukin-8, eine Entzündungsreaktion verursachen [34]. Ist die Zellschädigung irreparabel, wird die Apoptose eingeleitet [35]. Ebenfalls wird bei der IRD ein Zelluntergang in Form von Nekrose beobachtet [34]. Die molekularbiologischen Unterschiede von Apoptose und Nekrose werden in Kapitel 1.3 und 1.4 genauer erläutert.

Kurzzeitige Ischämien können häufig gut kompensiert werden. Dauert der Sauerstoffmangel jedoch zu lange an, bricht in der Zelle die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien zusammen. Die mitochondriale Atmungskette produziert kein weiteres Adenosin-5'-Triphoshat (ATP). Der Hauptenergieträger der Zelle fehlt, sodass innerhalb weniger Minuten das vorhandene ATP vor allem von der Natrium/Kalium-Adenosin-5'-Triphosphatase (Na⁺/K⁺-ATPase) verbraucht wird. Sobald der Na⁺/K⁺-ATPase und anderen energieabhängigen Ionentransportern der Membran kein ATP mehr zur Verfügung steht, gerät der Elektrolythaushalt der Zelle aus dem Gleichgewicht. Dem osmotischen Gradienten folgend, strömt Wasser ein, was ein Zellödem zur Folge hat [36]. Zusätzlich kann der hohe Anteil an intrazellulärem Calcium (Ca²⁺), das aufgrund des Zellstresses aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) freigesetzt wird, in kürzester Zeit durch Aktivierung zytoplasmatischer Enzyme zur Einleitung der Apoptose beitragen [22, 37]. Die Zelle versucht diesem Energiemangel entgegenzuwirken, indem die Regulationsenzyme energieaufwendiger Syntheseprozesse in der Zelle durch die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase β (AMPK- β) phosphoryliert und damit inaktiviert werden, während energieproduzierende Wege induziert werden [38]. Hierzu zählt z. B. auch der anaerobe Energiestoffwechsel. Das nach der Glykolyse entstehende Pyruvat wird unter aeroben Bedingungen im mitochondrialen Citrat-Zyklus verstoffwechselt. Unter Sauerstoffmangel kann dieser sauerstoffabhängige Kreislauf jedoch nicht ablaufen. Das Pyruvat wird daher zu Laktat abgebaut, was durch die Gluconeogenese einem erneuten Abbau via Glykolyse zur ATP-Gewinnung zur Verfügung gestellt werden kann. Eine erhöhte Konzentration von Laktat führt aufgrund seiner biochemischen Struktur über längere Zeit zu einem Abfall des lokalen pH-Wertes und damit zu einer Herunterregulation der arbeitenden Enzyme, die sich außerhalb ihres pH-Wert-Optimums befinden [39, 401.

Eine Unterbrechung der Atmungskette in den Mitochondrien führt durch einen Elektronentransfer auf den molekularen Sauerstoff zur aktiven Bildung von O2-Radikalen. Die Radikale können zum einen durch zelleigene Radikalfänger, wie Glutathion, Superoxiddismutase, Ascorbinsäure oder Tocopherol [41], unschädlich gemacht werden. Zum anderen reagieren sie aber auch mit der Zellmembran und bilden somit Lipidradikale, die die Integrität der Barriere stören. Das hat eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran zur Folge. Auch die Membran der Mitochondrien wird durch ROS beeinträchtigt, was zu einem mitochondrialen Ödem führt. Zusammen mit der ohnehin beeinträchtigten Funktion dieser Zellorganelle entsteht innerhalb von Minuten ein ATP-Mangel. Zuletzt führt die erhöhte Durchlässigkeit der Membran zum Ausstrom von Cytochrom C, was ein direkter Initiator der Apoptose ist (s. Kapitel 1.3). Die Sauerstoffradikale reagieren mit zahlreichen Bestandteilen der Zelle, neben den Membranen auch mit dem genetischen Material, der Desoxyribonukleinsäure (DNS). Dieser Effekt wird oxidativer Stress genannt. Dieser entsteht unter entgegengesetzten Bedingungen ebenfalls: Aus dem Sauerstoff-Überangebot während der Reperfusion aufgrund einer reaktiven Hyperämie entstehen ebenfalls ROS. Scheitert der Versuch der Zellerhaltung durch Reparaturmechanismen, führen diese Schäden unweigerlich zur Apoptose [41, 42].

In Bezug auf den klinischen Hintergrund kann die Kombination der verschiedenen Faktoren erklären, weshalb eine Paraparese/-plegie auch noch mehrere Stunden und Tage postoperativ auftreten kann. Die direkt einsetzende Lähmung entsteht durch den sofortigen Zelluntergang der Neurone oder ihrer Fortsätze. Die oben genannten Prozesse innerhalb der Zellen sind eher für das später einsetzende neurologische Defizit verantwortlich, u. a. durch die ödematös bedingte Gewebeschwellung, die zum Anstieg des intraspinalen Drucks führt [22]. Zusätzlich führt die Abklemmung der Aorta selbst zum erhöhten intraspinalen Druck, aufgrund Perfusion und konsekutiv der erhöhten zerebralen zur gesteigerten Liquorproduktion. Da der Spinalkanal knöchern begrenzt ist, entsteht ein globaler Druck auf das innenliegende Rückenmark. Die Mikrozirkulation wird somit noch weiter gestört [22]. Eine Liquordrainage zur Druckkontrolle des intraspinalen Drucks scheint in diesem Kontext sinnvoll, um bei erhöhten Druckwerten Liquor ablassen und die Mikrozirkulation gewährleisten zu können. Aufgrund katheterassoziierter Komplikationen, wie Hämatome, Katheterabrisse oder Meningitiden, sollte die Indikation restriktiv und individuell gestellt werden [22].

1.3 Apoptose

Apoptose, aus dem griechischen *apopiptein*, "abfallen", beschreibt den Vorgang des programmierten Todes einer Zelle. Davon abzugrenzen ist die Nekrose als unkontrollierter Zelluntergang, der meist mit einem hohen Grad an Entzündung einhergeht [43]. Neben physiologischen Alterungs- und Abbauprozessen können extrazelluläre Stressoren, wie Hyperthermie, Toxine, Ischämie und mechanische Traumata, Auslöser für sowohl Apoptose als auch Nekrose sein [44].

Entscheidende Proteine im Verlauf der Apoptose sind Caspasen (*Cysteinyl-aspartate specific protease*). Hierbei handelt es sich um Enzyme, die als inaktive Vorstufen (Procaspasen) vorliegen und durch Abspaltung von einzelnen Peptiden aktiviert werden. Sie selbst haben eine proteolytische Funktion, indem sie die Aminosäuresequenzen nach Aspartat spalten. Caspasen werden nach ihrer Funktion im Verlauf in Untergruppen eingeteilt. Initiatorcaspasen (Caspase 2, 8, 9, 10) spalten zuerst weitere Caspasen und tragen somit zur Amplifikation der

Apoptoseinduktion bei. Effektorcaspasen (Caspase 3, 6, 7) zerlegen daraufhin die intrazellulären Proteine und die DNS [43, 45].

Klassischerweise unterscheidet man zwei Wege der Zelle, den Vorgang der Apoptose geregelt einzuleiten, den extrinsischen und den intrinsischen Weg. Beide Wege können sich gegenseitig beeinflussen und teilen eine gemeinsame Endstrecke.



Abb. 1: Schematische Darstellung der Initiierungswege der Apoptose (eigene Darstellung) Extrinsischer Weg, der über Todesrezeptoren und assoziierte *Death-Domains* via Caspase 8 zu den Effektorcaspasen führt, aber auch über NF κ B und IAPs diese hemmen kann. Intrinsischer Weg über smac/DIABLO und Cytochrom C (mitochondrial) und Beziehung zu p53 als proapoptotischer Faktor sowie Proteine der Bcl-Familie. Rote Pfeile inhibieren, schwarze Pfeile aktivieren. Der umrandete Komplex bildet mit Desoxyadenosintriphosphat (dATP) das Apoptosom. Grün unterlegt = antiapoptotisch, lila unterlegt = proapoptotisch, orange unterlegt = (Pro-)Caspasen, blau unterlegt = nehmen Einfluss auf Transkription Abkürzungen: Apaf-1 = *Apoptotic protease activating factor 1*, Bax = Bcl-2-assoziiertes X Protein, Bcl = *B-Cell follicular Lymphoma*, FADD = Fas assoziierte *Death Domain*, IAP = Inhibitor von Apoptose-Proteinen, NF κ B = Nekrose Faktor κ B, smac/DIABLO = *Second mitochondrial activator of caspases/direct Inhibitor of apoptotic proteins binding protein with low isoelectric point*, TRADD = Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1 assoziierte *Death Domain*

Der extrinsische Weg der Apoptoseinduktion ist verbunden mit Transmembranrezeptoren der Zelle (s. Abb. 1). Die auslösenden Faktoren binden

von extrazellulär an diese Rezeptoren. Zu diesen zählen beispielsweise der Fettsäure-Synthetase-Rezeptor (*Fatty acid synthetase*, Fas-Rezeptor) und der Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1 (TNFR1). Diese Rezeptortypen haben eine intrazelluläre Domäne gemein, die als Todesdomäne (*Death domain*, DD) bezeichnet wird. Binden an diese Rezeptoren die entsprechenden Liganden, z. B. Fas-Ligand und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), kommt es zur Zusammenlagerung der Rezeptoreinheiten und eine intrazelluläre Signalkaskade wird angestoßen. Zunächst binden Adapterproteine, die spezifisch für den jeweiligen Rezeptor und dessen DD sind, hier also Fas assoziierte DD (FADD) und TNFR1-assoziierte-DD (TRADD), an die Rezeptoreinheit. Dadurch kann die autokatalytische Aktivierung von Procaspase 8 zu Caspase 8 erfolgen [45].

Der intrinsische Weg ist rezeptorunabhängig und wird durch intrazelluläre Schäden am Mitochondrium angestoßen. Strahlung, Hypoxie, Hyperthermie und Zellgifte tragen dazu bei, dass es zur Störung des mitochondrialen Milieus kommt [45]. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, erhöht sich die Permeabilität der mitochondrialen Membran, sodass vermehrt mitochondriale Bestandteile ins Zytosol gelangen (s. Abb. 1). Dazu gehören unter anderem Cytochrom C und smac/DIABLO (Second mitochondrial activator of caspases/direct inhibitor of apoptotic proteins binding protein of low isoelectric point), die proapoptotisch wirken. Cytochrom C verursacht die Bildung eines Apoptosoms, ein Proteinkomplex zum Abbau fehlerhafter oder ausgedienter Proteine, u. a. durch die Aktivierung von Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) und Procaspase 9 sowie Desoxyadenosintriphosphat (dATP) [43, 45, 46]. Im Anschluss wird Procaspase 9 zur aktiven Caspase 9 gespalten. Smac/DIABLO hingegen hemmt die Funktion der IAP-Familie (Inhibitor of apoptotic proteins) durch eine direkte Bindung, sodass deren inhibitorischer Effekt ausbleibt und die Apoptose weiter voranschreitet (s. Abb. 1) [43, 45, 47]. Entscheidend für die Initiierung oder Inhibierung über diesen Weg sind Proteine der Bcl-2-Familie (B-cell follicular lymphoma-2). Zu ihr gehört eine große Anzahl an Proteinen, die sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken. Sie haben sowohl hemmende als auch aktivierende Effekte aufeinander. Zudem nehmen sie Einfluss auf die Transkription, die posttranslationale Modifikation und die Translokation [43]. Da es sich um multiple und sich gegenseitig beeinflussende, komplexe Vorgänge handelt, sind noch längst nicht alle Interaktionen und Wirkmechanismen aufgeklärt. Bcl-2 und Bcl_{xL} (*B-cell follecular lymphoma extra Large*) sind Vertreter der antiapoptotischen

Seite, wohingegen Bax (Bcl-2-assoziiertes X Protein) und zahlreiche weitere proapoptotisch wirksame Proteine sind [43, 45, 47].

Im Kontext der Apoptose findet sich p53 als Schlüsselprotein wieder, da es verantwortlich für die Regulation des Zellzyklus ist. Finden sich bei der Proliferation irreparable Unregelmäßigkeiten oder Fehlfunktionen, wird die Zelle durch p53 in einen Zellarrest versetzt [48], indem direkt Bax und Apaf-1 aktiviert werden [43]. Auf die Regulation durch p53 kann durch die Beeinflussung der Transkriptionsfähigkeit von p53 Einfluss genommen werden. Ein Beispiel stellt die Familie der NF κ B (Nekrosefaktor κ B), bestehend aus fünf Einzelproteinen, dar, die vor allem in Entzündungsprozessen eine Rolle spielen und sich in inaktiver Form im Zytosol befinden. Erst nach Aktivierung translozieren sie in den Kern und nehmen Einfluss auf die Genexpression. Hier konkurrieren sie mit p53 und hemmen es dadurch. Das Überwiegen von NF κ B führt zu einer Stimulation von c-IAP-1 und -2 sowie x-IAP (Teil der IAP-Familie) und weiteren Proteinen, die antiapoptotische Effekte aufweisen [47].

Die gemeinsame Endstrecke der beiden Apoptosewege beginnt mit der Aktivierung der Procaspase 3 zur Caspase 3 (s. Abb. 1). Diese proteolytische Abspaltung kann durch jegliche Initiatorcaspase durchgeführt werden. Caspase 3 hat daraufhin verschiedene Angriffspunkte. Zunächst baut sie den Inhibitor der Caspase aktivierten DNAse (CAD), einer Endonuklease, ab, sodass es im Zellkern zur Kondensation der DNS kommt. Des Weiteren führt Caspase 3 durch Umstrukturierung des Zytoskeletts zur Zerlegung der Zelle in einzelne Vakuolen, die von der Zellmembran umgeben und von Makrophagen oder dendritischen Zellen phagozytiert und somit entfernt werden [45]. Durch die vornehmlich stattfindende Phagozytose wird die Zelle in der Apoptose ohne Umgebungsreaktion, kontrolliert abgebaut.

1.4 Nekrose

Da sowohl Apoptose als auch Nekrose ähnliche Ursachen haben können, ist es daher Gegenstand der Forschung, den Scheidepunkt zwischen Apoptose und Nekrose aufzudecken [44, 45]. Ein akuter Energiemangel, wie z. B. bei einer akuten Ischämie, führt analog zur Apoptose zur Verschiebung des Elektrolythaushalts. Im konkreten Fall der Neuronen bricht das Membranruhepotential zusammen, wodurch es zu einer Freisetzung von Glutamat an den Synapsen kommt und es bei Hyperexzitation zur Excitotoxizität von Neuronen kommt [44]. Als essenzielles Ion gilt Calcium in der Zellhomöostase. Schadensbedingt kommt es zum Calciumeinstrom von extrazellulär und aus dem endoplasmatischen Retikulum. Zudem strömt Natrium in die Zelle, zieht sekundär Wasser mit sich und führt zum Zellödem [44, 45]. Wie bei der Apoptose werden die Mitochondrien in Mitleidenschaft gezogen und dadurch Cytochrom C freigesetzt. Des Weiteren entstehen auch hier ROS u. a. als Nebenprodukt von sauerstoffabhängigen Stoffwechselprozessen. Eine hypoxisch bedingte Azidose erhöht zusätzlich die Radikalbildung. Lysosomale und zytoplasmatische Proteasen, wie Calpain und die bereits bekannten Caspasen, sind Hauptkomponenten der Nekrose [44]. Der o. g. Calciumeinstrom führt zur Calpainaktivierung. Die Lysosomenmembran wird durch ROS und spezifische Hydrolasen angegriffen, wodurch die lysosomalen Proteasen, sogenannte Cathepsine, freigesetzt werden. Calpain baut das Zytoskelett ab, während die Cathepsine essenzielle Proteine degradieren und über die Aktivierung von Caspase 11 eine weitere Kaskade an Proteasen aktiviert [44]. Trotz der Parallelen zur Endstrecke der Apoptose während der Nekrose wird von einer inadäquaten Caspasen-Aktivierung ausgegangen, so wie auch andere zelluläre Prozesse fehlreguliert aktiviert werden [44]. Schlussendlich kommt es zur Lyse der Zelle. Eine Vakuolenbildung durch Neuformierung des Zytoskeletts (*Blebbing*) bleibt Dementsprechend freiliegende intrazelluläre Bestandteile führen zur aus. Aktivierung des Immunsystems und einer sekundären Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes [44, 45].

1.5 Experimentelle Herangehensweise

1.5.1 In Vitro Hypoxiemodelle

In der Hypoxieforschung haben sich über die letzten Jahre zahlreiche *in vitro* Modelle zur Hypoxieinduktion und -aufrechterhaltung etabliert, die im Folgenden eingehender beleuchtet werden:

• Hypoxiekammer

Silverthorn *et al.* beschrieben 2009 in ihrem Versuchsaufbau mit Melanozyten eine Hypoxiekammer (Fa. Billups-Rothenberg, Del Mar, USA) zur Induktion einer sauerstoffarmen Umgebung. Hierbei handelt es sich um eine Kammer von ca. 30 cm Durchmesser, die luftdicht verschlossen werden kann. Über eine zuführende Leitung wird über 5 Min. ein Gasgemisch aus 94 % Stickstoff (N₂), 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂), und 1 % O₂ in die Kammer geleitet, während über eine abführende Leitung die vorherige Atmosphäre ausgeleitet wird. Die atmosphärische O₂-Konzentration lag konstant bei 1 % [49]. Eine Messung der tatsächlichen Konzentration im Medium erfolgte nicht. Vorteilig ist, dass die Hypoxieinduktion der Atmosphäre prompt und das Gasgemisch anfangs für die Hypoxie frei wählbar ist. Zudem ist die Hypoxiekammer handlich und ist für eine Kultur innerhalb eines üblichen Zellkulturschranks geeignet. Von Nachteil ist die fehlende Modifizierbarkeit des Gasgemischs. Eine Probenentnahme während einer laufenden Versuchsreihe ist nicht möglich. Nachteilig ist zudem die Exposition der Zellen gegenüber normaler Atmosphäre bei der Probengewinnung.

• Hypoxiebank

Esteban und Maxwell induzierten eine *in vitro* Hypoxie mithilfe der InVivo2 1000 *workstation* (Fa. Baker Ruskinn, Sanford, USA) [50]. Es handelt sich hierbei um eine Arbeitsbank mit zwei abgeschlossenen Kammern, zu denen man Zugriff über in die Wand eingelassene Handschuhe hat. Für beide Kammern lassen sich unterschiedliche atmosphärische Sauerstoffkonzentrationen einstellen. Für eine komplette Anoxie ist ein Palladium-Katalysator nötig, der unter Zusatz von Wasserstoff jeglichen atmosphärischen Sauerstoff verbraucht. Vorteilhaft ist das gleichzeitige Kultivieren, Bearbeiten und Probengewinnen von beispielsweise Zellkulturen, ohne die Atmosphäre zu verändern. Gebrauchsmaterialien können problemlos über eine Schleuse in die Arbeitskammern überführt werden. Die Sauerstoffkonzentration der Umgebung wird konstant gemessen und von der Arbeitsbank dementsprechend angepasst. Nachteilig ist der hohe Platzbedarf der Hypoxiebank. Eine direkte Messung im Medium hat diese Forschungsgruppe nicht durchgeführt.

• Enzymatische Hypoxieinduktion

Die Arbeitsgruppe um Olechnowicz nutzte AnaeroGen Beutel (Oxoid, Fa. Waltham, USA), die ThermoScientific, für eine atmosphärische Sauerstoffkonzentration von < 1 % angegeben wird [51]. Hierfür wird neben den Beuteln ein luftdichtes Gefäß benötigt. Laut Herstellerangaben werden weder Wasser noch ein Katalysator für die Reaktion gebraucht. Neben dem Abfall der Sauerstoffkonzentration entsteht gleichzeitig CO₂, das Konzentrationen von 9-13 % erreichen kann. Zudem handelt es sich um eine exotherme Reaktion. Der Beutel kann dadurch Temperaturen von bis zu 65 °C erreichen. Aufgrund der hohen CO2-Konzentration und des Temperaturanstiegs verändern sich neben der O₂-Konzentration zusätzliche Umgebungsfaktoren, was je nach Zellkultur bereits zu unphysiologischen Lebensbedingungen führt.

Nach einem ähnlichen Prinzip arbeiteten Baumann et al. 2008. Sie entwickelten ebenfalls ein enzymatisches Modell, in dem eine Verminderung der Sauerstoffkonzentration um 96 % erreicht wurde. Unter Sauerstoffverbrauch bildet die Glucose-Oxidase aus Glucose Glucuronsäure und Wasserstoffperoxid. Letzteres gilt als potenziell toxisches Radikal, das daher durch das Enzym Katalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut wird. Hiermit wird neben der Hypoxie auch ein Zustand des Glucosemangels hergestellt. In Abhängigkeit von Enzymaktivität und Glucosekonzentration konnte in ihrer Versuchsreihe eine Hypoxiedauer von 6 Stunden induziert werden [52]. Von Vorteil ist die Kultivierbarkeit der Zellen innerhalb eines üblichen Zellkulturschranks. Zur isolierten Untersuchung einer Hypoxie ist dieses Modell jedoch ungeeignet, da ein gleichzeitiger Glucosemangel besteht. Zudem ist eine genaue Konzentrationsfindung der Enzyme notwendig, um die geplante Hypoxiezeit zu erreichen.

• Hypoxieschrank

Neben den genannten Modellen gibt es des Weiteren Inkubatoren, die zur Etablierung einer Hypoxie geeignet sind. Sie sind vergleichbar mit den üblichen

Zellkulturschränken, jedoch kann bei diesen Inkubatoren das Gasgemisch variiert werden. Deschepper *et al.* nutzten 2010 einen CO₂-/O₂-Inkubator der Firma BINDER (Tuttlingen, Deutschland) zur Induktion einer Hypoxie in mesenchymalen Stammzellen. Das Gasgemisch in ihrem Ansatz bestand aus 1 % O₂, 5 % CO₂ und 95 % N₂. Sie erzielten über einen Beobachtungszeitraum von zwölf Tagen ein konstant niedriges Sauerstoffniveau im Zellkulturmedium. Der Abfall von 21 % auf < 5 % dauerte vier Stunden, unabhängig von An- oder Abwesenheit von Zellen. Nach zehn Stunden war die vorgegebene atmosphärische Konzentration von 1 % erreicht. Bei gleichzeitigem Zellwachstum war die Anpassung bereits nach fünf Stunden erreicht und die Sauerstoffkonzentration sank im Verlauf noch weiter bis auf 0,2 % [53]. McKay *et al.* nutzten 2017 einen vergleichbaren Inkubator der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland). Das Gasgemisch bestand aus 2 % O₂, 5 % CO₂ und 93 % N₂. Der Untersuchungszeitraum betrug sieben Tage [54]. Allerdings wurde hier keine Kontrollmessung der Sauerstoffkonzentration im Medium oder der Atmosphäre durchgeführt.

Es handelt sich um ein sehr leicht reproduzierbares Modell mit konstantem Niveau der Sauerstoffkonzentration. Die Hypoxieinduktion ist jedoch nicht unmittelbar. Zudem kann unter diesen Bedingungen weder ein Mediumwechsel noch eine Entnahme von einzelnen Proben erfolgen, ohne die Atmosphäre zu stören und die Hypoxie zu unterbrechen.

1.5.2 EPO und cEPO-Fc

Das körpereigene Hormon Erythropoietin (EPO) wird unter anderem in der Leber, dem Gehirn, dem Uterus, aber vor allem in den Nieren produziert [41]. Die Hauptfunktion des EPOs liegt in der Förderung der Ausdifferenzierung der Erythrozyten aus Progenitorzellen durch Hemmung der Apoptose. Abgesehen von der Hämatopoese fördert EPO aber auch zum einen den Gewebeerhalt und dessen Regeneration nach Schäden, zum anderen spielt es während der Embryonalphase eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) [55]. Der ursprüngliche klinische Nutzen des EPOs, die Anämiebehandlung, wurde seit der Erkenntnis dieses zytoprotektiven Effekts mit Hinblick auf neue Therapiekonzepte um einige Forschungsbereiche erweitert. Beispielsweise wird der Nutzen von EPO bei Myokardinfarkt, schweren neurologischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, zerebralem Insult, Friedreich Ataxie, diabetischer Retinopathie und bei Rückenmarksläsionen unterschiedlicher Genese erforscht [56-58]. Im Kontext der COVID-19-Pandemie (SARS-CoV-2) wird der Einfluss von EPO bei schweren Erkrankungsverläufen untersucht [59].



Abb. 2: Schematische Darstellung der intrazellulären Prozesse bei EPO-Bindung an seinen Rezeptor (eigene Abbildung)

Nach Autophosphorylierung Aktivierung von Jak2 und STAT5 sowie Ras und NFκB (via Zwischenschritte) mit Induktion antiapoptotischer Proteine, die zur Hemmung des Apoptosoms führen. Nicht dargestellt: Einfluss auf die Permeabilität der Mitochondrienmembran. Grün unterlegt = antiapoptotisch, lila unterlegt = proapoptotisch, blau unterlegt = nimmt Einfluss auf Transkription, orange unterlegt = Caspasen

Abkürzungen: Bcl_{xL} = B-Zell follikuläres Lymphom *extra large*, EPO = Erythropoietin, Erk1/2 = *extracellular-signal regulated kinase 1* bzw. 2, IAP = Inhibitor von Apoptose-Proteinen, Jak2 = Janus-Tyrosinkinase 2, P = Phosphorylierung, NF κ B = Nekrose Faktor κ B, Ras = *Rat sarcoma*, STAT5 = *signaltranducer and activator of transcription 5*

Ebenfalls Gegenstand der Forschung ist der genaue Mechanismus, mit dem EPO auf die betroffenen Zellen wirkt. Bisher ist bekannt, dass der EPO-Rezeptor (EPO-R) für die Hämatopoese ein Homodimer-Komplex aus EpoR-EpoR ist. Hierbei handelt es sich um einen Janus-Tyrosinkinase 2 (Jak2) assoziierten Rezeptor, der ebendiese Jak2 durch Phosphorylierung aktiviert. Über den intrazellulären Weg der signaltranducer and activator of transcription (STAT)-Proteine und der extracellular signal-related kinases (ERKs) wird im Zellkern die Transkription zugunsten der Apoptosehemmung reguliert (vgl. Abb. 2) [55]. Insbesondere Effektorcaspase 3, die vor allem mit DNS-Spaltung assoziiert ist (s. Kapitel 1.3), wird durch EPO an ihrer Funktion gehindert. Ein weiterer Initiationsweg des programmierten Zelltods ist Cytochrom C vermittelt und damit mitochondrienassoziiert. Auch dieser Zweig kann durch EPO sowohl durch direkte Hemmuna als auch durch Über Mitochondrienstabilisierung unterbunden [41]. mehrere werden Zwischenschritte ist zusätzlich eine NFkB Translokation in den Nukleus für die Neuroprotektion notwendig [60].

Wie Brines et al. 2004 feststellten, wird die zytoprotektive Wirkung an vielen Zelltypen durch einen Rezeptorkomplex aus dem bekannten EpoR-Anteil und einem Common-β-Rezeptor-Anteil (βcR) vermittelt. Wird nur dieser heterodimere Rezeptor (EpoR-βcR) angesprochen, entfallen die systemischen Nebenwirkungen von EPO [61], wie beispielsweise ein erhöhtes Risiko für thrombembolische Ereignisse oder die Entwicklung von Bluthochdruck [62, 63]. Dieser Zusammenhang entsteht dadurch, dass EPO systemisch auf die Hämatopoese wirkt - nicht nur auf die Differenzierung der Erythrozyten, sondern in höheren Konzentrationen und, vor allem in Kombination mit Thrombopoetin, auch auf die Bildung von Megakaryozyten und somit Thrombozyten. EPO erhöht die Adhäsion der Erythrozyten und Thrombozyten an das Gefäßendothel, wodurch es bei einer Polyzythämie zu lebensgefährlichen thrombembolischen Ereignissen, wie Schlaganfall oder Herzinfarkt, kommen kann. Ein weiterer Effekt ist die Erhöhung des arteriellen Blutdrucks, der am ehesten auf dem erhöhten Hämatokrit durch die gesteigerte Hämatopoese beruht. Problematisch ist außerdem, dass EPO förderlich auf das Wachstum von Tumorzellen und die Tumor-Angiogenese wirken kann [56, 62, 63].

In einigen Tiermodellen konnte bereits gezeigt werden, dass es unter dem Einfluss von EPO zu einer geringeren Rate an histopathologisch nachweisbarem Zellsterben und teilweise zu einem besseren klinischen *Outcome* der Tiere während einer Ischämie-/Reperfusionssequenz kam [64-67].

Die Problematik, der man sich zu stellen hat, ist, dass in den Versuchen sehr hohe intravenöse Dosen von EPO nötig waren, um den gewünschten Effekt nachzuweisen. Am ehesten hängt dies mit der Größe des Hormons zusammen: Mit 30,4 kDa [68] ist es formal zu groß, um die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, um am Rückenmark seinen zytoprotektiven Effekt bewirken zu können [69]. Brines *et al.* fanden in diesem Zusammenhang die EpoR-Expression an der Blut-Hirn-Schranke. So ist die Transzytose des EPOs in das ZNS möglich. Allerdings werden erst bei extrem hohen intravenösen Gaben relevante Konzentrationen im ZNS und damit der gewünschte Effekt erreicht [69]. Wie bereits erwähnt, steigt durch die hohen EPO-Konzentrationen auch das Risiko für systemische Komplikationen. Zur Drucküberwachung und -entlastung des Spinalraums aufgrund des erhöhten zerebralen Blutflusses wird in einigen Kliniken ein perioperativer Spinalkatheter gelegt [22]. Eine intrathekale Gabe von EPO über diesen Spinalkatheter findet bisher nur auf experimenteller Ebene statt [70].



Abb. 3: Schematischer Aufbau eines cEPO-Fc-Moleküls (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Brigitta Vclar, Polymun Scientific GmbH, Österreich) Zwei Moleküle carbamyliertes Erythropoietin (cEPO) sind über die *Hinge-region* mit dem Fc-Teil (*fragment, cristallizable*) eines Immunglobulins verbunden. Gekennzeichnet sind die carbamylierten Regionen (*carbohydrate*) und Disulfidbindungen (*disulfide bond*) innerhalb des Moleküls.

Eine Alternative zum herkömmlich genutzten rekombinanten humanen Erythropoietin (rhEPO) ist das carbamylierte Erythropoietin (cEPO). Es wurde für eine längere Plasmahalbwertszeit mithilfe des Fc-Teils (fragment, cristallizable) eines humanen IgG-Antikörpers (Immunglobulin G) zu einem Fusionsprotein gekoppelt (s. Abb. 3). Dabei sind zwei EPO-Moleküle mit einem Fc-Teil fusioniert (EPO-Fc). Anschließend wurde das gesamte Molekül carbamyliert (cEPO-Fc) und jede Charge im Tiermodell auf die Effektivität der Hämatopoesehemmung überprüft. Diese chemische Modifikation hat den Vorteil, dass es überwiegend an den EpoRßcR-Rezeptor bindet und somit die oben genannten Nebenwirkungen, wie die erhöhte Thromboseneigung, ausbleiben, während der zytoprotektive Effekt weiterhin erhalten bleibt [42, 66].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Da die molekularbiologischen Vorgänge während einer Aortenokklusion mit paralleler Ischämie und Reperfusion des Rückenmarks noch weitestgehend ungeklärt sind, stellt sich die Aufklärung dieses Prozesses als klinisch relevant dar. Durch vorherige Untersuchungen im Tiermodell, in denen sich ein zytoprotektiver Effekt von EPO und cEPO-Fc auf Neuronen gezeigt hat, werden in diesem Projekt diese beiden Agentien genutzt [66, 71]. Im Gegensatz zum Tiermodell kann innerhalb einer Zellkultur der molekularbiologische Effekt eines isolierten Sauerstoffmangels (Hypoxie) mit anschließender erneuter Sauerstoffzufuhr (Reoxygenierung) genauer untersucht werden. Im Tiermodell lassen sich Einflussfaktoren, wie Nährstoffmangel und Immunreaktion, als Teil einer Ischämie/Reperfusionssequenz nicht ausschließen.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, das ideale Hypoxiemodell für neuronale Zelllinien zu finden, mit dem eine Hypoxie/Reoxygenierungssequenz simuliert werden kann. Hierfür wurden folgende Kriterien definiert:

- Ein konstanter O₂-Gehalt im Zellmilieu von < 5 % (der Ausgangswert unter Standardatmosphäre wird auf 100 % gesetzt)
- Eine sofortige Hypoxieinduktion, Zeitfenster < 1 h
- Eine Probenentnahme möglichst ohne Störung des Milieus
- Die anwenderunabhängige Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen
- Die Modifizierbarkeit von Einzelfaktoren (bspw. O2-Gehalt, Zusatz von Medikamenten)
- Eine Übertragbarkeit auf verschiedene neuronale Zelllinien, perspektivisch auch auf nicht-neuronale Zelllinien

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die anschließende Etablierung eines geeigneten Versuchsprotokolls für die genutzten Zelllinien in Abhängigkeit der jeweiligen Hypoxietoleranz.

Als Endpunkte unter Hypoxie galten:

- Stagnierende oder reduzierte Viabilität im MTT-Assay
- Aktivierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF-1α)

• Veränderte Zellmorphologie durch subjektive Beobachtung

Im Anschluss an die Etablierung eines geeigneten Modells wurde der Einfluss von EPO und cEPO-Fc auf die neuronalen Zellen untersucht.

Folgende wissenschaftliche Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Wie verändert sich die Viabilität der Zelllinien während Hypoxie und Reoxygenierung?
- Wie werden pro- und antiapoptotische Proteine in den jeweiligen Zelllinien unter Hypoxie und Reoxygenierung reguliert?
- Wie werden die Proteinregulation und die Viabilität durch EPO und cEPO-Fc beeinflusst?
- Gibt es einen dosisabhängigen Einfluss der beiden Substanzen?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien und damit assoziierte Materialien

Für die Versuche wurden drei Zelllinien genutzt:

Neuro-2A (murines, spontanes Neuroblastom), SH-SY5Y (humane Knochenmarksmetastase eines Neuroblastoms) und IMR-32 (abdominelle Metastase eines humanen Neuroblastoms) wurden vom Leibniz Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Braunschweig) bezogen. Bei den Zelllinien handelt es sich um adhärent bis semiadhärent wachsende Zellen.

Für die Versuche mit Neuro-2A und IMR-32 wurden Passagierungsphasen zwischen P3-P29 genutzt, für SH-SY5Y zwischen P4-P8. Für letztere fand sich in der Literatur die Empfehlung zu möglichst niedrigen Passagierungsphasen [72]. Für Neuro-2A und IMR-32 waren keine Restriktionen zu finden. Dennoch wurde hier eine eher niedrige Passagierungsphase bevorzugt, um mögliche spätere Spontanmutationen der Zellen zu vermeiden.

Produkt	Hersteller und Sitz	
100x Minimum Essential Medium (MEM), Non Essential Aminoacids (NEAA)	Gibco® ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	
Cell Culture Dishes PS 100x20 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	
CryoTubes Cryo S.	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco® ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) [-] CaCl ₂ [-] MgCl ₂	Gibco® ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	
Fetal Bovine Serum (FBS) Superior	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland	
Gentamycin 10 mg/ml	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland	
Neubauer Zählkammer		
RPMI-Medium 1640	Gibco® ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	

Produkt	Hersteller und Sitz	
Tissue Culture Flask T25, T75 red Vent	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	
Tissue Culture Plate 96well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	
Trypsin/EDTA	PAN/Biotech, Aidenbach, Deutschland	
Tabelle 1: Übersicht über die genutzten Materialien in der Zellkultur		

2.1.2 Antikörper und Reagenzien

Produkt	Hersteller und Sitz	
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	
Acrylamid	Serva, Heidelberg, Deutschland	
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Anti-AMPK-β #4178	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien	
Anti-Bax #2772	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien	
Anti-Bcl2 #2876	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien	
Anti-Bcl _{xL} #2762	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien	
Anti-Caspase 3 #9665	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien	
Anti-Caspase 9 #9502	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien	
Anti-Caspase 9 #9504	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien	
Anti-cIAP #4952	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien	
Anti- <i>cleaved</i> Caspase 3 #9661	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien	

Produkt	Hersteller und Sitz
Anti- <i>cleaved</i> Caspase 9 #9509	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien
Anti- <i>cleaved</i> Caspase 9 #9505	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien
Anti-Cytochrom C #4272	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien
Anti-HIF1α #3716	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien
Anti-HIF1α ab113642	Abcam®, Cambridge, Großbritannien
Anti-smac/DIABLO #2954	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien
Anti-smac/DIABLO ab32023	Abcam®, Cambridge, Großbritannien
Anti-xIAP #2042	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraktion V	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Carbamyliertes Erythropoietin Fc (cEPO-Fc) 972 μg/ml	Polymun Scientific GmbH, Klosterneuburg, Österreich
Clarity™ Western ECL Substrate	BioRad, Hercules, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Erythropoietin (EPO) 75.000 IU/ml	Polymun Scientific GmbH, Klosterneuberg, Österreich
Glycerin wasserfrei	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerol 99 %	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Goat-Anti-Rabbit IgG sc-2004	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Horse-Anti-Mouse IgG HRP linked #7076	Cell Signaling Technology®, Cambridge, Großbritannien

Produkt	Hersteller und Sitz	
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
IGEPAL®	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Methanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
PageRuler	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Protein Assay Farbstoff Konzentrat	BioRad, Hercules, USA	
SDS	Serva, Heidelberg, Deutschland	
SuperSignal® West Femto	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	
Thiazolylblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Tris Base	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Tris HCI	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Trypan Blau Solution	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Tween® 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Tabelle 2: Übersicht über die genutzten Antikörper und Reagenzien		

2.1.3 Geräte und damit assoziierte Materialien

Produkt	Hersteller und Sitz
Absaugsystem Integra Vacusafe	Integra Bio Science, Biebertal, Deutschland
Autoklav VX-95	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Blood Gas Analyzer ABL725	Radiometer GmbH, Krefeld, Deutschland
Blotting Kammer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Brutschrank HeraCell 240	Heraeus, Hanau, Deutschland
Cell-Imager JULIBr Live cell movie analyzer mit 2 Monitoren	NanoEnTek, Seoul, Südkorea
ChemiDoc™ MP Imgaging System	BioRad, Hercules, USA
Eismaschine Scotsman Frimont AF 80	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Feinwaage "Extend Sartorius"	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Hera Freeze, HFU T Series	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Heraeus FRESCO 17 Zentrifuge	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Heraeus Megafuge 40R Centrifuge	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Hypoxia Incubator Chamber	Stemcell™ Technologies, Vancouver, Kanada
IKA Schüttler MTS4	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
Laborwaage "EK-3000i"	A&D Company, Toshima, Japan
Magnetrührer MS4 basic	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
Magnetrührer RSM-10HS	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus Life Science, Müchen, Deutschland
Mini Shaker Multi Bio 3D	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Produkt	Hersteller und Sitz
----------------------------------------------	------------------------------------------------------
Mini-Protean® Tetra System	BioRad, Hercules, USA
Multiskan EX	Labsystems, Helsinki, Finnland
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nitrocellulose Membranes 0,45 µm	BioRad, Hercules, USA
Perfect Spin Mini	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
pH-Meter "Five Easy"	Mettler Toledo, Columbus, USA
Plattenschüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Powersupply Power Pac HC	BioRad, Hercules, USA
Safe 2020 Bench	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Schüttel-Wasserbad "WNE 14"	Memmert, Schwabach, Deutschland
Schweißgerät "AIE-205 AC 120 V 60 Hz"	American International Electric, Kalifornien, USA
Seven2Go Pro mit Handgerät	Mettler Toledo, Columbus, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Whatman® Chromatography Paper	GE Healthcare, Chicago, USA
Whitley H35 Hypoxystation	Meintrup dws, Herzlake, Deutschland
Tabelle 3: Übersicht über die genutzten Gerä	te und damit assoziierte Materialien

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller und Sitz
5 ml Polystyrene Round Bottom Tube	Falcon® Corning Inc., Corning, USA
Cell Star® Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
CellScraper 25 cm 2 position blade	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Combistopper rot/blau	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Drei-Wege-Hahn, Discofix® C 3SC	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Einkanalpipetten "Eppendorf Research Plus" 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einkanalpipetten "Eppendorf Research" 10, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Extension Line Typ Heidelberger 75 cm	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Glasflaschen 100, 250, 500, 1000 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
	DWK Life-Science, Wertheim, Deutschland
	Bohemia Cristal, Selb, Deutschland
Küvetten 10x4x45 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Luer-Lock-Einwegspritzen, 50 ml	BD-Plastipak, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Mehrkanalpipette "Eppendorf Research 300"	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Omnifix® 50 ml	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Omnifix® Luerlock solo 20 ml	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Parafilm "M"	Bemis, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl	StarLab, Hamburg, Deutschland
Pipettus "Accupette"	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettus "Eppendorf Easypet"	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettus "Neo-Accupette 3-9905"	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Pipettus Hirschmann	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland

Produkt	Hersteller und Sitz			
Reagiergefäß 1,5 ml, 2 ml ungefärbt	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland			
Reagiergefäß SafeSeal 1,5 ml braun	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland			
Reagiergefäß SafeSeal 1,5 ml, 2 ml ungefärbt	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland			
Silikonstopfen	Neolab, Heidelberg, Deutschland			
Sterican® Einmalkanülen 0,8x120 mm 21 G	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland			
Stripette® 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml Costar®	Corning Inc., Corning, USA			
V.A.C.®-Folie	KCI Medical, San Antonio, USA			
Tabelle 4: Übersicht über die allgemeinen Verbrauchsmaterialien				

2.1.5 Verarbeitungsprogramme

Produkt	Hersteller und Sitz		
Ascent™ Software for Multiskan	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA		
EndNote X7	Thomson Reuters, Toronto, Kanada		
GraphPad Prism 8.3.0 bis 9.2.0	GraphPad Software, LLC, San Diego, USA		
Image Lab 4.1	BioRad, Hercules, USA		
Microsoft Office Word und Excel 365	Microsoft, Albuquerque, USA		
NanoDrop 2000c	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA		
Sigma Plot 13.0	Systat Software, Inc., San Jose, USA		
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Verarbeitungsprogramme			

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die Neuro-2A und SH-SY5Y wurden in T75-Flaschen, die IMR-32 in 10 cm Zellkulturschalen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und ab einer Besiedelung der Flasche von 80-90 % passagiert. Ein Mediumwechsel fand mindestens alle drei Tage statt.

Zur Passage der adhärent wachsenden Zellen (SH-SY5Y und Neuro-2A) wurde unter steriler Atmosphäre das Medium aus den Flaschen abgenommen und die Zellen daraufhin mit 10 ml DPBS gewaschen. Mit 1,5 ml Trypsin/EDTA (Pan/Biotech) und unter leichtem Beklopfen der Flasche wurde die Adhärenz gelöst. 6 ml Nährmedium neutralisierten das Trypsin und das Lysat wurde vollständig in ein 15 ml Falcon überführt. Dieses wurde mit 200 x g (Zentrifugalkraft) über 5 Min. zentrifugiert und der Überstand danach abgenommen. Es erfolgte eine Resuspension des Zellpellets in 10 ml DPBS und erneute Zentrifugation. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und die Zellen in 10 ml Nährmedium aufgenommen. Meist erfolgte bei den SH-SY5Y eine 1:2- bis 1:3-Teilung, bei den Neuro-2A eine 1:4- bis 1:5-Teilung der Zellen. Die Kulturflaschen wurden zum Schluss auf ein Gesamtvolumen von 12 ml Nährmedium aufgefüllt. Die Zusammensetzung der jeweiligen Zellkulturmedien ist in Tabelle 6 zu finden.

Zur Passage der IMR-32 wurden die Zellen anfangs kurz in der Schale mit 10 ml DPBS gewaschen, dieses wurde wieder abgenommen und die Zellen in 10 ml frisches DPBS geklopft. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation bei 200 x g über 5 Min. Das DPBS wurde verworfen und das Zellpellet in 10-12 ml RPMI-Medium gelöst und zwischen 1:2 bis 1:4 gesplittet.

Medium	Zusätze
Kulturmedium Neuro-2A	500 ml DMEM
DMEM	10 % FBS
	1 % 100x Non-Essential-Aminoacid
	0,5 % Gentamycin

Medium	Zusätze	
Kulturmedium SH-SY5Y	500 ml RPMI	
RPMI	20 % FBS	
	0,5 % Gentamycin	
Kulturmedium IMR-32	500 ml RPMI	
RPMI	20 % FBS	
	0,5 % Gentamycin	
	1 % 100x Non-Essential-Aminoacid	
Hypoxiemedium	Jeweils obiges Medium	
	+ 25 mM HEPES	
Tabelle 6: Zusammensetzung der Zellkulturmedien für Neuro-2A, SH-SY5Y und IMR-32		

sowie des jeweiligen Hypoxiemediums

2.2.2 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde ein Cryo-Tube mit Zellen aus dem flüssigen Stickstoff bei -160 °C entnommen und direkt im 37 °C warmen Wasserbad geschwenkt, bis sich das Pellet im Tube gelöst hatte. Das Pellet wurde im Anschluss in 50 ml 37 °C warmes Medium in ein entsprechendes Falcon gegeben und bei 200 x g für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 12 ml Medium resuspendiert, in eine T75-Flasche respektive 10 cm Schale gegeben und im Brutschrank kultiviert. Nach spätestens drei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Bei dichter Besiedelung (80-90 %) erfolgte die erste Passage, wie oben beschrieben.

2.2.3 Entwicklung des Hypoxiemodells

Orientierend an den Arbeiten von Jäger (2011) an Nierenzellen wurde dieses Modell auf Nervenzellen übertragen. Dafür wurden 30 ml des HEPES-gepufferten Zellkulturmediums in 50 ml-Spritzen aufgenommen und darin durch Verschließen der Spritzenöffnung mithilfe eines Dreiwegehahns und zehnmaliges Aufziehen des Kolbens mittels Unterdruck entgast [42]. Für die Messung der O₂-Sättigung wurde über einen Dreiwegehahn 1 ml des so entgasten Mediums in eine 1 ml-Spritze abgezogen und in einem Blutgasanalyse-Gerät (Fa. Radiometer Copenhagen, ABL 725) gemessen. Die Ausgangssättigung von O2 im Medium wurde auf 100 % gesetzt. Davon ausgehend sollte eine Reduktion der O₂-Sättigung auf < 5 % erzielt werden. Die Hypoxieinduktion sollte möglichst schnell ablaufen. Der Zeitrahmen wurde auf < 1 h festgelegt. Daher wurde in einem zweiten Modell, basierend auf Allen und Schneider (2001), das Medium vor der eigentlichen Hypoxie über 4 h in einer Hypoxiekammer (Fa. StemCell™Technologies) desoxygeniert (vgl. Abb. 4) [73]. Hierfür wurde die benötigte Menge eines 25 mM HEPES gepufferten Mediums in ein ausreichend großes Becherglas mit Rührfisch überführt. Die Hypoxiekammer wurde im Anschluss dicht verschlossen und über 4 Min. mit 100 % Stickstoff (N₂) geflutet und die Zugänge zum Schluss abgeklemmt. Die Hypoxiekammer wurde auf einem Rührer platziert und das Medium so über 4 h umgewälzt, bis mithilfe einer direkten O₂-Sättigungsmesssonde (SevenGo Pro, Fa. Mettler Toledo) eine O₂-Sättigung von < 5 % erzielt worden war. Die Messsonde wurde durch eine Bohrung im Deckel mit Abdichtung durch einen Gummistopfen in der Hypoxiekammer platziert. Während des Rührvorgangs befand sich die Sonde außerhalb des Mediums. Zur Messung wurde der Rührer gestoppt und die Sonde im Medium positioniert. Seitlich am Deckel befand sich ein weiteres mit einem Gummistopfen abgedichtetes Bohrloch, durch das vor Verschluss der Kammer eine Heidelberger Verlängerung so positioniert worden war, dass sie von außen in das Medium bewegt werden konnte. Nach Fluten der Kammer wurde sie mithilfe einer Metallklemme verschlossen und befand sich außerhalb des Mediums. Zum Transfer des desoxygenierten Mediums auf die Zellen, ohne zwischenzeitlichen Kontakt zur normalen Atmosphäre, wurde der Rührvorgang und die Heidelberger Verlängerung von außen manuell ins Medium manövriert. Mit einer 10 ml Spritze wurde das Totraumvolumen der Heidelberger Verlängerung abgenommen. Mit einer ausreichend großen Spritze (bspw. 50 ml BD-Plastipak Luer-Lock-Einwegspritzen, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) wurde im Anschluss das Fa. desoxygenierte Medium aus der Hypoxiekammer entfernt und die Spritze mit einem Combi-Stopper verschlossen. Beim Spritzentausch wurde die Heidelberger Verlängerung stets mit der Metallklemme verschlossen.



Abb. 4: Desoxygenierung des Mediums, Ansicht des Aufbaus von oben (A) und seitlich (B) (eigene Abbildungen)

Das Medium befindet sich in einem Becherglas mit Rührfisch innerhalb der Hypoxiekammer. Die Kammer steht auf einem Rührer. Durch den oberen Gummistopfen wird die Sonde zur Messung der Sauerstoffsättigung eingeführt. Die Sonde ist mit einem Handgerät als Messanzeige verbunden. Über den seitlichen Gummistopfen wird die Heidelberger Verlängerung positioniert und durch eine Metallklemme verschlossen. Abgebildet ist eine 50 ml Spritze (Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) zur Entnahme des Mediums.

Für diesen Versuchsaufbau wurden alle Zelllinien in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Zur Hypoxieinduktion wurde das übliche Zellkulturmedium aus den Zellkulturschalen abgenommen. Unter der Sterilbank wurden die Schalen dann in der Hypoxiekammer pyramidenförmig angeordnet. Diese Kammer wurde im Anschluss verschlossen und dann für 4 Min. mit 100 % N₂ geflutet. Nach dem Abklemmen der Zugänge der Kammer wurden, mithilfe 12 cm langer Kanülen, durch die Gummistopfen im Deckel die einzelnen Zellkulturschalen mit 12 ml des desoxygenierten Mediums befüllt. Im Anschluss erfolgte die Kultivierung in der Hypoxiekammer im normalen Zellkulturschrank bei o. g. Bedingungen.

Die Messungen der O₂-Konzentration über 24 h erfolgten im Becherglas. Grund hierfür ist ein ausreichend hoher Flüssigkeitsspiegel für die Messsonde, der mindestens eine Eintauchtiefe von 1,0 bis 1,5 cm ermöglichen sollte. Dies war jedoch weder in den T75 noch in den 10 cm Kulturschalen umsetzbar. Daher war eine Messung bei gleichzeitigem Zellwachstum nicht möglich.



Abb. 5: Hypoxiebank H35 Hypoxystation, Fa. Don Whitley (eigene Abbildung) Frontal zwei Handeingriffe (1), rechts Schleuse (2) und Bedienfeld (3). Entgasung der Ärmel durch Fußpedale (nicht dargestellt). Links neben der Hypoxiebank Handgerät (4) für die Sauerstoffmesssonde. Das Verbindungskabel führt durch einen seitlich gelegenen, abgedichteten Schlitz, sodass auch innerhalb der Hypoxiebank die O₂-Sättigung des Mediums überwacht werden kann.

In einem dritten Modell wurde die Hypoxiebank H35 Hypoxystation der Firma Don Whitley genutzt (s. Abb. 5). Die Atmosphäre wurde auf 94,9 % N₂, 5 % CO₂ und 0,1 % O₂ eingestellt. Die Luftfeuchtigkeit lag bei 65 % und die Temperatur bei 37,0 °C. Um auch innerhalb der Hypoxiebank die Sauerstoffsättigung des Mediums zu bestimmen, wurde die Messsonde hineingeschleust. Da das Handgerät nicht für die erhöhte Temperatur und Luftfeuchtigkeit ausgelegt ist, wurde über einen seitlichen Schlitz an der Hypoxiebank das Verbindungskabel ausgeführt. Der Schlitz wurde mithilfe von selbstklebender, luftdichter Folie für Vakuumverbände (V.A.C.® Folie, Fa. KCI Medical) verschlossen. Auch hier erfolgte die Messung der O₂-Konzentration über 24 h im Becherglas ohne gleichzeitiges Zellwachstum.

Desoxygenierung des Mediums, Zusätze

Zur Vorbereitung des benötigten mit 25 mM HEPES gepufferten Mediums wurde dieses 12 h vor Hypoxiebeginn in einer Glasflasche steril abgefüllt und ein Rührfisch hinzugefügt. Das Medium wurde dann in der Hypoxiebank in geöffnetem Zustand auf einen Rührer gestellt und dort unter kontinuierlicher Umwälzung bis zum Hypoxiebeginn belassen.

Bevor das desoxygenierte Medium auf die Zellen gegeben wurde, wurde es äquivalent auf Falcons für die jeweiligen Gruppen aufgeteilt und die jeweiligen Zusätze (EPO bzw. cEPO-Fc) hinzugefügt:

Gruppe 1: Kontrolle	ohne Zusatz
Gruppe 2: EPO <i>low</i>	+ 0,2 IU/ml
Gruppe 3: EPO high	+ 20 IU/ml
Gruppe 4: cEPO-Fc low	+ 0,2 µg/ml
Gruppe 5: cEPO-Fc high	+ 20 µg/ml

Ermittlung der Hypoxiezeiten der einzelnen Zelllinien

Für die Ermittlung der Hypoxiezeiten wurden die einzelnen Zelllinien unbehandelt einer Hypoxiereihe ausgesetzt. Neben der subjektiven Beurteilung morphologischer Anhaltspunkte, wie Adhärenz der adhärent wachsenden Zelllinien (Neuro-2A und SH-SY5Y) und der Zellsegmentierung, wurden ein Viabilitätsassay mit Tetrazoliumbromid (MTT) (s. Kapitel 2.2.4) und die Bestimmung des Hypoxieinduzierten Faktors 1 α (HIF-1 α) mittels Western Blot durchgeführt. In der Literatur finden sich je nach Versuchsaufbau und Untersuchungsziel unterschiedliche Hypoxiezeiten. Für die murinen Neuro-2A sind Zeiten von 1 h über 3 h und 6 h [74] bis 24 h [74-76] beschrieben. Für die humane Zelllinie IMR-32 werden Hypoxiezeiten von 1 h [77], 7 h [78], 12 h [79] und 72 h [80] genannt. Bei den ebenfalls humanen SH-SY5Y reichen die Hypoxiezeiten von 2 h [81], 6 h und 24 h über 48 h [82] bis 72 h [80]. Darauf basierend wurden für die Ermittlung der idealen Hypoxiezeit folgende Versuchsreihen durchgeführt: Für die Neuro-2A wurden Messintervalle von 2, 12, 18, 24 und 48 h gewählt, für die IMR-32 8, 24, 48 und 72 h und für die SH-SY5Y 2, 12, 18, 24, 48, 72, 96 und 120 h. Hierbei wurden lediglich Kontrollen ohne Zusatz von EPO oder cEPO-Fc untersucht. Der weitere Versuchsaufbau des MTT ist in Kapitel 2.2.4, der des Western Blot in Kapitel 2.2.5 beschrieben.

Hypoxieinduktion mit anschließender Reoxygenierung, Zellen ernten

Die Zelllinien wurden 1-2 Tage vor Hypoxiebeginn in T75-Flaschen (Neuro-2A, SH-SY5Y) bzw. 10 cm-Kulturschalen (IMR-32) ausgesät, sodass zum Zeitpunkt des Hypoxiebeginns eine Dichte von 70 % (Neuro-2A) bzw. 50-60 % (SH-SY5Y und IMR-32) bestand. Vor Überführen der Flaschen in die Hypoxiebank wurde das verbrauchte Zellkulturmedium mittels Vakuumpumpe (IntegraSafe mit IntegraVacuboy) unter der Sterilbank abpipettiert und ein dünner Flüssigkeitsfilm belassen, um die Zellen vor Austrocknung zu schützen. Nach Schleusung in die Hypoxiebank wurden 12 ml des jeweiligen Mediums auf die Zellen gegeben und die Gefäße verschlossen. Nach Durchführung der oben beschriebenen Hypoxiereihen wurden folgende Hypoxiezeiten für die einzelnen Zelllinien festgelegt: für die Neuro-2A 24 h, für die IMR-32 48 h und für die SH-SY5Y 72 h. Die Reoxygenierungszeit betrug bei allen Zelllinien 24 h.

Zur Beendigung der Hypoxie und Induktion der Reoxygenierung wurde nach der jeweiligen Hypoxiezeit von den zur Reoxygenierung vorgesehenen hypoxischen Ansätzen das Medium abpipettiert und durch 12 ml des üblichen Kulturmediums ohne weitere Zusätze ersetzt. Bei fehlender Adhärenz in der Reoxygenierungs-Probe wurde ein Zentrifugationsschritt bei 200 x g über 5 Min. des abgenommenen Hypoxiemediums eingeschoben und das entstandene Zellpellet in 12 ml des üblichen Kulturmediums ohne Zusatz von EPO oder cEPO-Fc resuspendiert und zurück in dieselbe Flasche gegeben. Die weitere Kultivierung erfolgte im normalen Zellkulturschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

Zur Probengewinnung der rein hypoxischen Gruppen (ohne Reoxygenierung) wurde bei makroskopisch bestehender Adhärenz der Zellen noch in der Hypoxiebank das Hypoxiemedium abgenommen und die Zellen für wenige Sekunden mit 10 ml 4 °C kalter DPBS gewaschen. Die Lösung wurde möglichst vollständig mit Hilfe der 100 µl Pipette abgenommen und durch 200 µl RIPA-Puffer

ersetzt. In diesen wurden dann mittels Zellschaber die Zellen abgelöst und danach in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

Bei überwiegend gelösten Zellen wurden mithilfe des Zellschabers die restlich adhärenten Zellen ebenfalls in das Hypoxiemedium in der Flasche gelöst, in ein 15 ml Falcon überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit 10 ml 4 °C kalter DPBS resuspendiert. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in 200 µl RIPA-Puffer gelöst und in einem 1,5 ml Reagiergefäß bei -80 °C gelagert. Zum gleichen Zeitpunkt wurden die Zellen der Normoxie nach oben beschriebenem Protokoll geerntet. Nach Ende der Reoxygenierung wurde ebenso verfahren.

Puffer	Zusatz			
Lyse-Puffer (RIPA/PIC)	150 mM NaCl (aus 5 M NaCl; 1:33,3)			
	1 % IGEPAL [®]			
	0,1 % SDS (aus 20 % SDS; 1:200)			
50 mM Tris pH 8,0 (aus 200 mM Tris; 1:4)				
Tabelle 7: Zusammensetzung des Lyse-Puffers (RIPA/PIC)				

2.2.4 Viabilitätsassay

Zur Beurteilung des Zellüberlebens während Normoxie, Hypoxie und Reoxygenierung wurde ein Viabilitätsassay durchgeführt. Die Grundlage des Tests beruht darauf, dass nur metabolisch aktive Zellen das eingesetzte Salz Tetrazoliumbromid (MTT) umsetzen. Durch die mitochondriale Reduktion wird aus dem gelblichen, wasserlöslichen MTT das blau-violette, wasserunlösliche Formazan. Mit Hilfe eines Photometers kann die Absorption bestimmt und dadurch auf den metabolischen Umsatz und damit indirekt auf die Proliferation der Zellen geschlossen werden [83].

Hierfür wurden die Zellen unter normoxischen Bedingungen auf 96Well Platten ausgesät. Bei den Neuro-2A in einer Konzentration von 5×10³ Zellen/Well, bei den IMR-32 von 1×10⁴ Zellen/Well und bei den SH-SY5Y von 1,2×10⁴ Zellen/Well. In

Vorversuchen boten die jeweiligen Zellzahlen die gewünschte Zelldichte pro Well nach dem jeweiligen Versuchszeitraum, ohne dabei um Platz zu konkurrieren. Wie oben beschrieben, wurde das Medium desoxygeniert und EPO bzw. cEPO-Fc in niedriger und hoher Konzentration hinzugefügt, sodass es pro Gruppe 16 Replikate gab. In Abbildung 6 ist ein beispielhaftes Pipettierschema dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Α	Ко	Ко	EPO	EPO	EPO	EPO	cEPO	cEPO	cEPO	cEPO		Blank
В	Ко	Ко	EPO	EPO	EPO	EPO	cEPO	cEPO	cEPO	cEPO		Blank
С	Ко	Ко	EPO	EPO	EPO	EPO	cEPO	cEPO	cEPO	cEPO		Blank
D	Ко	Ко	EPO	EPO	EPO	EPO	cEPO	cEPO	cEPO	cEPO		Blank
E	Ко	Ко	EPO	EPO	EPO	EPO	cEPO	cEPO	cEPO	cEPO		Blank
F	Ко	Ко	EPO	EPO	EPO	EPO	cEPO	cEPO	cEPO	cEPO		Blank
G	Ко	Ко	EPO	EPO	EPO	EPO	cEPO	cEPO	cEPO	cEPO		Blank
н	Ко	Ко	EPO	EPO	EPO	EPO	cEPO	cEPO	cEPO	cEPO		Blank

Abb. 6: Beispielhaftes Pipettierschema einer 96Well Platte zum Viabilitätsassay mit MTT MTT = Tetrazoliumbromid, Ko = Kontrolle, kein Zusatz zum Medium, EPO = Erythropoietin, cEPO abgekürzt für cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin-Fc, hellgrau hinterlegt = jeweils niedrige Dosierung (0,2 IU/ml bzw. 0,2 μ g/ml), dunkelgrau hinterlegt = jeweils höhere Dosierung (20 IU/ml bzw. 20 μ g/ml), Blank = Medium ohne Zellen, Spalte 11 = Leere Wells

Der vollständige Ansatz umfasste eine normoxische Kontroll-Platte und eine sich an die Hypoxie anschließende Reoxygenierung über den für die Zelllinien vorgegebenen Zeitraum. Die Platten für Hypoxie und Reoxygenierung wurden in die Hypoxiebank geschleust. Dort wurde das vorbereitete Hypoxiemedium zugegeben und die Platten über den zellspezifischen Zeitraum dort kultiviert. Die normoxische Platte wurde im üblichen Zellkulturschrank mit HEPES-gepuffertem, aber sauerstoffreichem Medium kultiviert. Im Anschluss an die Hypoxie wurde die zur Reoxygenierung bestimmte Platte aus der Hypoxiebank entfernt, das Medium ausgetauscht und die Platte unter normoxischen Bedingungen im üblichen Zellkulturschrank für weitere 24 h kultiviert. Für das eigentliche Assay wurde zum jeweiligen Messzeitpunkt das Medium aus den einzelnen Wells pipettiert und 100 µl Kulturmedium mit MTT (5 mg/ml) darauf gegeben. Diese 96Well Platte wurde abgedeckt und für weitere 2 h bei den jeweiligen Bedingungen kultiviert. Im

Anschluss wurde die Lösung abpipettiert und durch 100 µl Isopropanol ersetzt. Die Absorptionsmessung erfolgte direkt im Photometer bei 580 nm gegen eine Leermessung mit Isopropanol ohne Zellen (Blank). Insgesamt wurde der Viabilitätsassay drei Mal für jede Zelllinie mit jeweils 16 Wells (technische Replikate) durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot. Hier wurde aufgrund fehlender Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) ein Mann-Whitney-Rank-Sum-Test durchgeführt. Verglichen wurden die einzelnen Interventionsgruppen untereinander sowie die verschiedenen Ansätze jeweils im Vergleich zur Kontrolle (ohne Zusatz) zum jeweiligen Zeitpunkt.

2.2.5 Protein Bradford und Western Blot

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die Zelllysate von -80 °C, auf Eis gelagert, aufgetaut. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 25.000 x g für mind. 20 Min. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt, auf Eis zwischengelagert und das Sediment verworfen. Aus den so gewonnen Proben wurden jeweils 20 µl in je 1 ml 1xBioRad Protein Assay überführt, vermischt und im Anschluss bei Raumtemperatur für 5 Min. inkubiert.

Mithilfe des NanoDrop2000 wurden photometrisch die Proteinkonzentrationen der Proben gegen eine Leerprobe (20 µl RIPA-Puffer, anstatt Probenmaterial) bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung von Proteinbestandteilen an den Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G250, wodurch sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt, sodass bei letzterer Wellenlänge die Absorption gemessen wird. Je höher die Absorption, desto höher ist dementsprechend die Proteinmenge in der Probe [84].

Anschließend wurde 1x EMSA zu den verbleibenden Proben gegeben. Danach wurden die Proben mit 1x Laemmli-Puffer versetzt und 10 Min. bei 95 °C denaturiert (s. Tabelle 8).

Puffer	Zusatz	
10x EMSA-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 7,9	
	500 mM NaCl	
	10 mM EDTA	
	10 mM DTT	
	20 % Glycerin	
	100 μg/ml BSA	
	In <i>A. dest.</i>	
4x Proben-Puffer (Laemmli)	40 % (v/v) Glycerin	
	8 % (w/v) SDS	
	8 % (v/v) ß-Mercaptoethanol	
	200 mM Tris pH 6,8	
	3 g/l Bromphenolblau	
Tabelle 8: Zusammensetzung der notwendigen Puffer zur Proteinaufbereitung		

Herstellung 12 % SDS-Gele

Es wurden zehn 12 % Gele hergestellt. In Tabelle 9 sind die notwendigen Puffer und Mengenangaben zu finden. Zunächst wurde das Trenngel eingegossen und mit 2-Isopropanol gesetzt. Nach Aushärtung erfolgte die Zugabe eines 4,5 % Sammelgels und das Einsetzen des *Spacers* (Kamm). Die ausgehärteten Gele wurden dann in 1x Laufpuffer durch feuchtes Papier gepolstert bei 4 °C gelagert.

Puffer	Zusatz
Lower Buffer	1,5 M Tris Base
	0,4 % SDS
	Ad 500 ml <i>A. dest.</i>
	рН 8,8
	Lagerung bei 4 °C

Puffer	Zusatz		
Upper Buffer	0,5 M Tris HCl		
	4 % SDS		
	Ad 500 ml <i>A. dest</i> .		
	рН 6,8		
	Lagerung bei 4 °C		
10x Laufpuffer	142,2 g Glycin		
	30,3 g Tris base		
	10 g SDS		
	Ad 1000 ml <i>A. dest</i> .		
1x Laufpuffer	100 ml 10x Laufpuffer		
	Ad 1000 ml <i>A. dest.</i>		
Trenngel für 10x 1 mm dicke Gele	16,65 ml <i>Lower Buffer</i>		
	26,64 ml Acrylamid		
	22,94 ml <i>A. dest</i> .		
	33,3 µl TEMED		
	333,3 µI APS		
Sammelgel für 10x 1 mm dicke Gele	8,33 ml <i>Upper Buffer</i>		
	5 ml Acrylamid		
	19,6 ml <i>A. dest.</i>		
	33,3 µl TEMED		
	333,3 µI APS		
Tabelle 9: Übersicht über die Puffer und ihre Zusammensetzung für 12 % SDS-Gele			

Für den Western Blot wurden, angepasst an die Proteinkonzentrationsbestimmung, die Taschen des 12 % SDS-Gels mit gleichen Proteinkonzentrationen der Proben und einem Gesamtvolumen von 20 µl/Tasche befüllt. Die Probe, die im Protein Bradford die geringste Konzentration aufwies, galt als Maßstab für die anderen Proben der Versuchsreihe, die dementsprechend mit RIPA zu einem Gesamtvolumen von 20 µl verdünnt wurden. Es wurden stets 5 µl 4x Laemmli-Puffer hinzugegeben. Dadurch variierte die Ladekonzentration pro Western Blot.

Bei den IMR-32 waren es die Konzentrationen 0,001 μ g/ μ l, 0,004 μ g/ μ l und 0,008 μ g/ μ l. Die Konzentrationen bei den SH-SY5Y lagen bei 0,002 μ g/ μ l, 0,004 μ g/ μ l und 0,005 μ g/ μ l. Für die Neuro-2A ergaben sich die Konzentrationen 0,004 μ g/ μ l, 0,016 μ g/ μ l und 0,018 μ g/ μ l. Als Größenkontrolle dienten 2,5 μ l Marker (PageRuler, Fa. BioRad) in einer separaten Tasche.

Der Western Blot an sich bezeichnet das Übertragen von Proteinen auf eine Membran, die dann der weiteren Analyse, bspw. deren spezifischer Nachweis durch eine Antikörperreaktion, zur Verfügung steht. Bevor dies möglich ist, werden die Proteinproben mittels Gelelektrophorese in einer Trägermatrix (hier SDS-PAGE) der Größe und Ladung nach aufgetrennt. Durch die Anlage eines gerichteten elektrischen Feldes erfolgt die Auftrennung auf dem Gel in Banden. Das eigentliche die Übertragung der Proteine Blotting ist aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Die Membran kann dann zum weiteren Einzel-Proteinnachweis genutzt werden [85].

Hier erfolgte die Proteinauftrennung für 10 Min. bei 90 V und im Anschluss für weitere 90 Min. bei 120 V. Das Gel wurde als Semi-Dry-Blot (BioRad) durch insgesamt 6 Schichten Whatman-Papier in 1x Blotting Puffer (s. Tabelle 10) für 30 Min. bei 800 mA auf die Nitrocellulosemembran übertragen.

Puffer	Zusatz
10x Blotting Puffer	292,75 g Tris Base
	142,6 g Glycin
	18,5 g SDS
	Ad 1000 ml <i>A. dest.</i>
1x Blotting Puffer	100 ml 10x Blotting Puffer
	200 ml Methanol
	Ad 1000 ml <i>A. dest</i> .
Tabelle 10: Notwendige Puffer und ihre Zusammensetzung für den Western Blot	

Im Anschluss wurde eine Ponceau S-Färbung (Gebrauchslösung, Sigma) durchgeführt. Dafür wurde Ponceau S auf die Blots gegeben und für 5 Min. bei

Raumtemperatur (RT) auf dem Schwenktisch (ST) inkubiert. Der Farbstoff wurde dann abgegossen und mit *A. dest*. abgewaschen.

Die Darstellung der nachzuweisenden Proteine wurde mittels Antikörperreaktion durchgeführt. Hierfür wird der Membran der Antikörper gegen das nachzuweisende Protein zugesetzt und über mehrere Stunden inkubiert. Durch einen Sekundärantikörper mit Reporterenzym und Zugabe von Substratlösung kann dessen Lumineszenzintensität im Entwickler detektiert und somit auf die Proteinmenge geschlossen werden.

Die *Blocking-Solution* war für alle Antikörper 5 % *Bovine Serum Albumine* (BSA), außer bei HIF-1α (abcam), bei dem 3 % Milch benutzt wurde (s. Tabelle 11).

Die Blockierung erfolgte über eine Stunde auf dem Schwenktisch bei Raumtemperatur. Der jeweilige Primärantikörper (s. Tabelle 12) wurde 1:1000 in 5 % BSA bzw. 0,01 % BSA für HIF-1α (abcam) verdünnt, dann in Folie mit der Membran eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C auf dem Schwenktisch inkubiert.

Puffer	Zusatz	
10x TBS	24,2 g Tris Base	
	80 g NaCl	
	Ad 1000 ml <i>A. dest.</i>	
	рН 7,4	
1x TBS	100 ml 10x TBS	
	Ad 1000 ml <i>A. dest.</i>	
1x TBST	100 ml 10x TBS	
	1 ml Tween 20	
	Ad 1000 ml <i>A. dest</i> .	
3 % Milch bzw. 5 % Milch	3 g Milchpulver bzw. 5 g Milchpulver	
	100 ml 1x TBST	
5 % BSA	5 g Bovines Serum Albumin	
	100 ml 1x TBST	
Blotto B	20 ml 5 % Milch	
	20 ml 5 % BSA	
	60 ml 1x TBST	
Tabelle 11: Übersicht über die notwendigen Puffer für den Western Blot		

Am Folgetag wurde der Blot aus der Folie genommen und 3x je 5 Min. in 1x TBS gewaschen. Der Sekundärantikörper (Goat-Anti-Rabbit IgG sc-2004, Fa. Santa Cruz Biotechnology bzw. Horse-Anti-Mouse IgG HRP linked, Fa. Cell Signaling) wurde 1:15.000 verdünnt in Blotto B (s. Tabelle 11) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch inkubiert. Auch daran schloss sich ein Waschgang mit 1x TBS (s. Tabelle 11) von 3x je 5 Min. an.

Als Ladekontrolle wurde entweder Anti- β -Aktin Alexa Fluor® 647 oder Anti- α -Tubulin Alexa Fluor® 488 Antikörper 1:2000 in 5 % BSA hinzugefügt und 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Waschgang mit 3x 5 Min. 1x TBS.

Primärantikörper	Zelllinien-Spezifität
Anti-AMPK-β #4178	Human, murin
Anti-Bax #2772	Human, murin
Anti-Bcl2 #2876	Human, murin
Anti-Bcl _{xL} #2762	Human, murin
Anti-Caspase 3 #9665	Human, murin
Anti-Caspase 9 #9502	Human
Anti-Caspase 9 #9504	Murin
Anti-cIAP #4952	Human, murin
Anti- <i>cleaved</i> Caspase 9 #9509	Murin
Anti- <i>cleaved</i> Caspase 9 #9505	Human
Anti-Cytochrom C #4272	Human, murin
Anti-HIF1α #3716	Human
Anti-HIF1α ab113642	Murin
Anti-smac/DIABLO #2954	Human
Anti-smac/DIABLO ab32023	Murin
Anti-xIAP #2042	Human, murin
Anti-α-Tubulin Alexa Fluor® #5063S	Human, murin
Anti-β-Aktin Alexa Fluor® #8584	Human, murin
Tabelle 12 [,] Übersicht über die genutzten Primärantikörner mit entsprechender Zellinien-	

Spezifität

Die Darstellung erfolgte unter Zugabe von Clarity[™] Western ECL Substrate (BioRad) nach 5- bis 10-minütiger Inkubation. Die Entwicklung und die anschließende Auswertung der Blots wurden mit ImageLab durchgeführt. Hierbei erfolgte eine Normierung auf das jeweilige *housekeeping*-Protein β-Aktin oder α-Tubulin. Die folgende statistische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot. Es wurde auf Normalverteilung mit Shapiro-Wilk getestet. Bei gegebener Normalverteilung wurde ein t-Test durchgeführt. Bei fehlender Normalverteilung erfolgte eine Auswertung mit Mann-Whitney-Rank-Sum-Test.

Die Versuche wurden pro Zelllinie drei Mal durchgeführt und die Western Blots, soweit genügend Proteinmenge vorhanden, zweimalig durchgeführt.

2.2.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot 13.0 (Fa. Systat Software, Inc., San Jose, USA), die graphische Aufarbeitung im Anschluss mit GraphPad Prism 8.3. bis 9.2.0 (Fa. GraphPad Software, LLC, San Diego, USA). Nach Testung der Normalverteilung mittels des Shapiro-Wilk-Tests wurde bei gegebener Normalverteilung ein t-Test durchgeführt. Bei fehlender Normalverteilung erfolgte eine Auswertung mittels des Mann-Whitney-Rank-Sum-Tests. Es wurde ein Signifikanzniveau von p \leq 0,05 festgelegt.

Bei der Ermittlung der Hypoxiezeit (s. Kapitel 3.1.4) wurden in jeder Versuchsreihe zwei Wells als Blank-Proben ohne Zusatz von Zellen oder Medium gemessen. Der Mittelwert aus beiden wurde als Leerprobe von den ermittelten Absorptionswerten der Proben subtrahiert. Waren diese Ergebnisse im negativen Zahlenbereich wurden sie von der weiteren statistischen Auswertung ausgeschlossen. Hierauf wird im entsprechenden Abschnitt erneut hingewiesen. Verglichen wurde die hypoxische mit der normoxischen Probe zum jeweiligen Messzeitpunkt. Lag hier eine Signifikanz von $p \le 0,05$ erfolgte die Markierung mit einem Stern (*), bei $p \le 0,01$ mit zwei Sternen (**) und bei $p \le 0,001$ mit drei Sternen (***). Ebenfalls verglichen wurden die Messwerte innerhalb der Hypoxie und innerhalb der Normoxie über den zeitlichen Versuchsverlauf. Es wurden dieselben statistischen Tests und Grenzen angewendet.

Bei der Auswertung der Western Blots (Kapitel 3.3) wurden zunächst negative Werte ausgeschlossen. Diese traten nach Abzug der Hintergrundstrahlung bei nur sehr schwacher Proteinexpression auf. Ebenso wurden stark über- oder unterexprimierte Proben (Ausreißer) aus der Auswertung ausgeschlossen, die mehr als die achtfache Standardabweichung vom Mittelwert aufzeigten. Nach Ausschluss der genannten Werte verblieben bei einzelnen Blots stark unterschiedliche Ergebnisse, die aufgrund der geringen Probenmengen nicht wiederholt und daher nicht als Ausreißer gewertet werden konnten. Hierauf wird im entsprechenden Absatz erneut hingewiesen.

Die Darstellung erfolgte im Säulendiagramm zu je drei Messzeitpunkten mit fünf Gruppen. Die Expression des Proteins der normoxischen Kontrollgruppe ohne Mediumzusatz wurde auf 1 (im Graphen mittels gestrichelter Linie markiert) und die Proteinexpression der übrigen Proben dazu in Relation als x-fache Expression gesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte (mean) mit Standardabweichung (SD). Interventionsgruppen (+ EPO Verglichen wurden die low/high bzw. + cEPO-Fc low/high) mit der Kontrollgruppe ohne Zusatz zum jeweiligen Zeitpunkt Hypoxie Reoxygenierung) sowie (Normoxie bzw. bzw. die jeweilige Interventionsgruppe gegenüber dem normoxischen Äquivalent. Bei Signifikanzen von p \leq 0,05 in Relation zur Kontrolle zu dem jeweiligen Zeitpunkt erfolgte die Markierung mit einem Stern (*), bei $p \le 0.01$ mit zwei Sternen (**) und bei $p \le 0.001$ mit drei Sternen (***). Signifikanzen von $p \le 0.05$ im Vergleich der Reoxygenierung zur jeweiligen Hypoxie sind mit einer Raute gekennzeichnet (#), $p \le 0,01$ mit zwei Rauten (##), $p \le 0,001$ mit drei Rauten (###). Bei Signifikanzen von p \leq 0,05 im Vergleich von Reoxygenierung und Hypoxie mit der jeweiligen Normoxie erfolgte die Kennzeichnung mit einem Paragrafen (§), bei $p \le 0.01$ mit zwei Paragrafen (§§) und bei $p \le 0,001$ mit drei Paragrafen (§§§).

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung des Modells

Die Etablierung eines geeigneten Modells zur Induktion und Aufrechterhaltung der Hypoxie sowie der Reoxygenierung in neuronalen Zellkulturen geschah in Anlehnung an das Hypoxiemodell nach Jäger (2011). Hier wurde das Medium vor Zugabe zu den Zellen desoxygeniert, um die Hypoxie möglichst unmittelbar zu induzieren [42]. Daher wurden in der hier vorliegenden Arbeit drei verschiedene Methoden der Mediumvorbereitung verglichen: (1) manuell durch Spritzenzug, (2) Hypoxiekammer und (3) Hypoxiebank. Im Anschluss wurde die Aufrechterhaltung der Hypoxie im Medium in der Hypoxiekammer und der Hypoxiebank untersucht. Die Untersuchung des Einflusses von EPO und cEPO-Fc auf neuronalen Zellkulturen unter Hypoxie und Reoxygenierung wurde ausschließlich in der Hypoxiebank durchgeführt.

Hier sei darauf hingewiesen, dass die folgenden Messungen der O₂-Konzentration im Medium (Abb. 7-9) aufgrund technischer Begebenheiten der Messsonde ausschließlich im Becherglas ohne gleichzeitiges Zellwachstum durchgeführt wurden (vgl. Kapitel 2.2.3). Ebenso gilt für die folgenden Abbildungen 7-9, dass die Ausgangssättigung des Mediums auf 100 % gesetzt wurde.

3.1.1 Desoxygenierung des Mediums durch Spritzenzug

Im Hypoxiemodell nach Jäger (2011) erfolgte die Mediumvorbereitung, d. h. die Desoxygenierung durch Ziehen des Spritzenkolbens einer mit 30 ml Medium gefüllten 50 ml-Spritze bei verschlossenem Dreiwegehahn an der Spitze. Nach jedem Kolbenzug wurde der Dreiwegehahn nach außen geöffnet und das so entstandene Gasvolumen abgelassen. Dieser Vorgang wurde 10x wiederholt [42]. In Abbildung 7 ist repräsentativ die Veränderung der Sauerstoffkonzentration im Zellkulturmedium der IMR-32 in Abhängigkeit von der Anzahl der Kolbenzüge aufgetragen.



Abb. 7: Veränderung der Sauerstoffkonzentration in % im RPMI-Medium (IMR-32) in Abhängigkeit der Kolbenzüge. Es erfolgte die Messung nach der jeweiligen Anzahl der Kolbenzüge (n = 2 bis n = 10). Ausgangssättigung wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Hieraus wird ersichtlich, dass die Sauerstoffkonzentration, ausgehend von 100 % im Medium, in keinem Fall einen Wert von 20 % unterschritt. Nach zehn hintereinander durchgeführten Kolbenzügen mit Entlüftung über den Dreiwegehahn nach jedem Kolbenzug ließ sich die O2-Konzentration lediglich auf 42 % des Ausgangswertes reduzieren. Wie initial postuliert, sollte eine Sauerstoffkonzentration von < 5 % erreicht werden, weshalb dieses Modell zur Desoxygenierung nicht zufriedenstellend niedrige Werte ermöglichte. Daher und aus Gründen der besseren Reproduzierbarkeit von konstanten O2-Konzentrationen, folgte als nächster Schritt die Desoxygenierung des Mediums in der Hypoxiekammer (Fa. StemCell) nach dem zweiten beschriebenen Modell.

3.1.2 Desoxygenierung des Mediums in der Hypoxiekammer

Repräsentativ ist in Abbildung 8 das RPMI-Medium der IMR-32 abgebildet. Die Y-Achse weist einen Bruch auf, um die hohen Ausgangskonzentration darzustellen. Es zeigte sich bei der Vorbereitung bereits nach einem kurzen Zeitintervall von einer Stunde ein drastischer Abfall der O₂-Konzentration im Medium. Es wurden konstant Werte von bis zu 0,0 % erreicht. Aufgrund der Angaben von Allen et. al wurde die Mediumvorbereitung jedoch über insgesamt 4 h fortgesetzt. Hiernach zeigte sich weiter eine O₂-Konzentration von 0,0 %. Das Kriterium von < 5 % war damit erfüllt.



Abb. 8: Sauerstoffkonzentration in % des RPMI-Mediums (IMR-32) nach 4 Stunden (h) Vorbereitung in der Hypoxiekammer, Entnahme über die Heidelberger Verlängerung (HV), anschließende Zugabe in die bereits mit 100 % Stickstoff geflutete Hypoxiekammer und darauffolgende 24-stündige Hypoxie. Rote Markierungen zeigen relevante Zeitpunkte: Beginn Hypoxie bei 4,5 h sowie Erreichen der 5 % Marke bei 18,5 h gesamter Versuchszeit (respektive 14 h Hypoxiezeit). Gepunktete Linie kennzeichnet die 5 % Marke (n = 8). Ausgangssättigung wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Im nächsten Schritt wurde daher der Verlauf der O₂-Konzentration während einer 24-stündigen Hypoxie gemessen. Nach der Überführung über die Heidelberger Verlängerung (HV) in eine Kunststoffspritze bis zur Induktion der Hypoxie, wurde

das Medium bei normaler Atmosphäre gelagert. Nach erneuter Hypoxieinduktion und weiteren 30 Min. Hypoxiezeit stieg die O₂-Konzentration wieder auf einen durchschnittlichen Wert von 15,1 % (ausgehend von 100 % vor der Vorbereitung) mit einer Schwankungsbreite von \pm 7,5 %. Es wurde eine durchschnittliche Hypoxiezeit von 14 h benötigt, um wieder eine O₂-Konzentration von < 5 % zu erreichen (durch gepunktete Linie im Graphen visualisiert). Auf eine bspw. 24-stündige Hypoxiezeit gesehen, ist dies mehr als die Hälfte der Zeit, in der lediglich eine milde Hypoxie besteht. Da hier zwar schlussendlich sehr niedrige Sauerstoffkonzentrationen erzielbar waren, jedoch mit inkonstantem Verlauf und hoher Schwankungsbreite, zudem fehleranfälligem und unhandlichem Procedere, wurde das Prinzip der vorherigen Desoxygenierung auf das dritte beschriebene Modell, die Hypoxiebank H35 Hypoxystation, übertragen.

3.1.3 Desoxygenierung des Mediums in der Hypoxiebank

Innerhalb der vier Stunden Vorbereitungszeit in der Hypoxiebank zeigte sich, wie in Abbildung 9 zu sehen, ein weniger steiler Abfall der Sauerstoffkonzentration im Vergleicht zur Desoxygenierung in der Hypoxiekammer (vgl. Abb. 8). Repräsentativ ist hier das RPMI-Medium der IMR-32 gezeigt. Der Kurvenverlauf zeigte sich vergleichbar in allen drei Medien. Es wurde ein durchschnittlicher Wert von 2,42 % ausgehend von 100 % Startkonzentration erreicht.



Abb. 9: Sauerstoffkonzentration in % im RPMI-Medium (IMR-32) in der Hypoxiebank H35 Hypoxystation nach 4 Stunden (h) Mediumvorbereitung, Transfer des Mediums zu Simulationszwecken innerhalb der Bank aus dem Becherglas und wieder zurück und anschließender 24-stündiger Hypoxiezeit. Gepunktete Linie kennzeichnet die 5 % Marke (n = 6). Ausgangssättigung wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Im Verlauf der daraufhin beginnenden Hypoxiezeit, repräsentativ über 24 h, veränderte sich die Sauerstoffkonzentration nur im Promillebereich. Es wurde demnach ein konstantes und leicht reproduzierbares Hypoxie-Medium bereitgestellt. Da für die Versuchsansätze mit Zellen mehr Medium (150 ml) benötigt wurde als in den Vorversuchen (50 ml) untersucht, wurde die Vorbereitungszeit des Mediums auf 12 h verlängert, um eine stabil niedrige O₂-Konzentration zur Hypoxieinduktion zu gewährleisten.

3.1.4 Ermittlung der Hypoxiezeit

Zur Ermittlung der Hypoxiezeit der einzelnen Zelllinien wurden diese einer Hypoxiereihe unterschiedlicher Dauer ausgesetzt. Hierbei wurde die Viabilität, d. h. der Zellmetabolismus mittels eines MTT-Assays bestimmt. Benannt ist der Test nach dem genutzten Salz Tetrazoliumbromid (MTT), das von metabolisch aktiven Zellen umgesetzt wird. Durch diese Untersuchung wird lediglich auf die metabolische Aktivität der Zellen geschlossen. Es ist kein direktes Nachweisverfahren für die Proliferation der Zellen. Ergänzend wurde HIF-1α mittels Western Blot bestimmt, sowie eine subjektive Beurteilung der Zellmorphologie herangezogen.

Zelllinie IMR-32

In Abbildung 10 ist der Verlauf der absoluten Absorption beim Viabilitätsassay in den IMR-32 über einen Versuchszeitraum von 8 bis 72 h abgebildet. Es wird deutlich, dass eine achtstündige Hypoxie noch keinen signifikanten Unterschied im MTT-Assay bewirkte. Mit zunehmender Dauer der Hypoxie nahm die Viabilität der IMR-32 ab, während die der normoxischen Zellen über den Versuchszeitraum weiter anstieg.





Abkürzungen: MTT = Tetrazoliumbromid, h = Stunden, ** / *** = signifikanter Unterschied zwischen hypoxischer und normoxischer Probe zum jeweiligen Messzeitpunkt (p = 0,002 / p < 0,001) (n = 16). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Die statistische Auswertung der beiden parallelen Versuchsreihen ist einzeln in Abbildung 11 A und B dargestellt. Auf der linken Seite (A) findet sich der Verlauf der absoluten Absorption während der Normoxie von 8 bis 72 h. Im Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte untereinander war jeweils ein signifikanter Anstieg zum Endzeitpunkt der Versuchsreihe (p = 0,01 bis p < 0,001) zu beobachten.



Abb. 11: A (links): Absolute Absorption IMR-32 im MTT-Viabilitätsassay (bei einer Wellenlänge von 580 nm) in der Normoxiereihe von 8 bis 72 h.

B (rechts): Absolute Absorption IMR-32 im MTT-Viabilitätsassay (bei einer Wellenlänge von 580 nm) in der Hypoxiereihe von 8 bis 72 h

Abkürzungen: MTT = Tetrazoliumbromid, h = Stunden, * / ** / *** = signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Messzeitpunkten ($p \le 0.05 / p \le 0.01 / p \le 0.001$) (n = 16). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Auf der rechten Seite (B) der Abbildung 11 ist die hypoxische Reihe dargestellt. Hier bestand zwischen 8 h, 24 h und 48 h ein signifikanter Abfall (p = 0,042 und p < 0,001). Im weiteren Verlauf bis zum Versuchsende nach 72 h stieg die Viabilität wieder signifikant an (p = 0,019). Die Differenz zwischen Versuchsbeginn und -ende nach 72 h war einfach signifikant (p = 0,020), während der Abfall bis 48 h Versuchsdauer hoch signifikant war (p < 0,001). Im Western Blot zeigte sich eine Aktivierung von HIF-1 α (vgl. Abbildung 19). Unter Hinzuziehung des mikroskopischen Bildes war unter subjektiver Betrachtung die Zellintegrität nach 48 h eher gegeben als nach 72 h. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte die Festlegung der Hypoxiezeit für die IMR-32 auf 48 h.

Zelllinie SH-SY5Y

Bei den SH-SY5Y erfolgte die Aufarbeitung der Ergebnisse nach oben beschriebenem Muster. Proben, die nach Abzug der gemittelten Blank-Daten einen negativen Wert hatten, wurden ausgeschlossen. Nach Anwendung dieses Ausschlusskriteriums fielen bei einer maximalen Probenanzahl von n = 28 einige Wells aus, sodass die Auswertung mit einer Probenzahl zwischen n = 9 bis n = 28 erfolgte. Die genauen Probenzahlen zu den jeweiligen Messzeitpunkten sind im Anhang aus Tabelle 13 zu entnehmen.



Abb. 12: Absolute Absorption SH-SY5Y im MTT-Viabilitätsassay (bei einer Wellenlänge von 580 nm) in paralleler Normoxie und Hypoxie von jeweils 2 bis 120 h Abkürzungen: MTT = Tetrazoliumbromid, h = Stunden, * / ** / *** = signifikanter Unterschied zwischen hypoxischer und normoxischer Probe zum jeweiligen Messzeitpunkt ($p \le 0.05 / p \le 0.01 / p \le 0.001$) (n = 9 bis n = 28). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

In Abbildung 12 ist die absolute Absorption im MTT-Assay der SH-SY5Y von 2 bis 120 h Hypoxie und paralleler Normoxie dargestellt. In den ersten 24 h waren nur

geringe Unterschiede zwischen beiden Versuchsreihen sichtbar. Ab 48 h änderte sich die Viabilität zu jedem weiteren Messzeitpunkt signifikant (72 h, p = 0,01) bis hoch signifikant (48 h, 96 h, 120 h, jeweils p < 0,001).

Im Einzelvergleich des normoxischen und hypoxischen Kurvenverlaufs im gleichen Zeitraum zeigten sich zwischen den einzelnen Messzeitpunkten zahlreiche signifikante Unterschiede. Diese sind aus Übersichtsgründen nicht vollständig in Abbildung 13 A und B dargestellt, jedoch im Anhang als Übersichtstabelle (s. Tabelle 13) zu finden. Während der ersten Stunden der Normoxie zeigten sich nur geringfügige, jedoch signifikante Veränderungen (s. Abb. 13 A). Ab 48 h stieg die Absorption an (p < 0,001), fiel nach 72 h wieder signifikant ab (p < 0,001), um dann erneut einen Höchstwert bei 96 h zu erreichen, der bis zum Versuchsende nach 120 h wieder signifikant abfiel (jeweils p < 0,001), jedoch gegenüber den ersten Stunden der Normoxie hoch signifikant (p < 0,001) erhöht war. In Abbildung 13 B (links) ist der parallele Versuchsverlauf in der Hypoxie abgebildet. Auch hier waren in den ersten 48 Stunden zwar signifikante, jedoch nur geringfügige Veränderungen in der Absorption messbar. Nach insgesamt 72 h Hypoxie stieg die Viabilität der SH-SY5Y signifikant an (p =0,003) und fiel bis zum Versuchsende nach 120 h (p < 0,001) wieder ab.



Abb. 13: A (links): Absolute Absorption SH-SY5Y im MTT-Viabilitätsassay (bei einer Wellenlänge von 580 nm) in der Normoxiereihe von 2 bis 120 h

B (rechts): Absolute Absorption SH-SY5Y im MTT-Viabilitätsassay (bei einer Wellenlänge von 580 nm) in der Hypoxiereihe von 2 bis 120 h

Abkürzungen: MTT = Tetrazoliumbromid, h = Stunden, * / ** / *** = signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Messzeitpunkten ($p \le 0.05 / p \le 0.01 / p \le 0.001$) (n = 9 bis n = 28). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Der erste hoch signifikante Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie lässt sich in Abbildung 12 nach 48 h erkennen. Nach weiteren 24 h (insgesamt 72 h) überstieg die Viabilität der Hypoxie die der Normoxie signifikant (p = 0,01). Im Western Blot war eine erhöhte Expression von HIF-1 α nach 72 h sichtbar (vgl. Abbildung 19). Im mikroskopischen Bild waren subjektiv erst nach 120 h Anzeichen für Zellstress zu sehen. Trotz der erhöhten Viabilität gegenüber der Normoxie nach 72 h wurde aufgrund der Western Blot Ergebnisse dieser Versuchszeitraum festgelegt.

Zelllinie Neuro-2A

Für die Neuro-2A waren für die Probenzeitpunkte 2 und 12 h insgesamt 14 Proben angesetzt, für den normoxischen 18 h Zeitpunkt 20 Proben, für alle späteren Messzeitpunkte standen 28 Proben zur Auswertung zur Verfügung. Die genaue Übersicht der Probenzahlen zu den jeweiligen Messzeitpunkten sind aus Tabelle 14 im Anhang zu entnehmen.



Abb. 14: Absolute Absorption Neuro-2A im MTT-Viabilitätsassay (bei einer Wellenlänge von 580 nm) in paralleler Normoxie und Hypoxie von jeweils 2 bis 48 h Abkürzungen: MTT = Tetrazoliumbromid, h = Stunden, ** = signifikanter Unterschied zwischen hypoxischer und normoxischer Probe zum jeweiligen Messzeitpunkt ($p \le 0.01$) (n = 14 bei 2 und 12 h, normoxisch 18 h n = 20 und bei allen weiteren n = 28). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Abbildung 14 stellt die absolute Absorption als Maß der Viabilität in Hypoxie und Normoxie über 48 h in den Neuro-2A dar. Zu Beginn zeigte sich noch kein signifikanter Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie. Dieser stellte sich nach 12 h (p = 0,009) und nach 48 h Versuchslänge ein (p = 0,002).

Auch bei den Neuro-2A waren innerhalb der Normoxie und Hypoxie viele signifikante Unterschiede, die aufgrund der besseren Übersicht tabellarisch im Anhang abgebildet sind (s. Tabelle 14). Die für die Findung der Hypoxiezeit relevanten Daten sind in Abbildung 15 A und B dargestellt. Die Viabilität stieg während der Normoxie (s. Abb. 15 A, links) stetig bis zum Versuchsende nach 48 h

(p < 0,001) an. Während der Hypoxie (s. Abb. 15 B, rechts) zeigte sich nach 18 h ein signifikanter Sprung der Viabilität (p < 0,001). Im weiteren Verlauf stagnierte sie auf dem Niveau.



Abb. 15: A (links): Absolute Absorption Neuro-2A im MTT-Viabilitätsassay (bei einer Wellenlänge von 580 nm) in der Normoxiereihe von 2 bis 48 h

B (rechts): Absolute Absorption Neuro-2A im MTT-Viabilitätsassay (bei einer Wellenlänge von 580 nm) in der Hypoxiereihe von 2 bis 48 h

Abkürzungen: MTT = Tetrazoliumbromid, h = Stunden, * / ** / *** = signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Messzeitpunkten ($p \le 0.05 / p \le 0.01 / p \le 0.001$) (n = 14 bei 2 und 12 h bzw. n = 28 bei allen weiteren). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Aus den erhobenen Daten kristallisierte sich der ideale Hypoxiezeitraum von 48 h heraus. Mit steigender Hypoxiezeit stieg die Expression von HIF-1α im Western Blot an. Unter Berücksichtigung des mikroskopischen Bildes der Zellkultur, waren zu nach 48 h jedoch nur noch wenige hypoxische Zellen adhärent wachsend, sodass der vorherige Messzeitpunkt von 24 h ausgewählt wurde.

3.2 Viabilitätsassay

Das gleiche Verfahren, das für die Ermittlung der Hypoxiezeit genutzt wurde, wurde auch für die sich anschließenden Versuchsreihen mit EPO und cEPO-Fc durchgeführt. Verglichen wurden die Interventionsgruppen zu ihrer jeweiligen unbehandelten Kontrolle zu einzelnen Messzeitpunkt jedem (normoxische EPO low/high bzw. cEPO-Fc low/high gegen normoxische Kontrolle; hypoxische EPO low/high bzw. cEPO-Fc low/high gegen hypoxische Kontrolle; reoxygenierte EPO low/high bzw. cEPO-Fc low/high gegen reoxygenierte Kontrolle). Ebenso wurde innerhalb jeder Interventionsgruppe an allen drei Messzeitpunkten die Werte miteinander verglichen (Kontrolle Normoxie vs. Hypoxie vs. Reoxygenierung; normoxische EPO low/high bzw. cEPO-Fc low/high vs. hypoxische vs. reoxygenierte Probe). Die Bezeichnung jeweilige der Interventionsgruppen bezieht sich auf den Zusatz und dessen Konzentration: Kontrolle = unbehandeltes Kulturmedium; EPO *low* = Kulturmedium + 0,2 IU/ml EPO; EPO high = Kulturmedium + 20 IU/ml EPO; cEPO low = Kulturmedium + 0,2 μ g/ml cEPO-Fc; cEPO *high* = Kulturmedium + 20 μ g/ml cEPO-Fc.

Zelllinie IMR-32



Abb. 16: Absolute Absorption IMR-32 im MTT-Viabilitätsassay (bei einer Wellenlänge von 580 nm) nach 48 h Normoxie, 48 h Hypoxie und 48 h Hypoxie mit anschließend 24 h Reoxygenierung (48 h H / 24 h Reox) (n = 48).

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; ml = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; §§§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent, (p ≤ 0,001); # / ## / ### = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,001). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

In Abbildung 16 ist das Verhalten der humanen IMR-32 dargestellt. Die Viabilität innerhalb der normoxischen Vergleichsgruppen zeigte keinen Unterschied, jedoch war in allen Ansätzen ein hoch signifikant reduzierter Metabolismus nach der Hypoxie zu sehen (p < 0,001), wobei es keine Differenz zwischen den Interventionsgruppen gegenüber der hypoxischen Kontrollgruppe gab. Mit Augenmerk auf die Reoxygenierung regenerierte die Zellviabilität nicht. In allen Ansätzen war eine hoch signifikante Reduktion gegenüber den jeweiligen normoxischen Proben zu sehen (p < 0,001). Verglichen mit den hypoxischen Äquivalenten fiel die metabolische Aktivität in allen Ansätzen um ein signifikantes
bis hoch signifikantes Niveau (p zwischen 0,001 und 0,027). Die einzige Ausnahme war der Ansatz mit 20 µg/ml cEPO-Fc, der auf einem vergleichbaren Aktivitätsniveau blieb wie während der Hypoxie (p = 0,262, nicht signifikant). Weiterhin bestanden keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Reoxygenierung.

Zusammenfassend sank bei allen Gruppen die Viabilität unter Hypoxie in vergleichbarem Maße. Nach der Reoxygenierung war die Viabilität aller Gruppen noch weiter eingeschränkt mit Ausnahme der cEPO-Fc *high*-Gruppe, deren Viabilität sich auf dem Niveau der Hypoxie hielt.



Zelllinie SH-SY5Y

Abb. 17: Absolute Absorption SH-SY5Y im MTT-Viabilitätsassay (bei einer Wellenlänge von 580 nm) nach 72 h Normoxie, 72 h Hypoxie und 72 h Hypoxie mit anschließend 24 h Reoxygenierung (72 h H / 24 h Reox) (n = 48) Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;*

EPO = Erythropoletin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = International Units; ml = Milliliter; μg = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung. Dargestellt sind die Mittelwerte (mean) mit Standardabweichung (SD) Wie in Abbildung 17 zu sehen, zeigte die Viabilität der SH-SY5Y innerhalb der Ansätze eine hohe Varianz mit deutlich breiterer Streuung als die anderen Zelllinien. Hier zeigte sich in der statistischen Auswertung weder an den einzelnen Messzeitpunkten noch zwischen den Interventionsgruppen ein signifikanter Unterschied. Lediglich eine Tendenz zur geringeren Viabilität während der Hypoxie mit gleichbleibendem Niveau während der Reoxygenierung ließe sich vermuten. Zusammenfassend fanden sich weder signifikante Veränderungen über den Versuchsverlauf noch durch den Einfluss von EPO oder cEPO-Fc.



Zelllinie Neuro-2A



Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; ml = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; § / §§ / §§§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,001); # / ## / ### = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,001); * = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Im Vergleich hierzu ist in Abbildung 18 zu sehen, dass es bei der murinen Zelllinie Neuro-2A eine hoch signifikante Verminderung der Viabilität in dem unbehandelten hypoxischen Ansatz und den Ansätzen mit EPO-Zugabe gegenüber den jeweiligen normoxischen Kontrollen gab, unabhängig von der beigefügten EPO-Konzentration $(p \le 0,001)$. Die Zugabe von 2 µg/ml cEPO-Fc zeigte eine signifikant erhöhte Zellviabilität während der Hypoxie gegenüber der zeitgleichen hypoxischen Kontrolle (p = 0,029). Nach der Reoxygenierung stieg die Viabilität der vorher stark eingeschränkten Gruppen wieder auf ein Niveau, das mit der Normoxie zu vergleichen und demnach signifikant erhöht zur jeweiligen hypoxischen Probe war $(p \le 0.001)$. Auch bei den Interventionsgruppen mit cEPO-Fc war nach der Reoxygenierung ein signifikant erhöhter Metabolismus gegenüber der Hypoxie festzustellen (*low* p = 0,028 und *high* p = 0,037). Allerdings war die metabolische Aktivität der cEPO-Fc high-Gruppe im Vergleich zur zusatzlosen Kontrolle unter Normoxie (p = 0.031) und nach Reoxygenierung signifikant reduziert (p = 0.021). Ebenso verhielt es sich mit der cEPO-Fc low-Gruppe unter Hypoxie (p = 0,029). Zusammenfassend sank die Viabilität der unbehandelten und EPO-Gruppen während der Hypoxie, regenerierte sich jedoch mit der Reoxygenierung. Die Viabilität der cEPO-Fc-Gruppen war durch die Hypoxie nicht signifikant beeinträchtigt, war allerdings nach der Reoxygenierung gegenüber der Hypoxie gesteigert. Der Zellstoffwechsel war unter 20 µg/ml cEPO-Fc gegenüber der unbehandelten Kontrolle bei sauerstoffhaltiger Atmosphäre (Normoxie und

Reoxygenierung) signifikant reduziert.

3.3 Western Blot

Zur weiteren Analyse der intrazellulären Vorgänge während Hypoxie und Reoxygenierung schlossen sich Western Blots aus dem gewonnenen Zellprotein an. Die Auswertung der Blots erfolgte durch das Detektionsprogramm ImageLab. Insgesamt wurden folgende Proteine analysiert (alphabetische Reihenfolge): AMPK-β, Bax, Bcl-2, Bcl_{XL}, Caspase 3, Caspase 9, c-IAP, *cleaved* Caspase 9, Cytochrom C, HIF-1α, smac/DIABLO, x-IAP und als *Housekeeping*-Protein α-Tubulin oder β-Aktin. Letztere genutzt, wurden um eventuelle Konzentrationsunterschiede beim Auftragen der Proteine detektieren und in der Auswertung berücksichtigen zu können.

In den folgenden Abbildungen 19 bis 42 sind die Ergebnisse der Western Blots dargestellt, wobei die humanen Zelllinien IMR-32 und SH-SY5Y im direkten graphischen Vergleich stehen und die murine Zelllinie Neuro-2A im Anschluss gezeigt wird. Die Einteilung erfolgt jeweils in 24/48/72 h Normoxie, 24/48/72 h Hypoxie und gleichlanger Hypoxie mit darauffolgender 24 h Reoxygenierung.



📼 Kontrolle 🗰 EPO 0,2 IU/ml 🗳 EPO 20 IU/ml 📼 cEPO-Fc 0,2 μg/ml 🖾 cEPO-Fc 20 μg/ml

Abb. 19: Relative Absorption des Hypoxie-induzierten Faktors-1 α (HIF-1 α) in IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts) nach jeweiliger Hypoxie- und Reoxygenierungszeit im Vergleich zur entsprechenden Normoxie (n = 6)

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; mI = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; § / §§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01); # / ### = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,001); * / ** / *** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,001). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Betrachtet man die in Abbildung 19 dargestellte relative Absorption von HIF-1a in den humanen Zelllinien IMR-32 und SH-SY5Y, fallen in beiden Graphen die starken Veränderungen der cEPO-Fc-Gruppen ins Auge. Im Fokus auf die IMR-32, lässt diese Veränderung über den Versuchszeitraum signifikant in der sich cEPO-Fc-low-Gruppe beobachten. Die relative Absorption verzwanzigfachte sich knapp (p = 0,002). Im Kontrast dazu stand der signifikante Abfall der HIF-1 α -Expression in der EPO-*high*-Gruppe von Normoxie über Hypoxie (p = 0,02) bis Reoxygenierung (p = 0,02). Hier war allerdings zu berücksichtigen, dass bereits in der Normoxie eine signifikant höhere Synthese gegenüber der Kontrolle bestand (p = 0,009). Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem der SH-SY5Y, zeichnete sich erhöhte Expression nach ebenfalls eine der Reoxygenierung in den cEPO-Fc-Gruppen ab, jedoch war diese Differenz nicht signifikant. Hervorzuheben ist hier, wie auch bei den IMR-32, die zu erwartende ansteigende Expression von

HIF-1 α während der Hypoxie in der Kontrolle (p = 0,002). In Relation dazu war die relative Absorption in beiden EPO-Gruppen (*low* p = 0,008; *high* p < 0,001) sowie in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe (p = 0,01) nach der Hypoxie signifikant vermindert. Nach der Reoxygenierung fiel die Expression von HIF-1 α in Kontrolle (p < 0,001) und beiden EPO-Gruppen (*low* p = 0,043; *high* p = 0,029), während sie, wie bereits beschrieben, in den cEPO-Fc-Gruppen gleichblieb bzw. tendenziell stieg.

Insgesamt zeigte sich in den humanen Zelllinien ein signifikanter Anstieg der HIF-1α-Expression in der hypoxischen Kontrolle. In Relation dazu sank die relative Absorption in den SH-SY5Y in den Interventionsgruppen, bei den IMR-32 in der EPO-*low*-Gruppe, stieg jedoch in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe. In der Reoxygenierung zeichnete sich in beiden Zelllinien ein Anstieg von HIF-1α mit Zugabe von cEPO-Fc gegenüber der Kontrolle und gegenüber Hypoxie und Reoxygenierung ab.



Abb. 20: Relative Absorption des Hypoxie-induzierten Faktors-1α (HIF-1α) in murinenNeuro-2A nach 24-stündiger Hypoxie und anschließender 24-stündiger Reoxygenierung imVergleich zu 24-stündiger Normoxie (n = 6)Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin fragment, cristallizable;EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = International Units; ml = Milliliter;

 μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; ** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,01). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Im Vergleich zeigt sich in Abbildung 20 die relative Absorption von HIF-1α in der murinen Zelllinie Neuro-2A. Zu sehen war lediglich ein signifikanter Anstieg der

Expression nach der Reoxygenierung in der cEPO-Fc-*low*-Gruppe gegenüber der Kontrolle (p = 0,01). Sonst zeigte sich ein konstantes Expressionsmuster. Der HIF-1 α wird üblicherweise unter hypoxischen Bedingungen vermindert abgebaut. Diese Erwartung spiegelte sich nicht in der vorliegenden Graphik wider.

Zusammenfassend zeigte sich in der murinen Zelllinie Neuro-2A kein signifikanter Unterschied über den Versuchsverlauf oder zwischen den Interventionsgruppen. Eine Ausnahme war der signifikante Anstieg der HIF-1α-Expression nach der Reoxygenierung in der cEPO-Fc-*low*-Gruppe im Vergleich zur zeitgleichen Kontrolle.





📼 Kontrolle 🗰 EPO 0,2 IU/mI 📼 EPO 20 IU/mI 📼 cEPO-Fc 0,2 μg/mI 📼 cEPO-Fc 20 μg/mI

Abb. 21: Relative Absorption der Adenosin-Monophosphat-Kinase- β (AMPK- β) in IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts) nach jeweiliger Hypoxie- und Reoxygenierungszeit im Vergleich zur entsprechenden Normoxie (n = 6)

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; mI = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; § / §§ / §§§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,001); * = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

In Abbildung 21 ist die relative Absorption von AMPK- β in den humanen Zelllinien dargestellt. Die AMPK- β wird üblicherweise durch Hypoxie und daraus resultierenden oxidativen Stress stimuliert. Eine vermehrte Expression ließ sich unter normoxischen Bedingungen in der Interventionsgruppe der IMR-32 (s. Abb.

21 links) mit 20 IU/mI EPO (*high*) gegenüber der Kontrolle zeigen (p = 0,027). Im Verlauf von Hypoxie (p = 0,001) und späterer Reoxygenierung (p = 0,002) fiel die Expression in dieser Gruppe jedoch signifikant gegenüber dem normoxischen Äquivalent ab. Im Vergleich zur Normoxie wurde die AMPK- β in der EPO-*low*-Gruppe im Versuchsverlauf signifikant niedriger exprimiert (p = 0,001 bzw. p = 0,01). In der Hypoxie war es jedoch signifikant mehr als in der unbehandelten Kontrolle (p = 0,029). Eine signifikant geringere Expression war nach der Reoxygenierung in der cEPO-Fc-*high* Gruppe gegenüber der Normoxie zu sehen (p = 0,01). Letzteres war auch in den SH-SY5Y zu beobachten (p = 0,018) (s. Abb. 21 rechts). Hier war zudem der zu erwartende Anstieg in der Kontrollgruppe über den Versuchszeitraum zu verzeichnen (p = 0,029). Bei beiden humanen Zelllinien mit niedriger cEPO-Fc-Konzentration stieg die Expression signifikant unter Hypoxie an (IMR-32 p = 0,029; SH-SY5Y p < 0,001). Im Verlauf der Reoxygenierung war kein Unterschied zu detektieren. Unter normoxischen Bedingungen wurde in den SH-SY5Y die AMPK- β in allen Gruppen auf vergleichbarem Niveau exprimiert.

Zusammenfassend war bei den IMR-32 in den EPO-Interventionsgruppen nach Hypoxie und Reoxygenierung eine verminderte Expression von AMPK-β im Vergleich zu ihrem normoxischen Äquivalent messbar, während es sich bei den SH-SY5Y unverändert bis gegenläufig abzeichnete.



Abb. 22: Relative Absorption von Adenosin-Monophosphat-Kinase- β (AMPK- β) in murinen Neuro-2A nach 24-stündiger Hypoxie und anschließender 24-stündiger Reoxygenierung im Vergleich zu 24-stündiger Normoxie (n = 6)

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; mI = Milliliter; μg = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; § / §§ / §§§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,001); # = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,05); * / ** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Im Vergleich hierzu war, in Abbildung 22 dargestellt, bei der murinen Zelllinie Neuro-2A, wie bei den IMR-32, eine Veränderung in der Expression bereits in der Normoxie bei der EPO-*high*-Gruppe zu beobachten. Allerdings war sie hier signifikant vermindert (p = 0,043), während sie bei den IMR-32 erhöht war. Beobachtet man den Verlauf der Expression in der EPO-*high*-Gruppe über den Versuchszeitraum, fiel in der Hypoxie ein stagnierendes Niveau ins Auge, das allerdings aufgrund der signifikanten Abnahme in der Kontrollgruppe relativ erhöht war (p = 0,002), ebenso war es in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe (p = 0,038). Bemerkenswert war daher umso mehr der Anstieg der Expression in der EPO-*high*-Gruppe nach der Reoxygenierung, sowohl im Vergleich zur Kontrolle (p = 0,029) als auch zur Hypoxie (p = 0,029) und Normoxie (p = 0,022). Die unbehandelten Kontrollen und die EPO-*low*-Gruppe zeigten über den Versuchsverlauf ein identisches Expressionsmuster mit jeweils signifikanten Abfällen während Hypoxie (Kontrolle p < 0,001; EPO-*low* p = 0,029) und Reoxygenierung (Kontrolle p = 0,004; EPO-*low* p = 0,025).

Zusammengefasst veränderte sich die Expression vor allem in der EPO-*high*-Gruppe dahingehend, dass sie in der Normoxie gegenüber der Kontrolle bereits vermindert war, während der Hypoxie und Reoxygenierung relativ zur Kontrolle anstieg und zuletzt auch zu den vorherigen Äquivalenten (Normoxie und Hypoxie) erhöht war. Deutlich wurde zudem der Abfall der Expression der Kontrollgruppen und der EPO-*low*-Gruppe über den Versuchsverlauf.



3.3.3 Bax

📼 Kontrolle 🗰 EPO 0,2 IU/ml 📼 EPO 20 IU/ml 📼 cEPO-Fc 0,2 μg/ml 📼 cEPO-Fc 20 μg/ml

Abb. 23: Relative Absorption des B-*cell follicular lymphoma*-2-assoziiertem X Proteins (Bax) in IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts) nach jeweiliger Hypoxie- und Reoxygenierungszeit im Vergleich zur entsprechenden Normoxie (n = 6) Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; ml = Milliliter; μg = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; §§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,01); * / ** / *** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,001). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

In Abbildung 23 ist die relative Absorption von Bax in den humanen Zelllinien IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts) abgebildet. Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse in den IMR-32 fiel ein sehr uniformes Expressionsmuster über den Versuchszeitraum auf. Ein hoch signifikanter Abfall zeigte sich nach 48 h Hypoxie

in der Interventionsgruppe mit 20 µg/ml cEPO-Fc in Relation zur hypoxischen Kontrolle (p < 0,001), wobei die Expression innerhalb der cEPO-Fc-high-Gruppe über die Versuchsreihe nicht signifikant verändert war. Bax werden propapoptotische Eigenschaften zugeschrieben. Ein Anstieg spricht demnach für eine höhere Apoptosebereitschaft der Zellen. Eine solche erhöhte Expression zeigte sich in den SH-SY5Y in der niedrig dosierten cEPO-Fc-Interventionsgruppe: sowohl nach der 72-stündigen Hypoxie (p = 0,009) als auch nach der anschließenden 24stündigen Reoxygenierung (p = 0.01) war die Expression gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe signifikant erhöht. Auch im Vergleich der hypoxischen (p = 0,006) und reoxygenierten Proben (p = 0.01) mit der normoxischen war eine erhöhte Expression zu sehen. Zwischen Hypoxie und Reoxygenierung war jedoch keine Differenz sichtbar. Der Effekt war in der cEPO-Fc-high-Gruppe nicht ausgeprägt. Stellte man die beiden humanen Zelllinien gegenüber, zeichnete sich die EPO-low-Gruppe ebenfalls als unterschiedlich ab. Während Bax in den SH-SY5Y in der Normoxie signifikant erniedrigt exprimiert wurde und in Relation zur Kontrolle ein konstant niedriges Niveau beibehielt, war es in den IMR-32 tendenziell erhöht.

Zusammengefasst zeigte sich in den IMR-32 ein signifikanter Abfall von Bax nach der Hypoxie in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe im Vergleich zur zeitgleichen Kontrolle. Bei den SH-SY5Y war eine signifikant gesteigerte Expression von Bax in der cEPO-Fc-*low*-Gruppe nach Hypoxie und Reoxygenierung im Vergleich zur Normoxie und jeweils zeitgleichen Kontrolle zu sehen.



Abb. 24: Relative Absorption des B-*cell follicular lymphoma-2*-assoziiertem X Proteins (Bax) in murinen Neuro-2A nach 24-stündiger Hypoxie und anschließender 24-stündiger Reoxygenierung im Vergleich zu 24-stündiger Normoxie (n = 6) Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; ml = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; * = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Im Vergleich zu den humanen Zelllinien ist in Abbildung 24 die relative Absorption von Bax in der murinen Zelllinie Neuro-2A dargestellt. Bei der genaueren Analyse ließ sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der hypoxischen Kontrolle und der hypoxischen cEPO-Fc-*high*-Gruppe feststellen (p = 0,047). Innerhalb dieser Interventionsgruppe schien sich im Verlauf der Versuchsreihe eine steigende Expressionstendenz abzuzeichnen. Die Zugabe von EPO, unabhängig von der Konzentration, schien keine Veränderung der Expression zu bewirken. Auch die Zugabe von geringer cEPO-Fc-Menge ergab ein eher uniformes Expressionsniveau über den Versuchszeitraum.

Insgesamt zeigte sich bei den Neuro-2A nur eine signifikant erhöhte Expression der hypoxischen cEPO-Fc-*high*-Gruppe gegenüber der Kontrolle.

3.3.4 Bcl-2



📼 Kontrolle 🗰 EPO 0,2 IU/ml 🗳 EPO 20 IU/ml 📼 cEPO-Fc 0,2 μg/ml 🖾 cEPO-Fc 20 μg/ml

Abb. 25: Relative Absorption des B-cell follicular lymphoma-2 (Bcl-2) in IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts) nach jeweiliger Hypoxie- und Reoxygenierungszeit im Vergleich zur entsprechenden Normoxie (n = 6)

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; mI = Milliliter; μg = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; § / §§ / §§§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,001); ### = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,001); * / ** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Bcl-2 gilt in der Apoptose-Kaskade als inhibitorisches Protein. Zu erwarten war ein Abfall der Konzentration in unbehandelten Kontrollen demnach im Versuchsverlauf mit eventuellem Anstieg nach der Reoxygenierung im Falle einer ausreichenden Regeneration. In Abbildung 25 ist die relative Absorption von Bcl-2 den humanen Zelllinien IMR-32 und SH-SY5Y über den jeweiligen in Versuchszeitraum von 48 bzw. 72 h dargestellt. Bei den IMR-32 zeigte sich in der Kontrolle ein signifikanter Anstieg während der Hypoxie (p = 0,027). Der gleiche Effekt war in den beiden niedrig konzentrierten Interventionsgruppen zu sehen (EPO-low p = 0,026; cEPO-Fc-low p = 0,026). Während jedoch in der EPO-low-Gruppe ein drastischer Abfall der Expression nach der Reoxygenierung zu verzeichnen war (p < 0,001), war kein Unterschied in der cEPO-Fc-low-Gruppe erkennbar. Des Weiteren zeigte sich in der EPO-high-Gruppe, dass bereits in der Normoxie zur Kontrolle eine höhere Expression bestand (p = 0,007), diese zum Ende der Reoxygenierung massiv in Relation zur Normoxie (p= 0,009) und Hypoxie (p < 0,001) abfiel, während zwischen Normoxie und Hypoxie kein Unterschied sichtbar war. Nahm man nun die SH-SY5Y zum Vergleich, sah man auch hier den drastischen Abfall der Expression der EPO-Interventionsgruppen von Normoxie zur Reoxygenierung (EPO-*low* p < 0,001; EPO-*high* p = 0,006). Bemerkenswert war ebenfalls der Expressionsunterschied während der Normoxie zwischen der Kontrolle und den beiden niedrig konzentrierten Gruppen (EPO-*low* p = 0,027; cEPO-Fc-*low* p = 0,027). Durch den relativen, jedoch nicht signifikanten Abfall der Expression der Kontrolle nach der Reoxygenierung war die cEPO-Fc-*high*-Gruppe relativ erhöht (p = 0,002).

Zusammengefasst zeigte sich in den IMR-32 ein signifikanter Anstieg der Bcl-2-Expression in der Kontrolle und beiden hypoxischen, niedrig konzentrierten Interventionsgruppen gegenüber ihrem jeweiligen normoxischen Äquivalent. Beide EPO-Gruppen wiesen nach der Reoxygenierung einen signifikanten Abfall der Bcl-2-Expression gegenüber der Hypoxie auf. In den SH-SY5Y war ebenfalls in beiden EPO-Gruppen nach der Reoxygenierung die Expression gegenüber der Normoxie vermindert.



Abb. 26: Relative Absorption des B-*cell follicular lymphoma*-2 (Bcl-2) in murinen Neuro-2A nach 24-stündiger Hypoxie und anschließender 24-stündiger Reoxygenierung im Vergleich zu 24-stündiger Normoxie (n = 6)

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; ml = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; * = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Im Vergleich zu den humanen Zelllinien wird in Abbildung 26 die relative Absorption von Bcl-2 in den murinen Neuro-2A verdeutlicht. Gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle zeigte sich in der cEPO-Fc-*low*-Gruppe eine signifikant erniedrigte Expression zu allen Messzeitpunkten nach Normoxie (p = 0,019), Hypoxie (p = 0,031) und Reoxygenierung (p = 0,031). Innerhalb der cEPO-Fc-*low*-Gruppe war jedoch keine signifikante Veränderung durch Hypoxie oder Reoxygenierung festzustellen. Ebenfalls signifikant erniedrigt war die Expression nach der Reoxygenierung in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe gegenüber der unbehandelten Kontrolle (p = 0,029), während diese bei den SH-SY5Y signifikant anstieg. In den Neuro-2A schien die Zugabe von EPO keinen Unterschied im Expressionsmuster zu bewirken.

Zusammengefasst war in den Neuro-2A die Expression von Bcl-2 zu allen Messzeitpunkten in der cEPO-Fc-*low*-Gruppe in Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle signifikant vermindert, jedoch ohne signifikante Veränderung über den Versuchsverlauf.

3.3.5 Bcl_{xL}



🗁 Kontrolle 💻 EPO 0,2 IU/ml 🔊 EPO 20 IU/ml 📼 cEPO-Fc 0,2 µg/ml 📼 cEPO-Fc 20 µg/ml

Abb. 27: Relative Absorption des B-cell follicular lymphoma extra Large (Bcl_{xL}) in IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts) nach jeweiliger Hypoxie- und Reoxygenierungszeit im Vergleich zur entsprechenden Normoxie (n = 6)

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; ml = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; § / §§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01); ## = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,01); * / ** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Das Protein Bcl_{xL} gehört wie Bcl-2 zu den inhibitorischen Komponenten der Apoptose-Kaskade, weshalb auch hier eine erniedrigte Konzentration im Versuchsverlauf zu erwarten war. In Abbildung 27 war bei der relativen Absorption von Bcl_{xL} in den humanen IMR-32 lediglich ein signifikanter Anstieg in der EPO-*low*-Gruppe nach 48-stündiger Hypoxie zu sehen (p = 0,015). Insgesamt war das Expressionsmuster eher uniform. Im Vergleich ist in Abbildung 21 (rechts) die relative Absorption von Bcl_{xL} in den SH-SY5Y repräsentiert. Wie bei der Expression von Bcl-2 in den IMR-32 war die Absorption in der EPO-*high*-Gruppe nach 72 h Normoxie signifikant erhöht (p = 0,005). Die Expression sank zum Ende der Reoxygenierung um das Vierfache (p = 0,026), wie zuvor bei Bcl_{xL}. Zum gleichen Zeitpunkt fiel allerdings hier die Absorption in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe gegenüber Hypoxie (p = 0,002) und Normoxie (p = 0,002) anstatt, wie bei Bcl-2, anzusteigen. Zusammenfassend zeigte sich in den IMR-32 ein eher konstantes Expressionsmuster. In den SH-SY5Y fiel die initial sehr hohe Expression in der EPO-*high*-Gruppe über den Versuchsverlauf ab, ebenso wie die der cEPO-Fc-*high*-Gruppe; letztere jedoch erst signifikant nach der Reoxygenierung.



Abb. 28: Relative Absorption des B-*cell follicular lymphoma extra Large* (Bcl_{xL}) in murinen Neuro-2A nach 24-stündiger Hypoxie und anschließender 24-stündiger Reoxygenierung im Vergleich zu 24-stündiger Normoxie (n = 4) Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;*

EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = International Units; ml = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; §§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,01); * = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Zieht man mit Abbildung 28 die murinen Neuro-2A in den Vergleich, so war auch hier die cEPO-Fc-*high*-Gruppe von Interesse. Während es bei Bcl-2 noch die niedrige Konzentration war, führte hier die höhere Menge an cEPO-Fc zur erhöhten Expression nach jeweils 24 h Normoxie (p = 0,027) und Hypoxie (p = 0,049). Der starke Abfall von Bcl-2 nach der Reoxygenierung in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe war bei Bcl_{xL} nicht erkennbar. Jedoch war nach der Reoxygenierung ein signifikanter Anstieg der Expression in der EPO-*high*-Gruppe gegenüber dem normoxischen

Äquivalent zu sehen (p = 0,01). Dies stand im Gegensatz zu den vorher präsentierten Ergebnissen der humanen SH-SY5Y, die eine abfallende Tendenz von Bcl_{xL} nach Reoxygenierung aufwiesen. Die niedrig konzentrierten Interventionsgruppen zeigten kein unterschiedliches Absorptionsmuster im Vergleich zur Kontrolle. Zu beachten ist bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse der Neuro-2A, dass die Probenanzahl nach Anwendung der Ausschlusskriterien von n = 6 auf n = 4 reduziert war und dadurch die teils hohen Standardabweichungen, beispielsweise in der Kontrolle und cEPO-Fc-*low*-Gruppe nach Reoxygenierung und in der EPO-*high*-Gruppe nach Hypoxie, resultierten.

Zusammenfassend war die Expression von Bcl_{xL} in den Neuro-2A nach Normoxie und Hypoxie in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe zur Kontrolle erhöht. Ebenso erhöht war die Expression in der EPO-*high*-Gruppe gegenüber dem normoxischen Äquivalent.



🖂 Kontrolle 📟 EPO 0,2 IU/ml 🔊 EPO 20 IU/ml 📼 cEPO-Fc 0,2 µg/ml 🖾 cEPO-Fc 20 µg/ml

Abb. 29: Relative Absorption von Caspase 3 in IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts) nach jeweiliger Hypoxie- und Reoxygenierungszeit im Vergleich zur entsprechenden Normoxie (n = 6) Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; ml = Milliliter; μg = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; §§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,01); ## / ### = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,01); ** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,01). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Caspase 3 ist eine der Effektorcaspasen in der Apoptose-Kaskade und ist somit aktiv an der Spaltung von Zellbestandteilen beteiligt. In Abbildung 29 ist die relative Absorption von Caspase 3 in den humanen Zelllinien IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts) über den jeweiligen Versuchszeitraum von 48 bzw. 72 h dargestellt. Bei den IMR-32 ist der Absorptionsverlauf in der EPO-high-Gruppe hervorzuheben. Während er nach der Hypoxie im Vergleich zur Kontrolle signifikant anstieg (p = 0,002), fiel er nach der Reoxygenierung in Relation zur Hypoxie wieder stark ab (p < 0,001), sodass kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrolle bestand. Deutlich anders verhielt sich die Absorption in der EPO-low-Gruppe, die über den Versuchszeitraum immer weiter anstieg (jeweils p = 0,01). Nimmt man im Vergleich die SH-SY5Y, so verhielt sich die EPO-low-Gruppe hier eher wie die EPO-high-Gruppe der IMR-32 (jeweils p = 0,002). Bemerkenswert war hier zudem der signifikante Anstieg der Expression nach der Reoxygenierung in der cEPO-Fc-low-Gruppe gegenüber der Kontrolle (p = 0.002) und dem normoxischen Äquivalent (p = 0,01). Im Gegensatz zu den vorherigen proapoptotischen Proteinen zeigte sich innerhalb der cEPO-Fc-high-Gruppe keine Veränderung.

Zusammenfassend zeigte sich bei den IMR-32 in beiden EPO-Gruppen ein Anstieg der Expression von Caspase 3, die in der EPO-*high*-Gruppe zum Ende der Reoxygenierung wieder signifikant abfiel, während sie in der EPO-*low*-Gruppe weiter auf hohem Niveau blieb. In den SH-SY5Y zeigte sich in beiden EPO-Gruppen nach der Reoxygenierung ein signifikanter Abfall in der Caspase 3-Expression.



Abb. 30: Relative Absorption von Caspase 3 in murinen Neuro-2A nach 24-stündiger Hypoxie und anschließender 24-stündiger Reoxygenierung im Vergleich zu 24-stündiger Normoxie. Man beachte, dass die Y-Achse einen Bruch aufweist (n = 4) Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; ml = Milliliter; μg = Mikrogramm;

Reox = Reoxygenierung. Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der relativen Absorption der murinen Neuro-2A dargestellt. Hier war nach Anwendung der Ausschlusskriterien speziell in den cEPO-Fc-Interventionsgruppen eine geringe Probenanzahl (n = 4) und -menge für eine hohe Standardabweichungen verantwortlich. Demnach war hier über den gesamten Versuchsverlauf keine signifikante Veränderung in den einzelnen Gruppen festzustellen. Die steigende Tendenz in den hypoxischen cEPO-Fc-low und -high-Gruppen war nicht signifikant und aufgrund der hohen Standardabweichung nicht zu werten.



🖂 Kontrolle 💻 EPO 0.2 IU/ml 🖾 EPO 20 IU/ml 🖾 cEPO-Fc 0.2 µg/ml 🖾 cEPO-Fc 20 µg/ml

Abb. 31: Relative Absorption von Caspase 9 in IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts) nach jeweiliger Hypoxie- und Reoxygenierungszeit im Vergleich zur entsprechenden Normoxie (n = 6) fragment, Abkürzungen: cEPO-Fc carbamyliertes Erythropoietin cristallizable; = EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = International Units; ml = Milliliter; µg = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; § / §§ / §§§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent ($p \le 0.05 / p \le 0.01 / p \le 0.001$); # = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,05); * / ** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle $(p \le 0.05 / p \le 0.01)$. Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Bei Caspase 9 handelt es sich wie bei Caspase 3 um eine Effektorcaspase, die direkt für den Abbau von Zellbestandteilen während der Apoptose verantwortlich ist. Sie werden beide durch proteolytische Spaltung aktiviert. Interessant ist daher der Verlauf der Expression von Caspase 9 in den humanen IMR-32, wie in Abbildung 31 (links) dargestellt. Während der Hypoxie kam es zu keiner signifikanten Veränderung. Erst nach Ablauf der Reoxygenierung zeigte sich vor allem in der Kontrolle der zu erwartende Anstieg von Caspase 9 (p = 0,01). Ähnlich verhielt es sich in der EPO-low-Gruppe. Hier war der Anstieg der Expression sowohl im Vergleich zur Hypoxie (p = 0,046) als auch zur Normoxie (p = 0,015) signifikant. Signifikant niedriger war die Expression in den cEPO-Fc-Interventionsgruppen nach der Reoxygenierung durch den relativen Anstieg der unbehandelten Kontrolle (cEPO-Fc-low p = 0.026; cEPO-Fc-high p = 0.002), wobei hier über den Versuchszeitraum keine Veränderung sichtbar war. Die Ergebnisse deckten sich teilweise mit den oben beobachteten Ergebnissen von Caspase 3 in den IMR-32. Auch hier war ein signifikanter Anstieg der Expression nach der Reoxygenierung in der EPO-*low*-Gruppe zu verzeichnen. Zieht man die SH-SY5Y zum weiteren Vergleich hinzu, wurde hier interessanterweise eine hoch signifikant erhöhte Expression in der cEPO-Fc-*low*-Gruppe nach der Hypoxie im Vergleich zur Normoxie deutlich (p < 0,001). Diese Tendenz konnte bei der Expression von Caspase 3 erst im Verlauf der Reoxygenierung dokumentiert werden.

Zusammenfassend fand sich in den SH-SY5Y bis auf die erhöhte Expression von Caspase 9 in der cEPO-Fc-*low*-Gruppe nach der Hypoxie keine signifikante Veränderung. In den IMR-32 zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression nach der Reoxygenierung in der Kontrolle und der EPO-*low*-Gruppe, sodass die cEPO-Fc-Gruppen relativ zur Kontrolle vermindert exprimiert wurden.



Abb. 32: Relative Absorption von Caspase 9 in murinen Neuro-2A nach 24-stündiger Hypoxie und anschließender 24-stündiger Reoxygenierung im Vergleich zu 24-stündiger Normoxie (n = 6) Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; mI = Milliliter; μg = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; § / §§ / §§§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,001); # = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,05); * / ** / *** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,05)

Bei der Auswertung in der murinen Zelllinie Neuro-2A zeigte sich, wie in Abbildung 32 dargestellt, im Verlauf der Hypoxie sowohl bei der Kontroll- (p = 0.001) als auch bei beiden mit EPO behandelten Gruppen eine deutlich niedrigere Expression als zum jeweiligen normoxischen Ansatz (EPO-low p = 0,005; EPO-high p = 0,045). Während der Reoxygenierung stieg in beiden EPO-Gruppen die Expression von Caspase 9 wieder auf ein der Normoxie vergleichbares Niveau an und war damit zur jeweiligen Hypoxie signifikant erhöht (EPO-low p = 0.016; EPO-high p = 0.026). In der Kontrolle blieb die Expression weiterhin niedrig, sodass im Vergleich zur Normoxie ein signifikanter Unterschied bestand (p = 0.004). Betrachtet man hingegen die mit cEPO-Fc behandelten Ansätze, so zeigte sich innerhalb der Hypoxie eine deutliche Expressionssteigerung der beiden Interventionsgruppen gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe, die durch den starken Abfall in der Kontrolle bedingt war (cEPO-Fc-low p = 0,005; cEPO-Fc-high p = 0,026). Im Vergleich zu ihrem jeweiligen normoxischen Pendant war keine signifikante Veränderung messbar. Zuletzt zeigte sich eine signifikante Expressionssteigerung der cEPO-Fc-low-Gruppe gegenüber der Kontrolle während der Reoxygenierung (p = 0,001). Man beachte jedoch, dass sowohl in der Hypoxie als auch in der Reoxygenierung niedrigere Expressionsniveaus erreicht wurden als in der normoxischen Kontrollgruppe.

Zusammenfassend betraf die Veränderung der Expression in den Neuro-2A wie bei den IMR-32 die Kontrolle und die EPO-Gruppen. Nach Hypoxie und Reoxygenierung war eine signifikant verminderte Expression von Caspase 9 in diesen drei Gruppen zu sehen.



🗁 Kontrolle 📟 EPO 0,2 IU/ml 🖎 EPO 20 IU/ml 📼 cEPO-Fc 0,2 μg/ml 🖾 cEPO-Fc 20 μg/ml

Abb. 33: Relative Absorption der *cleaved* **Caspase 9 in IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts)** nach jeweiliger Hypoxie- und Reoxygenierungszeit im Vergleich zur entsprechenden Normoxie (n = 4)

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; mI = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; § = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,05); # = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,05); * = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Die *cleaved* Caspase 9 entsteht als Abspaltungsprodukt nach der Spaltung von Pro-Caspase 9 in die aktive Caspase 9 und die *cleaved* Caspase 9. Die Auswertung der humanen Zelllinien, wie in Abbildung 33 zu sehen, gestaltete sich nach Anwendung der Ausschlusskriterien aufgrund der hohen Standardabweichung und der Reduktion der Probenanzahl von n = 6 auf n = 4 schwierig. Dies betraf die cEPO-Fc-Interventionsgruppen der Reoxygenierung, sowie die EPO-*low*-Gruppe der Normoxie in den IMR-32. Bei den SH-SY5Y betraf es die EPO-*low*-Gruppe der Reoxygenierung. Bei den restlichen Gruppen standen weiter n = 6 Proben zur Auswertung zur Verfügung. Trotzdem war ein signifikanter Anstieg der Expression in der reoxygenierten cEPO-Fc-*high*-Gruppe gegenüber der Normoxie zu sehen (p = 0,028). Mit Fokus auf die Hypoxie der IMR-32, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der *cleaved* Caspase 9 in der EPO-*high*-Gruppe, sowohl im Vergleich mit der Normoxie (p = 0,029) als auch in Relation zur Kontrolle (p = 0,029). Der Abfall nach 24 h Reoxygenierung war im Vergleich zur Hypoxie signifikant (p = 0,029).

Weder bei Caspase 3 noch bei Caspase 9 konnten dieses Expressionsmuster in der Interventionsgruppe gezeigt werden. Im Vergleich dazu sah man bei den SH-SY5Y während der Hypoxie lediglich einen signifikanten Anstieg der Expression in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe gegenüber der Normoxie (p = 0,029), der zum Ende der Reoxygenierung jedoch in einen signifikanten Abfall umschlug (p = 0,029), auch im Vergleich zur Normoxie (p = 0,029) und Kontrolle (p = 0,029). Verglichen mit Caspase 9 war eine deutliche Veränderung am Ende der Versuchsreihe in allen Gruppen, mit Ausnahme der EPO-*low*-Gruppe, zu verzeichnen. So war in der reoxygenierten Kontrolle Caspase 9 gegenüber der normoxischen Kontrolle vermehrt messbar (p = 0,048). Wie zuvor bei Caspase 3 zu beobachten, war auch in der cEPO-Fc-*low*-Gruppe bei der *cleaved* Caspase 9 eine signifikante Steigerung der Expression im Vergleich zur Normoxie zu sehen (p = 0,029).

Zusammenfassend war hier nach Anwendung der Ausschlusskriterien die Aussagekraft eingeschränkt. In den IMR-32 ist eine erhöhte Expression der *cleaved* Caspase 9 in der EPO-*high*-Gruppe nach der Hypoxie sichtbar, die nach der Reoxygenierung wieder abfiel. Auffällig war zudem die erhöhte Expression der cEPO-Fc-Gruppen zu diesem Zeitpunkt. Bei den SH-SY5Y war zwischen Normoxie und Reoxygenierung ein signifikanter Anstieg der Expression in der cEPO-Fc-*low*-Gruppe sichtbar, während gleichzeitig die Expression in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe abfiel.



Abb. 34: Relative Absorption von *cleaved* Caspase 9 in murinen Neuro-2A nach 24-stündiger Hypoxie und anschließender 24-stündiger Reoxygenierung im Vergleich zu 24-stündiger Normoxie

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; mI = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; §§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,01); ** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,01). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

In der weiteren Analyse der murinen Zelllinie Neuro-2A zeigte sich, wie in Abbildung 34 zu sehen, die Expression der *cleaved* Caspase 9 in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe nach der Reoxygenierung signifikant vermindert. Es wurde deutlich, dass eine geringere Absorption in Relation zur Kontrolle (p = 0,01) und Normoxie (p = 0,01) gemessen wurde, ebenso wie gerade bei den SH-SY5Y verdeutlicht. Während bei Caspase 9 die Expression in den cEPO-Fc-Gruppen stieg, fiel sie hier jedoch im Verlauf von Hypoxie und anschließender Reoxygenierung weiter ab. So war in der cEPO-Fc-*low*-Gruppe ein signifikanter Abfall gegenüber der Kontrolle messbar (p = 0,01), der jedoch innerhalb der Gruppe über den Versuchszeitraum nicht signifikant verändert war. Eine Beeinflussung durch den Zusatz von EPO ließ sich nicht zeigen.

Zusammenfassend war bei den Neuro-2A über Hypoxie und Reoxygenierung eine verminderte Expression der *cleaved* Caspase 9 in den cEPO-Fc-Gruppen gegenüber der zeitgleichen Kontrolle zu sehen.

3.3.9 c-IAP



📼 Kontrolle 🗰 EPO 0,2 IU/ml 🖾 EPO 20 IU/ml 📼 cEPO-Fc 0,2 μg/ml 🖾 cEPO-Fc 20 μg/ml

Abb. 35: Relative Absorption des c-Inhibitor of apoptotic proteins (c-IAP) in IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts) nach jeweiliger Hypoxie- und Reoxygenierungszeit im Vergleich zur entsprechenden Normoxie (n = 6)

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; mI = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; § / §§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01); # / ## = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01); * / **= signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

c-IAP gehört zu den antiapoptotischen Proteinen, indem es unter anderem hemmend auf die Caspasen 3 und 9 wirkt. In der obigen Abbildung 35 ist die relative Absorption von c-IAP über den Versuchszeitraum in den humanen Zelllinien IMR-32 und SH-SY5Y abgebildet. Bei den IMR-32 (links) zeigten sich vor allem deutliche Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie sowie zwischen Hypoxie und Reoxygenierung. Während in der Hypoxie in allen Interventionsgruppen, mit Ausnahme der cEPO-Fc-*low*-Gruppe, eine signifikant erhöhte Expression gegenüber ihrer jeweiligen Normoxie zu verzeichnen war (EPO-*low* p = 0,018; EPO-*high* p = 0,003; cEPO-Fc-*high* p = 0,029), fiel diese in allen Interventionsgruppen im Vergleich zur Hypoxie nach der Reoxygenierung ab (EPO-*low* p = 0,029; EPO-*high* p = 0,004; cEPO-Fc-*low* p = 0,026; cEPO-Fc-*high* p = 0,029). Die Expression von c-IAP war in der Kontrolle während der Reoxygenierung am höchsten, jedoch nicht signifikant, im Vergleich zu den Interventionsgruppen, allerdings im Vergleich zur Normoxie (p = 0,036). Nach 48 h Hypoxie war die Expression von c-IAP in den cEPO-Fc-Gruppen signifikant höher als in der Kontrolle (cEPO-Fc-*low* p = 0,018; cEPO-Fc-*high* p = 0,0,24). Im direkten Vergleich mit den SH-SY5Y (s. Abb. 29 rechts) fiel auch hier die signifikante Veränderung in den hypoxischen EPO-Gruppen auf. Allerdings war c-IAP im Vergleich zur Normoxie vermindert exprimiert (jeweils p = 0,029). In der Normoxie stieg die Expression des Proteins in beiden EPO-Gruppen signifikant gegenüber der Kontrolle (jeweils p = 0,004). Es zeigte sich zudem eine signifikante Abnahme in der EPO-*high*-Gruppe nach der Reoxygenierung (p = 0,029). Auffällig war zudem eine verminderte Absorption in der Kontrollgruppe nach der Reoxygenierung (p = 0,004 bzw. p = 0,029). Die cEPO-Fc-Interventionsgruppen wiesen insgesamt ein konstantes Expressionsmuster auf.

Zusammengefasst wiesen in den IMR-32 alle Interventionsgruppen nach der Hypoxie eine erhöhte Expression von c-IAP auf. Nach der Reoxygenierung fiel sie wiederum in allen Interventionsgruppen ab. In den jeweils zeitgleichen Kontrollen stieg die Expression hingegen an. In den SH-SY5Y war nur in den EPO-Gruppen eine signifikante Veränderung messbar. Bereits in der Normoxie war die Expression in den beiden Gruppen erhöht, dadurch war sie nach der Hypoxie signifikant vermindert, was sich in der EPO-*high*-Gruppe bis zur Reoxygenierung hielt.



Abb. 36: Relative Absorption des c-Inhibitor of apoptotic proteins (c-IAP) in murinen Neuro-2A nach 24-stündiger Hypoxie und anschließender 24-stündiger Reoxygenierung im Vergleich zu 24-stündiger Normoxie (n = 6)

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; mI = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; §§§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,001); ## = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,01); * / *** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,001). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

c-IAP wurde in den Neuro-2A im Verlauf der Versuchsreihe in der Kontrollgruppe wie erwartet exprimiert (vgl. Abb. 36). Während der Hypoxie sank die Synthese (p = 0,001) und stieg nach der Reoxygenierung wieder auf ein der Normoxie entsprechendes Niveau an, womit sie gegenüber der Hypoxie signifikant erhöht war (p = 0,01). Bei den Interventionsgruppen ließ sich lediglich in den höher behandelten Ansätzen ein Unterschied sehen. Bereits während der Normoxie wurde in der EPO-*high*-Gruppe signifikant weniger c-IAP exprimiert (p = 0,017). Dieser Trend setzte sich während Hypoxie und Reoxygenierung nicht signifikant fort. In der cEPO-Fc-*high*-Gruppe war gegenüber der Kontrolle nach der Hypoxie hoch signifikant vermehrt c-IAP zu messen (p = 0,001). In der Reoxygenierung zeigte sich ein gleichbleibendes Niveau. Da die Kontrolle zu diesem Zeitpunkt wieder mehr c-IAP exprimierte, war kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Bei den Neuro-2A ließ sich zusammenfassend eine verminderte Expression in der Kontrolle nach der Hypoxie mit erneutem Anstieg nach der Reoxygenierung zeigen.

In der cEPO-Fc-*high*-Gruppe war nach der Hypoxie eine signifikant erhöhte Expression von c-IAP messbar.

3.3.10 x-IAP



Abb. 37: Relative Absorption des x-Inhibitor of apoptotic proteins (x-IAP) in IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts) nach jeweiliger Hypoxie- und Reoxygenierungszeit im Vergleich zur entsprechenden Normoxie (n = 6)

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; ml = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; § / §§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01); ## = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,01); * / ** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Das Protein x-IAP gehört wie c-IAP zu den antiapoptotischen Komponenten der Apoptose-Kaskade. Beide wirken hemmend auf die Effektorcaspasen 3, 6 und 7. In Abbildung 37 ist die relative Absorption von x-IAP in den humanen Zelllinien IMR-32 und SH-SY5Y abgebildet. Betrachtete man zunächst die IMR-32, so fiel in der Normoxie eine signifikant erhöhte Expression von x-IAP in der EPO-*high*-Gruppe auf (p = 0,01). Nach der Hypoxie fiel die relative Absorption jedoch signifikant ab, sowohl in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle (p = 0,016) als auch auf die normoxische Referenz (p = 0,027). Im weiteren Verlauf zeichnete sich eine tendenzielle Steigerung der Expression ab, die jedoch nicht signifikant war. Im Vergleich dazu zeigte sich die x-IAP-Expression in der EPO-*low*-Gruppe während der Hypoxie erhöht (p = 0,006) und nach der Reoxygenierung wieder auf normoxischem Niveau und damit signifikant vermindert zur Hypoxie (p = 0,009). Betrachtet man die cEPO-Fc-*low*-Gruppen, so war nach Hypoxie (p = 0,033) und Reoxygenierung (p = 0,041) eine niedrigere Absorption zu messen. Die cEPO-Fc-*high*-Gruppe zeigte sich mit konstanter Expression während des gesamten Versuchsverlaufs.

Die relative Absorption von x-IAP in den SH-SY5Y war in allen normoxischen Gruppen vergleichbar. Nach der Hypoxie wies die cEPO-Fc-*high*-Gruppe eine signifikant niedrigere Expression auf (p = 0,026), die bis zum Ende der Reoxygenierung konstant blieb (p = 0,05). Nach der Reoxygenierung waren signifikant verminderte Absorptionen in beiden EPO-Interventionsgruppen gegenüber der Kontrolle zu messen (jeweils p = 0,029). Auch bei c-IAP war dies zumindest in der EPO-*low*-Gruppe der Fall. In der EPO-*high*-Gruppe war die Expression auch zur Normoxie signifikant vermindert (p = 0,029).

Bei den IMR-32 fand sich zusammengefasst in der EPO-*low*-Gruppe nach der Hypoxie ein Anstieg der Expression, in der cEPO-Fc-*low*-Gruppe hingegen ein Abfall. Nach der Reoxygenierung fiel sie auch in der EPO-*low*-Gruppe. In der EPO*high*-Gruppe fiel die Expression während der Hypoxie signifikant ab, da bereits in der Normoxie eine erhöhte Expression gegenüber der Kontrolle bestand. Bei den SH-SY5Y war ein Abfall der Expression in allen Interventionsgruppen nach der Reoxygenierung zu sehen, mit Ausnahme der cEPO-Fc-*low*-Gruppe. In der cEPO-Fc-*high*-Gruppe bestand dies bereits nach der Hypoxie.



Abb. 38: Relative Absorption von x-Inhibitor of apoptotic proteins (x-IAP) in murinen Neuro-2A nach 24-stündiger Hypoxie und anschließender 24-stündiger Reoxygenierung im Vergleich zu 24-stündiger Normoxie (n = 6)

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; mI = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; § / §§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01); ## = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,01); ** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,01). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Abbildung 38 stellt die relative Absorption von x-IAP im Verlauf der Versuchsreihe in den murinen Neuro-2A dar. Bemerkenswert war die Veränderung während der Reoxygenierung. Während Normoxie und Hypoxie gab es zwischen behandelten und unbehandelten Ansätzen keine signifikanten Unterschiede. Innerhalb der Reoxygenierung waren die Interventionsgruppen mit höher konzentrierten Zusätzen hervorzuheben. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle zeigte sowohl die cEPO-Fc-high-Gruppe als auch die EPO-high-Gruppe eine signifikante Abnahme in der Expression (jeweils p = 0,01). In Relation zur hypoxischen (cEPO-Fc-high p = 0,002; EPO-high p = 0,002) und normoxischen Vergleichsgruppe (cEPO-Fc-high p = 0,01; EPO-high p = 0,026) war eine signifikante Reduktion zu beobachten, die bei den niedrig dosierten Interventionsgruppen nicht zu messen war.

Zusammenfassend zeigte sich bei den Neuro-2A ein Abfall der Expression von x-IAP vor allem nach der Reoxygenierung in den hochkonzentrierten Interventionsgruppen.

3.3.11 Cytochrom C



🗂 Kontrolle 🔳 EPO 0,2 IU/ml 🖾 EPO 20 IU/ml 🔲 cEPO-Fc 0,2 μg/ml 🖾 cEPO-Fc 20 μg/ml

Abb. 39: Relative Absorption von Cytochrom C in IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts) nach jeweiliger Hypoxie- und Reoxygenierungszeit im Vergleich zur entsprechenden Normoxie (n = 6) Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; ml = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; §§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,01); * / ** / *** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,05 / p ≤ 0,01 / p ≤ 0,001). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

Cytochrom C ist fördernder Teil der mitochondrialen Apoptose-Kaskade. Ein Anstieg während der Hypoxie war demnach zu erwarten. In Abbildung 39 ist die Expression von Cytochrom C in den humanen Zelllinien IMR-32 und SH-SY5Y abgebildet. Eine signifikante Steigerung der Expression ließ sich hier nicht nachweisen. In der EPO-*low*-Gruppe war nach Hypoxie und Reoxygenierung (jeweils p = 0,01) eine verminderte Expression von Cytochrom C zu sehen. Auch bei den SH-SY5Y zeigte sich zumindest nach der Reoxygenierung in der EPO-*low*-Gruppe eine erniedrigte Expression (p = 0,01). Eine signifikante Reduktion der relativen Absorption im Versuchsverlauf im Vergleich zur Kontrolle, war zudem in der cEPO-Fc-*low*-Gruppe zu sehen (p = 0,026). Zu beachten war hierbei, dass bereits nach der Normoxie eine tendenziell, jedoch nicht signifikant niedrigere Expression bestand. Ebenso war ein solcher Abfall der relativen Absorption nach

der Reoxygenierung im Vergleich zur Kontrolle (p < 0,001) und Normoxie (p = 0,01) in der EPO-*high*-Gruppe messbar.

Zusammengefasst zeigte sich bei den IMR-32 in der EPO-*low*-Gruppe eine verminderte Expression von Cytochrom C nach Hypoxie und Reoxygenierung. Bei den SH-SY5Y war nach der Hypoxie in beiden cEPO-Fc-Gruppen eine verminderte Expression sichtbar. Nach der Reoxygenierung war die Expression von Cytochrom C in allen Interventionsgruppen, mit Ausnahme der cEPO-Fc-*high*-Gruppe vermindert.



Abb. 40: Relative Absorption von Cytochrom C in murinen Neuro-2A nach 24-stündiger Hypoxie und anschließender 24-stündiger Reoxygenierung im Vergleich zu 24-stündiger Normoxie (n = 6)

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = *International Units*; ml = Milliliter; μ g = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; §§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,01); ## = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,01); ** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,01). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

In Abbildung 40 ist die relative Absorption von Cytochrom C in den murinen Neuro-2A dargestellt. Die normoxische cEPO-Fc-*low*-Gruppe zeigte gegenüber der normoxischen Kontrolle eine signifikant erhöhte Expression (p = 0,01), sowie im Verlauf der Versuchsreihe einen Abfall der Expression im Vergleich zur Normoxie (p = 0,004 bzw. 0,014), wobei zwischen Hypoxie und Reoxygenierung ein

vergleichbares Expressionsniveau bestand und dieses nicht signifikant verändert zur jeweiligen Kontrolle war. Hervorzuheben ist zudem die Interventionsgruppe mit hoher EPO-Zugabe. Während der Hypoxie war die Expression von Cytochrom C gegenüber der Normoxie signifikant reduziert (p = 0,002) und stieg zum Ende der Reoxygenierung wieder an (p = 0,01). Hier wurden zur Normoxie vergleichbare Werte erreicht. Gegenüber der Kontrolle gab es keine signifikante Differenz. Auffällig war der Abfall von Cytochrom C in der Kontrolle von Normoxie zur Hypoxie auf knapp die Hälfte (p = 0,01). Bei den Neuro-2A konnte bereits bei Bax eine gesteigerte Expression in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle nach der Hypoxie beobachtet werden. Ebenso verhielt es sich mit der Expression von Cytochrom C (p = 0,004). Die Zugabe von geringer EPO-Konzentration bewirkte keine signifikante Veränderung im Versuchsverlauf.

Zusammenfassend fiel bei den Neuro-2A die Expression nach Hypoxie und Reoxygenierung in der EPO-*high*- und der cEPO-Fc-*low*-Gruppe unter das normoxische Niveau ab. Bereits in der Normoxie war die relative Absorption in letztgenannter Gruppe signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Durch den Abfall der Expression in der Kontrolle nach der Hypoxie war die Expression von Cytochrom C in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe signifikant erhöht.

3.3.12 smac/DIABLO



🗂 Kontrolle 🖿 EPO 0,2 IU/ml 🖾 EPO 20 IU/ml 📼 cEPO-Fc 0,2 µg/ml 🖾 cEPO-Fc 20 µg/ml

Abb. 41: Relative Absorption von smac/DIABLO in IMR-32 (links) und SH-SY5Y (rechts) nach jeweiliger Hypoxie- und Reoxygenierungszeit im Vergleich zur entsprechenden Normoxie (n = 6) cEPO-Fc carbamyliertes Erythropoietin Abkürzungen: = fragment, cristallizable; EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = International Units; ml = Milliliter; µg = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; smac/DIABLO = Second mitochondrial activator of caspases/direct inhibitor of apoptotic proteins binding protein of low isoelectric point; § / §§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent ($p \le 0.05$ / $p \le 0.01$); ## = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent ($p \le 0.01$); * / ** / *** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle ($p \le 0.05 / p \le 0.01 / p \le 0.001$). Dargestellt sind die Mittelwerte (mean) mit Standardabweichung (SD)

Das Protein smac/DIABLO ist wie Cytochrom C maßgeblich an der mitochondrialen Schiene der Apoptose-Kaskade beteiligt. Seine relative Absorption in den IMR-32 und den SH-SY5Y ist in Abbildung 41 dargestellt. In den IMR-32 ließ sich nach Normoxie und Hypoxie keine signifikante Veränderung in der Proteinexpression feststellen. Hier wurde erst nach Ablauf der Reoxygenierung eine signifikante Reduktion von smac/DIABLO in der Kontrolle gegenüber der Hypoxie messbar (p = 0,007). In Relation dazu trat daher eine signifikant erhöhte Expression in der EPO-*low*-Gruppe (p = 0,003) und der cEPO-Fc-*high*-Gruppe auf (p = 0,035). Diese Differenzen waren jedoch nicht signifikant zur jeweiligen Hypoxie und Normoxie. Im Vergleich dazu stand die relative Absorption der SH-SY5Y (s. Abb. 41 rechts). Hier fand sich bereits in der Normoxie eine signifikant erhöhte smac/DIABLO-Expression in der cEPO-Fc-*low*-Gruppe (p = 0,043). Die Expression stieg nach der Hypoxie in dieser Gruppe nicht an. Erst nach Ablauf der Reoxygenierung war eine signifikant
erhöhte Absorption messbar (p = 0,01). In der cEPO-Fc-*high*-Gruppe fand sich nach der Hypoxie eine erhöhte Expression im Vergleich zur Normoxie (p = 0,01), die jedoch nach Reoxygenierung wieder auf ein normoxisches Niveau rückläufig und damit zur Hypoxie signifikant vermindert war (p = 0,01). Diese war zudem gegenüber der reoxygenierten Kontrolle signifikant erhöht (p = 0,029). Weitere Veränderungen waren in der EPO-*low*-Gruppe zu verzeichnen. Während Hypoxie (p = 0,024) und Reoxygenierung (p = 0,002) fiel die Expression von smac/DIABLO signifikant gegenüber der Normoxie. In der EPO-*high*-Gruppe waren ein signifikanter Abfall von smac/DIABLO nach der Reoxygenierung gegenüber der Normoxie (p = 0,026) und ein signifikanter Anstieg gegenüber der Hypoxie (p = 0,01) messbar.

Zusammenfassend war in den IMR-32 nach der Reoxygenierung ein signifikanter Abfall der smac/DIABLO-Expression zu beobachten, sodass die Expression in der EPO-*low*- und der cEPO-Fc-*high*-Gruppe signifikant erhöht war. Bei den SH-SY5Y war die Expression nach der Reoxygenierung in den EPO-Gruppen vermindert, während sie in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe zunächst nach der Hypoxie anstieg, dann aber ebenfalls fiel. Durch den signifikanten Abfall der Expression in der Kontrolle nach der Reoxygenierung war die relative Absorption von smac/DIABLO in der EPO-*high*- und beiden cEPO-Fc-Gruppen erhöht.



Abb. 42: Relative Absorption von smac/DIABLO in murinen Neuro-2A nach 24-stündiger Hypoxie und anschließender 24-stündiger Reoxygenierung im Vergleich zu 24-stündiger Normoxie (n = 6)

Abkürzungen: cEPO-Fc = carbamyliertes Erythropoietin *fragment, cristallizable;* EPO = Erythropoietin; h = Stunden; H = Hypoxie; IU = International Units; ml = Milliliter; μg = Mikrogramm; Reox = Reoxygenierung; smac/DIABLO = Second mitochondrial activator of caspases/direct inhibitor of apoptotic proteins binding protein of low isoelectric point; §§ = signifikanter Unterschied zum normoxischem Äquivalent (p ≤ 0,01); # = signifikanter Unterschied zum hypoxischen Äquivalent (p ≤ 0,05); ** = signifikanter Unterschied zur zeitgleichen Kontrolle (p ≤ 0,01). Dargestellt sind die Mittelwerte (*mean*) mit Standardabweichung (SD)

In Abbildung 42 ist im Vergleich dazu die relative Absorption von smac/DIABLO in den murinen Neuro-2A dargestellt. Hier zeigte sich besonders in der EPO-*high*-Gruppe ein signifikanter Anstieg nach der Hypoxie im Vergleich zur Kontrolle (p = 0,002). Nach der Reoxygenierung fiel die Expression signifikant wieder auf ein mit der Normoxie vergleichbares Niveau ab (p = 0,038), das in Relation zur Kontrolle jedoch nicht signifikant verändert war. Mit Blick auf die oben ausgewerteten Ergebnisse von Cytochrom C in dieser Gruppe fand sich dort eine eher erniedrigte Expression nach der Hypoxie. Das sonst konstante Expressionsniveau während der Versuchsreihe wurde nach der Reoxygenierung durch eine signifikant niedrigere relative Absorption von smac/DIABLO in der cEPO-Fc-*high*-Gruppe in Relation zum normoxischen Äquivalent unterbrochen (p = 0,006).

Zusammenfassend war in den Neuro-2A nach der Hypoxie zunächst ein Anstieg der Expression in der EPO-*high*-Gruppe sichtbar, im Verlauf fiel sie nach der Reoxygenierung wieder ab.

4. Diskussion

Neuronale Ischämie- und Reperfusionsschäden in Form von Paraplegie bzw. Paraparese nach invasiven Therapieansätzen an der Aorta sind eine schwere Komplikation mit einer Häufigkeit von 1,7-11,4 % [14, 19]. Bis heute gibt es keine präventive Methode, die mit geringer Nebenwirkungsrate und breiter Anwendbarkeit im klinischen Alltag Einzug gefunden hätte. Sowohl pathophysiologische Abläufe als auch medikamentöse und interventionelle Therapieansätze sind in den letzten Jahren in in vivo Modellen evaluiert worden. Hierbei kristallisierten sich Erythropoietin (EPO) und ein modifiziertes EPO-Derivat, das carbamylierte Erythropietin-Fc (cEPO-Fc), als potenziell therapeutisch wirksame Substanzen heraus [65, 86]. Tierexperimentelle Ansätze erlauben zwar Rückschlüsse auf die Klinik, jedoch beantworten sie nicht ausreichend die Frage nach den molekulargenetischen Vorgängen auf Zellebene. Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf neuronale Zelllinien zu untersuchen. Hier können einzelne Umgebungsfaktoren wie Nährstoffzusammensetzung des Mediums. Temperatur und Sauerstoffkonzentration der Atmosphäre gezielt beeinflusst und verändert werden. Eine Immunmodulation oder das Verhalten von umgebenden Zellstrukturen können so als Einflussfaktoren ausgeschlossen werden. Um möglichst den menschlichen Zellorganismus zu simulieren, wurden zwei humane (IMR-32 und SH-SY5Y) und zum Vergleich eine murine Zelllinie (Neuro-2A) gewählt. Bei allen drei Zelllinien handelt es sich um gut etablierte und bereits langjährig in der Forschung genutzte Zelllinien. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei diesen Zelllinien um neuronale Tumorzelllinien handelt. Sie weisen somit eine oder mehrere Mutationen auf, die dazu führen, dass sie eine hohe Teilungsrate und potenziell eine höhere Widerstandfähigkeit gegenüber äußeren Noxen aufweisen als Primärzellen in Kultur oder Zellverbände, die tierexperimentell gewonnen wurden.

4.1 Entwicklung des Hypoxiemodells

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines passenden Hypoxiemodells. Es sollte eine sofortige Hypoxie initiieren, diese konstant halten können, händisch einfach umsetzbar und somit reproduzierbar sein. Wünschenswert wäre eine kontrollierbare Modifizierbarkeit, beispielsweise Übertragbarkeit auf andere Zelllinien oder Veränderung der Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre.

Die diversen enzymatischen Hypoxiemodelle (bspw. 2,5 Liter Beutel AnaeroGen Oxoid, Fa. Thermo Scientific[™]) versprechen zwar eine unmittelbare und konstante Hypoxie und scheinen reproduzierbar zu sein, verändern jedoch das Mikromilieu derart, dass sie für die vorliegende Arbeit bereits im Vorfeld ausgeschlossen wurden. Übermäßige Temperaturentwicklung, CO₂-Produktion [51] oder das Entstehen von potenziell toxischen Radikalen, wie Wasserstoffperoxid [52], machen diese Modelle ungeeignet für die geplante Versuchsreihe. Ein Hypoxieschrank, bspw. von BINDER (CB Serie) oder Eppendorf (Galaxy® 48 R), ermöglicht eine modifizierbare und kontrollierte Hypoxie, die leicht reproduzierbar ist. Jedoch ist die Hypoxieinduktion nicht unmittelbar. Jedes Öffnen des Schranks stört die Atmosphäre, sodass zwischenzeitliche Probenentnahmen nicht möglich sind, ohne eine erneute stundenlange Anpassung der Atmosphäre in Kauf nehmen zu müssen. Ohne äußerliche Störung erreicht der Schrank nach ungefähr vier Stunden eine konstante Hypoxie, die über mehrere Tage aufrechterhalten werden kann [53, 54].

Die Hypoxiekammer (bspw. Fa. Stemcell Technologies) ist ebenfalls eine verbreitete Methode in der Hypoxieforschung. Hierfür ist vorher das Gasgemisch zu definieren und zu bestellen. Über einen zuleitenden und einen ableitenden Schenkel kann die Kammer mit dem speziellen Gemisch geflutet werden, sodass aufgrund des hohen Luftstroms die ursprüngliche Atmosphäre ausgetauscht wird. Demnach ist theoretisch eine plötzliche Hypoxieinduktion möglich. Aufgrund des vorherig Gasgemisches gewünschte ist die definierbaren auch kontrollierbare Modifizierbarkeit für andere Versuche denkbar. Zudem ist es möglich die Hypoxiekammer ihrer Größe im üblichen Zellkulturschrank aufgrund unterzubringen. Die genutzten Zelllinien oder Primärzellen sind ebenfalls variierbar. Die Kammer ist somit sehr flexibel einsetzbar. Allerdings ist es auch hier nicht möglich, zwischenzeitlich Proben zu entnehmen, ohne die Atmosphäre zu stören. In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung der Hypoxiekammer überprüft. Durch die Arbeit von Jäger [42] war bereits bekannt, dass für eine sofortige Hypoxieinduktion nicht nur die Atmosphäre rasch ausgetauscht werden musste, sondern auch eine Vorbereitung des Zellkulturmediums nötig war. In den Messungen der Sauerstoffkonzentration nach manuellem Entgasen mittels Spritzenzug konnte in dieser Arbeit keine ausreichende Hypoxie induziert werden (vgl. Abb. 7). Zudem konnte die Durchführungsobjektivität dieser Methode nicht gewährleistet werden; Mehrere interne Mitarbeiterinnen (n = 3) führten hierfür das manuelle Entgasen nach o. g. Protokoll durch, was zu einer großen Varianz in den Ergebnissen führte, weshalb diese Entgasungsmethode als mögliches Verfahren verworfen wurde. Bedenkt physikalische Gesetzmäßigkeiten man von Sauerstoffpartialdruck und Diffusion in Abhängigkeit von der Höhe und Oberfläche des Flüssigkeitsspiegels in der Zellkulturschale, dauert es bis zu einer Stunde bis zur Angleichung [87]. Wenger et al. beschreiben ebenfalls, dass eine Mediumvorbereitung dieses Problem beheben könnte. Idealerweise sollte hierbei eine Stickstoffleitung durch das Medium geführt werden. Dies zeigte sich jedoch als wenig praktikabel. Allen et al. berichteten 2001, dass sich übliche Zellkulturmedien sogar erst in mehr als drei Stunden an die Umgebungsatmosphäre anpassen [73]. Für eine zuverlässige Mediumdesoxygenierung wurde das Medium in der vorliegenden Dissertationsarbeit unter hypoxischer Atmosphäre in der Hypoxiekammer über vier Stunden desoxygeniert. Da größere Volumina benötigt wurden, wurde das Medium mittels Rührfisch und Magnetrührer umgewälzt, um eine größtmögliche Austauschoberfläche zu ermöglichen. In den regelmäßigen Messungen in der geschlossenen Kammer zeigten sich hierbei konstant niedrige Sauerstoffkonzentrationen im vorbereiteten Medium. Als problematisch stellte sich im Anschluss jedoch die Extraktion des Mediums dar. Ein Kontakt des desoxygenierten Mediums mit sauerstoffhaltiger Atmosphäre hätte aufgrund des hohen Konzentrationsgefälles zu einer sofortigen, wenn auch nicht vollständigen, Reoxygenierung geführt [87]. Aus diesem Grund wurden an der Kammer weitere Bohrungen vorgenommen, die mit Gummistopfen verschlossen wurden. Hierüber konnte im Anschluss an die Desoxygenierung das Medium über eine Heidelberger Verlängerung in eine Spritze abgezogen und auf die in einer zweiten Hypoxiekammer vorbereiteten Zellkulturplatten gegeben werden. Eine Kultur in üblichen Flaschen war aufgrund der fehlenden Zuspritzmöglichkeit nicht möglich. Zu Beginn des eigentlichen Hypoxieversuchs wurde ein erneuter Anstieg der Sauerstoffkonzentration von annähernd Anoxie auf 20 % des Ausgangswertes

gemessen. Erst nach 14 h Hypoxie lag die Sauerstoffkonzentration bei < 5 % (vgl. Abb. 8). Während des Abziehens des Mediums über die Heidelberger Verlängerung, des kurzen Zwischenlagerns und während des Einspritzens auf die Zellkulturschalen konnte es zu einer geringen Reoxygenierung durch unvermeidbare Atmosphärenkontakte kommen. Die Messung wurde aufgrund der notwendigen Eintauchtiefe der Messsonde in einem Becherglas ohne Zellwachstum durchgeführt. Der Flüssigkeitsspiegel war hier deutlich höher als in den bewachsenen Platten. Der Zellansatz selbst ließ eine direkte Messung im Medium aufgrund des nur sehr dünnen zum Schutz vor Austrocknung belassenen Mediumfilms nicht zu. Dass dieses Restmedium ebenso einen geringen Anstieg der Sauerstoffkonzentration nach dem eigentlichen Hypoxiebeginn bedingen könnte, ist somit nicht auszuschließen. Die oben beschriebene Mediumvorbereitung hielt diesen Anstieg so gering wie möglich. Zudem sollte sich der dünne Mediumfilm schnell an die umgebenden atmosphärischen Zustände angleichen. Außerdem verbrauchen die Zellen weiteren Sauerstoff, bevor sie auf eine anaerobe Stoffwechsellage wechseln, sodass potenziell sogar ein schnellerer Beginn der wäre. Die Handhabbarkeit des Hypoxie anzunehmen beschriebenen Versuchsaufbaus mittels Hypoxiekammer erwies sich letztlich als umständlich und reproduzierte bereits erlangte Messwerte nur unzuverlässig.

Zusammengefasst erfüllte die Hypoxiekammer somit die o.g. Gütekriterien des hier zu etablierenden Modells nur unzureichend. Sie erzeugte keine unmittelbare Hypoxie, das Handling war umständlich und somit stark untersucherabhängig. Die Reproduzierbarkeit war dadurch nur bedingt gegeben.

Im Vergleich dazu erzielte die Hypoxiebank (hier Modell Whitley H35 Hypoxystation, Fa. dws) ein deutlich zuverlässigeres Ergebnis. Meintrup Dank der Handarbeitskanäle, der Schleuse und der automatischen Atmosphärenanpassung waren Arbeiten und Kultivieren innerhalb der Bank ohne Veränderung der Sauerstoffkonzentration möglich. An der Hypoxiebank wurden die Einstellungen für das Gasgemisch vorgenommen. Das Bestellen eines fertigen Gasgemischs entfiel somit. Die Mediumvorbereitung mit Rührer und Rührfisch vor der eigentlichen Hypoxiereihe zeigte eine konstant niedrige Sauerstoffkonzentration. Nach durchschnittlich drei Stunden waren Werte < 5 % erzielt worden (s. Abb. 9). Der Transfer, der bei der Hypoxiekammer notwendig war, wurde innerhalb der Hypoxiebank zur Simulation durchgeführt und die Messung anschließend

103

fortgeführt. Die Sauerstoffkonzentration blieb durchgehend bei < 5 %. In der Bank konnte eine reproduzierbare Hypoxie unmittelbar induziert und aufrechterhalten werden, weshalb die eigentliche Hypoxiesequenz in der Hypoxiebank durchgeführt wurde. Die Vorbereitungszeit des Mediums wurde aufgrund der größeren Volumina, die benötigt wurden, von vier auf zwölf Stunden verlängert, um eine ausreichende Desoxygenierung zu gewährleisten.

Die Hypoxietoleranz von neuronalen Zellen und insbesondere neuronaler Zelllinien ist sehr unterschiedlich, zumal es sich bei den verwendeten Zelllinien um Tumorzellen handelte. Vorbeschrieben sind für die humane IMR-32 Hypoxiezeiten zwischen 1 h [77], 7 h [78], 12 h [79] und 72 h [80]. Für SH-SY5Y sind Hypoxiezeiten von 2 h [81], 6 h und 24 h über 48 h [82] bis 72 h [80, 88] genannt. Bei den Neuro-2A sind in der Literatur Hypoxiezeiten von 1 h, 3 h, 6 h [74] bis 24 h [74-76] zu finden. Die Ziele dieser Arbeiten variierten sehr stark und somit auch die Methodik der Hypoxieinduktion. Teilweise folgte auf die Hypoxie eine Hypothermie oder es bestand ein gleichzeitiger Glucosemangel. Meist fehlte eine vorherige Desoxygenierung des Mediums. Vereinzelt wurde nach einem gewissen Zeitintervall das Medium ausgetauscht, womit die hypoxische Atmosphäre kurzzeitig unterbrochen und neu aufgebaut werden musste. Eine inkonstante oder nur milde Hypoxie kann hier postuliert werden. Aufgrund der in der o.g. Literatur angegebenen Zeiten erfolgten die in Kapitel 2.2.3 geschilderten MTT-Vorversuche, HIF-1α-Bestimmung im Western Blot und subjektive Beurteilung der Zellmorphologie für jede Zelllinie. Die so ermittelten Hypoxiezeiten von 24 h für die Neuro-2A, 48 h für die IMR-32 und 72 h für die SH-SY5Y decken sich mit einem Teil der oben genannten Quellen [74, 75, 80, 88].

4.2 Veränderungen nach Hypoxie und Reoxygenierung

Zur Ermittlung der idealen Hypoxiezeit wurden die Zelllinien, wie oben beschrieben, ausgesät und das Medium vorab desoxygeniert. Nach 6, 12, 18, 24, 28 und bei den humanen Zelllinien nach 48 und 72 h wurden die Zellen geerntet und Vollprotein aus ihnen gewonnen. Aus dem Vollprotein erfolgte der antikörper-basierte Nachweis von HIF-1α mittels Western Blot. Der Hypoxie-induzierte Faktor-1α wird konstant in der Zelle exprimiert, jedoch unter normoxischen Bedingungen proteasomal abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen wird er stabilisiert und die Konzentration steigt in der Zelle an [89]. Ein weiteres Protein, die AMPK-β, wird häufig als Indikator in Hypoxieversuchen untersucht. Zu bedenken ist allerdings, dass dieses Enzym nicht nur unter Hypoxie vermehrte Aktivität zeigt, sondern auch aufgrund anderer Stressoren, wie Radikalbildung, Substratmangel, Elektrolyt- oder Temperaturveränderungen, ebenfalls in der Aktivität steigt [38]. Die AMPK-β wird durch ein Missverhältnis von hohem Adenosinmonophosphat zu niedrigem Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) aktiviert, sodass ATP-konsumierende Prozesse, wie die Fettsäuresynthese, zugunsten von ATP-produzierenden Prozessen, wie die Betaoxidation von Fettsäuren, herabreguliert werden [38].

Betrachtet man diese Aspekte bei der murinen Zelllinie Neuro-2A, so fand sich zellmorphologisch ein Ablösen der sonst adhärent wachsenden Zellen nach 20-24 h. Durch eine weitere Verlängerung der Hypoxiezeit blieb kaum nutzbares Zellmaterial übrig, weil sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden gelöst hatten. Durch Zentrifugieren ließ sich das Material zwar gewinnen, nach der Proteinisolation war allerdings keine verwertbare Proteinmenge mehr nachweisbar. In den MTT-Vorversuchen zur Findung der Hypoxiezeit war nach 24 h Hypoxie kein signifikanter Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie messbar (vgl. Abb. 14). In der Wiederholung des Viabilitätsassays sprachen die dort gefunden Ergebnisse für das 24 h Intervall. Hier war der Zellmetabolismus signifikant reduziert, regenerierte sich jedoch nach 24 h anschließender Reoxygenierung wieder auf ein der Normoxie entsprechendes Niveau (vgl. Abb. 18). In den Vorversuchen zur Hypoxiezeitfindung zeigte sich mit längerer Hypoxiedauer eine steigende Expression von HIF-1α. In der molekularbiologischen Aufarbeitung nach Festlegung auf das 24 h Intervall war allerdings nach dieser Hypoxiezeit kein signifikanter Anstieg des HIF-1a messbar (vgl. Abb. 20). Die AMPK- β zeigte sogar eine signifikant niedrigere Expression nach 24 h Hypoxie und ebenso nach 24 h folgender Reoxygenierung im Vergleich zur Normoxie (vgl. Abb. 22).

In den humanen Zelllinien zeigte sich subjektiv morphologischer Zellstress in den IMR-32 nach 48 h Hypoxie, bei den SH-SY5Y waren subjektiv selbst nach 72 h nur vereinzelte morphologische Veränderungen sichtbar. Im Vergleich zur Normoxie war die Teilungsrate bzw. Dichte der Bewachsung in der Zellkulturflasche reduziert. In den SH-SY5Y konnte jedoch keine signifikante Veränderung der Viabilität nach Hypoxie bzw. Reoxygenierung festgestellt werden (vgl. Abb. 17). Zu

berücksichtigen ist allerdings, dass die Viabilität nur einen indirekten Hinweis auf die Proliferation darstellt, da sie nur den Anteil stoffwechselaktiver, also lebender Zellen an der Gesamtpopulation angibt. Auch Cho et al. untersuchten den Effekt von Normoxie und zweistündiger Hyperoxie (O₂ 80 %) nach einer zweistündigen Hypoxie in SH-SY5Y mit einer Nachinkubation von 24 h. Sie konnten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im MTT oder der Apoptoserate in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration während der Reoxygenierung feststellen. Interessanterweise war in der Hyperoxie-Gruppe die Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies geringer als in der Normoxie-Gruppe [90]. Currò et al. induzierten eine Hypoxie (1 % O₂) über 24 h mit anschließender 24-stündiger Reoxygenierung in SH-SY5Y und zeigten eine signifikante Reduktion der Proliferation mittels MTT und einen signifikant erhöhten Anteil toter Zellen [91]. Im Hinblick auf die Proteinexpression in der hier vorliegenden Arbeit wurde die AMPK-β in den SH-SY5Y über den Versuchsverlauf auch in der Reoxygenierungsphase tendenziell vermehrt exprimiert. HIF-1a stieg während der Hypoxie signifikant an, fiel zwar nach der Reoxygenierung wieder ab, blieb dabei aber weiterhin oberhalb des normoxischen Kontrollwerts. Diese beiden Beobachtungen sprechen für die Induktion einer suffizienten Hypoxie. Es waren subjektiv keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen erkennbar. Die Messung der Dendritenlängen im Verhältnis zum eigentlichen Zellkörper oder die mikroskopische Beurteilung von intrazellulären Strukturen wären Möglichkeiten zur genaueren Evaluation dieses Aspekts.

Bei den IMR-32, die nur semiadhärent wachsen, zeigte sich im MTT-Assay nach einer Hypoxie von 48 h eine signifikant verminderte Viabilität, die nach der Reoxygenierung noch weiter abfiel. Aldinucci *et al.* konnten nach zwölfstündiger Hypoxie, die sich nach ihren Angaben erst nach drei Stunden in der Atmosphäre einstellte, zunächst einen signifikanten Anstieg an Radikalen und Calcium zeigen. Allerdings beobachteten sie keine Reduktion der Viabilität, was am ehesten mit der deutlich kürzeren Hypoxiezeit zu erklären ist. Beide erhöhten Werte normalisierten sich nach einer 24-stündigen Reoxygenierung [79]. Bei den hier vorliegenden Ergebnissen war ein signifikanter Anstieg von HIF-1α nach der Hypoxie zu sehen, der zur Reoxygenierung konstant blieb. Die AMPK-β-Konzentration fiel tendenziell, aber nicht signifikant, während der Hypoxie ab, was für reduzierten Zellstress spräche, und stieg ebenfalls nicht signifikant zum Ende der Reoxygenierung wieder an. Die HIF-1α-Dynamik und die verminderte Viabilität nach Hypoxie und Reoxygenierung sprechen jedoch für eine suffiziente Hypoxie.

In der Literatur finden sich die hier genutzten, humanen Zelllinien sowohl in der Schlaganfall-Forschung als auch in Bereichen der neurodegenerativen Erkrankungen sowie in der Tumorforschung. Bei letzterer wurde in den letzten Jahren ebenfalls der Einfluss von Hypoxie/Ischämie aufgrund von schnellem Tumorwachstum bei nicht nachkommender Angiogenese untersucht. Hierfür wurden neben den Zelllinien auch Primärzellen genutzt. S. Chen et al. und Zhang et al. fokussierten sich unabhängig voneinander auf den Einfluss von HIF-1α auf das Tumorwachstum. Sie exponierten IMR-32 und SH-SY5Y Zellkulturen einer atmosphärischen Hypoxie von 1 bis 3 % O₂ in unterschiedlichen Zeitintervallen bis 72 h ohne anschließende Reoxygenierung. Chen zeigte unter hypoxischen Bedingungen und erhöhter HIF-1α-Konzentration eine gesteigerte Proliferation, Migration, Invasivität und eine Hochregulierung der Sonic Hedgehoc-Signalkaskade, die schlussendlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt, die zum Überleben der Zelle beitragen [92]. Da in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls ein Anstieg von HIF-1α in den humanen Zelllinien messbar war, kann ein durch die Hypoxie erzeugter proliferativer Effekt postuliert werden, der der anfangs formulierten Hypothese entgegensteht. Somit sind die konstante Expression oder sogar Herabregulation von proapoptotischen Proteinen, wie smac/DIABLO, und die erhöhte Expression von beispielsweise BclxL bzw. Bcl-2 und c-IAP in den SH-SY5Y und IMR-32 erklärbar. Zhang et al. untersuchten einen anderen intrazellulären Signalweg, kamen aber ebenfalls zum Ergebnis der Zellproliferation unter Hypoxie und somit erhöhtem HIF-1a-Level durch Aktivierung von Survivin, welches ebenfalls der IAP-Familie angehört [93]. Durch direkte und indirekte Inhibition von Caspase 9 und 3 (durch erhöhten Abbau von smac/DIABLO) wirkt Survivin antiapoptotisch [94, 95]. Dieser Signalweg unterstützt weiter die hier vorliegenden Ergebnisse, so z. B. die erhöhte Expression von c-IAP unter Hypoxie und die verminderte Expression von smac/DIABLO. Cytochrom C als weiterer mitochondrialer Marker wies ein konstantes Expressionsmuster über den gesamten Versuchsverlauf auf und spricht damit gegen einen Mitochondrienschaden. In der bereits erwähnten Arbeit von Currò et al. waren im MTT bei den IMR-32 keine signifikanten Veränderungen messbar [91]. Ihre Ergebnisse sprechen ebenfalls für eine erhöhte Resistenz Hypoxie eine erhöhte Tumoraggressivität gegenüber und durch die

Reoxygenierung [91]. Diesen Ergebnissen widerspricht jedoch die signifikant reduzierte Viabilität der IMR-32 unter Hypoxie und Reoxygenierung in der vorliegenden Arbeit. Außerdem war die Expression von Caspase 9 und *cleaved* Caspase 9, als Zeichen für eine gesteigerte Apoptoseaktivität unter Hypoxie und Reoxygenierung, in den SH-SY5Y erhöht, obwohl die Viabilität nicht signifikant verändert war. Xiao *et al.* stellten in den SH-SY5Y einen Abfall von Bcl-2 unter Hypoxie fest. In der vorliegenden Arbeit war ein signifikanter Abfall erst nach der Reoxygenierung zu sehen. Der bei Xiao beobachtete Anstieg von Caspase 3 und Bax war in der hier vorliegenden Arbeit nicht so ausgeprägt [96].

Aufgrund des semiadhärenten Wachstumsverhaltens der IMR-32 ist zukünftig jedoch eine weitere Untersuchung der Viabilität oder Proliferation notwendig, bei der ein mögliches Abpipettieren von noch vitalen Zellen technisch vermieden werden kann. Bei den SH-SY5Y war die Viabilität nicht signifikant verändert. Dieses Ergebnis sollte durch einen alternativen Test, wie beispielsweise eine Ki67-Färbung verifiziert werden. Ki67 kann durch einen antikörperbasierten Test an den Chromosomen sich teilender Zellen angefärbt werden und gibt daher Aufschluss über die mitotisch aktive Zellfraktion [97].

Betrachtet man im Vergleich die murine Zelllinie Neuro-2A, findet sich keine vergleichbare Studie zur Frage der Tumorproliferation. Xing et al. erforschten 2019 mithilfe der Neuro-2A den Einfluss von Melatonin auf Hypoxie und Reoxygenierung in Bezug auf einen potenziellen Einsatz in der Schlaganfalltherapie. Der Fokus lag vor allem auf oxidativem Stress und der Reaktion des endoplasmatischen Retikulums. Im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen war bei Xing ein Anstieg der Caspase 3 nach nur einer Stunde Hypoxie messbar [98]. Auch der konstante Verlauf von Bcl-2 und Bax fand sich nicht deckungsgleich in der Literatur wieder. Chio konnte in einem Hypoxiemodell mit gleichzeitigem Glucosemangel (OGD-Modell, Oxygen-Glucose-Deprivation-Modell) einen zeitabhängigen Abfall von Bcl-2 im Western Blot bei einer Hypoxiezeit von 3 und 6 h zeigen. Zugleich war keine Veränderung, analog zu den hier vorliegenden Ergebnissen, von BclxL messbar [74]. Bemerkenswert ist zwar die plötzliche Induktion von OGD durch vorherig desoxygeniertes, glucosefreies Medium, jedoch wird nicht deutlich, unter welchen Bedingungen die Hypoxie über die nächsten Stunden aufrechterhalten wurde [74]. Gotoh et al. konnten einen Bax-Anstieg und Bcl-2-Abfall unter Cobaltchlorid-Hypoxie (CoCl₂) messen [99]. Vergleichbare Ergebnisse konnten Chang et al. mit OGD und folgender CoCl₂-Hypoxieaufrechterhaltung erzielen. Caspase 3, Cytochrom C und Bax waren dort signifikant erhöht [100], während in der vorliegenden Arbeit eine signifikant erniedrigte Cytochrom C-Expression nach Hypoxie und Reoxygenierung zu sehen war. Dies spricht für eine verminderte Mitochondrienschädigung. Gestützt wird die Hypothese des verminderten Mitochondrienschadens durch die unveränderte Expression von smac/DIABLO in der vorliegenden Arbeit. smac/DIABLO gilt als weiterer mitochondrialer Apoptosemarker. Die Expression von Caspase 3 war in den vorliegenden Ergebnissen im Vergleich zu den gerade genannten Publikationen (Gotoh [99] und Chang [100]) unverändert über den Versuchszeitraum. Allerdings war die Zellviabilität bei den vorliegenden Ergebnissen, wie unter OGD und Hypoxie, signifikant reduziert [100]. Anzumerken ist bei dem OGD-Versuchsaufbau von Gotoh jedoch, dass es sich um eine chemische Hypoxieinduktion handelte. Dabei wurde der Zellkultur CoCl₂ zugefügt, das für eine Stabilisierung von HIF sorgte, sodass dieser weniger abgebaut und somit eine Hypoxiesituation simuliert wurde. Die Zellen wurden unter normoxischer Atmosphäre kultiviert [101]. Es handelt sich zwar um ein etabliertes Hypoxiemodell, ist aber nicht direkt auf den vorliegenden Versuchsaufbau zu übertragen. Ein mit der vorliegenden Arbeit vergleichbareres Hypoxiemodell mittels Hypoxieschrank nutzte die Arbeitsgruppe um Song. Sie konnte nach 24-stündiger Hypoxie eine signifikant erhöhte Expression von *cleaved* Caspase 3 zeigen. Interessanterweise war erst nach 48 h Hypoxie eine signifikant verminderte Viabilität sichtbar, die in den Vorversuchen ebenfalls erst dann vermindert war, in der Wiederholung aber bereits nach 24 h Hypoxie eintrat [102]. Im Kontrast dazu stehen die Hypoxieversuche von Geng (2018) und Zhao (2018) mit Neuro-2A. Die Zellen wurden in beiden Arbeitsgruppen über 45 Min. in einer Hypoxiekammer unter Anoxie ohne Vorbereitung des Mediums kultiviert. Nach ausführlichen Messungen in der hier vorliegenden Arbeit war nach einem so kurzen Zeitintervall mit keiner suffizienten Hypoxie zu rechnen (vgl. Abb. 9, Kapitel 3.1.3). Allerdings zeigten die Arbeitsgruppen um Geng und Zhao eine signifikant verminderte Viabilität [103, 104]. Ebenso waren in der Western Blot Analyse Caspase 9, *cleaved* Caspase 3, Bax und Cytochrom C, wie bereits in der Literatur beschrieben, verstärkt nachweisbar [103, 104], was widersprüchlich zu der Auswertung von Caspase 9 in der vorliegenden Arbeit war. Die Expression war sogar signifikant vermindert, was für eine verminderte Apoptosebereitschaft spricht. Andererseits war in der vorliegenden Arbeit die Expression von c-IAP nach der

Hypoxie, deckungsgleich zu den von Geng publizierten Daten, signifikant reduziert [103].

4.3 Einfluss von EPO und cEPO-Fc auf die Proteinexpression

Erythropoietin (EPO) und dem modifizierten EPO, dem carbamylierten EPO-Fc, werden zytoprotektive Eigenschaften zugeschrieben. Vermittelt wird dieser Mechanismus nicht über den üblichen EpoR-EpoR-Rezeptorkomplex, sondern über einen EpoR-βcR-Rezeptorkomplex [61]. Intrazellulär wird Einfluss auf die Proteinexpression zugunsten der antiapoptotischen Proteine genommen (s. Kapitel 1.4.2). Zur Vermeidung systemischer Nebenwirkungen, wie z. B. eine erhöhte Thromboseneigung, wurde das carbamylierte EPO-Fc entwickelt. In vorherigen Tierversuchen zur Ischämie/Reperfusionssequenz auf Rückenmarksebene zeigte sich ein verbessertes klinisches Outcome der Interventionsgruppen gegenüber der Kontrolle [65, 66]. Auch in einer darauf folgenden in vitro Untersuchung zu Hypoxie/Reoxygenierung in Nierenzellkulturen zeigte höheres sich ein Zellüberleben in den Interventionsgruppen [42].

Nach Etablierung des *in vitro* Hypoxie-/Reoxygenierungsmodells nach o. g. Vorgehen, erfolgte die Zugabe von EPO mit 0,2 IU/ml und 20 IU/ml sowie von cEPO-Fc mit 0,2 µg/ml und 20 µg/ml.

In Hinblick auf die humane, neuronale Zelllinie IMR-32 fand sich unter Einfluss von EPO und cEPO-Fc keine veränderte Viabilität im MTT im Vergleich zur zeitgleich unbehandelten Kontrolle. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer Studie von Sartelet *et al.*, in der kein EPO-R auf den IMR-32 nachweisbar war. Unter EPO-Zugabe war keine Veränderung messbar [105]. Jedoch zeigten sich in der vorliegenden Arbeit im Western Blot signifikante Veränderungen einzelner Proteine unter Zugabe von 20 µg/ml EPO. Bcl-2 und x-IAP wurden mit EPO-Zugabe unter normoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert. Diese Ergebnisse sprechen für eine adäquate Wirkung des EPOs gemäß seinem bekannten Wirkmechanismus (vgl. Abb. 2) über Aktivierung von STAT5 und NFkB und konsekutiv erhöhter Transkription von Proteinen der Bcl- und IAP-Familie. Interessanterweise stieg jedoch die Expression von Caspase 3 und *cleaved* Caspase 9 unter hypoxischen Bedingungen unter Zugabe von 20 µg/ml EPO, während x-IAP signifikant niedriger exprimiert wurde. Das spricht für eine gesteigerte Apoptosebereitschaft der Zellen mit gleichzeitiger Herabregulation von antiapoptotischen Proteinen. Der anfangs postulierte

zytoprotektive Effekt von EPO lässt sich hier nicht reproduzieren. Im Gegensatz dazu steht die Proteinexpression unter Einfluss von cEPO-Fc während Hypoxie und Reoxygenierung. Die proapoptotischen Proteine Bax und Caspase 9 wurden geringer exprimiert als die gleichzeitige Kontrolle, zudem war das antiapoptotische Protein c-IAP vermehrt messbar. Dies spricht für einen zytoprotektiven Einfluss von cEPO-Fc auf die IMR-32. Beide Zusatzsubstanzen, cEPO-Fc sogar ausschließlich, entwickeln ihre Wirkung über den EpoR- β cR Rezeptorkomplex. Im Versuchsaufbau von Sartelet *et al.* wurde immunhistochemisch nur der EpoR-EpoR Rezeptorkomplex untersucht und nicht nachgewiesen [105]. Zukünftig sollte dieser interessante Aspekt durch eine weitere Analyse des EpoR- β cR auf den IMR-32 genauer untersucht werden.

2007 stellten Um et al. die Hypothese auf, dass der "klassische" homodimere EPO-R (EpoR/EpoR) für die zytoprotektiven Eigenschaften von EPO an SH-SY5Y verantwortlich sei. Er stützte die Hypothese darauf, dass der heterodimere Rezeptor (EpoR/βcR) nicht nachweisbar war, die Zellen jedoch vor einer Staurosporininduzierten Apoptose unter EPO-Zugabe geschützt wurden [106]. Die Arbeitsgruppe um Chamorro fokussierte sich daraufhin auf die Analyse des genauen EPO-R-Subtyps u. a. in den SH-SY5Y unter Einfluss von EPO und cEPO. Es zeigte sich, dass cEPO im Zellzyklus die G1-zu-S-Phase verlangsamt [107]. Einen verminderten Stoffwechsel oder Viabilität konnte in den SH-SY5Y unter cEPO-Fc-Einfluss in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Allerdings zeigte sich dieses Ergebnis in den Neuro-2A unter cEPO-Fc-Einfluss zu allen Messzeitpunkten des MTT-Assays. Des Weiteren postulierte die Arbeitsgruppe die Hypothesen, EPO binde an beide Rezeptortypen (EpoR/EpoR und EpoR/βcR), und cEPO benötige zwingend beide Untereinheiten des heterodimeren Rezeptors, um seine zytoprotektive Wirkung in neuronalen Zellen zu entfalten [107]. Entgegen den Daten von Um et al. wurden hier beide Rezeptortypen nachgewiesen. Poniewierska-Baran et al. wiesen mRNA (messenger-Ribonukleinsäure) für den EPO-R nach und konnten diesen mit 0,5 und 20 IU/ml EPO im Western Blot stimulieren, was zeigt, dass auf den SH-SY5Y der EPO-R exprimiert wird [108]. In SH-SY5Y führte es zu einer geringen, nicht signifikanten Steigerung der Proliferation, jedoch zu signifikant erhöhter Motilität und Adhäsion [108]. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls keine signifikante Veränderung der Viabilität, und damit indirekt der Proliferation, gezeigt werden. Nach der Reoxygenierung zeigte sich in den SH-SY5Y unter EPO-Zugabe eine reduzierte Expression von Cytochrom C, was sich mit den gerade beschriebenen Ergebnissen deckt. Allerdings ist auch x-IAP reduziert, wohingegen smac/DIABLO hochreguliert wurde, was für eine verstärkte mitochondriale Schädigung spricht. Die Zugabe von EPO führte unter hypoxischen Bedingungen zu einer verminderten Expression von Bcl_{xL}, was ebenfalls ein Indikator für eine höhere Apoptosebereitschaft der Zellen ist. In Primärzellen wurde zuvor unter EPO-Einfluss eine erhöhte Bcl_{xL}-Expression bestimmt. Hierbei handelte es sich jedoch um eine chemisch induzierte Hypoxie durch die Zugabe von Hemmstoffen der mitochondrialen Atmungskette [109]. Möglicherweise kann EPO bei direkter mitochondrialer Schädigung einen stärkeren antiapoptotischen Einfluss nehmen als unter extrazellulär bedingtem Schaden.

cEPO-Fc scheint bei den SH-SY5Y wie bei den IMR-32 auf mehr Proteine und ihre Expression Einfluss zu nehmen: Unter hypoxischen Bedingungen wurden die proapoptotischen Proteine Bax und tendenziell Caspase 9 hochreguliert, während Cytochrom C wie bei EPO-Zugabe herunterreguliert wird. Dies ist ein Hinweis für eine erhöhte Apoptoserate der Zellen, die jedoch weniger mitochondrial vermittelt scheint. Von einer Zytoprotektion während der Hypoxie ist daher nicht zu sprechen. Bisher findet sich in der Literatur keine Arbeitsgruppe, die cEPO oder cEPO-Fc unter hypoxischen Bedingungen in SH-SY5Y untersucht hat. In Studien mit neuronalen Primärzellen wurde die Proteinexpression der hier untersuchten Proteine ebenfalls noch nicht analysiert.

Bekannt ist, dass die unter Hypoxie übliche Zellschwellung unter cEPO-Zugabe reduziert wird [110], ebenso, dass eine erhöhte Proliferation unter Zugabe von EPO und cEPO nach dreistündiger OGD zu verzeichnen war [108]. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit im MTT nicht reproduziert werden. Nach der Reoxygenierung zeigte sich bei cEPO-Fc-Zugabe eine erhöhte Expression von proapoptotischem Bax und smac/DIABLO, jedoch auch vom antiapoptotischem Bcl-2. Zudem war eine reduzierte Expression von *cleaved* Caspase 9 und Cytochrom C, messbar. Insgesamt zeigte sich ein gemischtes Bild der Proteinexpression, weshalb für die SH-SY5Y keine klare Aussage über Zytoprotektion nach der Reoxygenierung möglich war.

Betrachtet man die Ergebnisse einer Hypoxie-/Reoxygenierungssequenz unter Einfluss von EPO, so war bei den Neuro-2A während des MTT kein Unterschied zu beobachten. Im Hinblick auf cEPO-Fc war unter höherer Konzentration eine signifikant niedrigere Viabilität gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu beobachten. Wie bereits erwähnt, könnte es sich um den von Chamorro beobachteten Effekt der Verlangsamung des Zellzyklus handeln [107]. Es sollte bedacht werden, dass in der hier vorliegenden Arbeit humanes EPO verwendet wurde. Ebenso wurde cEPO-Fc aus humanem IgG1 und humanem EPO fusioniert, was zu einer gewissen Inkompatibilität oder sogar toxischem Einfluss der humanen, speziesfremden Zusätze in der murinen Zelllinie führen könnte. Die verminderte Viabilität unter höherer cEPO-Fc-Konzentration deckt sich mit dieser Annahme. In der Arbeit von Jäger war im Vergleich der humanen und porcinen Zelllinie dieser Effekt nicht ausgeprägt [42]. *In vivo* zeigte sich in Ratten und Kaninchen ein zytoprotektiver Effekt durch cEPO-Fc, sodass von keiner einflussnehmenden Immunreaktion gegen die speziesfremde Substanz ausgegangen werden kann [111, 112]. Zudem fehlen immunaktive Zellen in der neuronalen Zellkultur, die eine Unverträglichkeit vermitteln könnten.

Die genutzten Konzentrationen von EPO und cEPO-Fc wurden von der genannten Arbeit an humanen Nierenzellkulturen von Jäger übernommen [42]. Fraglich ist, ob diese Dosis passend war, um in den neuronalen Zellkulturen einen entsprechenden Effekt auszulösen. Die niedrigere Konzentration von EPO und cEPO-Fc (0,2 IU/ml bzw. 0,2 µg/ml) zeigte in der murinen Zelllinie im Western Blot keinen relevanten Effekt. Bei den höheren Konzentrationen (20 IU/ml bzw. 20 µg/ml) waren allerdings signifikante Unterschiede zu verzeichnen. Ding *et al.* erforschten den Zusatz von jeweils nur 5 ng/ml EPO bzw. cEPO in Neuro-2A unter normoxischen Bedingungen. Das entspricht bei cEPO-Fc einem Vierzigstel von der in dieser Arbeit genutzten Konzentration. Sie beobachteten eine erhöhte Viabilität in der EPO-Gruppe nach 24 h gegenüber der cEPO-Gruppe. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen cEPO-Zugabe und der Kontrolle [113]. Eine Erweiterung der Dosierungsreihe stellt sich somit als interessanter Aspekt für weitere Untersuchungsansätze dar.

Die höhere Konzentration von EPO (20 IU/ml) führte zu erhöhter Bcl_{xL}-Expression nach der Reoxygenierung, während es zu erniedrigter c-IAP-Expression während der Normoxie und zu x-IAP-Expression während Normoxie und Reoxygenierung kam. Dies ist ein Hinweis auf eine verminderte Abwehr der Zelle gegenüber apoptotischer Trigger, möglicherweise bedingt durch die relative Hyperoxie nach der Reoxygenierung und konsekutiver ROS-Bildung. Allerdings wurden die

proapoptotischen Proteine unverändert gegenüber der unbehandelten Kontrolle exprimiert. Dies spricht zwar für verminderte antiapoptotische Prozesse, jedoch keine erhöhte Apoptosebereitschaft der Zelle. Dies wird durch die signifikant gesteigerte Viabilität nach der Reoxygenierung gegenüber der Hypoxie gestützt. Unter EPO-Einfluss wurde smac/DIABLO als einziges proapoptotisches Protein nach der Hypoxie verstärkt gemessen, was auf eine mitochondriale Schädigung hinweist. In Primärzellen aus der Ratte wurde unter Hypoxie und gleichzeitiger Gabe von 40 IU/mI EPO eine verminderte Viabilität und erhöhte Apoptoserate beobachtet [114]. Die verminderte Viabilität unter EPO-Einfluss und gleichzeitiger Hypoxie war im Vergleich zur unbehandelten Hypoxie-Kontrolle in der vorliegenden Arbeit in den Neuro-2A nicht zu beobachten. Am ehesten war dies durch die verschiedenen EPO-Konzentrationen und die unterschiedliche Zellart bedingt.

Die Annahme, dass cEPO-Fc einen zytoprotektiven Effekt auf die Neuro-2A unter Hypoxie und Reoxygenierung hat, wird in der Proteinanalyse durch eine erhöhte c-IAP-Expression und eine abnehmende Cytochrom C-Expression im Vergleich zum normoxischen Äquivalent unterstützt. Dem steht allerdings die Beobachtung entgegen, dass Bax und Caspase 9 als proapoptotische Proteine gegenüber der gleichzeitigen Kontrolle signifikant erhöht exprimiert werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine verminderte mitochondriale Schädigung, jedoch für eine erhöhte Apoptosebereitschaft trotz cEPO-Fc unter Hypoxie. Bisher gibt es keine vergleichbare Studie mit Neuro-2A, bei der eine genauere Western Blot Analyse unter cEPO- oder cEPO-Fc-Einfluss durchgeführt wurde. In einer in vivo Studie von Diao wurde der Einfluss von cEPO mit Hinblick auf hypoxisch-ischämische Encephalopathie in einem Rattenmodell untersucht: Nach Behandlung mit cEPO zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression von *cleaved* Caspase 3 und Bax, sowie eine signifikant erhöhte Expression von Bcl-2 nach Ischämie und Reperfusion. Die Arbeitsgruppe konnte folglich den zytoprotektiven Einfluss von cEPO reproduzieren [115].

In der bereits erwähnten Untersuchung von Ding wurde gezeigt, dass cEPO die JAK-2 nicht aktiviert, während EPO an den JAK-2 gekoppelten EpoR-EpoR bindet und somit aktiviert [113]. Wie bereits bei den humanen Zelllinien besteht weiterer Spielraum zur Analyse des genauen EPO-R-Subtyps, der für die cEPO-vermittelten intrazellulären Prozesse verantwortlich ist. In einer darauf aufbauenden Studie zeigte die gleiche Arbeitsgruppe um Ding in einem Mausmodell, dass EPO zu einem erhöhten Wachstum eines injizierten Neuro-2A Tumors führte, cEPO wiederum

nicht [116], was möglicherweise mit dem o. g. Rezeptorstatus in Verbindung steht. In der hier vorliegenden Arbeit wurde zwar das gesteigerte Wachstum unter EPO nicht reproduziert, allerdings fand sich ebenfalls eine verminderte Viabilität unter cEPO-Fc wieder.

4.4 Schlussfolgerung

In dieser Dissertation war es möglich, ein zuverlässiges und leicht reproduzierbares Hypoxie-/Reoxygenierungsmodell in neuronalen Zelllinien zu etablieren. Für die genutzten Zelllinien IMR-32, SH-SY5Y und Neuro-2A gelang es eine suffiziente Hypoxie zu induzieren.

Unter Hypoxie und Reoxygenierung zeigte sich in den humanen Tumorzelllinien eine proliferative Tendenz, was sich jedoch den Beobachtungen im Viabilitätsassay widersprach. In der murinen Zelllinie war die Apoptoserate erhöht, jedoch mit verminderter mitochondrialer Beteiligung. Die Viabilität zeigte sich unter Hypoxie deutlich vermindert, erholte sich jedoch im Verlauf der Reoxygenierung vollständig. In den Folgeversuchen mit zwei unterschiedlichen EPO- und cEPO-Fc-Konzentrationen sollte der aufgrund mehrerer Voruntersuchungen postulierte zytoprotektive Effekt beider Substanzen unter Hypoxie und Reoxygenierung verifiziert werden. Dies gelang lediglich in den IMR-32 unter Einfluss von cEPO-Fc. In den SH-SY5Y konnte aufgrund divergierender Expression von pro- und antiapoptotischer Proteinen weder nach Hypoxie noch nach Reoxygenierung von einem zytoprotektiven, aber auch nicht von einem schädlichen Einfluss von EPO oder cEPO-Fc gesprochen werden. Die Viabilität zeigte sich auch in den Interventionsgruppen unverändert. Die Neuro-2A wiesen ein vergleichbar divergierendes Bild der Proteinexpression nach Hypoxie und Reoxygenierung unter EPO- und cEPO-Fc-Zugabe auf.

Der vorherig in *in vivo* Untersuchungen [66, 86] festgestellte zytoprotektive Effekt von EPO und cEPO-Fc konnte im vorliegenden Versuchsaufbau nur teilweise reproduziert werden.

4.5 Ausblick

Ein Faktor, der bei der weiteren Interpretation der Ergebnisse beachtet werden sollte, ist die Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose. Letztere ist als unkontrolliertes Zellsterben bekannt. Hierbei werden neben den lysosomalen auch zytosolische Proteasen wie Caspasen analog zur Apoptose, aktiviert, die zur Degradation der Zelle führen [44]. Durch eine sich an die bisher durchgeführten Untersuchungen anschließende FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie) wäre hier eine genauere Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose möglich. Hier bietet sich eine Doppelfärbung mit Annexin V-CF Blue und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) wie im Apoptosis Staining/Detection Kit der Firma abcam (ab214663) an. In der Durchflusszytometrie ist durch eine unterschiedlich fluoreszierende Zellfärbung eine Unterscheidung von intakten, früh apoptotischen und spät apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen möglich [117]. In Abhängigkeit der daraus resultierenden Ergebnisse müsste der Versuchsaufbau erneut überdacht und die Hypoxiebedingungen angepasst werden. Erst im Anschluss daran könnte der Einfluss eines zusätzlichen Glucosemangels untersucht werden. Um der klinischen Situation näher zu kommen und die dabei ablaufenden zellulären Prozesse zu verstehen, wäre dies jedoch ein notwendiger Schritt.

Bei zukünftigen Untersuchungen im Bereich der neuronalen Hypoxie und Reoxygenierung wären, um den Einfluss von tumorbedingten Veränderungen des Genoms als potenziellen Störfaktor auszuschließen, Primärzellen (bspw. Motoneurone) aus gesunden Tieren die ideale Lösung. Zwar handelt es sich hierbei um tierische Primärzellen, bei denen Rückschlüsse auf den Menschen nur eingeschränkt möglich sind, allerdings würden sie am ehesten Aufschluss über die zugrundeliegenden molekulargenetischen und therapeutisch relevanten Signalwege geben. Im Hinblick auf die Wahl der Zellen/Zelllinien sollte berücksichtigt werden, dass es sich bei den meisten Zelllinien um Tumorzellen mit verändertem Proliferationsvermögen handelt. EPO wird zur Therapie bei tumorbedingter Anämie restriktiv eingesetzt, da auch an Primärtumoren proliferative und sogar mortalitätssteigernde Wirkungen gezeigt wurden [62, 118]. Dadurch könnte es zu einem Bias kommen, der erst in vivo ausgeschlossen werden könnte, zuvor jedoch zur Verzerrung der Ergebnisse führen würde. Ein weiterer interessanter Aspekt, dem sich bereits mehrere Arbeitsgruppen angenommen

haben, ist die genauere Untersuchung des EPO-R der jeweiligen Zelllinien. Hierdurch könnte in Zukunft die intrazelluläre Signalkaskade weiter aufgeschlüsselt werden.

Mit Blick auf EPO und cEPO-Fc gibt es neben den klinischen Feldern der neuronalen Ischämie ebenso Ansätze für neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und Morbus Parkinson [58, 119, 120]. Um betroffenen Patienten eine verträgliche, nebenwirkungsarme Therapieoption anbieten zu können, sollten EPO und vor allem cEPO-Fc, als Substanz ohne hämatopoetischen Effekt, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* weiterverfolgt werden.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1. Steckmeier, B., *Epidemiologie der Aortenerkrankung: Aneurysma, Dissektion, Verschluss.* Der Radiologe, 2001. 41(8): p. 624-632.
- 2. Senser, E. M., Misra, S., and Henkin, S., *Thoracic Aortic Aneurysm: A Clinical Review.* Cardiology Clinics, 2021. 39(4): p. 505-515.
- 3. Akin, I., et al., *Endovascular repair of thoracic aortic aneurysm.* Archives of Medical Science : AMS, 2010. 6(5): p. 646-652.
- 4. Debus, E.S., et al. S3-Leitlinie zu Screening, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Bauchaortenaneurysmas. 2018. AWMF-Registernummer: 004-14.
- 5. Forsdahl, S. H.; Singh, K.; Solberg, S.; Jacobsen, B. K., *Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromso Study, 1994-2001.* Circulation, 2009. 119(16): p. 2202-2208.
- 6. Prisant, L. M.; Mondy, J. S., *Abdominal Aortic Aneurysm.* The Journal of Clinical Hypertension, 2004. 6(2): p. 85-89.
- 7. Medical, Advisory; Secretariat *Endovascular Repair of Descending Thoracic Aortic Aneurysm: An Evidence-Based Analysis*. Ontario Health Technology Assessment Series, 2005. 5.
- 8. Erbel, R.; Aboyans V, et al., 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases. European Heart Journal, 2014. 35: p. 2873-2926.
- 9. Torsello, G.; Grundmann, R., *S2k Leitlinie zu Typ B Aortendissektion.* 2018(AWMF-Registernummer: 004-034).
- 10. Antoniou, G. A., Antoniou, S. A., and Torella, F., *Editor's Choice Endovascular vs. Open Repair for Abdominal Aortic Aneurysm: Systematic Review and Meta- analysis of Updated Peri-operative and Long Term Data of Randomised Controlled Trials.* Eur J Vasc Endovasc Surg, 2020. 59(3): p. 385-397.
- 11. Lübke, T.; Brunkwall, J., *Aktualisierte Metaanalyse EVAR versus offene Operation zur elektiven Ausschaltung von infrarenalen Bauchaortenaneurysmen.* Zentralbl Chir, 2014(EFirst).
- 12. McCutcheon, B. A., et al., *The comparative effectiveness of surgeons over interventionalists in endovascular repairs of abdominal aortic aneurysm.* Ann Surg, 2013. 258(3): p. 476-482.
- 13. Di, X., et al., *Fenestrated Endovascular Repair for Pararenal Abdominal Aortic Aneurysms: A Systematic Review and Meta-Analysis.* Ann Vasc Surg, 2013.
- 14. Kotelis, D., et al., *Paraplegie nach endovaskulärer Therapie der thorakalen und thorakoabdominellen Aorta.* Zentralbl Chir, 2008. 133(04): p. 338-343.
- 15. Misfeld, M., et al., *Rate of Paraplegia and Mortality in Elective Descending and Thoracoabdominal Aortic Repair in the Modern Surgical Era.* Thorac cardiovasc Surg, 2008. 56(06): p. 342-347.

- 16. Scali, S. T., et al., *National incidence, mortality outcomes, and predictors of spinal cord ischemia after thoracic endovascular aortic repair.* Journal of Vascular Surgery, 2020. 72(1): p. 92-104.
- 17. Bozinovski, J.; Coselli, J. S., *Outcomes and Survival in Surgical Treatment of Descending Thoracic Aorta With Acute Dissection.* The Annals of Thoracic Surgery, 2008. 85(3): p. 965-971.
- 18. Jacobs, M. J., et al., *Surgical repair of thoracoabdominal aortic aneurysms.* J Cardiovasc Surg (Torino), 2007. 48(1): p. 49-58.
- 19. Cambria, R. P., et al., *Thoracoabdominal aneurysm repair: results with 337 operations performed over a 15-year interval.* Ann Surg, 2002. 236(4): p. 471-479; discussion 479.
- 20. Vuong, S. M., et al., *Vascular Diseases of the Spinal Cord: Infarction, Hemorrhage, and Venous Congestive Myelopathy.* Seminars in Ultrasound, CT and MRI, 2016. 37(5): p. 466-481.
- 21. Samandari, F.; Mai, J. K., *Curriculum Funktionelle Anatomie für Zahnmediziner: Allgemeine Anatomie, Skelettsystem, Kopf, Hals, Brust, Bauch, Becken, Aufbauprinzip der Extremitäten*. Vol. 2. 2008: Quintessenz Verlag. 642.
- 22. Gawenda, M., et al., *Das Dilemma der spinalen Ischämie: Interdisziplinäre Strategien zum Schutz vor spinaler Ischämie bei Aortenchirurgie.* Dtsch Arztebl International, 2005. 102(4): p. A-201.
- 23. Tanaka, H., et al., *The impact of preoperative identification of the Adamkiewicz artery on descending and thoracoabdominal aortic repair.* The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2016. 151(1): p. 122-128.
- 24. Takagi, H., et al., *Identifying the Adamkiewicz artery using 3-T time-resolved magnetic resonance angiography: its role in addition to multidetector computed tomography angiography.* Japanese Journal of Radiology, 2015. 33(12): p. 749-756.
- 25. Jellish, W. S., *Spinal Cord Protection During Thoracoabdominal Aortic Intervention: Now and in the Future–It's Not All About Hypothermia.* Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, 2016. 30(2): p. 275-279.
- 26. 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. 228-234.
- Cambria, R. P., et al., *Epidural cooling for spinal cord protection during thoracoabdominal aneurysm repair: A five-year experience.* J Vasc Surg, 2000. 31(6): p. 1093-1102.
- Shine, T. S. J., et al., Motor and Somatosensory Evoked PotentialsTheir Role in Predicting Spinal Cord Ischemia in Patients Undergoing Thoracoabdominal Aortic Aneurysm Repair with Regional Lumbar Epidural Cooling. Anesthesiology, 2008. 108(4): p. 580-587.
- 29. Kattail, D.; Furlan, J. C.; Fehlings, M. G., *Epidemiology and clinical outcomes of acute spine trauma and spinal cord injury: experience from a specialized spine*

trauma center in Canada in comparison with a large national registry. J Trauma, 2009. 67(5): p. 936-943.

- Donepudi, S.; Chavalitdhamrong, D.; Pu, L.; Draganov, P. V., Air embolism complicating gastrointestinal endoscopy: A systematic review. World J Gastrointest Endosc, 2013. 5(8): p. 359-365.
- 31. Acker, G.; Schneider, U. C.; Grozdanovic, Z.; Vajkoczy, P.; Woitzik, J., *Cervical disc herniation as a trigger for temporary cervical cord ischemia.* Journal of Spine Surgery, 2016. 2(2): p. 135-138.
- 32. Salvarani, C.; Brown, R. D., Jr.; Christianson, T.; Miller, D. V.; Giannini, C.; Huston, J., 3rd; Hunder, G. G., *An update of the Mayo Clinic cohort of patients with adult primary central nervous system vasculitis: description of 163 patients.* Medicine (Baltimore), 2015. 94(21): p. e738.
- 33. Love, S., *Oxidative Stress in Brain Ischemia.* Brain Pathology, 1999. 9(1): p. 119-131.
- 34. 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. 652-656.
- 35. Eldadah, B. A.; Faden, A. I., *Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury.* J Neurotrauma, 2000. 17(10): p. 811-829.
- 36. Silver, I. A.; Erecinska, M., *Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals.* J Neurosci, 1994. 14(8): p. 5068-5076.
- 37. Mobley I., Lloyd W.; Agrawal, S. K., *Role of calcineurin in calcium-mediated hypoxic injury to white matter.* The Spine Journal, 2003. 3(1): p. 11-18.
- 38. Hardie, D. G.; Carling, D., *The AMP-Activated Protein Kinase.* European Journal of Biochemistry, 1997. 246(2): p. 259-273.
- 39. J., Rassow, et al., *Duale Reihe Biochemie*. Thieme, 2008. 2: p. 90-93.
- 40. Schmidt R. F., Lang F., *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.* Springer, 2007. 30: p. 817-828.
- 41. Maiese, K.; Chong, Z. Z.; Hou, J.; Shang, Y. C., *Erythropoietin and oxidative stress.* Curr Neurovasc Res, 2008. 5(2): p. 125-142.
- 42. Jäger, E., Etablierung und Charakterisierung eines in vitro- Hypoxiemodells -Einfluss von Erythropoetin (EPO) und carbamyliertem EPO auf hypoxisch induzierte Schäden in renalen Zellkulturen, in Universitätsklinikum Ulm. 2011, Universität Ulm. p. 143.
- 43. Ashe, P. C.; Berry, M. D., *Apoptotic signaling cascades.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003. 27(2): p. 199-214.
- 44. Syntichaki, P.; Tavernarakis, N., *The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology?* Nat Rev Neurosci, 2003. 4(8): p. 672-684.

- 45. Elmore, S., *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.* Toxicologic Pathology, 2007. 35(4): p. 495-516.
- 46. Reed, J. C., *Mechanisms of apoptosis.* Am J Pathol, 2000. 157(5): p. 1415-1430.
- 47. Schultz, D. R.; Harrington, W. J., Jr., *Apoptosis: programmed cell death at a molecular level.* Semin Arthritis Rheum, 2003. 32(6): p. 345-369.
- 48. Kastan, M. B.; Kuerbitz, S. J., *Control of G1 arrest after DNA damage.* Environmental Health Perspectives, 1993. 101(Suppl 5): p. 55-58.
- 49. Silverthorn, C. F.; Alani, R. M., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* expression is altered by hypoxia in melanoma cells and primary human melanocytes. Melanoma Res, 2010. 20(1): p. 61-63.
- 50. Esteban, M. A.; Maxwell, P. H., *Manipulation of oxygen tensions for in vitro cell culture using a hypoxic workstation.* Expert Review of Proteomics, 2005. 2(3): p. 307-314.
- 51. Olechnowicz, S. W. Z., Fedele, A. O., and Peet, D. J., *Hypoxic Induction of the Regulator of G-Protein Signalling 4 Gene Is Mediated by the Hypoxia-Inducible Factor Pathway.* PLoS ONE, 2012. 7(9): p. e44564.
- 52. Baumann, R. P., et al., *Generation of Oxygen Deficiency in Cell Culture Using a Two-Enzyme System to Evaluate Agents Targeting Hypoxic Tumor Cells.* Radiation research, 2008. 170(5): p. 651-660.
- 53. Deschepper, M., et al., *Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia.* Journal of cellular and molecular medicine, 2011. 15(7): p. 1505-1514.
- 54. McKay, T. B., et al., *Acute hypoxia influences collagen and matrix metalloproteinase expression by human keratoconus cells in vitro.* PloS one, 2017. 12(4): p. e0176017-e0176017.
- 55. Chateauvieux, S., et al., *Erythropoietin, erythropoiesis and beyond.* Biochem Pharmacol, 2011. 82(10): p. 1291-1303.
- 56. Sanchis-Gomar, F., Perez-Quilis, C., and Lippi, G., *Erythropoietin receptor (EpoR)* agonism is used to treat a wide range of disease. Mol Med, 2013. 19: p. 62-64.
- 57. Millet, A., et al., *Erythropoietin and Its Derivates Modulate Mitochondrial Dysfunction after Diffuse Traumatic Brain Injury.* J Neurotrauma, 2016. 33(17): p. 1625-1633.
- 58. Thomas Tayra, J., et al., *The neuroprotective and neurorescue effects of carbamylated erythropoietin Fc fusion protein (CEPO-Fc) in a rat model of Parkinson's disease.* Brain Research, 2013. 1502: p. 55-70.
- 59. Begemann, M., et al., *Addressing the 'hypoxia paradox' in severe COVID-19: literature review and report of four cases treated with erythropoietin analogues.* Molecular medicine (Cambridge, Mass.), 2021. 27(1): p. 120-120.
- 60. Chong, Z. Z., Li, F., and Maiese, K., *Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity.* Curr Neurovasc Res, 2005. 2(5): p. 387-399.

- 61. Brines, M., et al., *Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(41): p. 14907-14912.
- 62. Arcasoy, M. O., *The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin.* Br J Haematol, 2008. 141(1): p. 14-31.
- 63. Phrommintikul, A., et al., *Mortality and target haemoglobin concentrations in anaemic patients with chronic kidney disease treated with erythropoietin: a meta-analysis.* The Lancet, 2007. 369(9559): p. 381-388.
- 64. Hwang, J., et al., *Pretreatment with erythropoietin attenuates the neurological injury after spinal cord ischemia.* Spinal Cord, 2012. 50(3): p. 208-212.
- 65. Simon, F., et al., *Erythropoietin during porcine aortic balloon occlusion-induced ischemia/reperfusion injury.* Crit Care Med, 2008. 36(7): p. 2143-2150.
- 66. Simon, F., et al., *Comparison of carbamylated erythropoietin-FC fusion protein and recombinant human erythropoietin during porcine aortic balloon occlusion-induced spinal cord ischemia/reperfusion injury.* Intensive Care Med, 2011. 37(9): p. 1525-1533.
- 67. Celik, M., et al., *Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(4): p. 2258-2263.
- 68. Jelkmann, W., *Molecular biology of erythropoietin.* Intern Med, 2004. 43(8): p. 649-659.
- 69. Brines, M. L., et al., *Erythropoietin crosses the blood–brain barrier to protect against experimental brain injury.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. 97(19): p. 10526-10531.
- 70. Kang, C. E., et al., *A new paradigm for local and sustained release of therapeutic molecules to the injured spinal cord for neuroprotection and tissue repair.* Tissue Eng Part A, 2009. 15(3): p. 595-604.
- 71. 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, 2015.
- 72. Shipley, M. M., Mangold, C. A., and Szpara, M. L., *Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line.* J Vis Exp, 2016(108): p. 53193.
- 73. Allen, C. B., Schneider, B. K., and White, C. W., *Limitations to oxygen diffusion and equilibration in in vitro cell exposure systems in hyperoxia and hypoxia.* American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, 2001. 281(4): p. L1021-L1027.
- 74. Chio, Ch.-Ch., et al., *MicroRNA-210 targets antiapoptotic Bcl-2 expression and mediates hypoxia-induced apoptosis of neuroblastoma cells.* Archives of Toxicology, 2013. 87(3): p. 459-468.
- 75. Jin, H., et al., *Role of the oxygen-dependent degradation domain in a hypoxiainducible gene expression system in vascular endothelial growth factor gene therapy.* Spine (Phila Pa 1976), 2009. 34(26): p. E952-958.

- 76. Chen, Y., et al., *Development of an ion-pair HPLC method for investigation of energy charge changes in cerebral ischemia of mice and hypoxia of Neuro-2a cell line.* Biomed Chromatogr, 2007. 21(6): p. 628-634.
- 77. Huang, Y., et al., *Effect of propofol on hypoxia re-oxygenation induced neuronal cell damage in vitro**. Anaesthesia, 2013. 68(1): p. 31-39.
- Zitta, K., et al., 2-Iminobiotin Superimposed on Hypothermia Protects Human Neuronal Cells from Hypoxia-Induced Cell Damage: An in Vitro Study. Front Pharmacol, 2017. 8: p. 971.
- 79. Aldinucci, C., et al., *The physiological behaviour of IMR-32 neuroblastoma cells is affected by a 12-h hypoxia/24-h reoxygenation period.* Neurochem Res, 2010. 35(11): p. 1691-1699.
- 80. Karlsson, J., et al., *Multidrug-resistant neuroblastoma cells are responsive to arsenic trioxide at both normoxia and hypoxia.* Mol Cancer Ther, 2005. 4(7): p. 1128-1135.
- 81. Karuppagounder, S. S., et al., *In vitro ischemia suppresses hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by inhibition of synthesis and not enhanced degradation.* J Neurosci Res, 2013. 91(8): p. 1066-1075.
- 82. Hau, S., et al., *Evidence for neuroprotective properties of human umbilical cord blood cells after neuronal hypoxia in vitro.* BMC Neurosci, 2008. 9: p. 30.
- 83. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.* Journal of Immunological Methods, 1983. 65(1): p. 55-63.
- 84. Bradford, M. M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-254.
- 85. Renart, J., Reiser, J., and Stark, G. R., *Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979. 76(7): p. 3116-3120.
- 86. Matejkova, S., et al., *Carbamylated erythropoietin-FC fusion protein and recombinant human erythropoietin during porcine kidney ischemia/reperfusion injury.* Intensive Care Med, 2013. 39(3): p. 497-510.
- 87. Wenger, R. H., et al., *Frequently asked questions in hypoxia research.* Hypoxia (Auckland, N.Z.), 2015. 3: p. 35-43.
- 88. Shi, R., et al., *Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia.* CNS Neurosci Ther, 2012. 18(3): p. 250-260.
- 89. Maxwell, P. H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxiainducible factors for oxygen-dependent proteolysis.* Nature, 1999. 399(6733): p. 271-275.
- 90. Cho, Y. D., et al., *The Effects of Oxygen and Treatments in Hypoxic Conditions in SH-SY5Y Cells.* Shock, 2018. 50(4): p. 449-454.

- 91. Currò, M., et al., *Hypoxia-Dependent Expression of TG2 Isoforms in Neuroblastoma Cells as Consequence of Different MYCN Amplification Status.* International journal of molecular sciences, 2020. 21(4): p. 1364.
- 92. Chen, S., et al., *HIF-1alpha contributes to proliferation and invasiveness of neuroblastoma cells via SHH signaling.* PLoS One, 2015. 10(3): p. e0121115.
- 93. Zhang, B., et al., *Upregulation of HIF-1alpha by hypoxia protect neuroblastoma cells from apoptosis by promoting survivin expression.* Asian Pac J Cancer Prev, 2014. 15(19): p. 8251-8257.
- 94. O'Connor, D. S., et al., *Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(24): p. 13103-13107.
- 95. Tarnawski, A. S.; Szabo, I., *Apoptosis-programmed cell death and its relevance to gastrointestinal epithelium: survival signal from the matrix.* Gastroenterology, 2001. 120(1): p. 294-299.
- 96. Xiao, B., et al., *Endothelial cell-derived exosomes protect SH-SY5Y nerve cells against ischemia/reperfusion injury.* International journal of molecular medicine, 2017. 40(4): p. 1201-1209.
- 97. Scholzen, T.; Gerdes, J., *The Ki-67 protein: from the known and the unknown.* J Cell Physiol, 2000. 182(3): p. 311-322.
- 98. Xing, J., et al., *Melatonin ameliorates endoplasmic reticulum stress in N2a neuroblastoma cell hypoxia-reoxygenation injury by activating the AMPK-Pak2 pathway.* Cell Stress Chaperones, 2019. 24(3): p. 621-633.
- 99. Gotoh, M., et al., *Protection of neuroblastoma Neuro2A cells from hypoxia-induced apoptosis by cyclic phosphatidic acid (cPA)*. PLoS One, 2012. 7(12): p. e51093.
- 100. Chang, Ch-Y., et al., *Roles of microRNA-1 in hypoxia-induced apoptotic insults to neuronal cells.* Archives of Toxicology, 2016. 90(1): p. 191-202.
- 101. Munoz-Sanchez, J.; Chanez-Cardenas, M. E., *The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model.* J Appl Toxicol, 2019. 39(4): p. 556-570.
- 102. Song, Y., et al., *Involvement of impaired autophagy and mitophagy in Neuro-2a cell damage under hypoxic and/or high-glucose conditions.* Scientific Reports, 2018. 8(1): p. 3301.
- 103. Geng, Ch., Wei, J., and Wu, Ch., Yap-Hippo pathway regulates cerebral hypoxiareoxygenation injury in neuroblastoma N2a cells via inhibiting ROCK1/Factin/mitochondrial fission pathways. Acta Neurologica Belgica, 2018.
- 104. Zhao, H., et al., *Sirt3 inhibits cerebral ischemia-reperfusion injury through normalizing Wnt/β-catenin pathway and blocking mitochondrial fission.* Cell Stress and Chaperones, 2018. 23(5): p. 1079-1092.
- 105. Sartelet, H., et al., *Expression of erythropoietin and its receptor in neuroblastomas.* Cancer, 2007. 110(5): p. 1096-1106.
- 106. Um, M., Gross, A. W., and Lodish, H. F., *A "classical" homodimeric erythropoietin* receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated

neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. Cellular Signalling, 2007. 19(3): p. 634-645.

- 107. Chamorro, M. E., et al., *Signaling pathways of cell proliferation are involved in the differential effect of erythropoietin and its carbamylated derivative.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research, 2013. 1833(8): p. 1960-1968.
- 108. Poniewierska-Baran, A., Rajewska-Majchrzak, J., and Ratajczak, M. Z., *Erythropoietin enhances migration of human neuroblastoma cells: in vitro studies and potential therapeutic implications.* J Cancer Stem Cell Res, 2017. 5.
- 109. Wen, T.-Ch., et al., *Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression.* Journal of Neuroscience Research, 2002. 67(6): p. 795-803.
- 110. Tang, Zh., et al., *Beneficial effects of carbamylated erythropoietin against oxygenglucose deprivation/reperfusion-induced astrocyte swelling: Proposed molecular mechanisms of action.* Neuroscience Letters, 2012. 530(1): p. 23-28.
- 111. Moosavi, M., et al., *Effect of carbamylated erythropoietin Fc fusion protein (CEPO-Fc) on learning and memory impairment and hippocampal apoptosis induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats.* Behavioural Brain Research, 2020. 384: p. 112554.
- 112. Lapchak, P. A., et al., *Therapeutic window for nonerythropoietic carbamylatederythropoietin to improve motor function following multiple infarct ischemic strokes in New Zealand white rabbits.* Brain Research, 2008. 1238: p. 208-214.
- 113. Ding, J., et al., *The lack of CD131 and the inhibition of Neuro-2a growth by carbamylated erythropoietin.* Cell Biol Toxicol, 2015. 31(1): p. 29-38.
- 114. Weber, A., et al., *Neuronal damage after moderate hypoxia and erythropoietin.* Neurobiology of Disease, 2005. 20(2): p. 594-600.
- 115. Diao, M., et al., *Effect of carbamylated erythropoietin on neuronal apoptosis in fetal rats during intrauterine hypoxic-ischemic encephalopathy.* Biol Res, 2019. 52(1): p. 28.
- 116. Ding, J., et al., *Neuroprotection and CD131/GDNF/AKT Pathway of Carbamylated Erythropoietin in Hypoxic Neurons*. Mol Neurobiol, 2017. 54(7): p. 5051-5060.
- 117. Abcam, Annexin V-CF Blue 7-AAD Apoptosis Staining / Detection Kit https://www.abcam.com/annexin-v-cf-blue-7-aad-apoptosis-staining--detection-kitab214663.html besucht am 27.06.2022, 2022.
- 118. Bohlius, J., et al., *Recombinant human erythropoiesis-stimulating agents and mortality in patients with cancer: a meta-analysis of randomised trials.* Lancet, 2009. 373(9674): p. 1532-1542.
- 119. Sun, J., et al., *The Promises and Challenges of Erythropoietin for Treatment of Alzheimer's Disease*. NeuroMolecular Medicine, 2019. 21(1): p. 12-24.
- 120. Mennini, T., et al., *Nonhematopoietic erythropoietin derivatives prevent motoneuron degeneration in vitro and in vivo.* Mol Med, 2006. 12(7-8): p. 153-160.

Zelllinie	u	Mean	SD				P-W	erte			
SH-SY5Y		(%)		2 h	12 h	18 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Normoxiezei	f										
2 h	12	0,0530	0,0444	ı	0,002	< 0,001	0,877	< 0,001	0,091	< 0,001	< 0,001
12 h	13	0,1171	0,0480	0,002	ı	0,417	0,002	< 0,001	0,266	< 0,001	< 0,001
18 h	20	0,1328	0,0567	< 0,001	0,417	I	< 0,001	< 0,001	0,060	< 0,001	< 0,001
24 h	14	0,0538	0,0479	0,877	0,002	< 0,001	I	< 0,001	0,087	< 0,001	< 0,001
48 h	28	0,2434	0,1070	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	ı	< 0,001	< 0,001	0,049
72 h	14	0,0920	0,0646	0,091	0,266	0,060	0,087	< 0,001	ı	< 0,001	< 0,001
96 h	28	0,5110	0,0841	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	< 0,001
120 h	28	0,3050	0,1208	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,049	< 0,001	< 0,001	ı
Hypoxiezeit											
2 h	6	0,1093	0,0566	I	0,179	0,470	0,434	0,069	0,082	0,05	0,003
12 h	6	0,0731	0,0528	0,179	ı	0,023	0,124	0,458	0,007	< 0,001	0,648
18 h	27	0,1106	0,0362	0,470	0,023	ı	0,130	0,003	0,016	0,002	< 0,001
24 h	28	0,0961	0,0391	0,434	0,124	0,16	ı	0,063	0,004	< 0,001	< 0,001
48 h	12	0,0711	0,0343	0,069	0,458	0,003	0,063	ı	0,003	< 0,001	0,059
72 h	21	0,1694	0,0922	0,082	0,007	0,016	0,004	0,003	ı	0,337	< 0,001
96 h	28	0,1511	0,0527	0,050	< 0,001	0,002	< 0,001	< 0,001	0,337	ı	< 0,001
120 h	22	0,0503	0,0267	0,003	0,648	< 0,001	< 0,001	0,059	< 0,001	< 0,001	

6. Anhang

Tabelle 13: Statistische Ergebnisse des MTT-Viabilitätsassays zur Findung der Hypoxiezeitfür SH-SY5Y. Getestet wurden alle Messzeitpunkte gegeneinander mittels t-Test beiNormalverteilung, sonst Mann-Whitney-U-Rank-Sum-Test, $p \le 0.05$ signifikant; Signifikanzen sindhervorgehoben; Abkürzungen: h = Stunde; n = Probenanzahl; SD = Standarddeviation / Standardabweichung

Zelllinie	u	Mean (%)	SD			P-Werte		
Neuro-2A				2 h	12 h	18 h	24 h	48 h
Normoxiezei	t.							
2 h	14	0,3576	0,1196	ı	0,018	0,002	< 0,001	< 0,001
12 h	14	0,4714	0,1180	0,018	I	0,031	< 0,001	< 0,001
18 h	20	0,7192	0,3500	0,002	0,031	ı	0,044	0,006
24 h	28	0,9870	0,4552	< 0,001	< 0,001	0,044	I	0,156
48 h	28	1,1443	0,5113	< 0,001	< 0,001	0,006	0,156	ı
Hypoxiezeit								
2 h	14	0,3802	0,1073	ı	0,250	< 0,001	< 0,001	< 0,001
12 h	14	0,3181	0,1659	0,250	I	< 0,001	< 0,001	< 0,001
18 h	28	0,6879	0,0762	< 0,001	< 0,001	I	0,111	0,550
24 h	28	0,7301	0,1150	< 0,001	< 0,001	0,111	I	0,476
48 h	28	0,6741	0,1611	< 0,001	< 0,001	0,550	0,476	I

Tabelle 14: Statistische Ergebnisse des MTT-Viabilitätsassays zur Findung der Hypoxiezeit für Neuro-2A. Getestet wurden alle Messzeitpunkte gegeneinander mittels t-Test bei Normalverteilung, sonst Mann-Whitney-U-Rank-Sum-Test, $p \le 0.05$ signifikant; Signifikanzen sind hervorgehoben; Abkürzungen: h = Stunde; n = Probenanzahl; SD = Standarddeviation / Standardabweichung

Danksagung

Herrn PD Dr. med. Florian Simon danke ich für die einmalige Zusammenarbeit, das Heranführen an wissenschaftliches Arbeiten, die zahlreichen Möglichkeiten, meine Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen vorstellen zu können und für sein hohes Maß an Unterstützung für den Promotionspreis der DGG, sowie für das Vertrauen, die unkomplizierte Kommunikation und für die Betreuung als mein Doktorvater.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig danke ich für die Gelegenheit, meine Doktorarbeit in seiner Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie durchführen und die Klinik auf Kongressen repräsentieren zu dürfen.

Besonders möchte ich Frau Dr. rer. nat. Wiebke Ibing für die engmaschige Betreuung im Labor bedanken. Mit ihrer freundlichen und aufrichtigen Art und ihrem breiten Wissen vermittelte sie mir die Grundlagen der Laborarbeit und half mir aus besonders stagnierenden Phasen heraus. Auch nach meiner aktiven Phase im Labor war sie für Rückfragen erreichbar. Dadurch hat sie an vielen Punkten zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Ich denke gern an die gemeinsame Zeit zurück.

Frau Astrid Hoffmann, der unerschütterlichen Seele des Labors, danke ich für die viele technische, zeitliche und moralische Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit. Durch ihre langjährige Erfahrung und ihren unermüdlichen Fleiß trug sie in wesentlichem Maße dazu bei, diese Arbeit abzuschließen.

Bei den anderen Doktoranden des gefäßchirurgischen Labors möchte ich mich ebenfalls bedanken. Sie haben für ein sehr angenehmes Arbeitsklima gesorgt.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. med. Anne Konstanze Charlotte Kuebart, Beraterin, Lektorin und stets loyale, mentale und moralische Stütze vom ersten Tag des Studiums an bis heute.

Ein großer Dank geht an meine Familie. Meinen Eltern Dr. Kusrin Timbul und Dr. Maria Gebben-Timbul und meinen Geschwistern Verena, Thomas und Sandra danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung und Motivation. Meinem Partner Jonas Sander danke ich für seine Geduld, seinen Pragmatismus, sein Vertrauen und seine Liebe.