

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

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

**Einfluss von rekombinantem, humanem Erythropoetin (rhEPO)
und carbamylisiertem Erythropoetin (cEPO-Fc) auf Hypoxie- und
Reoxygenierungsschäden unter Glukosemangel in neuronalen
Zelllinien**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Constanze Irene Molski

(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

Zweitgutachter: PD Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock

Dla Mamy

Kongressbeiträge zu der vorliegenden Dissertationsschrift:

- 10/2018 Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Gefäß- und Endovaskularchirurgie, Bonn
- „Einfluss von rekombinantem, humanem Erythropoetin (rhEPO) und carbamylisiertem Erythropoetin (cEPO-Fc) auf Hypoxie- und Reoxygenierungsschäden unter Glukosemangel in neuronalen Zelllinien“*
- Posterpräsentation durch Molski, C.
-
- 10/2018 Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Gefäß- und Endovaskularchirurgie, Bonn
- „Einfluss von rekombinantem, humanem Erythropoetin (rhEPO) und carbamylisiertem Erythropoetin (cEPO-Fc) auf Hypoxie- und Reoxygenierungsschäden unter Glukosemangel in neuronalen Zelllinien“*
- Vortrag im Rahmen der Sitzung des NGG (Netzwerk Gefäßchirurgischer Grundlagenforschung) durch Molski, C.

Zusammenfassung

Pathologien der thorakoabdominellen Aorta wie das Aortenaneurysma, welches mit einer Inzidenz von 5,9 pro 100.000 Personen und Jahr auftritt, gehen aufgrund der Rupturgefahr mit einer hohen Mortalität einher. Eine invasive Intervention in Form einer offen chirurgischen oder endovaskulären Versorgung ist häufig unabdingbar. Insbesondere langstreckige *Cross-Clampings* der Aorta bergen ein beträchtliches Risiko einer Paraparese oder Paraplegie aufgrund von Ischämie- und Reperfusionsschäden des Rückenmarks. Erythropoetin und dem Derivat cEPO-Fc konnten in tierexperimentellen und zellkulturellen Versuchen neuroprotektive Eigenschaften nachgewiesen werden, welche vorwiegend auf einer Apoptoseinhibition beruhen. Ziel der Arbeit war es, ein bestehendes Hypoxie- und Reoxygenierungsmodell neuronaler Zellen zu erweitern und die möglichen zytoprotektiven Eigenschaften der Erythropoetinderivate zu untersuchen. Für die Versuche wurden die Zelllinien Neuro-2A, SH-SY5Y und IMR-32 verwendet, welche einer Hypoxie- und einer Reoxygenierungsphase ausgesetzt wurden. Mithilfe von Viabilitätsassays (MTT- und WST-Assays) und Bestimmung von pro- und antiapoptotischen Proteinen via Westernblots wurden zunächst Auswirkungen unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen (0,5, 2 und 5 %) untersucht und eine Konzentration von 2 % für die Hypoxiephase der Folgeversuche festgelegt. Zusätzlich erfolgte die Inkubation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (*high*, *low* und *no glucose*), um den Substratmangel während einer Ischämie nachzustellen. Aufgrund fehlender Vorteile für das Modell kam es zum Ausschluss der Gruppe *no glucose*, ein eindeutiger Unterschied zwischen den Gruppen *high* und *low glucose* hinsichtlich des apoptotischen Geschehens konnte nicht detektiert werden. In einem zweiten Schritt wurde die Reoxygenierungsphase näher beleuchtet und eine Reoxygenierungszeit von 3 Stunden etabliert. Final erfolgten die Versuche unter Zusatz von rhEPO (20 und 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (20 und 0,2 µg/ml), um die Auswirkungen der Erythropoetinderivate auf die Zellviabilität und das apoptotische Geschehen nach Hypoxie und Reoxygenierung zu untersuchen. Für die Zelllinie Neuro-2A konnte eine erhöhte Viabilität nach Reoxygenierung unter Zusatz beider Erythropoetine nachgewiesen werden sowie eine verminderte Expression der *Cleaved Caspase 3* bei Einsatz von rhEPO und einer niedrigen cEPO-Fc-Konzentration nach Hypoxie (*high glucose*). Auch eine verminderte Smac/DIABLO-Expression nach Hypoxie unter Zusatz von rhEPO in IMR-32 (*low glucose*) spricht für die antiapoptotische Wirkung von Erythropoetin. Allerdings blieb in Zusammenschau aller Ergebnisse ein konstantes und einheitliches Bild hinsichtlich der Expression pro- und antiapoptotischer Proteine aus, weswegen eine definitive Aussage über die antiapoptotischen Eigenschaften von rhEPO und cEPO-Fc oder Wirkungsunterschiede zwischen den beiden Derivaten nicht eindeutig zu treffen ist. Weiterführende Versuche könnten das Modell um Methoden wie den Einsatz von Caspase 3/9-Aktivitätsassay-Kits oder der Messung von ROS ergänzen, um weitreichendere Informationen über die Wirkung der Erythropoetine zu erlangen.

Abstract

Pathologies of the thoracoabdominal aorta such as the aortic aneurysm, which has an incidence of 5.9 per 100,000 persons and year, are associated with high mortality due to the risk of rupture. Invasive intervention in the form of open surgery or endovascular treatment is often inevitable. In particular, long-segment aortic cross-clamping carries a considerable risk of paraparesis or paraplegia due to ischaemia and reperfusion damage to the spinal cord. In this context, erythropoietin and its derivative cEPO-Fc proved to have neuroprotective properties in animal and cell culture experiments, which are primarily based on the inhibition of apoptosis. The aim of this study was to extend an existing hypoxia and reoxygenation model of neuronal cell cultures and to investigate the possible cytoprotective properties of the erythropoietin derivatives. The cell lines Neuro-2A, SH-SY5Y and IMR-32 were used for the experiments, which were subjected to a hypoxia and a reoxygenation phase. Using viability assays (MTT and WST assays) and determination of pro- and anti-apoptotic proteins via Western blots, the effects of different oxygen concentrations (0.5, 2 and 5 %) were first investigated and a concentration of 2 % was set for the hypoxia phase of the subsequent experiments. In addition, incubation with different glucose concentrations during the hypoxia phase (high, low and no glucose) was performed to mimic the substrate deficiency during ischemia. As a result, the no glucose group was excluded due to a lack of advantages for the model; a clear difference between the high and low glucose groups with regard to apoptotic events could not be detected. In a second step, the reoxygenation phase was examined in more detail and a reoxygenation time of 3 hours was established. Final experiments were performed with the addition of rhEPO (20 and 0.2 IU/ml) and cEPO-Fc (20 and 0.2 µg/ml) to investigate the effects of the erythropoietin derivatives on cell viability and apoptotic events after hypoxia and reoxygenation. For the cell line Neuro-2A, an increased cell viability after reoxygenation was demonstrated with treatment of both derivatives as well as a reduced expression of the proapoptotic Cleaved Caspase 3 with the addition of rhEPO and a low cEPO-Fc concentration after hypoxia (high glucose). Furthermore, a reduced Smac/DIABLO expression after hypoxia with the addition of rhEPO in IMR-32 (low glucose) speaks for the anti-apoptotic effect of erythropoietin. However, in the synopsis of all results, a constant and uniform representation of the expression of pro- and anti-apoptotic proteins has not emerged, which is why a definitive statement regarding the anti-apoptotic properties of rhEPO and cEPO-Fc or differences in effect between the two derivatives cannot be made. Further experiments could complement the model with methods such as the use of Caspase 3/9 Activity Assay Kits or the measurement of ROS to obtain more extensive information about the effect of rhEPO and cEPO-Fc.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
100x	hundertfach
A	Ampere
A.	<i>Arteria</i>
A. dest.	<i>Aqua destillata</i>
Aa.	<i>Arteriae</i>
AAA	abdominelles Aortenaneurysma
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
Apaf 1	<i>apoptotic protease-activating factor-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cEPO-Fc	carbamyliertes Erythropoetin-Fc-Fusionsprotein
CFU-E	<i>colony forming unit-erythroid</i>
ciAP1/2	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2</i>
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
Cyt. C	Cytochrom c
D(+)-Glucose	rechtsdrehende Glucose
d. h.	das heißt
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
dl	Deziliter
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
EPO	Erythropoetin
EPO-R	Erythropoetin-Rezeptor
et al.	<i>et alii, et aliae</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
FBS	fetales Rinderserum

Fc	<i>fragment crystallisable</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H₂DCFH	2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor-1
HOO°	Hydroperoxyradikal
HRE	<i>hypoxia response element</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
i. R.	im Rahmen
i. S.	im Sinne
I/R	Ischämie/Reperfusion
IAP	<i>inhibitors of apoptosis proteins</i>
IgG1	Immunglobulin G1
IU	Internationale Einheit
Jak2	Januskinase 2
kDA	Kilodalton
l	Liter
L2	2. Lendenwirbel
M	Molar
MAD	mittlerer arterieller Druck
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Milimeter
mM	Milimolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Poren
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NAD⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEAA	nichtessenzielle Aminosäuren
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
no.	<i>number</i>
O₂	Sauerstoff
O₂⁻	Dioxid(1-)-Anion
ODDD	<i>oxygen-dependent degradation domain</i>
OGD	<i>oxygen and glucose deprivation</i>
ONOOH	Peroxynitrosäure

pH	lat.: <i>potentiia hydrogenii</i> ; Potential des Wasserstoffs
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
PTFE	Polytetrafluorethylen
rhEPO	rekombinantes, humanes Erythropoetin
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNOS	<i>reactive nitrogen oxide species</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s.	siehe
S.	Seite
s. u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Smac/DIABLO	<i>second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low isoelectric point</i>
STAT5	<i>signal transducer and activator of transcription 5</i>
TAA	thorakales Aortenaneurysma
TAAA	thorakoabdominelles Aortenaneurysma
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEVAR	<i>Thoracic Endovascular Aortic Repair</i>
Th9	9. Brustwirbel
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
TPR	<i>tissue-protective receptor</i>
u.	und
u. a.	unter anderem
UPR	<i>unfolded protein response</i>
USA	<i>United States of America</i>
V	Volt
v. a.	vor allem
VE-H₂O	vollentsalztes Wasser
WST	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
z. B.	zum Beispiel
α	alpha
β	beta
βCR	<i>β common receptor</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Rückenmarksischämie nach Eingriffen an der Aorta	1
1.2	Pathophysiologie von Ischämie und Reperfusion	5
1.3	Apoptose	8
1.4	EPO und cEPO-Fc	11
1.5	Hypoxie- und Reoxygenierungsmodelle	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Materialien	16
2.1.1	Zelllinien	16
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.4	Antikörper	20
2.1.5	Laborgeräte	21
2.1.6	Elektronische Datenverarbeitungsprogramme	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Zellkultur	24
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl	25
2.2.3	Einfrieren und Auftauen der Zelllinien	26
2.2.4	Erarbeitung des Hypoxie- und Reoxygenierungsmodells	26
2.2.5	Proteingenerierung und Westernblot	30
2.2.6	Zellviabilitätsassays	36
2.2.7	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Bestimmung der Sauerstoffkonzentration zur Hypoxieinduktion	39
3.1.1	Zellviabilitätsassays	40

3.1.2	Expression von HIF-1 α und Caspase 3	44
3.1.3	Expressionsprofile bei 2 % Sauerstoff	51
3.2	Glukosemangel unter normoxischen Bedingungen	55
3.3	Bestimmung der Reoxygenierungszeit.....	60
3.3.1	MTT-Assays.....	61
3.3.2	Westernblots.....	63
3.4	Einfluss von rhEPO und cEPO-FC.....	76
3.4.1	MTT-Assays.....	78
3.4.2	Westernblots der Zelllinie Neuro-2A	81
3.4.3	Westernblots der Zelllinie SH-SY5Y	86
3.4.4	Westernblots der Zelllinie IMR-32.....	92
4	Diskussion	97
4.1	Bestimmung der idealen Sauerstoffkonzentration	97
4.2	Auswirkungen der unterschiedlichen Glukosekonzentrationen	101
4.3	Bestimmung der Reoxygenierungszeit.....	104
4.4	Wirkung von rhEPO und cEPO-FC	107
4.5	Schlussfolgerung.....	114
4.6	Ausblick.....	114
5	Literaturverzeichnis.....	116
6	Danksagung.....	123

1 Einleitung

1.1 Rückenmarksischämie nach Eingriffen an der Aorta

Klinischer Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist der mögliche Einsatz von Erythropoetin als Therapeutikum gegen Rückenmarksschäden als Komplikation nach chirurgischen Eingriffen an der thorakoabdominellen Aorta.

Die häufigste Erkrankung der Hauptschlagader, abgesehen von Atherosklerose, stellt das Aortenaneurysma dar, eine umschriebene, pathologische Erweiterung der Aorta [1]. Je nach Lokalisation wird zwischen dem abdominellen Aortenaneurysma (AAA), dem thorakalen Aortenaneurysma (TAA) und dem thorakoabdominellen Aortenaneurysma (TAAA), welches sowohl Anteile der Bauchorta als auch der thorakal gelegenen Hauptschlagader einschließt, unterschieden. Definiert wird das TAAA als eine Durchmesserzunahme um das 1,5-Fache [2]. Die Klassifikation des TAAA erfolgt nach Crawford mit Modifikation nach Safi und richtet sich nach der anatomischen Ausdehnung [3]. Sie definiert fünf Typen, dabei hat ein TAAA des Typs II die größte Ausdehnung und reicht von der *A. subclavia sinistra* bis zur Bifurkation der Bauchorta [3].

Die Inzidenz des thorakoabdominellen Aortenaneurysmas beträgt 5,9 pro 100.000 Personen und Jahr [2]. Pathophysiologisch handelt es sich in den meisten Fällen um eine degenerativ-entzündliche Erkrankung der Aortenwand, deren Risikofaktoren ähnlich anderer kardiovaskulärer Erkrankungen u. a. Nikotinabusus, männliches Geschlecht, arterielle Hypertonie und positive Familienanamnese sind [3, 4]. Es betrifft vorwiegend ein betagtes, männliches und komorbides Patientenkollektiv [5]. Ferner können auch Bindegewebserkrankungen wie das Marfan-Syndrom, Entzündungen wie die Takayasu-Arteriitis, Infektionen wie die Lues oder Traumata verantwortlich sein [2].

Eine schwerwiegende Komplikation ist die Ruptur des Aneurysmas. So beträgt das Rupturrisiko eines Aneurysmas größer als 6 cm 31 % innerhalb von fünf Jahren, das Risiko in diesem Zeitraum zu versterben bis zu 80 % [2, 6]. Das Risiko einer Ruptur und die hohe Letalität machen die Notwendigkeit einer adäquaten Therapie des TAAA deutlich, die häufig eine invasive Behandlung unabdingbar macht. Weitere interventionsbedürftige Aortenpathologien sind die Aortendissektion, das intramurale Aortenhämatom und das penetrierende Aortenulkus, welche unter dem Begriff des akuten Aortensyndroms zusammengefasst werden [7]. Herauszustellen ist die Aortendissektion, bei der es

nach einem Riss der Intima zu einer Spaltbildung in der Aortenwand kommt, wodurch ein falsches Lumen entsteht [8]. Die akute Aortendissektion stellt häufig einen chirurgischen Notfall dar, da sie zu einer Aortenruptur, zu Herzversagen, zur Verlegung des echten Lumens und damit zur Endorganischämie führen kann [9]. Die Aortendissektion kann auf dem Boden eines Aortenaneurysmas entstehen, aber auch selbst nach chronischem Verlauf zu einem Aneurysma führen [9].

Als Behandlungsoptionen des TAAA und anderer Aortenpathologien stehen der operative Eingriff und die endovaskuläre Versorgung sowie Hybridverfahren zur Verfügung. Nach aktuellen Leitlinien ist die invasive Behandlung des thorakoabdominellen Aortenaneurysmas ab einem Durchmesser von 6 cm indiziert, wobei auch eine Durchmesserzunahme von mehr als 5 mm jährlich eine invasive Behandlung notwendig machen kann [10]. Bei symptomatischen Patienten und Patienten mit Bindegewebserkrankungen wie dem Marfan-Syndrom sollte die Indikation zur Intervention früher gestellt werden [10]. Das operative Verfahren beruht auf dem Ersatz des betroffenen Abschnitts der Aorta durch ein Kunststoffinterponat aus Dacron oder Polytetrafluorethylen (PTFE) [2]. Es handelt sich um einen Zweihöhleneingriff mit linksseitiger Thorako-Laparotomie, welche die Hauptschlagader im Situs in voller Länge zugänglich macht [1, 2]. Während der Operation ist die Unterbrechung des Blutflusses der Hauptschlagader mittels *Cross-Clamping* notwendig. Dabei wird die Aorta proximal und distal der zu versorgenden Läsion abgeklemmt [11]. Die Komplexität und Invasivität ist für einen häufig elektiven Eingriff beträchtlich, besonders vor dem Hintergrund, dass die Patienten in der Regel höheren Alters und komorbid sind. Die perioperative Mortalität liegt zwischen 7,5 und 8,4 % [12-15]. Dabei handelt es sich allerdings um Daten aus spezialisierten Zentren. Schließt man Versorgungseinrichtungen mit geringerem Patientenaufkommen ein, beträgt die postoperative Mortalität bis zu 22,3 % [16].

Als Alternative zum operativen Verfahren gewinnt die weniger invasive, endovaskuläre Behandlungsmethode TEVAR (*Thoracic Endovascular Aortic Repair*) immer mehr an Relevanz [17]. Dabei wird kathetergestützt eine Endoprothese meist über die *A. femoralis* retrograd zur Aorta geführt und über der zu versorgenden Läsion entfaltet, um diese auszuschalten [18]. Die verwendeten Stentgrafts werden stetig weiterentwickelt. So stehen mittlerweile fenestrierte und gebranchte Stentgrafts zu Verfügung, die einen Anschluss der von der Aorta abgehenden Arterien ermöglichen [2]. TEVAR ist somit deutlich weniger invasiv

als die offen chirurgische Behandlung. Die postinterventionelle Mortalität nach 30 Tagen liegt bei etwa 7,8 % [19]. Damit ist sie vergleichbar mit der Mortalität nach offen chirurgischen Eingriffen in spezialisierten Zentren, aber deutlich niedriger als im Querschnitt, insbesondere wenn man das hohe Risikoprofil des Patientenkollektivs betrachtet, das häufig eine offen chirurgische Behandlung kontraindiziert [19]. Jedoch hat die endovaskuläre Behandlungsmethode auch ihre Grenzen. So ist sie nicht bei Patienten mit Bindegewebserkrankungen vorgesehen [10]. Außerdem können anatomische Besonderheiten des Patienten oder des Aneurysmas eine endovaskuläre Versorgung technisch unmöglich machen [17]. Nur etwa 60 % der thorakoabdominellen Aneurysmen sind aus anatomischen Gegebenheiten für eine endovaskuläre Therapie zugänglich [20].

Neben der beachtlichen postoperativen Mortalität nach offen chirurgischen Eingriffen können weitere, schwerwiegende Komplikationen auftreten, allen voran die Rückenmarksischämie [11]. Sie kann zur Schädigung der spinalen Neurone und damit zu einer Querschnittssymptomatik führen, die sich in einer Paraparese, der inkompletten, oder einer Paraplegie, der kompletten Lähmung der unteren Extremitäten äußern kann [21]. Während des *Cross-Clampings* der thorakoabdominellen Aorta werden rückenmarksversorgenden Arterien von der Blutzirkulation ausgeschlossen. Dies betrifft im thorakalen Bereich die *Aa. intercostales posteriores* und im abdominellen Bereich die *Aa. lumbales*, welche als paare Segmentarterien die *A. spinales anterior* speisen und damit an der Versorgung des Rückenmarks beteiligt sind [11]. Die *A. radicularis magna*, auch als *Arteria Adamkiewicz* bezeichnet, ist eine unpaare kaliberstarke Segmentarterie mit variabler Ausprägung im thorakolumbalen Bereich, meist auf Höhe von Th9 bis L2, und kann ebenfalls vom *Clamping* betroffen sein [22]. Sie soll maßgeblich zur arteriellen Versorgung des Rückenmarks beitragen [11]. Auch distal des Clampingbereichs kommt es zu einer Blutflussunterbrechung der Aorta, falls keine Kreislaufersatztherapie i. S. einer Herz-Lungen-Maschine oder eines Links-Herz-Bypasses zum Einsatz kommt [11]. Da die kaudale arterielle Versorgung des Rückenmarks mitunter über Äste der *Aa. iliacaе internaе*, der *A. sacralis mediana* und der *A. mesenterica inferior* gewährleistet wird, ist auch diese vom *Cross-Clamping* betroffen [11]. Ein weiterer, die spinale Ischämie begünstigender Pathomechanismus geht auf den Anstieg des arteriellen Blutdrucks proximal des Clampingbereichs zurück. Die Zunahme der Hirndurchblutung hat eine Steigerung der Liquorproduktion zur Folge, was zu erhöhtem cerebralen und intraspinalen

Druck führt. Die das Rückenmark mit Blut versorgenden Arterien müssen diesen erhöhten Druckgradienten überwinden, was zu einer schlechteren Versorgung des Rückenmarks beiträgt [11]. Auch ein reaktiv entstandenes Rückenmarksödem verschlechtert die arterielle Versorgung zusätzlich [11]. Das Risiko einer permanenten Rückenmarksschädigung liegt in spezialisierten Zentren und nach Einführung präventiver Maßnahmen zwischen 5,1 und 7,5 % [13, 15, 23]. Dieses hängt u. a. von der Clampingzeit sowie von dem Ausmaß und der Lokalisation des Aneurysmas i. S. der Crawford-Klassifikation ab, wobei Aneurysmen des Typs II das höchste Risiko einer Rückenmarksschädigung bis zu 22 % haben [11, 15].

Trotz der geringeren Invasivität und Kreislaufbelastung ist die Rückenmarksischämie auch bei der endovaskulären Versorgung eine relevante Komplikation. Während bei der offen chirurgischen Methode kaliberstärkere Segmentarterien wieder an den Kreislauf angeschlossen werden können, werden deren Abgänge von der Aorta bei der TEVAR durch die Entfaltung des Stentgrafts verlegt [11]. Nach endovaskulärer Versorgung liegt das Risiko einer Rückenmarksschädigung im Schnitt zwischen 2 und 10 % [24]. Es werden aber auch höhere Zahlen bis zu 28 % postuliert [6]. Das Risiko hängt dabei ebenfalls vom Ausmaß des Aneurysmas ab und ist bei Typ II Aneurysmen am höchsten [6, 25]. Trotz der Hoffnung ist das Risiko einer Rückenmarksschädigung derzeit nach endovaskulärer Versorgung nicht signifikant geringer als beim operativen Verfahren [15, 24, 26].

Mittlerweile haben sich einige präventive Strategien etabliert, die das Risiko einer Rückenmarksschädigung reduzieren sollen. Dazu gehören die Aufrechterhaltung der Blutversorgung distal des Clampingbereichs, z. B. durch einen Linksherzbypass, Reimplantation von Segmentarterien, die perioperative Hypothermiebehandlung, Liquordrainage und Aufrechterhaltung eines adäquaten arteriellen Mitteldrucks (MAD) von mindestens 80 mmHg zur Verbesserung der Rückenmarkspfusion sowie das Monitoring von motorisch- oder somatosensorisch evozierten Potentialen, um eine Rückenmarksischämie frühzeitig zu detektieren [11, 25]. Eine pharmakologische Behandlungsmöglichkeit zur Prävention der Rückenmarksschädigung ist bisher nicht etabliert [25, 27].

Während ein Teil der Patienten unmittelbar postoperativ neurologische Defizite aufweist, kommt es bei einigen Patienten erst Stunden bis Wochen nach dem Eingriff zu Paraparese oder Paraplegie, bei initial intakter Motorik der unteren Extremitäten [28]. Diese verspätete Querschnittssymptomatik macht mehr als

50 % der Rückenmarksschädigungen aus [13, 29]. Der dafür ursächliche Mechanismus ist bis heute nicht ausreichend verstanden. Einen Erklärungsansatz bietet ein möglicher Reperfusionsschaden, ähnlich wie in anderen Organsystemen, die eine Ischämie erleiden [29].

1.2 Pathophysiologie von Ischämie und Reperfusion

Kommt es zu einer transienten Unterbrechung des Blutzufusses (Ischämie) und im Anschluss zu einer Rückkehr der lokalen Blutzirkulation (Reperfusion), führt dies im betroffenen Gewebe oder Organ über eine Kaskade von Mechanismen, welche in Abbildung 1 dargestellt sind, zu Zellschädigungen und Zelltod [30, 31]. Es handelt sich um einen zweizeitigen Vorgang, der auch als I/R-Sequenz zusammengefasst und als Grundlage der voran beschriebenen Rückenmarksschädigung während eines operativen Eingriffs an der thorakoabdominellen Aorta verstanden wird [32, 33]. Die I/R-Sequenz ist aber auch ursächlich für viele weitere Erkrankungen wie beispielsweise den Herzinfarkt [32]. Störungen des Energiehaushalts, Übersäuerung der Zellen, Elektrolytverschiebungen sowie Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und Entzündungsreaktionen führen über Nekrose und Apoptose zum Zelltod und somit zur Organdysfunktion [34].

Wird die Blutzufuhr unterbrochen, wie es beim *Cross-Clamping* der Aorta der Fall ist, entsteht ein Minderangebot an Sauerstoff, aber auch anderer Substrate allen voran Glukose. Die lokale Hypoxie induziert den anaeroben Stoffwechsel, um weiterhin Energie generieren zu können, was zur Anhäufung von Laktat führt (s. Abb. 1) [34]. Es folgt die Dysfunktion der Atmungskette in den Mitochondrien [34]. Dadurch verringert sich die Bildung von ATP, was eine Störung der ATP-abhängigen Natrium-Kalium-Pumpe verursacht [32, 34]. Das Ruhemembranpotential kann nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt über spannungsabhängige Ionenkanäle zum Einstrom von Natrium, Calcium und Chlorid in die Zelle sowie zum Ausstrom von Kalium [34, 35]. Intrazellulär resultiert die Anhäufung von Laktat in Azidose und die erhöhte intrazelluläre Osmolarität in einem Zellödem [34]. Der Calcium-*Influx* hat eine Schädigung der Mitochondrien zur Folge, welche zum einen kein weiteres ATP produzieren können und zum anderen Cytochrom c in die Zelle freisetzen und so zur Aktivierung der Apoptose

beitragen [30]. Außerdem beeinträchtigt die Azidose Enzymfunktionen und die Proteinbiosynthese [34].

Das Wiederherstellen der Blutversorgung, die Reperfusion, ist für die Zellen einerseits überlebensnotwendig, da erneut Sauerstoff und Energielieferanten an sie herangetragen und Abfallprodukte wie Laktat entfernt werden, was zu einem pH-Anstieg führt [31]. Andererseits entstehen freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies, welche die Zellen zusätzlich schädigen [34]. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Xanthindehydrogenase, ein Enzym des Purinstoffwechsels, die im ischämischen Zustand zur Xanthinoxidase konvertiert wird [35]. Innerhalb normoxischer Konditionen setzt die Xanthindehydrogenase Hypoxanthin zu Xanthin, unter der Zuhilfenahme von NAD^+ als Elektronenakzeptor, um. [35]. Die Xanthinoxidase jedoch verwendet bei der Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin Sauerstoff als Elektronenakzeptor [35]. Während der Ischämie fällt vermehrt Hypoxanthin an, welches bei erneutem Sauerstoffangebot in der Phase der Reperfusion unter Bildung von Superoxidanionen (O_2^-) zu Xanthin verstoffwechselt wird (s. Abb. 1) [35]. Superoxidanionen sind instabil und reagieren zu weiteren reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) wie Hydroperoxyradikalen (HOO°), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder, in Anwesenheit von Stickstoffmonoxid (NO), zu reaktiven Stickstoffverbindungen (*reactive nitrogen oxide species*, RNOS) wie der stark zytotoxischen Peroxynitrosäure (ONOOH) [31]. Herrscht ein Ungleichgewicht zwischen ROS und Radikalfängern zugunsten von ROS, schädigen sie Makromoleküle wie DNA, Proteine, Lipidmembranen und andere Zellstrukturen, was als oxidativer Stress bezeichnet wird [36].

Des Weiteren führen ROS zu Leukozytenaktivierung, Chemotaxis und Transmigration von Immunzellen ins Gewebe sowie zur Zytokinbildung [32]. Letztlich resultiert das in einer sterilen Inflammation, welche zusätzlich durch Aktivierung des Komplementsystems und Transkriptionsfaktoren sowie der Beteiligung des angeborenen und erworbenen Immunsystems gekennzeichnet ist [30]. Neben der Xanthinoxidase sind aber noch weitere Enzyme an der Bildung von Superoxiden während der Reperfusion beteiligt, z. B. die Elektronentransportkette der Mitochondrien oder die NADPH-Oxidase [31]. Folglich ist die Phase der Reperfusion nicht als Reversion der Ischämie zu verstehen, sondern als sogenannter *Second Hit*.

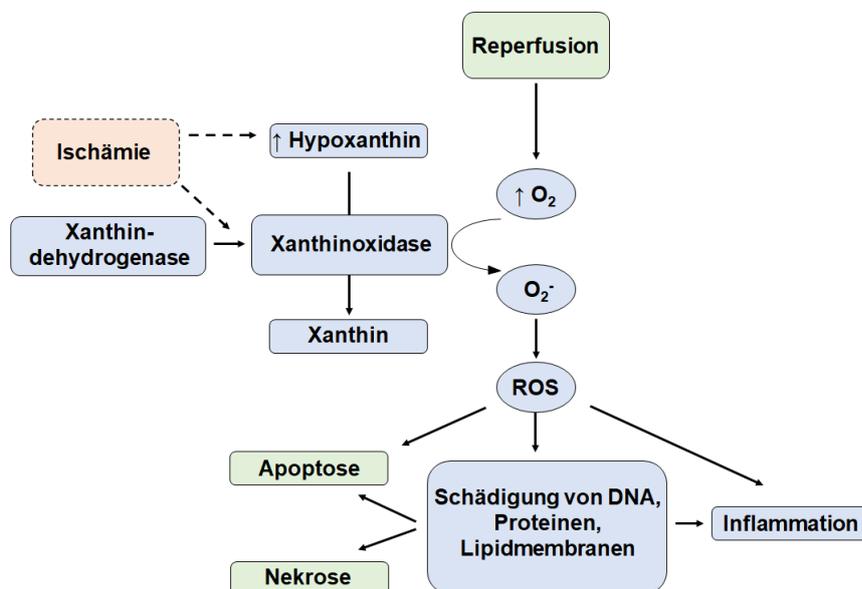
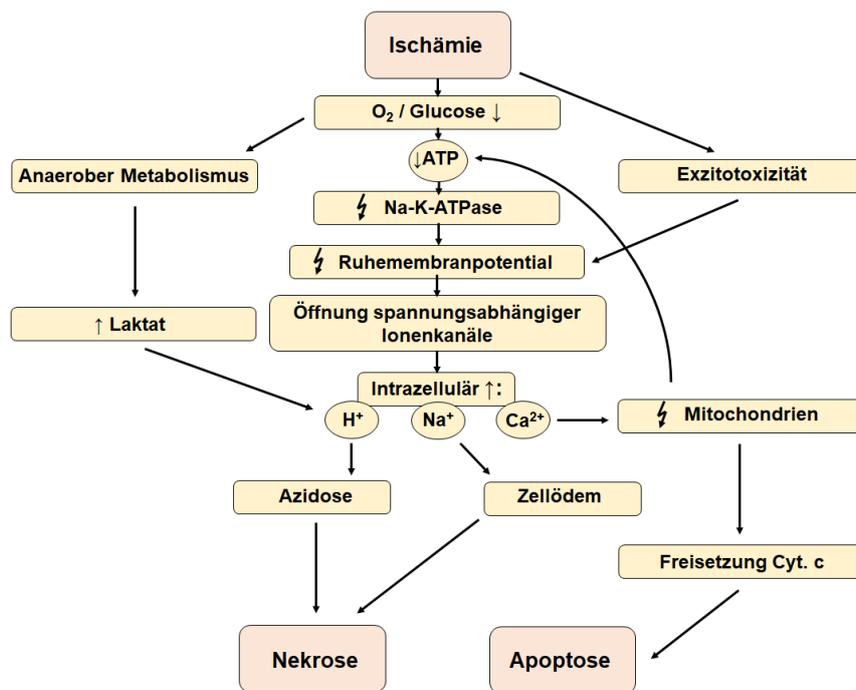


Abb. 1: Zusammenfassung der Pathomechanismen während Ischämie und Reperfusion in neuronalen Zellen

Oben: Der Einbruch der ATP-Produktion während der Ischämie führt zu Depolarisation der Zellmembran und Einstrom von Na⁺, Ca²⁺ und Wasser. Die hohe Ca²⁺-Konzentration schädigt die Mitochondrien, die Cytochrom c freisetzen und die Apoptose einleiten. Die Laktatakkumulation durch den anaeroben Metabolismus führt zu Azidose. Die vermehrte Aktivierung von Glutamaterezeptoren i. R. der Exzitotoxizität verstärkt den Einstrom von Na⁺ und Ca²⁺. Schließlich folgt der Zelltod im Zuge von Apoptose und Nekrose.

Unten: Das während der Ischämie akkumulierte Hypoxanthin wird unter Bildung von Superoxidanionen in der Reperusionsphase durch die Xanthinoxidase zu Xanthin umgesetzt. Aus den Superoxidanionen entstehen weitere ROS, die Makromoleküle schädigen und zu Apoptose, Nekrose und Inflammation führen.

Symbole: ↑ = Erhöhung, ↓ = Erniedrigung, Blitz-Symbol = Schädigung oder Beeinträchtigung

Abkürzungen: ATP = Adenosintriphosphat, Ca²⁺ = Calciumionen, Cyt. c = Cytochrom c, DNA = *deoxyribonucleic acid*, H⁺ = Protonen, Na⁺ = Natriumionen, Na-K-ATPase = Natrium-Kalium-ATPase, O₂ = Sauerstoff, O₂⁻ = Superoxidanionen, ROS = *reactive oxygen species*

Quelle: Eigene Darstellung basierend auf Dumont, 2001, p. 256-257 [36]; Eltzschig, 2004, p. 76-77 [35]; Kalogeris, 2012, p. 231-234, 246-254, 263, 271-272 [31]

Ein weiterer zu Schäden führender Mechanismus, die Exzitotoxizität, fasst die aus exzessiver Aktivierung von Glutamatrezeptoren hervorgehenden Zellschäden zusammen [36]. Die Ischämie des Rückenmarks führt zu einer stark erhöhten Aktivität der Synapsen, wodurch es zu einer drastischen Ausschüttung von Glutamat und zu einer vermehrten Aktivierung von Glutamatrezeptoren z. B. der NMDA-Rezeptoren kommt [37, 38]. Dies führt ebenfalls zu Natrium- und Calciumeinstrom nach intrazellulär sowie zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies mit den bereits erläuterten Konsequenzen [36].

Neben den zellschädigenden Pathomechanismen werden auch Gegenmaßnahmen induziert. So können Hypoxie und Glukosemangel über ein Missverhältnis zwischen AMP und ATP zugunsten von AMP die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase aktivieren (AMPK), welche ihrerseits katabole Stoffwechselvorgänge und die Bereitstellung an Energielieferanten anregt [39].

Letztendlich führen die aufgeführten Mechanismen je nach Ausmaß und Länge der I/R-Sequenz zu Zellschäden oder gar zum Zelltod [31].

1.3 Apoptose

Vereinfacht dargestellt werden zwei Formen des Zelltods unterschieden: Nekrose und Apoptose [40]. Die Nekrose ist ein ungerichteter Prozess als Reaktion auf einen starken, exogenen Reiz z. B. physikalischer oder chemischer Natur und endet in Autolyse und Entzündungsreaktion [34, 40]. Sie ist durch das Anschwellen der Organellen, dem frühen Verlust der Membranintegrität und dem Funktionsverlust der Mitochondrien gekennzeichnet [34]. Im Kontrast dazu wird die Apoptose auch als programmierter Zelltod bezeichnet und ist ein energieverbrauchender Vorgang [41]. Erreicht ein bestimmter Stimulus die Zelle, wird eine Kaskade von Proteasen aktiviert, die am Ende zur Aufteilung der Zelle und der Zellorganellen in sogenannte Apoptosekörperchen, die u. a. von Makrophagen phagozytiert werden, führt [41]. Es kommt zu einem strukturierten Abbau der Zelle, ohne eine Entzündungsreaktion hervorzurufen, um das umliegende Gewebe möglichst wenig zu schädigen [40, 41]. Morphologisch zeichnet sich eine apoptotische Zelle durch Schrumpfung, eine Verdichtung des Zytoplasmas und Pyknose, der Kondensation des im Zellkern befindlichen Chromatins, aus [41].

Im Wesentlichen wird bei der Apoptose zwischen einem extrinsischen und einem intrinsischen Signalweg unterschieden, welche in Abbildung 2 illustriert sind [42]. Wichtigster Bestandteil beider Wege sind die Caspasen (*cysteine-dependent aspartate-directed protease*) [43]. Dabei handelt es sich um Proteasen, die als inaktive Pro-Caspasen vorliegen und über eine Spaltung in ihre aktive Form überführt werden [41]. Dabei lassen sich Initiator-Caspasen (z. B. Caspase 2, -8, -9, -10) von Effektor-Caspasen (z. B. Caspase 3, -6, -7) unterscheiden [42, 44]. Beim extrinsischen Weg findet die Signalübertragung über transmembranöse Rezeptoren, die Todesrezeptoren, statt. Beispiele für Todesrezeptoren sind Fas und TNFR1 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1), der TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) bindet [42, 43]. Fas gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren und bindet den dazugehörigen Fas-Liganden [45]. Anschließend binden intrazellulär Adapterproteine, FADD (*Fas-associated protein with death domain*) genannt, an welche sich wiederum Pro-Caspase 8 heftet (s. Abb. 2) [46]. Der Komplex aus Rezeptor, Adapterproteinen und Pro-Caspase 8 wird als DISC (*death-inducing signaling complex*) bezeichnet und führt zur Aktivierung der Pro-Caspase 8, wodurch die weiteren Schritte der Apoptose initiiert werden (Abb. 2) [42, 46].

Im Gegensatz dazu wird der intrinsische Signalweg nicht durch Rezeptoren eingeleitet, sondern durch intrazelluläre Stimuli wie Hypoxie, freie Radikale, Toxine oder DNA-Schädigungen und spielt sich an den Mitochondrien ab [41, 46, 47]. Über Änderungen an der inneren Mitochondrienmembran entstehen Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Poren (MPTP) [41]. Über diese Poren gelangen u. a. Cytochrom c und SMAC/Diablo (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low isoelectric point*) ins Zytosol [46]. Cytochrom c bindet Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) und es folgt eine ATP-abhängige Konformationsänderung [46]. Unter Bildung des Apoptosoms bindet Pro-Caspase 9, welche aktiviert wird und wiederum Effektor-Caspasen wie Caspase 3 spalten kann (Abb. 2) [42].

SMAC/Diablo wirkt hingegen proapoptotisch, indem es Inhibitoren der Apoptose, sogenannte IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*), hemmt [46]. Zu dieser Gruppe gehören u. a. XIAP, cIAP1 und cIAP2, welche selektiv Caspasen des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs hemmen können [46]. Weitere wichtige Proteine mit regulatorischer Funktion sind die Proteine der Bcl-2-Familie (*B-cell lymphoma 2*), wobei sich proapoptotische wie Bax von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2

oder Bcl-xL unterscheiden lassen [41, 43]. Sie üben Einfluss auf die Permeabilität der Mitochondrienmembran aus und damit auf die Freisetzung von Cytochrom c [41, 48].

Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Signalweg führen zu einer Aktivierung der Effektor-Caspasen, allen voran Caspase 3 [43]. Diese aktivieren ihrerseits Endonukleasen und Proteasen, die DNA bzw. Proteine spalten [41]. Dabei beteiligen sich die Caspasen auch direkt an dem Abbau des Zytoskeletts [41]. Schließlich werden die Zellstrukturen in Apoptosekörperchen aufgeteilt, die u. a. von Makrophagen phagozytiert werden [41]. Die zu phagozytierenden Zellen werden durch die Verlagerung von Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Plasmamembran erkannt [40, 41]. Dabei bleibt die Zellmembran bis zuletzt intakt, es wird keine Entzündungsreaktion hervorgerufen [41].

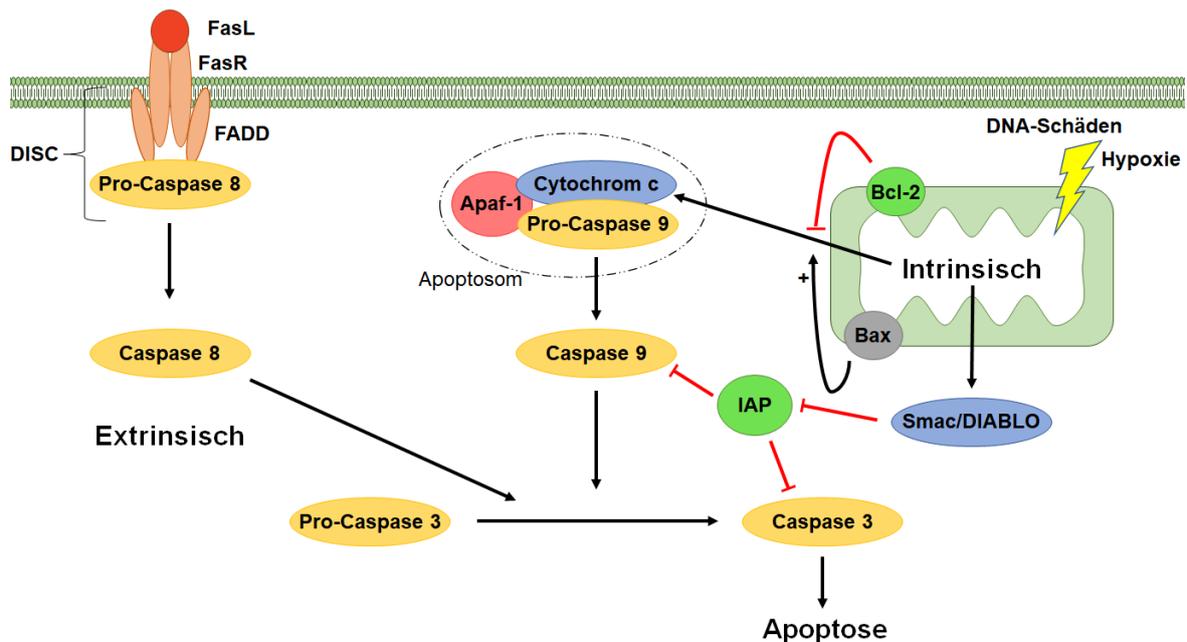


Abb. 2: Schematische Darstellung der apoptotischen Signalwege

Induktion der extrinsischen Signalkaskade durch Aktivierung des Todesrezeptors am Beispiel des FasR, unter Bindung von Adaptarproteinen (hier FADD) und Bildung von DISC Aktivierung der Caspase 8. Durch interne Stimuli Initiierung des intrinsischen Signalwegs und mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c und Smac/DIABLO. Zusammenschluss von Cytochrom c, Apaf-1 und Pro-Caspase 9 unter Bildung des Apoptosoms. Extrinsische und intrinsische Aktivierung der Caspase 3 stellvertretend für Effektor-Caspasen. Regulatorische Funktion von Bcl-2 und Bax auf die Freisetzung von Cytochrom c sowie von IAP auf Caspasen. Aktivierung dargestellt durch schwarze Pfeile, Inhibition durch rote Pfeile.

Abkürzungen: Apaf-1 = *Apoptotic protease-activating factor-1*, Bax = *Bcl-2-associated X protein*, Bcl-2 = *B-cell lymphoma 2*, DISC = *Death-inducing signaling complex*, DNA = *deoxyribonucleic acid*, FADD = *Fas-associated protein with death domain*, FasL = *Fas-Ligand*, FasR = *Fas-Rezeptor*, IAP = *Inhibitors of apoptosis proteins*, Smac/DIABLO = *Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low isoelectric point*

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Delhalle, 2003, p. 3 [46]; Elmore, 2007, p. 501-505 [41]

Während ein großer Teil der Zellen nach Einwirken von Ischämie und Reperfusion durch Nekrose sterben, geht ein Teil in Apoptose [34]. Ferner sind noch weitere Mechanismen wie die Nekroptose und Autophagie beteiligt [34]. Ob eine Zelle nekrotisch oder apoptotisch wird, ist u. a. abhängig vom Ausmaß der Hypoxie [41]. Dabei werden sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Signalweg besprochen [34]. So aktivieren reaktive Sauerstoffspezies proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie. Außerdem lösen sie gemeinsam mit einer erhöhten Calciumkonzentration das Öffnen der MPTP aus, was über die Freisetzung von Cytochrom c mit der Aktivierung des intrinsischen Signalwegs einhergeht [31, 34]. Im Rahmen der Inflammation nach Ischämie und Reperfusion wird vermehrt TNF- α gebildet, welches durch Bindung an einen Todesrezeptor den extrinsischen Signalweg einleiten kann [34]. Ein weiterer Pathomechanismus ist die „ungefaltete Protein-Antwort“ (*unfolded protein response, UPR*). Dabei handelt es sich um eine Stressreaktion des Endoplasmatischen Retikulums, die im Zuge der Reperfusion auftreten und ebenfalls die Apoptose aktivieren kann [31]. Außerdem führt die I/R-Sequenz zu einer vermehrten Expression von regulatorischen Genen, die sowohl anti- als auch proapoptotische Signalwege in Gang setzen [40]. So kann Glutamat im Rahmen der Exzitotoxizität zu einer Expressionssteigerung des p53-Proteins, einem Tumorsuppressor, beitragen, welches eine erhöhte Aktivität von Bax verursachen kann [40].

Die Hemmung der Apoptose könnte ein pharmakologischer Ansatz sein, um neuronale Schäden nach Eingriffen an der thorakoabdominellen Aorta und die sich daraus ergebende Querschnittssymptomatik zu reduzieren oder gar zu verhindern. Ein vielversprechendes Pharmakon ist Erythropoetin.

1.4 EPO und cEPO-Fc

Erythropoetin, kurz EPO, ist ein 34 kDa großes Glykoprotein, welches hauptsächlich in der Niere produziert wird [49-52]. Als Hormon stimuliert es die Erythropoese, die physiologische Bildung der roten Blutzellen im Knochenmark [51].

Bei einer erniedrigten Hämoglobinkonzentration oder einem pO₂-Abfall im Blut werden über eine gesteigerte Erythropoetinproduktion vermehrt Erythrozyten produziert, welche die Sauerstoffversorgung des Organismus gewährleisten sollen [51, 53]. EPO wird bei Erwachsenen vorwiegend in peritubulären Fibroblasten der

Niere gebildet [53]. Im Knochenmark wirkt es über die Hemmung der Apoptose von Erythrozytenvorläufern, v. a. der Gruppe der CFU-E (*colony forming unit-erythroid*) [51]. Bei einer physiologischen EPO-Konzentration gehen die meisten dieser Zellen in Apoptose. Steigt die EPO-Konzentration hingegen an, entstehen aus ihnen Erythroblasten und letztendlich Retikulozyten, die vom Knochenmark ins Blut übergehen [53]. Diese Wirkung entfaltet Erythropoetin über seinen Rezeptor EPO-R, einen Rezeptor der Zytokin Superfamilie 1 [53]. Ein EPO-Molekül bindet dazu an zwei benachbarte EPO-R und führt zu deren Dimerisierung, was die weitere Signaltransduktion einleitet [51]. Intrazellulär wird die Januskinase 2 (Jak2) aktiviert, welche die Phosphorylierung des EPO-R katalysiert, wodurch eine Bindungsstelle für STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*) entsteht. Dadurch erfolgt die Aktivierung von STAT5, der als Transkriptionsfaktor in den Zellkern wandert und die Expression von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-xL induziert [53].

Die sauerstoffabhängige Produktion und Sekretion von EPO sowie die Expression des EPO-R wird über den Hypoxie-induzierten Faktor-1 (HIF-1) vermittelt [51]. HIF-1 ist ein Schlüsselprotein in der Sauerstoffhomöostase und als Transkriptionsfaktor wesentlich an Vorgängen wie der Angiogenese und Erythropoetinproduktion beteiligt [54]. Es handelt sich um einen Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten HIF-1 β , welche intrazellulär konstant vorliegt, und HIF-1 α , die zwar kontinuierlich transkribiert wird, aber posttranslationalen Modifikationen unterliegt [54]. Unter Normoxie wird HIF-1 α stetig abgebaut, indem es an seiner Domäne ODDD (*oxygen-dependent degradation domain*) enzymatisch hydroxyliert und anschließend proteasomal beseitigt wird [54].

Während eines Sauerstoffmangels fallen die Hydroxylierung und der Abbau weg, sodass HIF-1 α stabilisiert in den Zellkern wandern und sich mit HIF-1 β zu einem Dimer zusammenschließen kann [54]. Nun kann HIF-1 als Transkriptionsfaktor an der HRE-Region (*hypoxia response element*) des Promotors des EPO-Gens binden und die Transkription von Erythropoetin induzieren [54].

Neben seiner Aufgabe in der Hämatopoese besitzt Erythropoetin zusätzlich zytoprotektive Eigenschaften, die vor einer Ischämie schützen sollen und konnte auch im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden. Beispielsweise exprimieren Neurone den EPO-R, während Astrozyten Erythropoetin produzieren können [55]. Auch in Kardiomyozyten, Zellen des Verdauungstrakts und der Niere konnte der EPO-R nachgewiesen werden [56]. Wie in der Hämatopoese bewirkt

eine lokale Hypoxie im Rahmen einer Ischämie über HIF-1 α eine gesteigerte EPO-Produktion [56]. Über seine parakrine und autokrine Wirkung hemmt EPO an der Zielzelle die Apoptose und trägt dadurch zum Erhalt von Gewebe bei, welches sonst in den programmierten Zelltod gehen würde [56, 57]. Außerdem fördert Erythropoetin die Angiogenese, was zu einer besseren Blutversorgung und Rekrutierung von Stammzellen beiträgt. Es hemmt die Zytokinausschüttung durch Leukozyten und wirkt antiinflammatorisch [56]. Neben seinen potenziell neuroprotektiven Eigenschaften gegen Ischämie- und Reperfusionsschäden im zentralen Nervensystem ist die Wirkung in Modellen für neurodegenerative und neuroinflammatorische Erkrankungen wie Parkinson oder Multiple Sklerose ebenfalls vielversprechend [58, 59].

Anders als in der Erythropoese entfaltet Erythropoetin seine gewebeprotectiven Eigenschaften nicht vornehmlich über einen Homodimer aus zwei EPO-R, sondern über den *tissue-protective receptor* (TPR) bestehend aus der EPO-R-Untereinheit und dem β *common receptor* (β CR, auch CD131 genannt) [60]. Dieser Rezeptor hat verglichen mit dem Homodimer (EPO-R) $_2$ eine deutlich geringere Affinität zu Erythropoetin und braucht zur Aktivierung seiner Signaltransduktion eine höhere EPO-Konzentration, als zur Steigerung der Erythropoese benötigt wird [60]. Würde es in dieser hohen Konzentration systemisch als Pharmakon appliziert werden, hätte es ein beträchtliches Nebenwirkungsprofil. Die Steigerung der Blutviskosität und des Blutdrucks könnte zu kardiovaskulären und thromboembolischen Ereignissen führen [51].

Zur Lösung dieser Problematik wurden Derivate entwickelt, die nicht am klassischen (EPO-R) $_2$, sehr wohl aber am TPR binden. Ein solches Derivat ist cEPO-Fc. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus zwei rekombinanten Erythropoetin-Molekülen und der konstanten Region des Immunglobulins IgG1 [61, 62]. Durch Carbamylierung der Lysinreste der EPO-Moleküle verliert das Derivat seine Bindungsfähigkeit zum Homodimer, die Wirkung am gewebeprotectiven Rezeptor TPR bleibt dabei unbeeinträchtigt [63]. Während einfaches, carbamylirtes Erythropoetin ähnliche pharmakokinetische Eigenschaften wie Erythropoetin besitzt, die Bluthirnschranke gleichermaßen passieren kann und eine vergleichbare Halbwertszeit hat, führt die Fusion mit dem Fc-Fragment zu einer höheren Halbwertszeit und damit zu einer möglichen Verlängerung der Wirkung [61, 62].

1.5 Hypoxie- und Reoxygenierungsmodelle

Um Ischämie- und Reperfusionsschäden *in vitro* nachzuahmen, bedient man sich in der Forschung unterschiedlicher Hypoxie- und Reoxygenierungsmodelle. Weite Anwendung findet das Modell OGD (*oxygen and glucose deprivation*), in welchem Zellen einer Zelllinie oder Primärkultur einer Kombination aus Sauerstoff- und Glukosemangel ausgesetzt werden [64]. Dies soll das gleichzeitige Minderangebot von Sauerstoff und Energiesubstraten während der Ischämie widerspiegeln. Auch die isolierte Hypoxie-Exposition, induziert durch eine Hypoxiekammer oder -bank, ist gängig [64]. Ferner können einzelne Komponenten der I/R-Sequenz imitiert werden wie der oxidative Stress durch Zugabe von H₂O₂ oder die Exzitotoxizität durch Zugabe von Glutamat [64, 65].

Trotz des häufigen Einsatzes des OGD-Modells in der neuronalen Zellkultur ist kein standardisiertes Versuchsprotokoll etabliert [66]. Beispielsweise werden Sauerstoffkonzentrationen von 0 bis 8 % für die Hypoxiephase verwendet [67-70]. Auch die Zeit, der die Zellen einem Sauerstoff- und Glukosemangel ausgesetzt werden, variiert von einer Stunde bis zu wenigen Tagen, selbst bei dem Einsatz derselben Zelllinie [66, 71-73]. Zugleich unterscheiden sich die verwendeten Reoxygenierungszeiten. Häufig wird eine Reoxygenierungszeit von 24 Stunden eingesetzt [68, 69, 71], aber auch kürzere Intervalle sind gängig [67, 72]. Im Gegensatz dazu wird der Glukosemangel in den meisten Modellen einheitlich durch den Einsatz von glukosefreiem Medium imitiert, die Versuche entsprechend bei einer Glukosekonzentration von 0 g/l durchgeführt [66, 67, 71, 72, 74].

Die vorliegende Arbeit baut auf dem Hypoxie- und Reoxygenierungsmodell von Timbul (2023) auf. In jener Arbeit wurden Auswirkungen einer isolierten Hypoxie auf neuronale Zelllinien bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,1 % in einer Hypoxiebank untersucht, ohne einen Glukosemangel herzustellen [75]. Damit wurde nachweislich eine ausreichende Hypoxie induziert, was an einer erhöhten Expression von HIF-1 α und am optischen Eindruck durch lichtmikroskopische Aufnahmen festgemacht wurde [75]. Allerdings blieb eine zufriedenstellende Erhöhung von proapoptotischen Proteinen aus. Timbul (2023) diskutiert als Ursache den proliferativen Effekt von HIF-1 α , der die Apoptose in der Zellkultur verhindern soll [75]. Eine weitere denkbare Möglichkeit ist, dass die geringe Sauerstoffkonzentration von 0,1 % für die Zellen eine so starke Noxe darstellte, dass diese eher durch Nekrose als Apoptose abgestorben sind und deswegen keine Erhöhung von proapoptotischen Proteinen nachzuweisen war. Diese These

würde erklären, warum in der Arbeit von Timbul (2023) die Zellviabilität im MTT-Assay nach der Hypoxiephase erniedrigt war, zumindest in den Zelllinien Neuro-2A und IMR-32 [75]. Auch in anderen Modellen blieb die Induktion von Apoptose zugunsten von nekrotischem Zelltod aus [76-78]. So konnten z. B. Moroni et al. (2001) in ihrer Arbeit keine relevante Apoptoserate nach OGD-Exposition ihrer kortikalen Zellen nachweisen, sehr wohl aber nekrotisches Zellsterben [76]. Da die Apoptoseinhibition als zentraler Wirkmechanismus von Erythropoetin diskutiert wird, ist eine nachweisbare Apoptose im Hypoxie- und Reoxygenierungsmodell, welches die Auswirkungen von Erythropoetin untersuchen soll, unerlässlich.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel ist es, die Ischämie- und Reperfusionsschäden, die durch das *Cross-Clamping* der Hauptschlagader während chirurgischer Eingriffe an der thorakoabdominellen Aorta im Rückenmark entstehen, in einem In-vitro-Ansatz nachzubilden. Die Etablierung bzw. Erweiterung eines geeigneten Hypoxie- und Reoxygenierungsmodells soll zum einen zu einem besseren Verständnis der zellulären Mechanismen während der I/R-Sequenz verhelfen, zum anderen als Grundlage dienen, die möglichen positiven Effekte von rhEPO und cEPO-Fc zu untersuchen.

In Tiermodellen konnte eine zytoprotektive Wirkung von rhEPO und cEPO-Fc bereits gezeigt werden [79, 80]. Simon et al. (2011) konnten in einem Schweinmodell den Benefit beider Substanzen auf die neurologische Funktion der unteren Extremitäten und auf neuronale Schäden im Rückenmark nach Aortenokklusion demonstrieren [79]. Bemerkenswert ist dabei, dass der zytoprotektive Effekt ohne den Nachweis von Apoptose oder Inflammation erzielt werden konnte [79]. In einer weiteren Versuchsreihe konnten Simon et al. (2016) den positiven Einfluss von rhEPO auf das neurologische *Outcome* in einem Kaninchenmodell reproduzieren, während die Wirkung von cEPO-Fc ausblieb. Als Ursache wurden Unterschiede der Blut-Hirn-Schranke von Schweinen und Kaninchen diskutiert [81].

Während die Ergebnisse aus Tierversuchen vielversprechend sind, besteht weiterhin Bedarf an der Aufklärung der zellulären Mechanismen im Rückenmark während der I/R-Sequenz sowie der genauen Wirkungsweise von rhEPO und cEPO-Fc. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten. Durch den

Einsatz neuronaler Zelllinien soll der direkte Effekt von Hypoxie und Reoxygenierung auf Nervenzellen untersucht werden, ohne den Einfluss systemischer Reaktionen wie z. B. Inflammation. Auch die isolierte Wirkung von rhEPO und cEPO-Fc auf entstandene Schäden in den Nervenzellen soll evaluiert und damit der Effekt auf Immunzellen oder die Durchblutung bewusst ausgeklammert werden. Außerdem kann durch die Verwendung zweier humaner Zelllinien und einer murinen Zelllinie eine Brücke zwischen Tiermodell und Mensch geschlagen werden.

Aufbauend auf dem Modell von Timbul (2023) steht am Anfang die Ermittlung einer geeigneten, apoptoseinduzierenden Sauerstoffkonzentration sowie die Erweiterung des Modells um den Einsatz unterschiedlicher Glucosekonzentrationen (OGD). Es folgt die Evaluation der Reoxygenierungszeit, die bei Timbul (2023) auf 24 Stunden festgelegt war. Nach Etablierung des Modells werden die Auswirkungen von rhEPO und cEPO-Fc untersucht. Es sollen die Antworten zu folgenden Fragestellungen erarbeitet werden:

Etablierung und Erweiterung des Hypoxie- und Reoxygenierungsmodells

- Welche Sauerstoffkonzentration eignet sich zur Hypoxieinduktion?
- Welche Auswirkungen hat eine Kombination aus Sauerstoff- und Glukosemangel auf neuronale Zelllinien?
- Welche Reoxygenierungszeit ist i. S. des Modells ideal?

Untersuchung der Auswirkungen von rhEPO und cEPO-Fc

- Welchen Einfluss üben rhEPO und cEPO-Fc auf neuronale Zelllinien im Hypoxie- und Reoxygenierungsmodell aus?
- Unterscheidet sich die Wirkung von rhEPO und cEPO-Fc?
- Ist eine mögliche Wirkung dosisabhängig?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Für die Versuche wurden drei neuronale Zelllinien verwendet, welche von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DMSZ) bezogen wurden:

- SH-SY5Y (DSMZ no.: ACC 209): humane Zelllinie aus einer Knochenmarkspröbe eines metastasierten Neuroblastoms
- IMR-32 (DSMZ no.: ACC 165): humane Zelllinie eines abdominalen Neuroblastoms
- Neuro-2A (DSMZ no.: ACC 148): murine Zelllinie eines Neuroblastoms

Für die Zelllinie SH-SY5Y gibt es die Empfehlung der Verwendung von Passagierungsphasen unter 15, weswegen für die Versuche die Passagierungsphasen 3-12 verwendet wurden [82]. Für die beiden anderen Zelllinien gibt es keine Einschränkungen. Die Versuche wurden mit undifferenzierten Zellen der genannten Linien durchgeführt.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Firma
Acrylamid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Aqua destillata	Zentralapotheke Universitätsklinikum Düsseldorf
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin), Fraction V	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Carbamyliertes Erythropoetin-Fc (cEPO-Fc), 972 µg/ml	Polymun Scientific, Klosterneuburg, Österreich
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
D(+)-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's PBS (Phosphate Buffered Saline), ohne Calcium, ohne Magnesium	Gibco® Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose, pyruvate	Gibco® Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), no glucose	Gibco® Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol, 99,5 %	Zentralapotheke Univeristätsklinikum Düsseldorf, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS) Superior	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Fötales Rinderserum (FBS)	Gibco® Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Gentamicin (10 mg/ml)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Glycerol, ≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure), ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Isopropanol	Zentralapotheke Univeristätsklinikum Düsseldorf, Deutschland
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X) (NEAA)	Gibco® Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Methanol, 99,8 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid, ≥99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Rekombinantes humanes Erythropoetin (rhEPO), 75.000 IU/ml	Polymun Scientific, Klosterneuburg, Österreich
RPMI 1640-Medium	Gibco® Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
RPMI 1640-Medium, no glucose	Gibco® Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Salzsäure rauchend, 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

SDS (Natriumlaurylsulfat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tris-Hcl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trizma [®] -Base / Tris-Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypanblau -Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Tween [®] 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
WST-1 Reagenz	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
96 Well Zellkulturplatte	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Halb-Mikro-Küvette 2,5 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Kanüle Sterican®, 0,8x120 mm 21 G	Bemis Company, Neenah, Wisconsin, USA
Kryoröhrchen Cryo s.	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Laborflaschen rund und vierkant, 100 ml; 250 ml; 500 ml; 1000 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland; DWK Life Sciences, Wertheim, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Multi-Casting Chamber	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland

Nitrozellulosemembran, Rolle, 0,45 µm	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Pipettenspitze 10 µl; 20 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml; 2 ml, braun	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml; 2 ml, natur	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Spirtzenvorsatzfilter Filtropor S, Porengröße: 0,45 µm	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Spritze 50ml Omnifix	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Standard-Reagiergefäß 1,5 ml; 2 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Stripette 2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml	Corning, Glendale, Arizona, USA
Verpackungsfolie Parafilm™ M	Bemis Company, Neenah, Wisconsin, USA
Whatman® Chromatographie-Papiere, 3 MM, 7,5 x 100 cm	GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland
Zellkulturflasche T25, T75, T175	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale PS, 145x20 mm, 100x20 mm	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellschaber mit 2-Positionen-Klinge, steril	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Corning, Glendale, Arizona, USA
Zentrifugenröhrchen 50 ml, 15 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper		
Antikörper	Best.-Nr.	Hersteller
Anti-AMPKβ1	#4178	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Bcl-2	#2876	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Caspase-3	#9665	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Caspase-9 (human)	#9502	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Caspase-9 (murin)	#9504	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Anti-Cleaved Caspase-3	#9661	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Cleaved Caspase-9 (human)	#9505	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Cleaved Caspase-9 (murin)	#9509	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-GAPDH	#8884	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-HIF-1alpha	ab113642	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-HIF-1alpha (human)	#3716	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Smac/DIABLO	ab8114	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Smac/DIABLO (human)	#2954	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti- α -Tubulin (Alexa Fluor® 488 Conjugate)	#5063	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti- β -Actin (Alexa Fluor® 647 Conjugate)	#8584	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Sekundärantikörper		
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	#7076	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Goat Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody	sc-2004	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper. Für humane oder murine Zelllinien spezifische Antikörper sind als solche gekennzeichnet.

2.1.5 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Absaugsystem "VACUSAFE"	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Autoklav Systec VX-95	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Blotting-Kammer Novex™ Semi-Dry Blotter	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Blotting-Kammer Semidry Electroblotter	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Brutschrank HERAccl 240	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Einkanalpipetten "Eppendorf Research plus" 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Einkanalpipetten "Eppendorf Research" 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einkanalpipetten "PIPETMAN Classic" P10, P20, P200, P1000	Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Elektrophorese-Kammer "Mini-PROTEAN Tetra Cell for Ready Gel Precast Gels"	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Feinwaage "Sartorius Extend"	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Flüssigstickstofflagerbehälter CRYO Plus 3	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Gefrierschrank "HERAfreeze HFU T Series"	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
HERAEUS FRESCO 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus Megafuge 40R Universalzentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
HERAEUS PICO 21 Microcentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
IKA Schüttler MTS 4	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
JuLI™ Br Live Cell Movie Analyzer	NanoEntek, Seoul, Korea
Laborwaage EK-3000i	A&D Company, Limited, Tokio, Japan
Magnetrührer MS 4 basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Magnetrührer RSM-10HS	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Mehrkanalpipette "Eppendorf Research 300"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipette "ErgoOne" 8-Kanal-Pipette 300 µl	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus K.K., Tokio, Japan
NanoDrop 2000c Spectralphotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
PerfectSpin Mini	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettierhilfe "Accupette"	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettierhilfe "Easypet"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe "neoAccupette 3-9905"	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipettierhilfe "PIPETBOY acu"	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Pipettierhilfe "pipetus®"	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland

Plattenschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Reinstwasseranlage "arium® pro"	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sauerstoffsonde "SevenToGo Pro"	Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA
Schweißgerät "Hemofreeze Sealer"	Fresenius HemoCare GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Scotsman AF 80 Ice Flaker	Scotsman Industries, Inc., Vernon Hills, Illinois, USA
Sicherheitsschrank für Gasflaschen vom Typ G90	Düperthal Sicherheitstechnik GmbH & CO. KG, Karlstein, Deutschland
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TissueLyser LT	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
VICTOR X4 Multilabel Plate Reader	PerkinElmer Inc., USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA
Wasserbad WNE 14	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Deutschland
Whitley H35 Hypoxystation	Meintrup DWS Laborgeräte GmbH, Herzlake, Deutschland

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Laborgeräte

2.1.6 Elektronische Datenverarbeitungsprogramme

Programm	Anbieter
Ascent™ Software	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
AxioVision LE64	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
EndNote X8	Clarivate, London, Vereinigtes Königreich
Image Lab 4.1	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
IrfanView 4.52	<i>Freeware</i> über www.irfanview.com
Microsoft 365 MSO (Version 2109)	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
NanoDrop 2000 Software	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
SigmaPlot 13.0	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Software und ihrer Anbieter

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kultiviert wurden die Zellen im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % und einem CO₂-Anteil von 5 %. Für die Zelllinien SH-SY5Y und Neuro-2A wurden T75-Zellkulturflaschen, für die IMR32 Petrischalen von 100 mm Durchmesser verwendet. Die Zusammensetzungen der Nährmedien sind in Tabelle 6 aufgeführt. Ein Nährmediumwechsel fand mindestens alle drei Tage statt. Nach Erreichen einer Dichte von ca. 80 % wurden die Zellen passagiert. Der Splitfaktor für die Zelllinien IMR32 und SH-SY5Y betrug dabei im Schnitt 1:2 bis 1:3, während die schnellwachsenden Neuro-2A zu einem Faktor von 1:4 bis 1:6 geteilt wurden.

Die Arbeitsschritte der Passagierung erfolgten unter sterilen Bedingungen in der Sicherheitswerkbank. Die verwendeten Lösungen wurden im Wärmebad auf 37 °C erwärmt. Zunächst wurde das alte Medium abpipettiert und der Zellrasen mit 10 ml DPBS gewaschen. Um den Zellrasen vom Flaschenboden zu lösen, wurde er mit 2 ml Trypsin-EDTA inkubiert und anschließend sanft abgeklopft. Das Abstoppen erfolgte mit 10 ml des entsprechenden Mediums, woraufhin die Zellsuspension in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei einer Beschleunigung von 200 g zentrifugiert wurde. Nach Abkippen des Überstands wurde das Zellpellet in 10 ml DPBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Lösung des Sediments in 10 ml des jeweiligen Mediums wurde es entsprechend des Teilungsfaktors in die Kulturflasche bzw. Petrischale übertragen und mit 10 ml Medium aufgefüllt. Abweichend von diesem Procedere erfolgte die Passagierung der Zelllinie IMR-32. Durch eine geringere Adhärenz wurde der Zellrasen ohne Verwendung von Trypsin-EDTA direkt in DPBS gelöst, zentrifugiert und im Medium resuspendiert.

Zelllinie	Kulturmedium
Neuro-2A	DMEM, high glucose + 10 % FBS + 1 % NEAA (100x) + 0,5 % Gentamicin
SH-SY5Y	RPMI 1640-Medium + 20 % FBS + 0,5 % Gentamicin
IMR-32	RPMI 1640-Medium + 20 % FBS + 1 % NEAA (100x) + 0,5 % Gentamicin

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze. Abkürzungen: FBS = Fetales Rinderserum, NEAA = nichtessenzielle Aminosäuren, DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, RPMI = *Roswell Park Memorial Institute*

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Um die Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten, sollten immer die gleichen Zellzahlen miteinander verglichen werden. Hierzu war die Auszählung der Zellen erforderlich, die mit der Neubauer-Zählkammer erfolgte. 20 µl der Zellsuspension, von welcher die Konzentration an Zellen bestimmt werden sollte, wurden mit 20 µl der Trypanblau-Lösung in einem Mikroreaktionsgefäß vermischt und 2 min inkubiert. Nach Vorbereitung der Zählkammer wurden 10 µl des Gemischs aus Zellsuspension und Trypanblau auf diese pipettiert, welches sich durch die Kapillarkräfte gleichmäßig zwischen Zählkammer und Deckglas verteilte. Ausgezählt wurden die vier Eckquadranten eines der zwei Großquadranten unter dem Lichtmikroskop. Dabei wurden nur die lebendigen, intakten Zellen eingeschlossen, welche sich durch Trypanblau nicht anfärben lassen und weiß aufleuchten [83]. Die Menge an Zellen in einem Milliliter der Ausgangslösung wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml Zellsuspension}$$

Da die Zellsuspension zu gleichen Teilen mit der Trypanblau-Lösung vermischt wurde, betrug der Verdünnungsfaktor zwei.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Um langfristig mit den Zelllinien arbeiten zu können, wurden diese kryokonserviert und im Stickstofftank bei -160 °C gelagert. Auf diese Reserve konnte jederzeit zurückgegriffen werden. Eingefroren wurden möglichst junge Zellen, die höchstens sechs Passagierungen durchlaufen hatten. Dafür wurden Zellen mehrerer Kulturflaschen bzw. Petrischalen in einem 15 ml-Falcon gepoolt, zentrifugiert und in 10 ml Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium enthielt 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), welches als Gefrierschutzmittel die Bildung von Eiskristallen und damit die Zerstörung der Zellen während des Einfrierprozesses verhindert. Nach Auszählung und entsprechender Verdünnung mit dem Einfriermedium wurden je 1×10^6 Zellen in 0,5 ml Medium auf Tieffrierampullen verteilt. Diese wurden zunächst über Nacht bei -80 °C im Tiefkühlschrank gelagert und anschließend im Stickstofftank verstaut.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen, welche die tiefgefrorene Zellsuspension enthielten, aus dem Stickstofftank geholt, auf Trockeneis transportiert und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Sobald sich die Suspension vom Kryoröhrchen lösen ließ, wurde sie unter sterilen Bedingungen in ein mit 50 ml Medium gefüllten, vorgewärmten Falcon überführt. Daraufhin wurde sie für 5 min bei 200 g Beschleunigung zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Zellpellet in 10 ml Medium aufgenommen. Schließlich wurde die Zellsuspension in eine entsprechende Zellkulturflasche oder Petrischale gegeben und stand der herkömmlichen Zellkultur zur Verfügung.

2.2.4 Erarbeitung des Hypoxie- und Reoxygenierungsmodells

Analog zur Ischämie und Reperfusion wurden die Zellen einer Hypoxie- und Reoxygenierungsphase ausgesetzt. Zur Erzeugung der Hypoxie wurde dafür die Hypoxiebank „Whitley H35 Hypoxiestation“ verwendet. Der Vorteil dieser Hypoxiebank bestand in integrierten Gassensoren, die eine stabile Sauerstoffkonzentration über die Versuche ermöglichten. Die Temperatur in der Hypoxiebank betrug konstant 37 °C , die Luftfeuchtigkeit lag um 65 %. In der Reoxygenierungsphase wurden die Zellen nach der Hypoxie ihren gewohnten, zellkulturellen Bedingungen ausgesetzt.

2.2.4.1 Erzeugung des Glukosemangels

Im Sinne der Sauerstoff- und Glukosedepriuation (OGD) sollte den Zellen während der Hypoxiephase nicht nur Sauerstoff, sondern auch Glukose entzogen werden. Dafür wurden die Zellen während der Hypoxie in drei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe erhielt während der Versuche die für ihre Zellkultur gewohnte Glukosekonzentration. Diese betrug bei den Zelllinien SH-SY5Y und IMR-32 2 g/l, bei der Zelllinie Neuro-2A 4,5 g/l und wurde als *high glucose* definiert. Die zweite Gruppe bekam eine herabgesetzte Glukosekonzentration von 1 g/l (*low glucose*) und die dritte Gruppe 0 g/l (*no glucose*). Während die Zellkulturmedien der Gruppen *high glucose* und *no glucose* vom Hersteller bezogen werden konnten, wurde das Versuchsmedium der Gruppe *low glucose* durch Zugabe einer hochkonzentrierten Glukoselösung zum glukosefreien Medium angefertigt. Dazu wurden 470 g D(+)-Glucose in 1 l destilliertem Wasser unter ständiger Bewegung eines Magnetrührers in einer verschlossenen Glasflasche über Nacht gelöst. Bei einer Konzentration von 470 g/l ist Glukose bei 20 °C gut wasserlöslich, ohne auszufallen, was dem Sicherheitsdatenblatt des Herstellers zu entnehmen war. Um Verschmutzungen und Mikroorganismen zu entfernen, wurde die Glukoselösung anschließend durch eine Kanüle mit Spritzenvorsatzfilter gefiltert und in 50 ml-Falcons luftdicht gefüllt.

2.2.4.2 Zubereitung der Hypoxiemedien

Die für die Hypoxiephase genutzten Zellmedien mussten vor Versuchsbeginn desoxygeniert werden. Dazu wurden sie mit 25 mM HEPES versetzt, in die Hypoxiebank geschleust und in offenem Zustand mithilfe eines Magnetstäbchens stetig umgerührt. In der Arbeit von Timbul (2023) konnte nachgewiesen werden, dass bereits nach vier Stunden die Sauerstoffkonzentration im Medium ein Plateau erreicht und ausreichend desoxygeniert vorliegt [75]. Deswegen wurde auch für die hiesigen Versuche eine minimale Desoxygenierungszeit von vier Stunden festgelegt, meist wurde das Medium bereits zwölf Stunden vor Versuchsbeginn in die Hypoxiebank geschleust. Anfangs erfolgten Kontrollmessungen mit der Sauerstoffsonde „SevenToGo Pro“ (Mettler Toledo), welche die zu erwartenden Sauerstoffkonzentrationen bestätigten.

2.2.4.3 Induktion von Hypoxie und Reoxygenierung

Die Aussaat der Zellen erfolgte am Vortag in T75-Zellkulturflaschen bzw. Petrischalen eines Durchmessers von 100 mm oder in 96-Well Platten, je nach Versuch (s. u.). Generell wurden die Zellen in drei Gruppen aufgeteilt: Hypoxie (H), Reoxygenierung (R) und Normoxie (N). Zusätzlich waren in jeder Gruppe die unterschiedlichen Glukosekonzentrationen vertreten. Zu Versuchsbeginn wurden die Zellen der Gruppen Hypoxie und Reoxygenierung in die Hypoxiebank geschleust, ihr Medium sorgsam abpipettiert und durch das jeweilige Versuchsmedium ersetzt. Die Hypoxiephase konnte beginnen. In Anlehnung an die durch Timbul (2023) erarbeiteten Hypoxiezeiten wurden Zellen der Linie Neuro-2A für 24 Stunden, Zellen der Linie IMR-32 für 48 Stunden und Zellen der Linie SH-SY5Y für 72 Stunden der Hypoxiephase ausgesetzt [75].

Für die Reoxygenierungsphase wurden die Zellen nach Ablauf der Hypoxiezeit aus der Hypoxiebank geschleust. In der Sicherheitswerkbank wurde das Versuchsmedium abpipettiert und durch ihr für die Zellkultur gewohntes Medium ersetzt. Dadurch wurden sie analog zur Reperfusion einem erneuten Angebot an Sauerstoff und Glukose, unabhängig von der Glukosekonzentration des jeweiligen Hypoxiemediums, ausgesetzt.

Den Zellen der Normoxiegruppe wurde parallel zum Hypoxiestart das Medium in der Sicherheitswerkbank abpipettiert und durch frisches Versuchsmedium ausgetauscht. Anschließend verblieben sie im Brutschrank für die gleiche zeitliche Länge wie die Hypoxiegruppe. Auch in der Normoxie erhielten die Zellen unterschiedliche Glukosekonzentrationen, sodass die Effekte von Sauerstoffmangel und Glukosedepriuation unabhängig voneinander untersucht werden konnten. Normoxische Zellen der Gruppe *high glucose* bildeten für die Versuche die Kontrolle.

2.2.4.4 Ermittlung der idealen Sauerstoffkonzentration

Für das Versuchsmodell sollte eine Sauerstoffkonzentration etabliert werden, die nicht nur einen nachweislichen hypoxischen Schaden, sondern auch eine erhöhte Apoptoserate der Zellen zur Folge hat. Dafür wurden die Auswirkungen der Sauerstoffkonzentrationen von 0,5 %, 2 % und 5 % untersucht. Kohlenstoffdioxid machte 5 % der in der Hypoxiebank befindlichen Atmosphäre aus, den restlichen Anteil bildete Stickstoff. Nach der Hypoxiephase mit entsprechender

Sauerstoffkonzentration wurde die Expression von HIF-1 α und Caspase 3 bestimmt sowie die Zellviabilität gemessen.

2.2.4.5 Ermittlung der idealen Reoxygenierungszeit

Nach Eruiierung der geeignetsten Sauerstoffkonzentration wurde die i. S. des Modells ideale Reoxygenierungszeit bestimmt. Dazu wurden die Zellen 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Induktion der Reoxygenierung u. a. auf die Expression von HIF-1 α und Caspase 3 sowie auf die Zellviabilität untersucht.

2.2.4.6 RhEPO und cEPO-FC

Nach Bestimmung der Sauerstoffkonzentration und der Reoxygenierungszeit konnten die Versuche mit rekombinantem, humanem EPO und carbamyliertem EPO-Fc durchgeführt werden. Dazu wurden die Versuchsmedien, wie oben beschrieben, vorbereitet und kurz vor Versuchsbeginn mit den Substanzen versetzt. Die Konzentrationen von rhEPO und cEPO-FC richteten sich nach den von Timbul (2023) verwendeten Konzentrationen [75].

Der Zusatz erfolgte zu folgenden Konzentrationen:

- rhEPO *high*: 20 IU/ml
- rhEPO *low*: 0,2 IU/ml
- cEPO-Fc *high*: 20 μ g/ml
- cEPO-Fc *low*: 0,2 μ g/ml
- Kontrolle: kein Zusatz (ohne rhEPO/cEPO-FC)

Dabei erhielten sowohl Zellen der Hypoxie und Reoxygenierung als auch der Normoxie entsprechende Zusätze und die Aufteilung in unterschiedliche Glukosekonzentrationen blieb ebenfalls bestehen, wobei die Versuchsgruppen der Kategorie *no glucose* für die Experimente mit rhEPO/cEPO-Fc aufgrund der Ergebnisse aus den Versuchen zur Bestimmung der idealen Sauerstoffkonzentration ausgeschlossen wurde (s. S. 51 und S. 102).

2.2.5 Proteingenerierung und Westernblot

Der Westernblot ist eine Methode zur selektiven Detektion von Proteinen, in diesem Fall von Apoptoseproteinen und HIF-1 α . Dabei werden die gesamten Proteine einer Probe zunächst mittels Gelelektrophorese, hier SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese), nach ihrer Größe und Ladung auf einem Gel in Banden aufgetrennt [84]. In einem zweiten Schritt erfolgt das eigentliche *Blotting*, der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Membran. Wie bei der Gelelektrophorese bildet ein elektrisches Feld die Grundlage für die Wanderung der meist negativ geladenen Proteine Richtung Anode, wodurch sie auf die Membran übertragen werden [84]. Diese wird anschließend mit einem Primärantikörper, der spezifisch an das zu detektierende Protein bindet, inkubiert. Der hinzugegebene Zweitantikörper trägt die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) und bindet an den Erstantikörper. Ein chemilumineszentes Substrat wird hinzugefügt und von der Meerrettich-Peroxidase gespalten, wodurch über dessen Lumineszenz indirekt das zu detektierende Protein nachgewiesen werden kann. Über die gemessene Größe und Intensität der Proteinbande lässt sich im Vergleich auch eine quantitative Aussage treffen. Wichtig ist dabei gegen ein *Housekeeper*-Protein, das in allen Zellen gleichermaßen exprimiert wird und keiner Regulation unterliegt, gegenzurechnen [84].

2.2.5.1 Proteinextraktion

Zunächst wurde das Zellmedium, in dem die Zellen zu den jeweiligen experimentellen Bedingungen kultiviert wurden, abpipettiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 5 ml eiskaltem DPBS gewaschen, anschließend in je 10 ml eiskaltem DPBS pro Zellkulturflasche resuspendiert und für 5 min zentrifugiert. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschengrund wurde ein Zellschaber verwendet. Abweichend davon erfolgte die Ernte der Zelllinie IMR-32. Aufgrund der geringen Adhärenz war das Abpipettieren des Versuchsmediums und die Waschung mit DPBS ohne erheblichen Zell- und damit Proteinverlust nicht möglich. Daher wurden die Zellen zunächst ins Versuchsmedium abgeklopft, in ein 15 ml-Falcon überführt und für 5 min zentrifugiert. Anschließend konnte das Zellepellet in 10 ml eiskaltem DPBS resuspendiert und erneut zentrifugiert werden.

Im nächsten Schritt wurde das Zellpellet in 100 µl RIPA-Lysepuffer gelöst und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Dieses kam für 50 Sekunden in den TissueLyser, in welchem die Zellstrukturen mechanisch zerstört werden, um die benötigten Proteine extrahieren zu können. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C über Nacht im Kühlschrank eingefroren.

Puffer	Zusammensetzung
RIPA-Lysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 150 mM Natriumchlorid - 1 % IGEPAL® - 0,1 % SDS - 50 mM Tris, pH 8 <p>In VE-H₂O</p>

Tabelle 7: Zusammensetzung des RIPA-Lysepuffers. Abkürzungen: RIPA = radioimmunoprecipitation assay, SDS = Natriumdodecylsulfat, VE-H₂O = vollentsalztes Wasser

2.2.5.2 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford

Die am Vortag eingefrorenen Proben wurden schonend auf Eis aufgetaut und anschließend für mindestens 20 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Am Boden sammelten sich die Zellreste, während die extrahierten Proteine im Überstand gelöst vorlagen. Dieser Überstand wurde abpipettiert und in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch nach Bradford mit dem Bio-Rad Protein-Assay bestimmt. Hierzu wurde das Farbstoffkonzentrat im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Je 1 ml Farbstofflösung und 20 µl der Proteinprobe wurden mittels Vortex vermischt und 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben in spezielle Küvetten gefüllt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im NanoDrop 2000 bestimmt. Als Blindprobe wurden 20 µl RIPA-Lysepuffer in 1 ml Farbstofflösung verwendet. Der Bradford-Assay beruht auf der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie-Brillantblau G-250, wodurch es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm kommt [85]. Je höher die Absorption bei besagter Wellenlänge, desto höher ist die enthaltene Proteinkonzentration.

Die Proteinproben wurden schließlich mit EMSA-Puffer (10x), der als Proteaseinhibitor fungiert, im Verhältnis 1:10 versetzt und erneut bei -80 °C eingefroren.

Puffer	Zusammensetzung
EMSA-Puffer (10x)	<ul style="list-style-type: none"> - 100 mM Tris-HCl, pH 7,9 - 500 mM Natriumchlorid - 10 mM EDTA - 10 mM DTT - 20 % Glycerin - 100 mg/l BSA <p>In Aqua destillata</p>

Tabelle 8: Zusammensetzung des EMSA-Puffers. Abkürzungen: BSA = Bovines Serumalbumin, DTT = Dithiothreitol, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure, EMSA = *electrophoretic mobility shift assay*, HCl = Salzsäure

2.2.5.3 Herstellung der SDS-Gele

Für die Gelelektrophorese wurden 12-prozentige SDS-Trenngele verwendet. Zur Herstellung dieser wurden zunächst alle Komponenten der Gelgieß-Vorrichtung mit 70-prozentigem Ethanol gesäubert. Nach regelrechter Positionierung der Glasplatten wurden sie mit dem Trenngel befüllt. Um einen unregelmäßigen Rand beim Aushärten zu vermeiden, wurde das Trenngel mit Isopropanol bedeckt. Nach mindestens 30 min konnte dieses abgegossen werden. Es erfolgte das Befüllen mit 4,5-prozentigem Sammelgel, auf welches der *Spacer* zur Ausformung der einzelnen Taschen platziert wurde. Nach weiteren 30 min waren die Gele auspolymerisiert und konnten vorsichtig von der Vorrichtung gelöst und anschließend in 1x Laufpuffer getränkten Papiertüchern bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden.

Puffer	Zusammensetzung
<i>Upper Buffer</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 4 % SDS - 0,5 M Tris Base In VE-H ₂ O, pH auf 6,8 mittels Salzsäure (37 %) einstellen. Lagerung bei 4 °C.
<i>Lower Buffer</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 0,4 % SDS - 1,5 M Tris Base In VE-H ₂ O, pH auf 8,8 mittels Salzsäure (37 %) einstellen. Lagerung bei 4 °C.
10x Laufpuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 142,4 g Glycin - 30,3 g Tris Base - 10 g SDS Ad 1000 ml VE-H ₂ O
1x Laufpuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 100 ml 10x Laufpuffer - 900 ml VE- H₂O
Pipettierschema für 10 SDS-Gele à 1 mm Dicke	
Trenngel (12 %)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lower Buffer</i>: 16,6 ml - Acrylamid: 26,7 ml - Aqua destillata.: 23 ml - TEMED: 33,3 µl - APS 10 %: 333 µl
Sammelgel (4,5 %)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Upper Buffer</i>: 8,4 ml - Acrylamid: 5 ml - Aqua destillata: 19,6 ml - TEMED: 33,3 µl - APS 10 %: 333 µl

Tabelle 9: Pipettierschema der SDS-Gele und Zusammensetzung der verwendeten Puffer.
 Abkürzungen: APS = Ammoniumpersulfat, SDS = Natriumdodecylsulfat, TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, VE-H₂O = vollentsalztes Wasser

2.2.5.4 Gelelektrophorese

Zunächst wurden die zu untersuchenden Proteinproben auf Eis schonend aufgetaut und zentrifugiert. Um möglichst die gleiche Gesamtproteinmenge pro

Ladung zu erhalten, wurde der Probe mit der geringsten Proteinkonzentration 15 µl entnommen, den anderen der Reihe entsprechend ihrer Konzentration kleinere Volumina und der Rest mit RIPA-Lysepuffer verdünnt. Zu jeder Probe wurden 5 µl Laemmli-Puffer (4x) hinzugefügt, woraufhin die Denaturierung auf dem Thermoschüttler bei 95°C für 10 min erfolgte.

Die SDS-Gele wurden in der mit 1x Laufpuffer gefüllten Gelelektrophorese-Kammer platziert, die *Spacer* vorsichtig entfernt und die Taschen mit 1x Laufpuffer gespült. Dann konnten die Taschen mit den denaturierten Proben beladen werden, während eine der Taschen für den *Page-Ruler* verwendet wurde. Dabei handelt es sich um eine kolorierte Proteinreihe, die als Größenstandard fungiert. Die Elektrophorese konnte nun gestartet werden und lief zunächst für 10 min bei 90 V, anschließend für ca. 1 h und 20 min bei 120 V, bis die Banden sichtbar vom SDS-Gel „gelaufen“ waren.

Puffer	Zusammensetzung
Laemmli-Puffer (4x)	<ul style="list-style-type: none"> - 8 % SDS - 40 % Glycerin - 8 % β-Mercaptoethanol - 0,3 % Bromphenolblau - 200 mM Tris-HCl, pH 6,8 In VE-H ₂ O

Tabelle 10: Zusammensetzung des 4x Laemmli-Puffers. Abkürzungen: HCl = Salzsäure, SDS = Natriumdodecylsulfat, VE-H₂O = vollentsalztes Wasser

2.2.5.5 Blotting

Das Blotting erfolgte im Halbtrockenverfahren. Die benötigten Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran sowie das SDS-Gel wurden in 1x *Blotting*-Puffer für 5 min äquilibriert, die plane Anode und Kathode ebenfalls mit diesem befeuchtet. Nach Platzierung des SDS-Gels, der Membran und der Filterpapiere auf der Kathode der *Blotting*-Kammer wurde diese fest verschlossen und es erfolgte das *Blotting* bei 0,8 A für 30 min.

Nach Ablauf der Zeit waren die Proteine des SDS-Gels auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Diese wurde mit der Ponceau S-Lösung, welche unspezifisch sämtliche Proteinbanden sichtbar macht, eingefärbt. Das

diente einer ersten visuellen Kontrolle, um beispielsweise Aussparungen auf der Membran durch Blasenbildung zu detektieren.

Anschließend folgte eine Waschung für 5 min in 1x TBS und die Blockierung für 1 h mit 5 % BSA. Abweichend davon wurde für die Blockierung vor Gebrauch des HIF-1 α -Antikörpers der Firma Abcam 3 % Milch verwendet. Sämtliche Waschungen, Blockierungen und Inkubationen erfolgten unter steten Schwenkbewegungen in Plastikschaalen auf einem Plattenschüttler.

Puffer	Zusammensetzung
10x <i>Blotting</i> -Puffer (1000 ml)	- 291,25 g Tris Base - 142,6 g Glycin - 8,5 g SDS Ad 1000 ml VE-H ₂ O
1x <i>Blotting</i> -Puffer (1000 ml)	- 100 ml <i>Blotting</i> -Puffer (10x) - 200 ml Methanol - 700 ml VE-H ₂ O
10x TBS (1000 ml)	- 24,2 g Tris Base - 80 g NaCl pH auf 7,4 mittels Salzsäure (37 %) einstellen, ad 1000 ml VE-H ₂ O
1x TBS (1000 ml)	- 100 ml TBS (10x) - 900 ml VE-H ₂ O
0,1 % TBST (1000 ml)	- 1 ml Tween 20 Ad 1000 ml TBS (1x)
5 % BSA (100 ml)	- 5 g BSA Ad 100 ml TBST (0,1 %)
0,01 % BSA (50 ml)	- 100 μ l BSA (5 %) Ad 50 ml TBST (0,1 %)
3 % Milch (100 ml)	- 3 g Milchpulver Ad 100 ml TBST (0,1 %)
Blotto B (100 ml)	- 1 g BSA - 1 g Milchpulver Ad 100 ml TBST (0,1 %)

Tabelle 11: Zusammensetzung der für den Western Blot verwendeten Puffer. Abkürzungen: BSA = Bovines Serumalbumin, TBS = Tris-gepufferte Kochsalzlösung, TBST = Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20, VE-H₂O = vollentsalztes Wasser

2.2.5.6 Antikörperreaktionen

Pro Membran waren 1,5 bis 3 ml Antikörperlösung notwendig. Die Erstantikörper wurden in einem Verhältnis von 1:1000 in 5 % BSA gelöst. Als Ausnahme davon wurde für den HIF-1 α -Antikörper der Firma Abcam 0,01 % BSA verwendet. In kleinen Tüten eingeschweißt und mit der Antikörperlösung vollständig und gleichmäßig benetzt, inkubierte die Antikörperlösung über Nacht auf einem Rotator im Kühlschrank bei 4 °C.

Vor der Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgten drei Waschungen mit 1x TBS zu je 5 min. Die Zweitantikörper wurden in einem Verhältnis von 1:15.000 in Blotto B gelöst. Die Inkubation erfolgte für mindestens eine Stunde, wobei sich zur Detektion des Proteins HIF-1 α eine Inkubation über Nacht bewährt hat. Daraufhin erfolgten erneut drei Waschgänge in 1x TBS für je 5 min. Als Zweitantikörper wurde für die meisten Primärantikörper der *Goat Anti-Rabbit HRP-linked IgG*-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) verwendet. Für die Primärantikörper Anti-HIF-1 α (Abcam) und Anti-Smac/DIABLO (Cell Signaling Technology) war der *Anti-Mouse HRP-linked IgG*-Zweitantikörper (Cell Signaling Technology) notwendig.

Unmittelbar vor der Messung wurde das Substrat für die Meerrettich-Peroxidase (HRP) auf die Membranen aufgetragen und nach 10 min Inkubationszeit konnte die Messung starten.

Als Referenzgröße wurde das *Housekeeper*-Protein β -Aktin, in seltenen Fällen auch α -Tubulin oder GAPDH verwendet. Deren Antikörper wurden in einem Verhältnis von 1:3000 in 5 % BSA gelöst und auf der Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei Waschgänge, einmal in 0,1 % TBST und zweimal in 1x TBS. Da es sich bei β -Aktin und α -Tubulin um fluoreszierende Antikörper handelt, waren kein Zweitantikörper und kein Substrat nötig.

Die Darstellung und Messung der Proteinbanden erfolgte mit dem Chemilumineszenz- und Fluoreszenz-Imager ChemiDoc™ (Bio-Rad Laboratories) und der Software Image Lab 4.1.

2.2.6 Zellviabilitätsassays

2.2.6.1 MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein Test zur Messung der Zellviabilität, dem Anteil lebender, proliferierender Zellen einer Zellpopulation, welche indirekt über die Bestimmung

der Stoffwechselaktivität ermittelt wird [83]. Der gelbe und wasserlösliche Ausgangsfarbstoff MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), ein Tetrazolium-Salz, wird dabei abhängig von der metabolischen Aktivität zu Formazan reduziert. Formazan ist ein violetter Farbstoff, der in Form von Kristallen intrazellulär ausfällt [86]. Die Menge an entstandenem Formazan wird photometrisch anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt, die wiederum proportional zur Zellviabilität ist. Der MTT-Assay ist gut geeignet, um die Auswirkungen einer Noxe, in diesem Fall die Auswirkungen von Hypoxie und Reoxygenierung, in der Zellkultur zu untersuchen. Je geringer die Menge an Formazan nach einem Versuch im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, desto geringer ist die Zellviabilität, d. h. desto weniger stoffwechselaktive Zellen haben die Versuchsbedingungen überlebt.

Für die MTT-Stocklösung wurden 50 mg MTT in 10 ml DPBS aufgelöst, zu je 2 ml in getönte Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Um die Gebrauchslösung herzustellen, wurde die Stocklösung in einem Verhältnis von 1:10 mit dem jeweiligen Versuchsmedium zu einer endgültigen Konzentration von 0,5 mg/ml verdünnt. Die Aussaat der Zellen für die Versuchsreihe erfolgte am Vortag in 96-Well Platten. Für die Zellreihe der SH-SY5Y wurden 1×10^4 Zellen pro Well, für die Zellreihe der IMR-32 7×10^3 Zellen pro Well und für die Zellreihe der Neuro-2A 5×10^3 Zellen pro Well ausgesät. Nachdem die Zellen den jeweiligen Versuchsbedingungen ausgesetzt worden sind, wurde das Medium abpipettiert und mit je 200 μ l pro Well der MTT-Gebrauchslösung ersetzt. Es folgte die Inkubation für 2 h unter Lichtschutz. Anschließend wurde die Gebrauchslösung sorgfältig abgesaugt und 200 μ l Isopropanol je Well hinzugegeben. Durch Auf- und Abpipettieren sowie fünfminütiger Bewegung auf einem Platten-Schüttler, wurden die entstandenen Formazankristalle ins Isopropanol gelöst. Im letzten Schritt erfolgte die Absorptionsmessung nach 0,1 s bei einer Wellenlänge von 570 nm im *Plate Reader* (Perkin Elmer VICTOR X4).

2.2.6.2 WST-Assay

Die Durchführung des MTT-Assays an der Zelllinie IMR-32 gestaltete sich als herausfordernd, wobei sich im Wesentlichen zwei Probleme ergaben. Zum einen fielen nach Behandlung mit Isopropanol weiße Kristalle aus, die die photometrische Messung beeinflussten. Zum anderen verloren die Zellen nach Aufnahme des MTT-Farbstoffs ihre Adhärenz. Dies führte dazu, dass sie

zusammen mit ihrem Medium abpipettiert wurden, was zu einer geringeren photometrischen Messung und einer Verfälschung der Ergebnisse hätte führen können. Deswegen wurde ein anderer Zellviabilitätsassay für diese Zelllinie herangezogen, der WST-Assay. Der WST-Assay hat gegenüber dem MTT-Assay den Vorteil, dass der umgesetzte Farbstoff wasserlöslich ist und das Abpipettieren des Mediums vor der Messung entfällt.

Wie der MTT-Assay basiert der WST-Assay auf der stoffwechselabhängigen Reduktion eines Tetrazolium-Salzes, nämlich des WST (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) zu Formazan. Analog zum MTT-Assay ist die spektralphotometrisch gemessene Absorption bzw. Menge des umgesetzten Formazans proportional zur Zellviabilität. Die Aussaat der Zellen der Linie IMR-32 erfolgte am Vortag mit je 7×10^3 Zellen pro Well. Nach Exposition der Zellen zu den jeweiligen experimentellen Bedingungen wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und mit 50 μ l Versuchsmedium sowie 5 μ l WST-Reagenz pro Well befüllt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h konnte die Absorption direkt im *Plate Reader* bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch ermittelt werden. Da sich das Formazan extrazellulär im Medium löst, war kein Abpipettieren und keine Behandlung mit Isopropanol notwendig.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Daten erfolgte in Form von Säulendiagrammen. Abweichend davon wurden für die Absorption im MTT-Assay während der Reoxygenierungsphase Liniendiagramme verwendet (Abb. 19 u. 20). Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen bzw. Standardfehlern. Für die statistische Auswertung fand SigmaPlot 13.0 Anwendung. Zunächst wurde auf das Vorhandensein einer Normalverteilung mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests untersucht. Bei Normalverteilung wurden die Daten auf statistisch signifikante Unterschiede mittels t-Tests, bei fehlender Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U-Tests, geprüft. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5 % festgelegt ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (Normoxie *high* oder ohne rhEPO/cEPO-FC) wurden bei $p < 0,05$ mit einer Raute (#) und bei $p < 0,001$ mit zwei Rauten (##) gekennzeichnet. Konnten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden, wurden diese bei $p < 0,05$ mit einem Stern (*) und bei $p < 0,001$ mit zwei Sternen (**) markiert. Abweichend davon wurden

signifikante Unterschiede zur Kontrolle im MTT-Assay zur Bestimmung der Reoxygenierungszeit (Abb. 19 u. 20) mit einem bzw. zwei Sternchen (*/**) gekennzeichnet und signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe *high* und *low glucose* mit einer bzw. zwei Rauten (###/###) markiert. Die meisten Daten wurden ins Verhältnis zu Normoxie *high glucose* gesetzt und sind in dessen Relation dargestellt. Zur Veranschaulichung wurde eine Referenzlinie bei 1,0 hinzugefügt. Im Gegensatz dazu ist die Absorption im MTT-Assay in Abbildung 19 und 20 in absoluten Zahlen dargestellt und in Abbildung 35 und 36 ins Verhältnis zu ohne rhEPO/cEPO gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Sauerstoffkonzentration zur Hypoxieinduktion

Aufbauend auf dem Hypoxie- und Reoxygenierungsmodell von Timbul (2023) erfolgte die Hypoxieinduktion in einer Hypoxiebank, in welcher die Zellen in einem zuvor desoxygenierten Medium kultiviert wurden. Die von Timbul (2023) ermittelten Hypoxiezeiten der einzelnen Zelllinien wurden übernommen [75]. Für die Zelllinie Neuro-2A wurde eine Hypoxiezeit von 24 Stunden, für IMR-32 48 Stunden und für SH-SY5Y 72 Stunden festgelegt. Am Anfang der Versuchsreihe stand die Ermittlung der idealen Sauerstoffkonzentration, die sowohl einen nachweislichen hypoxischen Schaden verursacht als auch zur Apoptose der Zellen führt. Die untersuchten Sauerstoffkonzentrationen lagen bei 0,5, 2 und 5 %. Zusätzlich wurden die Zellen während der Hypoxiephase im Sinne des OGD-Modells unterschiedlichen Glukosekonzentrationen ausgesetzt und in die Gruppen *high glucose* (2 bzw. 4,5 g/l), *low glucose* (1 g/l) und *no glucose* (0 g/l) unterteilt. Für die Gruppe *high glucose* erhielten Zellen der Linie Neuro-2A 4,5 g/l Glukose und Zellen der Linien IMR-32 und SH-SY5Y 2 g/l. Diese Konzentrationen entsprachen denen für die reguläre Zellkultur der jeweiligen Zelllinie. Zur Bestimmung der idealen Sauerstoffkonzentration im Sinne des Modells wurden Zellviabilitätsassays durchgeführt und die Expression von HIF-1 α und Caspase 3 mittels Westernblot bestimmt. Im Anschluss wurden Expressionsprofile unterschiedlicher pro- und antiapoptotischer Proteine für die drei Zelllinien nach Hypoxieexposition zu 2 % Sauerstoff angefertigt.

3.1.1 Zellviabilitätsassays

Um den Einfluss der unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen während der Hypoxiephase auf die Zellviabilität der drei Zelllinien zu untersuchen, wurde zunächst der MTT-Assay durchgeführt. Die Versuche wurden zu den drei beschriebenen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt und die Zellviabilität miteinander verglichen. Es erfolgte zudem die Inkubation mit drei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (*high*, *low* und *no glucose*). Die Absorption nach Hypoxieinkubation mit den unterschiedlichen Sauerstoff- und Glukosekonzentrationen wurde ins Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *glucose high*) gesetzt.

Der MTT-Assay wurde zunächst für alle drei Zelllinien durchgeführt. Die Versuche mit der Zelllinie IMR-32 verliefen allerdings aus zwei Gründen mehrfach frustant. Zum einen handelt es sich bei der besagten Zelllinie um semiadhärent wachsende Zellen. Für die Ausführung des MTT-Assays ist das Abpipettieren des mit dem Farbstoff inkubierten Mediums notwendig. Nach Aufnahme des MTT lösten sich die Zellen vom Boden und wurden zusammen mit ihrem Medium abpipettiert. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass stoffwechselaktive, den Farbstoff umsetzende Zellen dem Versuch auf diese Weise abhandengekommen sind und die gemessene Zellviabilität falsch niedrig war. Zum anderen fielen nach Behandlung mit Isopropanol weiße Kristalle aus, welche die Absorptionsmessung verfälschen könnten. Ob dies an der aminosäuren- bzw. proteinreichen Zusammensetzung des Nährmediums lag, bleibt eine Spekulation. Als Alternative zum MTT-Assay wurde der WST-Assay durchgeführt. Dieser wurde allein für die Hypoxieexposition zu einer Sauerstoffkonzentration von 2 % für die Zelllinie IMR-32 durchgeführt.

Bei den Zellviabilitätsassays handelt es sich beim Stichprobenumfang (n) um technische Replikate, die Anzahl biologischer Replikate ist der jeweiligen Legende zu entnehmen. Die technischen Replikate wurden den jeweiligen Bedingungen in individuellen Kulturen der 96-Well-Platten ausgesetzt. Sie wurden zur selben Zeit den jeweils gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt und beinhalten Zellen derselben Passagierung. Bei biologischen Replikaten handelt es sich um zeitlich unabhängig voneinander generierte Proben, welche sich zudem in den Passagierungen unterscheiden können.

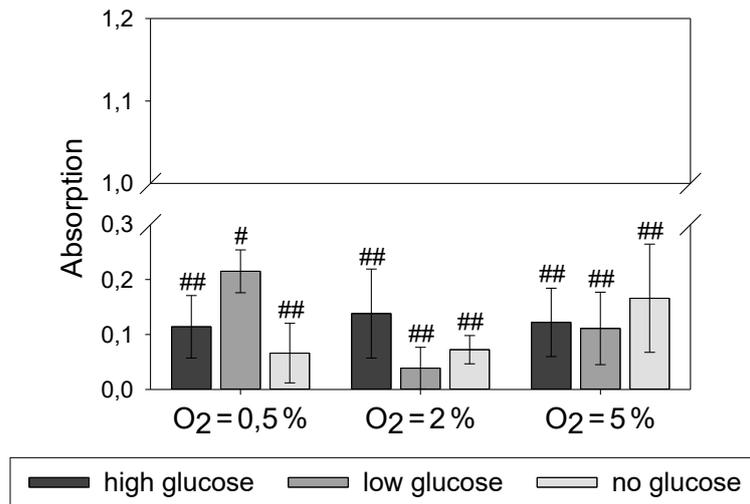


Abb. 3: Absorption im MTT-Assay nach Hypoxie zu unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen in Neuro-2A

Relative Absorption im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) nach 24 h Hypoxie im MTT-Viabilitätsassay bei einer Wellenlänge von 570 nm nach 0,1 s. Absorption dargestellt nach Inkubation mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (0,5, 2 und 5 %) und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5, 1 und 0 g/l). Darstellung der Mittelwerte und der jeweiligen Standardabweichungen. n = 24 (aus je einem biologischen Replikat), # / ## = signifikanter Unterschied zur Kontrolle p < 0,05 / p < 0,001. Abkürzungen: O₂ = Sauerstoff

In Abbildung 3 ist die relative Zellviabilität, gemessen anhand der Absorption im MTT-Assay, der Zelllinie Neuro-2A nach Hypoxieexposition zu den drei unterschiedlichen Sauerstoff- (0,5, 2 und 5 %) und Glukosekonzentrationen dargestellt. Sie ist ins Verhältnis zur normoxischen Kontrolle gesetzt, welche als horizontale Referenzlinie bei 1,0 dargestellt ist. Die Zellviabilität ist zu jeder untersuchten Sauerstoff- und Glukosekonzentration signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe Normoxie *high glucose*. Sie beträgt anhand der Mittelwerte nur das 0,04- bis 0,2-fache der Kontrollgruppe und ist bei einer Sauerstoffkonzentration von 5 % nicht höher als bei 0,5 oder 2 %. Innerhalb einer untersuchten Sauerstoffkonzentrationen lassen sich zudem keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Glukosekonzentrationen feststellen.

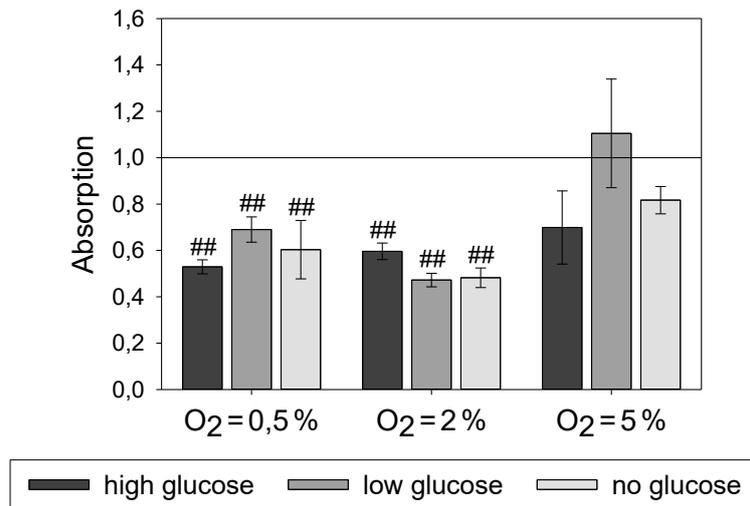


Abb. 4: Absorption im MTT-Assay nach Hypoxie zu unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen in SH-SY5Y

Relative Absorption im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) nach 72 h Hypoxie im MTT-Viabilitätsassay bei einer Wellenlänge von 570 nm nach 0,1 s. Absorption dargestellt nach Inkubation mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (0,5, 2 und 5 %) und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2, 1 und 0 g/l). Darstellung der Mittelwerte und der jeweiligen Standardabweichungen. n = 24 (aus je einem biologischen Replikat), ## = signifikanter Unterschied zur Kontrolle p < 0,001. Abkürzungen: O₂ = Sauerstoff

Im Gegensatz zur Zelllinie Neuro-2A ist die Zellviabilität von SH-SY5Y nur nach Exposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 0,5 und 2 % signifikant niedriger als in der normoxischen Kontrolle, wie in Abbildung 4 zu sehen ist. Dies betrifft alle untersuchten Glukosekonzentrationen. Nach Hypoxie mit einer Sauerstoffkonzentration von 5 % lässt sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle feststellen, unabhängig von der verwendeten Glukosekonzentration. Die Zellviabilität bei 0,5 % Sauerstoff ist nicht niedriger als bei 2 %. Hinsichtlich der Zellviabilität lässt sich innerhalb einer untersuchten Sauerstoffkonzentration kein signifikanter Unterschied zwischen den verwendeten Glucosekonzentrationen feststellen.

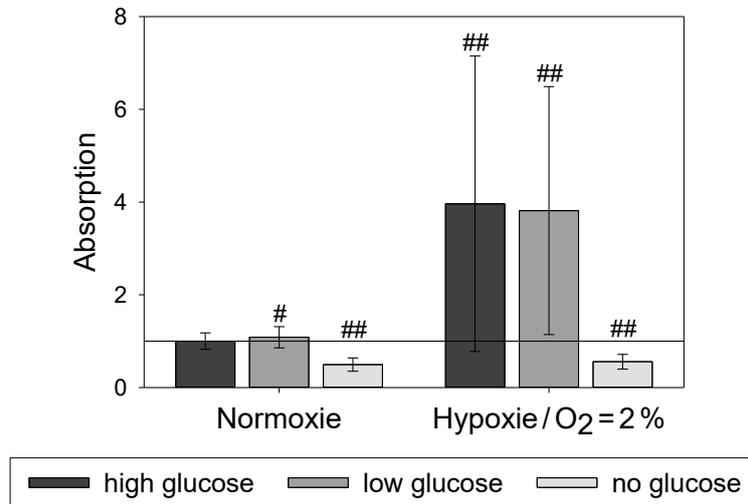


Abb. 5: Absorption im WST-Assay nach Normoxie und Hypoxie in IMR-32

Relative Absorption im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) im WST-Viabilitätsassay bei einer Wellenlänge von 450 nm nach 48 h Normoxie und nach 48 h Hypoxie bei einer Sauerstoffkonzentration von 2 %. Absorption dargestellt nach Inkubation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2, 1 und 0 g/l). Darstellung der Mittelwerte und der jeweiligen Standardabweichungen. *no glucose*: n = 24 (aus einem biologischen Replikat), *high* u. *low glucose*: n = 48 (aus je 3 biologischen Replikaten), # / ## = signifikanter Unterschied zur Kontrolle p < 0,05 / p < 0,001. Abkürzungen: O₂ = Sauerstoff

Während die Absorption im MTT-Assay der Zelllinien Neuro-2A und SH-SY5Y nach Exposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % niedriger ist als nach Normoxie (*high glucose*), ist in Abbildung 5 zu erkennen, dass die Absorption von IMR-32 im WST-Assay nach Hypoxie um ein Vielfaches höher ist als in der Kontrolle, zumindest für die Gruppen *high* und *low glucose*. Würde in diesem Fall die Absorption mit der Zellviabilität gleichgesetzt werden, hieße das, dass nach Hypoxie zu einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und einer hohen bzw. niedrigen Glukosekonzentration der Anteil lebender, stoffwechselaktiver Zellen höher ist als unter normoxischen Standardbedingungen ohne Stressreiz. Die Gruppe, die ohne Glukose kultiviert wurde, weist sowohl nach Hypoxie als auch nach Normoxie eine signifikant erniedrigte Absorption auf als die Kontrollgruppe (Normoxie *high glucose*). Warum der WST-Assay kein geeignetes Testverfahren zur Untersuchung von hypoxischen Schäden darstellt, wird in der Diskussion erörtert. Im Weiteren wurde der WST-Assay von den Folgeversuchen ausgeschlossen.

3.1.2 Expression von HIF-1 α und Caspase 3

Zur weiteren Untersuchung der Auswirkungen von unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen während der Hypoxiephase wurde die Expression unterschiedlicher Proteine mittels Westernblot bestimmt. Analog zum MTT-Assay wurden die zuvor von Timbul (2023) ermittelten Hypoxiezeiten übernommen, die drei Zelllinien Sauerstoffkonzentrationen von 0,5, 2 und 5 % zu den unterschiedlichen Glucosekonzentrationen (*high*, *low* und *no glucose*) exponiert und Proteinextrakte gewonnen. Zunächst wurden die Expressionen von HIF-1 α und Caspase 3 untersucht. HIF-1 α fungierte dabei als Hypoxiemarker, Caspase 3 als Apoptosenachweis. Für die Analyse der Westernblots wurde die Software *Image Lab* verwendet und die Menge an detektierbaren Proteinen mithilfe der *Housekeeping*-Proteine β -Aktin und α -Tubulin normiert. Anschließend wurde die Proteinexpression ins Verhältnis zur Kontrollgruppe Normoxie *high glucose* gesetzt.

Beim Stichprobenumfang (n) der Westernblots handelt es sich um biologische Replikate. Dies bedeutet, dass die gemessenen Proteinexpressionen jeweils aus Proteinextrakte individueller Zellproben gewonnen wurden. Diese Proben waren den jeweiligen Versuchsbedingungen unabhängig voneinander ausgesetzt und befanden sich z. B. nicht zwangsläufig in der gleichen Passagierung.

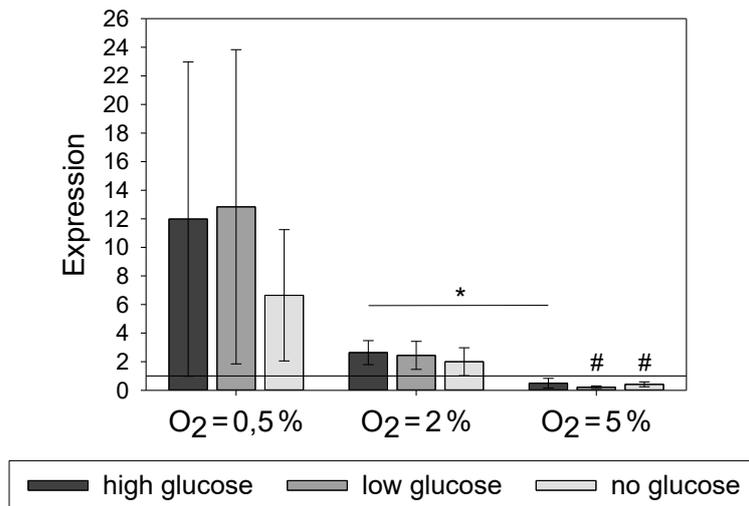


Abb. 6: HIF-1 α -Expression nach Hypoxie mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen in Neuro-2A

Relative Expression im Westernblot von HIF-1 α im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) in Neuro-2A nach 24 h Hypoxie zu Sauerstoffkonzentrationen von 0,5, 2 und 5 % und Inkubation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5, 1 und 0 g/l). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3, # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle p < 0,05, * = signifikanter Unterschied zueinander p < 0,05.

Abkürzungen: HIF-1 α = Hypoxie-induzierter Faktor-1 α , O₂ = Sauerstoff

Blickt man auf die HIF-1 α -Expression der Zelllinie Neuro-2A, dargestellt in Abbildung 6, ist diese nach Hypoxie mit einer Sauerstoffkonzentration von 0,5 % für alle untersuchten Glukosekonzentrationen im Mittel höher als in der Kontrollgruppe (Normoxie *high glucose*), allerdings mit einer breiten Streuung der Daten und ohne Signifikanz. Die Mittelwerte der Expression von HIF-1 α nach Inkubation mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % liegen zwar oberhalb des Referenzniveaus aber ebenfalls ohne Signifikanz. Indes ist die Expression bei einer Sauerstoffkonzentration von 5 % nicht nur nicht erhöht, sondern für die Gruppen *low glucose* und *no glucose* sogar signifikant niedriger als zur gewohnten Sauerstoffkonzentration von ca. 21 %. Außerdem ist eine erhöhte Expression von HIF-1 α nach Hypoxie zu einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und hohen Glukosekonzentration höher als in der gleichen Gruppe nach Hypoxie bei 5 % Sauerstoff. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Glukosekonzentrationen sind nicht detektierbar.

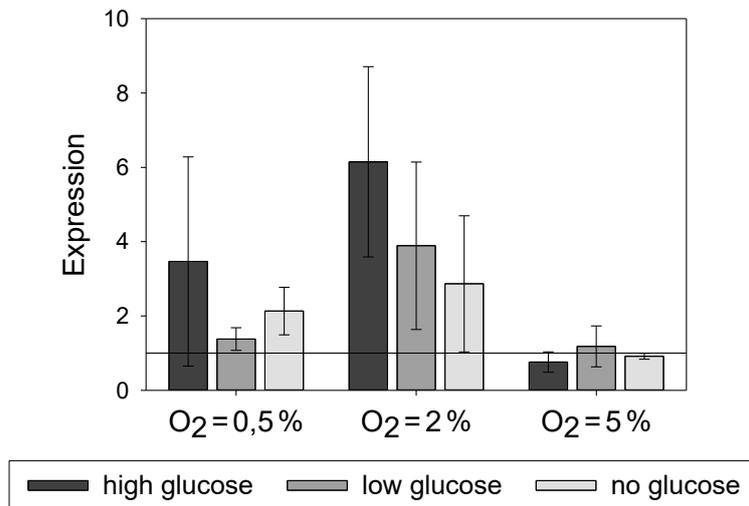


Abb. 7: Caspase 3-Expression nach Hypoxie mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen in Neuro-2A

Relative Expression im Westernblot von Caspase 3 im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) in Neuro-2A nach 24 h Hypoxie zu Sauerstoffkonzentrationen von 0,5, 2 und 5 % und Inkubation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5, 1 und 0 g/l). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3 bis auf O₂ = 5 %: n = 2. Keine signifikanten Unterschiede der Caspase 3-Expression im Verhältnis zur Kontrolle oder untereinander.

Abkürzung: O₂ = Sauerstoff

Ähnlich verhält es sich bei der Betrachtung der Expression des proapoptotischen Proteins Caspase 3 derselben Zelllinie in Abbildung 7. Die Mittelwerte der Caspase 3-Expression liegen nach Hypoxie mit 0,5 und 2 % über der Referenz (Normoxie *high glucose*), wobei sie bei 2 % Sauerstoff etwas höher als bei 0,5 % sind. Auch hier sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant und könnten dem reinen Zufall unterliegen. Nach Inkubation mit einer Sauerstoffkonzentration von 5 % ist keine Erhöhung der Caspase 3-Expression detektierbar. Außerdem unterscheiden sich die Caspase 3-Expressionen zwischen den Gruppen *high*, *low* und *no glucose* nicht untereinander.

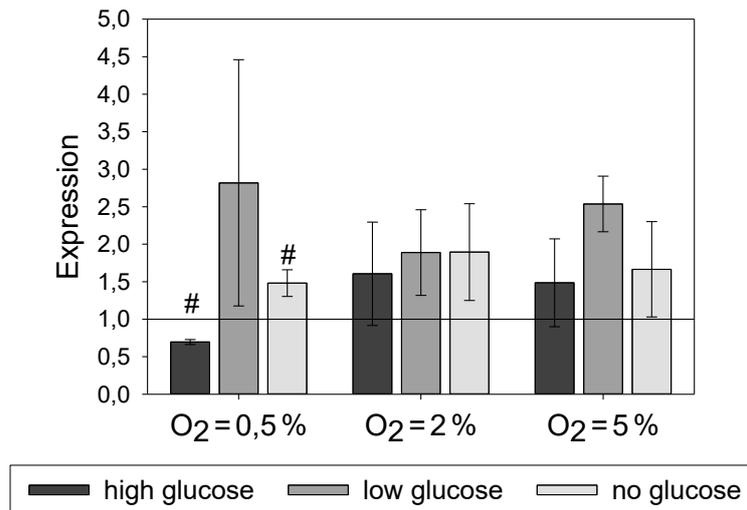


Abb. 8: HIF-1 α -Expression nach Hypoxie mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen in SH-SY5Y

Relative Expression im Westernblot von HIF-1 α im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) in SH-SY5Y nach 72 h Hypoxie zu Sauerstoffkonzentrationen von 0,5, 2 und 5 % und Inkubation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2, 1 und 0 g/l). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3 bis auf O₂ = 5 %: n = 2 und O₂ = 2 % *no glucose*: n = 2, # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle p < 0,05.

Abkürzungen: HIF-1 α = Hypoxie-induzierter Faktor-1 α , O₂ = Sauerstoff

Betrachtet man in Abbildung 8 die HIF-1 α -Expression der Zelllinie SH-SY5Y nach Exposition mit unterschiedlichen Sauerstoff- und Glukosekonzentrationen während der Hypoxiephase, fällt keine wesentliche Erhöhung im Vergleich mit der normoxischen Kontrolle auf. Zwar ist die Expression bei 0,5 % Sauerstoff in der Gruppe *no glucose* signifikant erhöht, allerdings nicht einmal um das 1,5-Fache. In der Gruppe *high glucose* bei derselben Sauerstoffkonzentration lag die HIF-1 α -Expression sogar signifikant niedriger als bei der Kontrolle. Signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Glukosekonzentrationen sind nicht nachzuweisen.

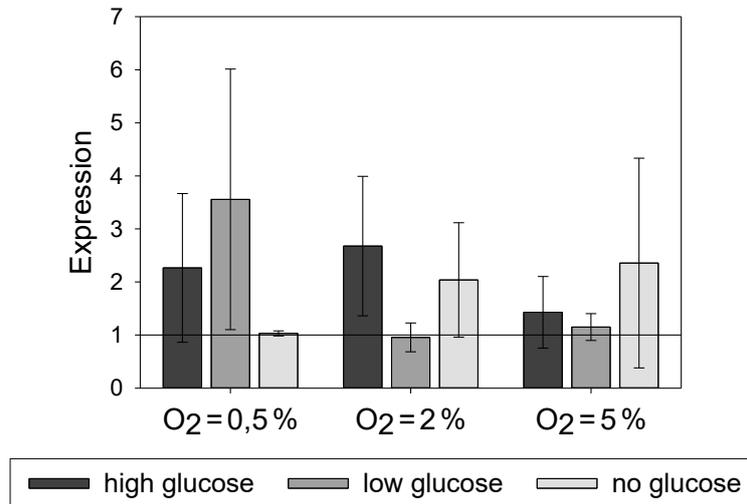


Abb. 9: Caspase 3-Expression nach Hypoxie mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen in SH-SY5Y

Relative Expression im Westernblot von Caspase 3 im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) in SH-SY5Y nach 72 h Hypoxie zu Sauerstoffkonzentrationen von 0,5, 2 und 5 % und Inkubation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2, 1 und 0 g/l). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3 bis auf O₂ = 5 %: n = 2, Keine signifikanten Unterschiede der Caspase 3-Expression im Verhältnis zur Kontrolle oder untereinander.

Abkürzung: O₂ = Sauerstoff

Für die Expression der Caspase 3 in SH-SY5Y konnte keine statistisch signifikante Erhöhung des proapoptischen Proteins zu den untersuchten Sauerstoff- und Glukosekonzentrationen nach Hypoxie festgestellt werden (Abb. 9). Den höchsten Mittelwert im Verhältnis zur Kontrolle erreichte die Gruppe *low glucose* bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,5 %, allerdings mit einer breiten Streuung und ohne Signifikanz. Auch hier ist hinsichtlich der Caspase 3-Expression kein Unterschied zwischen den verwendeten Glukosekonzentrationen feststellbar.

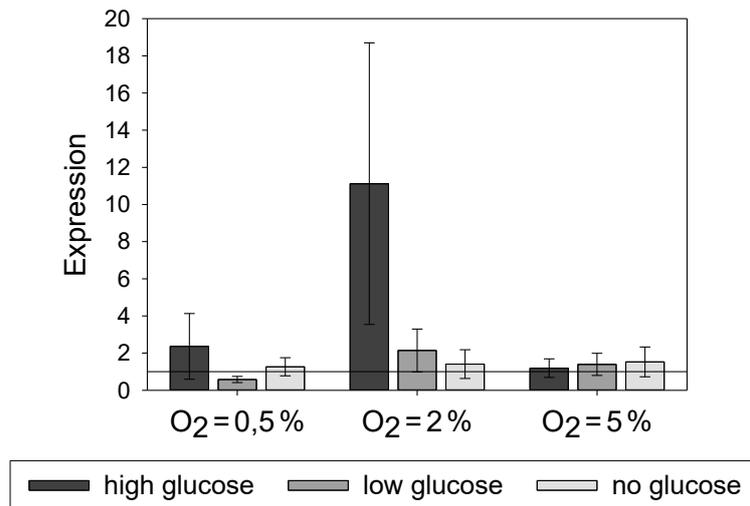


Abb. 10: HIF-1 α -Expression nach Hypoxie mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen in IMR-32

Relative Expression im Westernblot von HIF-1 α im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) in IMR-32 nach 48 h Hypoxie zu Sauerstoffkonzentrationen von 0,5, 2 und 5 % und Inkubation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2, 1 und 0 g/l). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3 bis auf O₂ = 2 % *no glucose*: n = 2. Keine signifikanten Unterschiede der HIF-1 α -Expression im Verhältnis zur Kontrolle oder untereinander.

Abkürzungen: HIF-1 α = Hypoxie-induzierter Faktor-1 α , O₂ = Sauerstoff

Wie in Abbildung 10 dargestellt, konnte auch für die Zelllinie IMR-32 keine signifikant gesteigerte HIF-1 α -Expression nach Hypoxieexposition mit den drei untersuchten Sauerstoffkonzentrationen verzeichnet werden. Den höchsten Mittelwert erreicht die Gruppe *high glucose* nach Hypoxie mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 %, allerdings mit einer breiten Streuung der Werte und ohne statistische Relevanz. Die Mittelwerte der Gruppe *high glucose* liegen nach Inkubation mit 0,5 % und 2 % Sauerstoff über denen der anderen Glucosekonzentrationen, allerdings ist auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied zu finden.

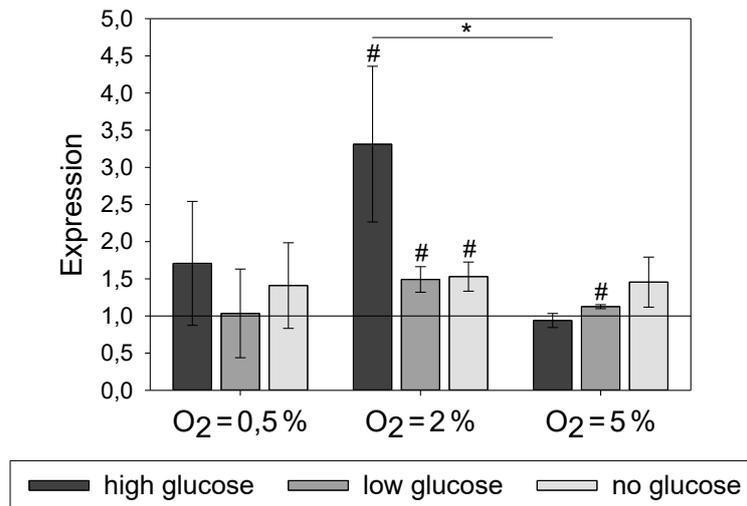


Abb. 11: Caspase 3-Expression nach Hypoxie mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen in IMR-32

Relative Expression im Westernblot von Caspase 3 im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) in IMR-23 nach 48 h Hypoxie zu Sauerstoffkonzentrationen von 0,5, 2 und 5 % und Inkubation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2, 1 und 0 g/l). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3 bis auf O₂ = 2 % *no glucose*: n = 2, # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle p < 0,05, * = signifikanter Unterschied zueinander p < 0,05. Abkürzung: O₂ = Sauerstoff

Im Gegensatz dazu liegen signifikante Expressionssteigerungen der Caspase 3 nach Hypoxieexposition der Zelllinie IMR-32 vor, wie in Abbildung 11 erkennbar. Nach Hypoxie mit 2 % Sauerstoff ist die Expression des proapoptotischen Proteins für jede untersuchte Glukosekonzentration signifikant höher als in der normoxischen Kontrolle. Der größte Unterschied konnte dabei in der Gruppe *high glucose* festgestellt werden. Für die Gruppen *low* und *no glucose* beträgt der Mittelwert lediglich ca. das 1,5-Fache der Kontrolle. Auch nach Inkubation mit 5 % Sauerstoff und niedriger Glukosekonzentration liegt eine statistisch signifikante, minimal erhöhte Expression vor. Im direkten Vergleich der Sauerstoffkonzentrationen liegt eine signifikant höhere Caspase 3-Expression nach Hypoxie mit 2 % Sauerstoff als mit 5 % in der Gruppe *high glucose* vor. Zwischen den Glukosekonzentrationen innerhalb einer verwendeten Sauerstoffkonzentration gibt es hinsichtlich der Caspase 3-Expression keine statistisch relevanten Unterschiede.

Zusammenfassend ist für die Zelllinie Neuro-2A nach Hypoxieexposition mit 0,5 % Sauerstoff im Mittel die HIF-1 α -Expression und mit 2 % die Caspase 3-Expression am höchsten, allerdings ohne statistische Signifikanz. Für den Zelltyp SH-SY5Y lässt sich für die Gruppe *no glucose* eine signifikant gesteigerte HIF-1 α -

Expression bei 0,5 % feststellen, allerdings eine erniedrigte bei der Gruppe *high glucose*. Die durchschnittlich höchste, aber nicht signifikant gesteigerte HIF-1 α -Expression erreichten IMR-32-Zellen bei 2 % Sauerstoff und einer hohen Glukosekonzentration. Die Caspase 3-Expression war bei jenem Zelltyp bei einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und jeder Glukosekonzentration signifikant erhöht. Da in Zusammenschau der MTT-Assays und der Expressionen von HIF-1 α und Caspase 3 die i.S. des Modells bestmöglichen Ergebnisse unter Verwendung einer Sauerstoffkonzentration von 2 % zu verzeichnen waren, wurde sich für diese Sauerstoffkonzentration für die Durchführung der Folgeversuche entschieden. Außerdem erfolgte der Ausschluss der Gruppe *no glucose* von den weiteren Hypoxieversuchen, da aufgrund von starkem Zellverlust kaum Proteinextrakte für die Durchführung der Westernblots zur Verfügung standen und die Verwendung eines glukosefreien Mediums unter Hypoxie keine Vorteile i. S. des Modells brachte.

3.1.3 Expressionsprofile bei 2 % Sauerstoff

Nach Festlegung der Sauerstoffkonzentration auf 2 % und Ausschluss der Gruppe *no glucose* wurden für die einzelnen Zelllinien Expressionsprofile von pro- und antiapoptotischen Proteinen erstellt. Dies sollte genauere Einblicke in die zellulären, apoptotischen Vorgänge während der Hypoxiephase geben, gleichzeitig wurde nach Möglichkeit der Stichprobenumfang (n) erhöht. Untersucht wurden die Proteine AMPK β 1, Bcl-2, Caspase 3, Caspase 9, *Cleaved* Caspase 3, *Cleaved* Caspase 9, HIF-1 α und Smac/DIABLO. Nicht alle dieser Proteine ließen sich bei jeder Zelllinie ausreichend detektieren, weswegen beispielsweise die proapoptotischen Proteine *Cleaved* Caspase 3 und 9 für den Zelltyp IMR-32 ausgeschlossen wurden. Dies ist zudem der Grund für die unterschiedlich hohen n-Werte der einzelnen Proteine. Die Hypoxiezeiten stimmten mit denen der vorherigen Versuche überein so wie die verwendeten Glukosekonzentrationen für die Gruppen *high* und *low glucose*.

Wenn nicht anders vermerkt, handelt es sich bei der Probenanzahl (n) um biologische Replikate, die aus individuellen Proben generiert wurden. Liegt die Probenanzahl über der Anzahl biologischer Replikate, bedeutet dies, dass aus einer biologischen Probe, in dem Fall einem Proteinextrakt, die Expression eines Proteins mehrmals im Westernblot bestimmt wurde.

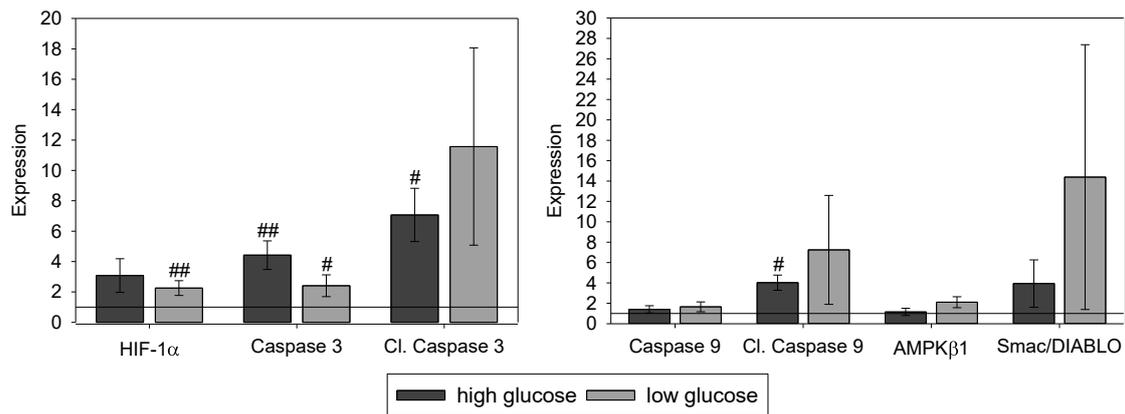


Abb. 12: Expressionsprofil unterschiedlicher Proteine nach Hypoxie mit 2 % Sauerstoff in Neuro-2A

Relative Expression im Westernblot von HIF-1 α und Caspase 3 (n = 10 aus 9 biologischen Replikaten), *Cleaved* Caspase 3 (n = 3), Caspase 9 (n = 7), *Cleaved* Caspase 9 (n = 4), AMPK β 1 (n = 4) und Smac/DIABLO (n = 3) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) in Neuro-2A nach 24 h Hypoxie zu unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 und 1 g/l). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, # / ## = signifikanter Unterschied zur Kontrolle p < 0,05 / p < 0,001.

Abkürzungen: AMPK β 1 = AMP-aktivierte Proteinkinase β 1, Cl. Caspase = *Cleaved* Caspase, HIF-1 α = Hypoxie-induzierter Faktor-1 α , O₂ = Sauerstoff, Smac/DIABLO = *second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low isoelectric point*

In Abbildung 12 ist die Expression von proapoptischen Proteinen, HIF-1 α und AMPK β 1 in Neuro-2A nach 24 Stunden Hypoxie bei einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und Inkubation mit einer hohen (4,5 g/l) sowie niedrigen (1 g/l) Glukosekonzentration im Verhältnis zur normoxischen Kontrolle dargestellt. Zu sehen ist eine signifikante Expressionssteigerung von HIF-1 α bei der Gruppe *low glucose*. Auch für die Gruppe *high glucose* liegt der Mittelwert oberhalb der Referenz, allerdings nicht statistisch signifikant. Zudem liegt eine signifikant erhöhte Expression der Caspase 3 für beide Glukosekonzentrationen sowie für die *Cleaved* Caspasen 3 und 9 nach Inkubation mit einer hohen Glukosekonzentration vor. Die Expressionsmittelwerte der *Cleaved* Caspasen der Gruppe *low glucose* liegen ebenfalls über der Kontrollgruppe bei fehlender statistischer Signifikanz. Gleichermäßen verhält es sich mit der Expression von Smac/DIABLO. Eine Expressionssteigerung von Caspase 9 und AMPK β 1 ist unabhängig von der verwendeten Glukosekonzentration nicht zu verzeichnen. Insgesamt sind keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Glukosekonzentrationen zu erkennen.

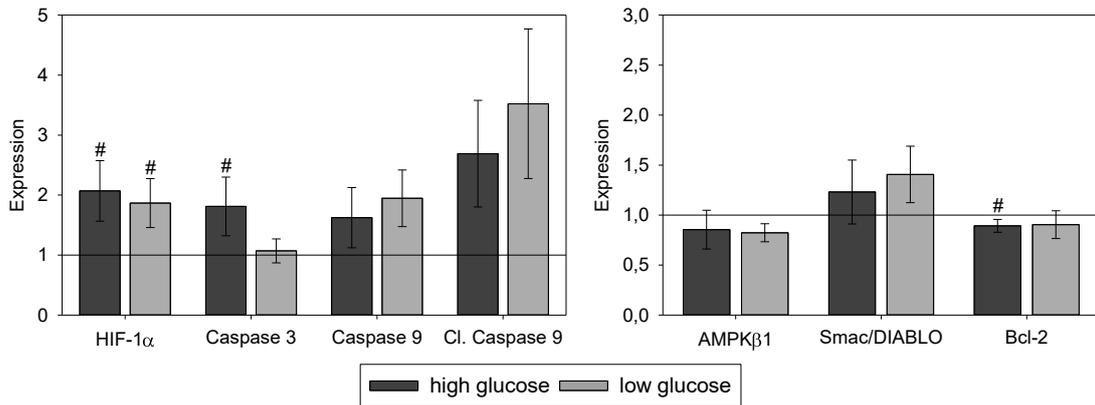


Abb. 13: Expressionsprofil unterschiedlicher Proteine nach Hypoxie mit 2 % Sauerstoff in SH-SY5Y

Relative Expression im Westernblot von HIF-1 α und Caspase 3 (n = 11 aus 9 biologischen Replikaten), Caspase 9 (n = 8), *Cleaved* Caspase 9 (n = 3), AMPK β 1 (n = 5 aus 4 biologischen Replikaten), Smac/DIABLO (n = 7 aus 6 biologischen Replikaten) und Bcl-2 (n = 7 aus 4 biologischen Replikaten) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) in SH-SY5Y nach 72 h Hypoxie zu unterschiedlichen Glucosekonzentrationen (2 und 1 g/l). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle p < 0,05.

Abkürzungen: AMPK β 1 = AMP-aktivierte Proteinkinase β 1, Bcl-2 = *B-cell lymphoma 2*, Cl. Caspase = *Cleaved* Caspase, HIF-1 α = Hypoxie-induzierter Faktor-1 α , O₂ = Sauerstoff, Smac/DIABLO = *second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low isoelectric point*

Betrachtet man das Expressionsprofil der Zelllinie SH-SY5Y nach 72 Stunden Hypoxie zu einer Sauerstoffkonzentration von 2 % in Abbildung 13, fällt eine signifikante Expressionssteigerung von HIF-1 α unter Exposition mit einer hohen (2 g/l) und niedrigen (1 g/l) Glukosekonzentration im Verhältnis zur Kontrollgruppe (Normoxie *high glucose*) auf. Ebenfalls liegen eine signifikant erhöhte Expression von Caspase 3 sowie eine signifikant erniedrigte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in der Gruppe *high glucose* vor. Allerdings weicht letztere nur leicht von der Referenz ab. Die Expressionsmittelwerte der Caspase 9 und *Cleaved* Caspase 9 liegen oberhalb des Niveaus der Kontrollgruppe, der Unterschied ist aber nicht signifikant. Auch zwischen den Gruppen *high* und *low glucose* ist keine relevante Differenz der Proteinexpressionen in der Zelllinie SH-SY5Y zu verzeichnen.

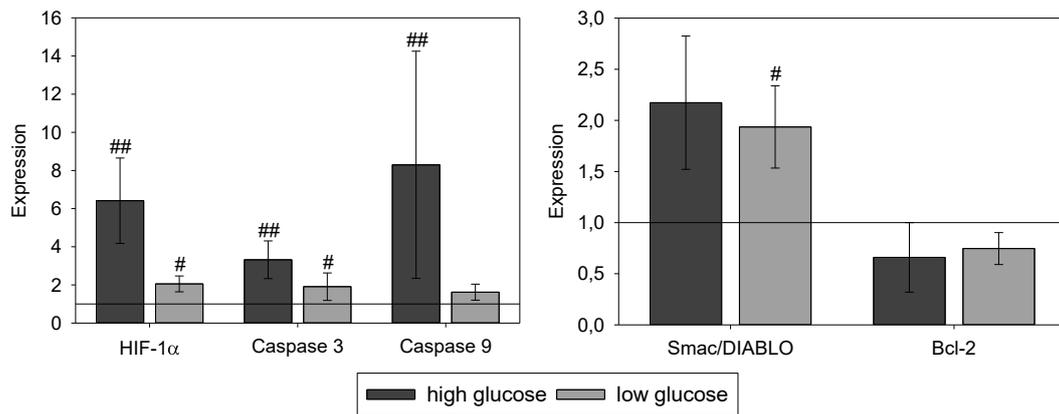


Abb. 14: Expressionsprofil unterschiedlicher Proteine nach Hypoxie mit 2 % Sauerstoff in IMR-32

Relative Expression im Westernblot von HIF-1α (*high glucose*: n = 11 und *low glucose*: n = 12 aus je 9 biologischen Replikaten), Caspase 3 (*high glucose*: n = 9 und *low glucose*: n = 10 aus je 9 biologischen Replikaten), Caspase 9 (*high glucose*: n = 7 und *low glucose*: n = 8), Smac/DIABLO (*high glucose*: n = 5 und *low glucose*: n = 6) und Bcl-2 (*high glucose*: n = 6 aus 5 biologischen Replikaten und *low glucose*: n = 8 aus 6 biologischen Replikaten) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) in IMR-32 nach 48 h Hypoxie zu unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, # / ## = signifikanter Unterschied zur Kontrolle p < 0,05 / p < 0,001.

Abkürzungen: Bcl-2 = *B-cell lymphoma 2*, HIF-1α = Hypoxie-induzierter Faktor-1α, O₂ = Sauerstoff, Smac/DIABLO = *second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low isoelectric point*

Abbildung 14 zeigt das entsprechende Expressionsprofil des Zelltyps IMR-32. Zu erkennen ist eine signifikante Expressionssteigerung von HIF-1α und Caspase 3 nach 48 Stunden Hypoxie mit einer hohen und niedrigen Glukosekonzentration. Auch die Caspase 9-Expression unter Verwendung einer hohen Glukosekonzentration ist im Verhältnis zur normoxischen Kontrolle erhöht, ebenso die Expression von Smac/DIABLO der Gruppe *low glucose*. Die Mittelwerte für das antiapoptotische Protein Bcl-2 liegen zwar leicht unterhalb der Referenz, eine signifikante Abweichung ist jedoch nicht vorhanden. Wie bei den Zelllinien Neuro-2A und SH-SY5Y liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Glukosekonzentrationen vor. Dennoch ist zu erwähnen, dass die Mittelwerte aller proapoptotischen Proteine und HIF-1α der Gruppe *high glucose* über denen der Gruppe *low glucose* liegen.

Resümierend ist in allen drei untersuchten Zelllinien zumindest zu einer der beiden untersuchten Glukosekonzentrationen eine Expressionssteigerung von HIF-1α und Caspase 3 nachzuweisen. Zusätzlich dazu liegt eine erhöhte Expression von *Cleaved* Caspase 3 und 9 in der Zelllinie Neuro-2A in der Gruppe *high glucose*, eine erniedrigte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in SH-SY5Y der Gruppe *high glucose* und eine erhöhte Expression von Caspase 9 in der Zelllinie

IMR-32 der Gruppe *high glucose* sowie von Smac/DIABLO der Gruppe *low glucose* vor.

3.2 Glukosemangel unter normoxischen Bedingungen

Um die Auswirkungen eines isolierten Glukosemangels näher zu untersuchen, wurden die Zellviabilitätsassays (MTT- und WST-Assay) und die Expressionsbestimmung von HIF-1 α und Caspase 3 via Westernblot analog zu den Hypoxieversuchen unter normoxischen Bedingungen durchgeführt. Um einen optischen Eindruck zu gewinnen, wurden zudem lichtmikroskopische Aufnahmen gefertigt. Für die Normoxie fanden dieselben Zeiten wie für die Hypoxie Anwendung, sprich 24 Stunden für die Zelllinie Neuro-2A, 72 Stunden für SH-SY5Y und 48 Stunden für IMR-32. Es erfolgte die Inkubation mit Nährmedien unterschiedlicher Glukosekonzentrationen. Die Gruppe *high glucose* erhielt ihre für die reguläre Zellkultur gängige Glukosekonzentration (4,5 g/l für Neuro-2A, 2 g/l für SH-SY5Y und IMR-32), die Gruppe *low glucose* eine herabgesetzte Glukosekonzentration von 1 g/l und die Gruppe *no glucose* wurde für die Versuchszeit einem glukosefreien Medium exponiert. Für die Zeit der Normoxie wurden die Zellen mit entsprechendem Medium im Brutschrank bei einem CO₂-Anteil von 5 % und 95 % atmosphärischer Luft kultiviert.

Beim Stichprobenumfang (n) handelt es sich bei den Zellviabilitätsassays um technische und bei den Proteinexpressionen um biologische Replikate (s. S. 40 u. S 44).



Abb. 15: Lichtmikroskopische Aufnahmen von IMR-32 nach 48 h Normoxie zu unterschiedlichen Glukosekonzentrationen

Lichtmikroskopische Bilder von IMR-32 in 10-facher Vergrößerung nach Inkubation mit 2 g/l (*high glucose*), 1 g/l (*low glucose*) und 0 g/l (*no glucose*) für 48 h unter normoxischen Bedingungen. Anpassung von Helligkeit, Kontrast und Sättigung erfolgt mit IrfanView 4.52.

In Abbildung 15 sind Aufnahmen der Zelllinie IMR-32 nach Exposition mit den unterschiedlichen Glukosekonzentrationen für 48 Stunden unter normoxischen Bedingungen zu sehen. Während nach Kultivierung mit einer hohen und niedrigen Glukosekonzentration ein annähernd gleichmäßiger Zellrasen zu erkennen ist, wirken die Zellen unter absolutem Glukosemangel endrundet und verklumpt, was auf eine Stressreaktion und Zellsterben deutet.

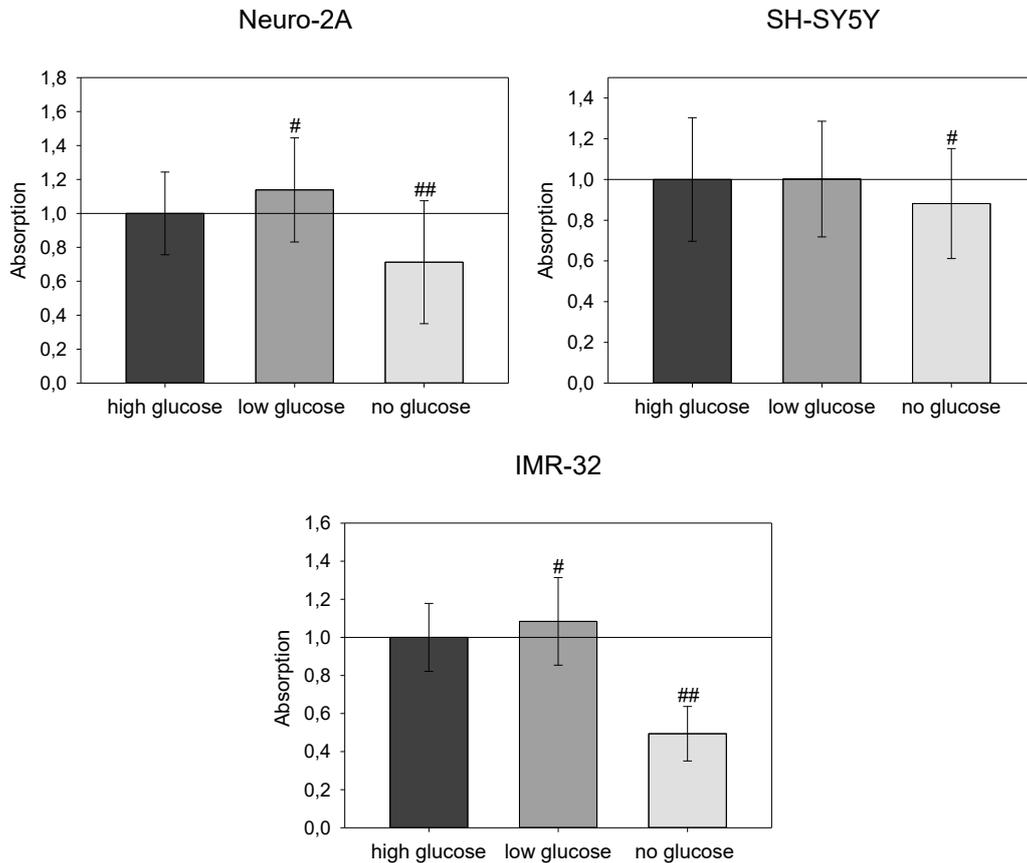


Abb. 16: Absorption in Zellviabilitätsassays zu unterschiedlichen Glukosekonzentrationen unter normoxischen Bedingungen

Relative Absorption im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) nach 24 h (Neuro-2A) bzw. 72 h (SH-SY5Y) Normoxie im MTT-Assay bei einer Wellenlänge von 570 nm und nach 48 h Normoxie im WST-Assay bei einer Wellenlänge von 480 nm nach 0,1 s. Absorption dargestellt nach Inkubation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 bzw. 2, 1 und 0 g/l). Darstellung der Mittelwerte und der jeweiligen Standardabweichungen. n = 72 (aus je 3 biologischen Replikaten) bis auf IMR-32 *high* und *low glucose* n = 48 (aus je 3 biologischen Replikaten) und IMR-32 *no glucose* n = 24 (aus einem biologischen Replikat), # / ## = signifikanter Unterschied zur Kontrolle p < 0,05 / p < 0,001.

In Abbildung 16 ist die Zellviabilität der einzelnen Zelllinien nach Inkubation mit einer hohen, für die Zellkultur gängigen Glukosekonzentration, mit einer niedrigen Glukosekonzentration von 1 g/l und nach Kultivierung ohne Glukose dargestellt. Die Versuche fanden unter normoxischen Bedingungen statt. Es ist zu erkennen, dass die Absorption und damit die Zellviabilität, der Anteil lebender, stoffwechselaktiver Zellen, nach Exposition mit einem glukosefreien Medium in allen drei Zelllinien signifikant niedriger ist als nach Kultivierung mit einer regulären, hohen Glukosekonzentration. Dies steht im Einklang mit dem optischen Eindruck der endrundeten und verklumpten Zellen nach Inkubation mit einem glukosefreien Medium der Zelllinie IMR-32, zu sehen in Abbildung 15, und spricht für eine akute Stressreaktion. Für die Zelllinien Neuro-2A und IMR-32 ist zudem eine signifikant erhöhte Zellviabilität nach Verwendung einer niedrigen

Glukosekonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen, auch wenn es sich um einen geringen Unterschied handelt.

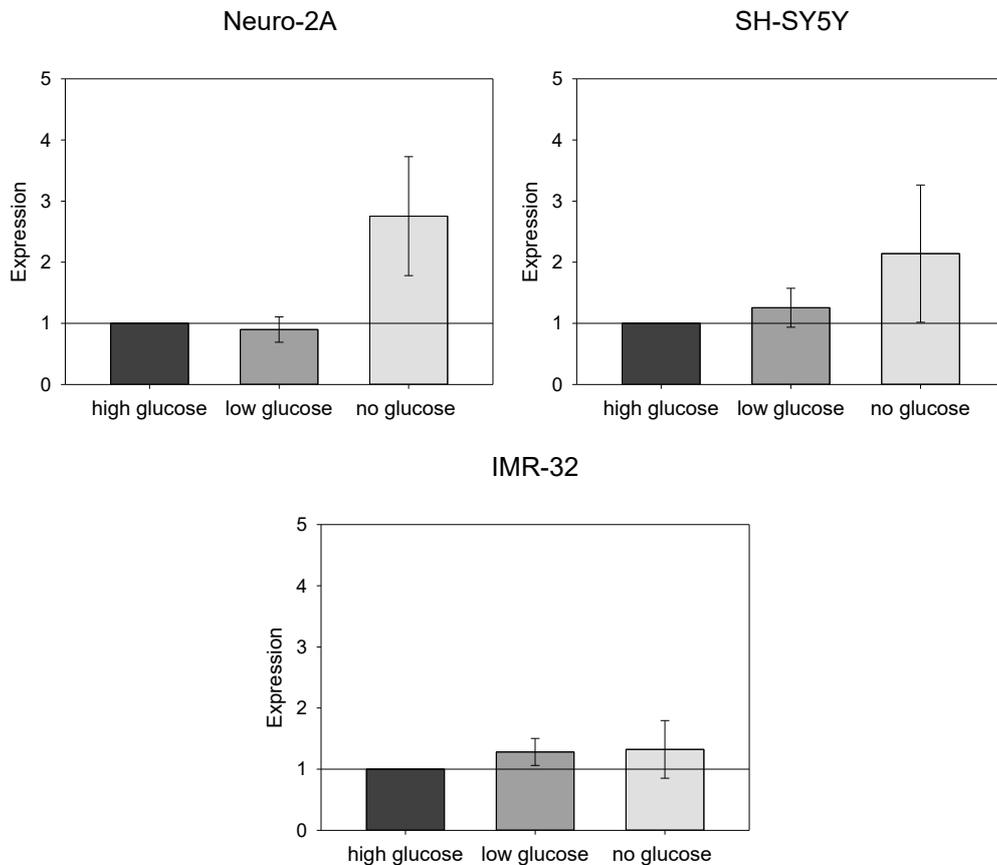


Abb. 17: HIF-1 α -Expression zu unterschiedlichen Glukosekonzentrationen unter normoxischen Bedingungen

Relative Expression von HIF-1 α im Westernblot im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) nach 24 h (Neuro-2A), 72 h (SH-SY5Y) und 48 h (IMR-32) Normoxie nach Inkubation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 bzw. 2, 1 und 0 g/l). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 9 bis auf SH-SY5Y n = 8 (*high* und *low glucose*) und n = 7 (*no glucose*), zudem IMR-32 *no glucose* n = 8. Keine signifikanten Unterschiede der HIF-1 α -Expression im Verhältnis zur Kontrolle.

Abkürzung: HIF-1 α = Hypoxie-induzierter Faktor-1 α

Betrachtet man die in Abbildung 17 dargelegte HIF-1 α -Expression der einzelnen Zelllinien zu unterschiedlichen Glukosekonzentrationen, ist kein signifikanter Expressionsunterschied zu verzeichnen. Insbesondere der optische Eindruck einer Stressreaktion in IMR-32 (Abb. 15) nach Inkubation mit einem glukosefreien Medium spiegelt sich nicht in einer Änderung der HIF-1 α -Expression wider. Dennoch fällt für Neuro-2A und SH-SY5Y ein über das doppelte der Kontrollgröße liegender Mittelwert nach Exposition mit einem Nährmedium ohne Glukose auf.

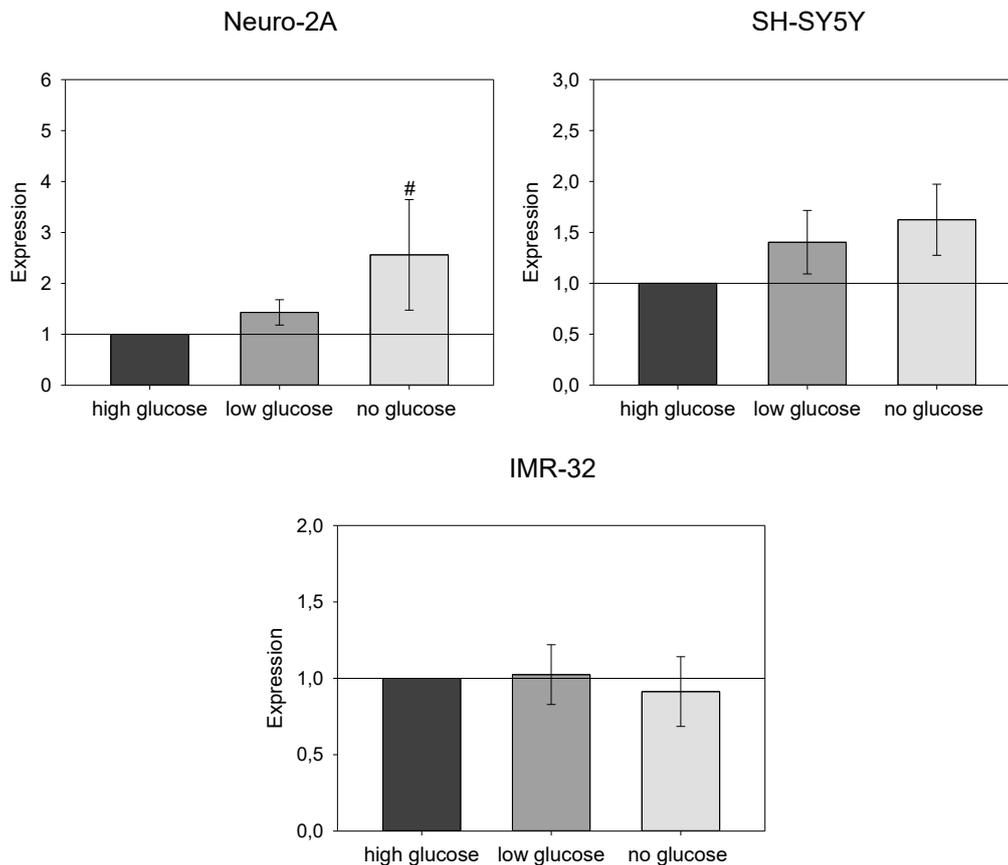


Abb. 18: Caspase 3-Expression zu unterschiedlichen Glukosekonzentrationen unter normoxischen Bedingungen

Relative Expression von Caspase 3 im Westernblot im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1) nach 24 h (Neuro-2A), 72 h (SH-SY5Y) und 48 h (IMR-32) Normoxie nach Inkubation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 bzw. 2, 1 und 0 g/l). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 9 bis auf SH-SY5Y und IMR-32 *no glucose* n = 8.

Im Gegensatz dazu ist Abbildung 18 eine für den Zelltyp Neuro-2A nach Inkubation mit einem glukosefreien Medium signifikante Expressionssteigerung der Caspase 3 im Verhältnis zur Kontrollgruppe (Normoxie *high glucose*) zu entnehmen. Der Expressionsmittelwert der Gruppe *no glucose* in SH-SY5Y liegt bei ca. dem 1,5-Fachen der Kontrolle – ohne statistische Signifikanz. Expressionsunterschiede des Zelltyps IMR-32 sind zwischen den verwendeten Glukosekonzentrationen nicht zu entnehmen, was im Widerspruch zu der in Abbildung 15 zu erkennenden Stressreaktion unter Inkubation mit einem glukosefreien Medium steht. Auch die Verwendung einer niedrigen Glukosekonzentration führt im Vergleich zur regulären, hohen Glukosekonzentration nicht zu signifikanten Unterschieden in der Caspase 3-Expression unabhängig vom Zelltypus.

3.3 Bestimmung der Reoxygenierungszeit

Neben der Bestimmung der optimalen Sauerstoffkonzentration für das Modell, erfolgte die Ermittlung der Reoxygenierungszeit. Die Reoxygenierung bildet im Modell die Reperfusionsphase nach Ischämie, den sogenannten *Second Hit*, ab. Nach Festlegung einer Sauerstoffkonzentration von 2 % für die Hypoxiephase und Ausschluss der Gruppe *no glucose* wurden Zellviabilitätsassays durchgeführt sowie die Expressionen unterschiedlicher Proteine im Zeitverlauf der Reoxygenierung bestimmt. Dabei erfolgte zunächst die Hypoxie bei einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und Inkubation bei einer hohen (4,5 g/l für Neuro-2A, 2 g/l für SH-SY5Y und IMR-32) und niedrigen (1 g/l) Glukosekonzentration zu den bekannten Hypoxiezeiten analog zu den Vorversuchen. Für die Reoxygenierungsphase wurden die Zellen aus der Hypoxiebank geschleust und mit ihrem für die reguläre Zellkultur gewohnten Nährmedium versetzt. Ähnlich wie bei der Reperfusion *in vivo* kam es zu einem erneuten Angebot an Sauerstoff und Glukose. Das bedeutet, dass auch Zellen der Gruppe *low glucose* ein glukosereiches Medium für die Reoxygenierungsphase erhielten und sich die Unterteilung der Gruppen *high* und *low glucose* auf das Glukoseangebot während der Hypoxie bezieht.

Zum einen wurde die Zellviabilität der Zelllinien Neuro-2A und SH-SY5Y im Verlauf der Reoxygenierung mithilfe des MTT-Assays ermittelt. Die Untersuchungszeitpunkte betragen 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Beendigung der Hypoxie, die Zellviabilität unmittelbar nach Hypoxie ist mit 0 Stunden Reoxygenierung gekennzeichnet. Zudem wurden Proteinextrakte zu denselben Untersuchungszeitpunkten gewonnen und die Expression von Bcl-2, Caspase 3 und 9, *Cleaved* Caspase 9, HIF-1a und Smac/DIABLO im Westernblot bestimmt. Ähnlich wie in den Vorversuchen waren aus vermeintlich technischen Gründen nicht alle Proteine in allen Zelllinien ausreichend detektierbar und wurden somit nicht in die Auswertung inkludiert.

Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich bei der Probenanzahl (n) in den MTT-Assays um technische und bei den Proteinexpressionen im Westernblot um biologische Replikate (s. S. 40 u. S. 51).

3.3.1 MTT-Assays

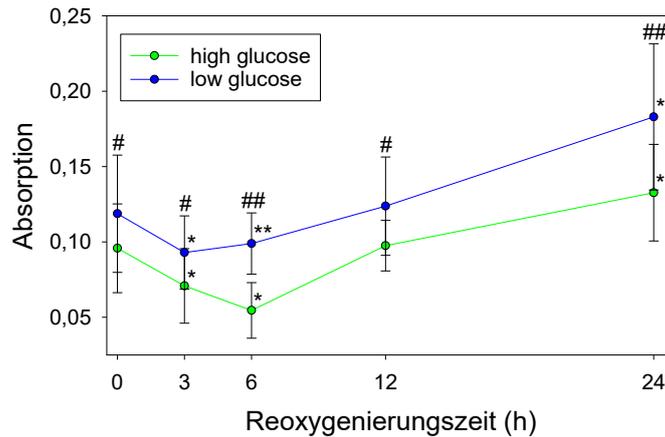


Abb. 19: Zellviabilität im MTT-Assay während Reoxygenierung in Neuro-2A

Absolute Absorption im MTT-Viabilitätsassay bei einer Wellenlänge von 570 nm während der Reoxygenierungsphase 0, 3, 6, 12 und 24 h nach Hypoxie bei 2 % Sauerstoff und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 und 1 g/l). Darstellung der Mittelwerte und der jeweiligen Standardabweichungen, n = 24, # / ## = signifikanter Unterschied zwischen *high* und *low glucose* p < 0,05 / p < 0,001, * / ** = signifikanter Unterschied zur Hypoxie (entspricht 0 h Reoxygenierungszeit) der jeweiligen Glukosekonzentration p < 0,05 / p < 0,001. Abkürzung: h = Stunden

In Abbildung 19 ist die Zellviabilität gemessen anhand der Absorption im MTT-Assay der Zelllinie Neuro-2A während der Reoxygenierungszeit zu sehen. Untersucht wurden die Zeitpunkte 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Beendigung der Hypoxie. Nach 3 und nach 6 Stunden Reoxygenierung ist die Zellviabilität geringer als direkt nach Hypoxieexposition, unabhängig von der untersuchten Glukosekonzentration. Das bedeutet, dass sie in den ersten Stunden zunächst sinkt. In der Gruppe *low glucose* hat sie nach 3 Stunden, in der Gruppe *high glucose* nach 6 Stunden Reoxygenierungszeit ihren Tiefpunkt erreicht. Im Anschluss steigt die Zellviabilität und nach 24 Stunden ist sie signifikant höher als zum Zeitpunkt 0. Außerdem ist die Zellviabilität in der Gruppe *low glucose* zu jedem Zeitpunkt höher als in der Gruppe *high glucose*.

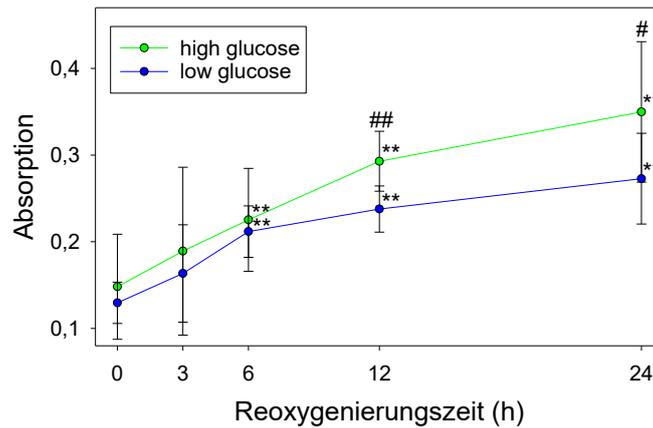


Abb. 20: Zellviabilität im MTT-Assay während Reoxygenierung in SH-SY5Y

Absolute Absorption im MTT-Viabilitätsassay bei einer Wellenlänge von 570 nm während Reoxygenierungsphase 0, 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l). Darstellung der Mittelwerte und der jeweiligen Standardabweichungen, n = 24, # / ## = signifikanter Unterschied zwischen *high* und *low glucose* $p < 0,05$ / $p < 0,001$, ** = signifikanter Unterschied zur Hypoxie (entspricht 0 Stunden Reoxygenierungszeit) der jeweiligen Glukosekonzentration $p < 0,001$.

Abkürzung: h = Stunden

Im Gegensatz dazu steigt die Zellviabilität der Zelllinie SH-SY5Y während der Reoxygenierungsphase bereits nach 3 Stunden und wächst über den gesamten Untersuchungszeitraum von 24 Stunden stetig (Abb. 20). Nach bereits 6 Stunden ist die Zellviabilität signifikant höher als unmittelbar nach Hypoxie (Zeitpunkt 0). Ein Abfall der Zellviabilität ist zu keinem untersuchten Zeitpunkt zu erkennen. Nach 12 und 24 Stunden Reoxygenierung ist die Zellviabilität der Gruppe *high glucose* höher als die der Gruppe *low glucose*.

3.3.2 Westernblots

3.3.2.1 N2A

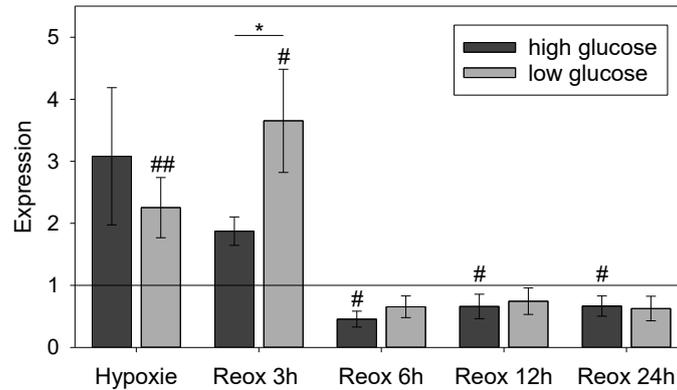


Abb. 21: HIF-1 α -Expression während Reoxygenierung in Neuro-2A

Relative Expression von HIF-1 α im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, # / ## = signifikanter Unterschied zur Kontrolle $p < 0,05$ / $p < 0,001$, * = signifikanter Unterschied zueinander $p < 0,05$, $n = 4$ bis auf Hypoxie ($n = 10$ aus 9 biologischen Replikaten).

Abkürzungen: h = Stunden, HIF-1 α = Hypoxie-induzierter Faktor-1 α , Reox = Reoxygenierung

Betrachtet man die in Abbildung 21 dargestellte Expression von HIF-1 α während der Reoxygenierung in der Zelllinie Neuro-2A, ist eine erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Normoxie *high glucose*) nach 3 Stunden für die Gruppe *low glucose* zu sehen. Bereits nach 6 Stunden Reoxygenierung fällt die HIF-1 α -Expression unter den Referenzwert und steigt innerhalb der 24 Stunden nicht erneut an. Für die Zeitpunkte 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxie liegt sie in der Gruppe *high glucose* sogar signifikant niedriger als in der Kontrolle. Außerdem ist die vermehrte Expression nach 3 Stunden zu einer niedrigen Glukosekonzentration signifikant höher im Vergleich zu einer hohen Glukosekonzentration. Zu den weiteren Reoxygenierungszeitpunkten ist kein Unterschied zwischen den verwendeten Glukosekonzentrationen festzustellen.

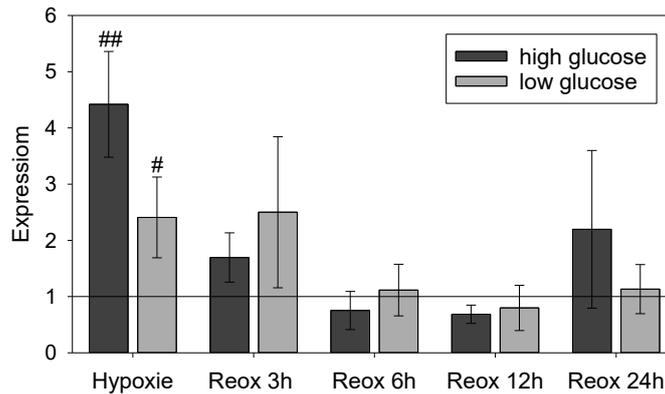


Abb. 22: Caspase 3-Expression während Reoxygenierung in Neuro-2A

Relative Expression von Caspase 3 im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, # / ## = signifikanter Unterschied zur Kontrolle $p < 0,05$ / $p < 0,001$, $n = 4$ bis auf Hypoxie ($n = 10$ aus 9 biologischen Replikaten). Keine signifikanten Unterschiede der Caspase 3-Expression während Reoxygenierung im Verhältnis zur Kontrolle.

Abkürzungen: h = Stunden, Reox = Reoxygenierung

Im Vergleich dazu ist kein statistischer relevanter Unterschied hinsichtlich der Caspase 3-Expression während des gesamten Reoxygenierungszeitraums nachzuweisen (Abb. 22). Auch wenn keine statistisch signifikant erhöhte Expression der Caspase 3 im Vergleich zur normoxischen Kontrolle während der Reoxygenierung vorliegt, ist eine tendenziell höhere Expression nach 3 Stunden als nach 6 und 12 Stunden zu sehen. Nach 24 Stunden Reoxygenierung steigt die Expression der Caspase 3 wieder tendenziell an, allerdings auch ohne statistische Signifikanz. Hinzukommend lassen sich zwischen den verwendeten Glukosekonzentrationen innerhalb eines Untersuchungszeitpunkts keine Expressionsunterschiede feststellen.

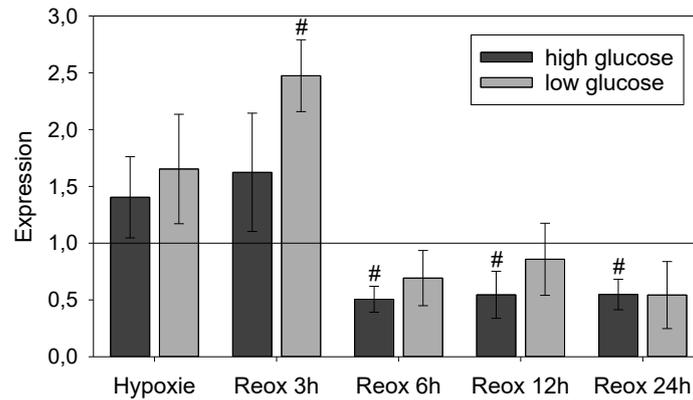


Abb. 23: Caspase 9-Expression während Reoxygenierung in Neuro-2A

Relative Expression von Caspase 9 im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle $p < 0,05$, $n = 3$ bis auf Hypoxie ($n = 7$). Abkürzungen: h = Stunden, Reox = Reoxygenierung

Die Expression von Caspase 9 verhält sich wiederum anders (Abb. 23). Nach 3 Stunden Reoxygenierung ist eine signifikante Steigerung der Expression in der Gruppe *low glucose* zu erkennen. Ähnlich wie die Expression von HIF-1 α fällt die Caspase 9-Expression nach 6 Stunden und ist für die Gruppe *high glucose* zu den Zeitpunkten 6, 12 und 24 Stunden signifikant geringer als nach Normoxie. Auch die Mittelwerte der Gruppe *low glucose* liegen zu den besagten Zeitpunkten im Verhältnis zur Kontrolle unter 1. Im direkten Vergleich lassen sich keine Unterschiede zwischen *high* und *low glucose* nachweisen.

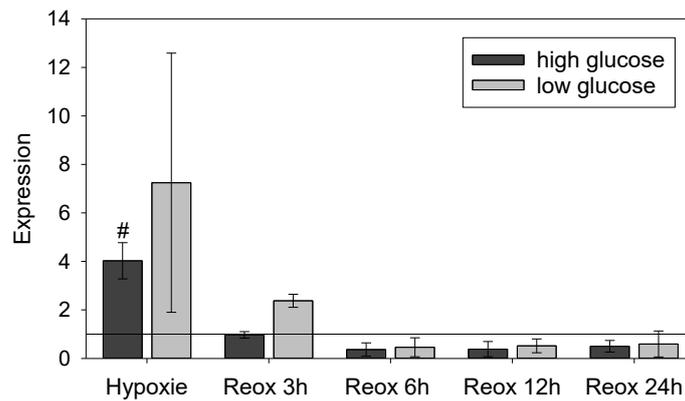


Abb. 24: Cleaved Caspase 9-Expression während Reoxygenierung in Neuro-2A

Relative Expression von *Cleaved Caspase 9* im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle $p < 0,05$, $n = 2$ bis auf Hypoxie ($n = 4$). Keine signifikanten Unterschiede der *Cleaved Caspase 9*-Expression während Reoxygenierung im Verhältnis zur Kontrolle.

Abkürzungen: Reox = Reoxygenierung, h = Stunden

Die Expression der *Cleaved Caspase 9* (Abbildung 24) weicht zu allen Reoxygenierungszeitpunkten nicht von der Kontrollgruppe ab. Die Mittelwerte der Expression der *Cleaved Caspase 9* liegen zu den Zeitpunkten 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxie alle unter 1, auch wenn im Verhältnis zur normoxischen Kontrolle keine statistische Signifikanz vorliegt. Zu erwähnen ist die begrenzte Aussagekraft aufgrund des geringen Stichprobenumfangs von $n = 2$.

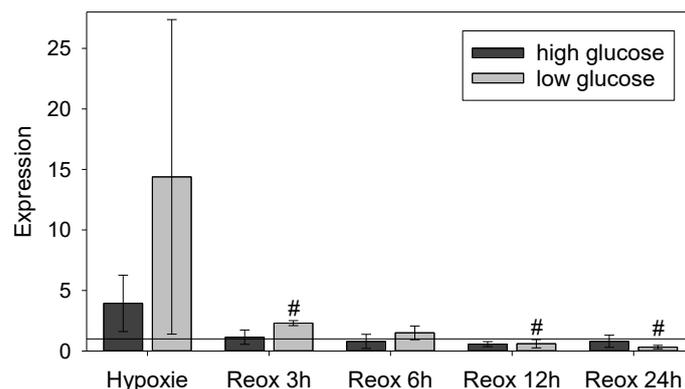


Abb. 25: Smac/DIABLO-Expression während Reoxygenierung in Neuro-2A

Relative Expression von Smac/DIABLO im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, $n = 3$, # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle $p < 0,05$.

Abkürzungen: h = Stunden, Reox = Reoxygenierung, Smac/DIABLO = *second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low isoelectric point*

Betrachtet man die Expression des proapoptotischen Proteins Smac/DIABLO, dargestellt in Abbildung 25, ist diese nach 3 Stunden Reoxygenierung in der Gruppe *low glucose* signifikant höher als in der Kontrolle. Nach 12 und nach 24 Stunden ist die Expression jener Gruppe signifikant niedriger als nach Normoxie, zeigt demnach auch eine Tendenz über den Zeitraum der Reoxygenierung zu sinken. Auch hier sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Glukosekonzentrationen festzustellen, allenfalls ist die Smac/DIABLO-Expression der Gruppe *low glucose* nach 3 Stunden Reoxygenierung etwas höher als der Gruppe *high glucose*.

Zusammenfassend lässt sich für die Zelllinie Neuro-2A nur eine erhöhte Expression proapoptotischer Proteine (Caspase 9 und Smac/DIABLO) und von HIF-1 α nach 3 Stunden Reoxygenierung für eine Exposition mit einer niedrigen Glukosekonzentration während Hypoxie feststellen. Bis auf die Expression von Caspase 3, die nach 24 Stunden Reoxygenierung wieder anzusteigen scheint, auch wenn dafür keine statistische Relevanz vorliegt, liegen die Niveaus der anderen Proteine nach 6, 12 und 24 Stunden sogar unterhalb des Expressionslevels der Kontrolle (Normoxie *high glucose*). In Betrachtung der Unterschiede zwischen den verwendeten Glukosekonzentrationen, lässt sich lediglich für HIF-1 α eine signifikant höhere Expression unter Verwendung einer niedrigen Glukosekonzentration im Vergleich zu einer hohen nachweisen.

3.3.2.2 SH-SY5Y

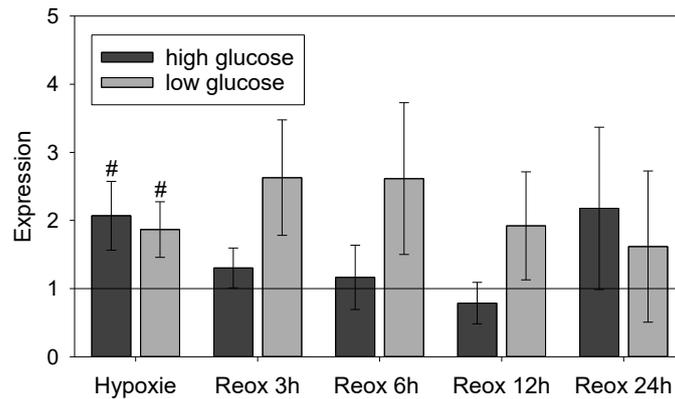


Abb. 26: HIF-1 α -Expression während Reoxygenierung in SH-SY5Y

Relative Expression von HIF-1 α im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle $p < 0,05$, $n = 4$ bis auf Hypoxie ($n = 11$ aus 9 biologischen Replikaten). Keine signifikanten Unterschiede der HIF-1 α -Expression während Reoxygenierung im Verhältnis zur Kontrolle.

Abkürzungen: h = Stunden, HIF-1 α = Hypoxie-induzierter Faktor-1 α , Reox = Reoxygenierung

Für die Zelllinie SH-SY5Y zeigt die HIF-1 α -Expression während der gesamten Reoxygenierungszeit keine statistisch signifikante Abweichung im Verhältnis zur Kontrollgruppe (Abbildung 26). Betrachtet man die Mittelwerte für die Gruppe *low glucose* liegen diese zu jedem untersuchten Zeitpunkt oberhalb des Referenzniveaus und sind nach 3 und 6 Stunden am höchsten, sogar höher als unmittelbar nach Hypoxie. Nach 12 und 24 Stunden scheint die Expression zu sinken. Allerdings sind all die Abweichungen nicht statistisch relevant und könnten durch Zufall entstanden sein. Anders verhält es sich für die Gruppe *high glucose*. Die Mittelwerte rangieren bereits nach 3 Stunden um das Referenzniveau. Nach 24 Stunden scheint die Expression wieder anzusteigen. Auch ein signifikanter Unterschied im direkten Vergleich der Glukosekonzentrationen ist nicht festzustellen, auch wenn die Expressionsmittelwerte für die Gruppe *low glucose* zu 3, 6 und 12 Stunden nach Hypoxieexposition höher sind als für die Gruppe *high glucose*.

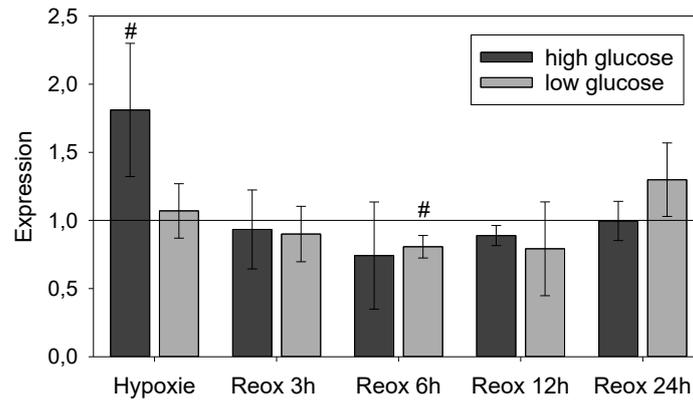


Abb. 27: Caspase 3-Expression während Reoxygenierung in SH-SY5Y

Relative Expression von Caspase 3 im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle $p < 0,05$, $n = 3$ bis auf Hypoxie ($n = 11$ aus 9 biologischen Replikaten).

Abkürzungen: h = Stunden, Reox = Reoxygenierung

In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass die Caspase 3-Expression bereits nach 3 Stunden Reoxygenierung abgesunken ist. Zu keinem Reoxygenierungszeitpunkt ist eine signifikant vermehrte Expression des proapoptotischen Proteins zu verzeichnen. Jedoch ist nach 6 Stunden eine signifikant niedrigere Expression in der Gruppe *low glucose* im Vergleich zur normoxischen Kontrolle festzustellen. Ein Unterschied zwischen den Glukosekonzentrationen hinsichtlich der Caspase 3-Expression ist nicht erkennbar.

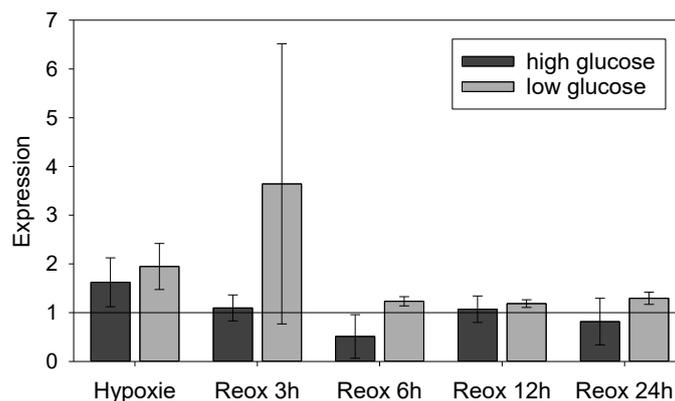


Abb. 28: Caspase 9-Expression während Reoxygenierung in SH-SY5Y

Relative Expression von Caspase 9 im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, $n = 2$ bis auf Hypoxie ($n = 3$). Keine signifikanten Unterschiede der Caspase 9-Expression während Reoxygenierung im Verhältnis zur Kontrolle.

Abkürzungen: h = Stunden, Reox = Reoxygenierung

Auch für die Expression von Caspase 9 kann über den Reoxygenierungszeitraum keine signifikante Steigerung zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 28). Der Mittelwert der Caspase 9-Expression nach 3 Stunden Reoxygenierung (*low glucose*) reißt leicht nach oben aus, allerdings mit einer hohen Streuung bei niedriger Probenanzahl (n = 2). Ferner liegen zwischen den Glukosekonzentrationen hinsichtlich der Höhe des untersuchten proapoptischen Proteins keine signifikanten Unterschiede vor.

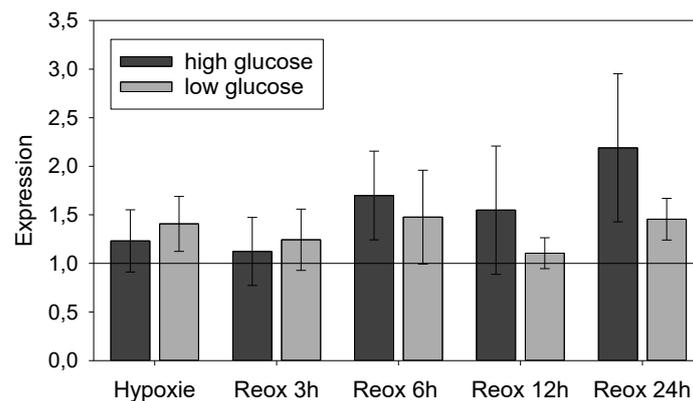


Abb. 29: Smac/DIABLO-Expression während Reoxygenierung in SH-SY5Y

Relative Expression von Smac/DIABLO im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3 bis auf Hypoxie (n = 6). Keine signifikanten Unterschiede der Smac/DIABLO-Expression während Reoxygenierung im Verhältnis zur Kontrolle.

Abkürzungen: h = Stunden, Reox = Reoxygenierung, Smac/DIABLO = *second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low isoelectric point*

Anders als die Smac/DIABLO-Expression in der Zelllinie Neuro-2A zeigt sie in der Zelllinie SH-SY5Y während der Reoxygenierung keine signifikanten Unterschiede zur normoxischen Referenz (Abb. 29). Über den Reoxygenierungszeitraum scheint sie im Gegensatz zur Expression in Neuro-2A-Zellen tendenziell für die Gruppe *high glucose* anzusteigen. Der höchste gemessene Mittelwert im Verhältnis zur Kontrolle lag bei 24 Stunden und einer hohen Glukosekonzentration, ohne einen signifikanten Unterschied aufzuweisen.

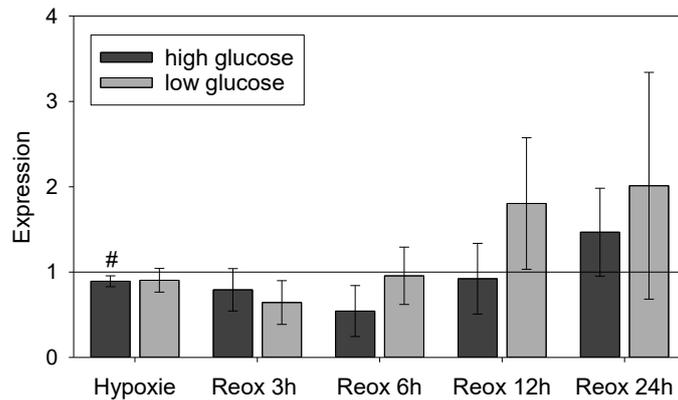


Abb. 30: Bcl-2-Expression während Reoxygenierung in SH-SY5Y

Relative Expression von Bcl-2 im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle $p < 0,05$, $n = 3$ bis auf Hypoxie ($n = 4$).

Abkürzungen: Bcl-2 = *B-cell lymphoma 2*, h = Stunden, Reox = Reoxygenierung

In Abbildung 30 ist die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 während der Reoxygenierung dargestellt. Auch wenn keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden können, ist zu erkennen, dass die Mittelwerte nach 3 (*low glucose*) und 6 (*high glucose*) ein Minimum erreichen und im Verlauf ansteigen. Sie sind nach 24 Stunden für beide Glukosekonzentrationen am höchsten, in der Gruppe *low glucose* höher als in der Gruppe *high glucose*.

Resümierend lässt sich für die Zelllinie SH-SY5Y während der Reoxygenierungsphase keine signifikant erhöhte Expression von proapoptotischen Proteinen und HIF-1 α feststellen. Die einzig signifikante Abweichung ist eine erniedrigte Caspase 3-Expression nach 6 Stunden (*low glucose*). Auch die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 unterscheidet sich während der Reoxygenierung nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

3.3.2.3 IMR-32

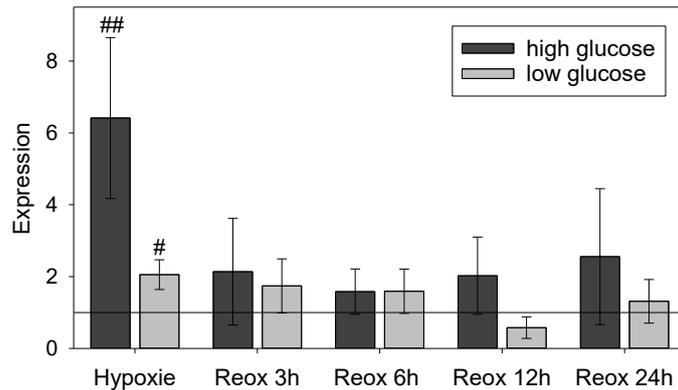


Abb. 31: HIF-1 α -Expression während Reoxygenierung in IMR-32

Relative Expression von HIF-1 α im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, # / ## = signifikanter Unterschied zur Kontrolle $p < 0,05$ / $p < 0,001$, $n = 4$ (aus 3 biologischen Replikaten) bis auf Hypoxie (*high glucose* $n = 11$ und *low glucose* $n = 12$ aus je 9 biologischen Replikaten). Keine signifikanten Unterschiede der HIF-1 α -Expression während Reoxygenierung im Verhältnis zur Kontrolle.

Abkürzungen: h = Stunden, HIF-1 α = Hypoxie-induzierter Faktor-1 α , Reox = Reoxygenierung

Auch für die Zelllinie IMR-32 lässt sich über den Reoxygenierungszeitraum keine signifikant erhöhte HIF-1 α -Expression nachweisen (Abb. 31). Bereits nach 3 Stunden ist diese abgesunken. Insgesamt bleibt die Expression über die Zeit der Reoxygenierung konstant, steigt allenfalls am Ende der Reoxygenierung in der Gruppe *high glucose* leicht an. Der Mittelwert der HIF-1 α -Expression der Gruppe *low glucose* nach 12 Stunden liegt unterhalb des Niveaus der Kontrollgruppe. Ein Unterschied zwischen der Exposition mit hoher oder niedriger Glukosekonzentration während der Hypoxie hinsichtlich der Expression von HIF-1 α in der Reoxygenierungsphase ist nicht zu erkennen.

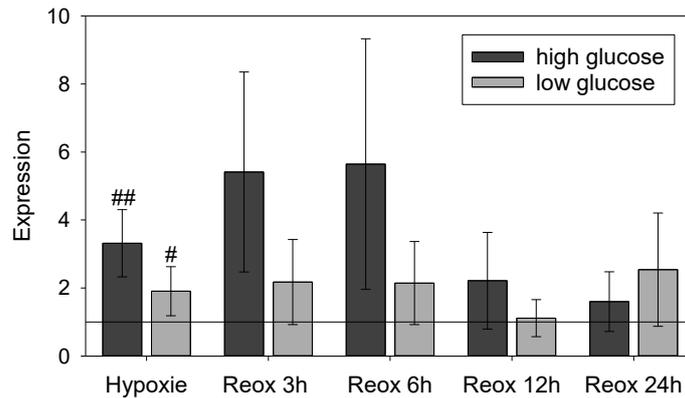


Abb. 32: Caspase 3-Expression während Reoxygenierung in IMR-32

Relative Expression von Caspase 3 im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, # / ## = signifikanter Unterschied zur Kontrolle $p < 0,05$ / $p < 0,001$, $n = 4$ (aus 3 biologischen Replikaten) bis auf Hypoxie (*high glucose* $n = 9$, *low glucose* $n = 10$ aus 9 biologischen Replikaten). Keine signifikanten Unterschiede der Caspase 3-Expression während Reoxygenierung im Verhältnis zur Kontrolle.

Abkürzungen: h = Stunden, Reox = Reoxygenierung

Die Expression von Caspase 3 weist über den Reoxygenierungszeitraum ebenfalls keine signifikante Steigerung auf, auch wenn die Mittelwerte nach 3 und 6 Stunden Reoxygenierung der Gruppe *high glucose* sogar höher als nach Hypoxie liegen (Abb. 32). Zwischen den Gruppen *high* und *low glucose* gibt es während der Reoxygenierungsphase hinsichtlich der Caspase 3-Expression keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell ist sie in der Gruppe *high glucose*, bis auf nach 24 Stunden Reoxygenierung, höher als in der Gruppe *low glucose*.

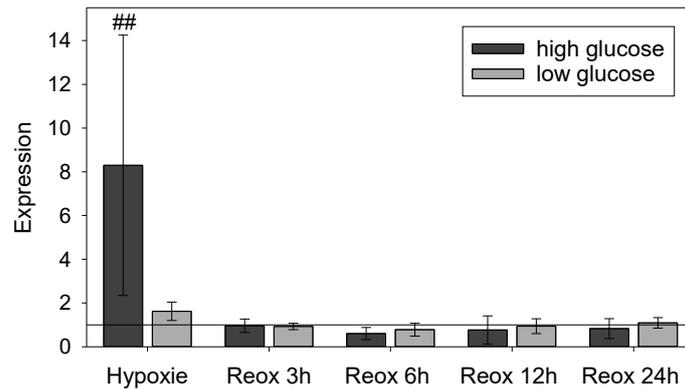


Abb. 33: Caspase 9-Expression während Reoxygenierung in IMR-32

Relative Expression von Caspase 9 im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, ## = signifikanter Unterschied zur Kontrolle $p < 0,001$, $n = 3$ (Reox 3 h + 6 h), $n = 2$ (Reox 12 h + 24 h), $n = 7$ (Hypoxie *high glucose*), $n = 8$ (Hypoxie *low glucose*). Keine signifikanten Unterschiede der Caspase 9-Expression während Reoxygenierung im Verhältnis zur Kontrolle.

Abkürzungen: h = Stunden, Reox = Reoxygenierung

In Betrachtung der Caspase 9-Expression in Abbildung 33 ist festzustellen, dass diese für beide Glukosekonzentrationen über den gesamten Reoxygenierungszeitraum konstant um das normoxische Referenzniveau liegt.

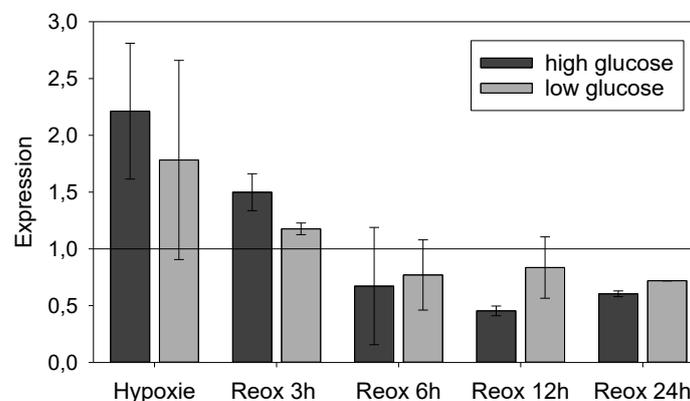


Abb. 34: Cleaved Caspase 9-Expression während Reoxygenierung in IMR-32

Relative Expression von *Cleaved* Caspase 9 im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, $n = 2$. Keine signifikanten Unterschiede der *Cleaved* Caspase 9-Expression während Reoxygenierung und Hypoxie im Verhältnis zur Kontrolle.

Abkürzungen: h = Stunden, Reox = Reoxygenierung

Auch für die Expression ihrer aktivierten Form, der *Cleaved* Caspase 9, liegt zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle vor (Abb. 34). Anhand der dargestellten Werte ließe sich ein Absinken der Mittelwerte über den Reoxygenierungszeitraum diskutieren, aber auch hier

fehlt die statistische Signifikanz, was ebenfalls an einer geringen Stichprobenmenge (n = 2) liegen könnte. Nach 3 Stunden Reoxygenierung befinden sich die Mittelwerte noch oberhalb, nach 6, 12 und 24 Stunden unterhalb des Referenzniveaus. Eine Abweichung zwischen den verwendeten Glukosekonzentrationen ist nicht zu detektieren.

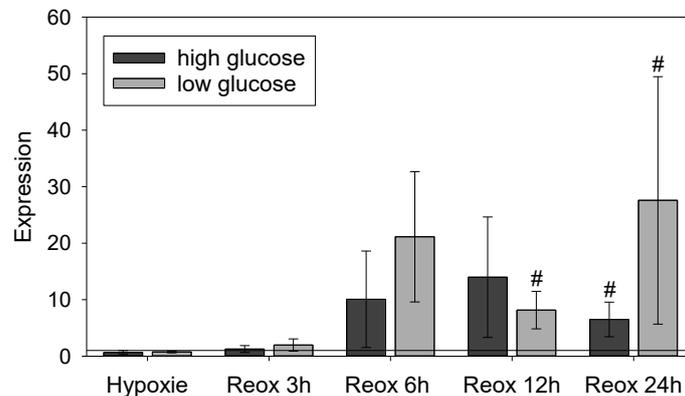


Abb. 35: Bcl-2-Expression während Reoxygenierung in IMR-32

Relative Expression von Bcl-2 im Westernblot während der Reoxygenierungsphase 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) im Verhältnis zur Kontrolle (Normoxie *high glucose*, dargestellt als Referenzlinie bei 1). Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle p < 0,05. n =4 (aus 3 biologischen Replikaten), bis auf Hypoxie *high glucose*: n = 6 (aus 5 biologischen Replikaten) und *low glucose* n = 8 (aus 6 biologischen Replikaten).

Abkürzungen: Bcl-2 = *B-cell lymphoma 2*, h = Stunden, Reox = Reoxygenierung

Im Gegensatz zu den proapoptotischen Proteinen verhält sich die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 während der Reoxygenierung anders, wie in Abbildung 35 zu erkennen ist. Nach 6, 12 und 24 Stunden liegt sie oberhalb des Niveaus der Kontrollgruppe, nach 24 Stunden (*high* und *low glucose*) und nach 12 Stunden (*low glucose*) ist diese Expressionssteigerung signifikant. Ein Unterschied zwischen den verwendeten Glukosekonzentrationen während der Hypoxieexposition ist nicht auszumachen.

In Zusammenschau aller Ergebnisse im Westernblot während der Reoxygenierungsphase in der Zelllinie IMR-32 lässt sich feststellen, dass für keine proapoptotischen Proteine und HIF-1 α zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine statistisch signifikante Erhöhung der Expression zu verzeichnen ist. Es lassen sich dennoch zwei Tendenzen erkennen. Die Expression von HIF-1 α und Caspase 9 ist bereits nach 3 Stunden Reoxygenierung um das Niveau der normoxischen Kontrolle gesunken und bleibt weitestgehend konstant. Im Gegensatz dazu steigt die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 mit der Zeit an und ist nach

12 Stunden (*low glucose*) und nach 24 Stunden (*high* und *low glucose*) signifikant höher als nach Normoxie. Es kann für die Expression eines Proteins ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen *high* und *low glucose* festgestellt werden.

Da nach 3 Stunden Reoxygenierung in Betrachtung der MTT-Assays und der Westernblots für die drei Zelllinien die i. S. des Modells bestmöglichen Ergebnisse erzielt wurden und längere Reoxygenierungszeiten keine Vorteile hinsichtlich der Expression pro- und antiapoptotischer Proteine brachten, fiel die Wahl auf eine Reoxygenierungszeit von 3 Stunden für die Folgeversuche.

3.4 Einfluss von rhEPO und cEPO-FC

Nach Ermittlung der für das Modell bestmöglichen Sauerstoffkonzentration zur Hypoxieinduktion von 2 % und einer Reoxygenierungszeit von 3 Stunden wurden die Versuche mit Zugabe von rhEPO und cEPO-Fc zu je einer hohen und einer niedrigen Konzentration durchgeführt und mit der Gruppe ohne Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc verglichen. Die verwendeten Konzentrationen von rhEPO und cEPO-Fc sind auf Seite 29 aufgeführt. Außerdem erfolgte nach Ausschluss der Gruppe *no glucose* die Unterteilung zwischen einer hohen Glukosekonzentration (*high glucose*) und einer niedrigen Glukosekonzentration (*low glucose*) analog zu den Vorversuchen. Um den Einfluss von rhEPO und cEPO-Fc zu untersuchen, wurden erneut MTT-Assays (Neuro-2A und SH-SY5Y) und die Expressionsbestimmung von HIF-1 α sowie pro- und antiapoptotischer Proteine mittels Westernblot durchgeführt. Im Westernblot wurden die Proteine AMPK β 1, Bcl-2, Caspase 3, Caspase 9, *Cleaved* Caspase 3, *Cleaved* Caspase 9, HIF-1 α , und Smac/DIABLO untersucht. Allerdings war die Expression einiger Proteine in bestimmten Zelllinien nicht ausreichend nachweisbar, weswegen nicht alle Proteine zu allen Zelllinien vertreten sind. Der Nachweis von *Cleaved* Caspase 9 gelang in keiner Zelllinie zufriedenstellend. Zudem ist zu erwähnen, dass die Hypoxieproben cEPO-Fc *low* beider Glukosekonzentrationen eines biologischen Replikats in der Zelllinie IMR-32 verpilzt waren und ebenfalls von den Versuchen ausgeschlossen werden mussten.

Die MTT-Assays und Proteinextraktionen erfolgten zum einen unmittelbar nach der jeweiligen Hypoxiezeit (24, 48 bzw. 72 Stunden) als auch nach drei Stunden Reoxygenierung. Die Erythropoetinderivate wurden kurz vor Beginn der

Hypoxiephase zugesetzt, somit erfolgte die Inkubation mit diesen über den jeweiligen Zeitraum der Hypoxie. Nach Austausch der Nährmedien zur Induktion der Reoxygenierungsphase befand sich kein Erythropoetinabkömmling mehr im Nährmedium. Zu beachten ist, dass für die Ergebnisse der MTT-Assays die entsprechende Gruppe ohne Zusatz von rhEPO und cEPO-FC als Normierung fungiert und gleich 1 gesetzt wurde (Abb. 36 u. 37), während die Ergebnisse der Westernblots im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* stehen (Abb. 38-53).

Die Probenanzahl (n) steht in den MTT-Assays für technische Replikate, die Anzahl biologischer Replikate ist der jeweiligen Legende zu entnehmen. Bei der Probenanzahl (n) der Proteinexpressionen handelt es sich um biologische Replikate, sofern nicht anders vermerkt (s. S. 40 u. S. 51).

3.4.1 MTT-Assays

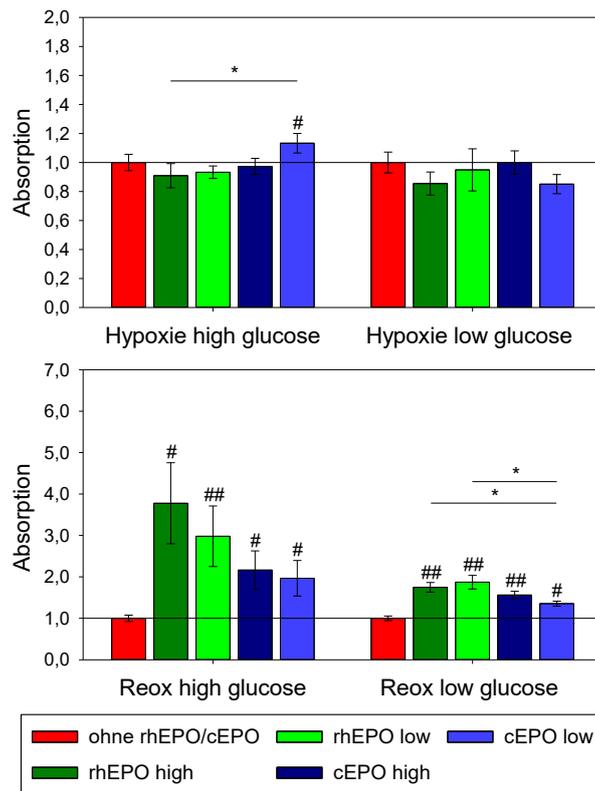


Abb. 36: Zellviabilität im MTT-Assay nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO und cEPO-Fc in Neuro-2A

Relative Absorption im MTT-Viabilitätsassay bei einer Wellenlänge von 570 nm nach 24 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zur jeweiligen Gruppe ohne rhEPO/cEPO-Fc (zusätzlich dargestellt als Referenzlinie bei 1) in Neuro-2A. Darstellung der Mittelwerte und der jeweiligen Standardabweichungen, n = 36 (aus 3 biologischen Replikaten), # / ## = signifikanter Unterschied zu ohne rhEPO/cEPO-Fc p < 0,05 / p < 0,001, * = signifikanter Unterschied untereinander p < 0,05 .

Abkürzungen: cEPO = carbamylirtes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

In Abbildung 36 ist die Absorption im MTT-Assay bzw. die Zellviabilität nach 24 Stunden Hypoxie (oben) und nach 3 Stunden Reoxygenierung (unten) nach Inkubation mit rhEPO und cEPO-Fc zu unterschiedlichen Konzentrationen für die Zelllinie Neuro-2A dargestellt. Jeweils links ist die Absorption der Gruppe mit Exposition zu einer hohen Glukosekonzentration (4,5 g/l) während der Hypoxiephase und rechts zu einer erniedrigten (1 g/l) zu sehen. Die Werte wurden jeweils mit der Gruppe ohne Zusatz von rhEPO/cEPO-Fc ins Verhältnis gesetzt und die Unterschiede zu dieser und untereinander statistisch untersucht. Auffallend ist, dass nach Hypoxie lediglich eine erhöhte Zellviabilität nach Zusatz einer geringen Konzentration von cEPO-Fc im Vergleich zur unbehandelten Gruppe bei einer hohen Glukosekonzentration zu verzeichnen ist. Abgesehen

davon kann unmittelbar nach der Hypoxiephase keine erhöhte Zellviabilität unter dem Einsatz eines Erythropoetinderivats festgestellt werden. Anders verhält es sich nach drei Stunden Reoxygenierung. Zu jeder verwendeten Konzentration des jeweiligen Erythropoetins konnte eine signifikant höhere Viabilität als in der Gruppe ohne rhEPO/cEPO-Fc nachgewiesen werden (*high* und *low glucose*). Den höchsten Mittelwert erreichten dabei die Zellen mit Zusatz einer hohen rhEPO-Konzentration der Gruppe *high glucose*, der fast das Vierfache der Referenzgruppe betrug. Insgesamt waren die Mittelwerte nach Inkubation mit rhEPO höher als mit cEPO-Fc, auch wenn nur ein signifikanter Unterschied unter Zusatz von rhEPO *high* und *low* im direkten Vergleich zu cEPO-Fc *low* in der Gruppe *low glucose* detektierbar war.

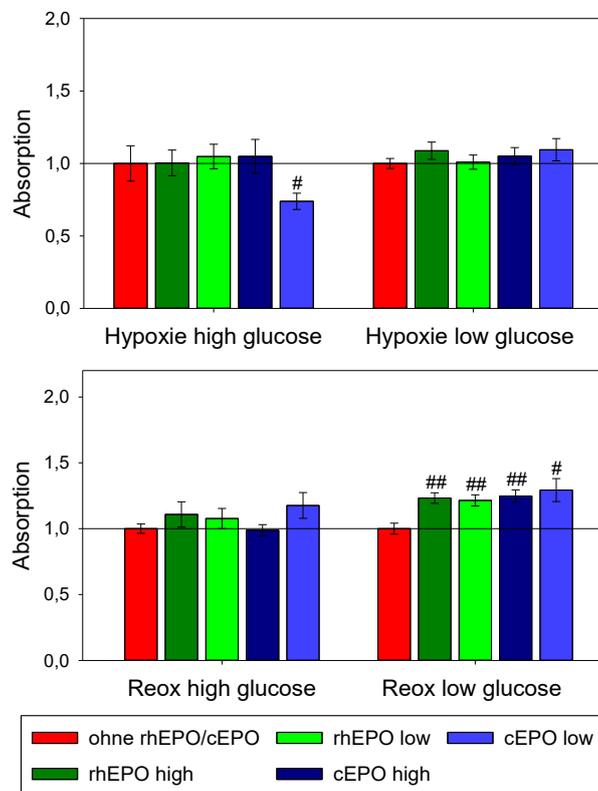


Abb. 37: Zellviabilität im MTT-Assay nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO und cEPO-Fc in SH-SY5Y

Relative Absorption im MTT-Viabilitätsassay bei einer Wellenlänge von 570 nm nach 72 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zur jeweiligen Gruppe ohne rhEPO/cEPO-Fc (zusätzlich dargestellt als Referenzlinie bei 1) in SH-SY5Y. Darstellung der Mittelwerte und der jeweiligen Standardabweichungen, Hypoxie: n = 48 (aus 3 biologischen Replikaten), Reox: n = 36 (aus 3 biologischen Replikaten) bis auf Reox *high glucose* cEPO-Fc *low*: n = 24 (aus 2 biologischen Replikaten), # / ## = signifikanter Unterschied zu ohne rhEPO/cEPO-Fc p < 0,05 / p < 0,001.

Abkürzungen: cEPO = carbamylirtes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Betrachtet man in Abbildung 37, welche analog zur Abbildung 36 aufgebaut ist, die Zellviabilität der Linie SH-SY5Y nach 72 Stunden Hypoxie unter Einsatz von rhEPO und cEPO-Fc, so kann auch hier nur ein Unterschied nach Hypoxie mit einer hohen Glukosekonzentration und Zusatz einer niedrigen Konzentration an cEPO-Fc im Vergleich zur Referenz festgestellt werden. Allerdings ist sie bei dieser Zelllinie erniedrigt. Das bedeutet, dass der Anteil lebender, stoffwechselaktiver Zellen nach Zusatz einer niedrigen Konzentration des entsprechenden Erythropoetinderivats niedriger ist als ohne Zusatz und das nur unter Einfluss einer hohen Glukosekonzentration während Hypoxie. Warum dies nicht in der Gruppe *low glucose* und nach Reoxygenierung replizierbar ist, und wieso eine hohe Konzentration der Substanz keinen, wohlmöglich toxischen, Einfluss ausüben sollte, bleibt offen. Eine technische Ursache im Versuchsablauf oder in der Datenverarbeitung konnte nicht eruiert werden. Auch bei der Zelllinie SH-SY5Y konnte, wie bei der Zelllinie Neuro-2A, nach Reoxygenierung eine signifikant erhöhte Viabilität unter Zusatz von rhEPO und cEPO-Fc zu jeder Konzentration ermittelt werden, allerdings nur bei einer niedrigen Glukosekonzentration. Ein Unterschied zwischen den jeweiligen Erythropoetinderivaten oder den verwendeten Konzentrationen ist nicht vorhanden.

Zusammenfassend üben beide Erythropoetinpräparate einen positiven Einfluss auf die Viabilität der Zellen Neuro-2A nach 3 Stunden Reoxygenierung aus, während sich dieser Effekt bei Zellen der Linie SH-SY5Y auf eine Hypoxieexposition zu einer niedrigen Glukosekonzentration beschränkt.

3.4.2 Westernblots der Zelllinie Neuro-2A

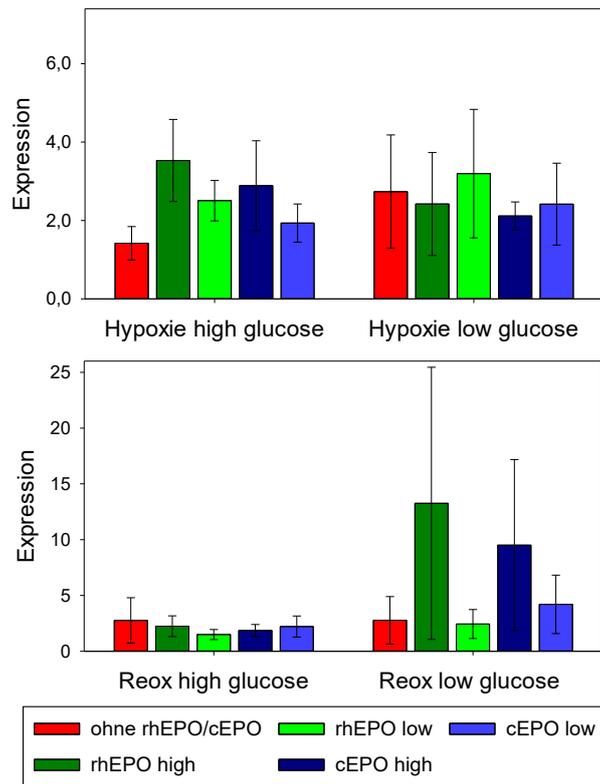


Abb. 38: HIF-1 α -Expression in Neuro-2A nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO und cEPO-Fc

Relative HIF-1 α -Expression im Westernblot nach 24 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 μ g/ml, *low* = 0,2 μ g/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in Neuro-2A. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3. Keine signifikanten Unterschiede unter Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc im Vergleich zur Kontrolle. Abkürzungen: cEPO = carbamyliertes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Im Gegensatz zur Zellviabilität zeigt die Expression des Markers für Hypoxie HIF-1 α in der Zelllinie Neuro-2A weder unmittelbar nach Hypoxie noch nach Reoxygenierung eine Veränderung nach Behandlung mit rhEPO oder cEPO-Fc (Abb. 38). Es sind auch keine Unterschiede zwischen den verwendeten Erythropoetinabkömmlingen hinsichtlich der HIF-1 α -Expression detektierbar.

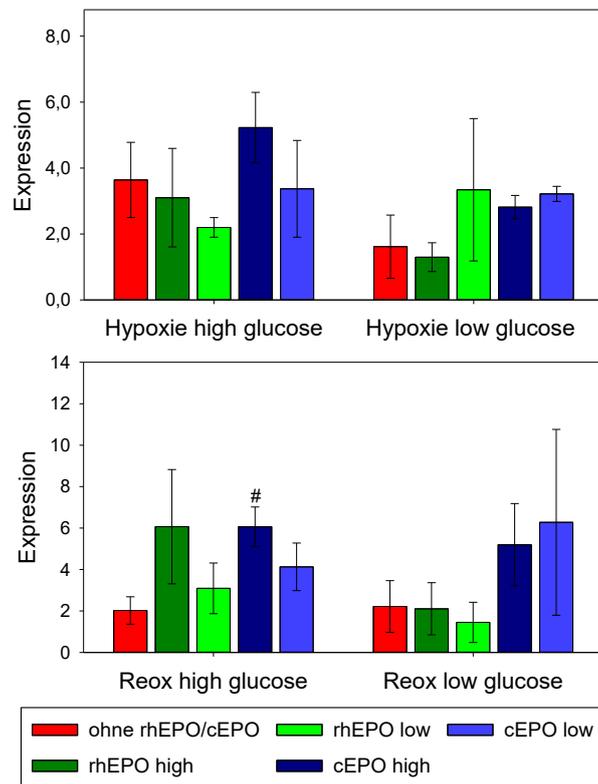


Abb. 39: Caspase 3-Expression in Neuro-2A nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative Caspase 3-Expression im Westernblot nach 24 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in Neuro-2A. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3, # = signifikanter Unterschied zur Gruppe ohne rhEPO/cEPO-Fc der jeweiligen Glukosekonzentration p < 0,05.

Abkürzungen: cEPO = carbamylirtes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Im Vergleich dazu ist in Abbildung 39 zu sehen, dass unter Behandlung mit einer hohen cEPO-Fc-Konzentration nach Reoxygenierung in der Gruppe *high glucose* eine signifikant höhere Caspase 3-Expression als ohne Behandlung mit einem Erythropoetin vorliegt. Auch wenn nicht statistisch relevant liegen die Mittelwerte der Caspase 3-Expression nach Hypoxie zu beiden Glukosekonzentrationen und nach Reoxygenierung zu einer niedrigen Glukosekonzentration unter Zusatz einer hohen cEPO-Fc-Konzentration über der jeweiligen Referenz. Da es sich bei Caspase 3 um ein proapoptotisches Protein handelt, kann anhand ihrer hier dargestellten Expression nicht auf eine verringerte Apoptoserate nach Einsatz von rhEPO oder cEPO-Fc geschlossen werden. Eher Gegenteiliges, zumindest für die Verwendung einer hohen Glukose- und cEPO-Fc-Konzentration nach Reoxygenierung, ist diskutierbar.

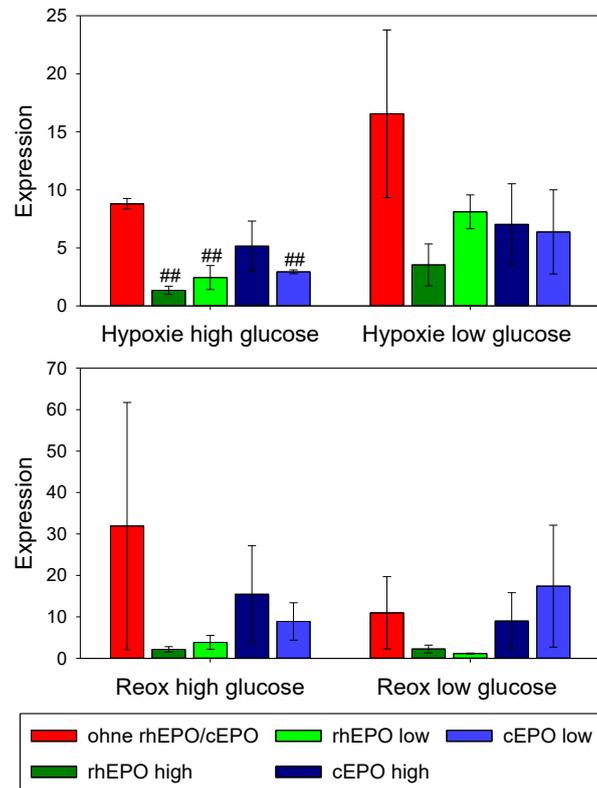


Abb. 40: *Cleaved* Caspase 3-Expression in Neuro-2A nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative *Cleaved* Caspase 3-Expression im Westernblot nach 24 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in Neuro-2A. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3, bis auf Hypoxie und Reox *low glucose* ohne rhEPO/cEPO: n = 2, ## = signifikanter Unterschied zur Gruppe ohne rhEPO/cEPO-Fc der jeweiligen Glukosekonzentration p < 0,001.

Abkürzungen: cEPO = carbamyliertes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Anders verhält es sich bei der Expression der aktivierten Form von Caspase 3, der *Cleaved* Caspase 3, wie in Abbildung 40 zu sehen ist. Unmittelbar nach Hypoxie mit einer hohen Glukosekonzentration ist eine signifikant erniedrigte Expression unter Zusatz von rhEPO beider Konzentrationen und von cEPO-Fc einer niedrigen Konzentration zu verzeichnen. Auch die Mittelwerte nach Hypoxie zu einer niedrigen Glukosekonzentration sind nach Behandlung mit rhEPO und cEPO-Fc kleiner verglichen mit der Referenz. Allerdings ist diese Beobachtung nicht statistisch signifikant, genauso wie die geringeren Mittelwerte unter Zusatz von rhEPO nach Reoxygenierung. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der *Cleaved* Caspase 3-Expression zwischen rhEPO und cEPO-Fc oder zwischen der Verwendung einer hohen oder niedrigen Konzentration sind nicht nachweisbar.

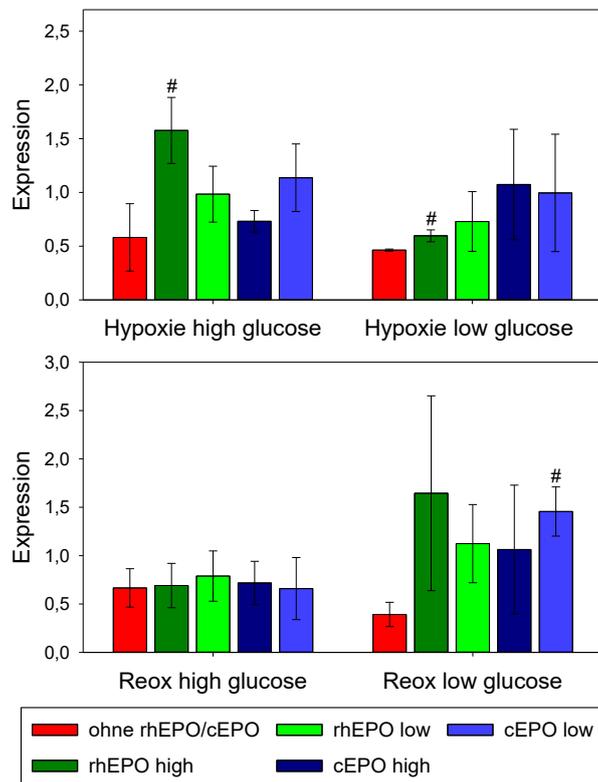


Abb. 41: Caspase 9-Expression in Neuro-2A nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative Caspase 9-Expression im Westernblot nach 24 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in Neuro-2A. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3, # = signifikanter Unterschied zur Gruppe ohne rhEPO/cEPO-Fc der jeweiligen Glukosekonzentration $p < 0,05$.

Abkürzungen: cEPO = carbamylirtes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Wie Abbildung 41 zu entnehmen ist, kann, wie für die Expression von Caspase 3, keine erniedrigte Expression von Caspase 9, als weiterem proapoptotischen Protein, nach Behandlung mit rhEPO oder cEPO-Fc im Vergleich zur Referenz nach Hypoxie und Reoxygenierung festgestellt werden. Unmittelbar nach 24 Stunden Hypoxie ist sogar die Expression unter Zusatz einer hohen rhEPO-Konzentration höher als ohne Zusatz, unabhängig von der Glukosekonzentration. Nach Reoxygenierung der Gruppe *low glucose* ist die Caspase 9-Expression außerdem bei Zusatz einer niedrigen cEPO-Fc-Konzentration im Vergleich zur Referenz gesteigert. Ein Unterschied unter den verwendeten Erythropoetinabkömmlingen oder deren Konzentrationen ist nicht auszumachen.

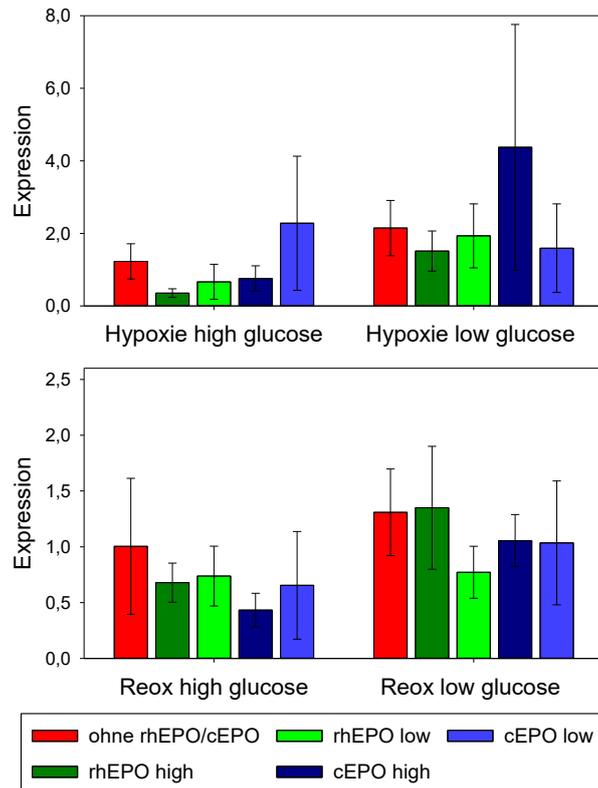


Abb. 42: AMPKβ1-Expression in Neuro-2A nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative AMPKβ1-Expression im Westernblot nach 24 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (4,5 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in Neuro-2A. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3. Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der AMPKβ1-Expression bei Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc im Vergleich zur Gruppe ohne Zusatz.

Abkürzungen: cEPO = carbamyliertes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

In Abbildung 42 ist die Expression von AMPKβ1 dargestellt. Unter Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc ist keine Veränderung der AMPKβ1-Expression nach Hypoxie oder Reoxygenierung zu verzeichnen.

Resümierend lässt sich hinsichtlich der Wirkung von rhEPO und cEPO-FC auf das Expressionsprofil der Zelllinie Neuro-2A nur eine erniedrigte Expression der *Cleaved* Caspase 3 unmittelbar nach Hypoxie zu einer hohen Glukosekonzentration nachweisen. Dies gilt für rhEPO und für eine niedrige Konzentration von cEPO-Fc. Es ist sogar eine erhöhte Caspase 9-Expression unter Zusatz einer hohen rhEPO-Konzentration unmittelbar nach Hypoxie festzustellen und auch die Caspase 3-Expression ist unter Zusatz einer hohen cEPO-Fc-Konzentration nach Reoxygenierung in der Gruppe *high glucose* erhöht. Keine Änderungen der AMPKβ1- oder HIF-1α-Expression sind unter dem Einfluss der Erythropoetinderivate festzustellen.

3.4.3 Westernblots der Zelllinie SH-SY5Y

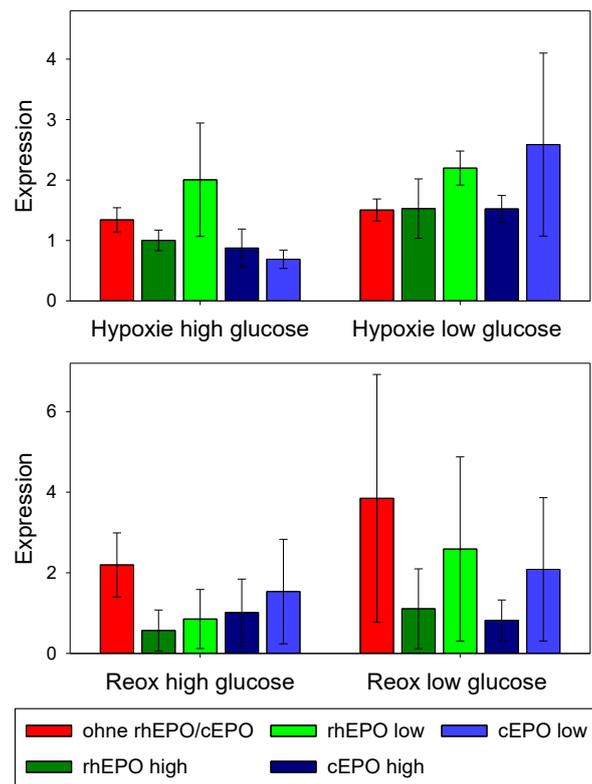


Abb. 43: HIF-1 α -Expression in SH-SY5Y nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative HIF-1 α -Expression im Westernblot nach 72 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 μ g/ml, *low* = 0,2 μ g/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in SH-SY5Y. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3. Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der HIF-1 α -Expression bei Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc im Vergleich zur Gruppe ohne Zusatz.

Abkürzungen: cEPO = carbamyliertes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

In Abbildung 43 ist die HIF-1 α -Expression der Zellreihe SH-SY5Y nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO und cEPO-Fc dargestellt. Weder rhEPO noch cEPO-Fc üben eine signifikante Wirkung hinsichtlich der HIF-1 α -Expression aus. Allenfalls erniedrigte Mittelwerte unter Zusatz einer hohen rhEPO-Konzentration nach 3 Stunden Reoxygenierung sind zu erkennen, die aber statistisch gesehen auch durch Zufall entstanden sein können.

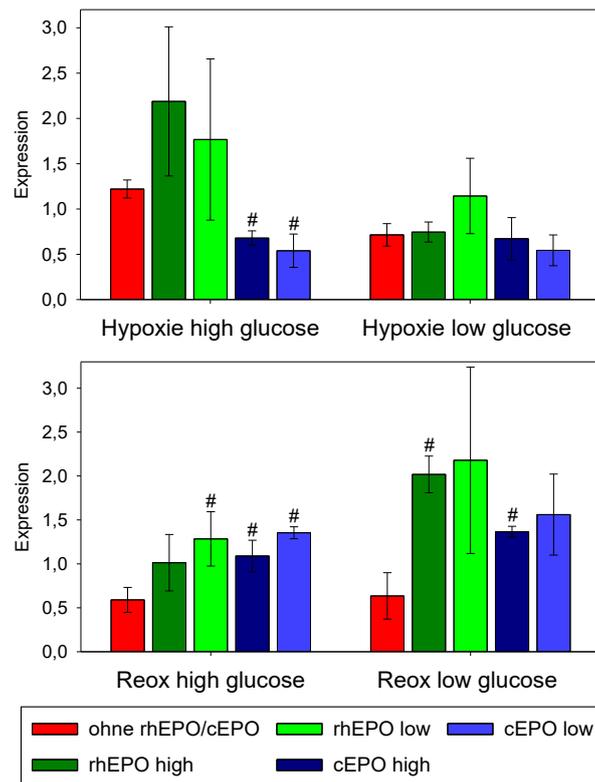


Abb. 44: Caspase 3-Expression in SH-SY5Y nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative Caspase 3-Expression im Westernblot nach 72 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in SH-SY5Y. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3, # = signifikanter Unterschied zur Gruppe ohne rhEPO/cEPO-Fc der jeweiligen Glukosekonzentration $p < 0,05$.

Abkürzungen: cEPO = carbamyliertes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Anders verhält es sich bei der Expression von Caspase 3 unter Einfluss der Erythropoetinabkömmlinge (Abb. 44). Ein signifikanter Abfall ist unter Zusatz von cEPO-Fc zu beiden Konzentrationen nach Hypoxie mit einer hohen Glukosekonzentration zu vernehmen. Dies trifft nicht auf den Einsatz von rhEPO zu, ein signifikanter Unterschied liegt in den Hypoxiegruppen im Vergleich zur Referenz nicht vor. Im Gegensatz zur Hypoxie ist die Caspase 3-Expression nach Reoxygenierung unter dem Einfluss von cEPO-Fc gesteigert. Dies betrifft bei der Gruppe *high glucose* beide eingesetzten Konzentrationen und bei der Gruppe *low glucose* nur die hohe Konzentration an cEPO-Fc. Außerdem ist nach Reoxygenierung eine vermehrte Expression durch Einsatz einer niedrigen rhEPO-Konzentration in der Gruppe *high glucose* und durch den Einsatz einer hohen rhEPO-Konzentration in der Gruppe *low glucose* zu sehen.

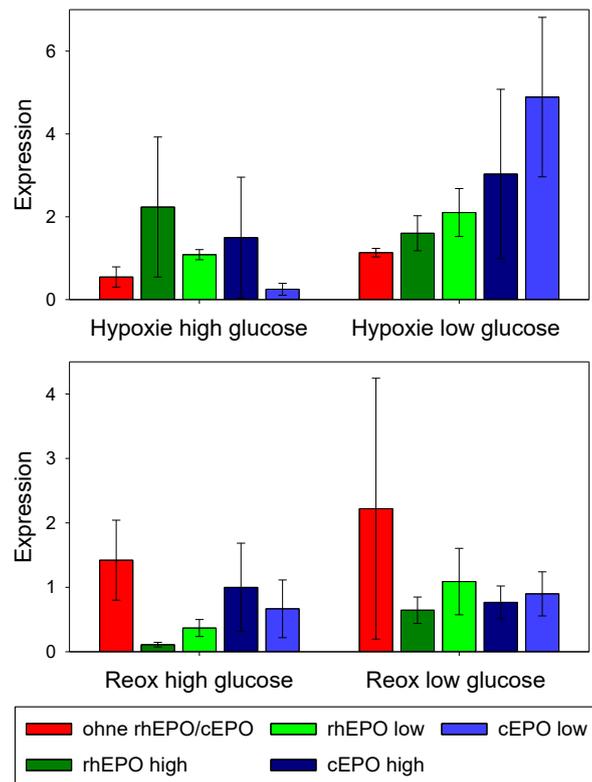


Abb. 45: Caspase 9-Expression in SH-SY5Y nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative Caspase 9-Expression im Westernblot nach 72 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in SH-SY5Y. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3. Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Caspase 9-Expression bei Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc im Vergleich zur Gruppe ohne Zusatz.

Abkürzungen: cEPO = carbamylirtes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Im Gegensatz dazu ist in Abbildung 45 die Caspase 9-Expression betreffend kein signifikanter Unterschied nach Behandlung mit einem der Erythropoetinderivate zu erkennen. Nach Reoxygenierung ist unter Zusatz einer hohen rhEPO-Konzentration ein geringerer Mittelwert als in der Referenz ohne Einsatz eines Erythropoetins zu sehen, allerdings ist diese Veränderung nicht statistisch signifikant.

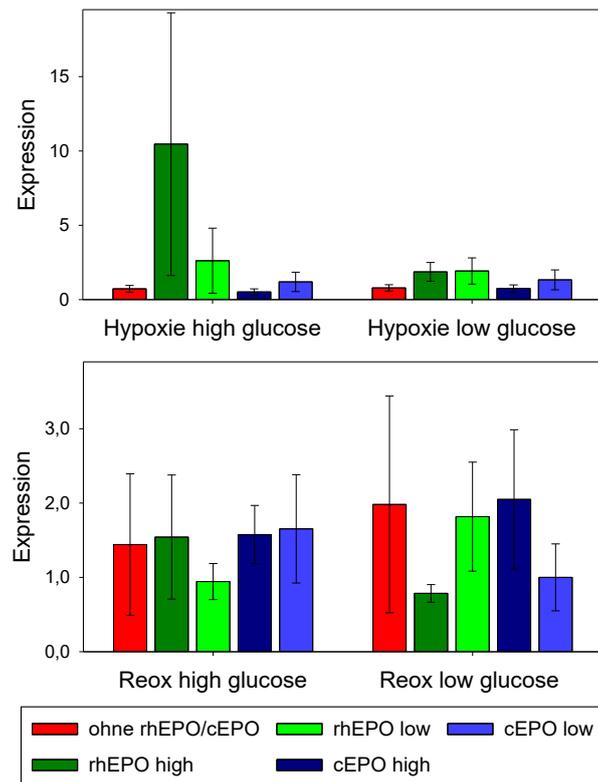


Abb. 46: AMPKβ1-Expression in SH-SY5Y nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative AMPKβ1-Expression im Westernblot nach 72 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in SH-SY5Y. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 4 aus 3 biologischen Replikaten. Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der AMPKβ1-Expression bei Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc im Vergleich zur Gruppe ohne Zusatz.

Abkürzungen: cEPO = carbamylirtes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Auch die Expression von AMPKβ1 weist nach Behandlung mit rhEPO oder cEPO-Fc weder nach Hypoxie noch nach Reoxygenierung signifikante Veränderungen auf (Abb. 46). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der AMPKβ1-Expression der Zelllinie Neuro-2A (Abb. 42). In diesem Zusammenhang ist herauszustellen, dass in beiden Zelllinien die AMPKβ1-Expression zumindest nach Hypoxie zu den gegebenen Bedingungen weder unter Verwendung einer hohen noch einer niedrigen Glukosekonzentration Veränderungen im Vergleich zur normoxischen Kontrolle bot (Abb. 12 u. 13).

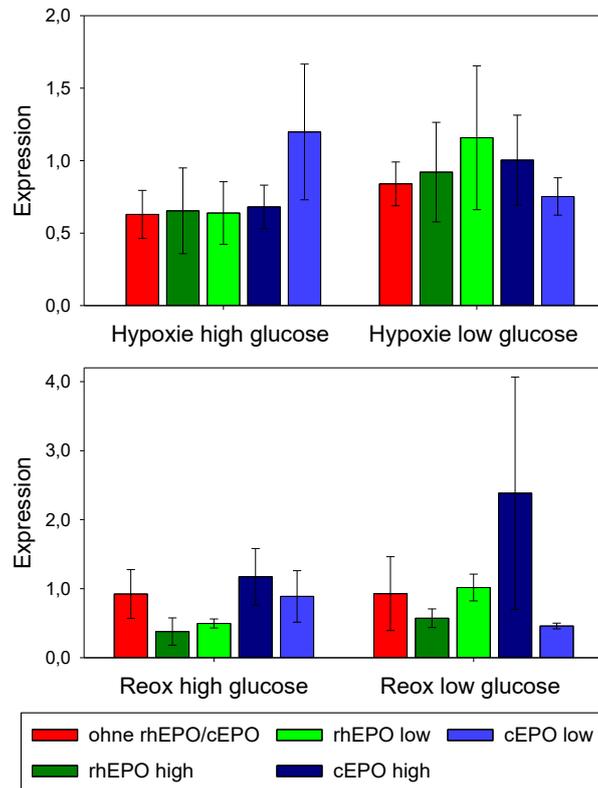


Abb. 47: Smac/DIABLO-Expression in SH-SY5Y nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative Smac/DIABLO-Expression im Westernblot nach 72 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in SH-SY5Y. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 4 aus 3 biologischen Replikaten. Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Smac/DIABLO-Expression bei Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc im Vergleich zur Gruppe ohne Zusatz.

Abkürzungen: cEPO = carbamyliertes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Wie bei der Expression von AMPKβ1 und Caspase 9 sind keine signifikanten Unterschiede der Smac/DIABLO-Expression nach Behandlung mit rhEPO oder cEPO-Fc im Vergleich zur Referenz ohne Zusatz eines Erythropoetins nachweisbar (Abb. 47).

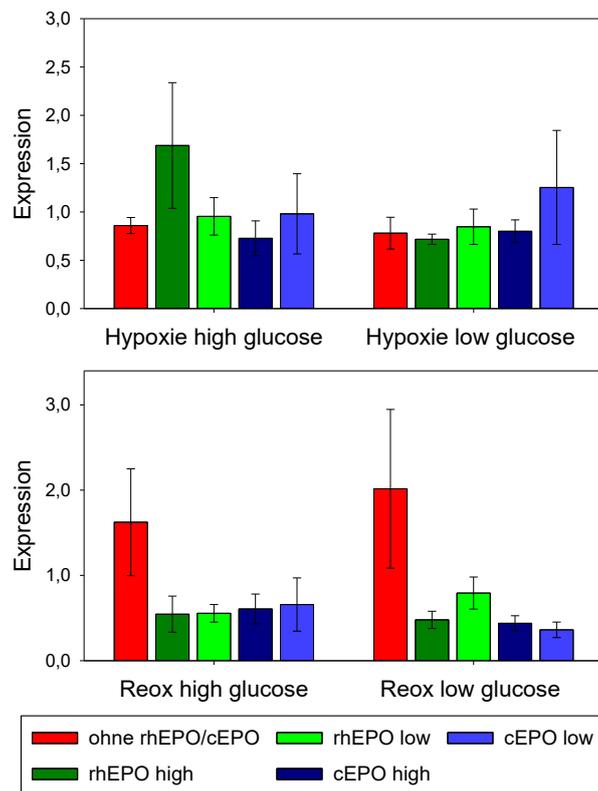


Abb. 48: Bcl-2-Expression in SH-SY5Y nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative Bcl-2-Expression im Westernblot nach 72 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in SH-SY5Y. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 6 aus 3 biologischen Replikaten. Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Bcl-2-Expression bei Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc im Vergleich zur Gruppe ohne Zusatz. Abkürzungen: cEPO = carbamylirtes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

In Abbildung 48 befindet sich die Darstellung der Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Erneut sind keine signifikanten Unterschiede unter Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc im Vergleich zur Expression ohne Erhalt eines Erythropoetins feststellbar. Auch wenn keine statistische Relevanz vorliegt, ist zu erwähnen, dass sich die Mittelwerte unter Zusatz beider Erythropoetinderivate nach drei Stunden Reoxygenierung unterhalb des Niveaus der Referenzgruppe ohne rhEPO und cEPO-Fc befinden. Da es sich bei Bcl-2 um ein antiapoptotisches Protein handelt, wäre bei einem positiven Einfluss der Erythropoetine eher Gegenteiliges zu erwarten.

In Zusammenschau der Ergebnisse für die Zelllinie SH-SY5Y lässt sich feststellen, dass lediglich für die Expression von Caspase 3 signifikante Unterschiede nach Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc zu detektieren sind. Unmittelbar nach Hypoxie zu einer hohen Glukosekonzentration ist eine Erniedrigung der Expression nach

Behandlung mit cEPO-Fc beider Konzentrationen zu erkennen. Im Kontrast dazu ist nach Reoxygenierung die Caspase 3-Expression der Gruppe *high glucose* unter Zusatz beider cEPO-Fc-Konzentrationen und der niedrigeren rhEPO-Konzentration und die der Gruppe *low glucose* zur jeweils hohen Konzentration beider Erythropoetinderivate gesteigert. Dass eines der Erythropoetine zu weniger apoptotischem Geschehen führt, ließe sich somit allenfalls für cEPO-Fc unmittelbar nach Hypoxie zu einer hohen Glukosekonzentration postulieren. Allerdings scheint sich dieser Effekt bereits nach drei Stunden Reoxygenierung umzukehren.

3.4.4 Westernblots der Zelllinie IMR-32

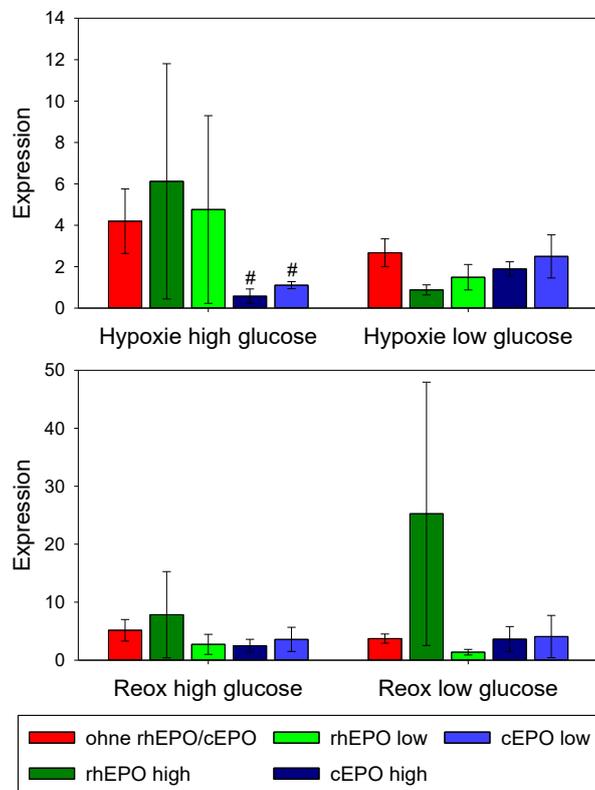


Abb. 49: HIF-1 α -Expression in IMR-32 nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative HIF-1 α -Expression im Westernblot nach 48 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 μ g/ml, *low* = 0,2 μ g/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in IMR-32. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3: Hypoxie *high glucose* ohne rhEPO/cEPO-Fc und Hypoxie *low glucose* cEPO-Fc *low*, n = 2: alle Proben mit rhEPO und alle Reox-Proben mit rhEPO oder cEPO-Fc, n = 4 (aus 3 biologischen Replikaten): restliche Proben. # = signifikanter Unterschied zur Gruppe ohne rhEPO/cEPO-FC der jeweiligen Glucosekonzentration p < 0,05.

Abkürzungen: cEPO = carbamylirtes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Betrachtet man die HIF-1 α -Expression der Zelllinie IMR-32 nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc (Abb. 49), ist eine signifikant erniedrigte Expression unter Zusatz von cEPO-Fc unmittelbar nach 48 Stunden Hypoxie zu einer hohen Glukosekonzentration zu ermitteln. Dies lässt sich weder auf die Hypoxie zu einer niedrigen Glukosekonzentration noch auf die Reoxygenierung übertragen. Für den Einsatz von rhEPO liegen keine signifikanten Unterschiede vor. Allerdings sind die Mittelwerte der HIF-1 α -Expression nach Behandlung mit rhEPO nach Hypoxie der Gruppe *high glucose* und nach Reoxygenierung im Vergleich zur Referenz erhöht mit einer breiten Varianz der Werte.

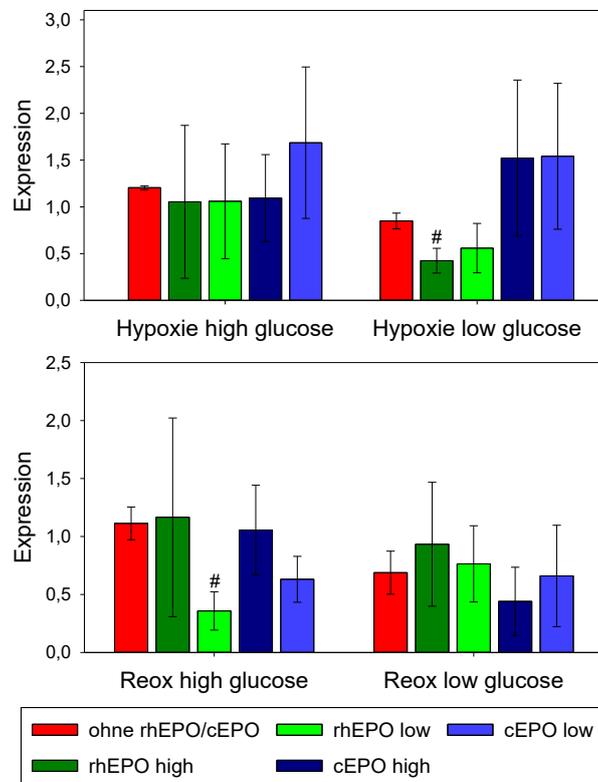


Abb. 50: Caspase 3-Expression in IMR-32 nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative Caspase 3-Expression im Westernblot nach 48 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 μ g/ml, *low* = 0,2 μ g/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in IMR-32. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3 bis auf Hypoxie *high glucose* und Hypoxie *low glucose* cEPO-Fc low (n = 2), # = signifikanter Unterschied zur Gruppe ohne rhEPO/cEPO-Fc der jeweiligen Glucosekonzentration p < 0,05. Abkürzungen: cEPO = carbamylisiertes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Im Vergleich liegen keine signifikanten Änderungen in der Caspase 3-Expression unter Einsatz von cEPO-Fc vor (Abb. 50). Aber der Graphik ist eine erniedrigte

Expression nach Behandlung mit einer hohen Konzentration an rhEPO unmittelbar nach Hypoxie zu einer niedrigen Glukosekonzentration und nach Behandlung mit einer niedrigen Konzentration an rhEPO nach Reoxygenierung der Gruppe *high glucose* zu entnehmen. Die erniedrigte Expression ist nicht auf die jeweils andere Glukosekonzentration replizierbar. Im direkten, statistischen Vergleich sind keine Unterschiede zwischen den beiden Erythropoetinderivaten oder den verwendeten Konzentrationen nachzuweisen.

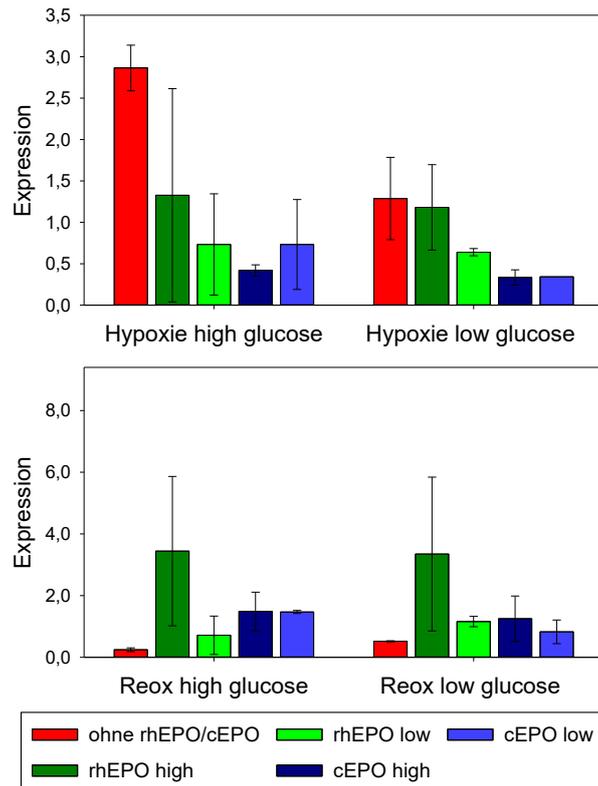


Abb. 51: Caspase 9-Expression in IMR32 nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative Caspase 9-Expression im Westernblot nach 48 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in IMR-32. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 2 bis auf Hypoxie *low glucose* cEPO-FC *low* (n = 1). Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Caspase 9-Expression bei Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc im Vergleich zur Gruppe ohne Zusatz.

Abkürzungen: cEPO = carbamylirtes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Anders als für die Caspase 3-Expression ist für die Expression der Caspase 9 gar keine statistisch signifikante Änderung unter Zusatz eines der beiden Erythropoetine festzustellen (Abb. 51). Nach Reoxygenierung beider Glukosegruppen ist eine Erhöhung der Mittelwerte nach Behandlung mit einer hohen rhEPO-Konzentration zu sehen. Auch wenn dieser Umstand keine

statistische Signifikanz besitzt, könnte eine vorsichtige Parallele zur Zelllinie Neuro-2A gezogen werden, bei welcher eine erhöhte Caspase-9-Expression unter Zusatz einer hohen rhEPO-Konzentration unmittelbar nach Hypoxie vorliegt (Abb. 41). Auch hier könnte die fehlende Signifikanz auf eine geringe Stichprobenzahl zurückzuführen sein.

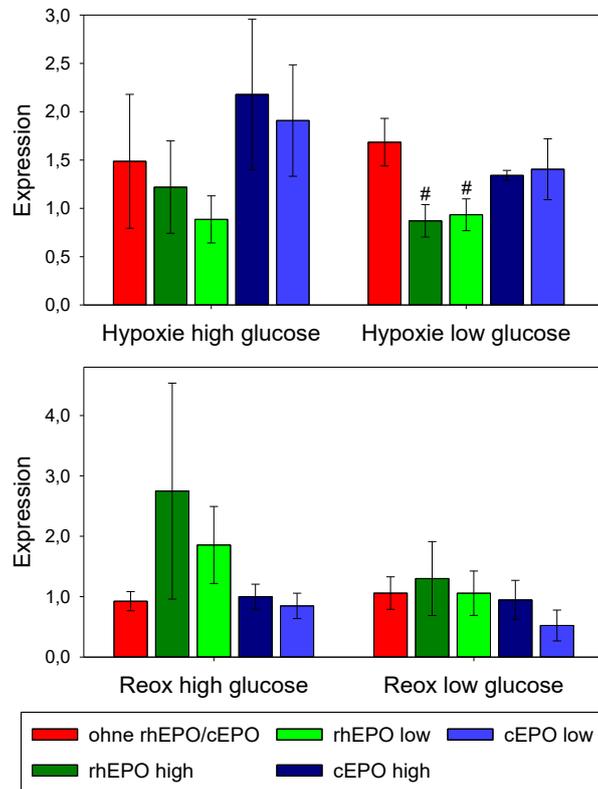


Abb. 52: Smac/DIABLO-Expression in IMR-32 nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative Smac/DIABLO-Expression im Westernblot nach 48 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-Fc (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in IMR-32. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, n = 3 bis auf Hypoxie *high glucose* ohne rhEPO/cEPO-FC und Hypoxie *low glucose* cEPO-Fc low (n = 2), # = signifikanter Unterschied zur Gruppe ohne rhEPO/cEPO-Fc der jeweiligen Glukosekonzentration p < 0,05.

Abkürzungen: cEPO = carbamyliertes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Bei Beleuchtung der Smac/DIABLO-Expression, zu sehen in Abbildung 52, fällt eine signifikant erniedrigte Expression unter Zusatz mit rhEPO beider Konzentrationen unmittelbar nach 48 Stunden Hypoxie zu einer niedrigen Glukosekonzentration auf. Dieser Effekt tritt nach Reoxygenierung unabhängig der Glukosekonzentration nicht auf, die Mittelwerte unter Zusatz mit rhEPO liegen sogar über der Referenz, ohne statistische Signifikanz. Der Einsatz von cEPO-Fc übt in diesem Fall keinen Einfluss auf die Expression von Smac/DIABLO nach

Hypoxie oder Reoxygenierung aus. Es können zudem im direkten Vergleich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Behandlung von rhEPO und cEPO-Fc oder zwischen den verwendeten Konzentrationen festgestellt werden.

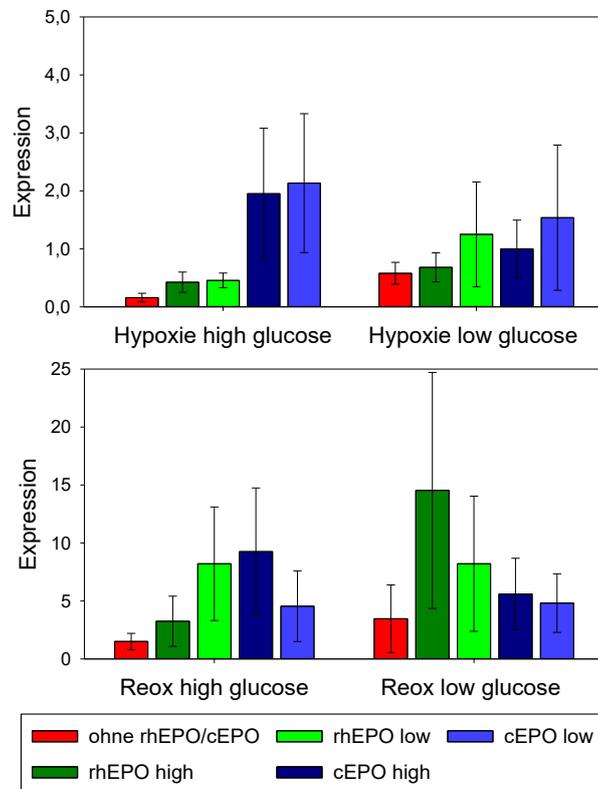


Abb. 53: Bcl-2-Expression in IMR-32 nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Zusatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc

Relative Bcl-2-Expression im Westernblot nach 48 h Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % (oben) und nach 3 h Reoxygenierung (unten) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2 und 1 g/l) und Zusatz von rhEPO (*high* = 20 IU/ml und *low* = 0,2 IU/ml) und cEPO-FC (*high* = 20 µg/ml, *low* = 0,2 µg/ml) im Verhältnis zu Normoxie *high glucose* in IMR-32. Darstellung der Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler, Hypoxie *high glucose* ohne rhEPO/cEPO-Fc und Hypoxie *low glucose* cEPO-Fc *low*: n = 3 aus 2 biologischen Replikaten, Hypoxie *high glucose* rhEPO *high*, Hypoxie *low glucose* ohne rhEPO/cEPO-Fc, Reox *high* und *low glucose* ohne rhEPO/cEPO-Fc: n = 5 aus 3 biologischen Replikaten, ansonsten n = 6 aus 3 biologischen Replikaten. Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Bcl-2-Expression bei Zusatz von rhEPO oder cEPO-Fc im Vergleich zur Gruppe ohne Zusatz.

Abkürzungen: cEPO = carbamyliertes EPO-Fc, Reox = Reoxygenierung

Im Gegensatz zur Expression proapoptotischer Proteine, wäre bei einer apoptosehemmenden Wirkung der Erythropoetinderivate eine erhöhte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 zu erwarten, welche in Abbildung 53 dargestellt ist. Auch wenn unter jedem Zusatz eines Erythropoetins sowohl nach Hypoxie als auch nach Reoxygenierung die Mittelwerte höher liegen als ohne Zusatz, ist keine statistisch signifikante Änderung der Bcl-2-Expression nachzuweisen.

Es ist festzuhalten, dass im Expressionsprofil pro- und antiapoptotischer Proteine der Linie IMR-32 die Veränderungen unter Zusatz von rhEPO und cEPO-Fc inkonsistent sind. Unter Einsatz von cEPO-Fc lässt sich eine erniedrigte HIF-1 α -Expression feststellen, aber nur unmittelbar nach Hypoxie mit einer hohen Glukosekonzentration. Eine Erniedrigung der Smac/DIABLO-Expression ist nur nach Hypoxie der Gruppe *low glucose* unter Zusatz von rhEPO beider Konzentrationen zu verzeichnen. Eine Erniedrigung der Caspase 3-Expression liegt lediglich unter Zusatz einer hohen rhEPO-Konzentration nach Hypoxie zu einer niedrigen Glukosekonzentration und unter Zusatz einer niedrigen rhEPO-Konzentration nach Reoxygenierung zu einer hohen Glukosekonzentration vor.

4 Diskussion

4.1 Bestimmung der idealen Sauerstoffkonzentration

Am Anfang der Versuchsreihe stand die Ermittlung der i. S. des OGD-Modells idealen Sauerstoffkonzentration während der Hypoxiephase. Zum Zweck von Praktikabilität sollte dieselbe Sauerstoffkonzentration für alle drei Zellreihen bestimmt werden, sodass Versuche parallel in der Hypoxiebank laufen konnten. Die Hypoxiezeiten wurden zuvor von Timbul (2023) in Vorversuchen ermittelt und für die vorliegende Arbeit übernommen [75]. Ziel war es, eine Sauerstoffkonzentration für die Hypoxiephase der Folgeversuche zu bestimmen, die einen nachweislich hypoxischen Schaden und apoptotisches Zellsterben verursacht, da rhEPO und cEPO-Fc vorwiegend eine antiapoptotische Wirkung zugeschrieben wird [57, 63]. Ein Überwiegen von nekrotischem Zelltod sollte bei der Wahl der Sauerstoffkonzentration vermieden werden. Timbul (2023) konnte bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,1 % hypoxische Schäden nachweisen, allerdings blieb eine ausreichende Apoptoseinduktion aus [75]. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass es sich bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,1 % eher um anoxische als um hypoxische Bedingungen handelt und die Zellen aufgrund des starken Stressreizes mehrheitlich nekrotisch wurden. Aus diesem Grund wurden für die Versuche zur Ermittlung der idealen Sauerstoffkonzentration höhere Konzentrationen von 0,5, 2 und 5 % gewählt. Zusätzlich erfolgte zur Nachahmung des Energiemangels während einer Ischämie die Inkubation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (*high*, *low* und *no glucose*) während der Hypoxiephase.

Im ersten Schritt sollte mithilfe der Viabilitätsassays (MTT- und WST-Assay) das allgemeine Überleben von stoffwechselaktiven Zellen nach Hypoxieexposition mit den drei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen untersucht werden ohne Aussagekraft über den Modus des Zelltodes. Im MTT-Assay konnte bei der Zelllinie Neuro-2A zu jeder untersuchten Sauerstoffkonzentration eine verringerte Viabilität gemessen werden, unabhängig von der untersuchten Glukosekonzentration. Im Sinne des Modells konnte zu jeder untersuchten Sauerstoffkonzentration ein negativer Einfluss der Hypoxie nachgewiesen werden, ein signifikanter Unterschied zwischen den verwendeten Sauerstoffkonzentrationen konnte nicht detektiert werden. Anders verhielt es sich bei der Zelllinie SH-SY5Y. Nach Exposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 5 % während der Hypoxiephase konnte kein Unterschied in der Absorption bzw. Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Es ist zu vermuten, dass eine Hypoxie zu 5 % Sauerstoff keinen ausreichenden Stressreiz setzt, um Zellen der Linie SH-SY5Y hinsichtlich ihrer Viabilität zu schaden.

Erstaunlicherweise verhielt sich die Absorption beim WST-Assay in der Zelllinie IMR-32 konträr. Nach Hypoxie zu 2 % Sauerstoff war in den Gruppen *high glucose* und *low glucose* die Absorption signifikant höher als in der normoxischen Kontrollgruppe. Das Gleichsetzen der gemessenen Absorption mit der Zellviabilität würde in diesem Fall bedeuten, dass nach Hypoxie der Anteil lebender, stoffwechselaktiver Zellen an der Zellpopulation höher ist als in der normoxischen Kontrolle, die Hypoxie hinsichtlich der Zellviabilität somit einen Benefit für die Zellen darstellen würde. Auch Weir et al. (2011) konnten eine deutlich erhöhte Absorption im WST-Assay nach Hypoxieexposition in Keratinozyten feststellen ohne eine Zunahme der Zellproliferation [87]. Dies mag an der Tatsache liegen, dass Superoxide den WST-Farbstoff direkt in Formazan reduzieren können [88, 89]. Es ist zu vermuten, dass die erhöhte Umsetzung des WST-Farbstoffs nach Hypoxie nicht an einer höheren Zellviabilität, sondern am oxidativen Stress lag. Der WST-Assay wurde aus diesem Grund von den weiteren Experimenten ausgeschlossen und kann zur Messung der Viabilität in Hypoxieversuchen nicht empfohlen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in alleiniger Betrachtung der Viabilitätsassays für die weiteren Versuche die beiden Sauerstoffkonzentrationen 0,5 und 2 % in Frage kamen. Denn Ziel war es, eine verminderte Viabilität nach Hypoxie nachzuweisen, auf die der Einsatz von rhEPO bzw. cEPO-Fc einen

positiven Einfluss ausüben könnte. Dies konnte für die Zelllinie SH-SY5Y zu einer Sauerstoffkonzentration von 5 % nicht nachgewiesen werden.

Für den Ausschluss einer Sauerstoffkonzentration von 5 % sprechen auch die Ergebnisse der Westernblots. Betrachtet man die Expressionen von HIF-1 α und Caspase 3 zu den unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen, fällt auf, dass bei einer Konzentration von 5 % lediglich in der Zelllinie IMR-32 unter Verwendung einer niedrigen Glukosekonzentration eine signifikante, wenn auch minimale Caspase 3-Expressionserhöhung vorlag. Außerdem war diese unter Hypoxie mit 2 % Sauerstoff ausgeprägter und betraf alle Glukosekonzentrationen. Obwohl in gängiger Zellkultur die Inkubation der Zellen in annähernd atmosphärischer Sauerstoffkonzentration erfolgt und diese Bedingungen als Normoxie verstanden werden, ist zu beachten, dass die tatsächliche Sauerstoffkonzentration im Gewebe *in vivo* deutlich niedriger ist [90]. Eine Sauerstoffkonzentration von 5 % kann im zentralen Nervensystem als physiologisch angesehen werden [91]. Daraus lässt sich folgern, dass eine Exposition mit 5 % Sauerstoff weniger einer Hypoxie i. S. des Modells entspricht, sondern normoxischen bzw. physiologisch hypoxischen Bedingungen [90]. Es lässt sich vermuten, dass eine Sauerstoffkonzentration von 5 % nicht niedrig genug ist, um die Expression von HIF-1 α oder Caspase 3 ausreichend zu steigern. Allerdings ist auch zu beachten, dass die perizelluläre Sauerstoffkonzentration im Medium nicht der in der Umgebungsluft entspricht, sondern niedriger ist [92].

In Betrachtung der HIF-1 α - und Caspase 3-Expressionen zu 0,5 und 2 % Sauerstoff musste sich aufgrund fehlender, signifikanter Expressionsunterschiede auch auf Mittelwerte und Tendenzen berufen werden. Die einzig eindeutig signifikant erhöhte Caspase 3-Expression war bei 2 % Sauerstoff in IMR-32 zu allen Glukosekonzentrationen nachzuweisen. Auch wenn eine signifikant erhöhte HIF-1 α -Expression in SH-SY5Y bei 0,5 % Sauerstoff in der Gruppe *no glucose* vorlag, war diese Steigerung nur gering bei gleichzeitig signifikant reduzierter Expression zu einer hohen Glukosekonzentration. In direktem Vergleich der Sauerstoffkonzentrationen war ein signifikanter Unterschied in der Gruppe *high glucose* bezüglich der HIF-1 α -Expression in Neuro-2A zwischen 2 und 5 % zu verzeichnen. Gleiches gilt für die Caspase 3-Expression in IMR-32. In Zusammenschau lieferte die Verwendung einer Sauerstoffkonzentration von 2 % die besten Ergebnisse.

Da die Aussagekraft der im ersten Schritt gemessenen HIF-1 α - und Caspase 3-Expression aufgrund fehlender Signifikanzen und geringer Probenanzahl (n = 3) natürlich begrenzt ist, wurde in einem zweiten Schritt die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine bei einer Sauerstoffkonzentration von 2 % näher untersucht. Timbul (2023) konnte eine gesteigerte HIF-1 α -Expression nach Hypoxie mit einer Sauerstoffkonzentration von 0,1 % unter Verwendung einer hohen Glukosekonzentration in den Zelllinien IMR-32 und SH-SY5Y nachweisen [75]. In der vorliegenden Arbeit war bei einer höheren Sauerstoffkonzentration von 2 % ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression nachzuweisen sowohl für die Gruppe *high* als auch *low glucose*. Somit konnte für die beiden Zelllinien auch bei einer höheren Sauerstoffkonzentration der Nachweis eines zellulären, hypoxischen Reizes nachgewiesen werden. Während die Steigerung bei Timbul (2023) in IMR-32 weniger als das doppelte betrug, war unter Verwendung von 2 % Sauerstoff eine über 6-fache Steigerung nachzuweisen (*high glucose*) [75]. Auf der anderen Seite war die Expressionssteigerung in SH-SY5Y in der Arbeit von Timbul (2023) doppelt so hoch wie in der hiesigen (*high glucose*) [75]. Die Expression von HIF-1 α in Neuro-2A ist allerdings bei der Gruppe *high glucose*, im Gegensatz zur Gruppe *low glucose*, bei einer Sauerstoffkonzentration von 2 % nicht signifikant erhöht. Auch Timbul (2023) konnte bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,1 % und hoher Glukosekonzentration keine Expressionssteigerung feststellen [75]. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass nach 24 Stunden Hypoxie HIF-1 α bereits abgebaut und der Peak vor Ablauf der 24 Stunden erreicht wurde. Allerdings wurde dies bereits von Timbul (2023) ohne Beleg einer höheren Expression zu kürzeren Hypoxiezeiten untersucht [75]. Betrachtet man die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine nach Hypoxie mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 %, ist festzustellen, dass es deutliche Hinweise gibt, dass mehr apoptotisches Zellsterben stattfindet als zu einer Sauerstoffkonzentration von 0,1 % unter ansonsten gleichen Bedingungen. Timbul (2023) konnte keine erhöhte Expression von Caspase 3, Caspase 9, *Cleaved* Caspase 9 und Smac/DIABLO nach Hypoxieexposition mit einer Sauerstoffkonzentration von 0,1 % in den untersuchten Zelllinien feststellen [75]. Im Gegensatz dazu war bei Einsatz einer Sauerstoffkonzentration von 2 % eine erhöhte Expression von Caspase 3 (*high* und *low glucose*), *Cleaved* Caspase 3 (*high glucose*) und 9 (*high glucose*) in Neuro-2A sowie von Caspase 3 (*high* und *low glucose*), Caspase 9 (*high glucose*) und Smac/DIABLO (*low glucose*) in IMR-

32 nachzuweisen. Jedoch lag bei der Zelllinie SH-SY5Y lediglich eine erhöhte Caspase 3- (*high glucose*) und eine erniedrigte Bcl-2-Expression (*high glucose*) vor, die Unterschiede waren zudem nicht beträchtlich. In ihrem OGD-Modell derselben Zelllinie konnten Cheng et al. (2014) trotz einer wesentlich niedrigeren Hypoxiezeit von 3 Stunden eine signifikant erhöhte *Cleaved* Caspase 3-Expression aufzeigen, die bei einer Hypoxiezeit von 6 Stunden ausblieb [93]. Trotz einer erhöhten HIF-1 α -Expression als Hypoxiemarker nach 72 Stunden Hypoxieexposition suggerieren diese Tatsachen, dass ein näheres Beleuchten kürzerer Zeitintervalle unter dem Aspekt der Apoptoserate für die Zelllinie SH-SY5Y sinnvoll wäre.

In der Gesamtheit konnte festgestellt werden, dass die Verwendung einer Sauerstoffkonzentration von 2 % hinsichtlich des apoptotischen Geschehens in dem vorliegenden Modell die günstigsten Ergebnisse bot und Vorteile gegenüber einer Sauerstoffkonzentration von 0,1 % aufwies. Folglich wurde für die Folgeversuche eine Sauerstoffkonzentration von 2 % zur Hypoxieinduktion festgelegt.

4.2 Auswirkungen der unterschiedlichen Glukosekonzentrationen

Werden Ischämie und Reperfusion in zellkulturellen Modellen nachgestellt, so wird die Phase der Ischämie als Hypoxie, d. h. der Exposition eines sauerstoffarmen Milieus, nachgeahmt. Neben der im engeren Sinne hypoxischen Bedingungen kommt es während der Ischämie auch zu einem Mangel an Energiesubstraten z. B. in Form von Glukose. Um diesem Umstand gerecht zu werden, findet das OGD-Modell (*oxygen and glucose deprivation*) in der Literatur Anwendung [64]. In vielen Modellen werden die Zellen einem gänzlich von Glukose befreitem Medium ausgesetzt. So kam bei den Experimente von Wu et al. (2020) und He et al. (2017) eine Glukosekonzentration von 0 g/l zum Einsatz [71, 94]. Um die Auswirkungen unterschiedlicher Glukosekonzentrationen während einer Hypoxie näher zu untersuchen, kamen in den Versuchen der vorliegenden Arbeit drei Glukosekonzentrationen zur Anwendung. Eine Gruppe erhielt während der Hypoxiephase ihre für die gängige Zellkultur reguläre Glukosekonzentrationen, eine Gruppe eine herabgesetzte, mindestens halbierte Glukosekonzentration und eine Gruppe wurde während der Hypoxiephase in glukosefreiem Medium kultiviert. Das Zellkulturmodell sollte zum einen die pathophysiologischen Bedingungen

während Hypoxie möglichst authentisch nachstellen, zum anderen ist die Induktion von Apoptose, als möglicher Angriffspunkt von rhEPO und cEPO-Fc entscheidend. Welche Glukosekonzentration den Bedingungen einer Ischämie im Rückenmark am ehesten entspricht, ist schwer zu ermitteln. Bäckström et al. (2001) konnten in einem Schweinemodell einen Abfall der Glukosekonzentration im Liquor auf minimal 20 % nach *Cross-Clamping* der Aorta feststellen [95]. Das spiegelt jedoch nicht die Realität der lokalen Glukoseversorgung der Rückenmarksneurone wider. Abschließend ist die Frage, ob die so oft verwendete Glukosekonzentration von 0 g/l in zellkulturellen OGD-Modellen der Realität einer Rückenmarksischämie entspricht, nicht zu beantworten.

In der hiesigen Arbeit wurde die Gruppe *no glucose* nach Initialversuchen von weiteren Experimenten ausgeschlossen. Zum einen gestaltete sich die Generierung von Proteinen zur Durchführung des Westernblots problematisch, da nach Hypoxie ohne Glukose kaum Protein zur weiteren Untersuchung mehr vorhanden war. Die Kombination aus beiden Stressreizen hat zu massivem Zellsterben geführt. Allein der absolute Glukosemangel ohne Hypoxie führte bereits zu einer deutlichen Stressreaktion, wie man beispielhaft in Abbildung 15 erkennen kann. Betrachtet man die Zellviabilität unter normoxischen Bedingungen, ist diese bei der Gruppe *no glucose* in jeder Zelllinie erniedrigt. Im Sinne des Modells wären eine erniedrigte Zellviabilität und eine erhöhte Expression proapoptotischer Proteine durchaus erstrebenswert. Allerdings war keine erhöhte Expression dieser proapoptotischer Faktoren nach Hypoxie zu einer Glukosekonzentration von 0 g/l im Vergleich zu den anderen Glukosekonzentrationen feststellbar. Das heißt, dass die Verwendung eines absoluten Glukosemangels für diese Versuchsreihe keine wesentlichen Vorteile brachte, da eines der Ziele eine ausreichende Apoptoseinduktion war. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass es sich bei Apoptose um einen energieverbrauchenden Prozess handelt [41]. Diese Umstände und die Tatsache, dass nach Inkubation ohne Glukose kaum Material zur Durchführung der Westernblots zur Verfügung stand, führten zum Ausschluss der Gruppe *no glucose* von den Folgeversuchen.

Für die reguläre Zellkultur sind je nach Zellreihe 2 bzw. 4,5 g/l Glukose im Medium empfohlen. Vergleicht man diese Glukosekonzentration mit dem Blutzuckerspiegel eines Menschen, so handelt es sich eher um diabetische als um physiologische Blutzuckerkonzentrationen [96]. Auch die Verwendung von 1 g/l Glukose als

herabgesetzte Glukosekonzentration entspricht nicht der Definition einer hypoglykämischen Stoffwechsellage, für die eine Unterschreitung von mindestens 70 mg/dl (entsprechend 0,7 g/l) erforderlich wäre [97]. Dieser Umstand legt das Argument nahe, dass die hier vorliegenden Versuche mehr unter „normoglykämischen“ und „hyperglykämischen“ als unter „hypoglykämischen“ Bedingungen stattgefunden haben. Allerdings ist dabei zu beachten, dass es sich bei den verwendeten Zelllinien um immortalisierte, sich replizierende Tumorzellen handelt, die einen anderen Glukosebedarf besitzen als gesunde Zellen *in vivo* [98]. Zum anderen fand in den Versuchen die stationäre Zellkultur Anwendung. Das bedeutet, dass die Konzentration an Glukose nicht kontinuierlich aufrechterhalten, sondern diese von den Zellen aufgebraucht wurde und somit die Glukosekonzentration während der Versuche sank. Da Silva et al. (2022) konnten feststellen, dass Zellen der Linie SH-SY5Y bereits nach 24 Stunden 75 % der Glukose in der stationären Zellkultur verbraucht haben [99]. Somit konnte allenfalls zu Versuchsbeginn von einer „Hyperglykämie“ gesprochen werden.

Geht man davon aus, dass es sich bei den Glukosekonzentrationen von 4,5 g/l (für Neuro-2A) und 2 g/l (für SH-SY5Y und IMR-32) um die idealen Glukosekonzentrationen für die reguläre Zellkultur handelt, liegt der Verdacht nahe, dass eine Halbierung (IMR-32 und SH-SY5Y) bzw. Reduktion um mehr 75 % (Neuro-2A) in der Hypoxie zu einer niedrigeren Zellviabilität sowie zu einer höheren Apoptoserate führt. Dies konnte in den durchgeführten Versuchen nicht bestätigt werden. Nach Hypoxie war in keiner Zelllinie eine verringerte Viabilität der Gruppe *low glucose* im Vergleich zur Gruppe *high glucose* zu verzeichnen. Auch konnte keine signifikant erhöhte Expression von HIF-1 α oder proapoptotischer Proteine festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass eine erniedrigte Glukosekonzentration auf 1 g/l während der Hypoxiephase keinen zum Sauerstoffmangel zusätzlichen Schaden verursacht. Betrachtet man das Expressionsprofil der Zelllinie IMR-32 liegen die Mittelwerte der Expression proapoptotischer Proteine bei einer regulären Glukosekonzentration (*high glucose*) sogar höher als bei einer erniedrigten Glukosekonzentration, auch wenn kein statistisch signifikanter Unterschied zu vernehmen ist. Die Viabilität war bei Neuro-2A und IMR-32 unter normoxischen Bedingungen zu einer herabgesetzten Glukosekonzentration signifikant höher als zur regulären, hohen Glukosekonzentration, auch wenn der Unterschied nur gering ausfiel. Die Zellviabilität während der Reoxygenierungsphase in Neuro-2A lag zu jedem

Untersuchungszeitpunkt bei einer Glukosekonzentration von 1 g/l signifikant höher als bei 4,5 g/l. Das legt die Vermutung nahe, dass eine herabgesetzte Glukosekonzentration während der Hypoxie sogar einen Benefit für die Reoxygenierungsphase darstellen könnte. Bereits Robertson et al. (1987) konnten ein besseres neurologisches *Outcome* nach insulininduzierter Hypoglykämie bei Okklusion der Aorta in einem Rattenmodell feststellen [100]. Li et al. (2014) untersuchten den zytotoxischen Effekt eines Lokalanästhetikums auf SH-SY5Y in Abhängigkeit von unterschiedlichen Glukosekonzentrationen und konnten eine erhöhte ROS-Produktion, vermehrten Stress des Endoplasmatischen Retikulums und eine gesteigerte Apoptoserate bei Inkubation mit einer hohen Glukosekonzentration feststellen [101]. Dabei lag die höchste untersuchte Glukosekonzentration lediglich bei knapp umgerechnet 2,4 g/l und überstieg kaum die hier verwendete Glukosekonzentration [101]. Trotz einiger Hinweise konnte weder ein eindeutig positiver noch negativer Effekt bei Einsatz einer herabgesetzten Glukosekonzentration in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Mutmaßlich war die Abweichung der eingesetzten Glukosekonzentrationen nicht groß genug. Auf der einen Seite wäre die Verwendung einer Glukosekonzentration zwischen 0 und 1 g/l in weiteren Versuchen interessant, da ein zur Hypoxie zusätzlicher Stressreiz in der Gruppe *low glucose* nicht zu detektieren war. Auf der anderen Seite liegen Hinweise vor, dass eine erhöhte Glukosekonzentration i. S. des Modells zu mehr Zelltod führt und damit einen Angriffspunkt für Erythropoetin bieten könnte.

4.3 Bestimmung der Reoxygenierungszeit

Vor dem Hintergrund der zugrundeliegenden Mechanismen während Ischämie und Reperfusion sollte die Phase der Reoxygenierung den sogenannten *Second Hit* bei der Reperfusion nachstellen. Während in der Literatur sehr unterschiedliche Zeiten zur Hypoxieinduktion verwendet werden, wird häufig für alle drei Zelllinien eine Reoxygenierungszeit von 24 Stunden festgelegt [69, 71, 94, 102, 103]. Ob die eingesetzten Reoxygenierungszeiten auf Vorversuchen aufbauen, bleibt oft unbeantwortet. Im Sinne des Modells wäre ein Nachweis über eine von der Hypoxie zeitlich entkoppelte, zusätzliche Schädigung der Zellen ideal.

Betrachtet man die Zellviabilität der Zelllinie SH-SY5Y während der Reoxygenierung, so ist ein Abfall nicht zu verzeichnen. Die Zellviabilität stieg während des betrachteten Reoxygenierungszeitraums stetig an. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu dem Resultat von Zhi et al. (2020). Die Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss von Melatonin auf Schädigungen der Zelllinie SH-SY5Y, verursacht durch Hypoxie und Reoxygenierung [72]. Im MTT-Assay war eine kontinuierliche Abnahme der Zellviabilität während der Reoxygenierungsphase bis 30 Stunden nach Hypoxie zu verzeichnen [72]. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Resultate könnte sein, dass die neuronalen Zellen im Modell von Zhi et al. (2020) während der Hypoxie einen größeren Stressreiz widerfahren haben, da sie glukose- und sauerstofffreien Bedingungen ausgesetzt wurden und dies bis 30 Stunden nach der Hypoxiephase seine Wirkung zeigte [72]. Auf der anderen Seite waren die Zellen im hiesigen Modell ganze 72 Stunden der Hypoxie ausgeliefert, während die Hypoxiephase bei Zhi et al. (2020) lediglich 3 Stunden dauerte [72].

Im Gegensatz zur Zellviabilität der Linie SH-SY5Y sinkt die Viabilität der Neuro-2A zunächst 3 Stunden (*low glucose*) bzw. 6 Stunden (*high glucose*) nach Hypoxie weiter ab, bevor sie ansteigt. Aber auch hier ist ein zweiter Abfall im eigentlichen Sinne eines *Second Hit* nicht nachzuweisen. Betrachtet man die Ergebnisse von Li et al. (2020) so konnte die Arbeitsgruppe einen stetigen Abfall der Zellviabilität im MTT-Assay für die Zelllinie Neuro-2A während einer Reoxygenierungszeit von 12 Stunden nachweisen, ein erneuter Anstieg blieb aus [104]. Ähnlich wie Zhi et al (2020) wurde hier eine Hypoxiezeit von 3 Stunden und ein gänzlich sauerstoff- und glukosefreies Medium während der Hypoxieexposition verwendet [72, 104]. Ob die Zellviabilität nach 12 Stunden wieder ansteigen würde, bleibt offen. Auch hier ist zu diskutieren, inwiefern die Unterschiede im Versuchsaufbau für die verschiedenen Ergebnisse verantwortlich sind. Allerdings konnte in der hiesigen Versuchsreihe zumindest ein Abfall der Zellviabilität der Neuro-2A während der ersten Stunden der Reoxygenierungsphase festgestellt werden, der für die Linie SH-SY5Y ausblieb.

In Betrachtung des Expressionsprofils der Zelllinie Neuro-2A während der Reoxygenierungsphase fällt eine signifikant verringerte HIF-1 α - und Caspase 9-Expression zu den Zeitpunkten 6, 12 und 24 Stunden in der Gruppe *high glucose* sowie eine erniedrigte Expression von Smac/DIABLO nach 12 und 24 Stunden in der Gruppe *low glucose* auf. Dies spricht für eine geringere apoptotische Aktivität

und eine verminderte Aktivierung von HIF-1 im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Gleichzeitig ist allein nach 3 Stunden eine erhöhte Expression von HIF-1 α , Caspase 9 und Smac/DIABLO (*low glucose*) festzustellen. Dies spricht in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Zellviabilität eindeutig für die Verwendung einer Reoxygenierungszeit von 3 Stunden für die Zelllinie Neuro-2A. In IMR-32 war nach 12 Stunden (*low glucose*) und 24 Stunden (*high* und *low glucose*) eine erhöhte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 nachzuweisen, was ebenfalls für eine reduzierte Apoptoserate nach 12 und 24 Stunden Reoxygenierung spricht. Aus Mangel an weiteren, signifikanten Expressionsunterschieden sollen zur unterstützenden Interpretation auch nicht statistisch signifikante Tendenzen wie erhöhte Mittelwerte der Caspase 3-Expression (*high glucose*) nach 3 und 6 Stunden und bereits erhöhte Mittelwerte der Bcl-2-Expression nach 6 Stunden Reoxygenierung (*high* und *low glucose*) Erwähnung finden. Damit wäre eine Reoxygenierungszeit von 3 Stunden für die Zelllinie IMR-32 in diesem Versuchsmodell die bestmögliche. Für die Zelllinie SH-SY5Y war lediglich eine signifikant erniedrigte Caspase 3-Expression nach 6 Stunden in der Gruppe *low glucose* zu detektieren. Da weder eine Reoxygenierungszeit von 12 noch von 24 Stunden hinsichtlich des Expressionsprofils in SH-SY5Y einen Vorteil brachte, wurde für jene Zelllinie ebenfalls eine Reoxygenierungszeit von 3 Stunden gewählt. Im Kontrast dazu konnte die Arbeitsgruppe um Zhi et al. (2020) in derselben Zelllinie nach 24 Stunden Reoxygenierung neben einer erniedrigten Zellviabilität eine erhöhte Apoptoserate und eine gesteigerte Caspase 3-Aktivität messen [72]. Auch Wu et al. (2020) wählten eine Reoxygenierungszeit von 24 Stunden und konnten ebenfalls eine erhöhte Caspase 3-Aktivität sowie eine verringerte Bcl-2-Expression feststellen [71]. Hinzukommend konnte in einem weiteren Modell von Yang et al. (2020) ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate sowie eine gesteigerte Caspase 3- und Caspase 9-Aktivität nach 24 Stunden Reoxygenierung nachgewiesen werden [105]. Allen ist gemein, dass wesentlich kürzere Hypoxiezeiten von 1 bis 6 Stunden verwendet worden waren [71, 72, 105]. Der stetige Anstieg der Zellviabilität in SH-SY5Y während der Reoxygenierungszeit nach einer langen Hypoxiephase von 72 Stunden spricht gegen einen höheren Stressreiz als nach kurzer Hypoxieexposition wie in den angeführten Arbeiten. Zudem hatten die Zellen nach 24 Stunden Reoxygenierung bereits eine Konfluenz von mindestens 80 % erreicht, sodass die Untersuchung längerer

Reoxygenierungszeiten nicht sinnvoll war. Auch das nur mäßig für apoptotisches Zellsterben sprechende Expressionsprofil der Zelllinie unmittelbar nach Hypoxie spricht dafür, dass die Untersuchung kürzerer Hypoxiezeiten in weiteren Versuchen interessant wäre. Spekulieren ließe sich, dass eine Hypoxieexposition von 72 Stunden eher einer chronischen Hypoxie gleicht und die Zellen Anpassungsstrategien entwickelt haben könnten.

Zusammenfassend sprechen die vorliegenden Ergebnisse dafür, insbesondere für die Zelllinie Neuro-2A, dass bereits 6 bis 12 Stunden nach Hypoxieexposition ein Erholungsprozess hinsichtlich der Zellviabilität und des apoptotischen Geschehens stattgefunden hat und die Wahl einer langen Reoxygenierungszeit keinen Vorteil im Sinne des Modells darstellt.

4.4 Wirkung von rhEPO und cEPO-FC

Neben seiner Aufgabe als hämatopoetischen Wachstumsfaktor rücken die zytoprotektiven Eigenschaften von Erythropoetin in der Wissenschaft in den Fokus [106]. Insbesondere wird EPO ein protektiver Effekt auf Ischämie- und Reperfusionsschäden in verschiedenen Geweben, wie Kardiomyozyten, Nierenzellen und im zentralen Nervensystem, zugesprochen [107-109]. Auch ein positiver Einfluss auf das neurologische *Outcome* nach Rückenmarksschädigung durch Okklusion der Aorta konnte in Groß- und Kleintiermodellen nachgewiesen werden [79-81, 110, 111]. Um typische Nebenwirkungen von Erythropoetin, wie Erhöhung der Blutviskosität mit konsekutiver Thromboseneigung, abzuwenden, wurde das Derivat cEPO-Fc entwickelt [61].

Während die Ergebnisse aus Tiermodellen von einer positiven Wirkung von EPO zeugen, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von rekombinantem Erythropoetin und cEPO-Fc auf zellulärer Ebene, insbesondere auf apoptotische Vorgänge, untersucht werden. Für die murine Zelllinie Neuro-2A konnte eine erhöhte Zellviabilität nach drei Stunden Reoxygenierung bei allen verwendeten Konzentrationen an rhEPO und cEPO-Fc festgestellt werden, unabhängig von der während der Hypoxie verwendeten Glukosekonzentration. Nach Reoxygenierung mit rhEPO und cEPO-Fc beider Konzentrationen konnten mehr lebendige, stoffwechselaktive Zellen nachgewiesen werden als ohne. Dies spricht für einen positiven Einfluss beider Erythropoetinderivate auf das Zellüberleben, ohne Aussage über den genauen Wirkmechanismus zu treffen. Timbul (2023) konnte

keine erhöhte Viabilität unter Verwendung der Erythropoetinabkömmlinge nach 24 Stunden Reoxygenierung nachweisen [75]. In Zusammenschau mit den Ergebnissen zur Bestimmung der optimalen Reoxygenierungszeit ist zu mutmaßen, dass die negative Auswirkung der Hypoxie keine 24 Stunden anhielt, auf welche rhEPO oder cEPO-Fc einen positiven Effekt hätten ausüben können. Vergleicht man die Auswirkungen der beiden verwendeten Erythropoetinderivate miteinander, so fällt eine höhere Zellviabilitätssteigerung unter Verwendung von rhEPO als unter cEPO-Fc auf, auch wenn im direkten Vergleich nur ein Unterschied zwischen der niedrigen cEPO-Fc-Konzentration im Verhältnis zu rhEPO in der Gruppe *low glucose* nachzuweisen ist. Bezüglich der Zellviabilität finden sich somit Hinweise, dass rhEPO eine bessere Wirkung als cEPO-Fc besitzt. Ding et al. (2015) konnten in derselben Zelllinie auch eine Steigerung der Zellviabilität nach 24 Stunden Inkubation mit rhEPO unter normoxischen Bedingungen belegen, nicht aber nach Inkubation mit cEPO ohne Fc-Fragment [112]. Begründet wird das mit einer geringen Expressionsrate von CD131, sprich des β C-Rezeptors, der für die Wirkung des carbamylierten Erythropoetins als notwendig erachtet wird [112]. Der nachgewiesene Effekt von cEPO-Fc auf die Zellviabilität nach drei Stunden Reoxygenierung in der vorliegenden Arbeit steht im Kontrast dazu. Eventuell ist für eine ausreichende Wirkung ein Stressreiz notwendig, der unter normoxischen Bedingungen nicht gegeben ist. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit nur eine weniger als 1,2-fache Zellviabilitätssteigerung unter Einsatz einer geringen cEPO-Fc-Konzentration unmittelbar nach Hypoxie der Gruppe *high glucose* detektiert werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Timbul (2023) unter Verwendung einer Sauerstoffkonzentration von 0,1 % [75]. Würde man sich auf diesen Aspekt beschränken, so hieße das, dass allein der Zusatz einer geringen cEPO-Fc-Konzentration einen positiven Einfluss ausübt. Jedoch ist der Einsatz einer niedrigen cEPO-Fc-Konzentration nach drei Stunden Reoxygenierung mit der niedrigsten Steigerung der Viabilität assoziiert. Eventuell weist dies auf eine zeitliche Dynamik hin. Ein möglicher Erklärungsansatz für die ausbleibende Viabilitätssteigerung unter Zusatz von rhEPO und einer hohen Konzentration von cEPO-Fc ist, dass die Stoffwechselaktivität der Zellen unmittelbar nach Hypoxie noch heruntergefahren ist und eine gewisse Latenz zur Rekonvaleszenz benötigt wird.

Betrachtet man die Expression der *Cleaved* Caspase 3 derselben Zelllinie, bei der es sich um die aktivierte Form einer Effektor-Caspase der apoptotischen Endstrecke handelt, fällt eine verminderte Expression unter Zugabe von rhEPO beider Konzentrationen und von cEPO-Fc einer niedrigen Konzentration nach 24 Stunden Hypoxie in der Gruppe *high glucose* auf. Auch in der Gruppe *low glucose* und nach Reoxygenierung in der Gruppe *high glucose* sind zumindest niedrigere Mittelwerte zu erkennen. Dies deutet stark auf die apoptosehemmende Eigenschaft der Erythropoetinderivate hin. Während die Inkubation mit einer hohen cEPO-Fc-Konzentration zu keiner signifikant verminderten *Cleaved* Caspase 3-Expression führt, kann sogar eine erhöhte Expression des inaktiven Vorläuferproteins Caspase 3 nach Reoxygenierung in der Gruppe *high glucose* festgestellt werden. Auch die Mittelwerte unmittelbar nach Hypoxie beider Glukosegruppen und nach Reoxygenierung der Gruppe *low glucose* liegen bei Zugabe einer hohen cEPO-Fc-Konzentration über dem Referenzniveau. Das gibt Anlass zur Vermutung, dass der Zusatz einer hohen cEPO-Fc-Konzentration zu einer erhöhten Apoptosebereitschaft der Zellen führt und ein möglicher antiapoptotischer Effekt von cEPO-Fc dosisabhängig ist. Wu et al. (2007) untersuchten den zytoprotektiven Effekt von EPO auf PC12-Zellen (Phäochromozytomzellen der Ratte), die mit einem Neurotoxin (MTP⁺) behandelt wurden und konnten die höchste Viabilitätssteigerung zu einer Konzentration von 1 IU/ml feststellen, die Verwendung einer höheren Konzentration bis zu 10 IU/ml brachte keinen Vorteil [113]. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe um Li et al. (2008), die die Auswirkungen von Erythropoetin auf β -Amyloid-induzierten Zelltod derselben Zelllinie untersuchten [114]. Die Zellviabilitätssteigerung und die Reduktion von ROS waren bei einer EPO-Konzentration von 2 IU/ml am größten [114].

Entgegen dem Hinweis einer antiapoptotischen Wirkung von rhEPO und einer niedrigen Dosierung von cEPO-Fc steht die Expressionssteigerung der inaktiven Caspase 9, einer Initiator-Caspase des intrinsischen Signalwegs, unter Zugabe einer hohen rhEPO-Konzentration nach Hypoxie beider Glukosegruppen und unter Zugabe einer niedrigen cEPO-Fc-Konzentration nach Reoxygenierung der Gruppe *low glucose* in Neuro-2A. Ein Erklärungsansatz wäre, dass im vorliegenden Fall rhEPO nicht zu Apoptoseinhibition über den intrinsischen, sondern über den extrinsischen Signalweg führt. Allerdings ist bisher vorwiegend die Wirkung von Erythropoetin über die Januskinase 2, den Transkriptionsfaktor STAT5 und die

Aktivierung apoptosehemmender Proteine wie Bcl-2 beschrieben, die Einfluss auf die Permeabilität der Mitochondrienmembran und somit auf den intrinsischen Signalweg üben [53]. Das vermehrte Vorliegen der inaktiven Caspase 9 könnte in Theorie zum einen über eine Aktivierung der Transkription durch rhEPO als Transkriptionsfaktor erklärt werden. Zum anderen wäre aber auch ein geringerer Verbrauch denkbar, das hieße, dass weniger apoptotische Aktivität zu weniger Spaltung von Caspase 9 zur *Cleaved* Caspase 9 führe und damit mehr Caspase 9 zur Detektion übrigbliebe. In anderen wissenschaftlichen Arbeiten werden die *Cleaved* Caspasen direkt ins Verhältnis zu ihren Pro-Caspasen gesetzt [115, 116] oder es wird sich auf die Detektion der *Cleaved* Caspase beschränkt [117]. Dennoch ist die Interpretation, dass eine höhere Caspase 3- oder 9-Expression einen Indikator für weniger Apoptose darstellt, nicht richtig. Van Hoecke et al. (2007) konnten in einem Rattenmodell nach cerebraler Ischämie eine erhöhte Expression von Caspase 3 nachweisen und fanden Hinweise, dass HIF-1 α als Transkriptionsfaktor die Expression der Caspase 3 induziert [118]. Auch Nishiyama et al. (2001) konnten nach Hypoxie in Nierenzellen von Ratten eine erhöhte Expression der Caspase 9 auf Transkriptionsebene detektieren [119]. Somit können die inaktiven Caspasen sehr wohl als Indikator für hypoxischen Schaden dienen. Vielleicht kann aber dennoch die erhöhte Expression unter Zugabe von rhEPO von einem geringeren Verbrauch und damit von einer niedrigeren Apoptoserate zeugen. Essenziell für eine definitive Aussage wäre die Expression der *Cleaved* Caspase 9. Allerdings gestaltete sich die Detektion der *Cleaved* Caspasen 3 und 9 über den Westernblot als problematisch und war für die Versuche unter Zusatz mit rhEPO und cEPO-Fc nur für die *Cleaved* Caspase 3 in der Zelllinie Neuro-2A ausreichend möglich. Die Änderung der Blottingzeit, der Zusammensetzung der SDS-Gele oder die Verwendung von mehr Vollprotein brachte im Westernblot auch nicht den gewünschten Erfolg. In weiteren Versuchen wäre der Einsatz von Caspase 3- bzw. 9-Aktivitätsassay-Kits denkbar, welche genauere Aussagen über die Aktivität der Caspasen treffen können [113, 120].

Für die Expression von AMPK β 1 konnten in allen drei Zelllinien keine signifikanten Änderungen nach Behandlung mit den Erythropoetinderivaten festgestellt werden. Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) steuert den Energiehaushalt der Zellen und wird durch ATP-Mangel aktiviert, wodurch sie katabole, energiebereitstellende Prozesse in der Zelle anregt [39, 121]. Neben einem Missverhältnis zugunsten von

AMP wird sie auf transkriptioneller Ebene nach Stressreizen wie Hypoxie oder Glukosemangel durch Transkriptionsinduktion der regulatorischen AMPK β 1-Einheit durch das p53-Protein, einem bekannten Tumorsuppressor, aktiviert [122]. Es gibt Hinweise, dass Erythropoetin über eine Inhibition von p53 zur Apoptosehemmung beiträgt [57]. Dass EPO über diesen Signalweg zu einer verminderten Expression von AMPK β 1 führt, konnte in den hiesigen Versuchen nicht bestätigt werden.

In den Zelllinien Neuro-2A und SH-SY5Y konnte unter Zusatz von rhEPO und cEPO-Fc zudem keine Expressionsänderung von HIF-1 α beobachtet werden. Dass der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 als Transkriptionsfaktor zur vermehrten Bildung von Erythropoetin beiträgt, ist wissenschaftlich gut erforscht [54, 123]. Ob Erythropoetin seinerseits im Sinne eines Feedbackmechanismus zur Regulation von HIF-1 beiträgt, ist Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen. Souvenir et al. (2014) konnten in der Zelllinie PC12 eine Expressionsminderung von HIF-1 α nach Zugabe von Erythropoetin in einem OGD-Modell nachweisen [124]. Auch in der vorliegenden Arbeit war eine Expressionsminderung von HIF-1 α in IMR-32 unter Behandlung mit cEPO-Fc beider Konzentrationen unmittelbar nach Hypoxie zu einer hohen Glukosekonzentration nachweisbar. Neueste Erkenntnisse suggerieren, dass HIF-1 neben seinen bekannten zytoprotektiven Eigenschaften auch apoptosestimulierende Signalwege in Gang setzt und Erythropoetin auch über Hemmung von HIF-1 α zur Apoptoseinhibition beitragen könnte [54, 124, 125]. Betrachtet man die Ergebnisse der MTT-Assays unter Zusatz der Erythropoetinabkömmlinge für SH-SY5Y fällt eine signifikant erhöhte Zellviabilität nach Reoxygenierung in der Gruppe *low glucose* auf. Dieser Effekt tritt weder in der Gruppe *high glucose* noch direkt nach Hypoxie auf. Ähnlich wie in der Zelllinie Neuro-2A geben diese Ergebnisse Hinweise auf einen positiven Einfluss von rhEPO und cEPO-Fc auf das Zellüberleben nach Reoxygenierung. Wieso die Erythropoetinabkömmlinge zu keiner Viabilitätssteigerung unter Verwendung einer hohen Glukosekonzentration führt, bleibt Spekulation. Möglicherweise ist für die Wirkung ein ausreichender Stressreiz notwendig, auf den rhEPO und cEPO-Fc einen Einfluss üben können. Jang et al. (2016) konnten in derselben Zelllinie unter normoxischen, „stressfreien“ Bedingungen keine Viabilitätssteigerung im MTT-Assay unter Zusatz von EPO unterschiedlicher Konzentrationen nachweisen, sehr wohl aber nach Rotenon-induzierter Neurotoxizität [126]. Dagegen spricht, dass weder nach Hypoxie noch nach 3 Stunden Reoxygenierung ein

Viabilitätsunterschied ohne Einsatz der Erythropoetine zwischen den Gruppen *low* und *high glucose* zu verzeichnen war. Auch konnte kein Expressionsunterschied von HIF-1 α oder Caspase 3 festgestellt werden. Somit liegen keine Hinweise vor, die auf eine höhere Stressreaktion in SH-SY5Y nach Inkubation mit einer niedrigeren Glukosekonzentration im Vergleich mit einer hohen deuten. Auffallend ist ferner eine erniedrigte Viabilität unter Zusatz einer niedrigen cEPO-Fc-Konzentration nach Hypoxie mit einer hohen Glukosekonzentration. Dies würde auf einen toxischen Effekt von cEPO-Fc unter Hypoxie deuten. Allerdings ist nur die Gruppe *high glucose* betroffen und weshalb eine niedrige cEPO-Fc-Konzentration zu weniger Zellüberleben führen sollte als in der Kontrollgruppe, der Einsatz einer hohen Dosis cEPO-Fc aber nicht, entzieht sich einer logischen Erklärung. Vermutlich handelt es sich um eine unbekannte technische Ursache, die in den Versuchen repetiert wurde.

Unerwartet war die Expression der Caspase 3 nach Zugabe von cEPO-Fc in SH-SY5Y. Während sie nach Hypoxie zu einer hohen Glukosekonzentration zu beiden Dosierungen signifikant niedriger war als in der Referenz, war sie signifikant höher nach Reoxygenierung in derselben Gruppe. Dies deutet auf die zeitliche Dynamik hinsichtlich der Expression hin. Während die erniedrigte Expression nach Hypoxie auf eine verringerte Apoptosebereitschaft und einen positiven Einfluss von cEPO-Fc deutet, stellen sich bei der erhöhten Expression nach Reoxygenierung dieselben Interpretationsfragen wie bei der Expression von Caspase 9 in der Zelllinie Neuro-2A. Auch hier könnte die Theorie aufgestellt werden, dass durch eine erniedrigte Apoptoserate weniger Caspase 3 verbraucht wurde. Ohne Wissen über die Expression der *Cleaved* Caspase 3 ist aber keine hinreichende Aussage möglich.

Ein gut beschriebener Signalweg, über den EPO seine antiapoptotische Wirkung entfaltet, führt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5, welcher antiapoptotische Proteine wie Bcl-xL und Bcl-2 aktiviert, die zu einer geringeren Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol führen, einer Komponente des intrinsischen Apoptosesignalwegs [53, 127]. Allerdings konnte in der hiesigen Arbeit weder für die Zelllinie SH-SY5Y noch IMR-32 eine signifikante Expressionssteigerung nachgewiesen werden. Die Mittelwerte nach Zusatz von rhEPO und cEPO-Fc in SH-SY5Y lagen nach Reoxygenierung sogar unterhalb der Referenz ohne statistische Signifikanz. Auch Pregi et al. (2006) konnten keine erhöhte Expression von Bcl-2 in SH-SY5Y bei Behandlung mit 25 IU/ml EPO nach

Stauroporin-induzierter Apoptose feststellen [128]. Dies steht zum Beispiel in Kontrast zur Arbeit von Wenker et al. (2010). Die Arbeitsgruppe konnte nach Einsatz von 25 IU/ml EPO in undifferenzierten SH-SY5Y sowohl eine Steigerung des Bcl-2-Proteins als auch der mRNA nachweisen [129].

Obwohl der Zusatz von cEPO-Fc in IMR-32 zu einer signifikant erniedrigten HIF-1 α -Expression nach Hypoxie führte, hatte es keine signifikanten Auswirkungen auf die Expression weiterer Proteine. Nach Inkubation mit einer hohen rhEPO-Konzentration konnte unmittelbar nach Hypoxie (*low glucose*) und nach Einsatz einer niedrigen Konzentration nach Reoxygenierung (*high glucose*) eine erniedrigte Caspase 3-Expression festgestellt werden. Die Expression von Smac/DIABLO ist unter Zusatz beider rhEPO-Konzentrationen nach Hypoxie in der Gruppe *low glucose* erniedrigt. Dies spricht für den antiapoptotischen Effekt von rhEPO zu beiden Konzentrationen, zumindest in dieser Untersuchungsgruppe. Der Mangel einer gesteigerten Smac/Diablo-Expression nach Hypoxie zu einer hohen Glukosekonzentration im Vergleich zur normoxischen Kontrolle könnte eine Erklärungsmöglichkeit für die fehlende Wirkung von rhEPO in der Gruppe *high glucose* bieten.

Abschließend ist über die Wirkung von rhEPO und cEPO-Fc für die Zelllinie Neuro-2A zu sagen, dass beide Derivate unabhängig von der Konzentration zu einer höheren Zellviabilität nach 3 Stunden Reoxygenierung führen. Die Viabilität liegt bei Behandlung mit rhEPO leicht über der mit cEPO-Fc. Es konnte zudem eine erniedrigte *Cleaved* Caspase 3-Expression nach Hypoxie mit einer hohen Glukosekonzentration für rhEPO und einer niedrigen cEPO-Fc-Konzentration nachgewiesen werden. Dies deutet auf den antiapoptotischen Effekt der Erythropoetinderivate sowie auf eine mögliche konzentrationsabhängige Wirkung von cEPO-Fc hin. Auch auf die Zellviabilität der Zelllinie SH-SY5Y üben die Erythropoetine einen positiven Einfluss, allerdings nur nach Reoxygenierung der Gruppe *low glucose*. Expressionsunterschiede der Caspase 3 weisen eine Wirkung auf apoptotisches Geschehen nach, eine eindeutige Interpretation ohne die Expression der aktivierten *Cleaved* Caspase 3 ist jedoch nicht möglich. Für die Zelllinie IMR-32 konnte eine verringerte HIF-1 α -Expression unter Zusatz von cEPO-Fc nach Hypoxie der Gruppe *high glucose* und eine verringerte Smac/DIABLO-Expression unter Zusatz von rhEPO nach Hypoxie der Gruppe *low*

glucose detektiert werden. Auch dies deutet auf eine Apoptoseinhibition durch die Erythropoetinderivate hin.

4.5 Schlussfolgerung

Eine Erweiterung des Hypoxie- und Reoxygenierungsmodells von Timbul (2023) konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation realisiert werden. Es erfolgte die Etablierung einer neuen Sauerstoffkonzentration von 2 % zur Hypoxieinduktion und einer neuen Reoxygenierungszeit von 3 Stunden. Zusätzlich wurde das Modell um eine herabgesetzte Glukosekonzentration im Sinne eines OGD-Modells ergänzt. Die Auswirkungen eines absoluten Glukosemangels unter Hypoxie und Normoxie wurden untersucht und führten zum Ausschluss einer Glukosekonzentration von 0 g/l, da diese aufgrund von hohen Proteinverlusten und dem Ausbleiben einer vermehrten Apoptoseinduktion keinen Vorteil für das Modell bot. Ferner konnte kein eindeutiger, zusätzlicher Stressreiz unter Verwendung einer erniedrigten Glukosekonzentration von 1 g/l während der Hypoxiephase nachgewiesen werden.

Die zytoprotektive Wirkung von rhEPO und cEPO-Fc konnte in dieser Arbeit nur teilweise demonstriert werden. So übten beide Erythropoetinderivate einen positiven Einfluss auf die Zellviabilität nach Reoxygenierung aus. Außerdem konnte eine erniedrigte *Cleaved* Caspase 3-Expression unter Zusatz von rhEPO und von einer niedrigen Konzentration an cEPO-Fc in Neuro-2A nachgewiesen werden, was für die apoptosehemmende Wirkung der Erythropoetinderivate spricht. Vereinzelt waren auch Expressionsänderungen anderer Proteine detektierbar, jedoch blieb ein einheitliches, konstantes Bild aus. Entsprechend ist auch keine eindeutige Aussage über einen möglichen Wirkungsunterschied zwischen rhEPO und cEPO-Fc oder zwischen den verschiedenen Konzentrationen zu treffen.

4.6 Ausblick

Aufgrund der klinischen Relevanz von Ischämie- und Reperfusionsschäden ist dem Verständnis der zellulären Mechanismen während Hypoxie und Reoxygenierung sowie der Etablierung von adäquaten Zellkulturmodellen eine wichtige Bedeutung zuzuschreiben. Zur Stärkung des Modells könnten weitere, niedrigere Glukosekonzentrationen und ihr Einfluss auf apoptotisches Zellsterben

untersucht werden. Die Hypoxiezeit der SH-SY5Y ist zu überdenken und kürzere Hypoxieintervalle sind zu analysieren. Der Einsatz von Caspase 3- bzw. 9-Aktivitätsassay-Kits könnte nähere Einblicke in die Apoptoseaktivität geben, unabhängig von der Verwendung des Westernblots. Ferner könnte das Augenmerk auf weitere pathophysiologische Prozesse während Hypoxie und Reoxygenierung gelegt werden. Die Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies, z. B. mithilfe von fluoreszierenden Markern wie H₂DCFH, oder die Untersuchung auf die „ungefaltete Protein-Antwort“ als Indikator für Stress des Endoplasmatischen Retikulums könnten zu einem weitreichenderen Verständnis der Prozesse und der Wirkung der Erythropoetinderivate führen [130-132]. Mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS) könnten apoptotisches und nekrotisches Zellsterben direkt gegenübergestellt und die Wirkung von Erythropoetin auf beide Zelltodesformen untersucht werden [133].

Da in der Literatur Hinweise auf eine konzentrationsabhängige Wirkung der Erythropoetinderivate vorliegen, wäre die Untersuchung von Konzentrationsreihen sinnvoll, um auszuschließen, dass eine fehlende Wirkung lediglich einer unpassenden rhEPO- oder cEPO-Fc-Konzentration zuzuschreiben ist [113, 114].

Finales Ziel sollte sein, ein wirksames Pharmakon gegen Ischämie- und Reperfusionsschäden zu etablieren. Neben dem Einsatz gegen Paraparese bzw. Paraplegie nach Eingriffen an der thorakoabdominellen Aorta könnten Erythropoetinderivate auch bei anderen durch Ischämie- und Reperfusionsschäden verursachten Krankheitsbildern wie dem Schlaganfall, dem Myokardinfarkt oder Komplikationen nach Nierentransplantationen Anwendung finden [107, 134]. Hinzukommend könnten sie als Therapeutika gegen degenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie Alzheimer dienen [114]. Dieses weite Spektrum an möglichen Einsatzgebieten attestiert der Forschung an der Wirkung von Erythropoetin und seinen Derivaten eine große Bedeutung.

5 Literaturverzeichnis

1. Erbel, R., et al., *2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2014. **35**(41): p. 2873-926.
2. Kalder, J., D. Kotelis, and M.J. Jacobs, [*Thoracoabdominal aortic aneurysm*]. Chirurg, 2016. **87**(9): p. 797-810.
3. Frederick, J.R. and Y.J. Woo, *Thoracoabdominal aortic aneurysm*. Ann Cardiothorac Surg, 2012. **1**(3): p. 277-85.
4. Baumann, F., V. Makaloski, and N. Diehm, *Aortenaneurysma und -dissektion*. Der Internist, 2013. **54**(5): p. 535-542.
5. McClure, R.S., et al., *Epidemiology and management of thoracic aortic dissections and thoracic aortic aneurysms in Ontario, Canada: A population-based study*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2018. **155**(6): p. 2254-2264.e4.
6. Messe, S.R., et al., *Neurologic outcomes from high risk descending thoracic and thoracoabdominal aortic operations in the era of endovascular repair*. Neurocrit Care, 2008. **9**(3): p. 344-51.
7. Booher, A.M., K.A. Eagle, and E. Bossone, *Acute aortic syndromes*. Herz, 2011. **36**(6): p. 480-7.
8. Criado, F.J., *Aortic dissection: a 250-year perspective*. Tex Heart Inst J, 2011. **38**(6): p. 694-700.
9. Golledge, J. and K.A. Eagle, *Acute aortic dissection*. The Lancet, 2008. **372**(9632): p. 55-66.
10. Koepfel, T., A. Greiner, and M. Jacobs, *DGG-Leitlinie Thorakale und thorakoabdominelle Aortenaneurysmen*. Europäisches Gefäßzentrum Aachen-Maastricht, 2010.
11. Etz, C.D., et al., *Contemporary spinal cord protection during thoracic and thoracoabdominal aortic surgery and endovascular aortic repair: a position paper of the vascular domain of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*. Eur J Cardiothorac Surg, 2015. **47**(6): p. 943-57.
12. Coselli, J.S., et al., *Outcomes of 3309 thoracoabdominal aortic aneurysm repairs*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2016. **151**(5): p. 1323-1338.
13. LeMaire, S.A., et al., *Results of open thoracoabdominal aortic aneurysm repair*. Ann Cardiothorac Surg, 2012. **1**(3): p. 286-92.
14. Murana, G., et al., *Open thoracoabdominal aortic aneurysm repair in the modern era: results from a 20-year single-centre experience*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2015. **49**(5): p. 1374-1381.
15. Greenberg, R.K., et al., *Contemporary analysis of descending thoracic and thoracoabdominal aneurysm repair: a comparison of endovascular and open techniques*. Circulation, 2008. **118**(8): p. 808-17.
16. Cowan, J.A., Jr., et al., *Surgical treatment of intact thoracoabdominal aortic aneurysms in the United States: hospital and surgeon volume-related outcomes*. J Vasc Surg, 2003. **37**(6): p. 1169-74.
17. Zanow, J. and U. Settmacher, *Aneurysmen der thorakalen und thorakoabdominalen Aorta*. Der Chirurg, 2014. **85**(9): p. 767-773.
18. Nation, D.A. and G.J. Wang, *TEVAR: Endovascular Repair of the Thoracic Aorta*. Semin Intervent Radiol, 2015. **32**(3): p. 265-71.
19. Verhoeven, E.L., et al., *Editor's Choice - Ten-year Experience with Endovascular Repair of Thoracoabdominal Aortic Aneurysms: Results from 166 Consecutive Patients*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2015. **49**(5): p. 524-31.
20. Rodd, C.D., et al., *The suitability of thoraco-abdominal aortic aneurysms for branched or fenestrated stent grafts--and the development of a new scoring method to aid case assessment*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2011. **41**(2): p. 175-85.
21. Conrad, M.F., et al., *Thoracoabdominal Aneurysm Repair: A 20-Year Perspective*. The Annals of Thoracic Surgery, 2007. **83**(2): p. S856-S861.

22. Shimizu, H. and R. Yozu, *Current strategies for spinal cord protection during thoracic and thoracoabdominal aortic aneurysm repair*. General Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2011. **59**(3): p. 155.
23. Coselli, J.S., et al., *Outcomes of 3309 thoracoabdominal aortic aneurysm repairs*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2016. **151**(5): p. 1323-1338.
24. Awad, H., et al., *Spinal cord injury after thoracic endovascular aortic aneurysm repair*. Can J Anaesth, 2017. **64**(12): p. 1218-1235.
25. Sinha, A.C. and A.T. Cheung, *Spinal cord protection and thoracic aortic surgery*. Curr Opin Anaesthesiol, 2010. **23**(1): p. 95-102.
26. Rocha, R.V., et al., *A systematic review and meta-analysis of early outcomes after endovascular versus open repair of thoracoabdominal aortic aneurysms*. J Vasc Surg, 2018. **68**(6): p. 1936-1945.e5.
27. Carroccio, A., et al., *Pathophysiology of paraplegia following endovascular thoracic aortic aneurysm repair*. J Card Surg, 2003. **18**(4): p. 359-66.
28. Wong, D.R., et al., *Delayed spinal cord deficits after thoracoabdominal aortic aneurysm repair*. Ann Thorac Surg, 2007. **83**(4): p. 1345-55; discussion 1355.
29. Smith, P.D., et al., *The evolution of chemokine release supports a bimodal mechanism of spinal cord ischemia and reperfusion injury*. Circulation, 2012. **126**(11 Suppl 1): p. S110-7.
30. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1391-401.
31. Kalogeris, T., et al., *Chapter Six - Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury*, in *International Review of Cell and Molecular Biology*, K.W. Jeon, Editor. 2012, Academic Press. p. 229-317.
32. Collard, C.D. and S. Gelman, *Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury*. Anesthesiology, 2001. **94**(6): p. 1133-8.
33. Simon, F. and A. Oberhuber, *Ischemia and reperfusion injury of the spinal cord: experimental strategies to examine postischemic paraplegia*. Neural Regen Res, 2016. **11**(3): p. 414-5.
34. Wu, M.Y., et al., *Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018. **46**(4): p. 1650-1667.
35. Eltzschig, H.K. and C.D. Collard, *Vascular ischaemia and reperfusion injury*. Br Med Bull, 2004. **70**: p. 71-86.
36. Dumont, R.J., et al., *Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms*. Clin Neuropharmacol, 2001. **24**(5): p. 254-64.
37. Sattler, R. and M. Tymianski, *Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity*. Journal of molecular medicine, 2000. **78**(1): p. 3-13.
38. de Lator, M.S., et al., *Ischemia-reperfusion model in rat spinal cord: cell viability and apoptosis signaling study*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(9): p. 9941-9.
39. Hardie, D.G. and S.A. Hawley, *AMP-activated protein kinase: The energy charge hypothesis revisited*. BioEssays, 2001. **23**(12): p. 1112-1119.
40. Banasiak, K.J., Y. Xia, and G.G. Haddad, *Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis*. Prog Neurobiol, 2000. **62**(3): p. 215-49.
41. Elmore, S., *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. Toxicologic pathology, 2007. **35**(4): p. 495-516.
42. Goldar, S., et al., *Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment*. Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(6): p. 2129-44.
43. Kajta, M., *Apoptosis in the central nervous system: Mechanisms and protective strategies*. Pol J Pharmacol, 2004. **56**(6): p. 689-700.
44. Fuchs, Y. and H. Steller, *Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(6): p. 329-44.
45. Timmer, T., E.G. de Vries, and S. de Jong, *Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application?* The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, 2002. **196**(2): p. 125-134.

46. Delhalle, S., et al., *An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1010**: p. 1-8.
47. Sugawara, T., et al., *Neuronal Death/Survival Signaling Pathways in Cerebral Ischemia*. NeuroRx, 2004. **1**(1): p. 17-25.
48. Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck, *Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis*. Anat Histol Embryol, 2002. **31**(4): p. 214-23.
49. Krantz, S.B., *Erythropoietin*. Blood, 1991. **77**(3): p. 419-34.
50. Grasso, G., et al., *Erythropoietin as a Tissue-Protective Cytokine in Brain Injury: What Do We Know and Where Do We Go?* The Neuroscientist, 2004. **10**(2): p. 93-98.
51. Lombardero, M., K. Kovacs, and B.W. Scheithauer, *Erythropoietin: a hormone with multiple functions*. Pathobiology, 2011. **78**(1): p. 41-53.
52. Jelkmann, W., *Erythropoietin: structure, control of production, and function*. Physiol Rev, 1992. **72**(2): p. 449-89.
53. Jelkmann, W., *Erythropoietin*. Front Horm Res, 2016. **47**: p. 115-27.
54. Ke, Q. and M. Costa, *Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(5): p. 1469-80.
55. Nagai, A., et al., *Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(4): p. 386-92.
56. Brines, M. and A. Cerami, *Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response*. Journal of Internal Medicine, 2008. **264**(5): p. 405-432.
57. van der Kooij, M.A., et al., *Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia*. Brain Research Reviews, 2008. **59**(1): p. 22-33.
58. Byts, N. and A.L. Siren, *Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent*. Exp Transl Stroke Med, 2009. **1**: p. 4.
59. Maiese, K., et al., *Erythropoietin: New Directions for the Nervous System*. International Journal of Molecular Sciences, 2012. **13**(9): p. 11102-11129.
60. Brines, M. and A. Cerami, *The receptor that tames the innate immune response*. Mol Med, 2012. **18**(1): p. 486-96.
61. Hooshmandi, E., et al., *CEPO-Fc (An EPO Derivative) Protects Hippocampus Against A β -induced Memory Deterioration: A Behavioral and Molecular Study in a Rat Model of A β Toxicity*. Neuroscience, 2018. **388**: p. 405-417.
62. Schriebl, K., et al., *Biochemical characterization of rhEpo-Fc fusion protein expressed in CHO cells*. Protein Expression and Purification, 2006. **49**(2): p. 265-275.
63. Leist, M., et al., *Derivatives of Erythropoietin That Are Tissue Protective But Not Erythropoietic*. Science, 2004. **305**(5681): p. 239.
64. Liu, Y., et al., *Human Ischaemic Cascade Studies Using SH-SY5Y Cells: a Systematic Review and Meta-Analysis*. Translational stroke research, 2018. **9**(6): p. 564-574.
65. Holloway, P.M. and F.N.E. Gavins, *Modeling Ischemic Stroke In Vitro: Status Quo and Future Perspectives*. Stroke, 2016. **47**(2): p. 561-569.
66. Juntunen, M., et al., *In Vitro Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Stroke Models with Human Neuroblastoma Cell- and Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons*. Stem Cells International, 2020. **2020**: p. 8841026.
67. Shi, Q., et al., *A natural diarylheptanoid protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation-induced autophagy and apoptosis*. J Pharm Pharmacol, 2019. **71**(7): p. 1110-1118.
68. Yang, Z., et al., *Butorphanol protects PC12 cells against OGD/R-induced inflammation and apoptosis*. Molecular medicine reports, 2020. **22**(3): p. 1969-1975.
69. Aldinucci, C., et al., *The Physiological Behaviour of IMR-32 Neuroblastoma Cells is Affected by a 12-h Hypoxia/24-h Reoxygenation Period*. Neurochemical Research, 2010. **35**(11): p. 1691-1699.

70. Zhang, Y., et al., *Neuroprotective effects of human bone marrow mesenchymal stem cells against cerebral ischemia are mediated in part by an anti-apoptotic mechanism*. Neural regeneration research, 2019. **14**(4): p. 597-604.
71. Wu, L., et al., *Curcumin exerts protective effects against hypoxia-reoxygenation injury via the enhancement of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 in SH-SY5Y cells: Involvement of the PI3K/AKT pathway*. International journal of molecular medicine, 2020. **45**(4): p. 993-1004.
72. Zhi, S.M., et al., *Melatonin reduces OGD/R-induced neuron injury by regulating redox/inflammation/apoptosis signaling*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020. **24**(3): p. 1524-1536.
73. Tay, A., et al., *Hydrogen sulfide protects neurons against hypoxic injury via stimulation of ATP-sensitive potassium channel/protein kinase C/extracellular signal-regulated kinase/heat shock protein90 pathway*. Neuroscience, 2010. **167**(2): p. 277-286.
74. Wang, H.-F., et al., *Endoplasmic reticulum stress regulates oxygen-glucose deprivation-induced parthanatos in human SH-SY5Y cells via improvement of intracellular ROS*. CNS neuroscience & therapeutics, 2018. **24**(1): p. 29-38.
75. Timbul, L., *Etablierung eines Hypoxie-/Reoxygenierungsmodells zur Untersuchung des Einflusses von Erythropoietin (EPO) und carbamyltem Erythropoietin-Fc (cEPO-Fc) auf die intrazellulären Vorgänge in neuronalen Zellkulturen*. Dissertation, Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2023.
76. Moroni, F., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors attenuate necrotic but not apoptotic neuronal death in experimental models of cerebral ischemia*. Cell Death & Differentiation, 2001. **8**(9): p. 921-932.
77. Jones, P.A., et al., *Apoptosis is not an invariable component of in vitro models of cortical cerebral ischaemia*. Cell Research, 2004. **14**(3): p. 241-250.
78. Almeida, A., et al., *Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture*. Journal of Neurochemistry, 2002. **81**(2): p. 207-217.
79. 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 Medicine, 2011. **37**(9): p. 1525-33.
80. Simon, F., et al., *Effects of Preoperative Pharmacological Conditioning on the Clinical and Molecular Outcome of Mice after Spinal Cord Ischemia/Reperfusion Sequence*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2018. **56**(5): p. e15.
81. Simon, F.H., et al., *Erythropoietin preconditioning improves clinical and histologic outcome in an acute spinal cord ischemia and reperfusion rabbit model*. J Vasc Surg, 2016. **64**(6): p. 1797-1804.
82. Shipley, M.M., C.A. Mangold, and M.L. Szpara, *Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line*. Journal of visualized experiments : JoVE, 2016(108): p. 53193-53193.
83. Adan, A., Y. Kiraz, and Y. Baran, *Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays*. Curr Pharm Biotechnol, 2016. **17**(14): p. 1213-1221.
84. Gavini, K. and K. Parameshwaran, *Western blot (protein immunoblot)*. StatPearls [Internet], 2020.
85. Noble, J.E., *Chapter Two - Quantification of Protein Concentration Using UV Absorbance and Coomassie Dyes*, in *Methods in Enzymology*, J. Lorsch, Editor. 2014, Academic Press. p. 17-26.
86. Stockert, J.C., et al., *Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives*. Acta Histochem, 2018. **120**(3): p. 159-167.
87. Weir, L., et al., *The reduction of water-soluble tetrazolium salt reagent on the plasma membrane of epidermal keratinocytes is oxygen dependent*. Anal Biochem, 2011. **414**(1): p. 31-7.

88. Peskin, A.V. and C.C. Winterbourn, *Assay of superoxide dismutase activity in a plate assay using WST-1*. Free Radical Biology and Medicine, 2017. **103**: p. 188-191.
89. Ukeda, H., et al., *Spectrophotometric assay of superoxide anion formed in Maillard reaction based on highly water-soluble tetrazolium salt*. Analytical Sciences, 2002. **18**(10): p. 1151-1154.
90. McKeown, S., *Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response*. The British journal of radiology, 2014. **87**(1035): p. 20130676.
91. Mas-Bargues, C., et al., *Relevance of oxygen concentration in stem cell culture for regenerative medicine*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(5): p. 1195.
92. Wenger, R.H., et al., *Frequently asked questions in hypoxia research*. Hypoxia, 2015. **3**: p. 35.
93. Cheng, Y.-L., et al., *Evidence that neuronal Notch-1 promotes JNK/c-Jun activation and cell death following ischemic stress*. Brain Research, 2014. **1586**: p. 193-202.
94. He, B., et al., *20(R)-Ginsenoside Rg3 protects SH-SY5Y cells against apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation/reperfusion*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017. **27**(16): p. 3867-3871.
95. Bäckström, T., et al., *Spinal cord metabolism during thoracic aortic cross-clamping in pigs with special reference to the effect of allopurinol*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2001. **22**(5): p. 410-7.
96. Schleicher, E., et al., *Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus*. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, 2022. **130**(S 01): p. S1-S8.
97. The International Hypoglycaemia Study, G., *Glucose concentrations of less than 3.0 mmol/l (54 mg/dl) should be reported in clinical trials: a joint position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes*. Diabetologia, 2017. **60**(1): p. 3-6.
98. Hay, N., *Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy?* Nat Rev Cancer, 2016. **16**(10): p. 635-49.
99. da Silva, G.H.R., et al., *Comparative Metabolomics Study of the Impact of Articaine and Lidocaine on the Metabolism of SH-SY5Y Neuronal Cells*. Metabolites, 2022. **12**(7): p. 581.
100. Robertson, C.S. and R.G. Grossman, *Protection against spinal cord ischemia with insulin-induced hypoglycemia*. J Neurosurg, 1987. **67**(5): p. 739-44.
101. Li, Y., et al., *Cytotoxicity study on SH-SY5Y cells cultured at high glucose levels and treated with bupivacaine*. Mol Med Rep, 2014. **9**(2): p. 515-520.
102. Xie, Q., et al., *Mitochondrial Transplantation Attenuates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury: Possible Involvement of Mitochondrial Component Separation*. Oxid Med Cell Longev, 2021. **2021**: p. 1006636.
103. Yu, S.J., et al., *MicroRNA-670 aggravates cerebral ischemia/reperfusion injury via the Yap pathway*. Neural Regen Res, 2021. **16**(6): p. 1024-1030.
104. Li, B., et al., *MiR-202-5p attenuates neurological deficits and neuronal injury in MCAO model rats and OGD-induced injury in Neuro-2a cells by targeting eIF4E-mediated induction of autophagy and inhibition of Akt/GSK-3 β pathway*. Mol Cell Probes, 2020. **51**: p. 101497.
105. Yang, T., et al., *N-hydroxy-N'-(4-butyl-2-methylphenyl)-formamidine attenuates oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced cerebral ischemia-reperfusion injury via regulation of microRNAs*. Journal of Integrative Neuroscience, 2020. **19**(2): p. 303-311.
106. Peng, B., et al., *Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation*. Cell Death Dis, 2020. **11**(2): p. 79.
107. Lipšic, E., et al., *Protective Effects of Erythropoietin in Cardiac Ischemia*. Journal of the American College of Cardiology, 2006. **48**(11): p. 2161-2167.
108. Moore, E. and R. Bellomo, *Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury*. Annals of Intensive Care, 2011. **1**(1): p. 3.
109. Nguyen, A.Q., et al., *Erythropoietin: powerful protection of ischemic and post-ischemic brain*. Experimental Biology and medicine, 2014. **239**(11): p. 1461-1475.

110. 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. 2258-63.
111. Hwang, J., et al., *Pretreatment with erythropoietin attenuates the neurological injury after spinal cord ischemia*. Spinal Cord, 2012. **50**(3): p. 208-212.
112. 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.
113. Wu, Y., et al., *Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3 β /caspase-3 mediated signaling pathway*. Apoptosis, 2007. **12**(8): p. 1365-1375.
114. Li, G., et al., *Protective effect of erythropoietin on β -amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms*. Neuroscience Letters, 2008. **442**(2): p. 143-147.
115. Xing, J., et al., *Melatonin ameliorates endoplasmic reticulum stress in N2a neuroblastoma cell hypoxia-reoxygenation injury by activating the AMPK-Pak2 pathway*. Cell Stress and Chaperones, 2019. **24**(3): p. 621-633.
116. Keum, Y.-S., et al., *Induction of apoptosis and caspase-3 activation by chemopreventive [6]-paradol and structurally related compounds in KB cells*. Cancer Letters, 2002. **177**(1): p. 41-47.
117. Si, W., et al., *Erythropoietin protects neurons from apoptosis via activating PI3K/AKT and inhibiting Erk1/2 signaling pathway*. 3 Biotech, 2019. **9**(4): p. 131.
118. Van Hoecke, M., et al., *Evidence of HIF-1 functional binding activity to caspase-3 promoter after photothrombotic cerebral ischemia*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2007. **34**(1): p. 40-47.
119. Nishiyama, J., et al., *cDNA cloning and promoter analysis of rat caspase-9*. Biochem J, 2001. **360**(Pt 1): p. 49-56.
120. Mihov, D., et al., *Erythropoietin protects from reperfusion-induced myocardial injury by enhancing coronary endothelial nitric oxide production ☆☆☆*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2009. **35**(5): p. 839-846.
121. Hardie, D.G., et al., *Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system*. FEBS Letters, 2003. **546**(1): p. 113-120.
122. Feng, Z., et al., *The Regulation of AMPK β 1, TSC2, and PTEN Expression by p53: Stress, Cell and Tissue Specificity, and the Role of These Gene Products in Modulating the IGF-1-AKT-mTOR Pathways*. Cancer Research, 2007. **67**(7): p. 3043-3053.
123. Semenza, G.L., et al., *Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1*. Kidney Int, 1997. **51**(2): p. 553-5.
124. Souvenir, R., et al., *Erythropoietin Inhibits HIF-1 α Expression via Upregulation of PHD-2 Transcription and Translation in an In Vitro Model of Hypoxia-Ischemia*. Translational Stroke Research, 2014. **5**(1): p. 118-127.
125. Bruick, R.K., *Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9082-7.
126. Jang, W., et al., *The Neuroprotective Effect of Erythropoietin on Rotenone-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells Through the Induction of Autophagy*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(6): p. 3812-3821.
127. Chong, Z.Z., J.-Q. Kang, and K. Maiese, *Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2002. **22**(5): p. 503-514.
128. Prega, N., et al., *Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2006. **1763**(2): p. 238-246.
129. Wenker, S.D., et al., *Differential antiapoptotic effect of erythropoietin on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells*. J Cell Biochem, 2010. **110**(1): p. 151-61.
130. Wang, Z.-y., et al., *Erythropoietin protects retinal pigment epithelial cells from oxidative damage*. Free Radical Biology and Medicine, 2009. **46**(8): p. 1032-1041.

131. Bartoszewska, S. and J.F. Collawn, *Unfolded protein response (UPR) integrated signaling networks determine cell fate during hypoxia*. Cellular & Molecular Biology Letters, 2020. **25**(1): p. 18.
132. Thuerauf, D.J., et al., *Activation of the Unfolded Protein Response in Infarcted Mouse Heart and Hypoxic Cultured Cardiac Myocytes*. Circulation Research, 2006. **99**(3): p. 275-282.
133. Yong, J., et al., *Hypoxia-inducible factor 1-alpha acts as a bridge factor for crosstalk between ERK1/2 and caspases in hypoxia-induced apoptosis of cementoblasts*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2021. **25**(20): p. 9710-9723.
134. van Rijt, W.G., et al., *Erythropoietin-mediated protection in kidney transplantation: nonerythropoietic EPO derivatives improve function without increasing risk of cardiovascular events*. Transplant International, 2014. **27**(3): p. 241-248.

6 Danksagung

Herrn PD Dr. med. Florian Simon danke ich für die herzliche und eingehende Betreuung als Doktorvater und die Möglichkeit der Erstellung dieser Doktorarbeit unter seiner Supervision. Insbesondere das ehrliche Interesse an der wissenschaftlichen Ausbildung jedes einzelnen Doktoranden weiß ich sehr zu schätzen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari danke ich für die Co-Betreuung meiner Doktorarbeit.

Großer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Wiebke Ibing für ihre intensive Mitbetreuung, die Ausbildung in der Laborarbeit und die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Ihre Expertise war allzeit eine große Hilfe.

Insbesondere danke ich Astrid Hoffmann für ihre Einarbeitung im Labor, für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und ihre professionelle Erfahrung als MTA, von welcher ich während meiner Laborarbeit stets profitieren konnte.

Frau Dr. med. Laura Timbul danke ich sehr für die Einführung in die Thematik, ihre Hilfestellung und die Möglichkeit zum Austausch.

Großer Dank gilt dem gesamten Team des Labors, den Doktoranden, Frau Dr. rer. nat. Wiebke Ibing und Frau Astrid Hoffmann für die herzliche Arbeitsatmosphäre im Labor. Die Zusammenarbeit hat mir allzeit große Freude bereitet!

Meiner Familie danke ich, dass sie mir jederzeit bedingungslos den Rücken freihält und mich bei jedem Vorhaben unterstützt und motiviert.

Besonderer Dank gilt Vanusch Walk für seine außerordentliche und entlastende Unterstützung in jeder Lebenslage.

