Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Chirurgie
Klinik für Thorax- und Gefäßchirurgie
Komm. Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. K.-H. Orend

Etablierung und Charakterisierung eines *in vitro*-Hypoxiemodells - Einfluss von Erythropoetin (EPO) und carbamyliertem EPO auf hypoxisch induzierte Schäden in renalen Zellkulturen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von:

Evelyn Jäger
aus Ulm

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hubert Schelzig
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Knippschild

Tag der Promotion: 21. Oktober 2011

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS I

1. EINLEITUNG 1

1.1. ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHÄDEN 1
1.2. APOPTOSE VERSUS NEKROSE 3
1.2.1. SIGNALWEGE DER APOPTOSE 4
1.2.2. PROTEINE DER BCL-2- FAMILIE 8
1.3. ERYTHROPOETIN UND CARBAMYLIERTES ERYTHROPOETIN 9
1.4. ZIELSETZUNG DER ARBEIT 10

2. MATERIAL UND METHODEN 12

2.1. MATERIALIEN 12
2.1.1. ZELLLINIEN 12
2.1.2. CHEMIKALIEN UND BIOCHEMISCHE REAGENZIEN 12
2.1.3. ANTIKÖRPER 14
2.1.4. VERBRAUCHSMATERIALIEN 15
2.1.5. GERÄTE 16
2.1.6. ELEKTRONISCHE DATENVERARBEITUNGSPROGRAMME 17
2.2. METHODEN 17
2.2.1. KULTIVIERUNG DER ZELLEN 17
2.2.2. ENTWICKLUNG DES HYPOXIEMODELLS 18
2.2.3. INDUKTION DER HYPOXIE UND REOXIGENIERUNG 20
2.2.4. BESTIMMUNG DES O_2- GEHALTS IM HYPOXIEMEDIUM 21
2.2.5. EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLLINIEN 22
2.2.6. DAPI- FÄRBUNG 22
2.2.7. TRYPANBLAU- FÄRBUNG 23
2.2.8. MITOCHONDRIENSPEZIFISCHE FÄRBUNG - MITOTRACKERRED (CMXROS) 23
2.2.9. BESTIMMUNG VON EXPRESSIONSPROFILEN APOPTOSE- RELEVANTER PROTEINE 24
2.2.10. CASPASE 3/7- AKTIVIERUNG 24
2.2.11. BESTIMMUNG DER ZELLULÄREN PROLIFERATION 25
2.2.12. BESTIMMUNG VON APOPTOTISCHEN UND NEKROTISCHEN ZELLEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS-ANALYSE) 25
2.2.13. WESTERN BLOT 27
2.2.14. ZELLULÄRE RESPIRATION 32
2.2.15. RESPIRATORISCHE MESSUNG 32
2.2.16. STATISTIK 36

3. ERGEBNISSE 37

3.1. ENTWICKLUNG DES HYPOXIEMODELLS 37
3.2. EVALUATION DES HYPOXIEMODELLS 44
3.2.1. CHARAKTERISIERUNG DES MODELLS - EFFEKTE VON HYPOXIE UND REOXIGENIERUNG 46
3.3. EXPRESSION VERSCHIEDENER APOPTOSE- RELEVANTER PROTEINE WÄHREND HYPOXIE UND EINFLUSS VON EPO UND CEPO-FP WÄHREND DER HYPOXIE 63

4. DISKUSSION 92

4.1. ENTWICKLUNG UND EVALUATION DES HYPOXIEMODELLS 92
4.1.1. BESTIMMUNG DES O_2- GEHALTS 92
4.1.2. EVALUATION DES HYPOXIEMODELLS 96
4.2. CHARAKTERISIERUNG DES HYPOXIEMODELLS 98
4.3. EFFEKTE VON EPO UND CEPO-FP AUF DIE EXPRESSION APOPTOSE-RELEVANTER GENE WÄHREND HYPOXIE UND REOXIGENIERUNG IN NIERENZELLLINIEN 107

5. ZUSAMMENFASSUNG 116

6. LITERATURLISTE (ALPHABETISCH) V

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Acetyl CoA	Acetyl Coenzym A
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPKβ1	AMP aktivierte Proteinkinase beta 1
Apaf-1	apoptotischer Protease- Aktivierungsfaktor 1
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5´- Triphosphat
Bad	Bcl-2- Antagonist of Cell Death
Bak	Bcl-2- Antagonist killer
Bax	Bcl-2- associated- X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-related protein 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
β- MSH	β- Mercaptoethanol
Bid	Bcl-2 interacting protein
Bidest.	Bidestilliert
BIR	Baculovirus IAP repeat
bp	Basenpaare
BRUCE	BIR repeat-containing ubiquitin- conjugating enzyme
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
ca.	circa
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CAD	Caspase-aktivierte DNase
cEPO-FP	Derivat des EPO (carbamyliertes Fusionsprotein)
cDNA	komplementäre DNA
cIAP-1	cellular inhibitor of apoptosis 1
cIAP-2	cellular inhibitor of apoptosis 2
Cl_2	Chlorid
CO_2	Kohlendioxid

Caspase	Cystenyl Aspartat Spezifische Protease
C-terminal	Carboxyl- terminal
Cyt c	Cytochrom c
DAPI	4',6- Diamidino- 2-phenylindol dihhydrochloride
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dd	bidestilliertes Wasser
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death inducing signalling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTNB	3-Carboxy-4- Nitrophenyldisulfid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EPO	Erythropoetin
et al.	und andere (et alteri)
$EtBr_2$	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FADD	Fass associated protein with DD
FACS	Fluorescens Activated Cell Sorting
FCCP	Carbonylcyanid-4- (trifluoromethoxy)-phenylhydrazon
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fl	Fluoreszenz
g	Gramm
gE	Erdbeschleunigung
ggf	gegebenenfalls
h	Stunde

HCl	Salzsäure
HEK	Human embryonic kidney
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) piperazin-1-ethansulfonsäure
HIF1α	Hypoxie induzierbarer Faktor 1 alpha
HNF-4	hepatic nuclear factor 4
HO-1	Hämoxygenase 1
HO-2	Hämoxygenase 2
HRP	Horse Radish Peroxidase
H_2O	Wasser
I	Ischämie
IAPs	inhibitor of apoptosis proteins
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IU	International Unit
Ko-	Kontrollprobe unbehandelter Zellen
kDa	Kilo-Dalton
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
M	Molar
µ	Mikro
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mmHg	Druckeinheit (mm Quecksilbersäule)
ml	Milliliter
ML-IAP	melanoma inhibitor of apoptosis
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
N_2	Stickstoff
n	normal
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAIP	neuronal apoptosis inhibitory protein

nm	Nanometer
NP-40	Nonidet- P40
O_2	Sauerstoff
OD	optische Dichte
P	Phosphor
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PHD	Prolyl-4-Hydroxylase
PK	Pig kidney
pO_2	Sauerstoffpartialdruck [mmHg]
pVHL	von-Hippel-Lindau- Protein
p21/Cip1	CDK (Cyclin- dependent kinase)- Inhibitor p21
p27/Kip1	CDK (Cyclin- dependent kinase)- Inhibitor p27
R	Reperfusion
RCR	respiratory control ratio
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA- Interferenz
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAC/Diablo	second derived mitochondria activator of caspase
SSC	Saline sodium citrate
STABW	Standardabweichung
ST	Staurosporin
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA- Puffer
tBid	truncated Bid
TBS	Tris-Puffer- Lösung
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TMPD	N,N,N`,N`- Tetramethyl-1,4-phenylendiamin-dihydrochlorid

TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
Tradd	TNFα- Rezeptor associated protein
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
Tris	Tri (hydroxymethol)- methylamin
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan- Monolaurat
U	(Protein-Aktivitäts-) Einheiten (units)
Upm	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
v.a.	vor allem
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
XIAP	X- linked inhibitor of apoptosis

1. Einleitung

1.1. Ischämie-Reperfusionsschäden

Unter einer Ischämie (Blutleere) versteht man die Unterversorgung eines Gewebes bzw. eines ganzen Organs mit Blut. Durch den entstehenden Sauerstoffmangel wird der zelluläre Stoffwechsel behindert und kommt letztendlich zum Erliegen. Eine Ischämie kann vorübergehend auftreten und ohne bleibende Schäden für das unterversorgte Gewebe sein. Die Ischämiedauer, die ohne einen permanenten Gewebeschaden toleriert wird, variiert von Organ zu Organ bzw. von Zelltyp zu Zelltyp. Wird die Ischämietoleranz eines Gewebes überschritten, führt dies zum Absterben der Zellen. Als Reperfusion wird die Wiederaufnahme der Durchblutung eines Organs nach vorübergehender Unterbrechung der Blutzufuhr bezeichnet. Akute Perfusionsstörungen führen durch die Kombination aus Ischämie (I) und Reperfusion (R) zur Schädigung des Organs und werden als I/R- Schäden zusammengefasst. Dies ist von besonderer Bedeutung z.B. bei Organtransplantationen und thorakoabdominalem Aortenersatz. Die Schädigung des Organs aufgrund von Ischämie/Reperfusion (I/R) hat einen Verlust der Organfunktion zur Folge. Eine immer gezieltere Erforschung der zellulären und molekularen Mechanismen bei I/R ist daher von essentieller Bedeutung, da es nur auf diese Weise möglich ist, neue Interventionsstrategien zu entwickeln. In unterschiedlichen tierexperimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass I/R sowohl mit kurz- als auch langfristigen Modulationen zahlreicher Zellfunktionen einhergeht. I/R ist daher als komplexe pathophysiologische Kaskade zu verstehen, da zahlreiche Mechanismen bei der Entstehung von I/R-Schäden von Belang sind. Hierzu gehören Sauerstoffmangel, Auftreten von freien Radikalen, mitochondriale Dysfunktion, speziell die Hemmung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung, ATP-Verbrauch bzw. Einbruch der ATP- Produktion, Störung der Ionen-Pumpen, intrazelluläre Übersäuerung (Azidose) sowie die Freisetzung von immunologischen und inflammatorischen Faktoren (Zytokine). Die Folgen sind Schädigung weiterer zellulärer Komponenten und Apoptose (Abe, 1995) (siehe Kapitel 1.2). Während einer Ischämiephase bedingt der Sauerstoff- und Glucosemangel einen intrazellulären Energieverbrauch, der die Aufrechterhaltung des zellulären Membranpotentials beeinträchtigt. Speziell die Na^+/K^+- Pumpe, welche einen großen Teil des aus der oxidativen Phosphorylierung stammenden ATP für den energieabhängigen Na^+/K^+- Antiport benötigt, ist in ihrer Funktion beeinträchtigt (Erecinska und Silver, 1994). Durch die Aktivierung spannungsgesteuerter Ionenkanäle erfolgt ein Einstrom von Na^+, Ca^{2+} sowie Cl^--Ionen in die Zelle, während K^+ aus der Zelle strömt. Diese Veränderung des intrazellulären Elektrolytspiegels führt

direkt zu einer intrazellulären Azidose sowie durch Wassereinstrom in die Zelle zur Bildung eines Zellödems. Bei der Entstehung von I/R-Schäden wird der Produktion freier Sauerstoffradikale eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Gelman, 1995; Willet, 2001). Freie Sauerstoffradikale sind hochreaktive Moleküle, die entstehen, wenn das zelluläre Redox- Gleichgewicht gestört wird. Während einer Ischämie kann die Bereitstellung intrazellulärer Energie in Form von ATP ausschließlich mittels anaerober Glykolyse erfolgen. Nach Reperfusion bzw. Reoxigenierung tritt molekularer Sauerstoff in die postischämischen Zellen, wo die Xanthinoxidase, entstanden in saurem Milieu durch Konversion der Xanthinhydrogenase (Waud und Rajagopalan, 1976), anschließend freie Sauerstoffradikale katalysiert. Die Xanthindehydrogenase ist eine Hydroxylase, die in Leber und Niere die Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure katalysiert (Truglio et al., 2002). Reperfusion und Reoxigenierung nach längeren Ischämie- oder Hypoxiezeiten sind zudem mit einem Anstieg der Ca^{2+}- Konzentration verbunden. Diese erhöhte Ca^{2+}- Konzentration führt zu einer Kalziumüberladung der Mitochondrien, was zusätzlich zur mitochondrialen Dysfunktion und Schädigung des oxidativen Stoffwechsels beiträgt (Kristan u. Sjesjö, 1998). Als Folge kommt es zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung der Atmungskette und einer Beeinträchtigung des ATP/ADP- Transports. Mitochondrien sind unter „oxidativem Stress“ (hypoxischischämischem Energiemangel) dilatiert, wodurch sich das mitochondriale, transmembranäre Potential verringert und die Produktion zusätzlicher reaktiver Sauerstoffderivate wie O- und H_2O_2 durch den fortlaufenden Elektronentransport bei reduzierter Atmungskette stattfindet. Besonders Komplex I (NADH- Ubichinon- Oxidoreduktase) der Atmungskette wird durch reaktive Sauerstoffderivate geschädigt, was einen weiteren Energiemangel aufgrund verringerter mitochondrialer ATP-Produktion zur Folge hat. Dies erhöht zudem die zelluläre Empfindlichkeit für weitere Schäden (Davis et al., 1997). Durch die Öffnung von Protonenporen in der inneren Mitochondrienmembran erliegt der elektrochemische Protonengradient, wodurch die ATP- Produktion nicht mehr aufrechterhalten werden kann (Kristan u. Sjesjö, 1998). I/R- Schäden führen in milderer Ausprägung zur Gewebsdysfunktion, bei maximaler Ausprägung zum vollständigen Verlust der Organfunktion. Bei der renalen Ischämie ist besonders die Schädigung der Tubuluszellen der Niere (akute tubuläre Nekrose, ATN) aufgrund verschiedener struktureller und biochemischer Veränderungen von Bedeutung. Die Ischämie- Phase ist geprägt von einem schnellen und rapiden Abfall zellulärer Energieträger (Adenosintriphosphat; ATP), der aufgrund der Hemmung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien zu Stande kommt. Da die elementare Zufuhr von Energie für die Zelle über die anaerobe Glykolyse nur kurzzeitig gewährleistet werden kann, kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Laktatkonzentration und einem zeitlich folgenden Abfall des pH-Wertes. Aufgrund dessen wird die Natrium-Kalium- ATPase inhibiert und Kalzium sowie Natrium und Wasser

strömen gemäß dem osmotischen Gefälle in die Zelle. Während der Phase der Reperfusion führen freie Sauerstoffradikale zu einer Peroxidationsreaktion von Lipiden, Depolimerisation von Polysacchariden und Degeneration von Desoxyribonucleotiden (Dittrich, 2001). Für den entstandenen Schaden ist daher nicht allein die mangelnde Sauerstoffversorgung während der Phase der Ischämie verantwortlich, sondern vielmehr handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel zellschädigender Teilprozesse der I/R- Sequenz.

1.2. Apoptose versus Nekrose

Apoptose ist die genetisch kodierte, aktive, d.h. energieverbrauchende Selbstzerstörung der Zelle und wird daher auch häufig als „Programmierter Zelltod“ bezeichnet. Die apoptotische Zelle benötigt daher aufgrund teilweise aktiver Trankskription und Translation eine noch funktionierende ATP-Produktion (Antonsson, 2001). Bei der Apoptose handelt es sich um ein hochkonserviertes Phänomen, das von Nematoden (z.B. *Caenorhabditis elegans*) über Insekten bis hin zu Säugetieren zu finden ist (u.a. Wyllie, 1980; Hengartner et al., 1992; Yuan et al., 1993). Auf zellulärer Ebene beobachtet man während apoptotischer Prozesse verschiedenste morphologische Veränderungen, wie z.B. Chromatinkondensation, Fragmentierung des Zellkerns, Schrumpfen der Zellen sowie Ausstülpung von Plasma- und Kernmembranen und Zerfall der Zellen in vesikuläre Strukturen (apoptotische Körper) (Kerr, 1972; Kiechle und Zhang, 1998). Der programmierte Zelltod, bei dem keine Entzündung oder Immunreaktion ausgelöst wird, kennzeichnet sich zudem durch verschiedene biochemische Veränderungen. Beispielsweise transloziert während früher apoptotischer Prozesse das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran (van den Eijnde et al., 1998; van Engeland et al., 1998). Phosphatidylserin ist ein Bestandteil der Plasmamembran und unter nicht pathologischen Bedingungen auf der zytoplasmatischen Seite der Doppelmembran lokalisiert (Witting, 2000). Molekular betrachtet finden sich weiterhin eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse, die letztendlich zu einer Aktivierung von Endonukleasen führen. Endonukleasen spalten die nukleäre DNA in regelmäßigen Abständen von etwa 200 Basenpaaren (Wyllie, 1980) und führen auf diese Weise zum Funktionsverlust der DNA und der Integrität des Zellstoffwechsels. Die endgültige Beseitigung der apoptotischen Zellen erfolgt über Phagozytose. Die vorrangige Aufgabe der Apoptose besteht in der gezielten Eliminierung von infizierten, überalterten, funktionsuntüchtigen oder fremden Zellen. Ein klassisches Beispiel für die Bedeutung sowie die enorme Präzision apoptotischer Prozesse zeigt sich während der Embryonalentwicklung bei der Bildung der Finger aus der „Handscheibe“. Hierbei kommt es zum gezielten Absterben der Häute zwischen den bereits angelegten Fingern. Nur auf diese Weise konnten sich Finger als

einzelne Komponenten entwickeln. Im Gegensatz zur Apoptose, die einem signalabhängigen, streng regulierten, genetischen Programm unterliegt, führt bei der Nekrose eine oftmals durch äußere Einwirkungen auftretende Schädigung der Zellstruktur dazu, dass der Inhalt der Zelle unkontrolliert austreten kann (Stephan et al., 2000). Die Auslöser können physikalischer oder chemischer Natur sein, wie mechanische Beschädigung, Verbrennung, Kontakt mit Toxinen oder Infektionen mit Krankheitserregern sowie Strahlung oder Vergiftungen. Diese führen in ausgedehnten Gewebsarealen zum Tod der betroffenen Zellen. Der nekrotische Zelltod zeichnet sich genau wie Apoptose durch verschiedene morphologische Veränderungen der Zelle aus und kann dadurch vergleichsweise gut charakterisiert werden. Durch Schädigung der Plasmamembran nekrotischer Zellen strömt Wasser osmotisch ins Zellinnere (Witting, 2000). Daraus resultiert ein Anschwellen der Zellorganellen und als direkte Folge der Verlust der Membranintegrität (Alberts 4. Aufl., 2002), d.h. die Zellen schwellen an und werden letztendlich lysiert (Duvall et al., 1986). Aufgrund dieser Membrandefekte erfolgt die unkontrollierte Freisetzung von zytoplasmatischen Bestandteilen in das umliegende Gewebe und ruft dort entzündliche Reaktionen hervor (Savill, 1997; Fiers et al., 1999). Obwohl Apoptose und Nekrose bisher als zwei unterschiedliche Formen des Zelltods betrachtet wurden, gibt es mittlerweile Hinweise, dass es sich um zwei eng miteinander verknüpfte, nur zum Teil morphologisch und biochemisch unterscheidbare Formen des Zelltods handelt (Ankarcrona et al., 1995; Leist und Nicotera, 1997). Beispielsweise tritt eine sekundäre Nekrose apoptotischer Zellen auf, wenn die apoptotischen Zellen nicht durch Phagozytose eliminiert werden (Leist et al., 1995 ; Leist und Nicotera, 1997). *In vivo* kann der apoptotische vom nekrotischen Zelltod aufgrund der Auswirkungen auf das umliegende Gewebe unterschieden werden. Im Gegensatz zur Nekrose wird bei der Apoptose, durch die schnelle phagozytotische Eliminierung der betroffenen Zellen aus dem Gewebe keine inflammatorische Immunantwort hervorgerufen (Savill et al., 1993; Leist und Nicotera, 1997; Witting, 2000).

1.2.1. Signalwege der Apoptose

Der „Programmierte Zelltod“ unterliegt strikten Kontrollmechanismen, wodurch sichergestellt wird, dass apoptotische Prozesse ohne Schädigung intakter Nachbarzellen bzw. gesunden Nachbargewebes abläuft. Im Gegensatz zur Nekrose, handelt es sich bei der Apoptose um einen aktiven Prozess und kann durch eine Vielzahl von Stimuli induziert werden. Abhängig von der Art der Induktion unterscheidet man den extrinsischen Weg vom intrinsischen (mitochondrialen) Weg der Apoptose. Wird Apoptose in einer Zelle durch ein Signal von außerhalb über sogenannte „Todesrezeptoren“ auf der Zelloberfläche eingeleitet, spricht man vom extrinsischen Weg. Erfolgt die

Initiation der Apoptose durch intrazelluläre Sensoren, handelt es sich um den intrinsischen Weg der Apoptose. Beide Wege sind strikt regulierte Mechanismen und führen letztendlich zur Aktivierung der Caspase- Kaskade.

Der extrinsische, d.h. rezeptorvermittelte Weg der Apoptose wird durch Aktivierung von verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren (Todesrezeptoren), Mitgliedern der TNF- Superfamilie (Trail, TNF) ausgelöst. Hierbei handelt es sich um Strukturproteine, die eine cysteinreiche extrazelluläre Domäne besitzen, mit deren Hilfe spezifische Liganden identifiziert werden (Naismith und Sprang, 1998). Die spezifische Bindung des Liganden führt durch Trimerisierung zur Aktivierung des Rezeptors. Es folgt die Rekrutierung des „TNFα- Rezeptor assoziierten Proteins" (Tradd) über die D- Domäne (death domain, DD) des aktivierten TNFα- Rezeptors. Tradd besitzt ebenfalls eine solche DD, wodurch es in der Lage ist, mit einem weiteren Protein („Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne; FADD) zu aggregieren. Dieses Protein weist zusätzlich zur DD eine weitere Domäne („death effector domain"; DED) auf. Mittels dieser DED erfolgt die Rekrutierung von Procaspase 8 und Bildung eines sogenannten „death inducing signaling complex" (DISC) und die autolytische Aktivierung der Procaspase 8 zur aktiven Caspase 8 (Muzio et al. 1998; Nicholson 1999). Die aktivierte Caspase 8 ist als Schlüsselinitiatorcaspase des extrinsischen Apoptosewegs anzusehen, da diese direkt weitere Effektorcaspasen schneidet und ggf. durch Prozessierung des BH3-only-Proteins (BID) in tBID (truncated BID) den extrinsischen mit dem intrinsischen Weg der Apoptose verbindet (Li et al. 1998; Luo et al. 1998).

Im Gegensatz dazu erfolgt die Initiation der Apoptose beim rezeptorunabhängigen, intrinsischen Weg durch intrazelluläre Signale, wie beispielsweise durch oxidativen Stress oder aufgrund von DNA- Schäden. Weitere mögliche intrazelluläre Signale zur Aktivierung des intrinsischen Wegs der Apoptose sind z.B. Schädigungen des Zytoskeletts, Verlust von Adhäsionsfähigkeit oder Wachstumsfaktoren sowie UV- oder Gamma- Strahlung. Kommt es zum Verlust der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran, führt dies beim intrinsischen Apoptoseweg zur Freisetzung von Faktoren wie z.B. Cytochrom c aus den Mitochondrien (Patterson et al. 2000; Wang et al. 2001). Von entscheidender Bedeutung für die Freisetzung von Cytochrom c sind pro- apoptotisch wirkende Mitglieder der Bcl-2- Genfamilie (z.B. Bax). Cytochrom c agiert in vitalen Zellen als Überträger von Elektronen von Komplex III auf Komplex IV in der zellulären Atmungskette. Nach dem Austritt ins Zytosol der Zelle wirkt Cytochrom c als sekundärer Botenstoff und trägt zur Konformationsänderung des *apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor 1* (Apaf-1) und damit zur Bildung des sogenannten Apoptosoms bei. Die daraus resultierenden Konformationsänderungen des Proteins bewirkt im Weiteren die autolytische Aktivierung der Caspase 9. (Liu et al, 1996; Li et al., 1997; Adrain et al., 1999; Cain et al., 1999; Rodriguez und Lazebnik, 1999; Zou et al., 1999; Cain et al., 2000; Shi, 2001;

Acehan et al., 2002; Cain et al., 2002; Ott et al., 2002). Der intrinsische Weg der Apoptose kann zusätzlich zur Signalverstärkung des extrinsischen Weges angeschaltet werden; gemeinsam ist den beiden Wegen letztendlich die Initiierung der Caspase- Kaskade. Eine vereinfachte schematische Darstellung der beiden Apoptosewege ist in Abbildung 1 dargestellt. Beiden Wege bedingen letztendlich die Aktivierung der Caspase- Kaskade und damit die Einleitung von Apoptose.

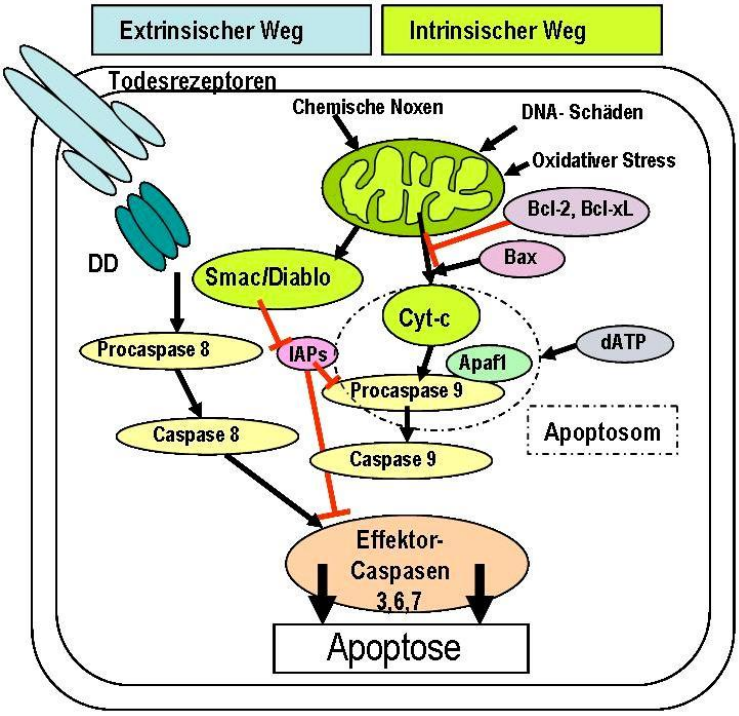

Abbildung 1: Der extrinsische und intrinsische Apoptoseweg – schematische Darstellung der Aktivierung der apoptotischen Stoffwechselkaskade. Abkürzungen: DD: death domain; SMAC/Diablo: second derived mitochondria activator of caspase; IAPs: Inhibitoren der Apoptose; Cytc: Cytochrom c; Apaf1: apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1; Bcl2: B-cell lymphoma-related protein 2; Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large; Bax: Bcl-2-associated-X protein; dATP: Desoxyadenosintriphosphat

Der Begriff Caspase leitet sich von *Cystein- abhängige Aspartat spezifische Protease* (Fernandes-Alnemri et al., 1996) ab, da es sich bei Caspasen um eine Familie von Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum handelt. Caspasen spielen eine zentrale Rolle im apoptotischen Signalnetzwerk und sind daher essentiell für die präzise Entwicklung von Lebewesen sowie verantwortlich für die Beseitigung entarteter Zellen. Caspasen werden als inaktive Proenzyme (Zymogene) synthetisiert, die durch spezifische Abspaltung von Untereinheiten aktiviert werden (Wilson et al,. 1994; Blanchard et al., 1999) und anschließend ihre Substrate nach spezifischen Aspartatresten schneiden (Earnshaw et al., 1999). Grundsätzlich unterscheidet man zwei Gruppen von Caspasen. Zum einen gibt es Caspasen, die hauptsächlich an inflammatorischen Prozessen (Caspase 1, 4, 5, 11 und 12), zum anderen Caspasen, die maßgeblich an apoptotischem Zelltod beteiligt sind (Slee et al., 1999). Diese werden wiederum in Initiator- und Effektorcaspasen unterschieden. Die früh im apoptotischen

Prozess wirkenden Initiatorcaspasen 8 und 9 aktivieren nachfolgend mehrere Effektorcaspasen wie beispielsweise die Caspasen 3 und 7, was direkt zur Einleitung der Apoptose führt (Nicholson und Thornberry, 1997). Die Aktivität der Caspasen unterliegt einer äußerst strengen Kontrolle, für die z.B. die Proteine der IAP- Familie (inhibitor of apoptosis proteins) von eminenter Wichtigkeit sind. In verschiedenen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass IAP- kodierende Sequenzen bei der Unterdrückung des programmierten Zelltods in mit Baculoviren infizierten Zellen eine entscheidende Rolle spielen (Crook et al., 1993; Birnbaum et al., 1994). Bei der Bindung der IAPs an Caspasen handelt es sich wahrscheinlich um einen selektiven Prozess. Beispielsweise inhibieren die Proteine XIAP, cIAP1 und cIAP2 spezifisch die Caspasen 3, 7, und 9, nicht aber die Caspasen 1, 6, 8, und 10 (Deveraux und Reed, 1999). Survivin, NAIP, ILP2, ML-IAP und BRUCE sind weitere Mitglieder der IAP- Familie. Survivin und NAIP inhibieren ebenfalls die Caspasen 3 und 7 direkt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IAPs zum einen mit hoher Affinität an die aktiven Formen der Capasen binden und daher einen sterischen Ausschluss der Interaktion mit Caspase- Substraten bedingen (Riedl et al., 2001; Huang et al., 2001; Chai et al., 2001); zum anderen ebenso mit inaktiven Vorläufern von Initiator- Caspasen (Procaspasen), interagieren, wodurch die autokatalytische Aktivierung des Enzyms (Cleavage) verhindert wird. Zusätzlich wird der proteasomale Abbau der Caspasen mittels Ubiquitinierung durch IAPs reguliert. Die Aktivität der IAPs selbst unterliegt ebenfalls strengen regulatorischen Mechanismen. Eine Regulationsmöglichkeit für IAPs sind IAP-bindende Proteine, wie z.B. SMAC (*second mitochondria- derived activator of caspase*)/diablo. Nach Apoptoseeinleitung und Permeabilisierung des Mitochondrienmembran wird SMAC/diablo aus den Mitochondrien freigesetzt und ist dann ebenfalls indirekt als Aktivator von Caspasen wirksam.

Dies ist vereinfacht dargestellt, tatsächlich handelt es sich aber um ein komplexes Netzwerk von Interaktionen zwischen den einzelnen Caspasen und weiterer regulatorische Moleküle, die das Todessignal in der jeweiligen Zelle amplifizieren und die irreversible, apoptotische Umstrukturierung der Zellen einleiten. Effektorcaspasen, allen voran die Caspasen 3, 6 und 7 führen letztendlich durch Spaltung verschiedener Schlüsselproteine und sekundärer Zielproteine (z.B. Caspase-aktivierte DNase, CAD) sowie durch Aktivierung bzw. Inaktivierung von entsprechenden Proteinen zur Fragmentierung des Zellkern und somit zum apoptotischen Tod der Zellen. Zudem werden aktiv Typ-V- Intermediärfilamente (Lamin), die Teil der Zellkernmembran sind und Aktine als Teil des Zytoskeletts abgebaut. Die entstanden Fragmente (Vesikel) werden phagozytiert.

1.2.2. Proteine der Bcl-2- Familie

Eine weitere Klasse intrazellulärer Regulatoren der Apoptose ist die Familie der Bcl-2 Proteine. Diese Proteine sind besonders bei der Regulation Mitochondrien- abhängiger Apoptose von eminenter Wichtigkeit (Gross et al., 1999). Durch den Vergleich von homologen Sequenzen konnte eine Vielzahl verschiedener Proteine dieser Familie identifiziert werden. Die einzelnen Mitglieder der Bcl-2- Familie können aufgrund ihrer Funktion sowie ihrer Struktur in drei Gruppen unterteilt werden (Adams und Cory, 1998; Antonsson und Martinou, 2000). Die erste dieser drei Gruppen umfasst alle anti- apoptotischen Mitglieder, z.B. Bcl-2 und Bcl-xL, deren Struktur durch vier Bcl-2 homologe Domänen (BH- Domänen) gekennzeichnet ist. Neben den BH- Domänen, welche für die anti-apoptotische Funktion der Proteine essentiell sind (Borner et al., 1994), besitzt diese Gruppe zusätzlich einen hydrophoben C- Terminus, der zur Insertion in die Mitochondrienmembran bzw. der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) dient. Die beiden weiteren pro- apoptotischen Gruppen der Bcl-2- Familie gliedern sich in die multimeren Bax- artigen und die monomeren BH3-only- Proteine auf. Mitglieder der Bax- artigen, z.B. Bax und Bak ähneln strukturell den anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2- Familie, jedoch fehlt ihnen die vierte BH- Domäne am N-terminalen Ende (Oltvai et al., 1993; Chittenden et al., 1995; Kiefer et al., 1995). Sowohl Bax als auch Bak reagieren auf apoptotische Stimuli mit einer Konformationsänderung und der Insertion in die äußere Mitochondrienmembran, was direkt zum Integritätsverlust der Membran führt und schließlich in der Freisetzung von Cytochrom c mündet (Wei et al., 2001). Monomere BH3-only-Proteine, z.B. Bad, Bid u.a. haben mit den beiden zuvor beschriebenen Gruppen lediglich die BH3-Domäne gemein (Huang und Strasser, 2000); diese allein ist für die apoptotische Funktion der BH3-only- Proteine verantwortlich. BH-3- only- Proteine wirken als Sensoren und im Weiteren auch als Mediatoren apoptotischer Signale und leiten die Konformationsänderung von Bax und Bak und damit deren Aktivierung im intrinsischen Weg der Apoptose ein.

Im Folgenden wird jedoch lediglich auf die Proteine genauer eingegangen, die für diese Arbeit von Bedeutung sind. Das anti- apoptotisch wirkende Bcl-2 selbst ist an der äußeren Mitochondrien-membran sowie am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Krajewski et al., 1993), während das pro- apoptotische Protein Bax zunächst zytosolisch vorliegt und erst nach Aktivierung an die Mitochondrien transloziert (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Alle Mitglieder der Bcl-2- Familie sind in der Lage untereinander Mono- und Heterodimere zu bilden, wobei die beiden Proteine Bcl-2 und Bax als Antagonisten zu verstehen sind. Beispielsweise bilden Bcl-2/Bcl-2- Homodimere Schutz vor dem apoptotischen Abbau der Zelle. Eine vermehrte Expression von Bax führt zur Entstehung von Bcl-2/Bax- Heterodimeren oder Bax/Bax- Homodimeren, wobei letztere im Gegensatz zu Bcl-2/Bcl-2-

Homodimeren die Apoptose fördern (Oltvai et al., 1993; Krajewski et al., 1993). Die Relation von pro- und anti- apoptotischen Signalen legt fest, ob in einer Zelle Apoptose eingeleitet wird oder nicht (Oltvai et al., 1993). Bax konnte weiterhin die Fähigkeit nachgewiesen werden, Kanäle in synthetischen Membranen zu bilden (Schendel et al., 1997; Antonsson et al., 1997; Minn et al., 1997). Auf diese Weise beeinflussen Bcl-2 und Bax über die Regulation der Membranpermeabilität die Freisetzung von pro- apoptotischen Stimuli wie Cytochrom c aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien und damit die Aktivierung der Caspase- Kaskade (Tsujimoto et al., 1986; Krajewski et al., 1993; Ravagnan et al., 2002). Damit ist der intrinsische Weg der Apoptose in Bezug auf Aktivitäten an den Mitochondrien durch pro- und antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2- Familie präzise reguliert (Borner, 2003).

1.3. Erythropoetin und carbamyliertes Erythropoetin

Das ca. 30,4 kDa schwere Glykoproteinhormon Erythropoetin (EPO) ist ein Wachstumsfaktor, der im Organismus die Regulation der Erythropoese zur Funktion hat. Unter hypoxischen Bedingungen stimuliert es die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen der Erythrozyten im Knochenmark durch Inhibierung der Apoptose (Jelkman, 2001; Fisher, 2003; Fandrey, 2004). Während der humanen Fetalperiode findet die für die Hämatopoese relevante EPO- Produktion hauptsächlich in der Leber (Hepatozyten und Ito-Zellen), teilweise auch in der Niere statt (Zanjani et al., 1981; Clemons et al., 1986). Im Erwachsenenalter ändert sich dieses Verhältnis zugunsten der Nieren, wobei peritubuläre Fibroblasten die EPO- Produktion wahrnehmen (Lacombe et al., 1988; Maxwell et al., 1993 und 1997; Bachmann et al., 1993). Mittels in-situ- Hybridisierung (Bachmann et al., 1993) und Untersuchungen an transgenen Mäusen (Maxwell et al., 1993) konnte in peritubulären Fibroblasten des äußeren Nierenmarks und des Nierenkortex bei Sauerstoffmangel EPO-Expression nachgewiesen werden. Unter starken hypoxischen Bedingungen kann die EPO-Expression in der Leber erneut aktiviert werden, wobei EPO- Signale sowohl in den Hepatozyten als auch in den Ito-Zellen gefunden wurde (Maxwell et al., 1997). Zudem konnte eine EPO- Expression in weiteren Organen wie beispielsweise dem Gehirn (Dame et al., 2000), oder in Sertolizellen von Ratten (Magnanti et al., 2001) gezeigt werden.

Wie bereits erwähnt, ist für die EPO- Expression die Genregulation auf Transkriptionsebene essentiell, welche ihrerseits von der Sauerstoffversorgung des Organismus abhängt. Nach Identifizierung des sogenannten *Hypoxie- induzierbaren Faktors 1 alpha* (HIF-1α), der für die hypoxische Induktion der EPO- Expression von Bedeutung ist (Semenza et al., 1992), konnte weiterhin das Zusammenspiel des HIF- Komplexes mit HNF- 4 (hepatic nuclear factor 4) (Galson et

al., 1994), sowie die Bedeutung zytosolischer, EPO- mRNA- stabilisierender Proteine beschrieben werden. Mittels systematischer Deletionsstudien und Reportergen- Assays konnte die für die sauerstoffabhängige EPO- Expression ausschlaggebende Domäne im EPO- Gen lokalisiert werden; der 3'-Enhancer zusammen mit dem „hypoxia responsive element „ (HRE) (Semenza, 1991; Pugh, 1991; Madan, 1993).

Beim carbamyliertem EPO (cEPO-FP) handelt es sich um ein künstliches Fusionsprotein, bei dem zwei EPO- Moleküle an die konstante Region eines Antikörpers fusioniert und anschließend ein zusätzlicher Carbamylrest an die Lysinmonomere des EPO- Moleküls gekoppelt werden. Vorteil des cEPO-FP, besonders im Hinblick auf eine klinische Relevanz ist seine geringe erythropoetische Potenz unter Beibehaltung der anderen positiven Wirkungen. Leist et al. konnten nachweisen, dass cEPO-FP nicht am klassischen EPO-Rezeptor (EPOR) bindet und selbst bei Langzeitgabe keine erythropoetische Aktivität zeigt. Dennoch behält cEPO-FP weiterhin seine zytoprotektiven (Nierentubulus- und neuronale Zellen) Effekte, wobei Potenz und Effektivität dem des nativen EPO vergleichbar sind (Leist et al.; 2004). Die Wirkung von cEPO-FP beruht vielmehr auf antiapoptotischen Effekten, durch die das Absterben von myokardialem und neuronalem Gewebe verhindert wird. Im Tiermodell konnten zudem erste Erfolge bei der der Therapie von Herzinfarkten erzielt werden (Fiordaliso et al., 2005).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, Ischämie/Reperfusionsschäden renaler Zellen in einem *in vitro*- Ansatz genauer zu charakterisieren. Beispielsweise kommt es nach thorakalem Aortenclamping beim Ersatz eines Gefäßabschnittes zu Ischämie/Reperfusionsschäden vor allem der Nieren und des Rückenmarks. Diese beiden Systeme reagieren besonders empfindlich auf I/R-Schäden und stehen daher im Mittelpunkt unserer Untersuchungen. In eigenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte hierzu im Schweinemodell bereits eine positive Wirkung verschiedener Substanzen, z.B. H_2S (Simon et al., 2008/1) und Erythropoetin (EPO) (Simon et al., 2008/2) auf die Funktionalität der Niere während Clamping/Declamping- Studien gezeigt werden. Aus diesen Großtierversuchen lassen sich funktionelle und klinisch relevante Daten gewinnen, jedoch bleiben Fragen hinsichtlich zellulärer und subzellulärer Prozesse offen. Um diese Lücken zu schließen, soll in dieser Arbeit ein Hypoxie-Modell für renale Zellkulturen etabliert werden. Basierend auf diesen vielversprechenden Vorarbeiten am Schweinemodell ergaben sich folgende Fragestellungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit geklärt werden sollten:

1. Welche Methodik (mit oder ohne Hypoxiekammer) eignet sich am besten zur Manipulation des Sauerstoffmilieus?
2. Kann mit der gewählten Methode nachweislich Hypoxie in den Zellen induziert werden?
3. Kann eine vollständige Hypoxie/Reoxigenierungssequenz analog zum Großtiermodell (Ischämie/Reperfusionssequenz) in einem *in vitro*- Modell simuliert werden?
4. Können die Ergebnisse bezüglich der Testung von EPO bzw. cEPO-FP im Großtierversuch im entwickelten Hypoxiemodell reproduziert werden? Bzw. können EPO bzw. cEPO-FP positiv auf das Überleben der Zellen einwirken.
5. Bei vergleichender Betrachtung von EPO und cEPO-FP: Ist cEPO-FP dem nativen EPO in seiner Wirkung vergleichbar oder ggf. sogar überlegen?
6. Ist es damit langfristig eventuell möglich, ein verlässliches Vorhersagemodell zur Testung vielversprechender Substanzen für den Großtierversuch zu etablieren?

Für die Realisierung dieser Fragestellungen werden permanente humane (HEK293) und porcine (LLC-PK1) Nierenzellen verwendet. Da es sich um isolierte Zellen handelt, wird nicht von Ischämie bzw. Reperfusion gesprochen, sondern der Zustand des Sauerstoffmangels wird als Hypoxie und die erneute Verfügbarkeit von Sauerstoff als Reoxigenierung bezeichnet. Im Mittelpunkt der Arbeit steht die Entwicklung eines Zellkulturmodells, mit Hilfe dessen in Zellkulturen Hypoxie stabil und zuverlässig simuliert werden soll, um auf zellulärer Ebene das Verhalten beider verwendeter Zelllinien bei Hypoxie und Reoxigenierung zu charakterisieren. Eine weiterer zentraler Punkt der Arbeit sind die Effekte von EPO bzw. cEPO-FP in den untersuchten Zellen während der Hypoxie/Reoxigenierungssequenz.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Zelllinien

Für die Untersuchungen wurden permanente, adhärent wachsende Zelllinien herangezogen. Zum einen handelt es sich um die humane Nierenzelllinie HEK293 (ATCC No. CRL-1573), zum anderen um die porcine Nierenzelllinie LLC-PK1 (ATCC No. CL-101). Beide Zelllinien wurden über die Firma Promochem, Wesel bezogen. Um eventuelle Kontaminationen mit Mycoplasmen frühzeitig zu erkennen, wurden in regelmäßigen Abständen DAPI- Färbungen der Kulturen durchgeführt.

2.1.2. Chemikalien und biochemische Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien der Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deutschland) und Serva (Heidelberg) waren von analytischem Reinheitsgrad. Die Herkunft weiterer Produkten anderer Firmen wird bei der Erwähnung im Methodenteil angegeben.

Bezeichnung (Firma)	Bestellnummer
Acetyl CoA (Sigma)	# A2181
Acridine orange (Sigma)	# 158550-25G
Acrylamid-Bis 29:1 (Serva)	# 10687
Agarose for Routine Use (Sigma)	# A 9539-500G
Ampuwa Spüllösung (Plastipur)	# 13CLP172
Annexin V-FITC/ 7AAD Kit (BD)	# IM3614
APS (Sigma)	# A3678-25G
Aqua Restist (VWR International)	# 462-7000
Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)	# 500-006
Biozidal ZF (WAK- Chemie)	# WAK-ZF-1
Borax (Fluka)	# 71997
Bovine Serum Albumin Fraction V (PAA Laboratories GmbH)	# K41-001
Caspase- Glo 3/7 Assay (Promega)	# G8090

Citrat Synthase, CS from porcine heart (Sigma)	# C3260-1KU
CMXRos (Invitrogen)	# M7512
Colcemid 10 µg/ml in HBSS (Biochrom)	# L6231
DAPI (Sigma)	# D9542-10MG
DEPC treated water (Invitrogen)	# 46-2224
DMEM 10x (Biochrom)	# F0455
DMEM 1x Hepes (Biochrom)	# F0425
DMSO (Serva, Heidelberg)	# 20385
DPBS 1x (GIBCO)	# 14190
DTNB (Sigma)	# D-8130
EDTA (Versen) 1 % (w/v) (Biochrom)	# L2113
Essigsäure >99,8 % (Riedel-de Haën)	# 33209
$EtBr_2$ (Fluka)	# 46067
Eukitt (Kindler)	# S9-25-37
FCS Superior (Biochrom)	# 0615
Gentamycin 10 mg/ml (Biochrom)	# A2710
Giemsa- Färbelösung (Merck)	# 1.09204.0500
Glycin (Applichem)	# A 1377,1000
HBSS 10x (PAN Biotech)	# P04-50500
HBSS ohne Phenolrot (Gibco)	# 14025
Igepal (Sigma)	# I3021-50ML
Kaliumchlorid (Merck)	# 1.04936.0500
L- Lactic Dehydrogenase from rabbit muscle (Sigma)	# L-2500
L- Glutamin 200 mm (Biochrom)	# K0282
LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche)	# 12239264001
Lysetol FF (Schülken+ Mayer)	# PZN-3174462
Methanol >99,8 % (Sigma)	# 32213
Milchpulver (Roth)	# T145.2
Mineral Oil, Embryo tested; sterile filtered (Sigma)	# M5310-500ML
Mowiol 4-88 (Calbiochem)	# 475904
Natriumbicarbonat (Biochrom)	# L1703
NADH (Fluka)	# 43423
Natriumchlorid 0,9 % Lösung (B.Braun)	# 3570160
Natriumchlorid (AnalR Normapur)	# 27.810.295

Oxalacetic acid (Sigma)	# O-4126
Paraformaldehyd, 16 % Lösung (EMS)	# 15710
PBS Dulbecco (Biochrom)	# L182-50
peqGold Total RNA Kit (PEQLAB)	# 12-6834-01
Poly-D-Lysin (Sigma)	# P6407-5MG
Ponceaus S Färbelösung (Sigma)	# P7170-1L
Precision plus Protein Standard Kaleidoscope (Bio-Rad)	# 161-0375
Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)	# 11873580001
Proteome Profiler Array Human Apoptosis Array Kit (R&D Systems)	# ARY009
Pyruvat (Sigma)	# P5280
RNase Zap (Sigma)	# R2020-250ML
SensiMix Two-Step Kit (PEQLAB)	# 06-QT305-01
SDS-Pellets (Serva)	# 20765
SSC Concentrate Buffer 20x (Sigma)	# S6639-1L
Staurosporin ready made (Sigma)	# 56942-200UL
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce)	# 34095
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)	# 04896866001
Tris (USB)	# 75825
Trypanblau-Färbelösung (Sigma)	# T8154
Trypsin 1:250 (Biochrom)	# L2133
Nitrozellulose-Membran (Bio-Rad)	# 162-0115
TEMED (Fluka)	# 87689-100ml
Triton X-100 (Serva)	# 37238
Trypanblau 0,4 % (Sigma)	# T8154
Tween 20 (Serva)	# 39796

2.1.3. Antikörper

Primärantikörper für Western Blot

AMPKβ1 Antibody (Cell Signaling)	# 4178
Bax Antibody (Cell Signaling)	# 2772
Bcl-2 Antibody (Cell Signaling)	# 2876
Bcl-xL- Antibody (Cell Signaling)	# 2762
Caspase 3 (8G10) Rabbit mAb (Cell Signaling)	# 9665

Caspase 9 Antibody (Cell Signaling)	# 9502
cIAP1 Antibody (Cell Signaling)	# 4952
cleaved Caspase 3 Antibody (Cell Signaling)	# 9661
cleaved Caspase 9 Antibody (Cell Signaling)	# 9502
Cytochrome c Antibody (Cell Signaling)	# 4272
HIF-1α Antibody (Cell Signaling)	# 3716
Smac/Diablo Antibody (Cell Signaling)	# 2954
XIAP Antibody (Cell Signaling)	# 2042

Sekundärantikörper für Western Blot

Goat anti rabbit IgG, HRP conjugated (SantaCruz)	# SC2004
Anti-Mouse IgG, HRP (Cell Signaling)	# 7076

Antikörper für FACS- Kompensation

Goat $F(ab)_2$ anti- mouse IgG- FITC (R&D Systems)	# F0103B
Goat anti mouse IgG, human-ads- PE (SouthernBiotech)	# 1030-09
Goat anti mouse IgG (γ chain specific) (BeckmanCoulter)	# 731832
Monoclonal Anti-porcine CD14 Antibody (R&D Systems)	# MAB4597
Mouse anti human CD46: RPE (Serotec)	# MCA2113PET
Mouse anti human CD46: FITC (Serotec)	# MCA2113FT
Porcine CD14 Mab (R&D Systems)	# MAB4597

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Bechergläser 100, 600 ml (VWR)	# 213-1122, -1126
Cryotube 1,8 ml (Nunc)	# 363401
Deckgläser 24 x 50 (Menzel)	# BB024050A1
Dreiwege- Hähne dicofix-3 (Braun)	# PZN 2133047
Duran Laborglasflaschen 100, 250, 500, 1000 (VWR)	# 215-1592, -93, -94, -17
Einmal- Waagschalen (Roth)	# 2159.1
Gefrierröhrchen 1.8 ml (Nunc)	# 363401
Gewindeflasche 4000 ml (Roth)	# Y682.1
Hypoxiekammer (StemCell Technology Inc.)	# 27310

Kanülen Lüer (Terumo)	# 11-1850R
Messzylinder enghals 50, 100, 500 ml (VWR)	# 612-5018, -5019, -5021
Messzylinder weithals 1000, 2000 ml (VWR)	# 612-5116, -511
Mikroskopische Deckgläser rund, 15 mm (VWR)	# 632-1578
Neubauer-Zählkammer Bright Line (Brand)	# 631-1112
Nitrocellulosemembran (Bio-Rad)	# BIOR162-0115
Objektträger Superfrost, geschliffen (Menzel)	# AG00008032E
Petrischalen 60 mm (TPP)	# 93100
Pipettenspitzen Easy load 10 µl, 200 µl, 1000 µl (Greiner)	# 741015,741000, 741045
Pipettenspitzen mit Filter 0,1-10; 1-200; 100-1000 µl (VWR)	# 46620-332; 53510-102; 16466- 004
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 8er Stripes (VWR)	# 211-2140, -2130, -2120, 732-0546
Röntgenfilm AGFA Cronex 5 100 NIF (Roentgen Bender)	# B4194
Serologische Pipetten 5, 10, 25, 50 ml (Corning Inc.)	# 4487, 4488, 4489, 4490
Spritzen Lüer 50 ml (BD Plastipak)	# 300865
Sterilfilter 0,2 µm (Sartorius)	# 18081-E
Whatman Papier (VWR)	# SART1-519-0300-0050
Zellkulturflaschen 25 cm^2 und 75 cm^2 (Nunc)	# 56367, 56499
Zellkulturplatten 6, 12 und 96 well (Nunc)	# 150628,
Zellschaber (Sarstedt)	# 83.1830
Zentrifugen-Röhrchen 15 ml und 50 ml (VWR)	# 525-0150, -0156

2.1.5. Geräte

Consort Electrophoresis Power Supply 835 (Sigma)

Elektrophoresekammer Easy Cast Horizontal System Owl B1 (Thermo)

FACS Canto II (BD)

Inkubator Function Line (Heraeus-Kendro)

Inkubator Heracell150 (Heraeus-Kendro)

Kühlzentrifuge R2.0 (Heraeus-Kendro)

Luminoskan Ascent Mikroplattenluminometer (Thermo Scientific)

Mastercycler (Eppendorf)

Mikroskop (Zeiss)

Mini- Protean Tetra Cell (Bio-Rad)

Nikon Diaphot 300 (Nikon)
Oxi 1970i (WTW)
Perfect Blue Doppelgelsystem Twin-S (PEQLAB)
peqPOWER 300 Volt Power Supply 230 VAC (PEQLAB)
Pipettboy (Hirschmann)
Photometer GeneQuant pro (Amersham)
Sicherheitswerkbank Typ II (Nunc)
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)
Thermocycler (Bio-Rad)
Thermoinkubationsmischer (PEQLAB)
Transferpette -8/-12 electronic (Brand)
Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrometer (Pharamacia Biotech)
Wasserbad GFL

2.1.6. Elektronische Datenverarbeitungsprogramme

Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Incorporated)
AxioVision Rel. 4.5 (Zeiss)
CellB Imaging Software (Olympus)
DatLab 4.0 (Oxygraph 2k Oroboros)
Image J Freeware 1.42
Microsoft Office 2003 (Microsoft)
SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc.)
SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc.)

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung der Zellen

Bei zu hoher Zelldichte in der Kulturflasche sinkt die Proliferationsrate durch Kontaktinhibition und Verbrauch des Mediums. Daher werden die Zellen nach erreichter Maximaldichte passagiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, einer wassergesättigten Atmosphäre von Luft und 5 % CO_2 in DMEM 10 % FCS. Zwei- bis dreimal pro Woche bei einer

Konfluenz von 70 – 90 % wurden die Zellen passagiert (T75 Kulturflasche). Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 5 ml Hanks (HBSS) gewaschen und danach mittels 4 ml Trypsin-EDTA-Lösung und leichtes Abklopfen vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde mit 6 ml Kulturmedium gestoppt und das gesamte Zelllysat in ein 15 ml Falcon- Röhrchen überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1000 rpm und Raumtemperatur (RT) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden je nach Zelllinie im Verhältnis 1:2 bis 1:6 in eine neue Kulturflasche passagiert. Für die Versuche wurden HEK293- Zellen in den Passagen 49 bis maximal 60 und LLC-PK1- Zellen in den Passagen 203 bis maximal 220 verwendet.

Hanks	50 ml Hanks balanced salt solution ad 500 ml A.bidest + 2,4 ml 7,5 % $NaHCO_3$
Trypsin-EDTA-Lösung (0,15 %)	60 ml 2,5 % Trypsin 80 ml 1 % EDTA 86 ml 10 x PBS ad 1000 ml A.bidest + 15 ml 5,5 % $NaHCO_3$ sterilfiltrieren
DMEM 10 % FCS	50 ml 10x DMEM ad 500 ml A.bidest + 14,6 ml 7,5 % $NaHCO_3$ + 2,5 ml Gentamycin (10 mg/ml) + 5 ml L- Glutamin + 50 ml FCS

2.2.2. Entwicklung des Hypoxiemodells

Um für die verwendeten Zelllinien ein optimales, d.h. effektives und stabiles System zur Induktion und Aufrechterhaltung der Hypoxie zu ermitteln, wurden zunächst unterschiedliche, bereits in der Literatur beschriebene Systeme ausgetestet.

1. Mineralöl- Monolayer

Bei dem Modell nach Vanheel, Henry und Meldrum (Vanheel et al., 1989; Henry et al., 1996; Meldrum et al., 2001) werden die Zellen nach Aussaat in T25- Kulturflaschen konfluent kultiviert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend direkt mit Mineralöl überschichtet. Für diese Arbeit wurden zwei Varianten getestet; bei Variante A wurden die Zellen genau nach dem Modell von Vanheel et al. direkt mit Mineralöl überschichtet, bei Variante B wurde das Mineralöl nicht direkt auf die Zellen, sondern auf die Mediumschicht über den Zellen gegeben (Abb.2).

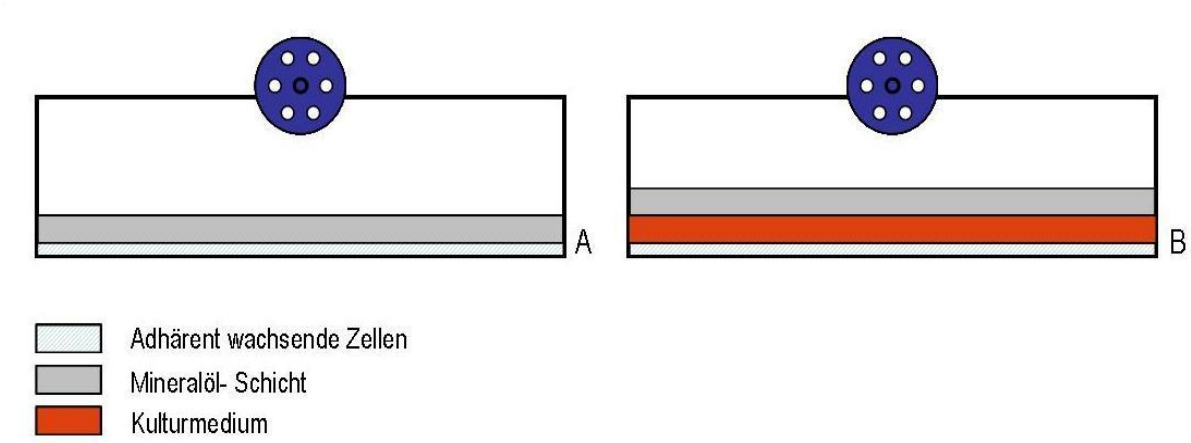

Abbildung 2: Schematische Darstellung von Variante A und B der Mineralöl- Überschichtung in den Kulturflaschen

2. Low O_2 and high CO_2

Nach einem weiteren Modell an LLC-PK1- Zellen, beschrieben bei Hotter et al. aus dem Jahre 2004 konnte eine ischämisch induzierte Apoptose in Nierenzellen durch Kultivierung bei geringer O_2- Konzentration (0,5 %) in Kombination mit einer hohen CO_2- Konzentration (18- 30 %) gezeigt werden. Diese Einstellungen beziehen sich auf eine umgebende Stickstoff- Atmosphäre (Balance N_2; bal N_2). Analog dazu wurden für diese Arbeit HEK293- und LLC-PK1- Zellen in einem Inkubator bei 1 % O_2 und 20 % CO_2 (bal N2) kultiviert.

3. Hypoxiekammer

In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen in einer standardisierten Hypoxiekammer (Silverthorn et al., 2010; Guo et al., 2008; Qanungo et al., 2007; u.v.a.) kultiviert. Um den gelösten O_2 aus dem Kulturmedium zu entfernen, wurde das Kulturmedium zunächst mittels Unterdruck entgast und die

Zellen in einer Hypoxiekammer, die einen dichten Abschluss gegenüber der Außenatmosphäre gewährleistet und ihrerseits in einen Inkubator gestellt wird, kultiviert.
Aus jedem der drei Ansätze wurde Protein isoliert, um die Expression oxidativer Stressfaktoren zu untersuchen.

2.2.3. Induktion der Hypoxie und Reoxigenierung

In jedem Experiment wurden hypoxische Zellen mit normoxischen verglichen. Die Induktion der Hypoxie erfolgte letztendlich nach Modell 3 in einer Hypoxiekammer der Firma StemCell Technologies (Vancouver, BC, Canada; Deutschlandvertrieb durch CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH). Die Zellen wurden etwa 24 h vor Beginn der Hypoxiezeit in Kulturgefäße ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Um einen konstanten pH- Wert in den Kulturen aufrecht zu erhalten, wurden die Zellen für die Dauer der Hypoxie in Hepes- gepuffertem DMEM 10 % FCS kultiviert. Das verwendete Medium wurden vor Beginn der Experimente wie in Abbildung 2 dargestellt, portionsweise (5 ml/ T25- Kulturflasche) mittels Unterdruck entgast. Maximal 30 ml DMEM Hepes wurden in eine 50 ml Spritze aufgesaugt und die Spritze anschließend mit einem Dreiwegehahn verschlossen. Durch Ziehen am Kolben entsteht im Spritzeninneren ein Unterdruck, der für das Entweichen des gelösten Sauerstoffs aus dem Medium verantwortlich ist. Die Gasphase wurde durch Umstellen des Dreiwegehahns entlassen und der Dreiwegehahn erneut verschlossen. Dieser Vorgang wurde 10 Mal wiederholt. Anschließend erfolgte zügig der Mediumwechsel von Normoxie- auf Hypoxiemedium in den Kulturflaschen. Gegebenenfalls wurde den Zellen bei diesem Schritt zusätzlich 1 IU bzw. 100 IU EPO (respektive cEPO-FP) pro 5 ml Medium ins Hypoxiemedium zugesetzt. Die Kammer gewährleistet einen dichten Abschluss gegenüber der Außenatmosphäre und wird ihrerseits in einen Inkubator gestellt. Der Innenraum der Kammer wurde anschließend nach Herstellerangaben 4 min mit 20l/ min N_2 begast. Kontrollzellen wurden im gleichen Inkubator, in normoxischem Hepes- gepuffertem Medium außerhalb der Hypoxiekammer inkubiert. Die Reoxigenierung erfolgte durch Entnahme der Kulturflaschen aus der Kammer. Das hypoxische Medium wurde abgenommen und durch normoxisches DMEM 10 % FCS ersetzt. Die weitere Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen im Inkubator (37 °C, 5 % CO_2).

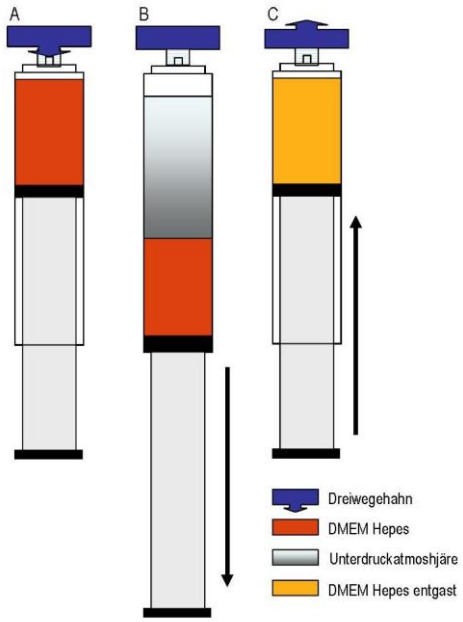

Abbildung 3: Herstellung des Hypoxiemediums; Entgasen mittels Unterdruck (Schemadarstellung)

2.2.4. Bestimmung des O_2- Gehalts im Hypoxiemedium

Die Bestimmung der O_2- Konzentration im Kulturmedium während der Kultivierung in der Hypoxiekammer erfolgte über eine Clark- Elektrode. Hierzu wurden einmalig Bohrungen in den Deckeln der Kammer gesetzt, die über einen Gummistopfen abgedichtet wurden. Erste Messungen des Sauerstoffgehalts wurden mit Hilfe eine Blutgasanalysegeräts (IL 1620, Instrumentation Laboratory) durchgeführt und anschließend über Referenzen der Sauerstoffgehalt berechnet. Die Messung der O_2- Konzentration erfolgte mit dem portablen Sauerstoffmessgerät Oxi1970i der Firma WTW. Mit dem Gerät konnte sowohl die Sauerstoffkonzentration (mg/l) als auch die Sauerstoffsättigung (%) im Kulturmedium über verschiedene Zeiträume verfolgt werden. Das Medium wurde mittels Unterdruck entgast und in ein Kulturgefäß gegeben, das in die Hypoxiekammer gestellt wurde. Nach dem dichten Verschließen der Kammer wurde diese 4 min mit 20l/ min N_2 begast und in den Inkubator gestellt. Das Sauerstoffmessgerät protokollierte stündlich Messwerte. Da lediglich die Stabilität des Hypoxiemediums untersucht werden sollte, wurden diesen Messungen ohne Zellen durchgeführt.

2.2.5. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zellen können als Suspension in kleinen Aliquots tiefgefroren und bei Bedarf „wiederbelebt“ werden. Jedes Zellkulturlabor verfügt über Reserven der eigenen Zelllinien, da man im Falle einer Kontamination wieder auf diese zurückgreifen kann. Zudem besteht bei zu vielen Passagen der Zellen die Gefahr der Dedifferenzierung der Zellen, daher werden „zu alte“ Zellen für Versuche nicht mehr verwendet. Gut wachsende Zellen (T75 Kulturflaschen) wurden trypsiniert und zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT). Aus zwei T75 Kulturflaschen erhält man Zellen für drei Tieffrierampullen (Cryotubes). Pro Tieffrierampulle wurde das Zellpellet in 500 µl Kulturmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte unter Schütteln die tropfenweise Zugabe von 600 µl DMSO. Dies wird dem Medium als Schutzsubstanz zugesetzt, da es die Bildung von Eiskristallen verhindert. Die Kühlung der Ampullen erfolgte für mindestens eine Stunde stufenweise in der Gasphase des Stickstofftanks oder in einem -80 °C Tiefkühlschrank. Zur weiteren Lagerung wurden die Ampullen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) abgetaucht. Der Tieffriervorgang sollte 20 Minuten nicht überschreiten, da DMSO bei steigender Temperatur toxisch wirkt.

Zum Auftauen der Zellen werden Aliquots der Tieffrierzellsuspensionen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Sobald in der Ampulle nur noch eine kleine Eiskugel zu sehen war wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und tropfenweise 9 ml Kulturmedium zugegeben. Nach Zentrifugation (1.000 rpm, 5 min, RT) wurde der Überstand abgenommen, die Zellen erneut in 1 ml DMEM 10 % FCS resuspendiert und mit Kulturmedium auf 10 ml aufgefüllt, um so das DMSO schonend aus den Zellen zu waschen. Dieser Waschschritt wurde noch einmal wiederholt, die Zellen in 2 ml Medium resuspendiert und die Zellen in T25 Flaschen oder 6well-Platten in Kultur gebracht.

2.2.6. DAPI- Färbung

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff der sich aufgrund seiner Affinität zu AT- reichen Sequenzen in die DNA einer Zelle einlagert und daher zur Markierung von DNA eingesetzt werden kann. Der Farbstoff wird in der Mikroskopie mit UV- Licht angeregt und fluoresziert daraufhin blau. Neben der Bindung an DNA kann der Farbstoff ebenso für die Markierung zellulärer RNA verwendet werden, wobei die Fluoreszenz hierbei wesentlich geringer ist. Aufgrund dieser Eigenschaften wird DAPI häufig für Kernfärbungen verwendet.

Um Qualität und Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden beide Zelllinien regelmäßig DAPI gefärbt und auf diese Weise auf Mycoplasmen getestet. Hierzu wurde auf Objektträger in

Petrischalen ein 50- 70 % Zellmonolayer kultiviert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurde das Medium abgenommen und die Objektträger zweimal kurz in PBS gewaschen. Die Zellen wurden weiterhin einmal kurz in etwa 10 ml DAPI- Methanol- Lösung gewaschen und anschließend in frischer DAPI- Methanol- Lösung 15 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Man benötigt 25 ml Färbelösung pro Petrischale (Endkonzentration 0,1µg/ml).
Danach wurden die Objektträger mehrmals kurz in PBS gewaschen und die Objektträger mit Deckgläschen eingedeckelt. Bei der Mikroskopie der Zellen wurde hauptsächlich das Zytoplasma der Zellen beurteilt, da die Mycoplasmen dort am deutlichsten auftreten. Als mycoplasmen- negativ wurden Zellen gewertet, deren Zellkern deutlich mit DAPI gefärbt war, während das Zytoplasma lediglich schwach, aber homogen gefärbt war. Mycoplsamen- positiv wären solche Zellen gewesen, die ebenfalls eine Kernfärbung, aber zudem deutliche Einschlüsse im Zytoplasma gezeigt hätten. Dies war jedoch zu keiner Zeit in den getesteten Kulturen der Fall.

2.2.7. Trypanblau- Färbung

Die Vitalität von Zellen kann vergleichsweise schnell und einfach mit Hilfe der Trypanblau- Färbung überprüft werden. Trypanblau gelangt durch defekte Membranen toter Zellen ins Zytosol und färbt dieses aufgrund von Interaktionen mit Zellproteinen tiefblau. In lebende, d.h. intakte Zellen kann der Farbstoff jedoch nicht eindringen. Normoxische und hypoxische Zellen wurden entsprechend der Probenart kultiviert, danach abtrypsiniert und das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal in 1 ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert und mit 100 µl 0,4 % Trypanblau-Lösung (Gebrauchslösung, Sigma) versetzt. Die Inkubationszeit bei der Trypanblau- Färbung variiert in der Regel von etwa 5 bis 15 min und müsste für jede Probe ausprobiert werden. Um Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden jedoch alle Präparate nach 5 min Färbezeit ausgezählt. Zudem wurde in Vorversuchen ein Anstieg toter Zellen bei längeren Färbezeiten ab 10 bis 15 min beobachtet. Die Auswertung erfolgte mittels Neubauer- Zählkammer (Bright Line), wobei alle Zellen der 4 großen Eckquadrate ausgezählt und anschließend der prozentuale Anteil trypanblau- positiver Zellen berechnet wurde.

2.2.8. Mitochondrienspezifische Färbung - MitoTrackerRed (CMXRos)

Um die mitochondrialen Strukturen, wie z.B. Form und Lokalisation in der Zelle sichtbar zu machen, wurde diese mit dem mitochondriene- spezifischen, rot- fluoreszierenden Farbstoff CMXRos markiert. MitoTracker Red- Farbstoffe werden passiv durch die Zellmembran aufgenommen und

akkumulieren in Abhängigkeit des mitochondrialen Membranpotentials in diesen Organellen. Sie besitzen eine Thiol- reaktive Chloromethylgruppe, durch deren Bindung an freie Thiolgruppen formaldehydfixierbare Konjugate entstehen, die anschließend im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können. Da die Aufnahme des Farbstoffs abhängig vom Mitochondrienpotential ist, können auf diese Weise Änderungen diese Potential als Nachweis apoptotischer Prozesse herangezogen werden, bei denen es zusätzlich zu Veränderungen der Mitochondrienstruktur sowie zu Änderungen an der Mitochondrienmembran kommt.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen in 6well- Schalen bis etwa 80 % Konfluenz kultiviert. Der Fluoreszenzfarbstoff CMXRos wurde nach Angaben des Herstellers (Molecular Probes) verdünnt und für 5 min auf die Zellen gegeben (37 °C, 5 % CO_2). Die Deckgläschen wurden kurz in Hanks geschwenkt und anschließend erfolgte die mikroskopische Auswertung mittels CellB Imaging Software.

2.2.9. Bestimmung von Expressionsprofilen Apoptose- relevanter Proteine

Für die Analyse von Expressionsprofilen wurde das Human Apoptosis Array Kit der Firma R&D Systems eingesetzt. Auf diese Weise kann parallel die relative Expression 35 verschiedener apoptose- relevanter Proteine bestimmt werden. Für zusätzliche Doppelbestimmungen sind spezifische Antikörper und Kontrollantikörper zweifach auf die Nitrozellulosemembran aufgebracht. Das Kit wurde entsprechend den Herstellerangaben verwendet und pro Array 500 µg Proteinlysat eingesetzt. Nach Inkubation mit diesem Lysat über Nacht bei 4°C auf dem Schwenker wurden die Membranen mehrfach in 1x Waschpuffer gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit biotinyliertem Zweitantikörper. Nach weiteren Waschschritten wurden die Membranen zur Verstärkung des Signals mit Streptavidin- HRP in 1x Array Puffer 2/3 inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte über eine Chemolumineszenz-Reaktion. Entwickelt wurde auf Frischhaltefolie mit dem SuperSignal West Femto- Kit (Pierce).

2.2.10. Caspase 3/7- Aktivierung

Die Caspasen 3 und 7 spielen eine zentrale Rolle bei der Initiierung der Caspase- Kaskade und damit bei der Einleitung apoptotischer Prozesse in der Zelle. Basierend auf der Messung eines Lumineszenzsignals, das proportional zur Menge aktivierter Caspasen ist, wurde mit dem Caspase-Glo® 3/7 Assay der Firma Promega die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 untersucht. Um die ideale Zellzahl für diese Experimente zu ermitteln, wurde entsprechend den Herstellerangaben zunächst eine Standardkurve ermittelt.

2.2.11. Bestimmung der zellulären Proliferation

Analog zur Messung der Caspase- Aktivierung wurden Bestimmungen zum Proliferationsvermögen der Zellen durchgeführt. Der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) beruht auf der Bestimmung des ATP- Gehalts metabolisch aktiver Zellen durch Messung einer Luziferasereaktion. Das gemessene Lumineszenzsignal ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen. Ebenso wie bei den Versuchen zur Caspase 3/7- Aktivierung wurde vor den eigentlichen Proliferationsversuchen eine Standardkurve erstellt, um die optimale Zellzahl zu bestimmen. Des Weiteren wurden sowohl bei den Versuchen zur Caspase 3/7- Aktivierung als auch bei den Proliferationsbestimmungen je 2 wells der 96 well- Platte ausschließlich mit Medium ohne Zellen bestimmt, um für jede Messung die Hintergrund- Lumineszenz, die mit dem Kulturmedium in Zusammenhang steht, zu erfassen.

2.2.12. Bestimmung von apoptotischen und nekrotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Unter FACS (fluorescence activated cell sorting; Becton Dickinson, San Diego, USA) versteht man ein Verfahren zur Bestimmung der Eigenschaften von Zellpopulationen. Die fluoreszenzmarkierten Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul des Geräts einen Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, das anhand von Detektoren, wie z.B. Photomultipliern detektiert wird. Man unterscheidet zwei Parameter. Zum einen das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FCS), der ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel abbildet. Zum anderen definiert man das Seitwärtsstreulicht (Sidewards Scatter, SSC), das ein Maßstab für die Brechung des Lichts im rechten Winkel darstellt. Die Menge des gestreuten Lichts hängt direkt mit der Größe und Komplexität der Zell ab. Die Untersuchungen wurden mit dem FACS – Canto II der Firma Becton und Dickinson durchgeführt.

Annexin V-FITC/7-AAD- Doppelmarkierung

Die Markierung der Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Annexin V-FITC/7-AAD-Kit der Firma Beckton Dickenson. Das Prinzip dieser Färbung beruht auf Veränderungen der Plasmamembran während apoptotischen Prozessen in der Zelle. Hierbei wird das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der zytoplasmatischen Membranseite auf die extrazelluläre Seite verlagert (Castedo, 1996). Das Annexin V- Protein (35- 36 kDa) ist ein Ca^{2+}- anhängiges

phospholipidbindendes Protein mit einer hohen Affinität zum negativ geladenen Phosphatidylserin und bindet somit an Zellen mit extrazellulärem PS. Daher eignet sich Annexin V zur Bestimmung von apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie. Da diese Phosphatidylserinexposition auf die extrazelluläre Membranseite ebenso bei nekrotischen Zellen auftritt, wird die Annexin V-FITC-Färbung mit einer 7-AAD- Markierung komplettiert. 7-AAD (7-Amino Actinomycin D) ist ein fluoreszierendes Molekül, das nach Bindung an DNA-Moleküle, mit hoher Selektivität zwischen den Basen Cytosin und Guanin unterscheidet (Chen Chiao, 1979; Philpott, 1996), indem es ihre Fluoreszenzeigenschaften ändert (Gill, 1975). In vitale Zellen wird 7-AAD hingegen nicht aufgenommen. Mit Hilfe dieser Doppelfärbung ist es möglich, intakte, apoptotische und nekrotische Zellen voneinander zu unterscheiden (Philpott, 1996; Lecoeur, 1998). Da die Annexin V-FITC/7-AAD- Doppelmarkierung mit dem Kit der Firma Beckton Dickenson humanspezifisch funktioniert, wurde diese ausschließlich für HEK293- Zellen durchgeführt. Neben den Messungen der zu untersuchenden Proben, wurden in Vorversuchen als Referenz zudem Positivkontrollen, d.h. Zellen, in denen Apoptose auf chemischem Wege induziert wurde, hergestellt. Hierzu wurden Zellen über einen Zeitraum von 2 h mit 1 µM Staurosporin behandelt.

Kompensationskontrolle bei Doppelmarkierung

Da sich Emissionsspektren mehrerer Fluoreszenzen teilweise überschneiden können, muss daher eine Korrektur dieser Überlagerung erfolgen. Hierzu wurden von jeder Zelllinie separat einfach gefärbte und ungefärbte Zellen (~ 1Million Zellen/ Probe) verwendet. Die Zellen wurden trypsiniert, zweimal in PBS gewaschen und das Pellet anschließend in 100 µl PBS resuspendiert. Danach wurden je 10 µl direkt PE bzw. FITC markierte Antikörper auf die Zellen gegeben und diese für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und das Pellet in PBS resupendiert. Zunächst wurden ungefärbte Kontrollzellen gemessen und auf diese Weise die Autofluoreszenz der Zellen bestimmt. Anschließend wurden der Reihe nach FITC und PE gefärbte Zellen gemessen und beide Farbstoffe so reguliert, dass sich die Fluoreszenzen nicht überschneiden. Die Kompensation wurde vom FACS Canto errechnet und die Einstellungen für alle nachfolgenden Messungen gespeichert. Die Kompensation wurde regelmäßig alle 6 Monate durchgeführt.

2.2.13. Western Blot

Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Die in T25 Flaschen ausgesäten Zellen wurden im Medium mit einem Zellschaber abgekratzt, mit eiskaltem PBS auf 10 ml aufgefüllt und 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und das Volumen erneut auf 10 ml aufgefüllt. Nach Zentrifugation wurde das Pellet je nach Größe in 50- 100 µl Lysepuffer resuspendiert und die Zellsuspension in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Zell- Lysepuffergemisch für 30 min bei 4 °C inkubiert und gelegentlich gevortext. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm für mindestens 20 min. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proben bei -80 °C gelagert.

Lysepuffer (RIPA/PIC)	150 mM NaCl (aus 5 M NaCl; 1 : 33,3)
	1 % IGEPAL
	0,1 % SDS (aus 20 % SDS; 1:200)
	50 mM Tris pH 8,0 (aus 200 mM Tris; 1:4)

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte photometrisch bei 595 nm mittels Bio-Rad Protein Assay nach Angaben des Herstellers (Bio Rad). Alle Proben wurden mit 1x EMSA- Puffer auf eine Konzentration von 200 µg/ 100 µl eingestellt. Die jeweilige gewünschte Proteinmenge wurde im Verhältnis 1:1 mit zweifach Sample Buffer versetzt und das Gemisch anschließend für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert.

10 x EMSA Buffer	100 mM Tris- HCl pH 7,9
	500 mM NaCl
	10 mM EDTA
	10 mM DTT
	20 % Glycerol
	100 µg BSA
1 x EMSA Buffer	1:10 in A.dest. verdünnen

Sample Buffer (2x)	6g SDS
	12,5 ml 1M Tris HCl pH 6,8
	20 g Glycerol
	8 ml β- MSH
	1 Spatelspitze Bromphenolblau (bis zur gewünschten Färbung)
	Ad 100 ml A.dest.

SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE)

Zunächst wurden alle Komponenten der Gelapparatur gründlich mit 70 % Ethanol gereinigt. Zur Trennung der Proteine nach Größe, wurden 5, 10, 12 und 15 %ige Polyacrylamid (29:1)- Trenngele hergestellt. Auf jedes Trenngel wurde direkt 4,5 %iges Sammelgel gegossen und der Spacer (Kamm) gesetzt. Nach etwa 60 min Auspolymerisierungszeit wurde das Minigel in Frischhaltefolie im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Es erwies sich als vorteilhaft, das Gel vor der Verwendung eine Nacht im Kühlschrank zu lagern, da es so besser ausgehärtet war. Vor dem Gellauf wurde der Spacer gezogen und die Taschen mit Laufpuffer gespült, um überschüssige Gelreste zu entfernen. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer gesetzt und diese mit Puffer aufgefüllt. Anschließend wurden Proteinproben sowie der mitgeführte Größenstandard (Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope) mit Hilfe einer Hamilton Glasspritze aufgetragen. Der Gellauf wurde mit 90 V für 15 Minuten gestartet und danach für weitere 45 Minuten bei 180 V durchgeführt.

Tabelle 1: Pipettierschema für verschiedene SDS- Trenngele (drei 1,0 mm Gele)

Trenngel	**5 %**	**10 %**	**12 %**	**15 %**
Lower Buffer	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Acrylamid	3,5 ml	6,65 ml	8,0 ml	10 ml
A.dest.	11,39 ml	8,24 ml	6,89 ml	4,89 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Tabelle 2: Pipettierschema für drei 1,0 mm Sammelgele

Sammelgel	**4,5 %**
Upper Buffer	2,5 ml
Acrylamid	1,5 ml
A.dest.	5,89 ml
TEMED	10 µl
APS	100 µl

Upper Buffer	0,5 M Tris
	4 % SDS
	ad 350 ml A.dest, pH mit 10 N HCl auf 6,8 einstellen;
	auffüllen auf 500 ml; lagern 4 °C
Lower Buffer	1,5 M Tris
	0,4 % SDS
	ad 350 ml A.dest, pH mit 10 N HCl auf 8,8 einstellen;
	auffüllen auf 500 ml; lagern 4 °C
Laufpuffer (10x)	142,4 g Glycin
	30,3 g Tris
	10 g SDS
	Ad 1000 ml A.dest.
Laufpuffer (1x)	100 ml Laufpuffer (10x)
	Ad 1000 ml A.dest.

Western Blot

Nach erfolgter SDS-PAGE zur Trennung der Proteine entsprechende ihrer Größe, wurde das Gel aus der Apparatur gelöst und ebenso wie die Whatmanpapiere und die Nitrocellulosemembran in Blotpuffer equilibriert. Der Proteintransfer wurde im Halbtrocken- Verfahren (Semi-Dry-Blotter, Bio Rad) für 1 h bei 20 V durchgeführt. Um die Qualität des Blots zu überprüfen wurde die Membran anschließend in Ponceau S- Lösung (Gebrauchslösung; Sigma) gefärbt und in A.dest entfärbt. Vor der Antikörperbehandlung wurden die Membranen zudem 5 min in TBS gewaschen.

Blotpuffer (10x)	582,5 g Tris 285,2 g Glycin 37,0 g SDS In 1500 ml A.dest lösen und anschließend auf 2000 ml auffüllen.
Blotpuffer (1x)	100 ml Blotpuffer (10x) 200 ml Methanol Ad 1000 ml A.dest.
TBS (10x)	24,2 g Tris 80 g NaCl Ad 1000 ml A.dest.
TBS (1x)	100 ml TBS (10x) Ad 1000 ml A.dest.

Antikörperreaktion

Die Antikörper wurden entsprechend der Herstellerangaben behandelt. Abweichend vom angegebenen Protokoll wurden die Antikörper Caspase 3 und 9 sowie cleaved Caspase 3 und 9, Xiap, Cytochrome c und Smac/Diablo nicht in 5% Milch, sondern in 1. Antikörperdilution gelöst. Weiterhin wurde bei allen Antikörpern außer Bcl-xL, Bax und p21 nicht mit 5 % Milch, sondern in Blotto B blockiert. Die Membranen wurden mit diesen Primärantikörpern über Nacht bei 4°C auf dem Schwenker inkubiert. Danach erfolgten 3 Waschschritte à 5 min in TBS/$T_{0,1\%}$. Primärantikörper binden mit hoher Affinität und hochspezifisch an das entsprechende Antigen, das auf die Membran geblottet wurde. An diesen Primärantikörper bindet ein Sekundärantikörper, an den das HRP-Enzym (horseradish peroxidase; Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist und über das letztendlich die Detektion der einzelnen Signale erfolgt. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:1000) über Nacht wurden die Membranen erneut 3 mal 5 min in TBS/$T_{0,1\%}$ gewaschen und anschließend der entsprechende Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:15.000 gelöst in Blotto B auf die Membranen gegeben. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1h bei RT auf dem Schwenker. Danach wurde erneut 3 mal 5 min in TBS/$T_{0,1\%}$ gewaschen. Um Tween-Rest von den Membranen zu waschen wurde vor dem Entwickeln zusätzlich einmal 5 min mit TBS

gewaschen. Detektiert wurden die Antikörpersignale mit dem Chemilumineszenz- Reagenz Supersignal (Pierce) nach Herstellerangaben auf Agfa Cronex-5- Filmen.

5 % Milch	100 ml TBS/$T_{0,1\%}$ 5 g Milch
1. Antikörperdilution	100 ml TBS/$T_{0,1\%}$ 5 g BSA
Blotto B	500 ml TBS/$T_{0,1\%}$ 5 g Milch 5 g BSA
TBS/$T_{0,1\%}$	100 ml TBS (10x) Ad 1000 ml A.dest + 1000 µl Tween 20

Auswertung

Die Röntgenfilme wurden gescannt und mit Hilfe des Microsoft Office Picture Manager wurde aus den Bilder die Farbsättigung entfernt, so dass für die anschließende Auswertung mittels ImageJ nur schwarz-weiß- Bilder mit verschiedenen Graustufen zur Verfügung standen. ImageJ bestimmt die Schwärzung in einem gesetzten Rahmen und berechnet daraus einen Wert, der anschließend in einer Excel- Tabelle gespeichert werden kann. Betrachtet wird bei der Auswertung mittels ImageJ die Anzahl der Pixel und gemessen werden neben die ‚Area', der minimale und maximale ‚Gray Value', der ‚Mean Gray Value' sowie die ‚Integrated Density (IntDen)'. Es wurden jeweils mindestens drei voneinander unabhängige Einzelexperimente ausgewertet. Da immer normoxische mit hypoxischen Zellen verglichen werden sollten, wurde für die endgültige Auswertung die IntDen der Kontrollen gleich 1 gesetzt.

2.2.14. Zelluläre Respiration

Für respirometrischen Messung wurde der Oxygraph 2k der Firma OROBOROS (Innsbruck; Österreich) verwendet. Das Gerät ist ein Zwei-Kammer-Titrations- Injektionsrespirometer für die hochauflösende Messung der zellulären Atmung. Jede der beiden Kammern wird mit Hilfe eines Stopfens luftdicht verschlossen. In jeden Stopfen ist eine dünne Kapillare eingelassen, durch die mittels einer Hamilton Mikroliterspritze Substanzen in die Kammern gegeben werden können. Während jeder Messung wird die Temperatur konstant auf 37 °C gehalten. Kontinuierliches Rühren während der gesamten Messung mit den elektromagnetischen Rührern in der Kammer gewährleistet eine optimale Durchmischung der Proben und verhindert eine Sauerstoffverarmung in der Nähe der Kathode. Zwei polarographische Sauerstoffsensoren (POS-Elektroden) messen die Sauerstoffkonzentration in den beiden Messkammern. Beide Sauerstoffsensoren bestehen aus einer Platin- Kathode und einer Silber- Anode und sind von einer gesättigten Kaliumchloridlösung umgeben. Die Sensoren sind komplett von einer dünnen, sauerstoffdurchlässigen Teflonmembran umhüllt, durch die der in der Probe enthaltene Sauerstoff diffundieren kann und dann an der Kathode reduziert wird. Der auf diese Weise gemessene Stromfluss ist direkt proportional zur Sauerstoffkonzentration in der Probe. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der zugehörigen DATLab Analysis Software der Firma OROBOROS.

2.2.15. Respiratorische Messung

In die Messkammern wurde je 4,5 ml Zellsuspension in MIROV- Medium gegeben. Bevor die Kammern verschlossen wurden, wurden je 500 µl Zellsuspension zur Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) und der Citrat- Synthase (CS) abgenommen sowie 1ml für die Ermittlung der Proteinkonzentration. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Zählkammer, wobei gleichzeitig mit Hilfe von Trypanblaufärbung der Anteil toter Zellen ermittelt wurde. Es wurde folgendes Messprotokoll durchgeführt (Tab.3.)

Tabelle 3: Messprotokoll Digitonin- Regime

	Konzentration	Titrations-volumen [µl]	Endkonzentration
Digitonin	8,1 mM	2	8,1 µM
Glutamat/Malat	2 M / 0,8 M	10 / 3,5	10 mM / 5 mM
ADP	0,5 M	20	10 µM
Cytochrom C	4 mM	5	10 µM
Succinat	1 M	20	10 mM
Oligomycin	4 mg/ ml	1	5 µM
FCCP	0,1 mM	1 (+0,5+0,5+…)	0,05 µM
Rotenone	0,2 mM	4	0,5 µM
Antimycin A	5 mM	1	5 µM
Ascorbat/TMPD	0,8 M / 0,2 M	5 / 5	2 mM / 0,5 mM

Bei allen Messungen wurde zunächst etwa 5 bis 10 min die Routineatmung der Zellen aufgezeichnet. Um die Zellmembran zu permeabilisieren wurden im ersten Schritt 8,1 µM Digitonin titriert. Danach erfolgte die Gabe von Glutamat (10 mM) und Malat (5mM) als Substrate der NADH-Dehydrogenase (Komplex I der Atmungskette; *state-3-Atmung*). Nach jeder Gabe von Substraten bzw. Inhibitoren wurde solange aufgezeichnet bis sich das Signal stabilisierte (Plateaubildung) und wird im Folgenden nicht mehr explizit erwähnt. Zur maximalen Stimulation der mitochondrialen Atmung wurden danach 2 mM ADP titriert, wodurch sich und die substratabhängige, aktive Atmung einstellt. Um zu überprüfen, ob die Membranen der Zellen intakt oder beschädigt sind, wurde danach Cytochrom c im Überschuss (10 µM) zugegeben. Anschließend erfolgte die Testung von Komplex II der Atmungskette (Succinat- Dehydrogenase) durch Titration von 10 mM Succinat. Danach erfolgte die Zugabe von 5 µM des Antibiotikums Oligomycin, um die ATP- Synthase irreversibel zu inhibieren. Dadurch findet nur noch eine nicht- phosphorylierende Restatmung statt, der sogenannten *state-4*-Atmung. Anschließend wird die maximale Atmungsrate durch 0,5 µM des künstlichen Entkopplers FCCP (Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon) ermittelt. Durch die Zugabe von 0,5 µM Rotenon erfolgte die Hemmung des Komplex I. Die darauffolgende Zugabe von Antimycin A unterbricht den Elektronentransport am Komplex III (Cytochrom c-Reduktase) der Atmungskette und bewirkte letztlich die völlige Unterbindung des Sauerstoffverbrauches an der Atmungskette. Der unter diesen Bedingungen messbare Sauerstoffverbrauch kommt durch nichtenzymatische und extramitochondriale Reduktion von Sauerstoff zustande und wird als Antimycin- resistente Atmung bezeichnet. Nach Reoxigenierung

der Kammern erfolgt am Ende jeder Messung die Gabe von Ascorbat (2 mm) und TMPD (N,N,N`,N`-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin-dihydrochlorid; 0,5 mM).

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte photometrisch bei 595 nm mit dem Bio-Rad Protein Assay wie in Abschnitt 2.2.13 beschrieben.

Bestimmung der CS- Aktivität

Um die Aktivität der Citratsynthase (CS) zu ermitteln, wurde von den zuvor abgenommenen 500 µl-Aliquots 100 µl Zellsuspension für die Messung eingesetzt. Es wurde jeweils ein Leerwert (LW) sowie ein Standard (Citrat Synthase from porcine heart) bestimmt. Die Messungen erfolgten spektrometrisch in Quarzküvetten bei 412 nm. Zunächst wurde in jede Küvette 700 µl A.dest vorgelegt sowie jeweils 100 µl DTNB- Puffer, 25 µl 10 % Triton- Lösung, 50 µl Oxalacetat- Puffer sowie 25 µl CoA- Puffer zugefügt. Danach wurden die Küvetten kurz gevortext und für 5 min im Photometer inkubiert (30 °C). Danach wurde jeweils 100 µl Zellsuspension zugegeben und es erfolgten Messungen direkt nach Zugabe der Zellen und 4 weitere Messungen im Abstand von jeweils einer Minute. Folgende enzymatische Reaktion wird durch die CS katalysiert:

$$\text{Acetyl-CoA + Oxalacetat + } H_2O \rightarrow \text{Citrat + CoA}$$

Das Prinzip der Messung beruht auf der Bindung des Coenzym A (CoA), einem Produkt der CS an das DNTB, Licht der Wellenlänge 412 nm absorbiert. Spektrometrisch kann auf diese Weise die Extinktion/Minute (E/min) bestimmt werden. Die nukleär kodierte CS ist in der Mitochondrienmatrix lokalisiert, wobei sie an den Ribosomen synthetisiert und anschließend in die Mitochondrienmatrix transportiert wird. Die CS wird daher als quantitativer Marker für die Anzahl intakter Mitochondrien herangezogen (Holloszy et al., 1970; Williams et al., 1986; Hood et al., 1989).

1 M Tris-HCl- Puffer pH 8,1	2,4 g Tris/ 20 ml A.dest mit 37 % HCl auf pH 8,1 einstellen
0,5 M Triethanolamin-HCl- Puffer	8,06 g Triethanolamin/ 100 ml A.dest

pH 8,0 + 5 mM EDTA	mit 37 % HCl auf pH 8,0 einstellen und 186,1 mg EDTA zugeben
10 % Triton X-100- Lösung	10 ml 100 % Triton X-100 ad 100 ml A.dest
12,2 mMAcetyl-CoA- Puffer	25 mg Acetyl-CoA + 2,5 ml A.dest zu 250 µl aliquotieren und bei -20 C lagern
0,1 M Triethanolamin-HCl- Puffer (immer frisch herstellen)	1 ml 0,5 M Triethanolamin-HCl- Puffer pH 8,0 + 4 ml A. dest
10 mM Oxalacetat- Lösung pH (immer frisch herstellen)	6,6 mg Oxalacetat + 5 ml 0,1 M Triethanolamin-HCl- Puffer 8,0
1,01 mM DTNB- Lösung (immer frisch herstellen)	2 mg DTNB + 5 ml 1 M Tris-HCl- Puffer pH 8,1

Bestimmung der LDH- Aktivität

Die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) wurde ebenfalls spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm ermittelt. Die zugrunde liegende Reaktion der Messung beschreibt sich wie folgt:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} \rightarrow \text{Laktat} + \text{NAD}^+$$

Für jede Messreihe (Leerwert, Standard und 4 Proben) wurde zunächst ein Mastermix entsprechend der Probenanzahl hergestellt. Pro Probe werden 870 µl This-HCl- Puffer, 10 µl 1 M Pyruvat 20 µl 15 mM NADH- Stammlösung benötigt. Nach sorgfältigem, vorsichtigem Mischen wurden die Küvetten 5 min bei 30 °C im Spektrometer inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Zellsuspension wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) aufgrund von 4 Messungen über einen Zeitraum von 2 min ermittelt.

100 mM Tris-HCl- Puffer pH 7,1	1,21 g Tris/ 100 ml A.dest. mit 37 % HCl auf pH 7,1 einstellen

10 % Triton X-100- Lösung	10 ml 100 % Triton X-100 ad 100 ml A.dest
15 m NADH- Stammlösung (immer frisch herstellen)	11,5 mg NADH + 1 ml A.dest.
1 M Pyruvat- Stammlösung (immer frisch herstellen)	110 mg Pyruvat + 1 ml A.dest.

2.2.16. Statistik

Um signifikante Unterschiede zwischen normoxischen und hypoxischen sowie cEPO-FP bzw. EPO-behandelten und unbehandelten Proben feststellen zu können, wurden unterschiedliche statistische Tests durchgeführt. Es wurden jeweils mindestens drei voneinander unabhängige Einzelversuche durchgeführt und anschließend der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt. Unterschiede bei den Bestimmungen der Genexpression mittels Western Blot- Analyse wurden mit Hilfe des „students t- test (T- Test) festgestellt. Dabei wurden Signifikanzen von $p < 0,05$ mit einem Stern (*) und $p < 0,01$ mit zwei Sternen (**) gekennzeichnet. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,001$ ist mit drei Sternen (***) bezeichnet.

Bei den Versuchen zur Proliferation sowie zur Aktivierung der Caspase 3 und 7 (Luminenszenzassays) in den untersuchten Zelllinien wurde ebenfalls auf statistische Signifikanz geprüft. Unterschiede zwischen normoxischen, hypoxischen und reoxigenierten Zellen wurden mit dem Test „Anova on Ranks“ (SigmaStat 3.5) geprüft ($p < 0,05$); gekennzeichnet mit „§“. Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben wurden mit Hilfe des „Signed Rank Test“ ermittelt; gekennzeichnet mit „#“.

3. Ergebnisse

3.1. Entwicklung des Hypoxiemodells

Für die Realisierung eines *in vitro*- Hypoxiemodells musste zunächst ein Weg gefunden werden, die Hypoxie effizient und stabil zu simulieren. Hierzu wurden verschiedene Ansätze getestet, wobei aus jedem Ansatz Gesamtprotein isoliert wurde, um mittels Western Blot die Expression verschiedener Stressfaktoren auf Proteinebene im Vergleich zu normoxischen Kontrollzellen zu untersuchen. In allen drei Ansätzen diente normoxisches Medium hierbei als Referenz und wurde als 100 % (Ko-) definiert. Alle weiteren in den Diagrammen 3 bis 6 dargestellten Werte wurden dementsprechend rechnerisch ermittelt.

Mineralöl- Monolayer

Bei Variante A (Direktüberschichtung) war es nicht möglich die Zellen rückstandslos aus dem Mineralöl herauszuwaschen und genügend Zellen für eine Proteinisolierung zu gewinnen. Daher wurde der Ansatz in einer zweiten Variante B geprüft, bei der die Zellen weiterhin mit Kulturmedium belassen wurden, das seinerseits mit Mineralöl überdeckt wurde. Zusätzlich wurde der Sauerstoffgehalt im Kulturmedium bestimmt. Hierfür wurden zum jeweiligen Messzeitpunkt 2 ml Aliquots mit einer Spritze aus den Kulturflaschen entnommen und der Sauerstoffgehalt mit einem IL 1620- Blutgasanalysesystem bestimmt.

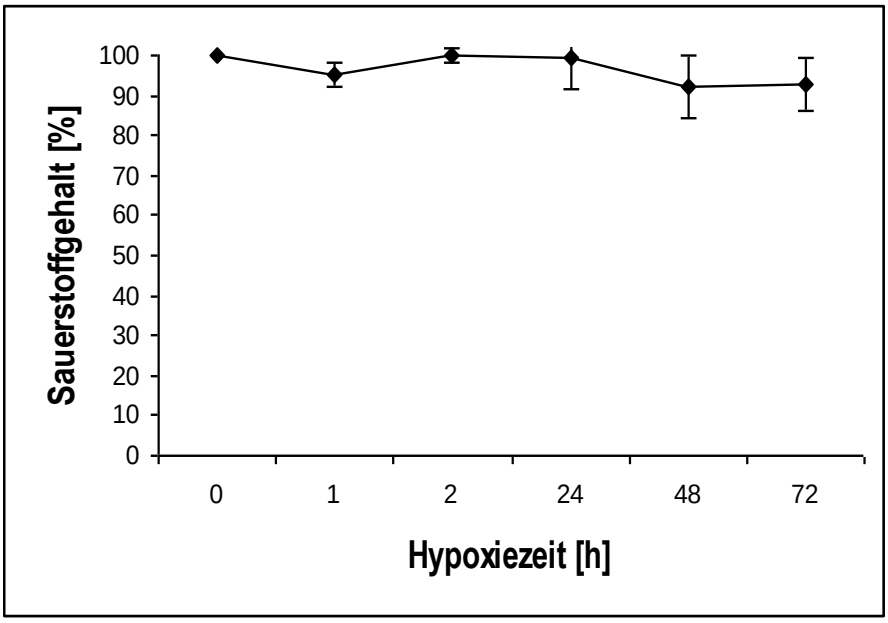

Abbildung 4: Entwicklung des Sauerstoffgehalts [%] über die Hypoxiezeit [h] im Kulturmedium bei Variante B der Mineralölüberschichtung.

Abbildung 4 zeigt die Entwicklung des Sauerstoffgehalts im Kulturmedium bei Versuchsvariante B. Im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (37°C, 5 % CO_2) zeigen sich im gesamten Verlauf nur geringfügige Veränderungen. Bezogen auf den O_2- Gehalt unter normoxischen Bedingungen konnte nach 48 h ein Minimalwert von 92 % gemessen werden. Weiterhin war es möglich bei Variante B genügend Gesamtprotein zu isolieren. Jedoch konnte auf Proteinebene weder die Expression des Transkriptionsfaktors HIF1α, noch der AMP abhängig aktivierten Kinase beta1 (AMPKβ1) nachgewiesen werden.

Low O2 and high CO2

Analog zur Mineralölüberschichtung der Zellen wurde ein weiterer Ansatz getestet, bei dem unter geringen O_2- (1%) und hohen (20%) CO_2- (20%) Bedingungen kultiviert wurde. Es wurde ebenfalls der Sauerstoffgehalt bestimmt und Gesamtprotein isoliert.

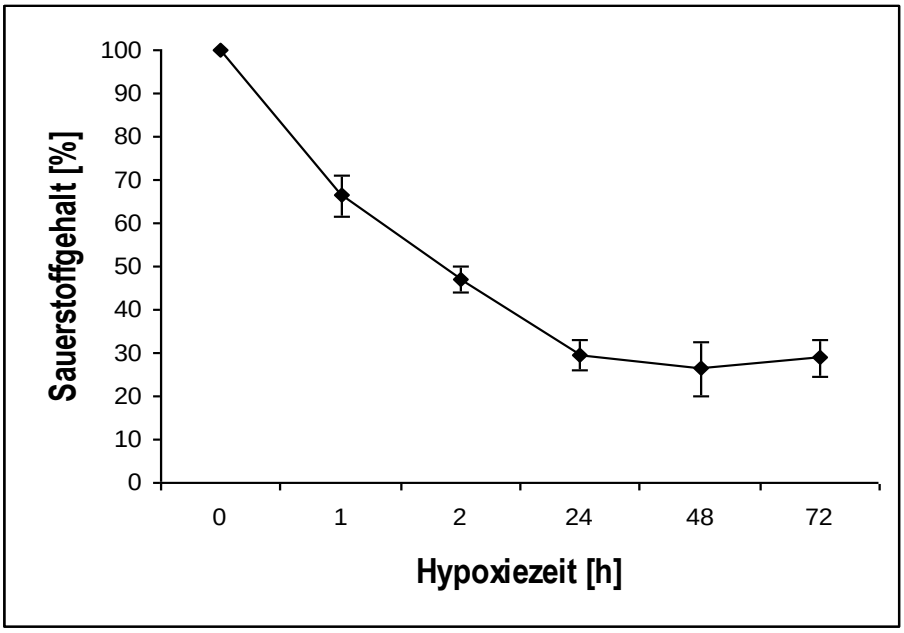

Abbildung 5: Entwicklung des Sauerstoffgehalts [%] über die Hypoxiezeit [h] im Medium bei Kultivierung bei 37 °C, 1% O_2 und 20 % CO_2.

Wurden die Zellen in einer Atmosphäre mit 1% O_2 und 20 % CO_2 kultiviert, zeigt sich bereits nach 1 h im Schnitt ein Rückgang um etwa 35 %. Nach weiteren 60 Minuten sinkt der Sauerstoffgehalt auf einen mittleren Wert von 46,9 %. Im Zeitraum von 24 bis 72 nähert sich die Kurve einen Wert von ungefähr 30% an, wobei die geringste durchschnittliche Sauerstoffkonzentration (26,4 %) nach 48 h zu verzeichnen war. Jedoch konnte in diesem Ansatz keine HIF1α- Expression in den Zellen nachgewiesen werden.

Hypoxiekammer

Für den dritten Ansatz, die Kultivierung in einer Hypoxiekammer wurde zunächst untersucht, in wieweit das eingesetzte Medium von gelöstem Sauerstoff befreit werden konnte. Hierzu wurde der Medium in eine 50 ml Spritze aufgesaugt und mittels Unterdruck entgast. Abbildung 6 zeigt die Reduktion des Sauerstoffgehalts ohne (0x) und nach Wiederholung der Entgasungseinheiten.

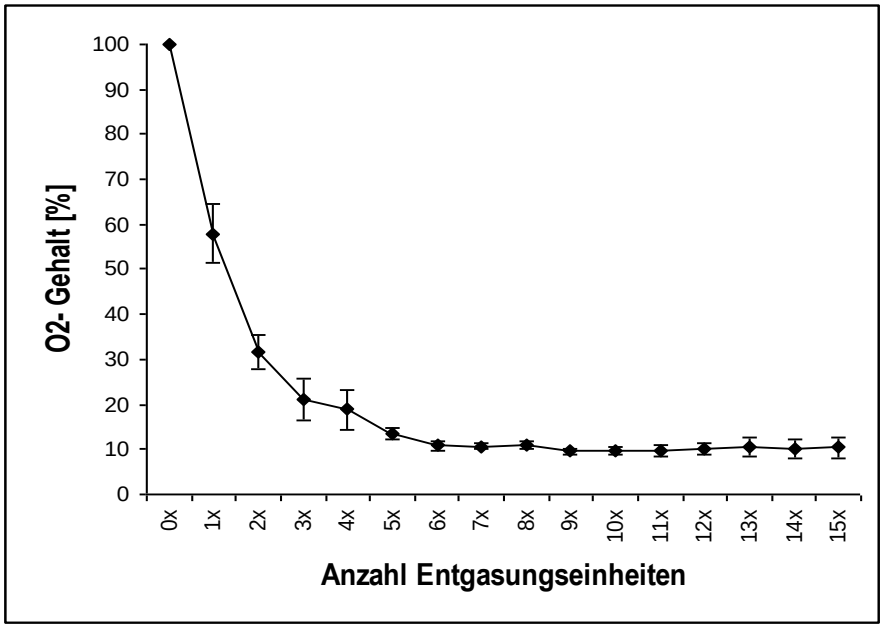

Abbildung 6: Entgasen mittels Unterdruck. Reduktion des O_2- Gehalts [%] durch wiederholte Entgasungseinheiten. Eine Entgasungseinheit stellt einmaliges Herunterziehen des Spritzenkolbens dar.

Es zeigt sich eine deutliche Reduktion des O_2- Gehalts bereits nach einmaligem Aufziehen in der Spritze. Eine durchschnittliche Reduktion des O_2- Gehalts um 70 bis 80 % wurde nach 4 maligen Aufziehen der Spritze erreicht. Nach 6- 15 Zyklen liegt der O_2- Gehalt stabil zwischen 10 und 20 % des ursprünglichen Wertes.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, den Sauerstoff aus dem Kulturmedium mit Stickstoff auszuschwemmen. Hierzu wurde das Medium mit Stickstoff begast, indem zwei 50 ml Spritzen über einen Dreiweghahn verbunden wurden. Die eine Spritze enthielt maximal 30 ml Kulturmedium, in die zweite Spritze wurde vorher Stickstoff aus einer Gasflasche abgefüllt. Anschließend wurde der Dreiweghahn zwischen den beiden Spritzen geöffnet und das Kulturmedium mit dem in der zweiten Spritze enthaltenen Gas mehrmals durchspült. Im zweiten Schritt wurde der Dreiwegehahn zwischen den Spritzen geschlossen, in einen neue sterile 50 ml Spritze Stickstoff eingefüllt und diese erneut mit dem Dreiwegehahn an die Spritze mit dem Kulturmedium angeschlossen und das Medium mit dem frischen Stickstoff durchspült. Diese Spülschritte wurden mehrfach wiederholt. Nach jedem Schritt erfolgte die Messung eines Aliquots am BGA- Gerät. Berechnet wurden die im Diagramm dargestellten Werte wie in Abschnitt 3.1.1. beschrieben.

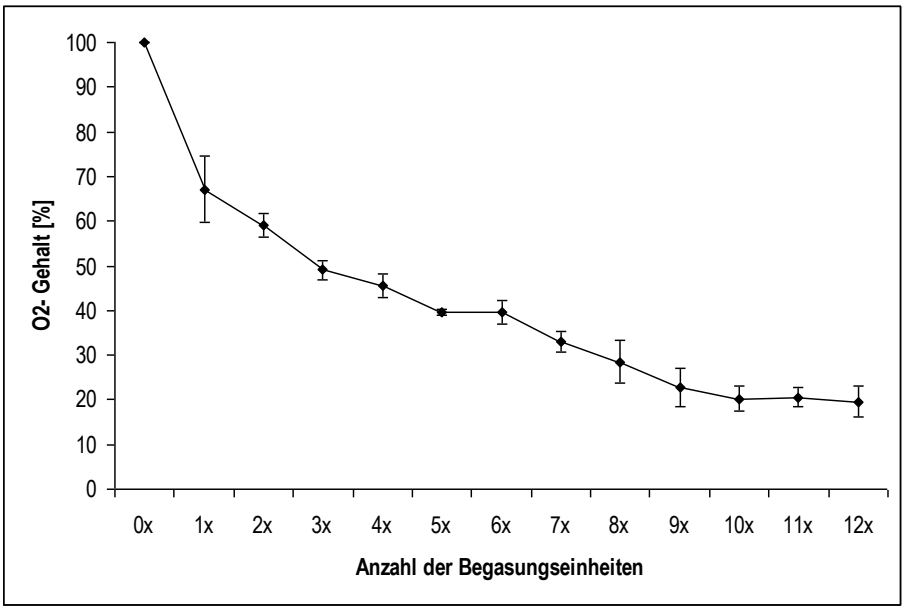

Abbildung 7: Reduktion des O_2- Gehalts [%] durch Begasung mit Stickstoff; jede Entgasungseinheit wurde mit frischen Stickstoff durchgeführt. Normoxisches Kontrollmedium wurde nicht begast (0x).

Abbildung 7 zeigt die auf diese Weise bestimmten Daten. Nach einer Entgasungseinheit konnte auch in bei diesem Ansatz eine deutliche Reduktion gegenüber normoxischen Kontrollmedium (keine Begasungseinheiten, 0x) erreicht werden. Im weiteren Verlauf reduziert sich der O_2- Gehalt mit steigender Anzahl der Begasungseinheiten. Minimalwerte zwischen 16 und 24 % konnten ebenfalls nach 10 maligem Begasen erreicht werden. In allen Experimenten, die im Folgenden beschrieben sind, wurde der gelöste Sauerstoff im Kulturmedium durch Entgasen mittels Unterdruck entfernt. Das entgaste Medium (Hypoxiemedium) wurde direkt aus der Spritze auf die Zellen in den Kulturflaschen gegeben. Zellen in T25- Flaschen wurden mit 5 ml Medium, Zellen in T75- Flaschen mit 10 ml Medium inkubiert. Und die Flaschen ohne Deckel in die Hypoxiekammer gestellt. Diese wurde geschlossen und für 4 min mit 20 l/min N_2 durchflutet. Erneut wurde die Änderung des O_2-Gehalts unter diesen Bedingungen ermittelt. Diese sind in den Abbildung 8 bis 10 dargestellt.

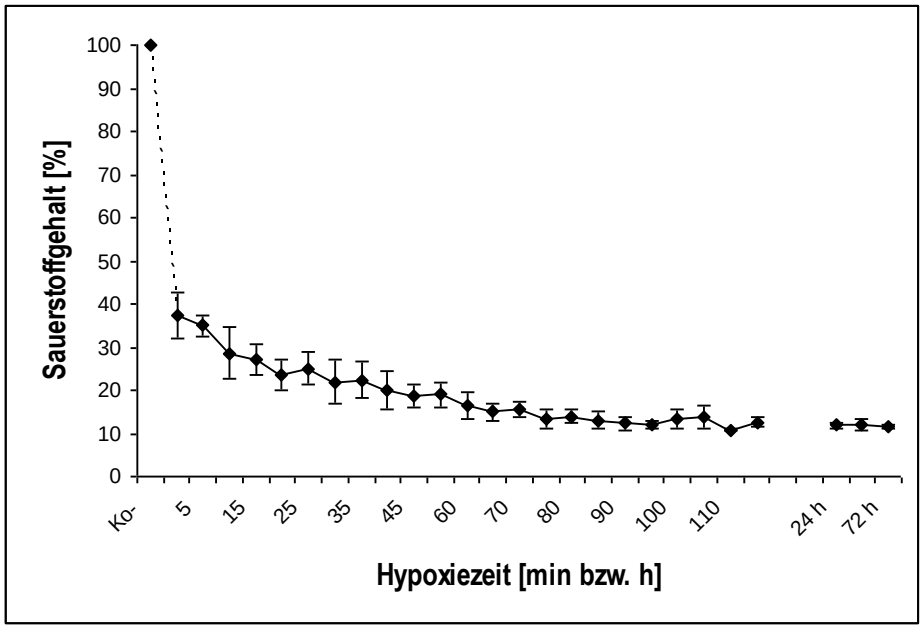

Abbildung 8: Sauerstoffgehalt [%] im Kulturmedium (DMEM Hepes; 10 % FCS). Normoxisches Medium (Ko-) sowie nach Entgasung (gestrichelt). Weitere Reduktion des Sauerstoffgehalts [%] während Hypoxiezeiten [min bzw. h] von 5 min bis 72 h.

In Abbildung 8 ist neben der Reduktion des O_2- Gehalts durch Entgasen der zeitliche Verlauf der O_2-Konzentration im hypoxischen Kulturmedium dargestellt. Es zeigt sich, dass bereits nach einer Hypoxiezeit von etwa 60 min eine vergleichsweise konstante O_2- Konzentration zwischen 10 und 15 % der ursprünglichen O_2- Konzentration auftritt, wobei der geringste Sauerstoffgehalt bei 13,2 %, der höchste bei 20,9 % lag. Diese verminderte O_2- Konzentration bleibt in der Kammer bis hin 72 h in etwa konstant. Um auch tatsächliche Werte zu erfassen wurden zusätzlich Messungen mit einem Oximeter der Firma WTW (Oxi1970i) durchgeführt. Das Gerät erfasst stündlich sowohl die O_2-Konzentration [mg/l] als auch die O_2- Sättigung [%]und bestimmt permanent die Temperatur [°C] über die Zeit wie in Abbildung 7 und 8 dargestellt. Mit Hilfe dieser Messmethode zeigt sich ebenfalls ein Rückgang des O_2- Gehalts auf durchschnittlich 20 % nach 60 min, wobei der O_2- Gehalt minimal bei 11,3 % und maximal 29,3 % lag (vgl. Abb. 8). Nach 24 h wurden ein Minimalwert von 3,6 % und ein Maximalwert von 4,7 % gemessen. Im weiteren Verlauf liegen die Messwerte nahezu stabil zwischen 2 % und 5 %. Während der gesamten Messzeit wurde zu jeden einzelnen Messzeitpunkt zusätzlich die Temperatur bestimmt; diese ist in den Abbildungen 9 und 10 blau dargestellt. Die Temperatur war zu jedem Zeitpunkt der Messung stabil bei 37 °C (minimal 36,8 und maximal 37,2 °C).

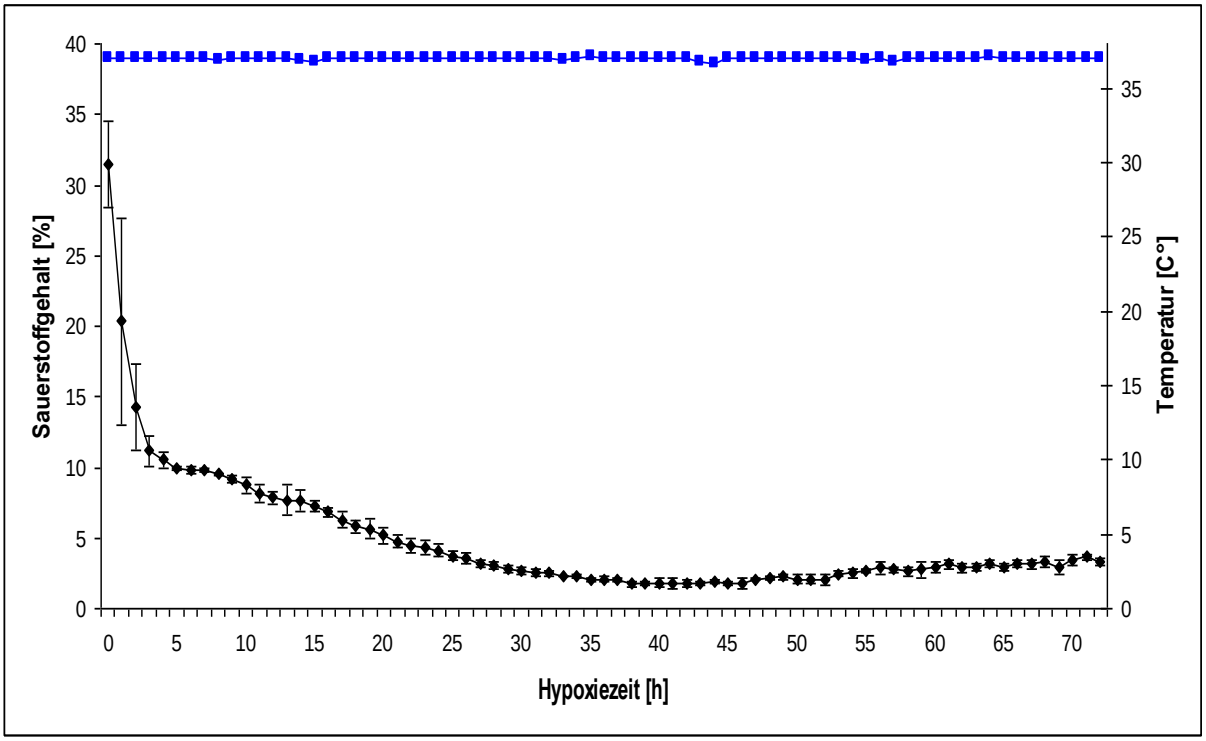

Abbildung 9: Stabilität des Hypoxiemediums nach Entgasen und weiterer Kultivierung in der Hypoxiekammer – Beschreibung des Sauertoffgehalts [%]; x- Achse: Hypoxiezeit [h], y1- Achse (links): Sauerstoffgehalt [%] und y2- Achse (rechts): Temperatur [°C] (blau)

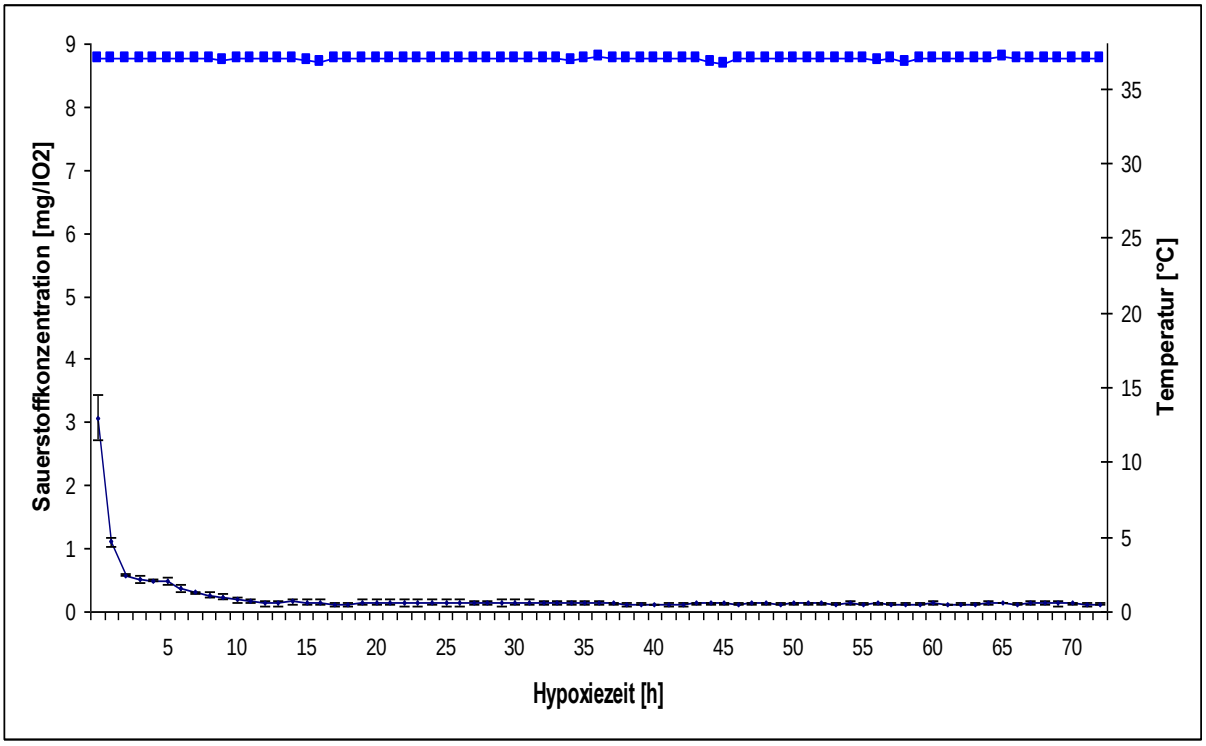

Abbildung 10: Stabilität des Hypoxiemediums nach Entgasen und weiterer Kultivierung in der Hypoxiekammer – Beschreibung der Sauerstoffkonzentration [mg/l]; x- Achse: Hypoxiezeit [h], y1- Achse (links): Sauerstoffkonzentration [mg/l] und y2- Achse (rechts): Temperatur [°C] (blau)

Ausgehend von einer O_2- Konzentration von 2,6 mg/l zu Beginn der Messung stabilisiert sich die O_2-Konzentration nach etwa 20 Stunden um einen Wert von 0,2 mg/l. Der Durchschnittswert liegt nach einer Stunde bei 3,1 mg/l, nach der zweiten bei 1,1 mg/l. Im normoxischen Kulturmedium wurde ursprünglich eine mittlere O_2- Konzentration von 8,5 mg/l gemessen, d.h. durch Entgasen mittels Unterdruck reduziert sich die O_2- Konzentration bereits um 5,9 mg/l. Abbildung 10 zeigt den Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Hypoxiemedium über einen Zeitraum von 72 Stunden. Analog zur Reduktion der O_2- Konzentration sinkt demzufolge zeitgleich ebenso der O_2- Gehalts im Hypoxiemedium. Der O_2- Gehalt sinkt nach 24 h auf 4,13 %, nach weiteren 24 h auf 2,17 % ab und bleibt danach weiter stabil

.

3.2. Evaluation des Hypoxiemodells

Um eine hypoxische Schädigung direkt in den Zellen nachzuweisen und das Ausmaß dieser zu beurteilen, wurde auf Proteinebene die Expression des O_2- abhängig regulierten Transkriptionsfaktors HIF1α (Hypoxie induzierbare Faktor 1 alpha) sowie der AMP abhängig exprimierten Proteinkinase beta 1 bestimmt (AMPKβ1). HIF1α aktiviert als Transkriptionsfaktor das Erythropoetin- Gen sowie eine Reihe weiterer Gene, die für die Adaptation der Zelle an eine mangelnde O_2- Versorgung notwendig sind und spielt damit eine entscheidende Rolle bei der Reaktion auf intrazellulären Sauerstoffmangel. AMPKβ1 wird durch ein erhöhtes AMP/ATP-Verhältnis infolge von zellulär bedingten und umweltabhängigen Stress, wie z.B. Hitzeschock, Hypoxie und Ischämie aktiviert. Da es sich bei AMP um ein Abbauprodukt des ATP handelt, eignet es sich daher als Indikator für den O_2- bedingten Energiemangel.

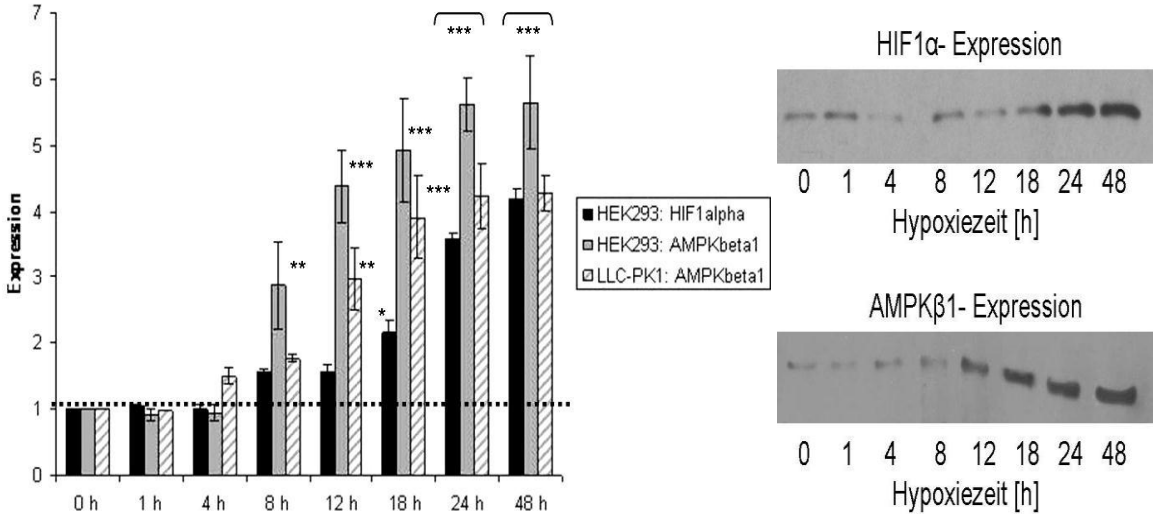

Abbildung 11: Expression des Hypoxie induzierbaren Faktors 1 alpha (HIF1α; schwarze Balken) und der AMP aktivierten Proteinkinase beta 1 (AMPKβ1; graue Balken) der Zelllinie HEK293 sowie die AMPKβ1- Expression in LLC-PK1- Zellen (gestrichelte Balken). Expression der beiden Faktoren in normoxischen Kontrollzellen (0 h; keine Hypoxie) und während unterschiedlichen Hypoxiezeiten (1 – 48 h). Links: Signifikant erhöhte HIF1α- Expression in HEK239- Zellen erstmals nach 18 h ($p < 0,05$), deutlich erhöhte AMPKβ1- Expression erstmals nach 12 h Hypoxie ($p < 0,001$). Eine signifikant gesteigerte Expression mit $p < 0,001$ beider Faktoren erstmals nach 24 h Hypoxie nachweisbar. Rechts: Exemplarische Darstellung der Western Blots. Oben: HIF1α. Unten: AMPKβ1; jeweils in HEK293- Zellen .

Abbildung 11 zeigt die Expression des O_2- abhängig exprimierten Trankskriptionsfaktors, Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 alpha (HIF1α) sowie der AMP- aktivierten Proteinkinase β 1 (AMPKβ1) in Abhängigkeit von der Hypoxiezeit (1 – 48 h). Für die Zelllinie LLC-PK1 konnte lediglich der Nachweis der Proteinkinase durchgeführt werden, da mit dem humanspezifischen HIF1α- Antikörper keine Ergebnisse für die Schweinenierenzellen erreicht werden konnte. In drei voneinander unabhängigen Einzelversuchen wurde die Expression beider Faktoren von Zellen mit unterschiedlichem Hypoxiegrad mit der jeweiligen Expression normoxischer Kontrollzellen (0 h) verglichen. In LLC-PK1-Zellen konnte eine im Vergleich zu Kontrollzellen erhöhte AMPKβ1- Expression erstmals nach 12 h Hypoxiedauer nachgewiesen werden. Nach 24 h Hypoxie konnte eine weitere Steigerung der Expression auf etwa den 4- fachen Wert verglichen mit normoxischen Zellen festgestellt werden. Während die AMPKβ1- Expression in LLC-PK1- Zellen erstmals nach 12 h signifikant ansteigt, konnte eine im Schnitt deutlich erhöhte Expression dieses Faktors in den humanen HEK293- Zellen erstmals nach 8 Stunden detektiert werden. Auch in den HEK293- Zellen steigt diese Expression mit verlängerter Hypoxiedauer nach weiter an und erreicht nach 24 h einen um etwa 5- fach erhöhten Wert im Vergleich zu den normoxischen Kontrollzellen. Weiterhin konnte für die humanen Nierenzellen die Expression des Transkriptionsfaktors HIF1α bestimmt werden. Erstmals konnte eine deutlich erhöhte Expression dieses Faktors nach 18 h Hypoxiedauer festgestellt werden, wobei

die HIF1α- Expression ähnlich der Expression der Proteinkinase mit verlängerter Hypoxiezeit noch weiter ansteigt. In beiden Zelllinien konnte eine signifikant erhöhte AMPKβ1- Expression mit einem p- Wert < 0,001 sowie eine signifikant erhöhte HIF1α- Expression mit einem p- Wert < 0,001 in den HEK293- Zellen nach 24 stündiger Hypoxie detektiert werden.
Aufgrund der Ergebnisse dieser Kinetiken wurde für alle folgenden Versuch eine Hypoxiedauer von 24 h ausgewählt.

3.2.1. Charakterisierung des Modells - Effekte von Hypoxie und Reoxigenierung

In allen Experimenten wurden hypoxische Zellen, die einer 24 stündigen Hypoxiephase (24/0) ausgesetzt waren mit normoxischen Kontrollzellen (Ko-) verglichen. Des Weiteren wurden die Zellen nach einer 24 stündigen Reoxigenierungsphase (24/24) untersucht. Unter Reoxigenierung versteht man hierbei einen Mediumwechsel von hypoxischen Medium zu normalen Medium und weiterer Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO_2 für 24 h. Dabei konnten vielfältige Änderungen auf zellulärer und subzellulärer Ebene nachgewiesen werden. Diese werden im Folgenden beschrieben.

Morphologie der Zellen

Neben Untersuchungen zu subzellulären Prozessen, wurde auch die Morphologie der Zellen betrachtet. Allgemein konnte beobachtet werden, dass HEK293- Zellen wesentlich empfindlicher als LLC-PK1- Zellen auf die 24 stündige Hypoxiephase reagieren. HEK293- Zellen erscheinen unter normoxischen Bedingungen in einem geschlossenen, adhärenten Zellverband mit gut gestreckten Einzelzellen (Abb. 12; A). Nach 24 h Hypoxie (Abb. 12; B) zeigen sich in diesen Zellen deutliche strukturelle Änderungen. Es ist kein geschlossener Zellverband zu beobachten, etwa zwei Drittel der Zellen schwimmen frei in Suspension. Zudem zeigen die Zellen, die noch in einzelnen Zellplaques am Flaschenboden anhaften keine gestreckte, sondern eine deutlich abgekugelte Struktur. Des Weiteren ist die Bildung von „Bläschen“ (Blebbing) durch Abschnürung einzelner Vesikel (apoptotische Körperchen) erkennbar (Abb. 12; B). Nach Wechsel auf normoxisches Kulturmedium und Kultivierung unter Standardbedingungen für weitere 24 h (Abb. 12; C) ist ebenfalls kein homogener Zellmonolayer erkennbar, jedoch erscheinen die Zellen, nicht mehr kugelförmig, sondern an den Rändern der verbliebenen Zellplaques ist eine neuerliche Streckung der einzelnen Zellen zu erkennen. Wurden diese Zellen weiter unter Standardbedingungen kultiviert, konnte nach

etwa 48 bis 72 h ein geschlossener Zellrasen vergleichbar mit normoxischen Kontrollzellen beobachtet werden. Vergleicht man normoxische und hypoxische Zellen der Zelllinie LLC-PK1 zeigen sich weniger deutliche Unterschiede.

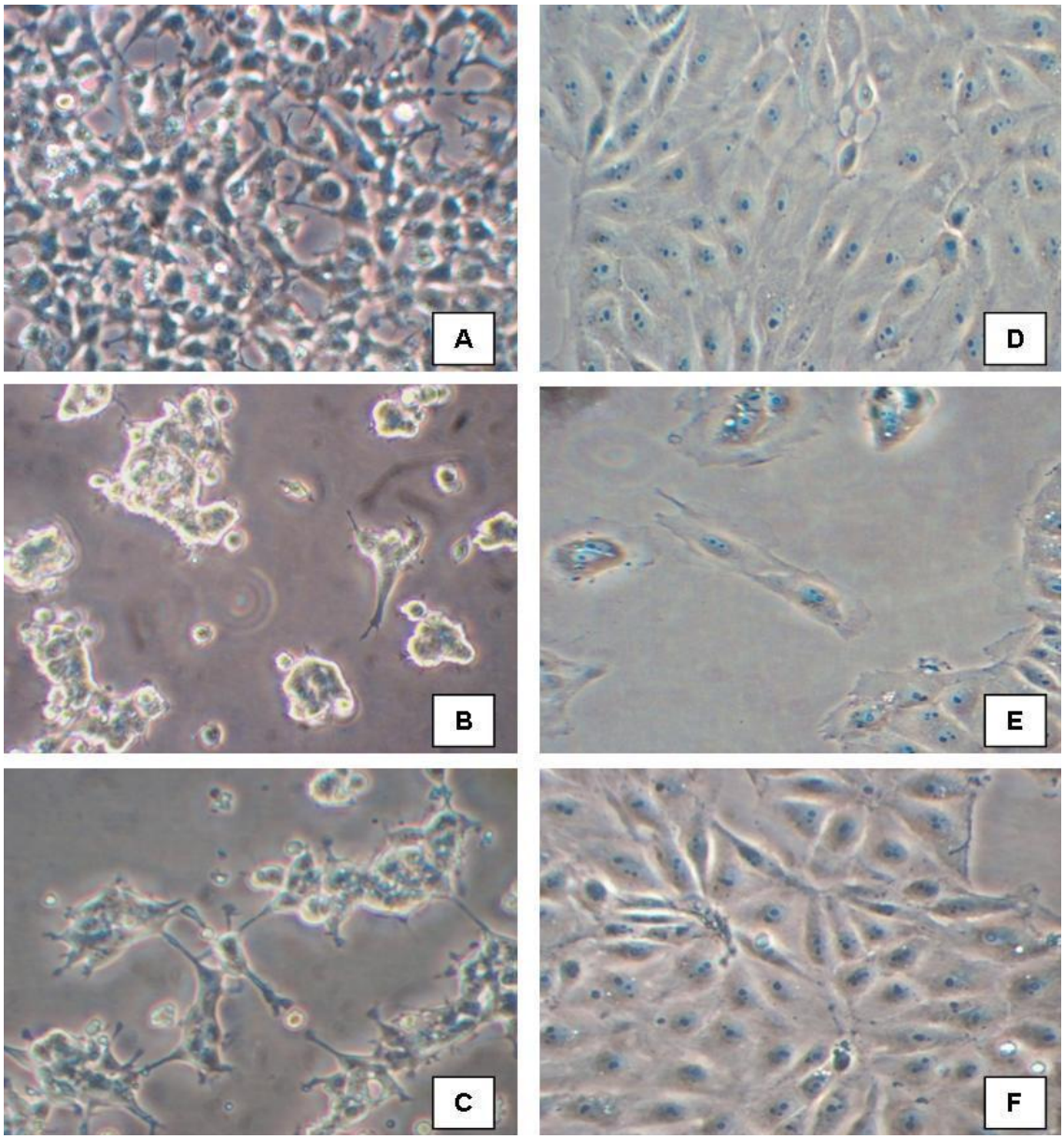

Abbildung 12: Änderungen der Zellstruktur in normoxischen (A), hypoxischen (B) und reoxigenierten (C) HEK293- Zellen. Strukturelle Veränderungen in normoxischen (D) und hypoxischen (E) LLC-PK1-Zellen sowie deren Morphologie nach 24 h Reoxigenierung (F). Objektiv: Plan 10 (160/0,17) 0,30 DL für Diaphot 300 (Nikon)

Betrachtet man die Morphologie der LLC-PK1- Zellen zeigen diese unter normoxischen Bedingungen (Abb. 12; D) einen homogenen Zellmonolayer, der nach 24 h Hypoxie (Abb. 12; E) ebenfalls unterbrochen ist. Etwa ein Viertel bis ein Drittel der Zellen schwimmt frei in Suspension. Zellen, die am Flaschenboden anhaften, liegen in meistens kleineren Verbänden vor, wobei die

Zellen eher aufgequollen mit ausgefransten Zellrändern als abgekugelt erscheinen. Nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase (Abb. 12; F) ist bei den LLC-PK- Zellen eine Rückkehr der zellulären Strukturen in den Ausgangszustand zu erkennen. Diese Beobachtungen konnten bei beiden Zelllinien in unterschiedlichen Ansätzen mehrmals auf diese Weise nachgewiesen werden.

Trypanblau- Färbung

Analog zur Mikroskopie wurden mit diesen Zellen Trypanblaufärbungen durchgeführt. Es wurden die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchsansätzen bei 5 min Färbezeit ausgezählt.

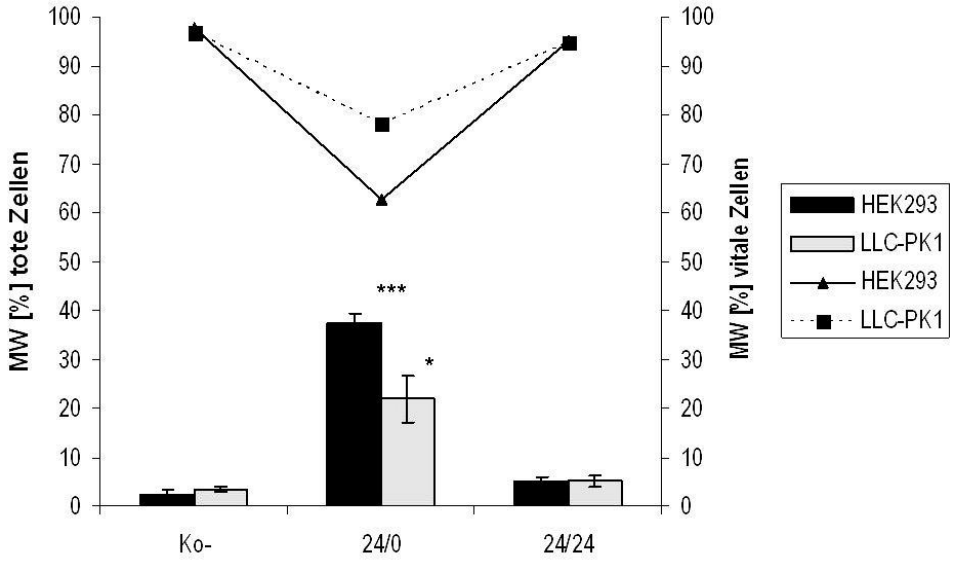

Abbildung 13: Trypanblaufärbung (5 min Färbezeit) von HEK293- und LLC- PK1- Zellen unter normoxischen Bedingungen (Ko-), nach 24 h Hypoxie (24/0) sowie nach 24 h Reoxigenierung (24/24). Zunahme trypanblau- positiver Zellen (Balken) und Abnahme vitaler Zellen (Linien). Ergebnisse aus je 3 voneinander unabhängigen Auszählungen (Neubauer Zählkammer, Bright Line).

In Abbildung 13 ist neben der Zunahme gefärbter, d.h. toter Zellen (Balken) sowie zusätzlich die Abnahme vitaler Zellen (Linien) der beiden untersuchten Zelllinien dargestellt. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Trypanblau- Färbung zeigen in beiden Zelllinien einen deutlichen Anstieg toter bzw. eine Abnahme vitaler Zellen nach 24 h Hypoxie. Die Kontrollen der Zelllinien HEK293 liegen im Mittel bei 5,9 % trypanblaupositiver Zellen, wobei sich der niedrigste Kontrollwert mit 5,2 % und der höchste mit 7,3 % darstellen. Ein deutlicher Anstieg toter Zellen mit durchschnittlich 37,5 % ist nach einer Hypoxiezeit von 24h zu erkennen ($p < 0,01$). Nach dieser Zeit schwanken die einzelnen Werte in einem Bereich von 35,6 % bis 39,3 %. Abhängig von der Zunahme toter Zellen konnte die Abnahme vitaler Zellen bestimmt werden. Im Vergleich zum Kontrollniveau ist erwartungsgemäß ein deutlicher Rückgang lebender Zellen nach 24 h zu verzeichnen. Ein ähnliches

Bild findet sich bei den LLC-PK1- Zellen. Der Kontrollbereich bei LLC-PK1- Zellen erstreckt sich von 2,6 % bis 6,4 %, wobei im Mittel 5 % der Zellen nach 5 min Färbezeit als tot identifiziert wurden, während nach 24 h durchschnittlich 21,9% tote Zellen gezählt werden konnten ($p < 0,05$). Auch bei diesen Zellen ist ein Rückgang vitaler Zellen von 95 % auf 78,1 % zu beobachten. Auffällig bei der mikroskopischen Auswertung ist, dass LLC-PK1- im Vergleich zu HEK293- Zellen sowohl bei der Betrachtung der Morphologie als auch bei der Bestimmung toter Zellen durch Trypanblaufärbung deutlich geringere Effekte nach gleicher Hypoxiezeit aufweisen.

Proliferation

Um das Proliferationsvermögen intakter, hypoxischer und von Zellen nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase zu bestimmen, wurde eine Cell Viability Assay basierend auf einer Luziferasereaktion durchgeführt. Es wurden mindestens 10 Einzelmessungen durchgeführt und die Ergebnisse mittel Box-Plot-Analyse dargestellt (Abb. 14). Signifikante Unterschiede zwischen normoxischen Kontrollzellen (Ko-) und hypoxischen Zellen (24/0) sind mit dem Symbol „§“ ($p < 0,05$; RM Anova on Ranks Test) gekennzeichnet.

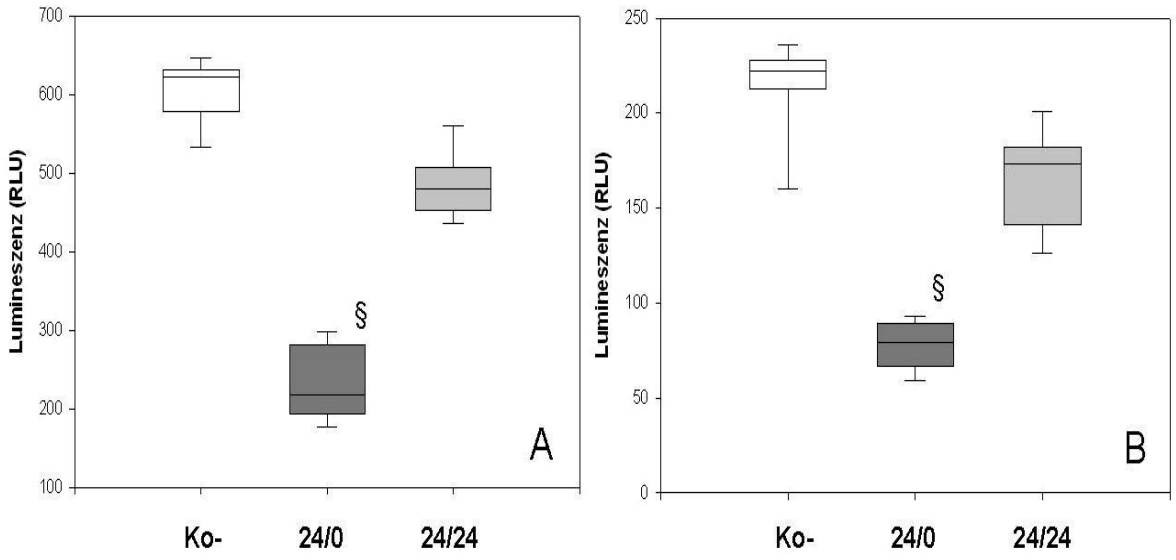

Abbildung 14: Proliferationsvermögen von HEK293- (A) und LLC-PK1- Zellen (B) unter normoxischen Bedingungen (Ko-), nach 24 h Hypoxie (24/0) und nach 24 h Reoxigenierung (24/24). Lumineszenz [RLU], wobei RLU = relative light units.

Sowohl HEK293- als auch LLC-PK1- Zellen weisen unter normoxischen Bedingungen (Ko-) eine mindestens doppelt so hohe Proliferationsrate verglichen mit hypoxischen Zellen (24/0) auf. Bei HEK293- Zellen wurde in den normoxischen Kontrollen ein Lumineszenzsignal von durchschnittlich 604,4 RLU, in Hypoxiezellen ein auf im Schmitt 233,6 RLU gemessen. Nach 24 h Reoxigenierung

steigt die Proliferationsrate erneut auf einen Wert von 485,5 RLU an. LLC-PK1- Zellen weisen trotz allgemein geringerer Signalstärke ein tendenziell sehr ähnliches Bild auf. Während in Kontrollzellen ein Mittelwert von 212,5 RLU gemessen werden konnte, sank dieser Wert in Hypoxiezellen auf durchschnittlich 77,09 RLU ab. Auch in diesen Zellen zeigte sich nach 24 h Reoxigenierung eine Erholung der Proliferationsrate (165,2 RLU).

Bestimmung intakter, apoptotischer und nekrotischer Zellen mittels FACS

Um in normoxischen und hypoxischen HEK293- Zellen den Anteil intakter sowie apoptotischer und/oder nekrotischer Zellen zu bestimmen, wurde eine AnnexinV-FITC/7-AAD- Doppelmarkierung durchgeführt. Intakte Zellen werden durch keinen der beiden Farbstoffe markiert und sind in den Abbildungen jeweils im Quadrat 3 (Q3; AnnexinV -- / 7 AAD --) zu sehen. Frühapoptotische Zellen werden als AnnexinV- positiv, aber 7-AAD- negativ detektiert (Quadrant 4; Q4). Spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen mit starkem AnnexinV und 7-AAD- Signal sind in Quadrant 2 (Q2) zu sehen. Abbildung 15 zeigt exemplarische die Verteilung intakter (Q3), frühapoptotischer (Q4) und spätapoptotischer/ nekrotischer (Q2) Zellen in normoxischen (Abb. 15; A) und hypoxischen (Abb. 15; B) HEK293- Zellen sowie nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase (Abb. 15; C).

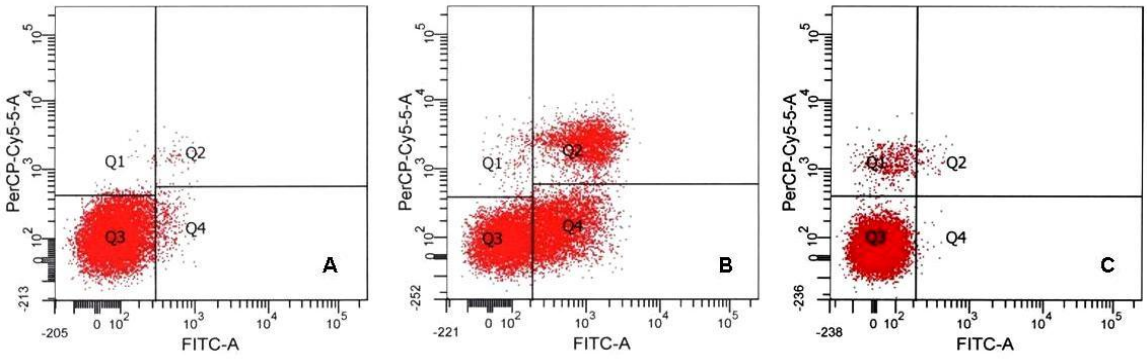

Abbildung 15: FACS (Fluorescence activated cell sorting)- Analyse mittels AnnexinV-FITC/7-AAD-Doppelmarkierung von HEK293- Zellen. A: normoxische Kontrollzellen (Ko-); B: Hypoxiezellen (24/0); C: Zellen nach 24h Reoxigenierung (24/24).

Während bei den Kontrollzellen im Schnitt 95,5 % der Zellen intakt (AnnexinV -- / 7 AAD --) waren, sinkt dieser Wert in Zellen nach 24 stündiger Hypoxie bis auf einen Minimalwert von 27,6 % (durchschnittlich 35,3 %) ab. Gleichermaßen steigt der Anteil sowohl früh- (AnnexinV ++ / 7 AAD --) als auch spätapoptotischer bzw. nekrotischer (AnnexinV ++ / 7 AAD ++) Zellen deutlich an. Frühapoptotische Zellen liegen dabei in einem Bereich von minimal 20,2 % bis maximal 52,9 %

verglichen mit maximalen 8,6 % und minimalen 0,2 % (durchschnittlich 2,5 %) frühapoptotischen Zellen in normoxischen Kontrollzellen.

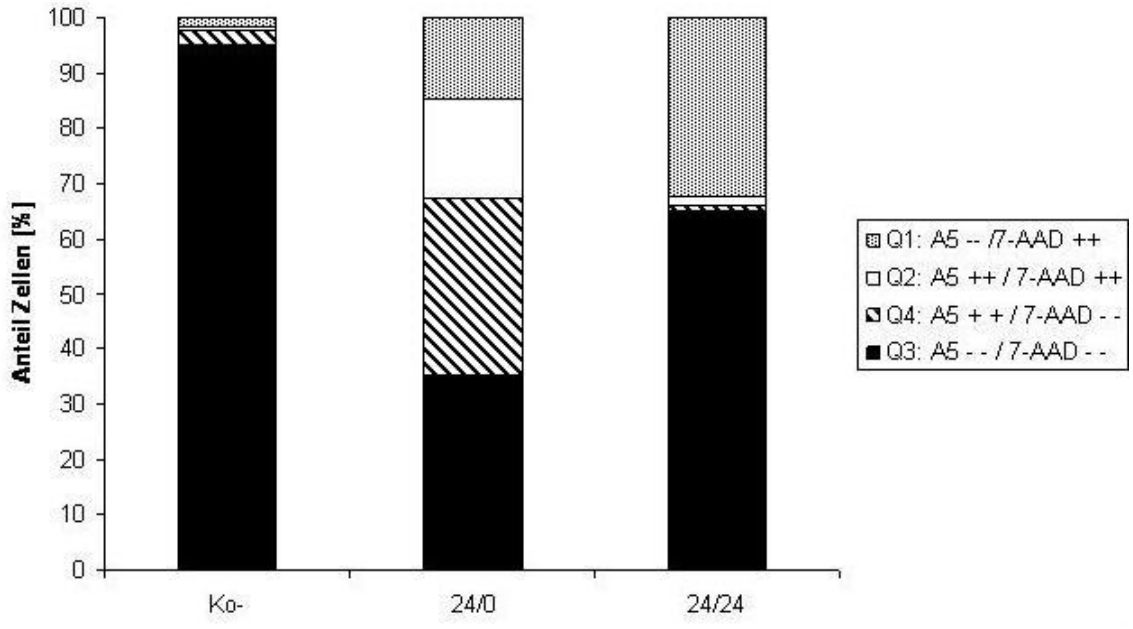

Abbildung 16: Zusammenfassung der Verteilung intakter (Q3; AnnexinV (A5) negativ/ 7-AAD negativ), frühapoptotischer (Q4; AnnexinV (A5) positiv/ 7-AAD negativ), spätapototischer/ nekrotischer (Q2; AnnexinV (A5) positiv/ 7-AAD positiv) und vollkommen nekrotischer (Q1; AnnexinV (A5) negativ/ 7-AAD positiv) Zellen in hypoxischen (24/0) und normoxischen (Ko-) HEK293- Zellen sowie nach der 24 stündigen Reoxigenierungsphase (24/24).

Nach der Reoxigenierungsphase sind im Schnitt 65,5 % der Zellen intakt, wobei bei den einzelnen Messungen der niedrigste Wert mit 45,5 %, der höchste mit 78,8 % gemessen werden konnte. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Abbildung 16 dargestellt. Des Weiteren wurde wiederholt ein deutlicher Rückgang von früh- und spätapoptotischen in Zellen, die nach der Hypoxiephase für 24 h reoxigeniert wurden festgestellt. In Vorversuchen wurden Positivkontrollen durch Stimulation mit 1 µM Staurosporin über einen Zeitraum von 2 h hergestellt. In diesen Proben lag der Anteil der intakten Zellen im Schnitt bei 46,8 %, während der Anteil frühapoptotischer Zellen bei 21,2 %, der spätapoptotischer durchschnittlich bei 30,3 % lag.

Die Durchführung dieser Experimente war für die porcinen LLC-PK1- Zellen nicht möglich, da mit einem humanspezifischen Kit gearbeitet wurde. Trotz der vergleichsweise großen Homologie zwischen Mensch und Schwein konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse mit dem verwendeten Kit für die Schweinenierenzellen erreicht werden.

Caspase 3/7- Aktivierung

Da in der FACS- Analyse ein erhöhter Anteil apoptotischer Zellen nach 24 stündiger Hypoxiephase bestimmt werden konnte, wurde zusätzlich zur Bestimmung der allgemeinen Proliferationsrate die Aktivierung der Caspasen 3 und 7, ebenfalls basierend auf der Bestimmung eines Lumineszenzsignals untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

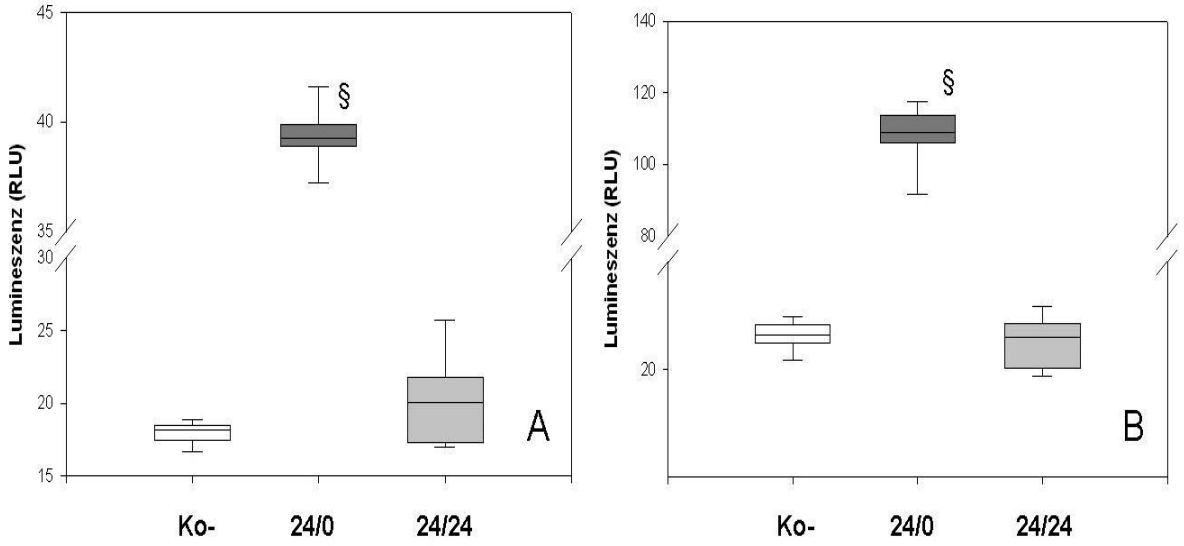

Abbildung 17: Caspase 3 und 7- Aktivierung in HEK-293- (A) und LLC-PK1- Zellen (B) in normoxischen Kontrollzellen (Ko-), in Zellen nach 24 h Hypoxie (24/0) und in Zellen nach Reoxigenierungsphase (24/24). Lumineszenz [RLU]; RLU = relative light.

Entsprechend den Daten aus den Proliferationsversuchen zeigen sich in normoxischen Kontrollzellen verglichen mit Zellen nach 24 h Hypoxie deutliche niedrigere Aktivitäten der Caspasen 3 und 7. Bei den HEK293- Zellen liegen die Kontrollwerte bei durchschnittlich 18,0 RLU, während in hypoxischen Zellen ein Verdopplung dieser Größe auf im Mittel 39,4 RLU stattfindet. Um ein Vielfaches erhöhte Werte zeigen die LLC-PK1- Zellen, bei denen in den Kontrollen im Schnitt 20,9 RLU bestimmt werden konnten, in den Hypoxiezellen ein Mittelwert von 108,2 RLU. Trotz der Unterschiede bezüglich der Signalstärke relativiert sich bei beiden Zelllinien die Aktivierungsrate der Caspasen 3 und 7 nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase erneut in Richtung Kontrollniveau (HEK293: 19,3 RLU; LLC-PK1: 21,3 RLU).

Expressionsprofile apoptose- relevanter Proteine

Zur Untersuchung der Expressionsprofile diverser apoptose- relevanter Gene wurde aus normoxischen und hypoxischen Zellen Gesamtprotein isoliert und anschließend 500 µg Protein je Blot in einen Apoptose Array eingesetzt. Da dieser Protein Array humanspezifisch ist, wurde dieser Versuch ausschließlich mit Protein aus HEK293- Zellen durchgeführt. In Abbildung 16 sind die Expressionen einer Auswahl von 20 apoptose- relevanten Proteinen in Kontroll- sowie Hypoxiezellen und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung dargestellt. Auf dem Array befinden sich Antikörper gegen weitere, im Folgenden aufgeführte Proteine: Catalase, Claspin, Clusterin, TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5, FADD, Fas/TNFSF6, HSP27, HSP60, HSP70, HTRA7/Omi, PON2, Phospho-p53 (Ser392), Phospho-Rad17 (S635), und TNF RI/TNFRSF1A. Für die Fragestellung dieser Arbeit wurde jedoch besonderes Augenmerk auf die 20 in Abbildung 16 dargestellten Proteine gelegt. Bestimmt wurde die Integrated Density (Einheit: relative light units, RLU), die proportional zur Proteinmenge ist.

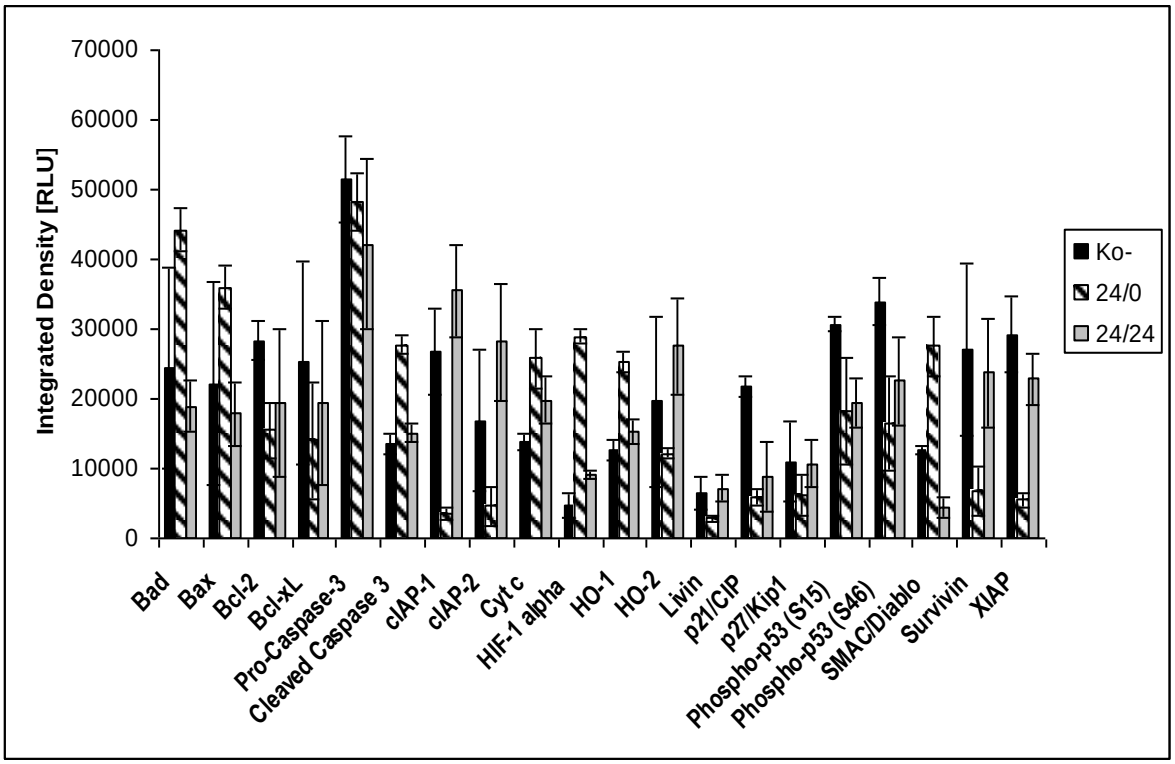

Abbildung 15: Expressionprofile 19 apoptose- relevanter Gene in normoxischen (Ko-, schwarze Balken) und hypoxischen (24/0, gestrichelte Balken) sowie in HEK293- Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24, graue Balken). Von links nach rechts: Bcl-2- Antagonist of Cell Death (Bad), Bcl-2-associated-X-protein (Bax), B-cell lymphoma-related protein 2 (Bcl-2), B-cell lymphopma-extra large protein (Bcl-xL), Pro-Caspase-3, Cleaved-Caspase-3, cIAP-1, cIAP-2, Cytochrom c (Cyt c), Hypoxie induzierbarer Faktor 1 alpha (HIF1α), Hämoxygenase-1 (HO-1), Hämoxygenase-2(HO-2) , Livin, p21/CIP, p27/Kip, Phospho-p53 (Ser15), Phospho-p53 (Ser46), SMAC/Diablo, Survivin, X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)

Verglichen mit normoxischen Kontrollzellen erscheinen die Expressionsprofile in hypoxischen Zellen im Allgemeinen verringert. Besonders fallen hierbei die Expressionen von Proteinen auf, die für das Überleben der Zelle von Bedeutung sind, wie beispielsweise die Inhibitoren der Apoptose (IAPs) wie cIAP-1 und -2, XIAP sowie Livin, Survivin sowie p53. Ebenso weisen antiapoptotische mitochondriale Faktoren wie Bcl-xL oder auch Bcl-2 nach 24 h Hypoxie eine deutlich verringerte Expression auf. Im Gegenzug erhöht sich die Expression von proapoptotischen Faktoren wie Bad und Bax in hypoxischen Zellen, so dass im hypoxischen Zustand z.B. zwischen den beiden Antagonisten Bax und Bcl-2 ein deutliches Missverhältnis herrscht. Des Weiteren konnte vermehrt die cleaved Caspase 3, d.h. die aktive Form der Caspse 3 nachgewiesen werden. Ebenso auffällig ist die erhöhte Expression der Hämoxygenase1 (HO-1) in hypoxischen Zellen, während die Hämoxygenase 2 (HO-2) herunterreguliert wird. Wie bereits in den Experimenten zur Evaluation des Hypoxiemodells konnte zudem in den hypoxischen Zellen eine gesteigerte HIF1α- Expression festgestellt werden. Weiterhin konnten unter hypoxischen Bedingungen die vermehrte Ausschüttung die beiden Faktoren Cytochrom c sowie SMAC/Diablo nachgewiesen werden. Nach 24 stündiger Reoxigenierung nähern sich alle untersuchten Expressionsprofile erneut ihrem Kontrollniveau an. Dies war nicht nur bei den in Abbildung 18 dargestellten Profilen, sondern auch bei den restlichen auf dem Array vorhandenen Profilen der Fall. Es wurden jeweils mindestens 3 voneinander unabhängige Einzelexperimente durchgeführt.

Mitochondrienspezifische Färbung mit CMXRos

Da die Vitalität und damit auch das Adhäsionsvermögen von Zellen von der zellulären O_2-Versorgung abhängig ist, wurden weiterhin mitochondrienspezifische Färbungen (MitoTrackerRed; CMXRos) durchgeführt. Deutlich sind in den Präparaten die einzelnen Zellen mit großem Zellkern und rotfluoreszierenden Mitochondrien zu erkennen (vgl. Abb. 19). Sowohl bei den humanen HEK293- als auch bei den porcinen LLC-PK1- Zellen konnte unter normoxischen Bedingungen ein geschlossener Zellrasen mit gut gestreckten Einzelzellen beobachtet werden (A und D). In den Zellen sind der Zellkern sowie die im Zytosol in etwa gleich verteilten Mitochondrien (rotfluoreszierend) gut zu erkennen. Nach 24h konnte in keinem ausgewerteten Präparat ein zusammenhängender Zellmonolayer beobachtet werden. Sowohl bei HEK- (B) als auch bei LLC-PK1- Zellen (E) lagen die Zellen einzeln oder in Plaques von wenigen Zellen vor.

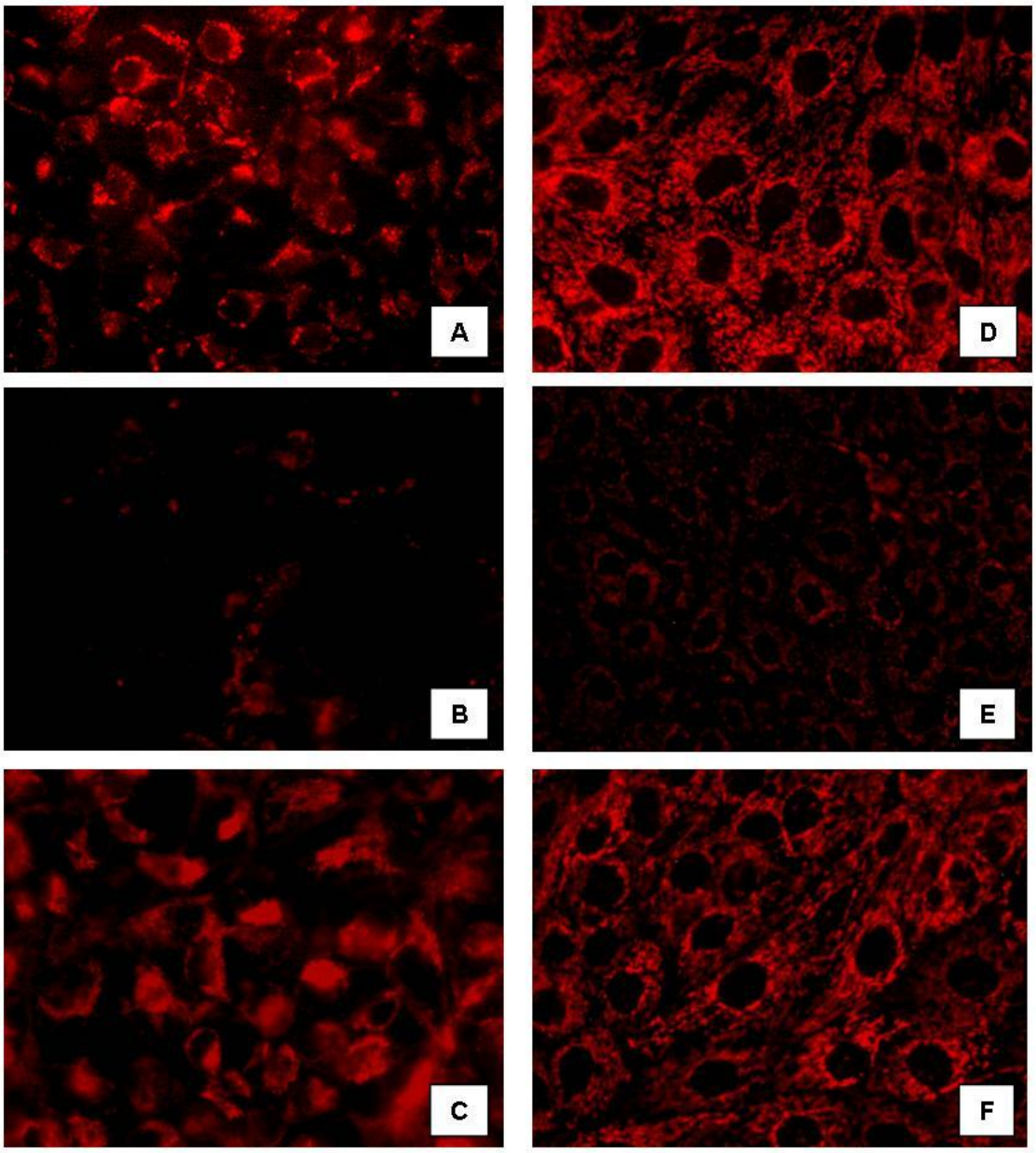

Abbildung 16: Mitochondrien spezifische Färbung von HEK293- (A, B und C) und LLC-PK1- Zellen (D, E und F) bei Kultivierung unter normoxischen Bedingungen (A und D) und nach 24 h Hypoxie (B und E) sowie nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase (C und F). Färbezeit 5 min bei 37 °C im Dunkeln (Inkubator).

Besonders ausgeprägt erscheint in beiden Zelllinien die abgeschwächte Fluoreszenz und damit die anteilige Abnahme aktiver Mitochondrien in den Zellen. Weiterhin wirken die Zellen zusammengezogen und optisch kleiner, wodurch Mitochondrien in der Zelle kompakter und weniger gleichmäßig über die Zelle verteilt erscheinen. Besonders in den LLC-PK1- Zellen können hauptsächlich Mitochondrien, die in der Nähe des Zellkerns lokalisiert sind, erfasst werden. Nach einer 24 stündigen Reoxigenierungsphase liegt besonders bei den LLC- PK1- Zellen (F) erneut ein nahezu geschlossener Zellmonolayer mit deutlich erkennbar fluoreszierenden Mitochondrien vor. Bei den HEK293- Zellen (C) erschien in der Regel ein weit weniger gut geschlossener Zellrasen, jedoch

mit ebenfalls deutlich aktiven, fluoreszierenden Mitochondrien im Vergleich zum hypoxischen Zustand ohne Reoxigenierungsphase.

Zelluläre Respiration

Um die Auswirkungen veränderter Mitochondrienstruktur aufgrund der Hypoxie genauer zu untersuchen, wurden zudem respiratorische Messungen mittels Oxygraph durchgeführt. Wie bei allen weiteren beschriebenen Experimenten wurden hierbei normoxische mit hypoxischen sowie zusätzlich mit Zellen nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase Zellen verglichen. Im Besonderen zeigten sich Unterschiede in der Grundatmung (state 1) zwischen Kontoll- und Hypoxiezellen (Abb. 20). Während der Sauerstoffverbrauch in beiden untersuchten Zelllinien unter normoxischen Bedingungen zwischen 30 und 40 pmol/(sek*Million) lag, wiesen hypoxische Zellen Werte zwischen 10 und 20 pmol/(sek*Million) auf. In Zellen, die eine 24 stündige Reoxigenierungsphase unterliefen, konnte ein erneuter Anstieg der Grundatmung auf durchschnittlich 25 – 30 pmol/(sek*Million) an.

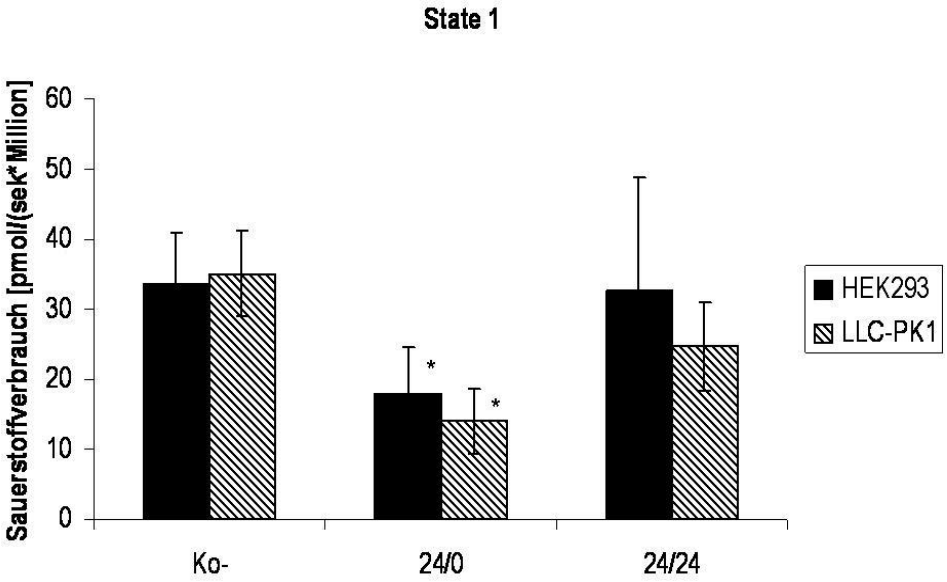

Abbildung 17: Grundatmung (state 1) in HEK293- und LLC-PK1- Zellen unter normoxischen (Ko-), und hypoxischen (24/0) Bedingungen sowie nach 24 h Reoxigenierung. Darstellung des Sauerstoffverbrauchs [pmol/(sek*Million)].

In Abbildung 21 sind exemplarisch 3 Messprotokolle der humanen Zelllinie HEK293 dargestellt. Teil A zeigt den Verlauf der Zellatmung unter normoxischen Bedingungen (Ko-), Teil B den Verlauf nach 24 h Hypoxie (24/0) und Teil C nach 24h Hypoxie mit anschließender 24 stündiger Reoxigenierungsphase (24/24).

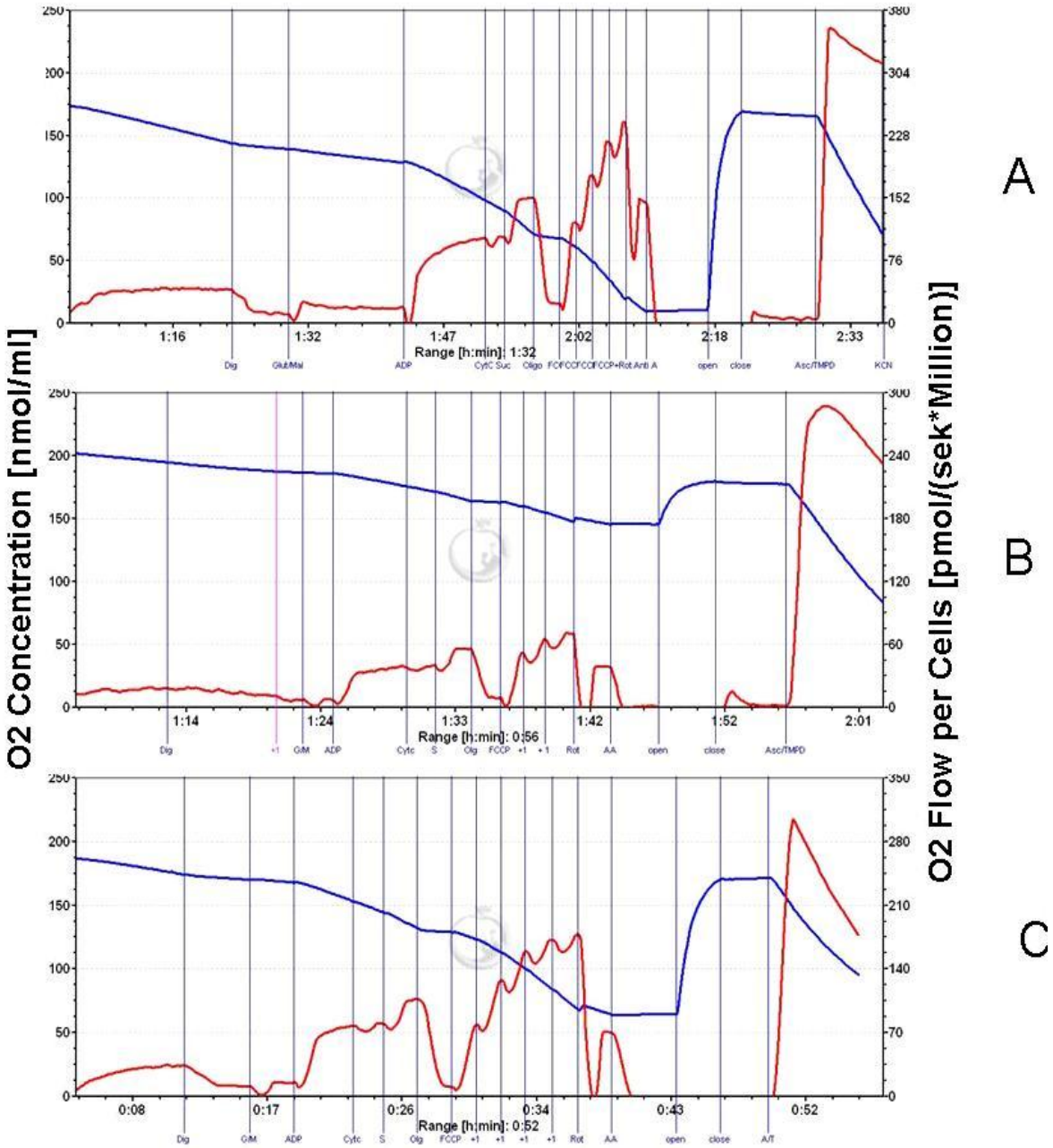

Abbildung 18: Exemplarische Messprotokolle nach Digitonin- Regime für HEK293- Zellen unter normoxischen (A) und hypoxischen (B) Bedingungen sowie nach 24 h Reoxigenierung (C). Blaue Kurve: Sauerstoffkonzentration [nmol/ml], rote Kurve Sauerstoffverbrauch der Zellen [pmol/(sek*Million].

In normoxischen Kontrollzellen konnte während der Grundatmung (*state1- Atmung*) ein durchschnittlicher O_2- Verbrauch von 33,5 pmol/s pro einer Million Zellen pmol/(s*Mill) gemessen werden, der Minimalwert der Einzelmessungen lag hierbei bei ca. 16, der Maximalwert bei 41,7 pmol/(s*Mill). Nach Permeabilisierung der Zellen durch Gabe von Digitonin reduzierte sich dieser Verbrauch auf durchschnittlich 6 pmol/s pro einer Million Zellen. Nach einem nur gering gesteigerten O_2- Verbrauch nach der Gabe von Glutamat und Malat erhöht sich der O2- Verbrauch nach ADP-Stimulation auf maximal auf 101 pmol/(s*Mill) in einem der Einzelexperiment; im Schnitt betrug

dieser Wert 63,2 pmol/(s*Mill). Eine weitere Steigerung des O2- Verbrauchs auf durchschnittlich 92,7 pmol/(s*Mill) konnte nach Succinat- Gabe gemessen werden. Nach Gabe von Oligomycin, um die ATP- Synthase irreversibel zu inhibieren (*state4- Atmung*), wurde zur Bestimmung der maximalen Atmungskapazität FCCP (Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon) titriert. Die maximale Atmungskapazität liegt bei HEK293- Zellen im Schnitt bei etwa 140 pmol/s pro einer Million Zellen (minimal bei etwa 88, maximal bei ca. 244 pmol/(s*Mill)). Nach 24 stündiger Hypoxie erwies es sich als allgemein schwieriger die einzelnen Messungen vollständig zu Ende zu führen, d.h. bei einer deutlich erhöhten Anzahl der Messungen starben die Zellen ab bzw. konnte die Zellatmung nicht mehr stimuliert werden, so dass die Messungen vorzeitig abgebrochen und die Daten nicht mit in die Auswertung einbezogen werden konnten. Bei Messungen, die an Zellen nach 24 Stunden Reoxigenierungsphase trat dieser Effekt nicht mehr auf. Eine Übersicht der Durchschnitts- sowie der Minimal- und Maximalwerte sind in nachstehender Tabelle 4 dargestellt.

Zusätzlich zur Bestimmung der einzelenen Werte wurde, als Maß für die Schädigung der Mitochondrien die sogenannte RCR (respiratory control ratio) ermittelt. Dieser Wert wird aus dem Verhältnis Grundatmung (gekoppelt)/ maximalte Atmungskapazität (entkoppelt nach FCCP- Gabe) berechnet. Je kleiner dieser Wert ist, desto größer ist die mitochondriale Schädigung. In normoxischen Kontrollzellen lag dieser Wert bei 23 gegenüber einem Wert von 16 in hypoxischen Zellen. Nach 24 h Reoxigenerung konnte eine RCR von 13,5 ermittelt werden.

Tabelle 4: Mittlere, minimale und maximale Messwerte des Sauerstoffverbrauchs (O2 Flow per cells [pmol/(sek*Million]) in HEK293- Zellen unter normoxischen (Ko-), und hypoxischen (24/0) Bedingungen sowie nach 24 h Reoxigenierung (24/24). Daten der Grundatmung (state1) sowie nach Gabe von Digitonin (Dig), Glutamat/Malat (G/M), Adenosindiphosphat (ADP), Cytochrom c (Cyt c), Succinat (S), Oligomycin (Olg), Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP), Rotenon (Rot), Antimycin A (AA) und Ascorbat/ N,N,N`,N`-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin-dihydrochlorid (Asc/TMPD) entsprechend dem Digitonin- Regime wie unter Punkt 2.2.15 beschrieben.

	Ko-			24/0			24/24		
HEK293	**MW ***	**min ***	**max ***	**MW ***	**min ***	**max ***	**MW ***	**min ***	**max ***
State1	**33,5**	16,0	41,7	**17,9**	6,3	28,6	**32,6**	18,3	63,3
±	7,5			6,5			16,3		
Dig	**6,0**	3,0	11,9	**5,9**	1,3	8,7	**12,5**	4,5	25,2
±	2,6			2,5			6,9		
G/M	**9,6**	5,0	18,6	**7,6**	0,2	11,8	**14,9**	6,9	29,3
±	3,4			3,9			7,7		
ADP	**63,1**	33,4	101,7	**46,3**	25,5	76,4	**81,8**	37,5	164,2
±	18,7			15,9			44,5		
Cytc	**64,1**	34,2	104,9	**47,8**	28,2	80,9	**85,3**	41,7	167,4
±	19,0			16,5			44,9		
S	**92,7**	65,2	151,9	**64,1**	42,5	103,8	**107,5**	51,4	202,1
±	21,3			19,8			52,8		
Olg	**10,9**	5,9	24,5	**7,0**	0,3	11,8	**9,8**	3,9	22,4
±	4,8			3,1			5,8		
FCCP	**140,3**	88,9	244,3	**93,9**	59,7	176,7	**168,1**	101,7	307,6
±	41,6			37,8			78,1		
Rot	**74,6**	49,8	145,1	**45,7**	33,3	78,5	**79,4**	38,9	144,5
±	30,9			14,9			34,6		
AA	**-1,1**	0 (-5,1)	6,3	**-0,8**	0 (-1,9)	1,3	**-1,6**	0 (-10,7)	1,8
±	2,8			0,9			3,4		
Asc/TMPD	**316,1**	177,4	530,4	**184,6**	76,7	285,1	**238**	103,6	465,1
±	95,2			70,9			121,31		
*** alle Werte [O2 Flow per cells [pmol/(s*Mill)]**									

Der Verlauf der Zellatmung stellt sich in LLC-PK1- Zellen (vgl. Abb. 22) tendenziell ähnlich wie in den humanen HEK293- Zellen dar. Eine Übersicht der einzelnen Werte ist in Tabelle 5 aufgeführt.

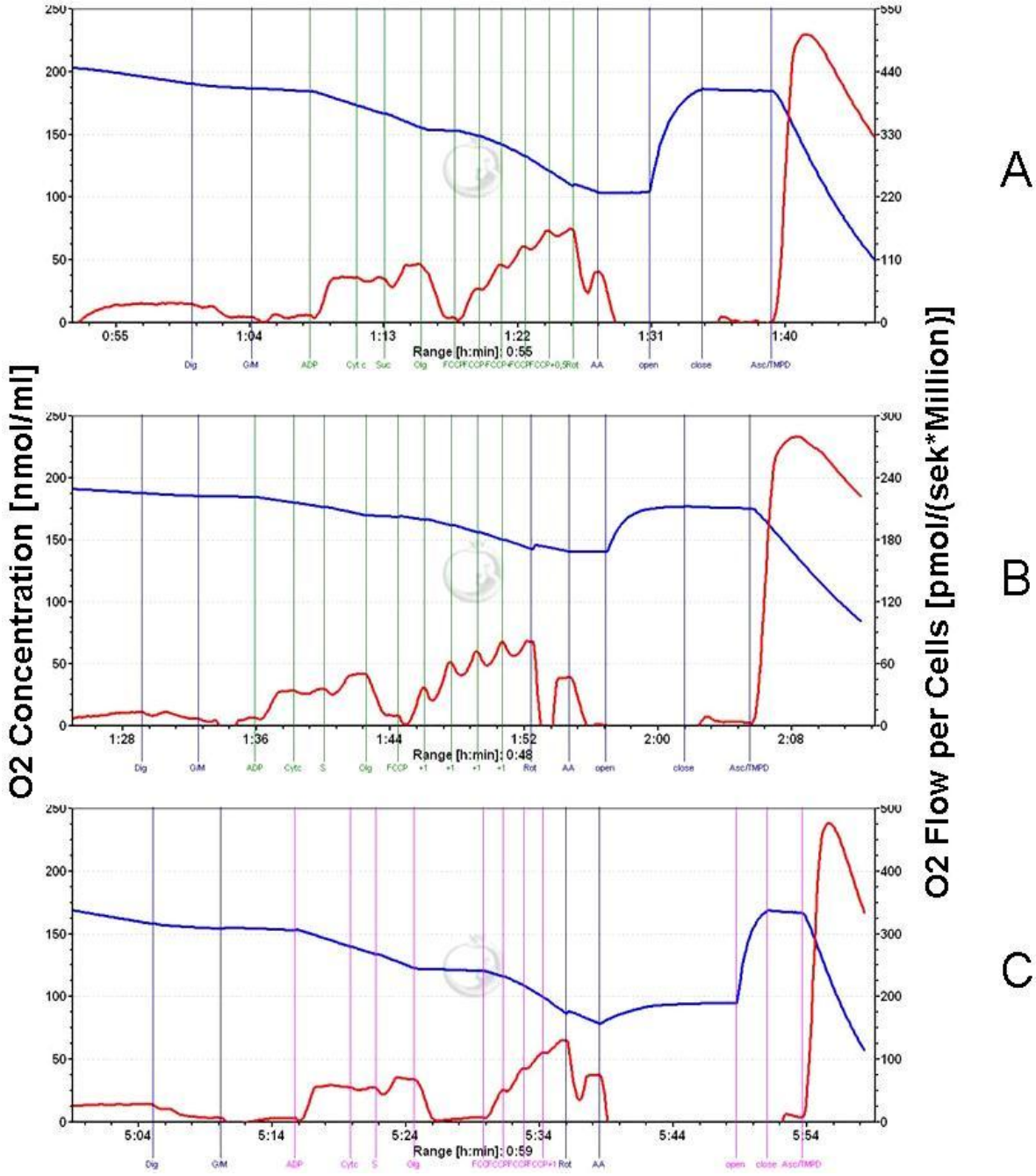

Abbildung 19: Messprotokolle nach Digitonin- Regime von LLC-PK1- Zellen. A: normoxische Kontrollzellen, B: hypoxische Zellen und C: Zellen nach 24 h Reoxigenierung. Blaue Kurve: Sauerstoffkonzentration [nmol/ml], rote Kurve Sauerstoffverbrauch der Zellen [pmol/(sek*Million].

Tabelle 5: Mittlere, maximale und minimale Messwerte der Zellatmung nach Digitonin- Regime in LLC-PK1- Zellen unter normoxischen (Ko-) und hypoxischen (24/0) Bedingungen sowie nach 24 h Reoxigenierungsphase (24/24). Daten der Grundatmung (state1) sowie nach Gabe von Digitonin (Dig), Glutamat/Malat (G/M), Adenosindiphosphat (ADP), Cytochrom c (Cyt c), Succinat (S), Oligomycin (Olg), Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP), Rotenon (Rot), Antimycin A (AA) und Ascorbat/ N,N,N`,N`-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin-dihydrochlorid (Asc/TMPD) entsprechend dem Digitonin- Regime wie unter Punkt 2.2.15 beschrieben.

	Ko-			24/0			24/24		
LLC-PK1	**MW ***	**min ***	**max ***	**MW ***	**min ***	**max ***	**MW ***	**min ***	**max ***
State1	**35,0**	27,0	48,0	**12,9**	7,1	19,5	**24,7**	15,1	33,5
±	6,0			3,9			6,3		
Dig	**6,9**	1,1	10,9	**4,6**	1,3	8,3	**8,6**	6,7	11,6
±	2,6			2,5			1,7		
G/M	**10,3**	6,5	18,9	**6,5**	4,5	8,1	**11,7**	7,0	18,6
±	3,6			1,0			3,6		
ADP	**72,2**	44,4	94,2	**25,3**	10,2	39,6	**67,3**	28,3	109,0
±	15,7			9,9			22,3		
Cytc	**70,0**	41,2	91,6	**26,3**	11,8	38,0	**67,0**	26,4	108,6
±	16,1			8,7			22,7		
S	**90,8**	46,5	146,5	**37,5**	21,8	53,5	**81,8**	29,9	127,2
±	29,6			11,3			28,0		
Olg	**9,4**	5,8	13,3	**5,9**	1,1	18,2	**10,0**	3,3	17,8
±	2,6			5,5			3,6		
FCCP	**131,0**	85,9	205,3	**71,8**	45,5	87,1	**138,3**	76,9	217,7
±	41,3			12,3			51,2		
Rot	**80,7**	58,0	139,4	**40,0**	23,2	54,6	**74,3**	31,8	116,6
±	22,9			10,9			26,9		
AA	**0,0**	0 (-2,0)	5,2	**1,0**	0 (-1,6)	5,4	**1,0**	0 (-3,6	11,1
±	1,9			2,2			4,4		
Asc/TMPD	**406,4**	177,1	769,0	**258,6**	94,8	483,0	**242,6**	104,3	394,1
±	169,2			135,6			87,6		
*** alle Werte [O2 Flow per cells [pmol/(s*Mill)]**									

Auch für die LLC-PK1- Zellen wurde die RCR berechnet. Die Werte lagen in den Kontrollzellen bei 19,1, in hypoxischen bei 15,8 und nach 24 h Reoxigenierung bei 16,2.

Für beide verwendeten Zelllinien wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) sowie der Citratsynthase (CS) im normoxischen, hypoxischen sowie im reoxigenierten Zustand bestimmt. Hierzu wurde bei der Messung der jeweiligen Enzymkinetik über einen Zeitraum von 4 min die Absorptionsrate (R_a), welche proportional zur Enzymaktivität ist, gemessen.

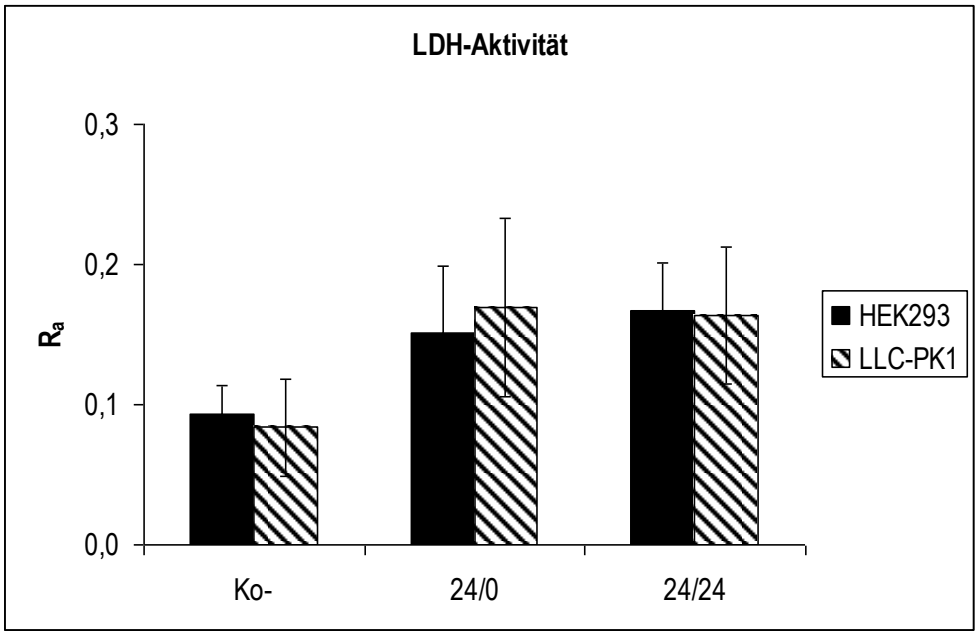

Abbildung 20: Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) in HEK293- und LLC-PK1- Zellen unter normoxischen Bedingungen (Ko-), nach 24 h Hypoxie (24/0) und nach 24 stündiger Reoxigenierung (24/24). Messung der Absorptionsrate (R_a), wobei R_a ~ Enzymaktivität.

In den beiden untersuchten Zelllinien konnte eine tendenzielle Erhöhung (um etwa 50 %) der LDH-Aktivität nach 24 h Hypoxie sowie nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase gemessen werden. Aufgrund der Individualität der Einzelversuche entstehen vergleichsweise hohe Standardabweichungen, wodurch bei der statistischen Auswertung keine Signifikanzen errechnet werden konnten.

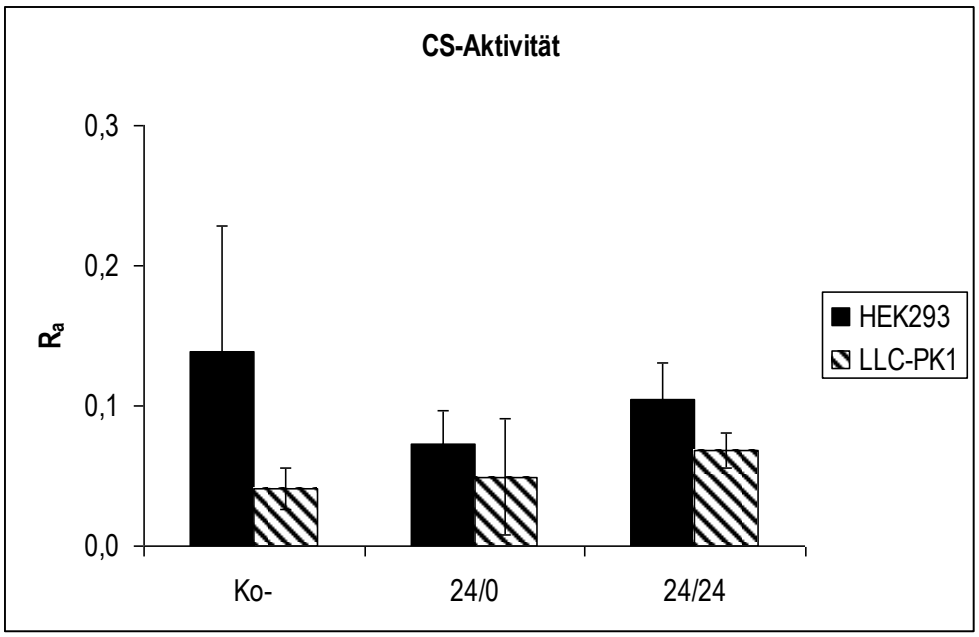

Abbildung 21: Aktivität der Citratsynthase (CS) in HEK293- und LLC-PK1- Zellen unter normoxischen Bedingungen (Ko-), nach 24 h Hypoxie (24/0) und nach 24 stündiger Reoxigenierung (24/24). Messung der Absorptionsrate (R_a), wobei R_a ~ Enzymaktivität.

Bei der Bestimmung der Citratsynthase (CS)- Aktivität zeigten sich sowohl in HEK293- als auch in LLC-PK1- Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen normoxischen Kontrollen, hypoxischen und reoxigenierten Zellen. Tendenziell erkennt man in beiden Zelllinie einen Rückgang der CS-Aktivität mit 24 stündiger Hypoxiephase und eine erneute Steigerung der Aktivität nach 24 h Reoxigenierung.

3.3. Expression verschiedener apoptose- relevanter Proteine während Hypoxie und Einfluss von EPO und cEPO-FP während der Hypoxie

Um den Einfluss von Hypoxie, Reoxigenierung sowie der Substanzen EPO und cEPO-FP auf die Expression verschiedener Gene in den Zellen zu untersuchen, wurden mit beide Zelllinien Western Blot- Analysen durchgeführt. Auf Proteinebene wurde die Expression von AMPKβ1, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Caspase 3 und 9, cleaved Caspase 3 und 9, Cytochrom c, Smac/Diablo, XIAP und cIAP-1 untersucht. In den folgenden Abbildungen 25 bis 36 sind die Expression der jeweiligen Proteine in HEK293- Zellen während Normoxie ohne (Ko-) und Normoxie mit (Ko- + EPO1 IU, Ko- + EPO100 IU, Ko- + cEPO-FP1 IU und Ko- cEPO-FP100 IU) EPO bzw. cEPO-FP- Behandlung. Die entsprechenden Bezeichnungen für die EPO bzw. cEPO-FP- Behandlungen gelten für die hypoxischen Zellen (24/0) sowie für die Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24). Die beiden für

diese Versuche verwendeten Konzentrationen (jeweils 1 und 100 IU EPO bzw. cEPO-FP) wurden aufgrund von Konzentrationstests in Vorversuchen gewählt. Da immer normoxische mit hypoxischen Proben verglichen wurden, wurden die Kontrollwerte (unbehandelte Kontrolle; Ko-) gleich 1 gesetzt (gestrichelte Markierung) und die Expression in den Proben als x-fache Expression der Kontrollen dargestellt. Sowohl EPO als auch cEPO-FP wurden freundlicherweise von der Firma Polymun Scientific GmbH (Wien) zur Verfügung gestellt.

In allen untersuchten Markern konnten zwischen unbehandelten und mit EPO bzw. cEPO-FP behandelten normoxischen Kontrollzellen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Behandelte und unbehandelte Kontrollzellen werden daher in den folgenden Ausführungen nicht gesondert bezeichnet, sondern allgemein als Kontrollzellen benannt. Um diese Ergebnisse der Western Blot- Analysen zu verdeutlichen, ist unter jedem Diagramm exemplarisch einer der ausgewerteten Western Blots zur jeweiligen Substanz dargestellt. Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen hypoxischen und normoxischen und reoxigenierten Zellen sowie in Proben dieser einzelnen zwischen behandelten (cEPO-FP bzw. EPO) und unbehandelten Zellen feststellen zu können, wurde auch für die Daten dieser Versuchsreihen der T-Test durchgeführt. In den folgenden Abbildungen werden daher alles Signifikanten mit einem p- Wert $< 0,05$ sind mit einem Stern (*) und $p < 0,01$ mit zwei Sternen (**) gekennzeichnet. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,001$ ist mit der Sternen (***) bezeichnet. Es wurden die Kontrollzellen (Ko-, Ko- + cEPO-FP 1 IU bzw. EPO 1 IU und Ko- + cEPO-FP 100 IU bzw. EPO 100 IU) auf statistisch signifikante Unterschiede untereinander sowie in Bezug auf hypoxische (24/0, 24/0 + cEPO-FP 1 IU bzw. EPO 1 IU 24/0 + cEPO-FP 100 IU bzw. EPO 100 IU) Zellen untersucht. Des Weiteren wurde die Unterschiede zwischen hypoxischen und reoxigenierte Zellen (24/24, 24/24 + cEPO-FP 1 IU bzw. EPO 1 IU 24/24 + cEPO-FP 100 IU bzw. EPO 100 IU) statistisch ausgewertet. Signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe sind mit einer Klammer dargestellt.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchsreihen sind für die humane Zelllinie HEK293 in den Abbildungen 25 bis 36, die für die porcine Zelllinie LLC-PK1 in den Abbildungen 37 bis 47 dargestellt.

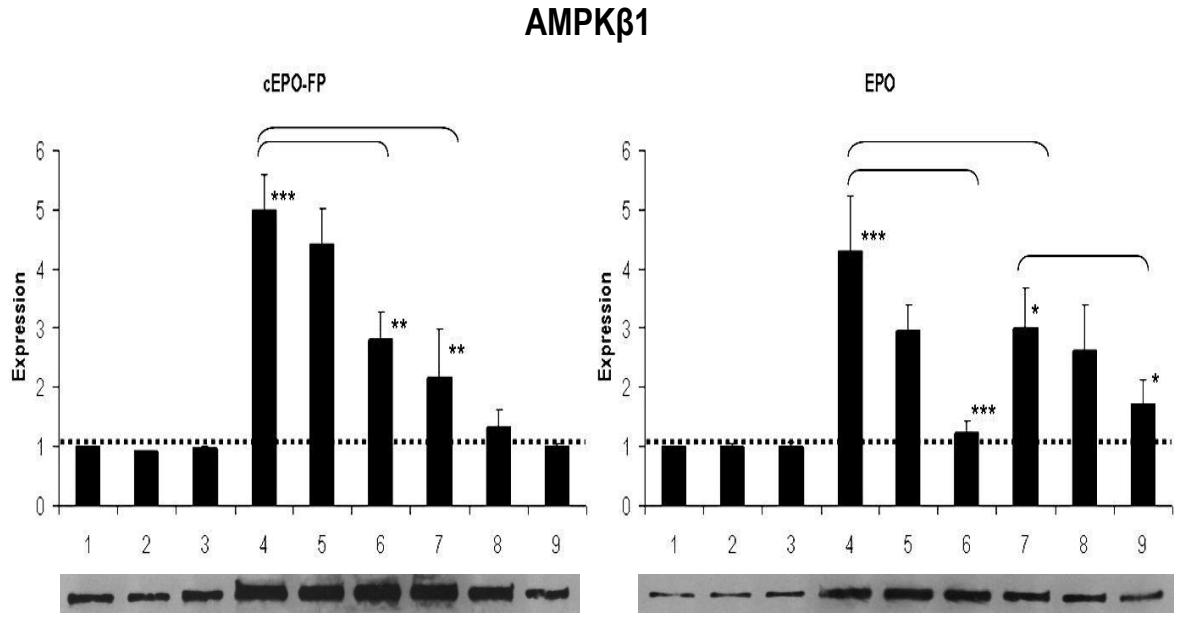

Abbildung 22: Expression der AMP- aktivierten Proteinkinase beta 1 (AMPKβ1) unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in HEK293-Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische AMPKβ1- Banden (37 kDa) im Western Blot.

Verglichen mit Kontrollzellen konnte in hypoxischen Zellen eine im Schnitt 5- fach erhöhte Expression der AMP-aktivierten Proteinkinase beta 1 (AMPKβ1) festgestellt werden. Sowohl unter der Behandlung mit jeweils 100 IU EPO als auch mit cEPO-FP während der 24 stündigen Hypoxiephase sank diese Expression signifikant ab. Zudem lässt sich eine Konzentrationsabhängigkeit bei der Wirkung beider Substanzen erkennen, da in beiden Fällen eine deutlichere Reaktion bei der Behandlung mit 100 IU der jeweiligen Substanz im Vergleich mit der Behandlung mit 1 IU auftrat. Da die Auswirkungen der beiden Substanzen in getrennten Versuchsreihen untersucht wurden, treten z.B. Unterschiede in den Zahlenwerten der Expressionen der hypoxischen und reoxigenierten Zellen, auf. Während in der cEPO-FP- Reihe die AMPKβ1-Expression in reoxigenierten Zellen bei dem etwa 2- fachen Wert gegenüber den Kontrollen liegt, sind die Werte in den EPO- Versuchen etwa 3- fach höher als in den Kontrollen. Die AMPKβ1-Expression nach 24 h Reoxigenierung (mit und ohne Behandlung der jeweiligen Substanz) war in allen Einzelversuchen geringer als in den hypoxischen Zellen ohne jegliche Behandlung. Weiterhin konnte ein statistisch signifikant geringere AMPKβ1- Expression in reoxigenierten Zellen mit Behandlung durch 100 IU EPO gegenüber unbehandelten reoxigenierten Zellen gezeigt werden.

Bax

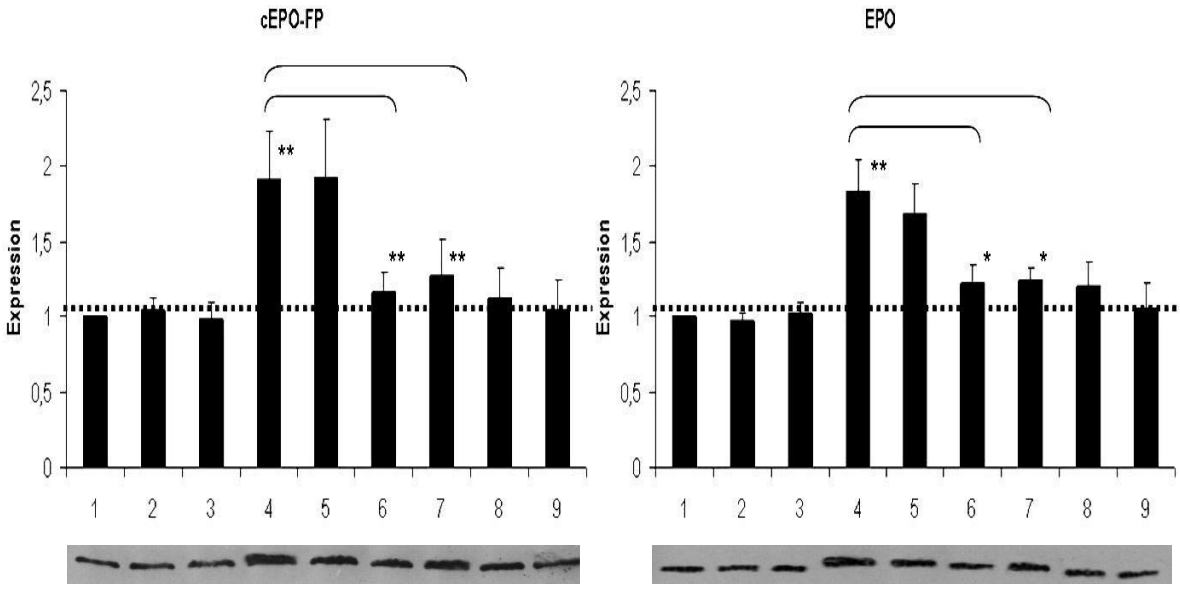

Abbildung 23: Expression des Faktors Bax (Bcl-2-associated-X protein) unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in HEK293-Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische Bax- Banden (20 kDa) im Western Blot.

Die Expression des mitochondrialen Apoptosefaktors Bax (Bcl-2-associated-X protein) steigt in beiden Versuchsreihen in hypoxischen Zellen auf etwa den doppelten Wert gegenüber den Kontrollzellen an. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten hypoxischen Zellen konnten sowohl unter cEPO-FP- als auch EPO- Behandlung in der hohen Konzentration (jeweils 100 IU) detektiert werden. Jedoch konnten keine Unterschiede zwischen unbehandelten hypoxischen und mit 1 IU der jeweiligen Substanz behandelten Zellen festgestellt werden. In beiden Versuchsreihen konnte eine deutlich verringerte Expression des mitochondrialen Apoptosefaktors Bax in behandelten sowie unbehandelten Zellen nach 24 h Reoxigenierung gegenüber unbehandelten Hypoxiezellen und Hypoxiezellen mit Behandlung der jeweiligen Substanz in der geringen Konzentration (1 IU) beobachtet werden. In der Gruppe der reoxigenierten Zellen zeigte sich kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen.

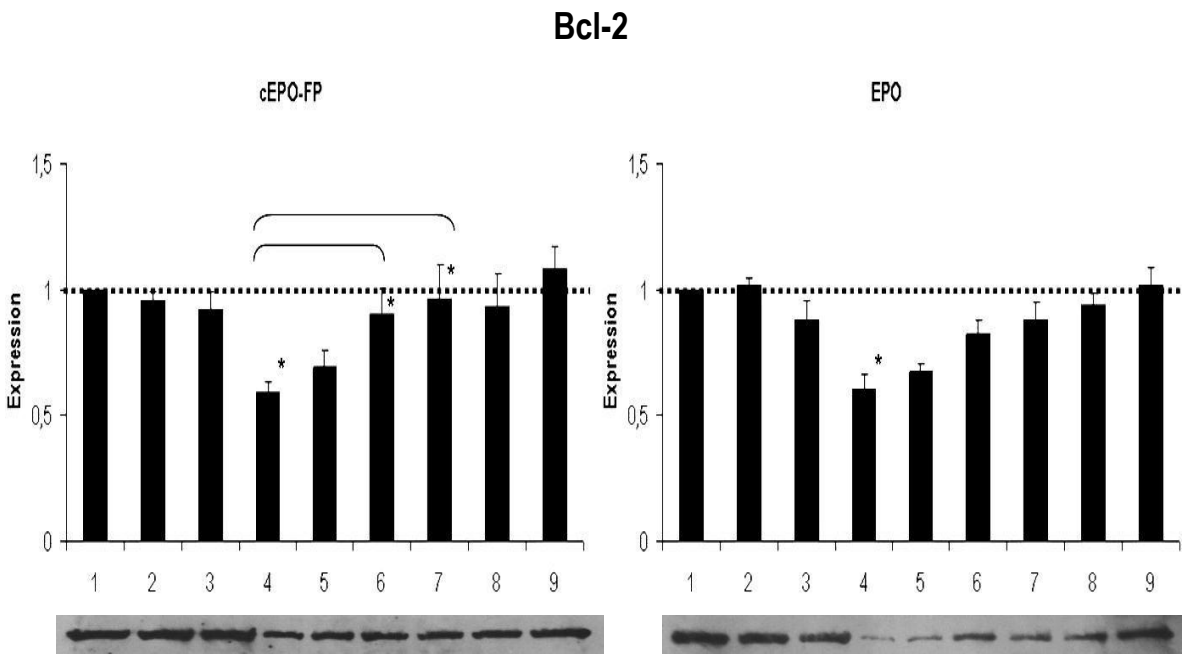

Abbildung 24: Expression des B-cell lymphoma-related protein 2 (Bcl-2) unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in HEK293-Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische Bcl-2- Banden (28 kDa) im Western Blot.

Analog zu den Untersuchungen der Bax- Expression wurde auch die Expression dessen Antagonist B-cell lymphoma-related protein 2 (Bcl-2) untersucht. Gegenüber Kontrollzellen wird in beiden Versuchsreihen die Expression dieses Faktors nach 24 h Hypoxiezeit um etwa die Hälfte reduziert. Auch hier zeigte sich in hypoxischen Zellen bei beiden Substanzen eine tendenziell konzentrationsabhängige Erhöhung der Expression in Richtung Kontrollniveau, was sich bei Behandlung mit cEPO-FP im hohen Konzentrationsbereich (100 IU) zudem in einer signifikant verbesserten Expression verglichen mit unbehandelten Hypoxiezellen äußert. Des Weiteren weisen unbehandelte, reoxigenierte Zellen dieser Versuchsreihe gegenüber unbehandelten Hypoxiezellen ebenso eine signifikant erhöhte Bcl-2- Expression auf. In der Gruppe der reoxigenierten Zellen konnten untereinander, d.h. zwischen behandelten und unbehandelten Zellen keine Unterschiede beobachtet werden, obwohl in Einzelversuchen z.B. im dargestellten Western Blot der EPO- Reihe (rechts) eine erhöhte Expression in reoxigenierten Zellen mit Behandlung von 100 IU EPO erkennbar ist.

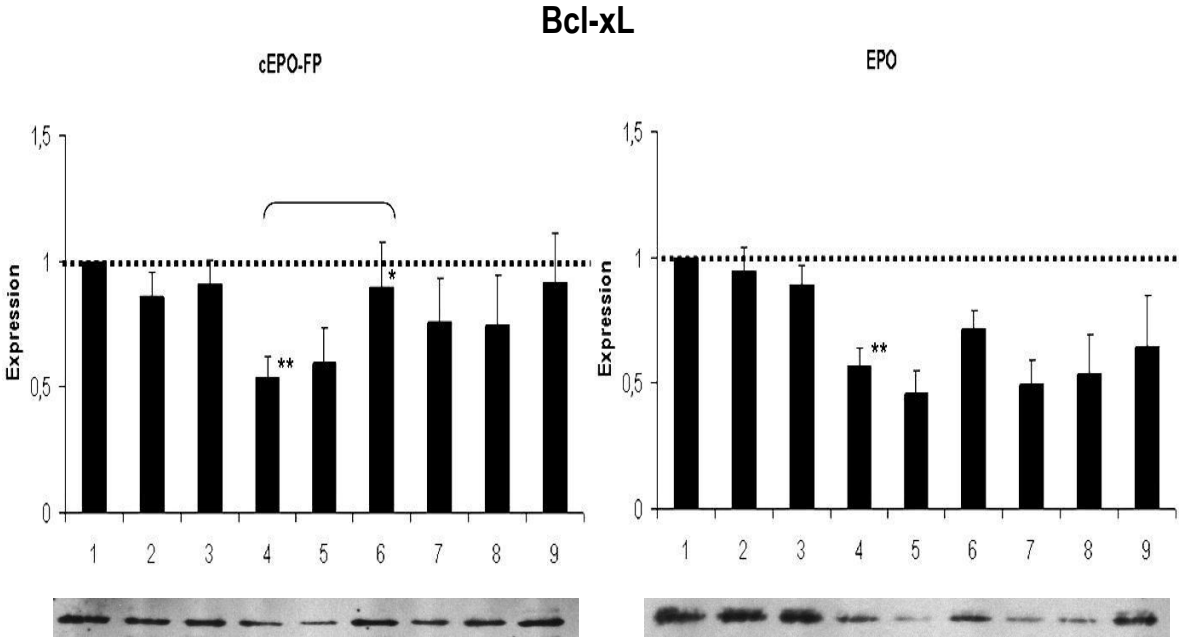

Abbildung 25: Expression des B-cell lymphoma-extra large protein (Bcl-xL) unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in HEK293-Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische Bcl-xL- Banden (30 kDa) im Western Blot.

Auch bei Betrachtung der Expression des B-cell lymphoma-extra large protein (Bcl-xL) konnten sowohl in der cEPO-FP- als auch in der EPO- Reihe signifikant verringerte Werte in hypoxischen verglichen mit normoxischen Zellen bestimmt werden. Des Weiteren konnte eine verbesserte Bcl-xL-Expression in Hypoxiezellen unter Behandlung mit 100 IU cEPO-FP festgestellt werden. In der EPO-Reihe zeigt sich lediglich eine tendenziell verbesserte Expression dieses Faktors durch Behandlung mit 100 IU EPO. Vergleicht man die Expressionen unbehandelter Hypoxiezellen mit denen von unbehandelten, reoxigenierten Zellen findet sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Ebenso weist die Gruppe der reoxigenierten Zellen untereinander, d.h. mit und ohne Behandlung von cEPO-FP bzw. EPO keine unterschiedlichen Bcl-xL- Expressionen auf.

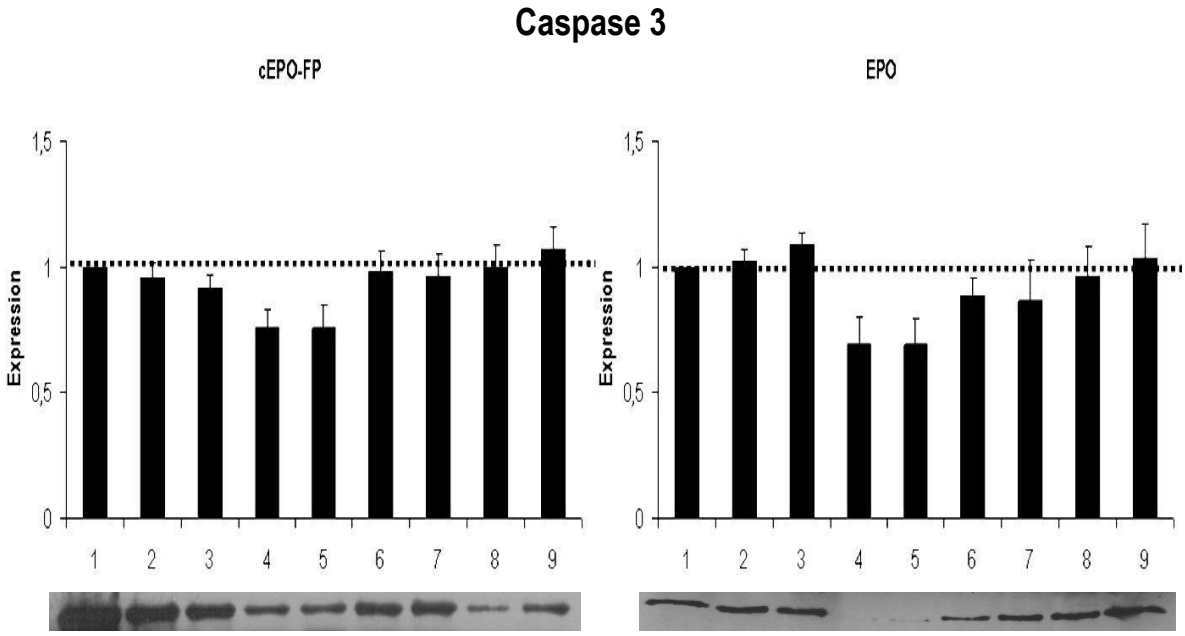

Abbildung 26: Expression der Caspase 3 unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in HEK293- Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische Caspase 3- Banden (35 kDa) im Western Blot.

Betrachtet man die Expression der Caspase 3 in den Darstellungen der Banden, erkennt man nach 24 stündiger Hypoxiephase eine deutliche Abnahme der Caspase 3 in beiden Versuchsreihen. Weiterhin zeigen diese Rohdaten eine Zunahme der Caspase 3 in hypoxischen Zellen nach Behandlung mit 100 IU der jeweiligen Substanz. Gegenüber der cEPO-FP- Reihe konnte in der EPO- Reihe keine Veränderung der Expression in reoxigenierten Zellen beobachtet werden. Aufgrund der individuellen Unterschiede und der in den meisten Experimenten geringen Unterschiede der Caspase 3- Expression, konnten nach statistischer Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Proben beider Versuchsreihen berechnet werden. Die exemplarisch dargestellten Western Blot- Ergebnisse beider Versuchsreihen stellen das jeweils eindeutigste Einzelergebnis dar. Diese wurde ausgewählt, um den Zusammenhang zwischen Abnahme der Caspase 3 und Zunahme der cleaved Caspase 3, wie in der folgenden Abbildung dargestellt, zu verdeutlichen.

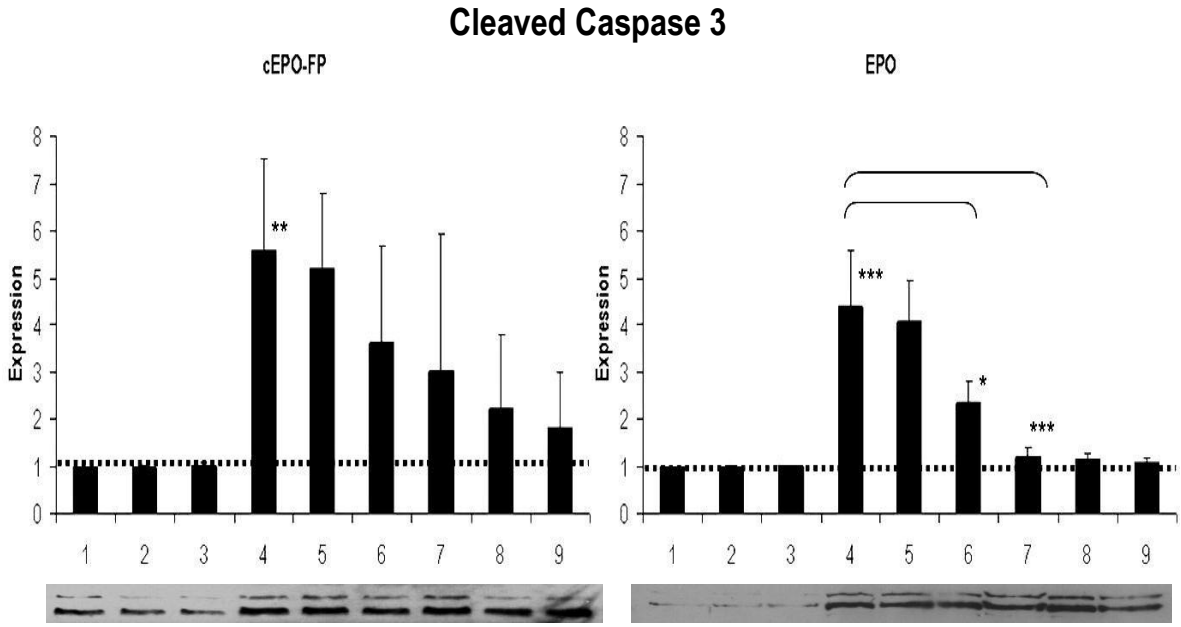

Abbildung 27: Expression der cleaved Caspase 3 unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in HEK293- Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische cleaved Caspase 3- Banden (19 und 17 kDa) im Western Blot, wobei es sich bei den 17 kDa- Fragment (untere Bande) um das aktive Fragment handelt.

In gleichem Maße wie die Caspase 3 in hypoxischen Zellen anteilig abnimmt, konnte in diesen Zellen deutlich vermehrt (Faktor 3 bis 5) das aktive Fragment dieser Caspase, die cleaved Caspase 3 (17 kDa) nachgewiesen werden. Aufgrund des schweren Nachweises der cleaved Caspase 3 auf Proteinebene ergeben sich zum Teil vergleichsweise große individuelle Unterschiede in der cEPO-FP- Reihe. Aufgrund dessen konnte weiterhin kein signifikant verbessertes Ergebnis unter cEPO-FP-Behandlung rechnerisch ermittelt werden. Jedoch lässt sich eine deutliche Zunahme der cleaved Caspase 3 sowohl in den berechneten Werten als auch anhand der Rohdaten im exemplarisch dargestellten Western Blot erkennen. In der EPO- Reihe ist diese Tendenz ebenfalls erkennbar. Im Vergleich zu normoxischen Kontrollzellen steigt der Anteil der cleaved Caspase 3 in hypoxischen Zellen ohne Behandlung durch EPO signifikant an. Durch Behandlung mit 100 IU EPO konnte zu dem eine deutliche Verringerung dieser Expression erreicht werden. Nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase zeigen sowohl unbehandelte als auch behandelte Zellen eine Expression der cleaved Caspase 3, die nahezu Kontrollniveau entspricht.

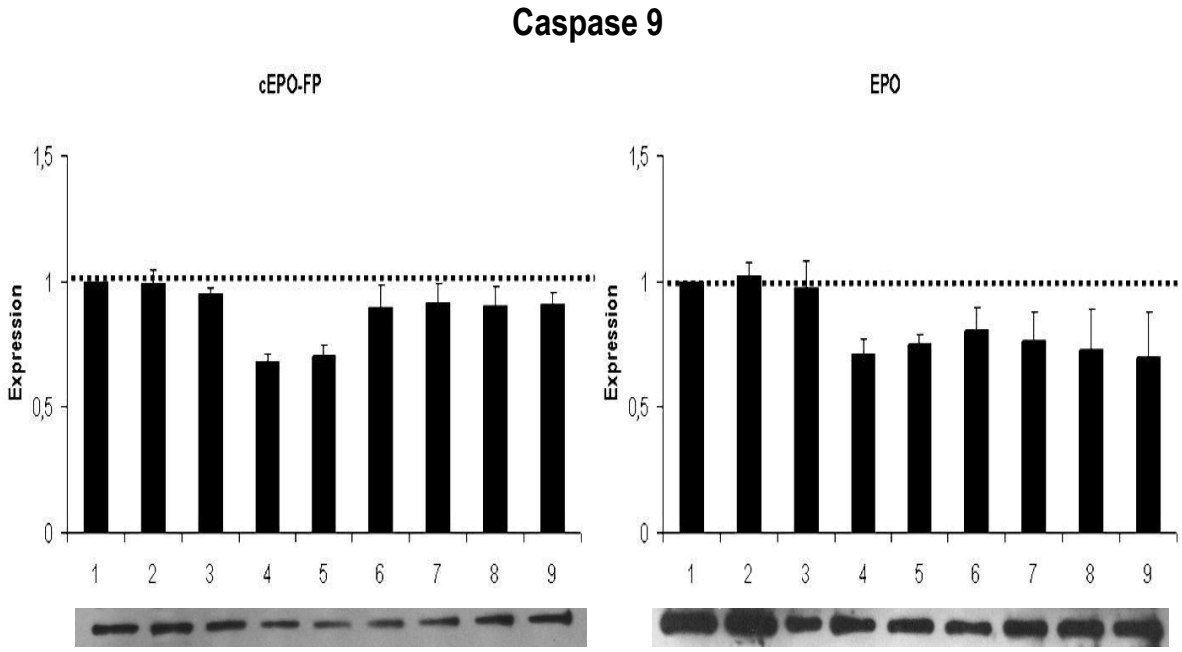

Abbildung 28: Expression der Caspase 9 unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in HEK293- Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische Caspase 9- Banden (47 kDa) im Western Blot.

Da es sich bei den beiden Caspasen 3 und 9 um zentrale Faktoren der Aktivierung der Caspase-Kaskade handelt, wurde zusätzlich zur Expression der Caspase 3 zusätzlich die der Caspase 9 untersucht. Ähnlich wie bei den Untersuchungen zu Expression der Caspase 3 zeigen sich nach Auswertung der Einzelversuche keine rechnerisch eindeutigen Unterschiede. Tendenzielle ist in beiden Versuchsreihen eine Abnahme der Caspase 9- Expression um etwa 25 % erkennbar. Weiterhin erscheint in hypoxischen Zellen unter Behandlung mit 100 IU cEP0-FP diese Expression verglichen zu unbehandelten Hypoxiezellen erhöht. Sowohl in der cEPO-FP- als auch in der EPO-Reihe konnten keine Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Zellen nach 24 h Reoxigenierungsphase detektiert werden. Anhand der Rohdaten lässt sich jedoch in beiden Versuchsreihen eine Abnahme dieser Caspase nach 24 h Hypoxie sowie eine erneute Zunahme nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase erkennen.

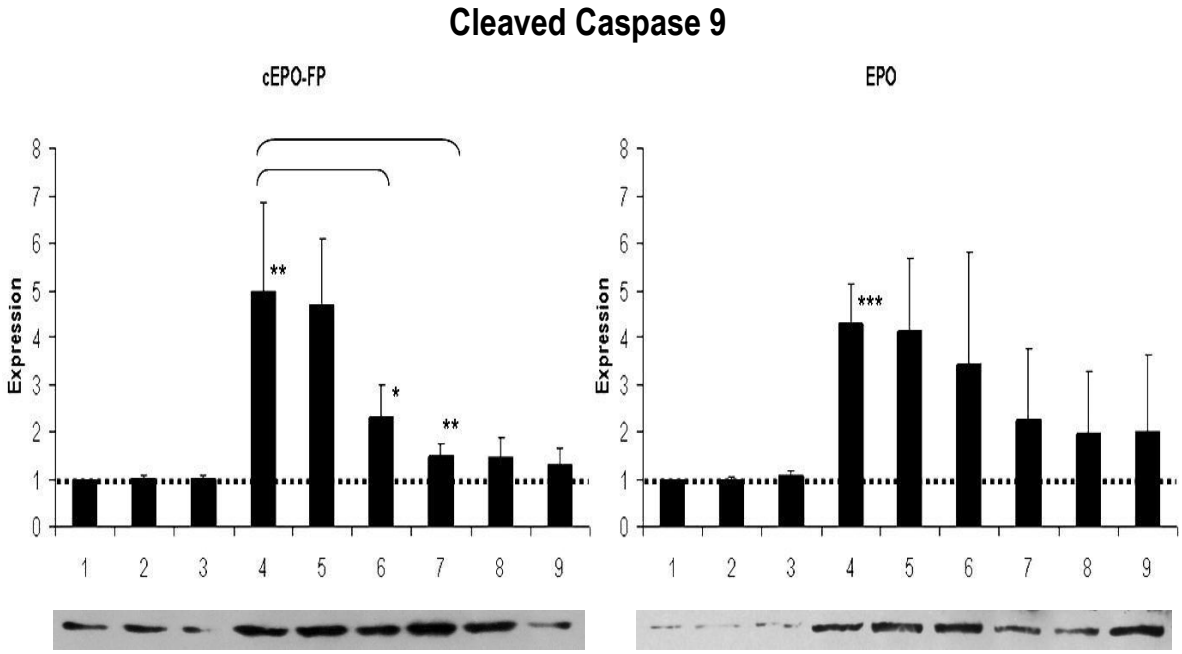

Abbildung 29: Expression der cleaved Caspase 9 unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in HEK293- Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische cleaved Caspase 9- Banden (37 kDa) im Western Blot.

Ebenso wie bei der cleaved Caspase 3 konnte in beiden Versuchsreihen in hypoxischen Zellen ein um den Faktor 4 bis 5 erhöhter Anteil der cleaved Caspase 9 festgestellt werden. Eine signifikant verringerte Expression der cleaved Caspase 9 konnte jedoch lediglich zwischen behandelten und unbehandelten Hypoxiezellen in der cEPO-FP- Reihe bei Behandlung mit 100 IU beobachtet werden. Bei der Behandlung mit EPO zeigte sich weder in der Hypoxie- noch in der Reoxigenierungsgruppe eine zu den Kontrollzellen veränderte Expression. Anhand der exemplarisch dargestellten Banden im Western Blot lässt sich jedoch eine scheinbar verbesserte cleaved Caspase 3- Expression in hypoxischen Zellen unter EPO- Behandlung vermuten.

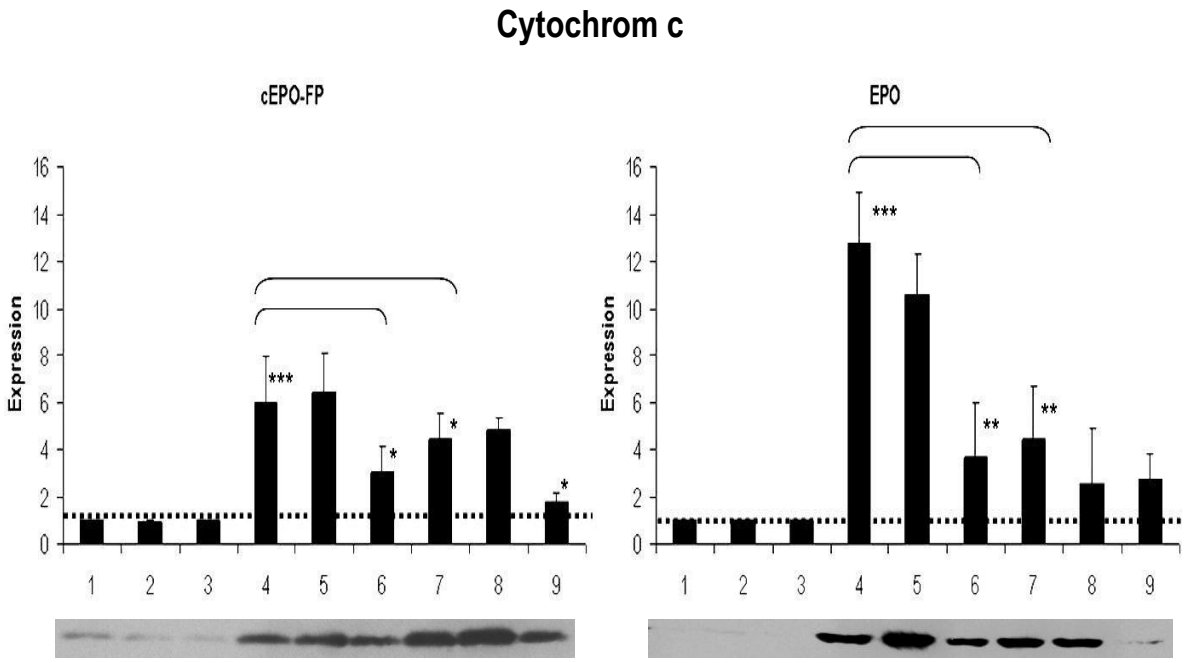

Abbildung 30: Expression des Faktors Cytochrom c (Cyt c) unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in HEK293- Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische Cyt c- Banden (14 kDa) im Western Blot.

Verglichen mit normoxischen Kontrollzellen, konnte bei beiden Versuchsreihen in hypoxischen Zellen eine maximal 6 (cEPO-FP) bis 12-fach (EPO) erhöhte Ausschüttung von Cytochrom c (Cyt c) festgestellt werden. In beiden Reihen zeigt sich in Hypoxiezellen zudem eine Verringerung des Faktors Cytochrom c durch die Behandlung mit 100 IU cEPO-FP bzw. 100 IU EPO. Weiterhin zeigte sich in beiden Versuchsreihen eine signifikant verringerte Cytochrom c- Ausschüttung nach 24 h Reoxigenierung in unbehandelten Zellen verglichen mit unbehandelten Hypoxiezellen. Unter dem Einfluss von 100 IU cEPO-FP konnte zu dem ein deutlicher Rückgang der Cytochrom c-Ausschüttung in reoxigenierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten, reoxigenierten Zellen beobachtet werden.

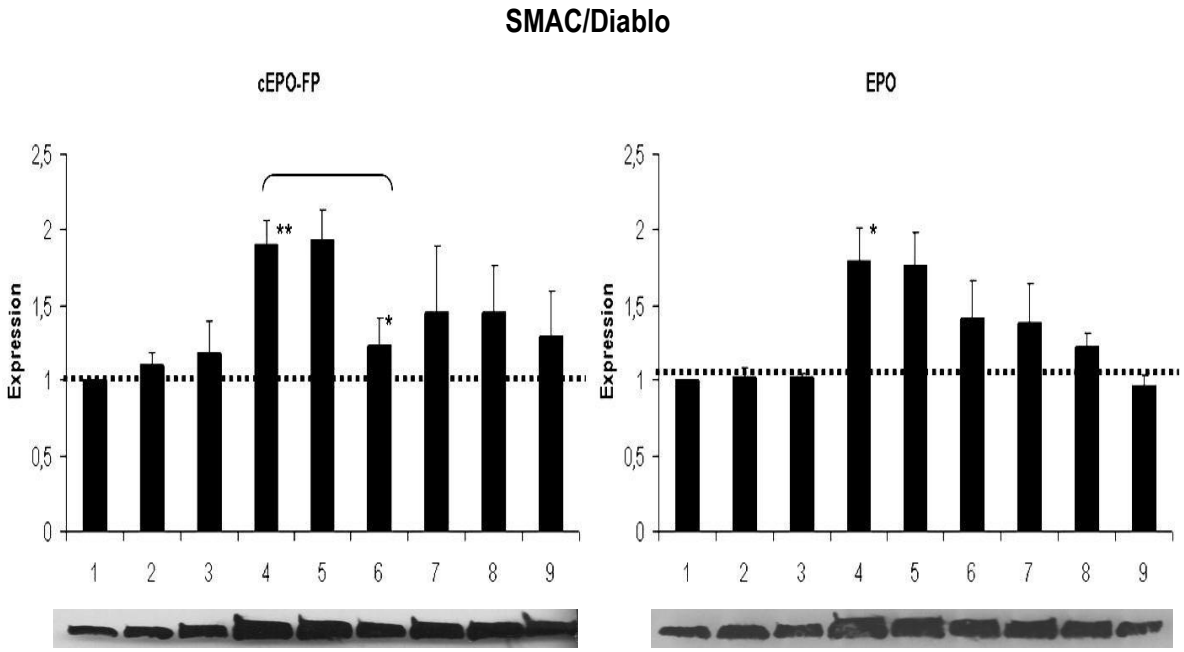

Abbildung 31: SMAC/Diablo (second derived mitochondria activator of caspase)- Expression unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in HEK293- Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische SMAC/Diablo- Banden (21 kDa) im Western Blot.

Verglichen mit normoxischen Kontrollzellen konnte sowohl in der cEPO-FP- als auch in der EPO-Versuchsreihe eine deutlich erhöhtes Vorkommen des ‚second derived mitochondria activator of caspase' (SMAC/Diablo) nach 24 h Hypoxie ohne cEPO-FP- bzw. EPO- Behandlung nachgewiesen werden. Während in der cEPO-FP- Versuchsreihe ein signifikanter Rückgang dieses Faktors nach Behandlung mit 100 IU festgestellt werden konnte, konnte in der EPO- Versuchsreihe bei dieser Konzentration lediglich ein tendenzieller Rückgang beobachtet werden. Nach einer 24 stündigen Reoxigenierungsphase zeigt sich in beiden Versuchsreihen eine Abnahme der Smac/Diablo-Freisetzung, wobei innerhalb der Gruppe der reoxigenierten Zellen keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu beobachten waren.

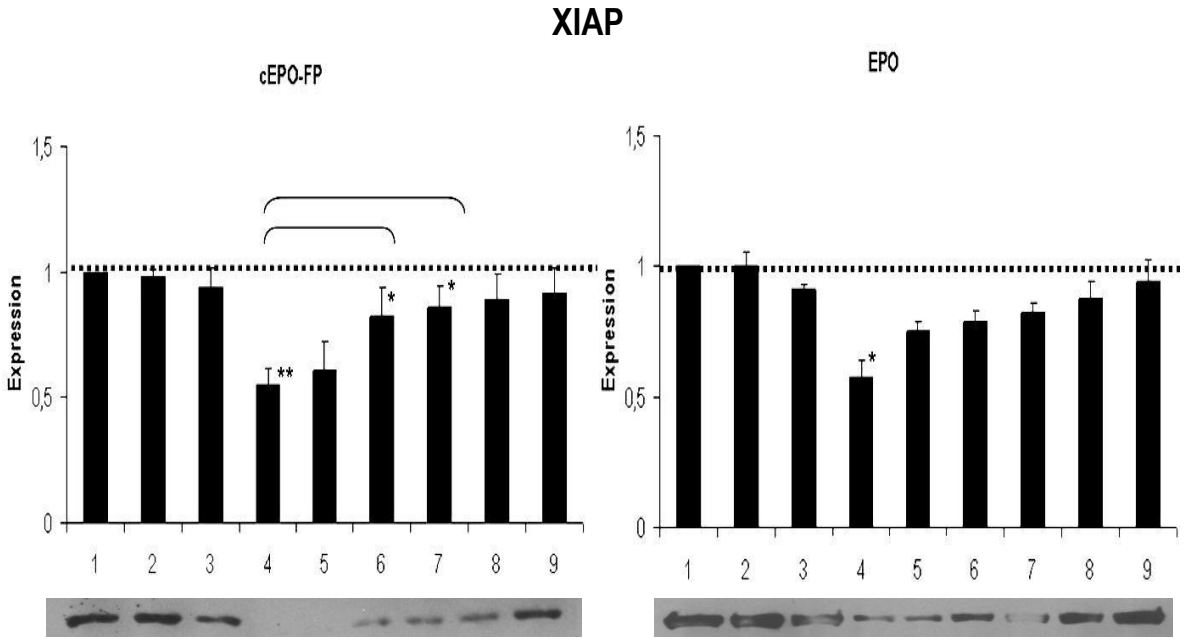

Abbildung 32: XIAP- (X- linked inhibitor of apoptosis)- Expression unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in HEK293-Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische XIAP- Banden (53 kDa) im Western Blot.

In hypoxischen Zellen konnte in beiden Versuchsreihen ein Rückgang der Expression des Inhibitors der Apoptose (IAP) XIAP um im Schnitt 50 % nachgewiesen werden. Auch hier ist unter hypoxischen Bedingungen eine Erholung dieser Expression bei der Behandlung mit cEPO-FP erkennbar. In der EPO- Reihe erreichen diese Werte kein Signifikanzniveau, jedoch ist auch hier ein tendenzieller Anstieg der XIAP- Expression unter EPO- Einfluss erkennbar. Des Weiteren ist in beiden Reihen eine signifikant verbesserte Expression dieses Faktors nach 24 h Reoxigenierung ohne Behandlung mit einer der beiden Substanzen zu erkennen. Betrachtet man jedoch die exemplarisch dargestellten Western Blot- Ergebnisse zeigt sich ein optisch deutlicher Unterschied sowohl zwischen hypoxischen als auch reoxigenierten, behandelten und unbehandelten Zellen. In beiden Reihen ist zum einen zu sehen, dass die XIAP- Expression unter hypoxischen Bedingungen ohne Behandlung deutlich geringer als in den behandelten Zellen ist. Weiterhin steigt die Expression dieses Faktors auch in reoxigenierten Zellen unter cEPO-FP- bzw. EPO- Gabe scheinbar weiter an.

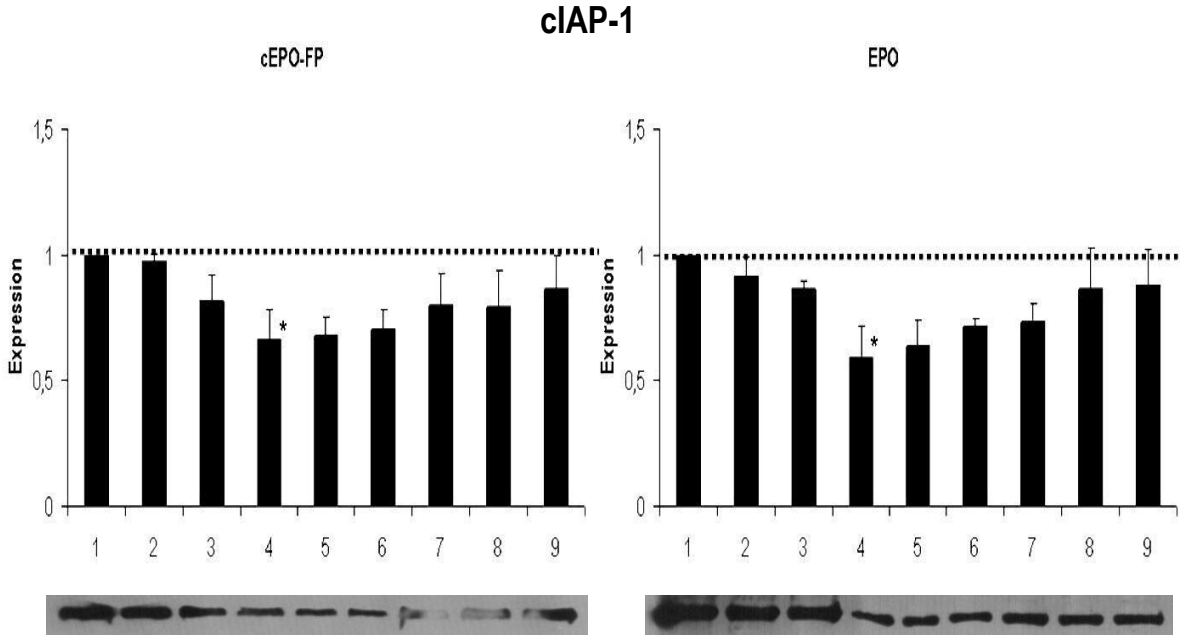

Abbildung 33: cIAP-1- (cellular inhibitor of apoptosis 1)- Expression unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in HEK293-Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische cIAP1- Banden (62 kDa) im Western Blot.

Ähnlich der Expression von XIAP sinkt auch die des zweiten untersuchten IAPs, cIAP-1 unter hypoxischen Bedingungen ab. Im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte eine um 25 bis 50 % verringerte cIAP-1- Expression festgestellt werden. Tendenziell zeigt sich in reoxigenierten gegenüber hypoxisch Zellen eine leicht erhöhte cIAP-1- Expression, die jedoch stets geringer als in Kontrollzellen ist. Unter der Behandlung mit 100 IU zeigen beide Substanzen in reoxigenierten Zellen einen tendenziell positiven Einfluss auf die cIAP-1- Expression. Weder in der cEPO-FP- noch in der EPO- Reihe konnten eindeutige Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Hypoxiezellen beobachtet werden.

Diese Expressionsanalysen auf Proteinebene wurden ebenfalls für die LLC-PK1- Zellen durchgeführt, wobei dieselben Antikörper wie für die humane Zelllinie verwendet wurden. Aufgrund der vergleichsweise hohen Homologie von Mensch und Schwein konnten die meisten Antikörper auch erfolgreich für die Schweinenierenzellen verwendet werden. Die einzigen Ausnahmen sind hierbei die beiden Faktoren SMAC/Diablo (second derived mitochondria activator of caspase) und HIF1α (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 alpha), für die in den Schweinenierenzellen kein Ergebnis

erzielt werden konnte. In den Abbildungen 37 bis 47 sind die Daten der Expressionsanalysen auf Proteinebene (Western Blot) der porcinen LLC-PK1- Zellen dargestellt. Ähnlich wie in den humanen Zellen zeigt sich auch bei den Schweinenierenzellen in keiner der untersuchen Expressionen ein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und mit cEPO-FP bzw. EPO- behandelten normoxischen Kontrollzellen.

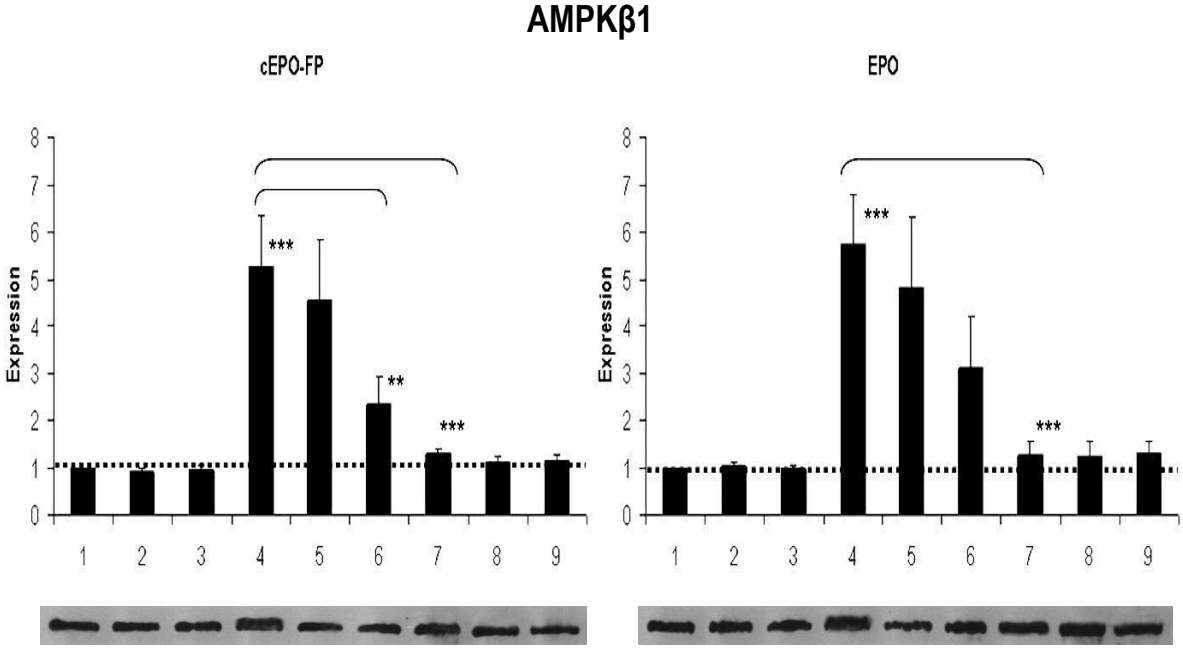

Abbildung 34: Expression der AMP- aktivierten Proteinkinase beta 1 (AMPKβ1) unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in LLC-PK1-Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische AMPKβ1- Banden (37 kDa) im Western Blot.

Ebenso wie für die humanen HEK293- Zellen, wurden die Untersuchungen an den LLC-PK1- Zellen zum Einfluss von cEPO-FP bzw. EPO während einer 24 stündigen Hypoxie in getrennten Versuchsreihen durchgeführt. In beiden Fällen konnte eine 5 bis 6- fach erhöhte AMPKβ1-Expression in unbehandelten, hypoxischen verglichen mit normoxischen bzw. reoxigenierten Zellen nachgewiesen werden. Durch Behandlung mit 100 IU cEPO-FP verringert sich die Expression der AMP- aktiverten Proteinkinase in Hypoxiezellen auf etwa das Zweifache des Kontrollwerts. Dieser Trend ist ebenfalls in der EPO- Reihe erkennbar. Es zeigt sich ein tendenzieller,

konzentrationsabhängiger Rückgang der AMPK β1- Expression in Hypoxiezellen unter EPO- Gabe. Innerhalb der Gruppe der reoxigenierten Zellen konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden.

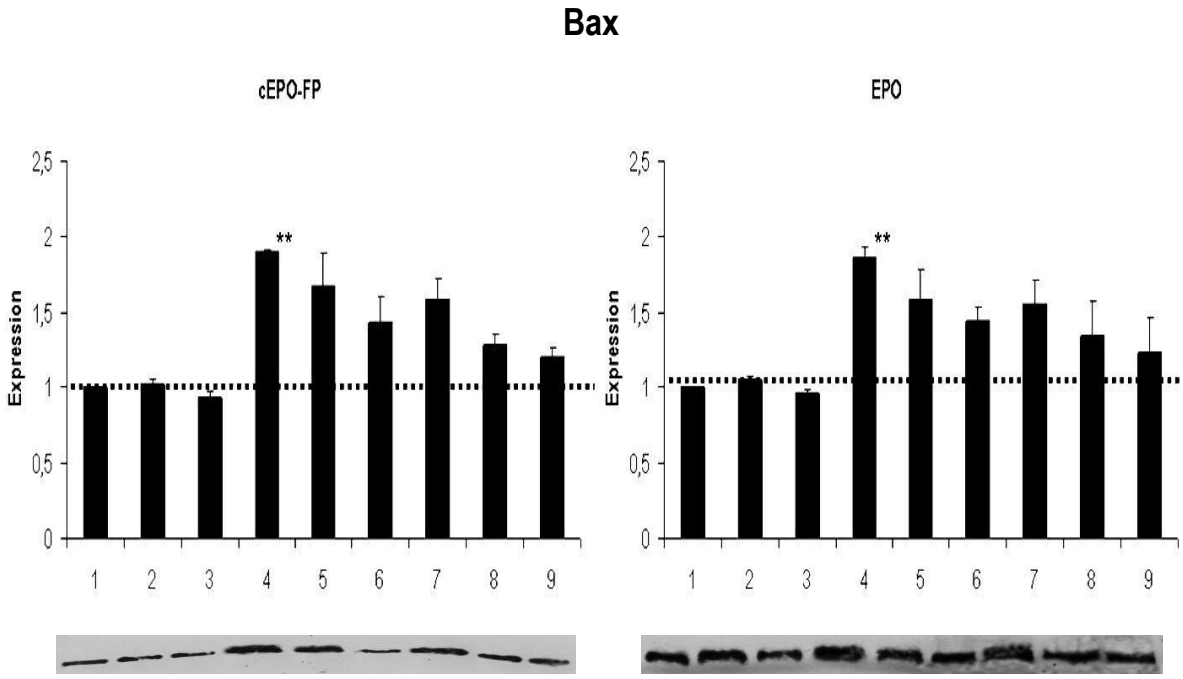

Abbildung 35: Expression des Faktors Bax (Bcl-2-associated-X protein) unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in LLC-PK1-Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische Bax- Banden (20 kDa) im Western Blot.

Bei den Untersuchungen zu Expression des ‚Bcl-2-associated-X- Proteins' Bax konnten ebenfalls Unterschiede nach einer 24 stündigen Hypoxiephase beobachtet werden. In beiden Versuchsreihen wurde eine etwa 2-fach erhöhte Bax- Expression nach der Hypoxiephase sowie ein tendenzielle, konzentrationsabhängiger Rückgang dieser Expression nach Gabe der jeweiligen Substanz nachgewiesen. Die Bax- Expression nach 24 h Reoxigenierung liegt in beiden Versuchsreihen deutlich über dem Kontrollniveau, jedoch stets unterhalb der Expression unbehandelter Hypoxiezellen. Weiterhin ist auch in der Gruppe der reoxigenierten Zellen eine konzentrationsabhängige Verringerung der Bax- Expression durch Behandlung mit der jeweiligen Substanz erkennbar.

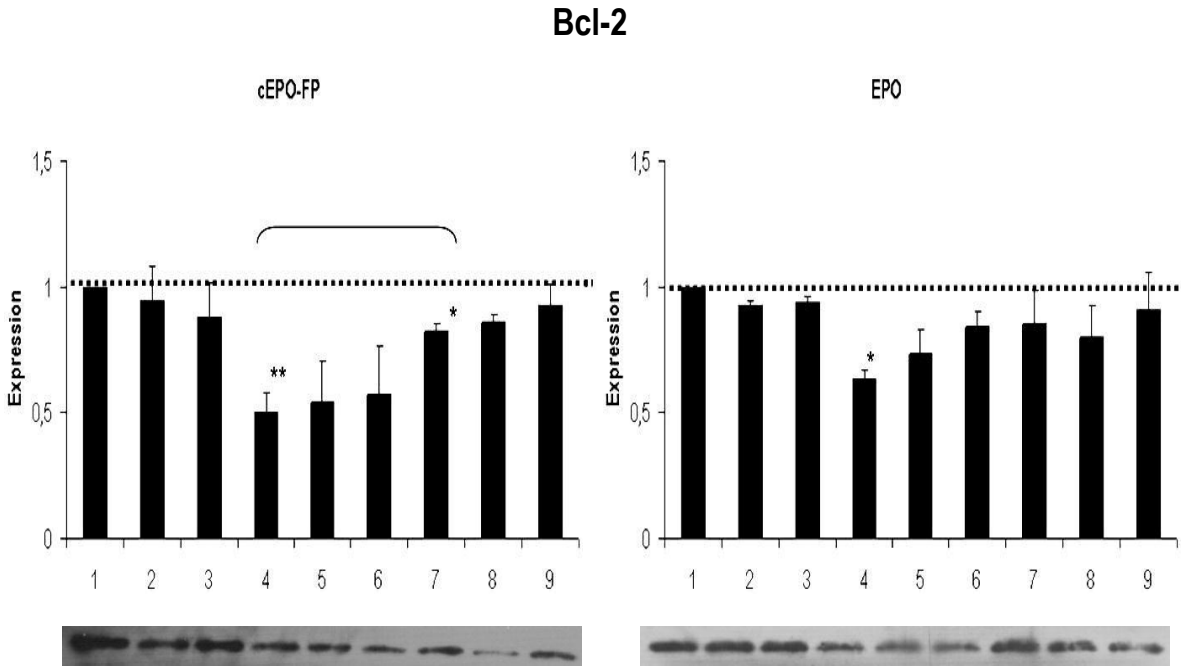

Abbildung 36: Expression des B-cell lymphoma-related protein 2 (Bcl-2) unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in LLC-PK1-Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische Bcl-2- Banden (28 kDa) im Western Blot.

Entgegen der Expression des Faktors Bax, sinkt die Bcl-2- Expression nach 24 h Hypoxie auf etwa die Hälfte des ursprünglichen Wertes. Hier zeigte sich eine tendenzielle Verbesserung durch die Behandlung mit EPO. Die Gabe von cEPO-FP scheint hingegen keinen Einfluss auf die Expression des B-cell lymphoma-related Proteins zu haben. In beiden Versuchsreihen konnte zudem verglichen mit 24 h Hypoxie eine deutliche Zunahme der Bcl-2- Expression nach 24 h Reoxigenierung nachgewiesen werden. Jedoch zeigten sich weder in der cEPO-FP- noch in der EPO- Reihe Unterschiede innerhalb der Gruppe der reoxigenierten Zellen.

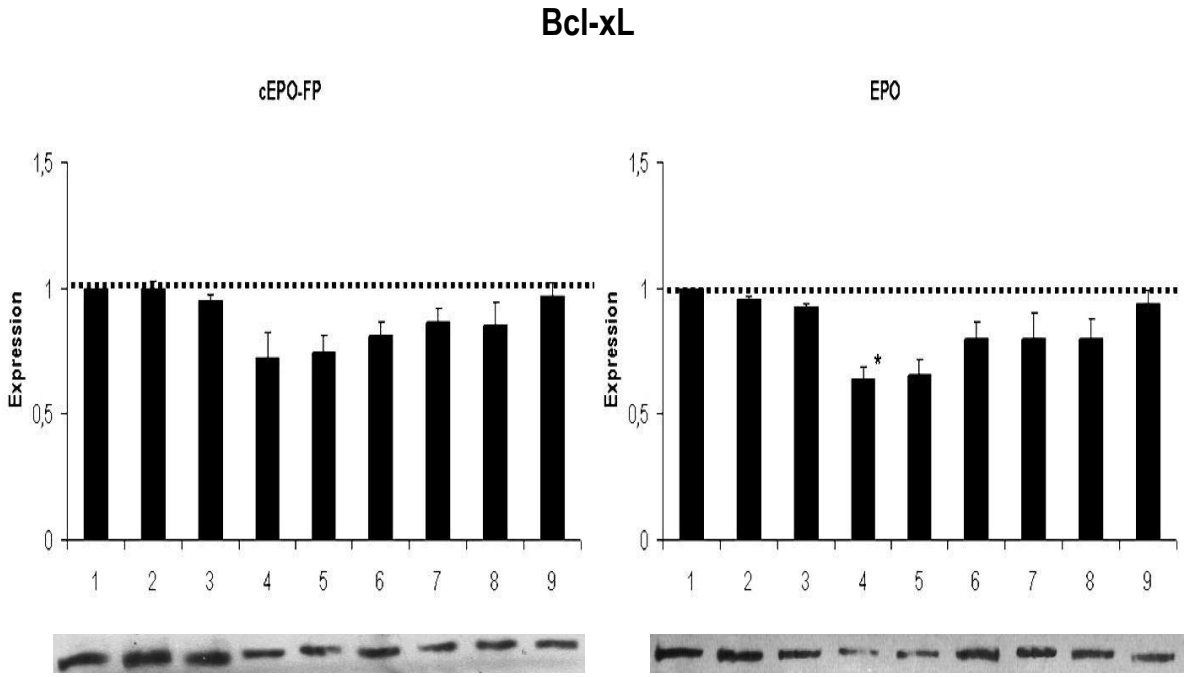

Abbildung 37: Expression des B-cell lymphoma-extra large protein (Bcl-xL) unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in LLC-PK1-Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische Bcl-xL- Banden (30 kDa) im Western Blot.

Ein weiteres antiapoptotisch wirkendes Protein der Bcl-2- Familie ist das ‚B-cell lymphoma-extra large Protein' (Bcl-xL). Auch bei diesem Protein zeigte sich in der EPO- Reihe eine Reduktion der Expression nach 24 h Hypoxie sowie eine tendenzielle Verbesserung unter Behandlung mit 100 IU EPO. In der cEPO-FP- Reihe zeigten sich kein vollkommen eindeutigen Ergebnisse. In beiden Versuchsreihen ist jedoch ein Anstieg der Bcl-xL- Expression nach der Reoxigenierungsphase erkennbar, wenngleich sich keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben dieser Gruppe erkennen ließen.

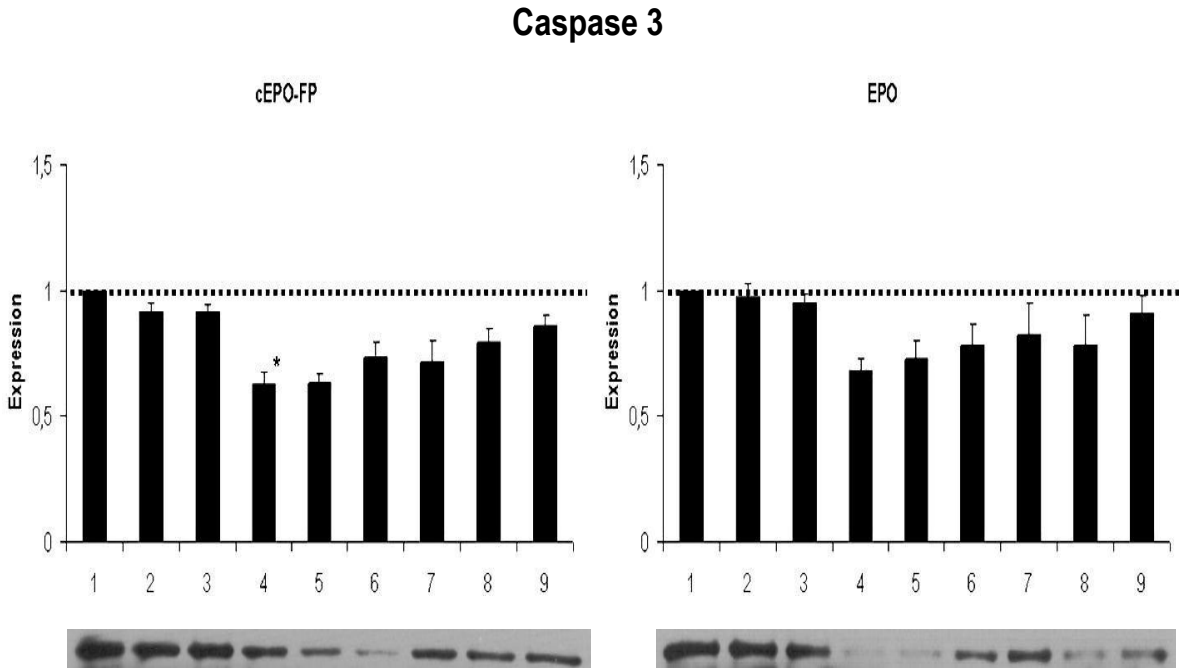

Abbildung 38: Expression der Caspase 3 unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in LLC-PK1- Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische Caspase 3- Banden (35 kDa) im Western Blot.

Betrachtet man die Expression der Caspase 3 in hypoxische verglichen mit normoxischen Zellen, zeigt sich eine im Schnitt auf etwa 50 bis 60 % reduzierte Expression, die sowohl unter cEPO-FP bzw. EPO- Behandlung keine signifikante Erholung, d.h. Steigerung erfährt. Reoxigenierte Zellen zeigten ebenso keine signifikante Verbesserung unter Substanzgabe.

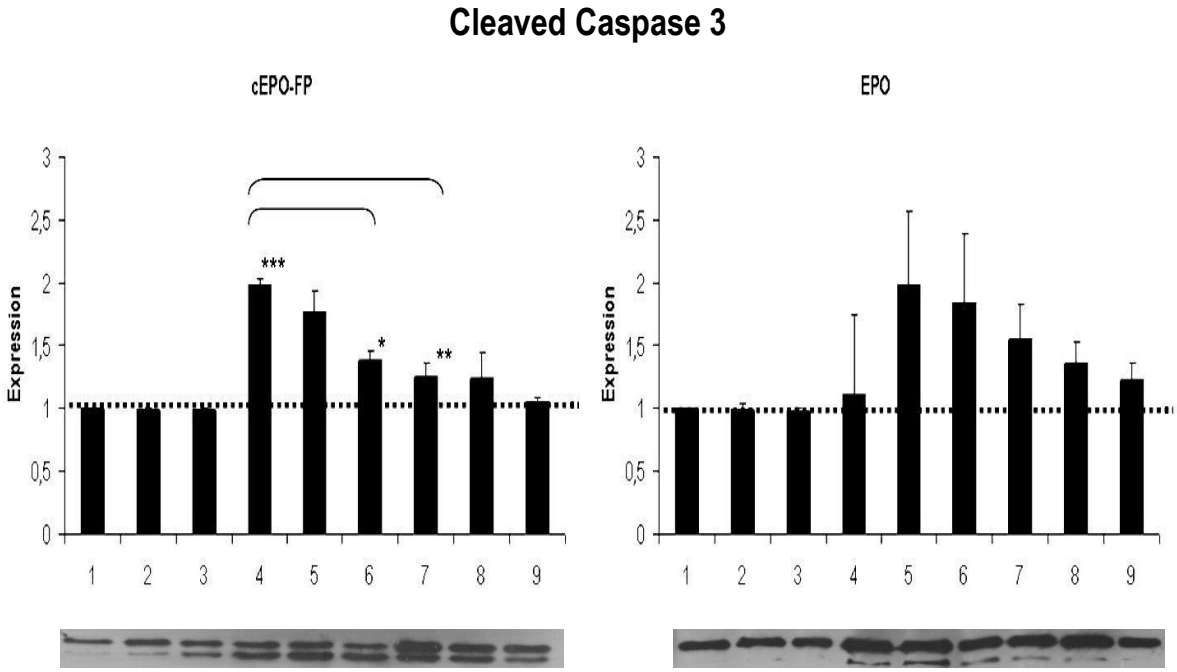

Abbildung 39: Expression der cleaved Caspase 3 unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in LLC-PK1- Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische cleaved Caspase 3- Banden (19 un d 17 kDa) im Western Blot, wobei es sich bei den 17 kDa- Fragment um das aktive Fragment handelt.

Ähnlich wie bei der humanen Zelllinie konnte jedoch in der cEPO-FP- Reihe eine deutliche Zunahmen der cleaved Caspase 3, dem aktiven Fragment dieser Caspase in unbehandelten, hypoxischen Zellen sowie eine Abnahme der cleaved Caspase 3 bei Gabe von 100 IU cEPO-FP gezeigt werden. Tendenziell zeigt sich ein Rückgang der cleaved Caspase 3 in beiden Versuchsreihen nach 24 h Reoxigenierung sowie eine verstärkte Abnahme unter Einfluss der jeweiligen Substanz. In der EPO- Reihe konnte keine eindeutige Zunahme des aktiven Fragments der Caspase 3 nach 24 h Hypoxie bestätigt werden, jedoch erhöht sich dieser Anteil scheinbar in Hypoxiezellen unter EPO- Gabe sowohl in der geringen (1 IU) als auch in der hohen (100 IU) Konzentration.

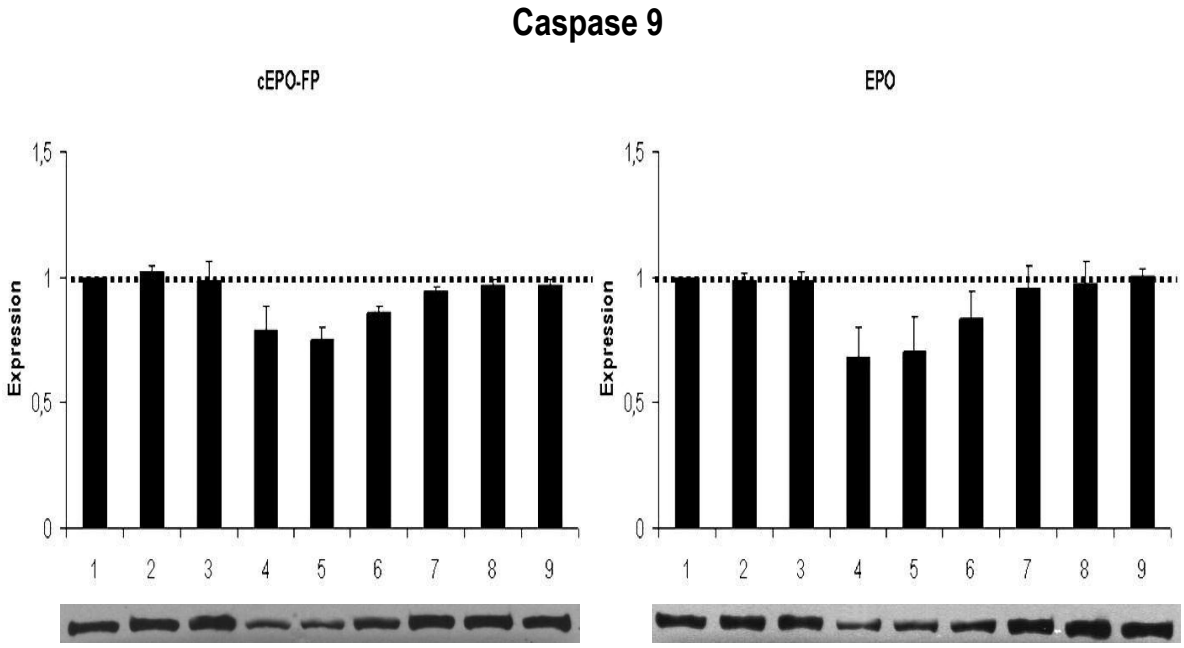

Abbildung 40: Expression der Caspase 9 unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in LLC-PK1- Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische Caspase 9- Banden (47 kDa) im Western Blot.

Ähnlich wie bei der Caspase 3- Expression in HEK293- und LLC-PK1- Zellen sinkt nach 24 h Hypoxie auch die Expression der Caspase 9 nur in geringem Maße ab. Im Gegensatz zur Expression der Caspase 3 in LLC-PK1- Zellen ist hier jedoch in beiden Versuchsreihen eine deutliche Erhöhung der Caspase 9- Expression nach der Reoxigenierungsphase erkennbar. Jedoch konnte in keiner der Untersuchungsgruppen ein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden.

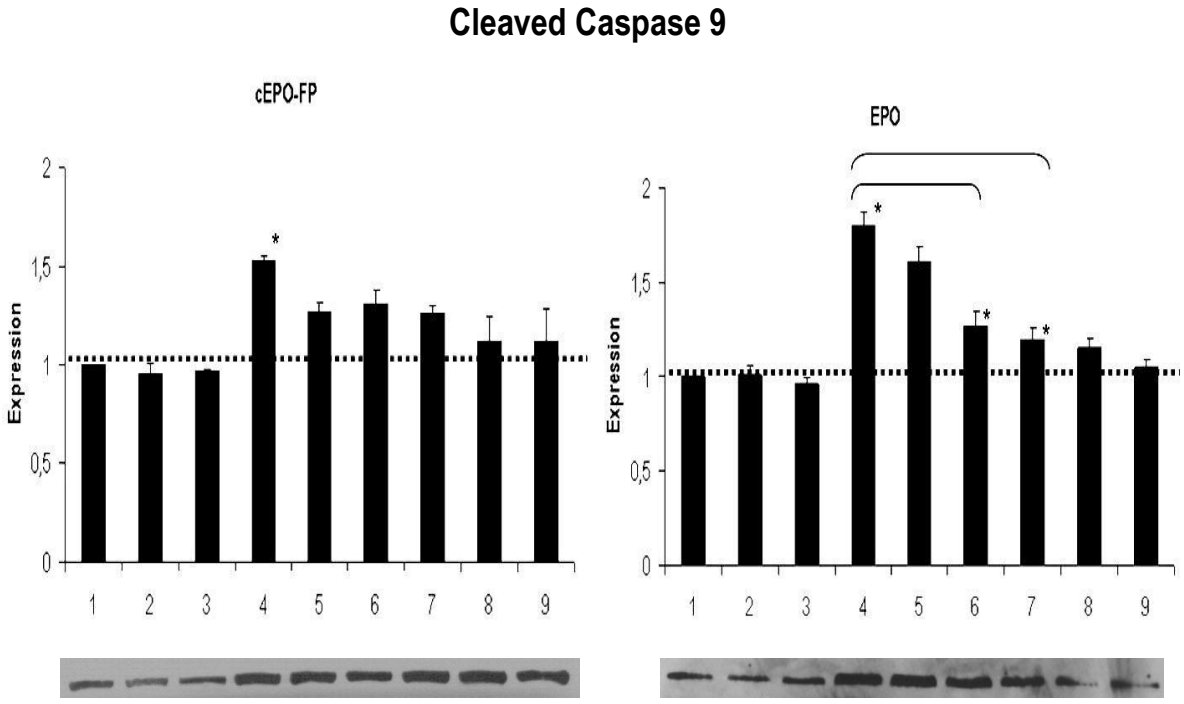

Abbildung 41: Expression der cleaved Caspase 9 unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in LLC-PK1- Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische cleaved Caspase 9- Banden (37 kDa) im Western Blot.

Ebenso wie in HEK293- Zellen findet sich in beiden Versuchsreihen der LLC-PK1- Zellen eine Steigerung der cleaved Caspase 9 nach 24 h Hypoxie. Während in der cEPO-FP- Reihe kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Hypoxiezellen nachgewiesen werden konnte, konnte in der EPO- Reihe ein deutlicher Rückgang des aktiven Fragments der Caspase 9 (cleaved Caspase 9) nach Gabe von 100 IU EPO festgestellt werden. Zusätzlich zeigte sich in dieser Versuchsreihe ein weiterer Rückgang der cleaved Caspase 9 nach der 24 stündigen Reoxigenierungsphase. Weder in der cEPO-FP- noch in der EPO- Reihe konnten Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten, reoxigenierten Zellen beobachtet werden.

Cytochrom c

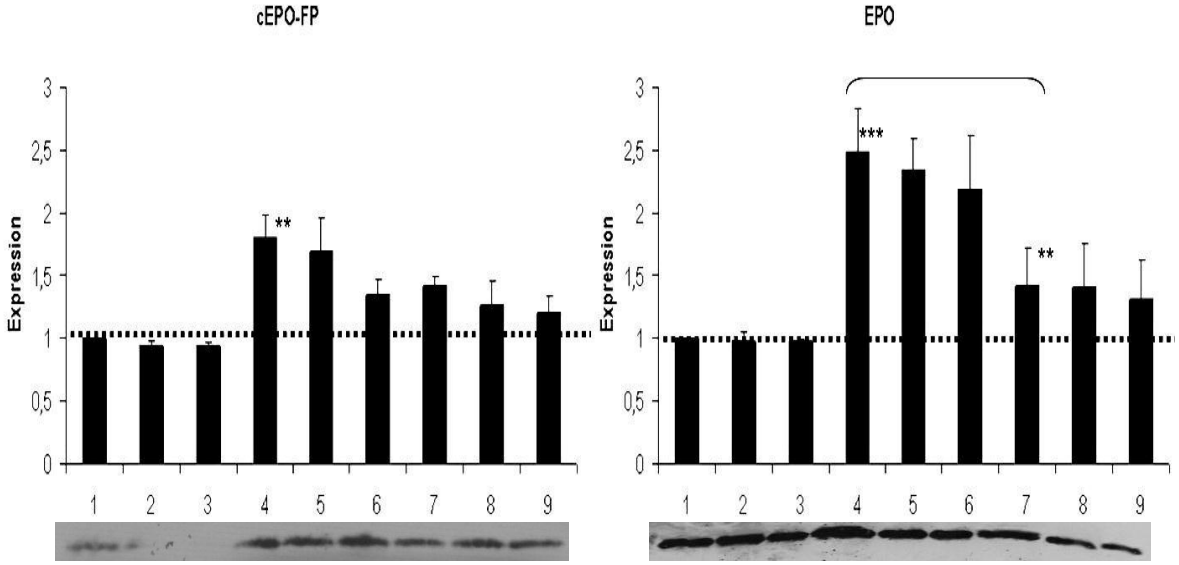

Abbildung 42: Expression des Faktors Cytochrom c (Cyt c) unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in LLC-PK1- Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische Cyt c- Banden (14 kDa) im Western Blot.

Weiterhin wurden Änderungen in der Cytochrom c (Cyt c)- Freisetzung nach 24 stündiger Hypoxie festgestellt. In beiden Versuchsreihen konnte in hypoxischen Zellen eine etwa 2-fach erhöhte Menge an Cyt c nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch keine Verminderung dieses Faktors in Hypoxiezellen durch Behandlung mit einer der beiden Substanzen. Sowohl in der cEPO-FP- als auch in der EPO- Reihe liegt in reoxigenierten Zellen ein geringerer Cyt c- Anteil als in reoxigenierten Zellen vor, wobei in keiner der beiden Versuchsreihen ein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen auftrat.

Weiterhin unterscheiden sich die Werte zwischen den humanen und den Schweinenierenzellen im Allgemeinen voneinander. Beispielsweise konnte z.B. in den HEK293- Zellen ein bis zu 12- fach erhöhter Anteil an Cytochrom c nach 24 h Hypoxie festgestellt werden.

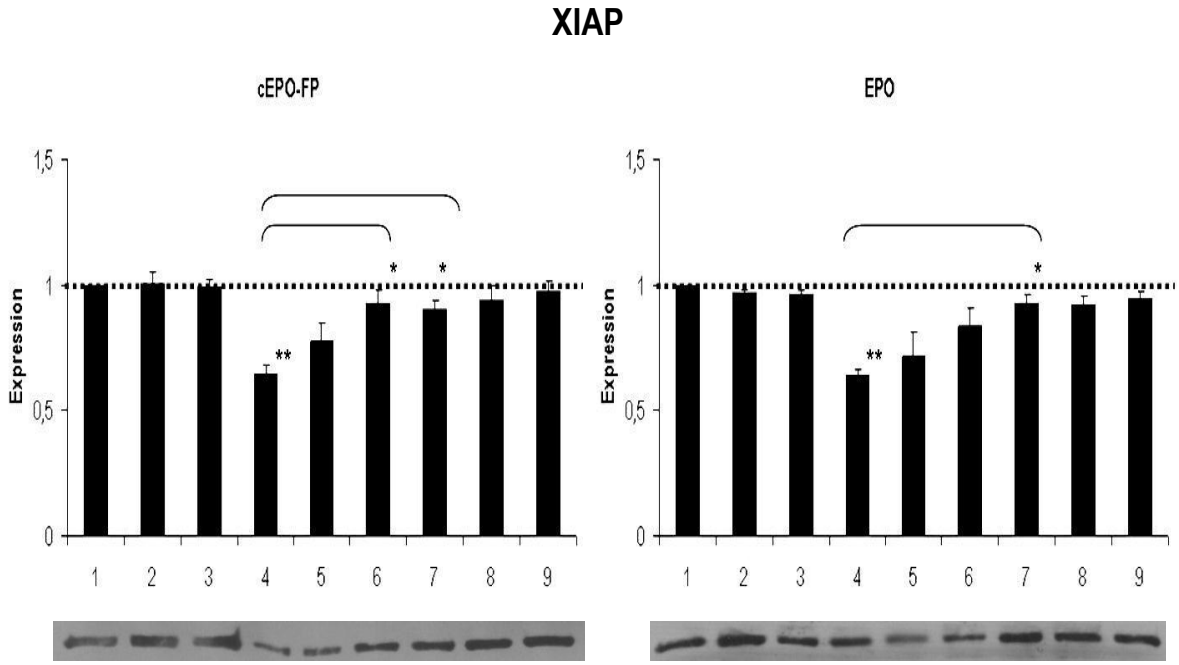

Abbildung 43: XIAP- (X- linked inhibitor of apoptosis)- Expression unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in LLC-PK1-Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische XIAP- Banden (53 kDa) im Western Blot.

Die Expression des ‚X-linked inhibitor of apoptosis' (XIAP) verhält sich in beiden Versuchsreihen ähnlich. Nach 24 h Hypoxie konnte eine deutliche Reduktion der Expression auf etwa die Hälfte der Werte in Kontrollzellen nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich eine deutliche Verbesserung nach Behandlung mit 100 IU cEPO-FP (signifikant) bzw. EPO (tendenziell). Ebenso konnte eine deutlich erhöhte XIAP- Expression nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase festgestellt werden, wobei sich innerhalb dieser Gruppe weder in der cEPO-FP- noch in der EPO- Reihe Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zeigten.

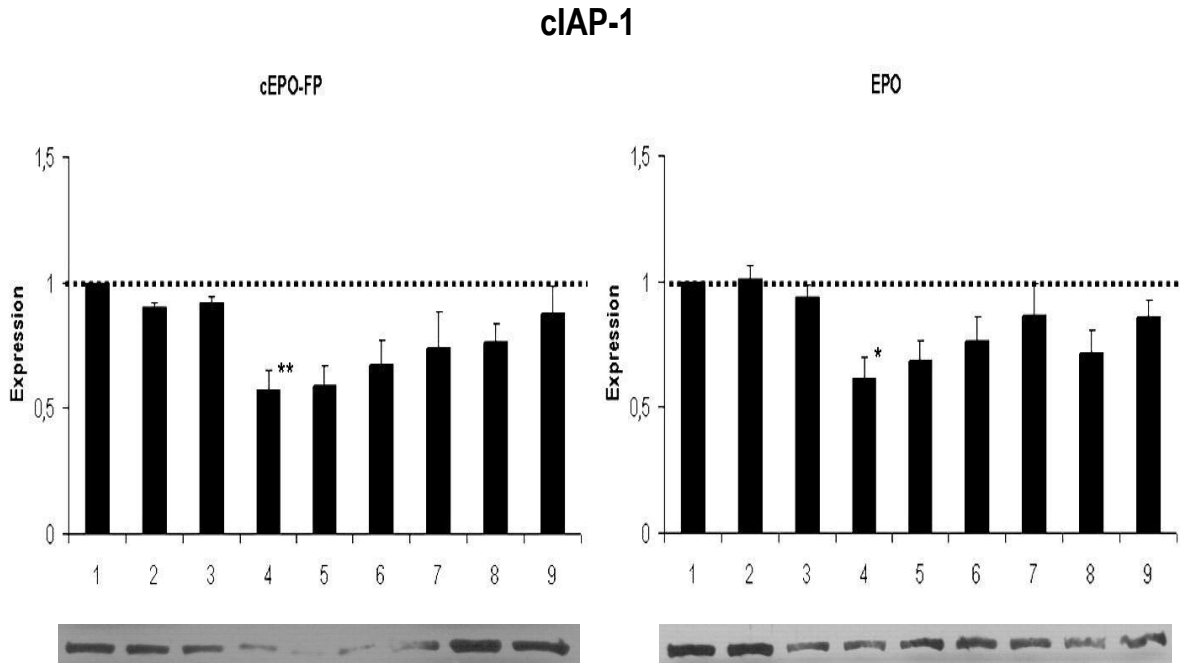

Abbildung 44: cIAP1- (cellular inhibitor of apoptosis 1)- Expression unter Behandlung mit carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP; links) bzw. nativem Erythropoetin (EPO; rechts) in LLC-PK1-Zellen. Bestimmung in normoxischen Kontrollzellen (Ko-; 1-3), in hypoxischen Zellen (24/0; 4-6) und in Zellen nach 24 h Reoxigenierung (24/24; 7-9)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Unten: Exemplarische cIAP1- Banden (62 kDa) im Western Blut.

Ähnlich wie bei der Expression des Faktors XIAP konnte nach 24 stündiger Hypoxiephase ebenfalls einer Verminderung der Expression eines weiteren IAPs, dem ‚cellular inhibitor of apoptosis 1' (cIAP1) nachgewiesen werden. Tendenziell lässt sich eine leicht verbesserte cIAP-1- Expression in Hypoxiezellen nach cEPO-FP- bzw. EPO- Gabe erkennen. In beiden Versuchsreihen konnte eine erhöhte Expression dieses Faktors in reoxigenierten gegenüber hypoxischen Zellen bestimmt werden. Jedoch konnte keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten reoxigenierten Zellen erfasst werden.

Proliferation

Neben den Analysen zur Proteinexpression wurden zudem die Effekte einer cEPO-FP- bzw. EPO-Behandlung von normoxischen, hypoxischen und reoxigenierten Zellen auf das Proliferationsvermögen und die Aktivierung der Caspase 3 und 7 mit Hilfe von Vitalitäts- Assays auf Lumineszenzbasis bestimmt.

In Abbildung 48 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zum Proliferationsvermögen unter EPO- (A) bzw. cEPO-FP- Einfluss (B) in normoxischen, hypoxischen und reoxigenierten HEK293- Zellen dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen normoxischen Kontrollzellen (1: Ko-) und unbehandelten hypoxischen Zellen (4: 24/0) sind mit dem Symbol „§“ ($p < 0,05$; RM Anova on Ranks Test) gekennzeichnet, während Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen mit dem Symbol „#“ ($p < 0,001$; Signed Rank Test) bezeichnet sind.

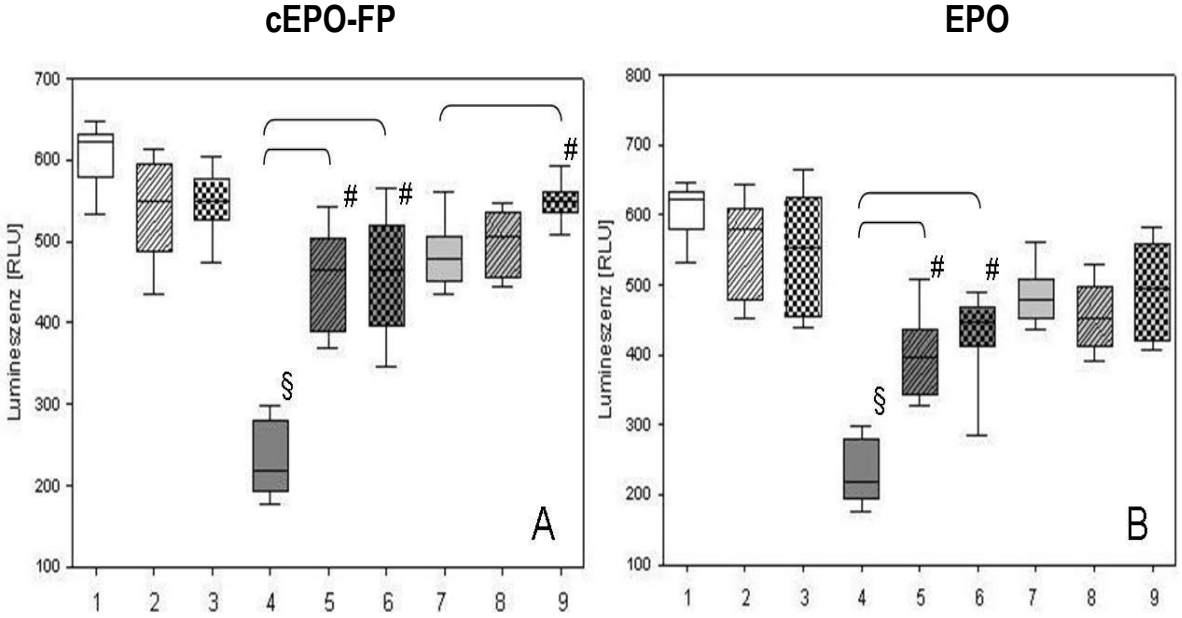

Abbildung 45: Proliferation in HEK293- Zellen unter Einfluß von carbamyliertem Erytropoetin (cEPO-FP ; A) und nativem Erythropoetin (EPO; B)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Sowohl bei der Behandlung mit cEPO-FP als auch mit EPO zeigen sich erwartungsgemäß keine Unterschiede in den normoxischen Kontrollzellen. Nach 24 h Hypoxie sinkt das Proliferationsvermögen in beiden Versuchsreihen auf etwa ein Drittel des Ursprungswertes der Kontrollzellen ab. Unter Einfluss beider Substanzen, sowohl in der geringen (1 IU) als auch in der hohen (100 IU) Konzentration, zeigt sich ein gesteigertes Proliferationsvermögen der HEK293-Zellen. Weiterhin konnte in beiden Versuchsreihen eine verbesserte zelluläre Proliferation nach 24 stündiger Reoxigenierung erfasst werden. Während sich in der EPO- Reihe hierbei keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten, reoxigenierten Zellen zeigen, konnte in der cEPO-FP- Reihe eine signifikant gesteigerte Proliferation in reoxigenierten Zellen mit Behandlung von 100 IU cEPO-FP bestimmt werden.

Der Einfluss von cEPO-FP bzw. EPO auf das Proliferationsvermögen der Zellen unter normoxisch und hypoxischen Bedingungen sowie nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase wurde weiterhin an

der Zelllinie LLC-PK1 untersucht. Nachstehende Abbildung 49 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Zelllinie.

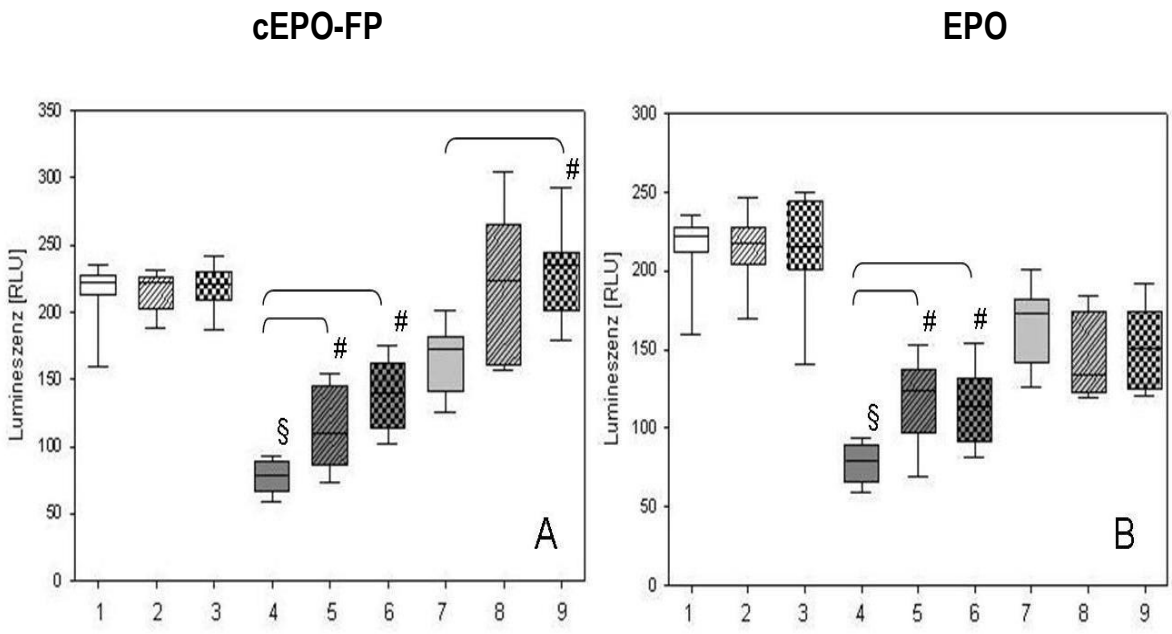

Abbildung 46: Proliferation in LLC-PK1- Zellen unter Einfluss von carbamyliertem Erytropoetin (cEPO-FP ; A) und nativem Erythropoetin (EPO; B)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Genau wie in den HEK293- Zellen konnte auch bei dieser Zelllinie kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten normoxische Kontrollzellen festgestellt werden. Ebenso weisen die Zellen nach 24 h eine deutliche Verringerung der Proliferation auf, bei der sich durch Behandlung mit cEPO-FP bzw. EPO in der geringen (1IU) sowie in der hohen (100 IU) eine signifikante Verbesserung der Proliferationsraten zeigt. Eine weiter Verbesserung der Proliferation gegenüber hypoxischen Zellen konnte in reoxigenierten Zellen beobachtet werden, jedoch ebenfalls ohne signifikante Unterschiede in den reoxigenierten Zellen mit EPO- Behandlung. Im Gegensatz dazu konnte ein gesteigertes Proliferationsvermögen in reoxigenierten Zellen ebenfalls nach Behandlung mit 100 IU cEPO-FP nachgewiesen werden.

Caspase 3/7- Aktivierung

Entsprechend zu den Bestimmungen des Proliferationsvermögens der Zellen unter Einfluss von cEPO-FP und EPO auf normoxische, hypoxische und reoxigenierte Zellen, wurde die Aktivierung der

Caspasen 3 und 7 untersucht. Abbildung 50 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen in HEK293- Zellen.

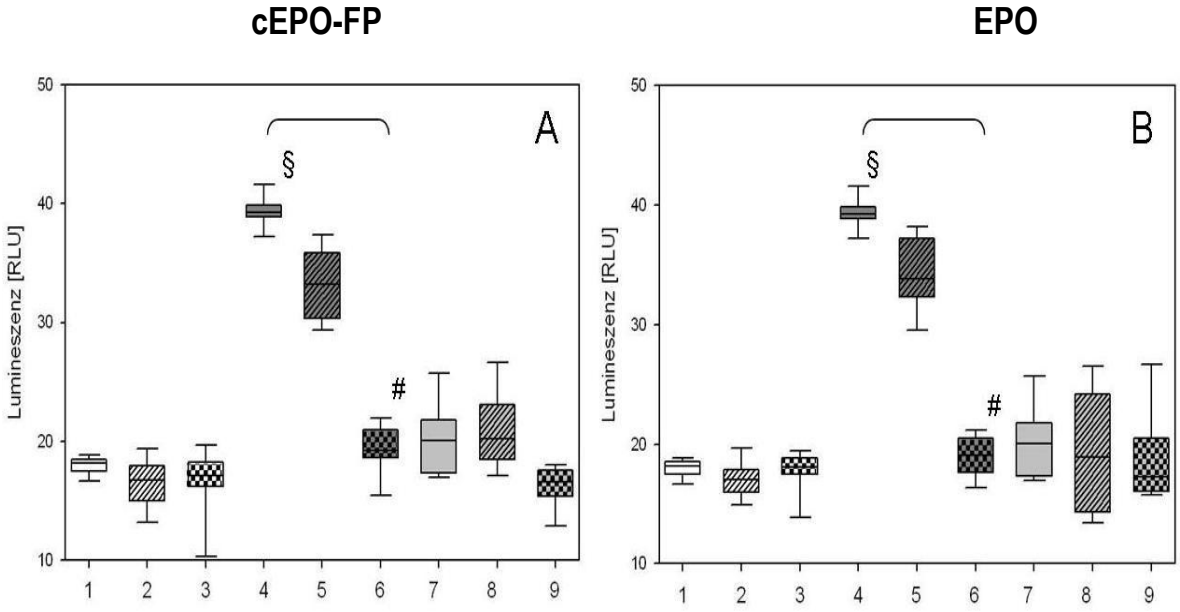

Abbildung 47: Caspase 3/7 Aktivierung in HEK293- Zellen unter Einfluss von carbamyliertem Erytropoetin (cEPO-FP ; A) und nativem Erythropoetin (EPO; B)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Erneut zeigen sich weder unter Einfluss von cEPO-FP noch unter dem von EPO Unterschiede in der Aktivierung der Caspase 3 und 7 der normoxischen Kontrollzellen. Nach 24 h Hypoxie konnte in beiden Versuchsreihen eine signifikant erhöhte Caspase 3/7- Aktivierung gemessen werden. Weiterhin konnte sowohl unter cEPO-FP- als auch unter EPO- Einfluss (jeweils 100 IU) eine signifikant verringerte Aktivierung der beiden untersuchten Caspasen nachgewiesen werden. Nach der Reoxigenierungsphase nimmt die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in beiden Versuchsreihen ab, ohne dass ein Einfluss einer der beiden untersuchten Substanzen festgestellt werden konnte.

Genau wie die Untersuchungen zum Proliferationsvermögen der Zellen wurde auch die Aktivierung der beiden Caspase 3 und 7 in beiden verwendeten Zelllinien untersucht. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen an den LLC-PK- Zellen sind in Abbildung 51 dargestellt.

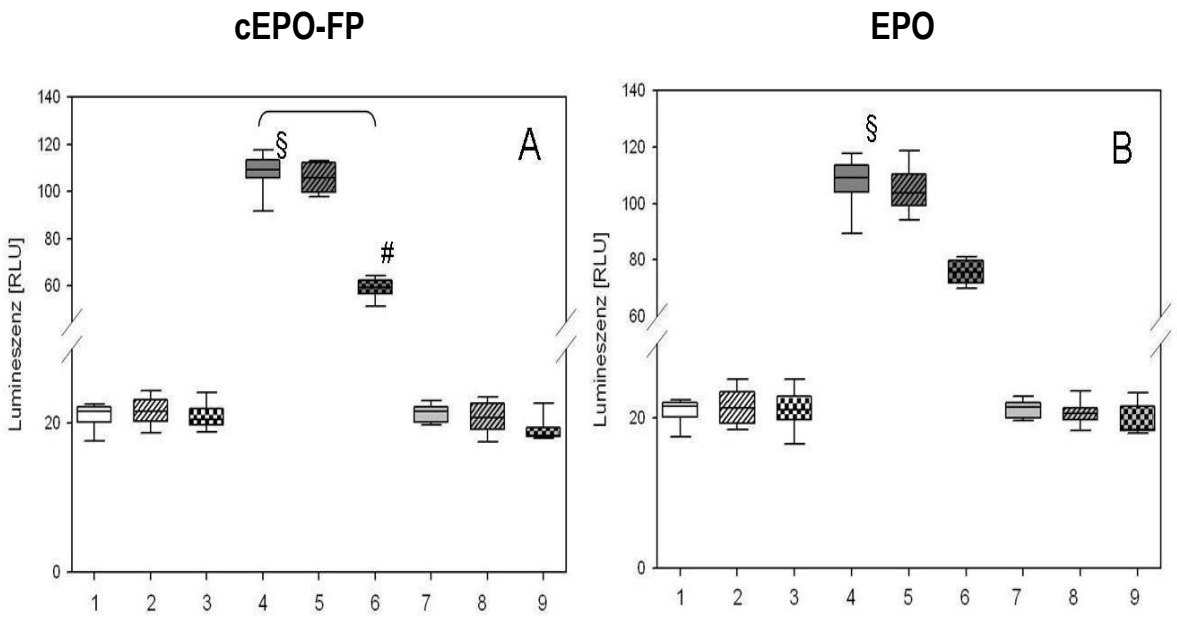

Abbildung 48: Caspase 3/7- Aktivierung in LLC-PK1- Zellen unter Einfluss carbamyliertem Erytropoetin (cEPO-FP ; A) und nativem Erythropoetin (EPO; B)

1: Ko-	**2: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**3: Ko- +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
4: 24/0	**5: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**6: 24/0 +cEPO-FP bzw. EPO 100 IU**
7: 24/24	**8: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO 1 IU**	**9: 24/24 +cEPO-FP bzw. EPO100 IU**

Auch bei dieser Zelllinie konnte kein Einfluss von cEPO-FP oder EPO auf die Aktivierung der Caspase 3 und 7 in normoxischen Kontrollzellen festgestellt werden. In beiden Versuchsreihen zeigt sich jedoch erneut eine signifikant erhöhte Caspase 3/7- Aktivierung nach der 24 stündigen Hypoxiephase. Während in der cEPO-FP- Reihe eine signifikant verringerte Aktivierung der Caspasen unter Gabe von 100 IU cEPO-FP erreicht werden konnte, konnte in der EPO- Reihe eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Verminderung der Caspasen- Aktivierung beobachtet werden. Sowohl in der cEPO-FP- als auch in der EPO- Versuchsreihe wurden nach 24 h Reoxigenierung eine deutlich verminderte Aktivierung der Caspasen auf nahezu Kontrollniveau nachgewiesen. Beide Substanzen zeigten jedoch keinen Einfluss in der Reoxigenierungsgruppe.

4. Diskussion

Ein besseres Verständnis der Entstehung und Entwicklung sowie der Behandlung von Ischämie/Reperfusion (I/R) bzw. Hypoxie/Reoxigenierung bedingten Schäden besonders in Nierenzellen ist vor allem aus klinischer Sicht von größter Relevanz. In den letzten Jahren haben vor allem tierexperimentelle Studien, wie z.B. Studien zur Effekten unterschiedlicher Substanzen wie H_2S (Blackstone et al., 2005, Simon et al., 2008/1) oder EPO (Simon et al., 2008/2) während I/R-Ereignissen das Verständnis des I/R- Schadens deutlich erweitert. Aus diesen Studien lassen sich klinisch relevante Daten gewinnen, jedoch bleiben Lücken in der zellulären und subzellulären I/R-Sequenz offen. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit in renalen Zelllinien von Mensch (HEK293) und Schwein (LLC-PK1) ein I/R im Sinne einer Hypoxie/Reoxigenierung simuliert werden. Zielsetzung der Arbeit war daher zum einen die Etablierung einer nachweislich zuverlässigen Hypoxiesequenz in den zu untersuchenden Zelllinien, zum anderen sollte der Einfluss von Erythropoetin (EPO) bzw. einem EPO- Derivat (carbamyliertes EPO; cEPO-FP) während der Hypoxie analog zum Großtiermodell untersucht werden. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit dem Großtiermodell sowie aufgrund der Tatsache, dass bereits bekannt ist, dass der proximale Tubulus beim Hypoxie- induzierten akuten Nierenversagen (akute, tubuläre Nekrose; ATN) am schwersten geschädigt wird (Kribben et al., 1999; Bonventre et al., 1998, Nissenson 1998), wurden in dieser Arbeit neben den humanen Zellen auch die porcine Zelllinie LLC-PK1 verwendet, da diese Zellen wesentliche Merkmale proximaler Tubuluszellen aufweisen (Toutain und Morin, 1992).

4.1. Entwicklung und Evaluation des Hypoxiemodells

4.1.1. Bestimmung des O_2- Gehalts

Um die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff (O_2) zu manipulieren, wurden verschiedene Ansätze wie in der Literatur beschrieben durchgeführt, um die reguläre O_2- Versorgung der Zellen über verschiedene Zeiträume zwischen 15 min und 72 h zu unterbinden. Bei Variante A der Mineralölüberschichtung (Vanheel et al., 1989; Henry et al., 1996; Meldrum et al., 2001) konnten die Zellen durch Waschen in PBS nicht vollständig aus dem Öl gelöst werden, so dass auf diese Weise nicht ausreichend viele Zellen für die Präparation von Gesamtprotein isoliert werden konnten. In der abgeänderten Variante B, konnten zwar genügend Zellen für die Proteinisolierung gewonnen werden, jedoch konnte kein Nachweis einer Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 alpha (HIF1α) bzw. eine Aktivierung der AMP aktivieren Proteinkinase beta 1 (AMPKβ1) erbracht

werden. Zusätzlich wurde der O_2- Gehalt im Kulturmedium mit Hilfe eines Blutgasanalysesystems bestimmt. Dieses Gerät konnte für die Messungen herangezogen werden, obwohl es auf die Bestimmung von Blutwerten kalibriert war, da immer normoxisches Kontrollmedium mit überschichtetem Medium (Mineralölüberschichtung nach Variante B) verglichen wurde. Auf diese Weise konnten der O_2- Gehalt von überschichtetem Medium relativ zum normoxischen Kontrollmedium ermittelt werden. Der O_2- Gehalt sinkt im überschichteten Medium nur sehr langsam und auch nach langen (48 bis 72 h) Überschichtungszeiträumen nicht signifikant ab. Sehr unwahrscheinlich ist, dass die Zellen trotz Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels nur geringe Mengen O_2 veratmen und daher der O_2- Gehalt über die Zeit nicht merklich absinkt. Viel wahrscheinlicher erscheint die Möglichkeit, dass die Mineralölschicht, obwohl optisch dicht erscheinend, das Medium über die vergleichsweise große Fläche der Kulturflasche nicht vollkommen dicht gegenüber der O_2- haltigen Atmosphäre abschließt und somit zumindest einen minimalen Gasaustausch ermöglicht. Dies ist zudem eine Möglichkeit, warum in diesen Zellen keinerlei HIF1α-Aktivität nachgewiesen werden konnte, da der Transkriptionsfaktor HIF1α sauerstoffabhängig stabilisiert wird (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Zellen können Veränderungen der Verfügbarkeit von Sauerstoff mit Hilfe einer Gruppe von speziellen Enzymen, den Proly-4-Hydroxylasen (PHDs) wahrnehmen. PHDs vermitteln direkt eine zelluläre Antwort auf eine verringerte Verfügbarkeit von Sauerstoff, indem sie die alpha- Untereinheit des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF) destabilisieren (Semenza, 2007). Unter normoxischen Bedingungen wird die HIF1α zwar permanent transkribiert und translatiert, jedoch führt, nach Ubiquitinierung, die Bindung des von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) zum proteasomalen Abbau von HIF1α (Maxwell et al., 1999; Hon et al., 2002, Min et al., 2002, Schofield und Ratcliffe, 2004). Daher wurde zur Evaluation eines geeigneten Hypoxiemodells in dieser Arbeit nicht nur der Nachweis einer im Vergleich zur Normoxie verringerten O_2- Umgebung der Zellen, sondern auch einer signifikant erhöhten HIF1α- Expression in den Zellen vorausgesetzt. Beide Voraussetzungen konnten mit dem Modell der Mineralölüberschichtung, das z.B. bereits von Vanheel, Henry und Meldrum (Vanheel et al., 1989; Henry et al., 1996; Meldrum et al., 2001) beschrieben war, weder in der originalen Variante noch der abgewandelten Variante B nachgewiesen werden. Dass keinerlei HIF1α- Expression in diesen Versuchen nachgewiesen werden konnte, könnte jedoch auch daran liegen, dass es sich bei HIF1α um einen vergleichsweise schwer nachzuweisenden Faktor handelt und beim Experimentator zum damaligen Zeitpunkt möglicherweise noch nicht genügend Erfahrungen bezüglich eines optimalen HIF1α- Nachweises vorhanden waren. Tatsache ist jedoch, dass effektiv weder eine Verringerung des O_2- Gehalts in der Umgebung der Zellen, noch HIF1α- Expression bzw. AMPKβ1-Aktivierung in den Zellen nachgewiesen werden konnte. Daher wurde der Ansatz der

Mineralölüberschichtung für unsere Zellen als ungeeignete Methoden zur Hypoxieinduktion ausgeschlossen.

In einem weiteren Ansatz wurde wie in einer Arbeit aus dem Jahre 2004 beschrieben (Hotter et al.; 2004) versucht, den O_2- Gehalt über die Atmosphäre im Inkubator zu manipulieren. Hierzu wurden die für 1 bis 72 h bei 1 % O_2 und 20 % CO_2 (bal N_2) inkubiert, wobei der Brutschrank etwa 20 min benötigte, um auf diese Werte reguliert zu werden. In diesem Ansatz konnte durchaus eine Verringerung des O_2- Gehalts auf etwa 30 % nach 24 bis 48 h Hypoxiezeit gemessen werden. Ein direkter Nachweis von O_2- Mangel in den Zellen über den Nachweis einer HIF 1α- Expression war mit dieser Methode jedoch ebenfalls nicht möglich, daher wurde auch dieser Ansatz verworfen. Zudem können bei dieser Methode immer nur einzelne Proben, die die gleichen Bedingungen benötigen gemeinsam im vergleichsweise großen Inkubator kultiviert werden. Durch jedes Öffnen und Schließen des Inkubators ändert sich die Atmosphäre im Brutschrank zumindest kurzzeitig durch Durchmischung mit einströmender Außenluft. Es handelt sich daher um ein relativ störanfälliges System, bei dem die O_2- Zufuhr nur schwer reguliert bzw. die O_2- Limitierung nur schwer gewährleistet werden kann. Daher wurde nach einer weiteren Möglichkeit gesucht, Hypoxie durch Manipulation des O_2- Gehalts effektiv und stabil zu induzieren.

Im dritten Ansatz wurden die Zellen in einer käuflich erworbenen, standardisierten Hypoxiekammer der Firma StemCell Technology inkubiert. Um das System weiter zu optimieren, wurde zudem getestet, ob durch Entgasen des Kulturmediums ein Hypoxiemedium mit stabil geringem O_2- Gehalt hergestellt werden kann. Das normoxische Kulturmedium wurde wie in Punkt 2.2.3 des Methodenteils durch Unterdruck entgast. In drei voneinander unabhängigen Messreihen konnte nachgewiesen werden, dass nach mindestens 6 wiederholten Entgasungseinheiten der O_2- Gehalt des Mediums stabil auf 15 bis 20 % des ursprünglichen Gehalts gesenkt werden konnte. Alternativ zu dieser Methode wurde versucht, den im Medium gelösten O_2 durch Begasung mit Stickstoff auszuschwemmen. Diese Methode erwies sich ebenfalls als effektiv, da nach durchschnittlich 10 Begasungseinheiten ein um bis zu 80 % geringerer O_2- Gehalt gegenüber normoxischem Kulturmedium bestimmt werden konnte. Letztendlich wurde diese Art der O_2- Reduktion im Kulturmedium in dieser Arbeit nicht verwendet, da sie im Vergleich zum Entgasen mittels Unterdruck deutlich aufwendiger und zeitintensiver war. Zudem war es bei dieser Methode aufgrund des mehrfachen Spritzentauschs weit schwieriger, die Sterilität des Kulturmediums zu wahren. Daher wurde in allen im Weiteren beschriebenen Versuchen ein durch Unterdruck entgastes Medium (Hypoxiemedium) verwendet. Bei den Versuchen zur Effektivität und Stabilität des Kammermodells konnte gezeigt werden, dass nach einer erstmaligen Messung nach 5 min der O_2- Gehalt des Hypoxiemediums in der Kammer im Schnitt bei etwa 38 % im Vergleich zum normoxischen

Kontrollmedium liegt. Nach Entgasen des Mediums lag dieser Wert zwar bereits bei mindestens 20 %, jedoch kommt das Medium durch Verteilen auf die einzelnen Kulturflaschen erneut mit der normalen Luftatmosphäre in Kontakt. Obwohl stets zügig gearbeitet wurde, um diesen Zeitrahmen so kurz wie möglich zu halten, benötigen die Vorgänge vom Entgasen bis zum endgültigen Verschließen und Durchfluten der Kammer einige Minuten, in denen das Medium vermutlich bis zu einem gewissen Grad reoxigeniert wurde. Da die O_2- Bestimmungen alle 5 min durchgeführt wurden, konnte die Änderung des O_2- Gehalts im zeitlichen Verlauf engmaschig aufgezeichnet werden. Nach etwa 60 min liegt der O_2- Gehalt im Medium erneut bei 15 bis 20 % und diese Werte bleiben bis hin zu langen Hypoxiezeiten (bis 72 h) stabil. Dass über einen derart lange Zeitraum noch O_2 nachgewiesen bzw. keine gravierende Änderung des O_2- Gehalts beobachtet werden konnte, könnte daran liegen, dass mit verlängerter Hypoxiezeit der Stoffwechsel der Zellen herunterreguliert wird bzw. in Teilen zum Erliegen kommt. Weiterhin wäre es denkbar, dass die Zellen bei O_2- Mangel von aerober Atmung, bei der die meiste Energie in Form von ATP über die oxidative Phosphorylierung gewonnen wird, auf O_2- unabhängige Glykolyse umschalten können. D.h. die Zellen veratmen keinen Sauerstoff mehr, wobei jedoch auch der Energiegewinn für die Zellen deutlich geringer ist (Rapoport, 8. Aufl.; 1983). Dies würde zudem von den Ergebnissen der Proliferations- Analysen bestätigt, da bei dieser Methode das Proliferationsvermögen der Zellen in Abhängigkeit vom nachweisbaren ATP- Gehalt bestimmt wird. Weiterhin konnte bei Bestimmung der zellulären Respiration ein verringerter Sauerstoffverbrauch hypoxischen Zellen gegenüber normoxischen Kontrollzellen nachgewiesen werden.

Da unter physiologischen Bedingungen nicht der O_2- Gehalt, sondern der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von Bedeutung ist, wurde ursprünglich versucht, den pO_2 im Kulturmedium zu bestimmen. Hierfür stand lediglich ein Blutgasanalysesystem (BGA) zur Verfügung. Übliche BGA- Geräte können den pH- Wert (pH- Glaselektrode), den pO_2 (pO_2- Elektrode nach Clark) sowie den pCO_2 (pCO_2- Elektrode nach Stow- Severinghaus) erfassen. Das Prinzip der pO_2- Messung beruht auf elektrochemischen Reaktionen zwischen der eigentlichen Messelektrode, die aus einem Edelmetall wie Platin oder Gold besteht, einer weiteren Bezugselektrode und der Flüssigkeit. Hierbei ist die Messelektrode von der zu analysierenden Flüssigkeit durch eine semipermeable Membran getrennt (Clark et al., 1956) O_2- Moleküle werden reduziert, sobald sie an die Oberfläche des Edelmetalls gelangen und die damit einhergehende Ladungsverschiebung kann als Strom erfasst werden. Die Größe der auftretenden Ströme ist direkt proportional zur Anzahl der O_2- Moleküle und damit auch zum pO_2. Bei einem typischen Kulturmedium handelt es sich jedoch um eine sehr reichhaltige Flüssigkeit, die alle für die Zellen essentiellen Komponenten, wie Aminosäuren, Vitamine sowie anorganische Salze und Zucker, die aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften zur gemessenen

Stromstärke beitragen können. Beispielsweise wurden in normoxischem Kulturmedium bei 37 °C wiederholt pO_2- Werte größer 230 mmHg gemessen. Um diesen gravierenden, systematischen Fehler zu relativieren, wurden diese Werte in den O_2- Gehalt umgerechnet, wobei normoxisches Kontrollmedium als Referenz verwendet wurde.

Um auch tatsächliche Werte im Hypoxiemedium zu erfassen, wurden zudem oximetrische Messungen mit einem Leihgerät der Firma WTW (Oxi1970i) durchgeführt. Mit diesem Gerät konnten bei Langzeitmessungen neben der Bestimmung des O_2- Gehalts (%) auch die O_2- Konzentration (mg/l) berücksichtigt werden. Bei stabilem Temperaturverlauf konnte bei beiden Parametern eine deutliche Reduktion im Laufe der Hypoxiezeit beobachtet werden, wobei damit gleichzeitig die ursprünglich berechneten Werte tatsächlich messtechnisch erfasst und bestätigt wurden.

Durch Entgasen des Mediums und Kultivierung in der Hypoxiekammer wurde ein stabiles und effektives System zur Manipulation der O_2- Zufuhr entwickelt und damit bestmögliche Voraussetzungen für die Untersuchung von hypoxisch induzierten Schäden in den verwendeten Nierenzelllinien geschaffen. Aufgrund dieser Daten wurde für alle weiteren Versuchsreihen zur Induktion der hypoxisch induzierten Schäden das Kammermodell herangezogen, da mit diesem Modell eine hochwertige Sauerstoffkontrolle gewährleistet werden konnte.

4.1.2. Evaluation des Hypoxiemodells

Um die Effekte des O_2- Mangels in den Zellen nachzuweisen, wurde nach 1, 4, 8, 12, 18, 24 und 48 h Gesamtprotein aus den Zellen isoliert und für Expressionsbestimmungen des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 alpha (HIF1α) sowie der AMP abhängig aktivierten Proteinkinase AMPKβ1 auf Proteinebene eingesetzt. Es zeigte sich im Vergleich zu normoxischen Kontrollzellen erst nach 24 h eine signifikant erhöhte Expression beider Faktoren. Die AMP abhängig aktivierten Proteinkinase mit ihren drei Untereinheiten α, β und γ ist ein hochkonserviertes Protein in Pflanzen und Tieren, das bei der Regulierung zellulärer Energieresourcen von entscheidender Bedeutung ist. AMPKβ1 (37 kDa) wird durch ein erhöhtes AMP/ATP- Verhältnis aufgrund von zellulärem Stress, wie beispielsweise Hitzeschock, Hypoxie oder Ischämie aktiviert. AMP, das von der β- Untereinheit der Proteinkinase erkannt wird, ist ein Abbauprodukt des ATP und damit ein geeigneter Indikator für ATP-, d.h. Energiemangel in der Zelle (Hardie, 2004). Da in den Vorversuchen nachgewiesen werden konnte, dass die Zellen in einem hypoxischen Medium sowie in einer Atmosphäre mit deutlichen O_2- Mangel kultiviert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die Hochregulierung diese Proteins auf eine Hypoxie zurückzuführen ist und nicht z.B. auf ein Hitzeschock- Ereignis in den Zellen. Im Gegensatz zum Transkriptionsfaktor HIF1α, welcher

ausschließlich O_2- abhängig stabilisiert wird, konnte eine signifikant erhöhte AMPKβ1- Expression bereits nach 8 h in HEK293- Zellen sowie nach 12 h Hypoxie in LLC-PK1- Zellen nachgewiesen werden. In anderen Studien (z.B. Fukuyama et al., 2007) konnte eine hypoxie- induzierte Hochregulierung der AMPKβ1- Expression bereits zu früheren Zeitpunkten (2 bis 6 h) gezeigt werden. In diesen Versuchsreihen, in denen die Expression von HIF1α und den AMPK Untereinheiten sowie die zelluläre Proliferation in RPC-C2A- Zellen (aus Zahnmark der Ratte) untersucht wurde, wurden bei Kultivierung im Inkubator als hypoxische Bedingungen 5 % CO_2 und 2 % O_2 verglichen mit 5 % CO_2 und 20 % O_2 (normoxisch) definiert. Diese widersprüchliche Datenlage ist in erster Linie wahrscheinlich auf die unterschiedlichen verwendeten Zelllinien zurückzuführen, wobei auch die verschiedenen Methoden der Hypoxie- Induktion sowie das Nachweisverfahren zur AMPKβ1- Bestimmung Einfluss auf die Ergebnisse haben können.

Da AMPKβ1 als Indikator für energetisch bedingten zellulären Stress, nicht aber spezifisch für O_2-Mangel angesehen werden kann, wurde zudem die Expression des Transkriptionsfaktors HIF1α untersucht. Als eine weitere Bedingung für ein funktionierendes Hypoxiemodell wurde im Vorfeld der Untersuchungen eine im Vergleich zu normoxischen Kontrollzellen signifikant erhöhte HIF1α-Expression vorausgesetzt. HIF1 ist ein heterodimeres Protein, das aus einer α- (120 kDa) und einer β-Untereinheit (91 bis 94 kDa) besteht. Beide Untereinheiten gehören einer Gruppe von Sensorproteinen, die v.a. auf Umwelt- und Entwicklungssignale spezialisiert sind (Gu et al., 2000). Von beiden Untereinheiten ist lediglich die HIF-1α-Untereinheit sauerstoffabhängig reguliert und wird konstitutiv sowohl transkribiert als auch translatiert. Wie bereits bei den Untersuchungen zur Sauerstoffkontrolle erwähnt, wird HIF1α unter normoxischen Bedingungen vom von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) erkannt, ubiquitiniert und als direkte Folge proteasomal abgebaut (Hon et al., 2002; Maxwell et al., 1999; Min et al., 2002; Schofield und Ratcliffe, 2004). Die Stabilität des HIF1-α-Proteins ist daher direkt abhängig von der zellulären O_2- Konzentration, da unter normoxischen Bedingungen permanent die Ubiquitinierung nach vorhergehender Hydroxylierung an zwei Prolin-Resten (Pro402 und Pro564) in der ODD (*oxygen dependent degradation*) Domäne erfolgt. Limitierender Faktor für die verantwortlichen Prolyl-4-hydroxylasen (PHDs) ist molekularer Sauerstoff (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Schofield and Ratcliffe, 2004). Unter hypoxischen Bedingungen wird die Hydroxylierung von HIF1α inhibiert (McNeill et al., 2002; Bardos et al., 2004) und das Protein auf diese Weise stabilisiert. In dieser Arbeit konnte eine von der Hypoxiedauer abhängig gesteigerte Expression dieses Faktors in HEK293- Zellen nachgewiesen werden. Obwohl eine erstmals statistisch signifikant erhöhte Expression des HIF1α- Proteins erstmals nach 18 h gezeigt werden konnte, steigt diese mit nach 24 h und 48 h Hypoxie weiter an. Der Nachweis des HIF1α- Proteins war in den porcinen LLC-PK1- Zellen nicht möglich, was vermutlich auf die

speziesspezifische Aktivität des verwendeten, humanen Antikörpers zurückzuführen ist. Die Herstellung eines individuellen HIF1α- Antikörpers, der für porcine Zellen geeignet ist, war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

HIF1α ist als zellulärer Sauerstoffsensor anzusehen, von dem bekannt ist, dass er unter hypoxischen Bedingungen die 3'-Enhancerregion des EPO- Gens besetzt und auf diese Weise als Transkriptionsfaktor die Transkription des EPO- Gens einleitet (Semenza et al., 1992). Genauer gesagt, müssen für eine erfolgreiche Transkriptionsinitiation zuvor die beiden Untereinheiten HIF1α und HIF1β, wobei letztere nicht sauerstoffabhängig reguliert ist, dimerisieren und in dieser Form an den HRE (hormone response elements) ihrer Zielgene, z.B. an das EPO- Gen binden. Aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften, wurde eine signifikant erhöhte HIF-1α- Expression in den Zellen als Nachweis von O_2- Mangel aufgrund der Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen angesehen und damit zugleich als Beweis für ein stabil und effektiv funktionierendes Hypoxiemodell für die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien. Die verglichen mit physiologischen Bedingungen sehr lange Hypoxiezeit von 24 h in den untersuchten Zelllinien erscheint insofern realistisch, da diese vergleichsweise langen Zeiten bereits für weitere Zelllinien in der Literatur beschrieben sind (Charlier et al., 2002).

Eine signifikant erhöhte Expression von sowohl AMPKβ1 als auch HIF1α konnte in HEK293- Zellen erstmals nach 24 h Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen festgestellt werden. Zusätzlich zur Tatsache, dass auch in den porcinen LLC-PK1- Zellen nach dieser Hypoxiezeit eine maximal gesteigerte AMPKβ1- Expression nachgewiesen werden, wurde für alle weiteren Versuchsreihen ein Zeitraum von 24 h für die Dauer der Hypoxie gewählt.

4.2. Charakterisierung des Hypoxiemodells

Um das in dieser Arbeit verwendete Hypoxiemodell genauer zu charakterisieren wurden für hypoxische und reoxigenierte Zellen im Vergleich zu normoxischen Kontrollzellen verschiedene Parameter, z.B. Morphologie, Verteilung von intakten und apoptotischen Zellen, Expressionsprofile apoptose- relevanter Gene betrachtet sowie unter anderem Untersuchungen zur zellulären Respiration und Mitochondrienaktivität durchgeführt. Es wurden stets normoxische mit hypoxischen und reoxigenierten Zellen verglichen.

Deutliche morphologische Änderungen in HEK293- Zellen nach 24 h Hypoxie deuten auf ein apoptotisches Geschehen in diesen Zellen hin. Im Gegensatz zu normoxischen Zellen liegt kein geschlossener Zellrasen vor, die Zellen erscheinen abgekugelt bzw. geschrumpft, wobei zusätzlich eine Bildung von apoptotischen Körperchen (Blebbing) beobachtet werden kann. Die rein optisch

feststellbaren Ereignisse deuten darauf hin, dass es möglicherweise zu spezifischen, intrazellulären apoptotischen Vorgängen wie Schrumpfung des Zytoskeletts und der Zellorganellen, Chromatinkondensation sowie endonukleärer Abbau der DNA kommt. In hypoxischen LLC-PK1-Zellen konnten mikroskopisch Ereignisse festgehalten werden, die eher auf ein nekrotisches Geschehen hindeuten. Diese Beobachtungen entsprechen Literaturdaten, denen nach, Schädigungen der Tubuluszellen u.a. besonders durch O_2- Mangel in einer akuten, tubulären Nekrose (ATN) resultieren und auf diese Weise zum akuten Nierenversagen führen können (Kribben et al., 1999; Bonventre et al., 1998, Nissenson 1998). Die Zellen erscheinen nach 24 stündiger Hypoxie angeschwollen mit diffuser Zellwandstrukur. Bei nekrotischen Abläufen kommt es aufgrund gestörter Membranintegrität zunächst zu einer Volumenzunahme in den Zellen. Ebenso wie bei apoptotischem Geschehen erfolgt der Abbau des genomischem Materials durch Fragmentierung und Auflösung des Zellkerns. Diese optischen Beobachtungen deuten darauf hin, dass Hypoxie sowohl apoptotische als auch nekrotische Prozesse in den Zellen induzieren kann. Interessant wäre hierbei, in welchem Grad es unter hypoxischen Bedingungen zu DNA- Schäden wie DNA- Einzel- und Doppelstrangbrüchen kommt, die im weiteren Verlauf des Projekts mit Hilfe spezifischer Methoden wie z.B. dem Comet Assay (Einzelzellgelelektrophorese) abgeklärt werden könnten. In beiden Zelllinien zeigt sich nach einer 24 stündigen Reoxigenierungsphase eine allmähliche Rückkehr zum normoxischen Kontrollzustand, d.h. die Zellen weisen zunehmend eine deutlich gestreckte Struktur auf, wobei kaum noch Anzeichen von apoptotischen bzw. nekrotischen Geschehnissen beobachtet werden können.

Diese Beobachtungen der reoxigenierten Zellen spiegeln sich auch in den Ergebnissen der Vitalitätsfärbungen wider. Der Farbstoff Trypanblau kann durch die defekte Zellmembran geschädigter oder toter Zellen in das Zytosol eindringen und färbt diese aufgrund von Interaktion mit Zellproteinen tiefblau. In intakte Zellen mit gut ausgeprägter Membranintegrität kann der Farbstoff zunächst nicht eindringen; diese Zellen erscheinen bei mikroskopischer Betrachtung daher ungefärbt. Aufgrund der Zytotoxizität des Farbstoffs wurde eine nur kurze Färbezeit von 5 min gewählt, da nach längeren Färbezeiten der Farbstoff auch in intakte Zellen eindringen und diese anfärben kann. Nach 24 h Hypoxie konnten sowohl in HEK293- auch in LLC-PK1- Zellen eine signifikant erhöhte Anzahl an trypanblau- positiven Zellen, d.h. Zellen mit eindeutig gestörter Membranintegrität ausgezählt werden. Intakte und reoxigenierte Zellen weisen keine eindeutigen Unterschiede auf, jedoch kann aus der Nichtaufnahme des Farbstoffes lediglich auf den Zustand der Membran, nicht aber auf die Funktionstüchtigkeit der Zellorganellen geschlossen werden. Daher kann mit Hilfe dieser Färbung zwar ein erster Eindruck über die Vitalität der Zellen gewonnen

werden, jedoch keinerlei Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen getroffen werden.

Um genauer zwischen intakten, apoptotischen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden und die bisherigen Beobachtungen auf molekularer Basis zu untermauern, wurden HEK293- Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) bei AnnexinV/ 7- AAD- Doppelmarkierung analysiert. Die simultane Anwendung von AnnexinV und 7- AAD ermöglicht eine einfache Differenzierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen sowie eine grobe Einschätzung des Apoptosestadiums. Intakte Zellen besitzen in der Regel eine stabile Zellmembran, die die Zelle umgibt und dadurch das innere Milieu vom Zellaußenraum trennt. Daher konnten unter normoxischen Bedingungen im Schnitt 95 % der Zellen als intakt, d.h. sowohl AnnexinV- als auch 7- AAD- negativ (AnnexinV -- / 7 AAD --) klassifiziert werden. Dass ein geringer Teil der Zellen unter normoxischen Bedingungen als früh- (AnnexinV ++ / 7 AAD --) bzw. spätapoptotisch (AnnexinV ++ / 7 AAD ++) bestimmt werden konnte, liegt daran, dass es sich bei den untersuchten Zellen nicht um synchronisierte Zelllinien handelt, sondern in den Kulturen Zellen in jeglichem Status des Zellzyklus vorliegen, d.h. auch unter Standardbedingungen sind sterbende bzw. bereits tote Zellen vorhanden. Nach 24 h Hypoxie konnte eine deutlich erhöhte Anzahl an AnnexinV- positiven, d.h. frühapoptotischen Zellen sowie AnnexinV- und 7- AAD- positiver Zellen nachgewiesen werden. Dies rührt daher, dass bei frühapoptotischen Prozessen Phosphatidylserin, dass in intakten Zellen auf der Intrazellulärseite der Membran lokalisiert ist, vermehrt auf die Extrazellulärseite verlagert wird und dadurch spezifisch durch AnnexinV markiert werden kann (Vermes et al. 1995). Darüber hinaus kann AnnexinV aufgrund der erhöhten Membranpermeabilität ebenfalls in nekrotische Zellen eindringen und dort an Phosphatidylserin binden (van Engeland et al. 1998). Daher kann allein durch die AnnexinV-Markierung keine Differenzierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen erreicht werden. Hierfür ist die Markierung mit einem weiteren Farbstoff (7- AAD) erforderlich. 7- AAD ist ein Farbstoff der in die DNA von Zellen interkaliert und lediglich die DNA spätapoptotischer bzw. nekrotischer Zellen anfärbt (Walton et al., 1997), da er nur in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen kann (Wadkins und Jovin, 1991). Im Stadium der frühen Apoptose ist dies nicht der Fall, da in diesen Zellen die Membranintegrität noch aufrechterhalten wird. Die entsprechenden Zellen werden daher als 7- AAD- negativ bestimmt. In hypoxischen Zellen zeigt sich verglichen mit Kontrollzellen, aber auch mit reoxigenierten Zellen ein hoher Anteil an spätapoptotischen bzw. nekrotischen Zellen. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass Hypoxie parallel sowohl apoptotische als auch nekrotische Vorgänge in der Zelle auslösen kann. Unter bestimmten Bedingungen, in diesem Falle nach einer 24 stündigen Reoxigenierungsphase zeigte sich bei etwa einem Drittel der Zellen kein AnnexinV, jedoch ein 7- AAD- Signal (AnnexinV -- / 7 AAD ++; Q1). Diese Konstellation dürfte es

nach dem eingangs beschriebenen Prinzip dieser Färbung theoretisch nicht geben, da Zellen deren Membran für den Farbstoff 7-AAD durchlässig geworden ist, auch AnnexinV an der Innenseite der Membran binden müssten. Dies ist jedoch offenbar nicht so, wobei sich über die Gründe hierfür nur spekulieren lässt. Einerseits wäre es möglich, dass es Zellen gibt, die nicht mit AnnexinV gefärbt werden können. Eine andere Hypothese ist, dass die Membranen einiger Zellen nicht für beide Farbstoffe parallel permeabel werden, sondern möglicherweise erst später für AnnexinV durchlässig werden. In jedem Fall werden Zellen, die auf diese Weise markiert sind, zu den Nekrotischen gezählt. Weiterhin fällt auf, dass nach der 24 stündigen Reoxigenierungsphase erneut durchschnittlich 65,5 % der Zellen als intakt, d.h. AnnexinV- und 7-AAD- negativ, klassifiziert werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine 24 stündige Hypoxie die Zellen vermehrt in den Zustand der Apoptose bzw. Nekrose zwingt. Zudem konnte gezeigt werden, dass, in den verwendeten Nierenzelllinien ähnlich wie in vorangegangenen Untersuchungen (Yoshimura et al., 1998) an PC12- Zellen, die in der Arbeit von Yoshimura aus dem Jahr 1998 als Modell für neuronale Zellen verwendet wurden, Hypoxie Apoptose und Nekrose parallel induzieren kann. Außerdem zeigt sich eine Erholung der Zellen nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase, die auf native zelluläre Mechanismen, die für das Überleben notwendig sind, zurückzuführen sind.

Als weiterer Nachweis dafür, dass in den untersuchten Zelllinien hypoxisch induzierte Schädigungen auftreten, können die Daten Bestimmung der Expressionsprofile angesehen werden. Hier erscheinen die Expressionsprofile nach 24 h Hypoxie verglichen mit Kontroll- und reoxigenierten Zellen im Allgemeinen verringert. Besonders betrifft dies Faktoren, die für das Überleben der Zelle von Bedeutung sind, wie beispielsweise die Inhibitoren der Apoptose, antiapototisch wirkende mitochondriale Faktoren, z.B. Bcl-2 und Bcl-xL. Weiterhin konnte eine verringerte Expression des Transkriptionsfaktors p53 beobachtet werden, der z.B. nach DNA- Schädigung die Aktivität einer Vielzahl von Genen, wie u.a. des pro- apoptotischen Faktors Bax kontrolliert und auf diese Weise in die Regulation des Zellzyklus sowie der Apoptoseinduktion eingreift (Lane, 1992). In der Vergangenheit konnte nachgewiesen werden, dass der p53- Status unter hypoxischen Bedingungen entscheidend für das Überleben von Zellen sein kann (Höckel et al., 1993). Die Autoren konnten an Rattenfibroblasten zum einen zeigen, dass unter Hypoxie die Apoptoserate der Zellen zunahm, jedoch durch Bcl-2 hemmbar war, was darauf schließen lässt, dass Mutationen im Bcl-2-Gen den physiologischen Apoptoseweg beeinflussen. Zum anderen wurde in einem weiteren Ansatz nachgewiesen, dass p53- mutierte Zellen (p53- negativ) im Vergleich zu Wildtyp- p53- Zellen verringerte Apoptoseraten aufwiesen und diese Zellen die Hypoxie in vermehrter Anzahl überlebten. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass Hypoxie das Wachstum von p53- mutierten Zellen bzw. Zellen, die ihre spontane Apoptosefähigkeit verloren haben, scheinbar begünstigt. Dass sich die

Expressionsprofile in den HEK293- Zellen nach 24 h Hypoxie allgemein verringert darstellen und damit auch die p53- Expression, könnte sich daher auch positiv auf das Überleben der in dieser Arbeit verwendeten Zellen ausgewirkt haben.

Besonderes Augenmerk liegt zusätzlich auf der vermehrten Ausschüttung der beiden proapoptotischen Faktoren SMAC/Diablo und Cytochrom c, wobei vor allem ersterer als spezifisch für die Beschreitung des intrinsischen Weges der Apoptose gilt (Srinivasula et al., 2000; Henry-Mowatt et al., 2004). Obwohl die Freisetzung von Cytochrom c als allgegenwärtiges Anzeichen von apoptotischem Geschehen angesehen wird, gilt dies beim extrinsischen Apotoseweg bzw. in der späten Phase der Apoptose eher als ein Ergebnis, als als Auslöser der apototischen Vorgänge. Der vermehrt Nachweis von SMAC/Diablo und Cytochrom c deutet darauf hin, dass die Zellen Hypoxie-bedingt dem intrinsischen Weg der Apoptose unterliegen.

Allgemein fällt in hypoxischen Zellen des Weiteren eine gesteigerte Expression von pro-apoptotischen Faktoren wie beispielsweise Bax auf, was zusammen mit der verminderte Bcl-2-Expression zu einem deutlich Missverhältnis dieser beiden Antagonisten der mitochondrialen Apoptose hin zum proapoptotischen Bax führt. Außerdem konnte in diesen Experimenten verglichen mit Kontrollzellen erneut eine ebenfalls deutlich erhöhte HIF1α- Expression in hypoxischen Zellen bestätigt werden. Einige Studien deuten darauf hin, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen p53 und HIF1α- Aktivität gibt. So konnte nachgewiesen werden, dass unter stark hypoxischen Bedingungen pro- apoptotische Gene wie z.B. Bax (Chae et al., 2001; Shen und White, 2001), aber auch der Tumorsuppressor p53 (Banasiak und Haddad, 1998) aktiviert werden. WEiterin konnte unter hypoxischen Bedingungen ein pro- apoptotischer Effekt von HIF1 anhand von kortikalen Neuronen sowie embryonalen Stammzellen nachgewiesen werden (Carmeliet et al., 1998; Halterman et al., 1999). Sowohl in der Studie von Carmeliet et al. als auch in der von Halterman et al. führte die durch HIF1 induzierte Aktivierung von p53 und gleichzeitiger Hemmung von Bcl-2 zur Induktion von Apoptose und damit zum Zelltod. Bei der Bestimmung der Expressionsprofile zeigte sich weiterhin, dass sich die Expression aller untersuchten Faktoren nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase erneut in Richtung Kontrollniveau relativieren. Da die Caspase- Kaskade den zentralen Punkt der Apoptoseeinleitung darstellt, wurde zudem die Aktivität der beiden Effektor-Caspasen 3 und 7 zusätzlich mit Hilfe eines lumineszenzbasierten Assay bestimmt. Auch hier zeigen sich zu den bisher ermittelten Daten vergleichbare Ergebnisse. In hypoxischen Zellen konnte eine im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant erhöhte Aktivierung der beiden Caspase 3 und 7 nachgewiesen werden, was direkt als Nachweis einer Apoptoseinduktion in den Hypoxiezellen gewertet werden kann, da die Aktivierung der Caspase 3 eine Schlüsselrolle während der Apoptoseeinleitung einnimmt (Darmon et al., 1995, Nicholson et al., 1995; Schlegel et al., 1996).

Nach 24 stündiger Reoxigenierung konnte eine deutliche Reduktion der Caspasen- Aktivität in Richtung Kontrollniveau festgestellt werden. Analog zur Caspase 3 und 7- Aktivierung wurde das Proliferationsvermögen der Zellen ebenfalls mit Hilfe eines Lumineszenz- Assays bestimmt. Entsprechend zur Caspase 3 und 7- Aktivierung in hypoxischen Zellen, zeigt sich ein zum Kontrollniveau signifikant verringertes Proliferationsvermögen in hypoxischen Zellen sowie eine erneute Verbesserung nach der Reoxigenierungsphase.

Alle bisher dargestellten und diskutierten Daten können durchaus als Nachweise dafür erachtet werden, dass in unserem *in vitro*- Modell die Hypoxie stabil und effektiv simuliert werden kann, da mit unterschiedlichen Methoden, verschiedene Aspekte zellulärer Veränderungen bei Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen reproduzierbar abgebildet werden konnten. Letztendlich können alle in den beiden Zelllinien beschriebenen Änderung nach 24 h Hypoxie, seien diese morphologischer Art, die Genexpression oder den Zellstatus sowie Caspase- Aktivierung und Proliferationsvermögen betreffend, auf die Limitierung von Sauerstoff und damit einhergehende, gestörte Prozesse in den Mitochondrien, die für den Energiegewinn der Zelle in Form von ATP zuständig ist, zurückgeführt werden. Der Mangel an O_2 während der Hypoxiephase führt zu einem enormen Abfall von Energiemetaboliten des Zellstoffwechsels (ATP, ADP und AMP). Hypoxie stört die Vorgänge in der Atmungskette, da bei der aeroben Atmung O_2 für die Erzeugung von Energie (ATP) während der oxidativen Phosphorylierung benötigt wird. Um Veränderungen in der Atmungskette in hypoxischen und reoxigenierten im Vergleich zu normoxischen Kontrollzellen tatsächlich zu verfolgen, wurden respiratorische Messungen mittels Oxygraph sowie mitochondrienspezifische Färbungen durchgeführt. MitoTrackerRed- Farbstoffe sind mitochondrienspezifische Farbstoffe, die passiv durch die Zellmembran aufgenommen werden können. Mit Hilfe dieser Färbung können grobe Strukturen der Mitochondrien, wie beispielsweise Form, Lage und Lokalisation in der Zelle sowie die ungefähre Anzahl aktiver Mitochondrien abgebildet werden. In diesen Versuchen konnte in beiden Zelllinen eine verringerte Anzahl funktionsfähiger Mitochondrien nach 24 stündiger Hypoxie gezeigt werden. Mitochondrien werden als die „biochemischen Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet, da unter normalen, aeroben Bedingungen in diesen Zellorganellen etwa 95 % des ATP durch oxidative Phosphorylierung gewonnen wird, jedoch lediglich 5 % in der Glykolyse entstehen (Rapoport, Auflage 8; 1983). Daher geht eine verringerte Anzahl an funktionsfähigen Mitochondrien direkt mit der Limitierung zellulärer Energieträger einher, welche zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels unabdingbar sind. Diese nachweisliche Limitierung zellulärer Energieträger durch Unterbrechung der oxydativen Phosphorylierung erklärt die zuvor beschriebenen Veränderungen in den beiden Zelllinien nach 24 stündiger Hypoxie. Daher erscheint auch eine Rückkehr in Richtung Normalzustand nach 24 stündiger Reoxigenierungsphase insofern plausibel, da während dieser

Phase keine Einschränkung der oxidativen Phosphorylierung mit freiem Zugriff auf zelluläre Energieträger herrschen sollte. Das System der oxidativen Phosphorylierung besteht aus den 4 Komplexen (Komplex 1 – IV) der Atmungskette sowie der ATP- Synthetase. Komplex I, die NADH-Dehydrogenase ist der größte der Atmungskettenkomplexe und verantwortlich für die Oxidation von NADH mittels Elektronentransfer zu Ubichinon, wodurch auch Ubiquinol entsteht. In Komplex II (Succinat- Dehydrogenase), dem kleinsten Komplex der Atmungskette erfolgt die Oxidation von Succinat zu Fumarat, indem Elektronen auf das in Komplex I gebildete Ubichinon übertragen werden. Anschließend erfolgt der Transfer von Elektronen von Ubichinol zu Cytochrom c im Komplex III der Atmungskette (Cytochrom c- Reduktase). Komplex IV, die Cytochrom c- Oxidase katalysiert unter der Bildung von Wasser den Transfer von 4 Elektronen vom zuvor reduzierten Cytochrom c zu einem molekularen Sauerstoff (O_2). Diese Komplexe der Atmungskette mit Ausnahme von Komplex II werden nach ihrer Funktion als Protonenpumpen bezeichnet, da beim Transfer von Elektronen von Komplex zu Komplex Protonen aus der Matrix in den Intermembranspalt gepumpt werden. Komplex II wird nicht als Protonenpumpe bezeichnet, da die Änderung der freien Energie hier zu gering ist. Jedoch liefert der auf diese Weise entstehende elektrochemische Protonengradient die Energie, um die energieabhängige ATP- Synthetase zu katalysieren, die ihrerseits ADP und anorganisches Phosphat zu ATP synthetisiert.

Bei den funktionellen Untersuchungen der Zellatmung und somit der oxidativen Phosphorylierung fand in dieser Arbeit die hochauflösende Respirometrie Anwendung. Bei dieser Methode können durch Titration von Substraten bzw. Inhibitoren selektiv Veränderungen in den einzelnen Komplexen der Atmungskette verfolgt und der O_2- Verbrauch [pmol/sek pro Million Zellen] der Zellen bestimmt werden. Da die Zellmembran jedoch für viele dieser Effektoren nicht permeabel ist, wurden nach Bestimmung der state-1- Atmung (Grundatmung) die Zellen mit Hilfe von Digitonin permeabilisiert. Allgemein war es bei beiden untersuchten Zelllinien weitaus schwieriger, hypoxische Zellen zu messen. Etwa jede zweite Messung konnte nicht bis zum vollständigen Ende durchgeführt werden, da keinerlei Reaktion mehr auf Substrate (und Inhibitoren) erfolgte. Dies bedeutet, ein Hauptproblem bei den Untersuchungen zur Mitochondrienfunktion stellte deren zeitliche Instabilität dar, die in hypoxischen Zellen, d.h. in Zellen mit geschädigten Mitochondrien weit ausgeprägter als in normoxischen oder reoxigenierten Zellen war. Jedoch gelang es, reproduzierbar eine um mindestens die Hälfte verringerte Grundatmung (state-1- Atmung) in hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Zellen nachzuweisen, wobei sich diese nach der Reoxigenierungsphase wieder deutlich erholt. Dass Zellen diese langen Phasen der Hypoxie überleben können, ist vermutlich auch darauf zurückzuführen, dass es in den Zellen neben der oxidativen Phosphorylierung eine weitere Möglichkeit zur Energiegewinnung gibt. Im Gegensatz zur oxidativen Phosphorylierung, läuft die

Glykolyse auch unter anaeroben Bedingungen in den Zellen weiter, da dieser Weg unabhängig davon funktioniert, ob O_2 für die Atmungskette zur Verfügung steht oder nicht. Auf dieser Weise kann in den Zellen auch unter anaeroben Bedingungen über einen gewissen Zeitraum ein grundlegender Zellstoffwechsel aufrechterhalten werden. Jedoch handelt es sich bei der Glykolyse um einen weit weniger effektiven Vorgang, um zelluläre Energieträger zu produzieren. Vergleicht man die Bilanzen der beiden Prozesse werden bei der Glykolyse effektiv 2 Moleküle ATP frei, während durch die oxidative Phosphorylierung weitere 26 Moleküle ATP entstehen. Hypoxischen Zellen stehen daher weit weniger zelluläre Energieträger zur Verfügung, um allgemeine Stoffwechselprozess aufrecht zu erhalten. Dies erklärt beispielsweise die im Allgemeinen eingeschränkt erscheinenden Expressionsprofile bei den Untersuchungen der apoptose- relevanten Gene, da eine Vielfalt zellulärer Prozesse energieabhängig funktioniert, wie beispielsweise die Proteinbiosynthese (Translation). Bei der Translation, d.h. der Synthese von Proteinen am Ribosom wird die tRNA (Transfer- RNA) an die mRNA (Messenger RNA) angelagert und die entsprechende, codierte Aminosäure unter Spaltung von ATP an die Peptidkette gebunden. Aufgrund der Einschränkung zellulärer Energieträger sind die Zellen zudem nicht mehr effektiv dazu in der Lage ATP zu regenerieren, da beide möglichen Wege (Substratkettenphosphorylierung und Elektronentransportphosphorylierung), um ATP zu regenerieren ebenfalls energieabhängig arbeiten.
Neben der Beobachtung der Grundatmung war weiterhin die Bestimmung der state-3- Atmung von Interesse. Bei der state-3- Atmung sind O_2 sowie ADP und Substrate ohne Limitierung vorhanden. Mit Hilfe von FCCP erfolgte die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, wodurch die Verbindung von Oxidation und Phosphorylierung unterbrochen wird. In diesem Fall können die Zellen ganz regulär einen Protonengradient aufbauen und aufrechterhalten, sind aber nicht mehr dazu in der Lage ATP zu synthetisieren. Da kein APT mehr synthetisiert werden kann, müssen keine Protonen mehr entgegen dem elektrochemischen Gradienten transportiert werden. Dass nun alle Prozesse in den Komplexen I bis IV schneller ablaufen können, führt parallel zu einem deutlich erhöhten O_2- Verbrauch in den Zellen. Dies konnte sowohl in normoxischen, als auch hypoxischen und reoxigenierten Zellen beobachtet werden. In HEK293- Zellen liegt die maximale respiratorische Kapazität etwa 4- fach höher als die bestimmte Grundatmung; in hypoxischen und reoxigenierten sogar 6- fach höher als die jeweilige Grundatmung. Ein ähnliches Verhältnis findet man bei den Daten der LLC-PK1- Zellen. Die maximale respiratorische Kapazität war gegenüber der Grundatmung in normoxischen Zellen ebenfalls um ein 4- faches erhöht; ebenso war die maximale respiratorische Kapazität im Vergleich zur jeweiligen Grundatmung in hypoxischen und reoxigenierten Zellen um den Faktor 6 erhöht.

Aus dem Verhältnis den Atmungen nach FCCP- und Digitonin- Gabe wurde die sogenannte RCR (respiratory control ratio) berechnet. Die RCR ist ein Maß für die Kopplung der oxidativen Phosphorylierung und gibt Auskunft über den Zustand, d.h. intakt oder defekt, der Mitochondrien. Je kleiner der Zahlenwert ist, desto stärker ist die Schädigung der Mitochondrien. In normoxischen Kontrollzellen liegt dieser Wert in HEK293- Zellen bei 23,04, in hypoxischen Zellen jedoch nur bei 16,03. Ein etwas weniger ausgeprägtes Verhältnis weisen die LLC-PK1- Zellen auf, bei denen dieser Wert bei 19,1 und 15,8 liegen. Die durch die respiratorischen Messungen nachgewiesene mitochondriale Schädigung und die damit einhergehende eingeschränkte Effektivität der oxidativen Phosphorylierung führt direkt zum Verlust zellulärer Energieträger, die für Aufrechterhaltung eines regulären Zellstoffwechsels notwendig sind. Nach der Reoxigenierungsphase konnte in den LLC-PK1- Zellen ein leicht erhöhter Wert festgestellt werden, woraus geschlossen werden kann, dass in diesen Zellen weniger geschädigte, sondern erneut ein größerer Anteil funktionsfähiger Mitochondrien vorhanden ist. Dies bestätigt sowohl die Daten der Mitochondrienfärbungen als auch die Ergebnisse aus den Bestimmungen zum Proliferationsvermögen der Zellen. Eine erneut gesteigerte Anzahl funktionsfähiger Mitochondrien bedingt eine verbesserte oxidative Phosphorylierung, wodurch den Zellen mehr freie Energieträger in Form von ATP zur Verfügung stehen. Daher können mehr energieabhängige Prozesse, wie beispielsweise aktiver Stofftransport oder die Synthese von organischen Molekülen (z.B. bei der Proteinbiosynthese) in den Zellen induziert und kontrolliert werden. In HEK293- Zellen könnte die erhöhte RCR in reoxigenierten Zellen auf einen Reoxigenierungsschaden an den Mitochondrien hindeuten. Zusätzlich zu den respirometrischen Untersuchungen wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), als Maß für die Kapazität der anaeroben Energiebereitstellung bestimmt, da dieses Enzym die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat bein der (anaeoben) Glykolyse katalysiert. Sowohl in HEK293- als auch in LLC-PK1- Zellen konnte eine gesteigerte LDH- Aktivität um etwa 50 % nach der Hypoxiephase nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass die untersuchten Zellen unter hypoxischen Bedingungen tatsächlich auf anaerobe Glykolyse umschalten. Dass diese erhöhte LDH- Aktivität zudem in reoxigenierten Zellen nachgewiesen werden konnte, könnte auf einen massiven Reoxigeneirungsschaden bezüglich der oxidativen Energiegewinnung hindeuten. Neben den Bestimmungen zur LDH- Aktivität wurde die Aktivität der Citratsynthase (CS) ermittelt. Dieses Enzym diente der Einschätzung der aeroben Kapazität (Zitratzyklus) der Zellen, d.h. des energetischen Anteils, der auf dem oxidativen Weg bereitgestellt wird. Es zeigte sich hierbei kein eindeutiger Unterschied der Aktivitäten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Dies erscheint insofern nicht plausibel, da anhand der Bestimmung der Zellatmung festgestellt werden konnte, dass hypoxische Zellen eine eindeutig verringerte Zellatmung aufweisen. Ähnliche Ergebnisse sind jedoch

bereits in der Literatur beschrieben. In einer Arbeit aus dem Jahre 2000 (Daneshrad et al., 2000) konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den Aktivitäten der Citratsynthase zwischen Kontroll- und Versuchstieren bei den Untersuchungen zu metabolischer Anpassung im Myokard der Ratte festgestellt werden.

4.3. Effekte von EPO und cEPO-FP auf die Expression Apoptose-relevanter Gene während Hypoxie und Reoxigenierung in Nierenzelllinien

Es ist bekannt, dass Hypoxie bzw. in der in vivo Situation Ischämie nicht nur schädigende, sondern auch protektive Mechanismen in der Zelle aktiviert. Ein O_2- Mangel löst in praktisch jedem Zelltyp eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration dieses Genregulatorproteins HIF1α aus, welches an einer Vielzahl verschiedener regulatorischer Prozesse in der Zelle beteiligt ist (Hill et al., 2008). Dieser Faktor induziert die Transkription verschiedener Proteine, wie z.B. die des Faktors VEGF (vascular endithelial growth factor) (u.a. Banai et al., 1994; Levy et al., 1995; Ladoux und Frelin, 1997), das Eisentransportprotein Transferrin (Rolfs et al., 1997) und - als Hintergrund zu dieser Arbeit – das Erythropoetin (EPO) (u.a. Beck et al., 1991; Semenza et al., 1991 und 1998) sowie viele weitere mehr.

Von zentralem Interesse in dieser Arbeit ist die Frage, ob es möglich ist, eine *in vitro*- Modell gemäß dem bereits bestehenden Großtiermodell zu etablieren. Ziel dieser Versuchsreihen im Großtiermodell war und ist es nach wie vor, Ischämie/Reperfusionssequenzen *in vitro* nachzustellen und Wege für zukünftige Therapien zu finden, da z.B. thorakales Aortenclamping zum Ersatz eines Gefäßabschnittes Ischämie/Reperfusions (I/R)-Schäden von u.a. Nieren und Rückenmark bedingen kann. Da im Mittelpunkt der I/R- Forschung unserer Arbeitsgruppe Nieren und Rückenmark stehen, wurden Versuche zum potentiell nephro- und neuroprotektiven Einfluss von Erythropoetin (EPO) während der I/R- Sequenz durchgeführt (Simon et a., 2008/2). Experimentell wurde durch gezieltes Platzieren und Füllen zweier Ballonkatheter ein System entwickelt, durch welches die Pathophysiologie des Aortenclampings kliniknah abgebildet werden kann und potentiell protektive Substanzen während I/R getestet werden können. In diesen Arbeiten konnte eine positive Wirkung des EPO auf die Funktionalität der Niere während 45 minütiger Ischämiezeit gezeigt werden. Tiere, die eine EPO- Behandlung erhielten, wiesen sowohl eine deutlich verbesserte Kreatinin- Clearance als auch eine signifikant verbesserte fraktionelle Na- Exkretion auf. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit

der Einfluss von EPO auf die Funktion des Rückenmarks betrachtet. Um die spinale Funktion beurteilen zu können, wurden motorisch evozierte Potentiale abgeleitet sowie histologische Untersuchungen durchgeführt. Obwohl in der EPO- Gruppe ein geringerer Anteil geschädigter Neurone beobachtet werden konnte, zeigte sich jedoch keine Verbesserung der spinalen Funktion. Aus diesem Grund und aus der Tatsache, dass neuroprotektive Eigenschaften des EPO bereits in der Literatur diskutiert wurden, wurden in einer separaten Versuchsgruppe vergleichende Untersuchungen zur neuroprotektiven Wirkung von EPO und einem EPO- Derivat (cEPO-FP, carbamyliertes EPO) durchgeführt. Carbamyliertes EPO (cEPO-FP) ist ein Derivat des nativen EPO, das durch Fusion zweier EPO- Moleküle an die konstante Region eines Antikörpers und anschließender Carbamylierung des Gesamtmoleküls entsteht. Durch die Carbamylierung kann die erythropoetische Potenz, unter Beibehalten der anderen Eigenschaften (Leist et al., 2004) umgangen werden. Bei einer auf 30 Minuten reduzierten Ischämiezeit konnten sowohl für EPO als auch cEPO-FP positive Effekte gezeigt werden, wobei eine signifikante Verbesserung gegenüber der Kontrollgruppe (Placebogruppe mit PBS behandelt) ausschließlich in der cEPO-FP- Gruppe nachgewiesen werden konnte. Während sich funktionelle und klinisch relevante Daten aus diesen Tierversuchen gewinnen lassen, bleiben dennoch Fragen hinsichtlich zellulärer und subzellulärer Vorgänge in der I/R- Sequenz offen.

Um diese Lücke zu schließen, wurde für die beiden Nierenzellinien HEK293 und LLC-PK1 ein *in vitro*- Modell etabliert und charakterisiert. Es konnten hypoxische Schädigungen bei der Morphologie, veränderter Verteilung intakter, apoptotischer und nekrotischer Zellen sowie anhand veränderter Genexpressionen apoptose- relevanter Gene nachgewiesen werden. Aufgrund der aus den Tierversuchen resultierenden Daten, wurde der Einfluss von EPO und cEPO-FP im etablierten Hypoxiemodell untersucht. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Expressionen einer Auswahl apoptose- relavanter Gene und die Bestimmung der Caspase 3/7- Aktivierung sowie auf das Proliferationsvermögen der Zellen gelegt. Aufgrund der zuvor bestimmten Expressionsprofile wurden, für die Bestimmungen zum Einfluss von EPO und cEPO-FP, die Faktoren AMPKβ1, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Caspase 3, cleaved Caspase 3, Caspase 9, cleaved Caspase 9, Cytochrom c, SMAC/Diablo, XIAP und cIAP-1 für genauere Untersuchungen mittels Western Blot- Analyse ausgewählt.

Es wurde in der humanen Zelllinie erneut eine signifikant vermehrte Ausschüttung von Cytochrom c und SMAC/Diablo nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnten in den porcinen LLC-PK1- Zellen für SMAC/Diablo keine Ergebnisse erzielt werden, was ebenfalls damit zu begründen ist, dass humanspezifische Antikörper für die Western- Blot- Analysen verwendet wurden. Aufgrund der relativ hohen Homologie zwischen Mensch und Schwein konnten mit nahezu allen Antikörpern, bis

auf den genannten SMAC/Diablo sowie für den bei der Evaluation des Hypoxiemodells genannten Faktor HIF1α, auch für die Proben aus den Schweinenierenzellen reproduzierbare Ergebnisse erlangt werden. Des Weiteren konnte ebenso eine signifikant erhöhte Expression von AMPKβ1 und pro- apoptotischen Markern wie Bax oder der cleaved Caspasen 3 und 9 in hypoxischen Zellen gezeigt werden. Analog wurde in beiden Zelllinien erneut die deutliche eingeschränkte Expression von Faktoren, die für das Überleben der Zellen wie beispielsweise Bcl-2, Bcl-xL und den IAPs, cIAP-1 und XIAP verantwortlich sind, demonstriert werden.

Es zeigten sich keinerlei unterschiedliche Expressionen zwischen unbehandelten und mit cEPO-FP bzw- EPO behandelten normoxischen Kontrollzellen, was damit zu begründen ist, dass unter diesen Bedingungen in den Zellen wahrscheinlich kein Bedarf an EPO respektive cEPO-FP, d.h. potentiell protektiven Agenzien, besteht. Interessant für weitere Untersuchungen wäre an dieser Stelle genauere Studien zum EPO- Rezeptor (EpoR), um abzuklären, ob diese Bindungsstellen unbesetzt bleiben, besetzt und wieder verlassen werden oder z.B. EpoR- vermittelte Endozytose (Agoram et al., 2009) zum Abbau des EPO ebenso in der *in vitro*- Situation stattfindet. Ausschlaggebend für diese Arbeit ist jedoch, dass keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten normoxischen Kontrollzellen festgestellt werden konnten.

In hypoxischen Zellen ohne jegliche Behandlung konnten bei jedem der untersuchten Faktoren verglichen zum Kontrollniveau signifikante erhöhte bzw. verringerte Expressionen nachgewiesen werden. Dies belegt erneut die Ergebnisse aus der Bestimmung der Expressionsprofile zur Charakterisierung des Systems und beschreibt zudem detailliert, um welchen Faktor verglichen mit der normoxischen Kontrolle die jeweilige Expression erhöht bzw. verringert ist.

Vergleicht man behandelte und unbehandelte Hypoxiezellen grundlegend miteinander, zeigt sich, dass sowohl EPO als auch cEPO-FP bei Gabe von 100 IU Einfluss auf die Expression einiger der untersuchten Faktoren ausüben.

Ein eindeutig positiver Effekt des carbamylierten EPO (cEPO-FP) konnte in den humanen HEK293-Zellen bei der Expression von AMPKβ1, den Proteinen der Bcl-2- Familie, XIAP und der cleaved Caspase 9 sowie auf die Freisetzung von SMAC/Diablo und Cytochrom c beobachtet werden. Dabei kann der verringerte Nachweis von Cytochrom c mit der verbesserten Expression der beiden antiapoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-xL und gleichzeitiger Verminderung der Bax- Expression erklärt werden, da die Cytochrom c- Freisetzung aus den Mitochondrien beispielsweise durch Bcl-2 kontrolliert wird. Bcl-2 ist in den Poren der Mitochondrienmembran lokalisiert und dichtet diese gegen den Austritt von Cytochrom c, das sich zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran befindet ab. Wird Bcl-2 durch Bax gebunden, wird Cytochrom c durch die geöffneten Membranporen freigesetzt und kann dann zur Aktivierung der Caspase- Kaskade beitragen (Kluck et al., 1997). Eine

Erklärung für die verminderte Cleavage der Caspase 9 könnte die signifikant verbesserte XIAP-Expression sein, da dieses Protein für eine direkte Inhibierung u.a. der Caspasen 9 verantwortlich ist. In LLC-PK1- Zellen konnte ebenfalls ein potentiell protektiver Einfluss von cEPO-FP auf die Expressionen von AMPKβ1 und des Inhibitors der Apoptose XIAP sowie eine verminderte Caspase 3 Cleavage in hypoxische Zellen festgestellt werden.

Betrachtet man die veränderten Genexpressionen nach 24 Hypoxie unter der EPO- Behandlung in den untersuchten Zellen, zeigt sich in der humanen Zelllinie ein deutlich positiver Einfluss auf die AMPKβ1-, Bax-, cleaved Caspase 3- Expression sowie auf die Freisetzung von Cytochrom c. Im Vergleich dazu konnte in LLC-PK1- Zellen neben der deutlich verringerten AMPKβ1- Expression durch EPO- Gabe neben der Cleavage der Caspase 3 auch die der Caspase 9 verringert werden.

Besonders auffällig ist jedoch, dass cEPO-FP in den humanen HEK293 Zellen einen besonders ausgeprägten Einfluss auf die Expression von Proteinen der Bcl-2- Familie und damit auf die Freisetzung von Cytochrom c auszuüben scheint. Ein positiver EPO- Effekt auf diese Proteinfamilie konnte z.B. bereits in Rattenzellen nach traumatischer Hirnschädigung beobachtet werden (Emir et al. 2004). In einer weiteren Arbeit zur Wirkweise von EPO bei neonatalem hypoxisch- ischämischen Hirnschaden konnte zudem eine verringerte Expression des Faktors Bax unter EPO- Einfluss gezeigt werden (Kumral et al., 2006). Vergleicht man den Einfluss beider Substanzen in Hypoxiezellen miteinander, ergibt sich ein vergleichsweise eindeutiges Bild. Scheinbar werden durch die Behandlung mit EPO respektive cEPO-FP proapoptotische Faktoren zu großen Teile inhibiert, antiapoptotische jedoch stimuliert, wodurch verglichen mit hypoxischen Zellen ohne Behandlung diese Zellen die Phase der Hypoxie theoretisch besser überstehen könnten. Da O_2- Mangel und oxidativer Stress aber nachweislich Zellschäden verursachen, könnten weiterhin genauere Untersuchungen von Schäden in den überlebenden Zellen, z.B. auf DNA- Ebene (Einzel- und Doppelstrangbrüche) von Interesse sein.

Dass bei einigen Faktoren zwar ein tendenzieller, jedoch kein signifikanter Effekt der jeweiligen Substanz nachgewiesen werden konnte, könnte an der Art der Verabreichung, d.h. Gabe ins Kulturmedium liegen. Es wurden nur geringe Mengen eingesetzt, da in Zellkulturen verabreichte Substanzen direkt an den Zellen angreifen und nicht wie unter physiologischen Bedingungen transportiert und/oder verstoffwechselt werden müssen. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass nicht alle Zellen mit den einzelnen Molekülen der verabreichten Substanzen interagieren konnten, da sehr kleine Mengen bzw. Volumina in die Kulturflaschen gegeben wurden. Trotz Schwenken der Kulturflaschen könnte es sein, dass sich die Substanzen nicht völlig gleichmäßig über die gesamte Oberfläche verteilt haben (keine optische Kontrolle möglich), somit nur lokal für einen Teil des

Zellverbandes verfügbar waren und sich daher bei der Bestimmung spezifischer Faktoren im Gesamtprotein aus allen Zellen kein signifikantes Ergebnis produzieren lies.

Neben dem Einfluss den beide Substanzen offenbar auf Proteine der Bcl-2- Familie auswirken, sticht ein weiterer Faktor ins Auge, der Inhibitor der Apoptose XIAP. Der Faktor ‚*X-linked inhibitor of apoptosis*' (XIAP) wurde unter hypoxischen Bedingungen von beiden Substanzen positiv beeinflusst. XIAP ist ein Regulator der Caspase Aktivität und damit der Apoptoseeinleitung in Zellen. Erwartungsgemäß unterliegt die Aktivität der Caspasen einer äußerst strengen Kontrolle, für die die Proteine der IAP- Familie (inhibitor of apoptosis proteins) von eminenter Wichtigkeit sind. IAPs wirken als endogene Inhibitoren der Apoptose und es konnte nachgewiesen werden, dass IAP-kodierende Sequenzen bei der Unterdrückung des programmierten Zelltods in mit Baculoviren infizierten Zellen eine entscheidende Rolle spielen (Crook et al., 1993; Birnbaum et al., 1994). Derzeit umfasst die humane IAP- Familie 8 dieser Proteine, wobei der antiapoptotische Effekt der IAPs durch direkte Bindung und Inhibition der Caspasen vermittelt wird. Bei der Bindung der IAPs an Caspasen handelt es sich scheinbar um einen selektiven Prozess. Beispielsweise inhibieren die Proteine XIAP, cIAP-1 und cIAP-2 spezifisch die Caspasen -3, -7, und -9, nicht aber die Caspasen -1, -6, -8, und -10 (Deveraux und Reed, 1999). In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass IAPs zum einen mit hoher Affinität an die aktiven Formen der Caspasen binden und daher einen sterischen Ausschluss der Interaktion mit Caspase- Substraten bedingen (Riedl et al., 2001; Huang et al., 2001; Chai et al., 2001); zum anderen ebenso mit inaktiven Vorläufern von Initiator-Caspasen, d.h. mit den Procaspasen interagieren, wodurch die autokatalytische Aktivierung des Enzyms (Cleavage) verhindert wird. Beide Wirkweisen konnten in dieser Arbeit ansatzweise beobachtet werden, da in Zellen mit erhöhter XIAP- Expression gleichzeitig eine zumindest tendenzielle Verringerung der aktiven Form der Caspase 3 bzw. 9 gezeigt werden konnte. Neben einer direkten Inhibierung wird zudem der proteasomale Abbau der Caspasen mittels Ubiquitinierung durch die IAPs reguliert. *In vitro*- Experimente zeigten eine Mono- Ubiquitinierung der Caspasen -3 und -7 durch cIAP-2 (Huang et al., 2000) sowie die Ubiquitinierung von Caspase-3 durch XIAP (Suzuki et al., 2001). Auf diese Weise gewährleisten IAPs einen Schutz vor Apoptose. Eine weitere Regulationsmöglichkeit für IAPs sind IAP-bindende Proteine, wie z.B. SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspase*)/Diablo. SMAC/Diablo wird nach Apoptoseeinleitung und Permeabilisierung des Mitochondrienmembran aus den Mitochondrien freigesetzt und ist dann ebenfalls als Aktivator von Caspasen wirksam. Diese Wirkung beruht auf der hochaffinen Bindung von SMAC/Diablo an XIAP, wobei die zuvor durch XIAP gebundenen und inaktivierten Caspasen (z.B. Caspase 3,7 und 9) von SMAC/Diablo verdrängt und auf diese Weise erneut aktiviert werden (Salvesen und Duckett, 2002) können. Dieser Zusammenhang zwischen SMAC

/Diablo und XIAP spiegelt sich in den Daten der Western Blot- Analysen wider. Unter hypoxischen Bedingungen konnte in den Zellen eine hohe SMAC/Diablo- Konzentration nachgewiesen werden, was den verringerten XIAP- Nachweis erklären könnte. Die Aktivität der IAPs selbst unterliegt strengen regulatorischen Mechanismen, wie z.B. der Inhibierung durch SMAC/Diablo. Weiterhin weisen IAPs einerseits zusätzlich eine sehr kurze Halbwertszeit auf, die auf eine aktive Autoubiquitinierung der Proteine zurückzuführen ist (Yang et al., 2000); andererseits stellen sie selbst Substrate als für die Prozessierung durch Caspasen dar. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit trotz nachweislich erhöhter Caspaseaktivität, reproduzierbar eine signifikant verringerte Menge des Faktors XIAP festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass sowohl EPO als auch cEPO-FP möglicherweise an dieser Stelle des apoptotischen Signalwegs schützend eingreifen. Aufgrund der geschilderten Ergebnisse sind in jedem Falle sowohl die Mitglieder der Bcl-2- Familie als auch XIAP geeignete Kandidaten für weiterführende Untersuchungen z.B. von RNA- und/oder DNA- Protein bzw. Protein- Protein- Wechselwirkungen oder durch gezielte Inhibierung der zu untersuchenden Gene mittels RNA- Interferenz (RNAi). Bei dieser Methode wird die spezifische mRNA des zu untersuchenden Gens aufgrund von Wechselwirkungen mit kleinen, spezialisierten, doppelsträngigen RNA- Molekülen (short interfering RNA; siRNA) unter Beteiligung mehrerer Enzymkomplexe abgebaut, so dass diese mRNA- Moleküle nicht translatiert und das entsprechende Protein nicht mehr gebildet werden kann. Im Vorteil dieser Methode ist, dass im Gegensatz zum „Knock out“ durch Genunterbrechung handelt keine vollständige und dauerhafte Repression erfolgt und es sich damit um einen „Knock down“ handelt.

Zusätzlich zu den Western Blot- Analysen wurde die Aktivierung der Caspase 3 und 7 sowie die zelluläre Proliferation hypoxischer Zellen mittels lumineszenbasierter Assays bestimmt. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Bestimmungen, werden die Ergebnisse aus den Western Blot- Analysen bestätigt. Nach 24 h Hypoxie konnte sowohl in HEK293- als auch in LLC-PK1- Zellen eine signifikant erhöhte Aktivierung der Caspase 3 und 7 demonstriert werden. Weiterhin konnte in beiden Zelllinien unter der Behandlung mit 100 IU cEPO-FP bzw. EPO eine signifikante Verringerung der Caspase 3/7- Aktivierung gemessen werden. Beim Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega) laufen unmittelbar hintereinander zwei enzymatische Schritte ab. Zunächst wird ein Substrat für die Caspasen 3 und 7 (Z-DEVD-Aminoluziferin) gespalten und setzt dabei Aminoluziferin, das wiederum als Substrat für eine thermostabile Luziferase dient. Diese Luziferase katalysiert eine Luziferasereaktion mit verlängerter Halbwertszeit, wodurch ein Lumineszenssignal gemessen werden kann, das direkt proportional zur Menge aktivierte Caspasen ist. Und damit ein sehr sensitiver und genauer Test für die Bestimmung der Caspase- Aktivierung. Aufgrund dieser Sensitivität dieses Test und der Tatsache, dass hier deutlich mehr Einzelexperimente durchgeführt werden konnten, kann davon

ausgegangen werden, dass beide Substanzen einen positiven Effekt in hypoxischen Zellen ausüben, was mit der Western Blot- Analyse nicht vollkommen eindeutig nachweisbar war. Analog zur Bestimmung der Caspase- Aktivierung konnte in den Proliferationsversuchen ein signifikant verringertes Proliferationsvermögen hypoxischer Zellen nachgewiesen werden. Der verwendete Vitalitätsassay ermittelt die Anzahl vitaler Zellen anhand der Quantifizierung von vorhandenem ATP, das als Indikator metabolisch aktiver Zellen gesehen werden kann. Die Menge an ATP ist hierbei direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen. Dadurch konnte in beiden Zelllinien gezeigt werden, dass sowohl cEPO-FP als auch EPO einen positiven Effekt auf das Proliferationsvermögen hypoxischer Zellen ausüben. Mit Hilfe der Genexpressions- Analysen auf Proteinebene sowie mit Hilfe der Lumineszenzassays konnte somit eine positive Wirkung beider Substanzen in hypoxischen Zellen bestätigt werden.

Nach 24 stündiger Reoxigenierung konnte allgemein sowohl in HEK293- als auch in LLC-PK1-Zellen ein zumindest tendenzieller Rückgang der untersuchten Expressionen in Richtung Kontrollniveau festgestellt werden. Einen deutlich positiven Einfluss, der sich auch noch in der Phase der Reoxigenierung nachweisen lässt, konnte lediglich in den humanen HEK293- Zellen auf die Faktoren AMPKβ1 (bei 100 IU EPO) und auf die Freisetzung von Cytochrom c (bei 100 IU cEPO-FP) detektiert werden. Bei allen weiteren untersuchten Faktoren scheint sich der Effekt, den beide Substanzen auf Hypoxiezellen ausüben, zu verlieren. Daher wurde zusätzlich das Proliferationsvermögen der reoxigenierten Zellen unter cEPO-FP bzw. EPO- Gabe bestimmt. Sowohl in HEK293- als auch in LLC-PK1- Zellen konnte eine signifikant verbesserte Proliferationsrate auch noch nach der Reoxigenierungsphase nach Gabe von 100 IU cEPO-FP während der Hypoxie, ermittelt werden. Unter EPO- Behandlung zeigte sich dieser Effekt jedoch nicht. Da cEPO-FP sowohl in den Western Blot- Analysen als auch bei den Bestimmungen zur zellulären Proliferation deutlich bessere Effekte als EPO zeigte, könnte spekuliert werden, dass die zusätzliche Carbamylierung dieses Moleküls in einer verbesserten Wirksamkeit niederschlägt, was jedoch in weiteren Versuchsreihen genauer abgeklärt werden müsste.

Da zwar positive, d.h. potentiell protektive Effekte auf Proteinebene und in den Bestimmungen zur Zellvitalität in hypoxischen Zellen verglichen mit unbehandelten Hypoxiezellen gezeigt werden konnten, deuten die weiteren Ergebnisse der reoxigenierten Zellen darauf hin, dass der in der Hypoxiephase noch so eindeutig positive Effekt der Substanzen im Laufe der Reoxigenierungsphase verloren geht. Da sich im Western Blot sowie bei beiden Assays keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten, reoxigenierten Zellen zeigen, scheinen die natürlichen Mechanismen in den Zellen auszureichen, um das Überleben einer 24 stündigen Hypoxiephase zu gewährleisten, wobei sich hierbei für die Zellen scheinbar kein Vorteil durch eine EPO bzw. cEPO-

FP- Behandlung ergibt. Die fehlenden Gruppenunterschiede bei den Bestimmungen Vitalität der reoxigenierten Zellen deuten darauf hin, dass die gewählte Hypoxiedauer von 24 h zwar prägnante Zellschäden verursacht, jedoch diese Effekte nicht ausreichen, um eine anhaltende Schädigung der natürlichen Reparaturmechanismen in den Zellen hervorzurufen. Um tatsächlich protektive Effekte der untersuchten Substanzen bei Hypoxie-/ Reoxigenierungsschäden besser zu beurteilen, sollte daher für weitere Versuchsreihen die Dauer der Hypoxie erhöht werden. Weiterhin erscheint es sinnvoll weitere Versuche nicht mehr mit der Gabe von 1 IU durchzuführen, da bei dieser Konzentration in keiner der untersuchten Faktoren eine signifikante Verbesserung bestimmt werden konnte. Außerdem sollte in Erwägung gezogen werden, die Substanzen ähnlich wie in den Großtierversuchen auch während der Reoxigenierungsphase zu verabreichen (Simon et al., 2008/1; Simon et al., 2008/2). Nicht nur die Gabe der zu testenden Substanzen, sondern auch die Phase der Hypoxie muss optimiert werden. Beispielsweise wäre es möglich zusätzlich sauerstoffabbauende Enzyme, wie die EC- Oxyrase (Oxyrase Inc. Mansfield, USA), einzusetzen, um den im Medium gelösten Sauerstoff schneller zu reduzieren (‚Petersen and Bradford, 2005). Um zukünftig ein verlässliches Vorhersagemodell für den Großtierversuch zu etablieren, sollte das Projekt nicht mit Zelllinien, sondern mit Primärzellen weitergeführt werden. Immortalisierte Zelllinien eignen sich durchaus für die Etablierung und Charakterisierung von Systemen wie diesem, jedoch ist die Immortalisierung von Zellen in der Regel mit einer Veränderung des Karyotyps der Zellen verbunden, da das aberrante Wachstumsverhalten der Zellen nur durch Modulation wachstumsregulierender Gene erreicht werden kann. Weiterhin kann das unnatürlich gesteigerte Wachstum von Zellen z.B. durch eine Transfektion mit Viren erhalten werden, wobei virale Signaltransduktionsprozess aktiviert werden, die die reguläre Zellphysiologie beeinflussen können. Daher repräsentieren immortalisierte bzw. transformierte Zellen nicht mehr die entsprechenden Vorläuferzellen aus der Primärkultur. Da für Primärkulturen daher grundsätzlich individuelle Hypoxiezeiten ausgelotet werden müssen, erscheint es sinnvoll das Projekt mit Primärkulturen weiter zu führen und zu optimieren. Etablierte Primärzellen können mittlerweile käuflich erworben werden und müssen nicht eigenständig präpariert und charakterisiert werden, was trotz der vergleichsweise hohen Kosten durch eine enorme Zeitersparnis und der Verwendung von gesichert etablierten und charakterisierten Zellen zweckmäßig erscheint. Aufgrund der Tatsache, dass I/R-Schäden nicht nur Organe wie Leber und Niere betreffen, sondern auch in besonderem Maße Auswirkungen auf spinale Funktionen haben, sollte das Projekt nicht nur für Nierenzellen weitergeführt werden, sondern auch auf neuronale Zellen übertragen werden. Des Weiteren könnten Experimente mit adaptierten Zellen von Interesse sein, um zu sehen ob die Zellen an hypoxischen Zustände adaptiert werden können, um später längere Hypoxiephasen besser zu bewältigen.

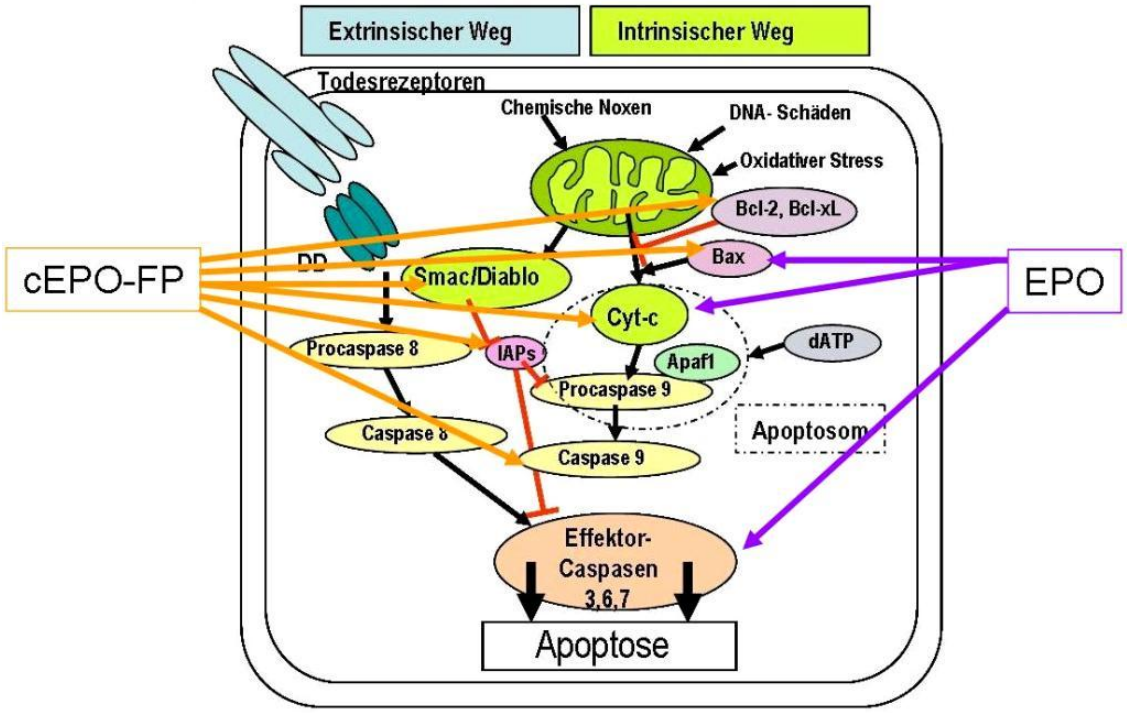

Abbildung 49: Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges sowie potentieller Einfluss (Pfeile) von Erythropoetin (EPO) bzw. carbamyliertem EPO (cEPO-FP) auf verschiedene Komponenten der beiden Wege. Abkürzungen: DD: death domain; Smac/Diablo: second derived mitochondria activator of caspase; IAPs: Inhibitoren der Apoptose; Cytc: Cytochrom c; Apaf1: apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1; Bcl2: B-cell lymphoma-related protein 2; Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large; Bax: Bcl-2-associated-X protein; dATP: Desoxyadenosintriphosphat

Unter Berücksichtigung aller in dieser Arbeit ermittelten Daten, kristallisiert sich ein starker Hinweis auf eine positiven Effekt beider Substanzen auf die Funktionalität von Nierenzellen während Hypoxieereignissen heraus, was zuvor beobachtete Effekte der Großtierversuche erklärt und bestätigt. Es zeigte sich in hypoxischen Zellen ein positiver Effekt von sowohl cEPO-FP als auch EPO auf einzelne Mitglieder der Bcl-2- Familie, der IAPs sowie auf die Cleavage der Effektorcaspase 3, 7 und der Initiatorcaspase 9, wobei scheinbar mehr Faktoren durch eine cEPO-FP- als durch die EPO- Behandlung positiv beeinflusst werden (vgl. Abb. 52)

Da die Proliferationsrate der Zellen, die die Hypoxiephase überleben, für die Regeneration gesamter Gewebeareale bzw. Organe von entscheidender Bedeutung ist und in dieser Arbeit ein positiver Effekt von EPO bzw. cEPO-FP in Hypoxiezellen gezeigt werden konnte, sollten weitere Untersuchungen, beispielsweise mittels RNAi- basierter Inhibierung z.B. der Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie durchgeführt werden, um die genaue Wirkweise beider Substanzen aufzuklären.

5. Zusammenfassung

Hintergrund dieser Arbeit sind die erarbeiteten Daten aus den Großtierstudien der Arbeitsgruppe. Am Schweinemodell konnten protektive Effekte verschiedener Substanzen, wie beispielsweise carbamyliertem Erythropoetin (cEPO-FP) auf die Funktion von Rückenmark und Niere während Clamping/Declaming- Experimenten gezeigt werden. Da diese Großtierversuche zwar funktionelle, klinisch relevante Daten hervorbringen, jedoch keinen Einblick in zelluläre und molekulare Prozesse ermöglichen, sollte in dieser Arbeit für humane und porcine Nierenzelllinien ein *in vitro*-Hypoxie/Reoxigenierungsmodell im Sinne einer Ischämie/Reperfusion (I/R) etabliert werden. Hierzu wurde die Kontrolle des Sauerstoff (O_2) - Milieus vorausgesetzt und letztendlich ein Kammersystem zur Induktion und Aufrechterhaltung der Hypoxie favorisiert. Um das Modell zu evaluieren, wurde in den untersuchten Nierenzelllinien HEK293 (human) und LLC-PK1 (porcin) die AMPKβ1- und HIF1α-Expression untersucht und es konnte nach einer 24 stündigen Hypoxiephase eine signifikante Steigerung beider Faktoren nachgewiesen werden. Daher wurde dieser Hypoxiezeitraum für alle weitern Versuche gewählt. Bei der weiteren Charakterisierung des Hypoxiemodells z.B. mittels zellspezifischen Färbungen, FACS- Analyse oder Expressionsuntersuchungen an apoptose-relevanten Genen konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, mit dem etablierten Modell verlässlich und effektiv Hypoxie und damit Hypoxie- induzierte Zellschäden aufgrund der erfolgreichen Manipulation des O_2- Milieus zu simulieren. Es konnten reproduzierbar hypoxische Schäden in den untersuchten Zelllinien induziert werden und nach Erhebung dieser Basisdaten die Wirkung von Erythropoetin (EPO) sowie carbamyliertem EPO (cEPO-FP) getestet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Versuche mit Nierenzelllinien bezüglich cEPO-FP bzw. EPO-Einfluss und den bisherigen Daten aus dem Großtiermodell durchaus Parallelen aufweisen. Analog zum verbesserten Outcome EPO- bzw. cEPO-FP- behandelter Tiere, konnte ein positiver Effekt beider Substanzen auf verschiedene an der Apoptoseregulation beteiligter Faktoren sowie auf das Proliferationsvermögen hypoxische Zellen nachgewiesen werden. Besonders zeichnen sich hierbei Wechselwirkungen mit den IAPs, den Inhibitoren der Apoptose sowie mit einigen Proteinen der Bcl-2- Familie ab, daher sollten für weitergehende Untersuchungen besonders diese Faktoren beachtet werden. Fehlende Gruppenunterschiede innerhalb der reoxigenierten Zellen deuten darauf hin, dass die Hypoxiedauer von 24 h möglicherweise zu kurz gewählt war. Zwar konnten mit dieser Hypoxiezeit deutliche Zellschäden hervorgerufen werden, die während der Hypoxie durch EPO bzw. cEPO-FP positiv beeinflusst werden konnten, jedoch zeigten die Ergebnisse auch, dass sich dieser Vorteil im Laufe der Reoxigenierungsphase zu verliert. Das System sollte daher bezüglich der

Hypoxiezeit und der Substanzgabe, d.h. mögliche Gabe auch während der Reoxigenierungsphase optimiert werden.

Um im Endeffekt ein verlässliches Vorhersagemodell für vielversprechende Substanzen für den Großtierversuch zu entwickeln, sollte dieser Ansatz mit Hilfe von Primärkulturen fortgeführt und optimiert werden.

Im Rahmen dieser Studie konnte ein starker Hinweis auf den protektiven Effekt von vor allem cEPO-FP, aufgrund der Regulation von Mitgliedern der Bcl-2- Familie sowie des Inhibitors der Apoptose XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) bei Hypoxie- induzierter Schädigung von Nierenzellen erarbeitet werden. Daher sollte dieser Ansatz in weiteren Untersuchungen experimentell fortgeführt werden, um die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Datenlage genauer einzuordnen.

6. Literaturliste (alphabetisch)

(1) **Abe** K, Aoki M, Kawagoe J, Yoshida T, Hattori A, Kogure K, Itoyama Y.: Ischemic delayed neuronal death: a mitochondrial hypothesis. Stroke 26:1478-1489 (1995)

(2) **Acehan** D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW: Threedimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. Mol Cell 9: 423-432 (2002)

(3) **Adams** JA and Cory .: The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 281: 1322-1326 (1998)

(4) **Adrain** C, Slee EA, Harte MT, Martin SJ: Regulation of apoptoticprotease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. J Biol Chem 274: 20855-20860 (1999)

(5) **Agoram** B, Aoki K, Doshi S, Gegg C, Jang G, Molineux G, Narhi L, Elliott S.: Investigation of the effects of altered receptor binding activity on the clearance of erythropoiesis-stimulating proteins: Nonerythropoietin receptor-mediated pathways may play a major role. J Pharm Sci 98: 2198-2211 (2009)

(6) **Alberts** B, Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: Programmend cell death (apoptosis). Molecular Biology of The Cell, 4. Auflage. Garland Science, New York: 1010-1025 (2002)

(7) **Ankarcrona** M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P.: Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. Neuron 15: 961-973 (1995)

(8) **Antonsson** B,Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC.: Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. Science 277: 370-372 (1997)

(9) **Antonsson** B und Martinou JC: The Bcl-2 protein family. Exp Cell Res 256: 50-57 (2000)

(10) **Antonsson** B.: Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim, the mitochondrion. Cell Tissue Res 306: 347-361 (2001)

(11) **Bachmann** S, Le Hir M, Eckardt KU: Colocalization of erythropoietin mRNA and ecto-5`-nucleotidase immunoreactivity in peritubulär cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. J Histochem Cytochem 41: 335-341 (1993)

(12) **Banai** S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E.: Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischemia; implications for coronary angiogenesis. Cardiovasc Res 28: 1176-1179 (1994)

(13) **Banasiak** KJ and Haddad GG: Hypoxia- induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. Brain Res 797: 295-304 (1998)

(14) **Beck** I, S Ramirez, R Weinmann, J Caro.: Enhancer element at the 3'- flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoetin gene. J Biol Chem 266: 15563-15566 (1991)

(15) **Blackstone** E, Morrison M, Roth MB: H_2S induces a suspended animation-like state in mice. Science 308: 518 (2005)

(16) **Blanchard** H, Kodandapani L, Mittl PR, Marco SD, Krebs JF, Wu JC, Tomaselli KJ, Grütter MG.: The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. Structure 7: 1125–1133 (1999)

(17) **Birnbaum** MJ, Clem RJ, Miller LK: An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. J Virol 58: 2521-2528 (1994)

(18) **Borner** C, Martinou I, attmann C, Irmler M, Schaerer E, Martinou JC,Tschopp J: The protein Bcl-2a does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. J Cell Biol 126: 1059-1068(1994)

(19) **Borner** C: The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. Mol Immun 39: 615-647 (2003)

(20) **Bonventre** JV, Force T: Mitogen-activated kinases and transcriptional response in renal injury and repair. Curr Opin Nephrol Hypertens 4: 425-433 (1998)

(21) **Cain** K, Brown DG, Langlais C, Cohen GM: Caspase activation involves the formation of the apoptosome, a large (appriximately 700 kDa) caspase-activating complex. J Biol Chem 274: 22686-22692 (1999)

(22) **Cain** K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, Cohen GM.: Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. J Biol Chem 27: 6067-6070 (2000)

(23) **Cain** K, Bratton SB, Cohen GM: The Apaf-1 apoptosome: a large caspaseactivating complex. Biochimi 84: 203-214 (2002)

(24) **Carmeliet** P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E: Role of HIF-1 alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation ans tumour angiogenesis. Nature 394: 485-490 (1998)

(25) **Castedo** M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Marchetti P, Macho A, Kroemer G.: Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. J Immunol 157: 512-521 (1996)

(26) **Chae** HJ, Kim SC, Han KS, Chae SW, An NH, Kim HM, Kim HH, Lee ZH, Kim HR: Hypoxia induces apoptosis by caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria in MC3T3E1 osteoblasts. P38 MAPK is related in hypoxia-induced apoptosis. Immunopharmacol Immunotoxicol 23: 133-152 (2001)

(27) **Chai** J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, Shi Y.: Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. Cell 104, 769-780 (2001)

(28) **Charlier** N, Leclere N, Felderhoff U, Heldt J, Kietzmann T, Obladen M, Gross J.: Hypoxia-induced cell death and changes in hypoxia-inducible factor-1 activity in PC12 cells upon exposure to nerve growth factor. Mol Brain Res 104: 21-30 (2002)

(29) **Chen Chiao** YC, Gurudath Rao K, Hook JW 3rd, Krugh TR, Sengupta SK..: 7-Aminoactinomycin D complexes with deoxynucleotides as models for the binding of the drug to DNA. Biopolymers 18, 1749-1762 (1979)

(30) **Chittenden** T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC: Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. Nature 374: S. 733-736 (1995)

(31) **Clark** LC: Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. Trans Am Soc Artif Intern Organs 2: 41 (1956)

(32) **Clemons** GK, Fitzsimmons SL, DeManincor D: Immunoreactive erythropoietin concentrations in fetal and neonatal rats and the effects of hypoxia. Blood 68: 892-899 (1986)

(33) **Crook** NE, Clem RJ, Miller LK. et al.: An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc fingerlike motif. J Virol 67: 2168-2174 (1993)

(34) **Dame** C, Bartmann P, Wolber E, Fahnenstich H, Hofmann D, Fandrey J: Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system. Dev Brain Res125: 69-74 (2000)

(35) **Darmon** AJ, Nicholson DW, Bleackley RC: Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. Nature 377: 446-448 (1995)

(36) **Davis** M, Whitely T, Turnbull DM, Mendelow AD: Selective impairments of mitochondrial respiratory chain activity during aging and ischemic brain damage. Acta Neurochir Suppl 70: 56-58 (1997)

(37) **Deveraux** Q L and Reed JC: IAP family proteins – suppressors of apoptosis. Genes Dev 13: 239-252 (1999)

(38) **Deveraux** QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC: Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. EMBO J 18: 5242-5251 (1999)

(39) **Dittrich** S: Untersuchungen zur Nierenfunktion bei der Behandlung angeborener Herzfehler. Med Habilitationsschrift, Humboldt-Universität Berlin (2001)

(40) **Duvall** E, Wyllie AH, Morris RG: Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). Immunology 56: 351-358 (1985)

(41) **Earnshaw** WC, Martins LM, Kaufmann SH: Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annu Rev Biochem 68: 383-424 (1999)

(42) **Emir** M, Ozisik K, Cagli K, Misirlioglu M, Ozisik P, Iscan Z, Yildirim E, Kilinc K, Sener E: Effect of erythropoietine on bcl-2 gene expression in rat cardiac myocytes after traumatic brain injury. Transplant Proc.36: 2935-2938 (2004)

(43) **Erecinska** M. and Silver I. A.: Ions and energy in mammalian brain. Prog Neurobiol 43: 37-71 (1994)

(44) **Fandrey** J: Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 286: 977-988 (2004)

(45) **Fernandes-Alnemri** T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES: In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. Proc Natl Acad Sci U S A; 93: 7464-7469 (1996)

(46) **Fiers** W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P.: More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. Oncogene 18(54): S. 7719-77130 (1999)

(47) **Fiordaliso** F, Chimenti S, Staszewsky L, Bai A, Carlo E, Cuccovillo I, Doni M, Mengozzi M, Tonelli R, Ghezzi P, Coleman T, Brines M, Cerami A, Latini R: A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. Proc Natl Acad Sci 102: 2046-2051 (2005)

(48) **Fisher** JW: Erythropoietin: Physiology and pharmacology update. Exp Biol Med 228: 1-14 (2003)

(49) **Fukuyama** Y, Ohta K, Okoshi R, Suehara M, Kizaki H, Nakagawa K: Hypoxia induces expression and activation of AMPK in rat dental pulp cells. J Dent Res 86 (9): 903-907 (2007)

(50) **Galson** DL, Tsuchiya T, Tendler DS, Huang LE, Ren Y, Ogura T, Bunn HF: The orphan receptor hepatic nuclear factor-4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. Mol Cell Biol 15: 2135-2144 (1994)

(51) **Gelman** S: The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. Anesthesiology 82: 1026-1060 (1995)

(52) **Gill** JE, Jotz MM, Young SG, Modest EJ, Sengupta SK: 7-Amino-actinomycin D as a cytochemical probe. I. Spectral properties. J Histochem Cytochem 23: 793-799 (1975)

(53) **Gross** A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ: Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. J Biol Chem 274: 1156-1163 (1999)

(54) **Gu** YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA: The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. Annu Rev Pharmacol Toxicol 40: 519-561 (2000)

(55) **Guo** S, Kim WJ, Lok J, Lee SR, Besancon E, Luo BH, Stins MF, Wang X, Dedhar S, Lo EH: Neuroprotection via matrix-trophic coupling between cerebral endothelial cells and neurons. Proc Natl Acad Sci USA 105: 7582-7587

(56) **Halterman** MW, Miller CC, Federoff HJ: Hypoxia- inducible factor-1 alpha mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. J Neurisci 19: 6818-6824

(57) **Hardie** DG: The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. J Cell Sci 117(Pt 23): 5479-5487 (2004)

(58) **Hengartner** MO, Ellis RE, Horvitz HR.: Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. Nature 356: 494-499 (1992)

(59) **Henry** P, Popescu A, Pucéat M, Hinescu ME, Escande D: Acute simulated ischaemia produces both inhibition and activation of K^+ currents in isolated ventricular myocytes. Cardiavasc Res 32: 930-939 (1996)

(60) **Henry- Mowatt** J, Dive C, Martinou JC, James D: Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. Oncogene 23: 2850-2860 (2004)

(61) **Hill** P. Shukla D, Tran MG, Aragones J, Cook HT, Carmeliet P, Maxwell PH: Inhibition of hypoxia inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia-reperfusion injury. Am Soc Nephrol 19: 39-46 (2008)

(62) **Höckel** M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Baussmann E, Mitze M, Knapstein PG, Vaupel P: Intratumoral pO2 predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. Radiother Oncol 26: 45-50 (1993)

(63) **Holloszy** Jo, Oscai LB, Don IJ, Molé PA: Mitochondrial citric cycle and related enzymes: adaptive response to exercise. Biochem Biophys Res Commun 40: 1368-1373 (1970)

(64) **Hon** WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY.: Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. Nature 417: 975-978 (2002)

(65) **Hood** DA, Zak R, Pette D: Chronic stimulation of rat skeletal muscle induces coordinate increases in mitochondrial and nuclear mRNAs of cytochrome-coxidase subunits. Eur J Biochem 179: 275-280 (1989)

(66) **Hotter** G, Palacios L, Sola A: Low O_2 and high CO_2 in LLC-PK1 cells culture mimics renal ischemia-induced apoptosis. Lab Invest 84: 213-220 (2004)

(67) **Huang** HK, Joazeiro CA, Bonfoco E, Kamada S, Leverson JD, Hunter T: The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. J Biol Chem 275: 26661-26664 (2000)

(68) **Huang** DC and Strasser A: BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. Cell 103: 839-42 (2000)

(69) **Huang** Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H: Strucutral basis of caspase inhibiton by XIAP: Differential roles of the linker versus the BIR domain. Cell 104: 781-790 (2001)

(70) **Ivan** M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr: HIFα targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. Science 292: 464-468 (2001)

(71) **Jaakkola** P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ: Targeting of HIF-1α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. Science 292: 468-472 (2001)

(72) **Jelkmann** W, Hellwig-Burgel T: Biology of erythropoietin. Adv Exp Med Biol 502: 169-187 (2001)

(73) **Kerr** JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26: 239-257 (1972)

(74) **Kiechle** FL and Zhang X: Apoptosis: a brief review. J Clin Ligand Assay 21: 58-61 (1998)

(75) **Kiefer** MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, Barr PJ: Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. Nature 374: 736-9 (1995)

(76) **Kluck** RM, Bossy- Wetzel E, Green DR and Newmeyer DD: The release of Cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 275: 1132-1136 (1997)

(77) **Krajewski** S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC: Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. Cancer Res 53: 4701-14 (1993)

(78) **Kribben** A, Edelstein CL, Schrier RW: Pathophysiology of acute renal failure. J Nephrol 12: 142-151 (1999)

(79) **Kristian** T and Siesjö BK: Calcium in ischemic cell death. Stroke 29: 705-718 (1998)

(80) **Kumral** A, Genc S, Ozer E, Yilmaz O, Gokmen N, Koroglu TF, Duman N, Genc K, Ozkan H: Erythropoietin downregulates Bax and DP5 proapoptotoc gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. Biol Neonate 89: 205-210 (2006)

(81) **Lacombe** C, Da Silva JL, Bruneval P, Fournier JG, Wendling F, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, Varet B, Tambourin P: Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. J Clin Invest 81: 620-623 (1988)

(82) **Ladoux** A and Frelin C: Cardiac expressions of HIF-1 alpha and HLF/EPAS, two basic loop helix/PAS domain transcription factors involved in adaptive respinse to hypoxic stresses. Biochem Biophys Res Commun 240: 552-556 (1997)

(83) **Lane** DP: Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 358: 15-16

(84) **Lecoeur** H, Ledru E, Gougeon ML: A cytofluorometric method for the simultaneous detection of both intracellular and surface antigens of apoptotic peripheral lymphocytes. J Immunol Methods 217: 11-26 (1998)

(85) **Leist** M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A: Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. Am J Pathol 146: 1220-1234 (1995)

(86) **Leist** M and Nicotera P: The shape of cell death. Biochem Biophys Res Commun 236: 1-9 (1997)

(87) **Leist** M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L, Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Cerami-Hand C, Xie QW, Coleman T, Cerami A, Brines M: Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. Science 305: 239-42 (2004)

(88) **Levy** AP, Levy NS, Loscalzo J, Calderone A, Takahashi N, Yeo KT, Koren G, Colucci WS, Goldberg MA: Regulation of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. Circ Res 76: 758-766 (1995)

(89) **Li** P, Nijhawan D, Budihardji I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 coplex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 91: 479-489 (1997)

(90) **Li** H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell 94: 491-501 (1998)

(91) **Liu** X, Kim CN, Yang J, Jemmersin R, Wang X: Induction of apoptotic programm in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell 86: 147-157 (1996)

(92) **Luo** X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X: Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell 94: 481-90 (1998)

(93) **Madan** A, Curtin PT: A 24-base pair sequence 3' to the human erythropoietin gene contains a hypoxia-responsive transcriptional enhancer. Proc Natl Acad Sci USA 90: 3928-3932 (1993)

(94) **Magnanti** M, Gandini O, Giuliani L, Gazzaniga P, Marti HH, Gradilone A, Frati L, Aglianò AM, Gassmann M: Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells. Blood 98: 2872-2874 (2001)

(95) **Maxwell** PH, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Nicholls LG, Tan CC, Doe BG, Ferguson DJ, Johnson MH, Ratcliffe PJ: Identification of the renal erythropoietinproducing cells using transgenic mice. Kidney Int 44: 1149-1162 (1993)

(96) **Maxwell** PH Ferguson DJ, Nicholls LG, Iredale JP, Pugh CW, Johnson MH, Ratcliffe PJ: Sites of erythropoietin production. Kidney Int 51: 393-401 (1997)

(97) **Maxwell** PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ: The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature 399: 271-275 (1999)

(98) **Meldrum** KK, Meldrum DR, Hile KL, Yerkes EB, Ayala A, Cain MP, Rink RC, Casale AJ, Kaefer MA: p38 MAPK mediates renal tubular cell TNF-alpha production and TNF-alpha-dependent apoptosis during simulated ischemia. Am J Physiol Cell Physiol 281: 563-570 (2001)

(99) **Min** JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr, Pavletich NP: Structure of an HIF-1α-pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. Science 296: 1886-1889 (2002)

(100) **Minn** AJ, Vélez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB: Bcl-xL forms an ion channel in synthetic lipid membranes. Nature 385: 353-7 (1997)

(101) **Muzio** M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM: An induced proximity model for caspase-8 activation. J Biol Chem 273: 2926-30 (1998)

(102) **Naismith** JH and Sprang SR:. Trends Biochem Sci 23: 74-79 (1998)

(103) **Nicholson** DW: Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ 6: 1028-1042 (1999)

(104) **Nicholson** DW and Thornberry NA: Caspases: killer proteases. Trends Biochem Sci (22) (1997)

(105) **Nicholson** DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA et al.: Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature 376: 37-43 (1995)

(106) **Nissenson** AR: Acute renal failure: Definition and pathogenesis. Kidney Int 53 : 7-10 (1998)

(107) **Ott** M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S: Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. Proc Natl Acad Sci USA 99: 1259-1263 (1998)

(108) **Oltvai** ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death. Cell 74: 609-19 (1993)

(109) **Patterson** SD, Spahr CS, Daugas E, Susin SA, Irinopoulou T, Koehler C, Kroemer G: Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. Cell Death Differ 7: 137-1344 (2000)

(110) **Petersen** JP and Bradford PA: Effect of medium age and supplementation with the biocatalytic oxygen- reducing reagent Oxyrase on in vitro activities of tigecycline against recent clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 49: 3910-3918 (2005)

(111) **Philpott** NJ, Turner AJ, Scopes J, Westby M, Marsh JC, Gordon-Smith EC, Dalgleish AG, Gibson FM: The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. Blood 87: 2244-2251 (1996)

(112) **Pugh** CW, Tan CC, Jones RW, Ratcliffe PJ: Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci USA 88: 10553-10557 (1991)

(113) **Qanungo** S, Starke DW, Pai HV, Mieyal JJ, Nieminen AL. Suparna Q. et al.: Glutathione Supplementation Potentiates Hypoxic Apoptosis by *S*-Glutathionylation of p65-NFκB. J Biol Chem 282: 18427-18436 (2007)

(114) **Qanungo** S, Starke DW, Pai HV, Mieyal JJ, Nieminen AL. Suparna Q. et al.: Glutathione Supplementation Potentiates Hypoxic Apoptosis by *S*-Glutathionylation of p65-NFκB. J Biol Chem 282: 18427-18436 (2007)

(115) **Rapoport** SM: Medizinische Biochemie. 8. Auflage. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1983)

(116) **Ravagnan** L, Roumier T, Kroemer G: Mitochondria, the killer organelles and their weapons. J Cell Physiol 192:131-13 (2002)

(117) **Riedl** SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS: Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. Cell 104: 791-800 (2001)

(118) **Rodriguez** J and Lazebnik Y: Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. Genes Dev 13: 3179-3184 (1999)

(119) **Rolfs** A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH: Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. J Biol Chem 272: 20055-20062 (1997)

(120) **Salvesen** GS and CS Duckett: IAP proteins: blocking the road to death's door. Nat Rev Mol Cell Biol 3: 401-410 (2002)

(121) **Savill** J, Fadok V, Henson P, Haslett C: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. Immunol Today 14: 131-136 (1993)

(122) **Savill** J: Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Br Med Bull 53: 491-508 (1997)

(123) **Schendel** SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC: Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 5113-5118 (1997)

(124) **Schlegel** J, Peters I, Orrenius S, Miller DK, Thornberry NA, Yamin TT, Nicholson DW: CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. J Biol Chem 271: 1841-1844 (1996)

(125) **Schofield** CJ and Ratcliffe PJ: Oxygen sensing by HIF hydroxylases. Nat Rev Mol Cell Biol 5: 343-354 (2004)

(126) **Semenza** GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE: Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci USA 88: 5680-84 (1991)

(127) **Semenza** GL, Wang GL: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol Cell Biol 12: 5447–5454 (1992)

(128) **Semenza** GL: Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostastis. J Lab Clin Med 131: 207-214 (1998)

(129) **Shen** Y and White E: p53-dependent apoptosis pathways. Adv Cancer Res 82: 55-84 (2001)

(130) **Shi** Y: A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. Nat Struct Biol 8:394-401

(131) **Silverthorn** CF, Alani RM: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression is altered by hypoxia in melanoma cells and primary human melanocytes. Melanoma Res 20: 61-63 (2010)

(132) **Simon** F, Giudici R, Duy CN, Schelzig H, Oter S, Gröger M, Wachter U, Vogt J, Speit G, Szabó C, Radermacher P, Calzia E: Hemodynamic and metabolic effects of hydrogen sulphide during porcine ischemia/reperfusion injury. Shock 30: 359-364 (2008/1)

(133) **Simon** F, Scheuerle A, Calzia E, Bassi G, Oter S, Duy CN, Kick J, Brückner UB, Radermacher P, Schelzig H: Erythropoietin during aortic balloon occlusion-induced ischemia/reperfusion injury. Crit Care Med 36: 2143-2150 (2008/2)

(134) **Slee** EA, Adrain C, Martin SJ: Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. J Biol Chem 276: 7320-7326 (2001)

(135) **Srinivasula** SM, Datta P, Fan XJ, Fernandes-Alnemri T, Huang Z, Alnemri ES. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. J Biol Chem 275:36152-36157 (2000)

(136) **Stephan** H, Polzar B, Mannherz HG: Sein oder nicht sein? Naturwissenschaftliche Rundschau 624: 273-281 (2000)

(137) **Suzuki** Y, Nakabayashi Y, Takahashi R: Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. Proc Natl Acad Sci 98: 8662-8667 (2001)

(138) **Toutain** H and Morin JM: Renal proximal tubule cell cultures for studying drug-induced nephrotoxicity and modulation of phenotype expression by medium components. Renal Failure 14: 371-383 (1992)

(139) **Truglio** JJ, Theis K, Leimkühler S, Rappa R, Rajagopalan KV, Kisker C: Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from Rhodobacter capsulatus. Structure 10: 115-125 (2002)

(140) **Tsujimoto** Y, Croce CM: Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. Proc Natl Acad Sci US A 83: 5214-5218 (1986)

(141) **van den Eijnde** SM, Boshart L, Baehrecke EH, De Zeeuw CI, Reutelingsperger CP, Vermeij-Keers C: Cell surface exposure of phospatidylserine during apoptosis is pylogenetically conserved. Apoptosis 3: 9-16 (1998)

(142) **van Engeland** M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP: Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry 31: 1-9 (1998)

(143) **Vanheel** B, Leybaert L, De Hemptinne A, Leusen I: Simulated ischemia and itracellular pH in isolated ventricular muscle. Am J Physiol Cell Physiol 257: 365-C376 (1989)

(144) **Vermes** I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods 184: 39-51 (1995)

(145) **Wadkins** RM and Jovin TM: Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA. Biochemistry 30: 9469-9478 (1991)

(146) **Walton** M, Sirimanne E, Reutelingsperger C, Williams C, Gluckman P, Dragunow M: Annexin V labels apoptotic neurons following hypoxia-ischemia. Neuroreport 8: 3871-3875 (1997)

(147) **Wang** X: The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev 15: 2922-33 (2001)

(148) **Waud** WR and Rajagopalan KV: The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD+-dependent form (type D) to an O2-dependent form (type O). Arch Biochem Biophys 172: 365-379 (1976)

(149) **Wei** MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ: Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. Science 292: 727-30 (2001)

(150) **Willett** WC, Stampfer MJ: Clinical practice. What vitamins should I be taking, doctor? N Engl J Med 345: 1819-1824 (2001)

(151) **Williams** RS, Salmons S, Newsholme EA, Kaufman RE, Mellor J: Regulation of nuclear ans mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. J Biol Chem 5: 376-380 (1986)

(152) **Wilson** KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA: Structure and mechanism of interleukin-1ß converting enzyme. Nature 370: 270–274 (1994)

(153) **Witting** A: Erkennung apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen *in vitro*. Biolog Dissertation, Humboldt-Universität Berlin (2000)

(154) **Wyllie** AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284: 555-556 (1980)

(155) **Yang** YL, Li XM: The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. Cell Res 10: 169-77 (2000)

(156) **Yoshimura** S, Banno Y, Nakashima S, Takenaka K, Sakai H, Nishimura Y, Sakai N, Shimizu S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Nozawa Y: Ceramide formation leads to caspase-3 activation during hypoxic PC12 cell death. Inhibitory effects of Bcl-2 on ceramide formation and caspase-3 activation. J Biol Chem 273: 6921-6927 (1998)

(157) **Yuan** J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR: The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. Cell 75: 641-652 (1993)

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

(159) **Zou** H, Li Y, Liu X, Wang X: An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. J Biol Chem 274: 11549-11556 (1999)

Name, Vorname: Evelyn Jäger…….....

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich habe keine Promotionsversuche an anderen Universitäten unternommen.

Es laufen keine Strafverfahren gegen mich.

.....
Datum, Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Dank sagen, die mich im Laufe der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, begleitet haben.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Orend sowie Prof. Dr. Ludger Sunder-Plassmann danke ich für die Aufnahme in die Abteilung und die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Meinem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Uwe Knippschild danke ich sehr für das kurzfristig benötigte, aber nichtsdestotrotz sehr freundliche und intensive Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hubert Schelzig, der mich immer beispiellos und unkompliziert bei fachlichen und organisatorischen, aber auch privaten Problemen unterstützte. Ich sehe all dies nicht als selbstverständlich an. Ich weiß alles, was Sie für mich getan und mir ermöglicht haben sowie das Vertrauen, welches Sie mir stets entgegengebracht haben, sehr zu schätzen.

Herrn Prof. Dr. Peter Rademacher und Herrn Prof. Dr. Enrico Calzia danke ich für viele fruchtbare Gespräche und Anregungen, ihr immerwährendes Interesse an meiner Arbeit und stete Hilfsbereitschaft einen ‚abteilungsfremden' Doktoranden herzlich in ihr Labor aufzunehmen und zu unterstützen. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Günter Speit für die freundliche Unterstützung und seine bereitwillige Begleitung als Prüfer trotz einiger Wirrungen.

Nicht zuletzt danke ich den Leuten, die mich tagtäglich ertragen haben. Ohne Euch hätte ich die letzten Jahre nicht überstanden! Flo, unsere hochphilosophischen Unterhaltungen werden mir fehlen (Don't Panic – 42)! Deine stoische Geduld beim Erklären gewisser Statistik- Ungereimtheiten werden mir gleichermaßen in Erinnerung bleiben, wie unsere gemeinsamen Kongresse, nächtliche Schlittenfahrten und fragwürdiger Wodka-Martini- Genuss. Nicole, danke für Deine unermüdliche Hilfe im Labor und Deine Schlagfertigkeit gegenüber gewissen Personen. Wir haben sehr viel gelacht und es hat unglaublich viel Spaß gemacht, mit Dir zu arbeiten. Pass auf Deinen linken Lungenflügel auf! Anika, Danke für alles und einfach auf den Frosch drücken, wenn es mal wieder zu viel wird! Andrea, Danke für Deine immerwährende Unterstützung (auch nach Abteilungswechsel), Deine SAP- Kenntnisse, die es mir oft ersparten…, Kaffeeklatsch, Katzenanekdoten und Cocktails-to-go. Bettina, Danke, dass Du Dein praktisch unerschöpfliches Laborwissen immer mit mir geteilt hast, dass Du immer zur richtigen Zeit, den richtigen Witz auf Lager hattest, immer schon kurz vor halb 12 daran gedacht hast, dass wir nicht verhungern und dafür gesorgt hast, dass ich Zwiebeln nicht mehr auf die herkömmliche Weise schneiden muss. Rosi, Danke dafür, dass Du immer noch eine weitere Idee hattest, wie man die Banden noch ein bißchen besser hinkriegt oder überhaupt welche sichtbar macht und für Deinen großzügigen, grünen Daumen, der uns mit Ablegern diverser

Kräuter und Pflanzen bis hin zum Kürbis versorgt hat. Dir und Gertrud sei auch für die Verpflegung mit Kaffee und Keksen, die immer zur rechten Zeit kam, gedankt. Anfänglich aus Kollegen seid Ihr mir alle gute Freunde geworden! Ihr habt dafür gesorgt, dass ich immer ein Licht am Ende des Doktorarbeitstunnels gesehen habe.

Ganz besonders danke ich natürlich meinen Eltern und meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung während der letzten Jahre. Sie waren immer für mich da und haben mein Studium und meine Doktorarbeit erst möglich gemacht.

Mein letzter Dank gilt meiner Hauptstütze, meinem Freund Steffen Weick. Ich weiß, dass ich Dich zu Weilen sehr strapaziert und vieles vorausgesetzt habe, was nicht immer selbstverständlich war. Trotz allem warst Du in dieser anstrengenden Zeit stets für mich da und hast mich gestärkt und mich mit viel Geduld immer wieder motiviert.

Ich weiß mein Glück zu schätzen. Ich danke Euch allen!