Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Neurologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. C. Ludolph

Erythropoietin im Liquor cerebrospinalis: altersabhängige Referenzwerte und Relevanz bei neurologischen Erkrankungen

Dissertation

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

Karin Ehrnthaller
München

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hayrettin Tumani

---

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Groß

Tag der Promotion: 18.12.2008

Meinen Eltern
Gertraud und Walter Widl und meinem Christian
in großer Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Erythropoietin im menschlichen Gehirn 1

1.2. Erythropoietin außerhalb des zentralen Nervensystems 2

1.2.1. Produktionsorte und Funktionen 2

1.2.2. Sauerstoffabhängige Expression und intrazelluläre Signalkaskaden 4

1.2.3. Physiko-chemische Daten 5

1.3. Erythropoietin und Erythropoietin-Rezeptor im Nervensystem 7

1.3.1. Vorkommen von Erythropoietin und seinem Rezeptor 7

1.3.2. Bedeutung von Erythropoietin für die Entwicklung des Nervensystems 7

1.3.3. Neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften 8

1.3.4. Erster Einsatz von rekombinantem EPO bei Schlaganfallpatienten 11

1.4. Fragestellung der vorliegenden Arbeit 12

2. Material und Methoden 13

2.1. Probengewinnung und Aufbewahrung 13

2.2. Konzentration des Liquor cerebrospinalis 16

2.3. Erythropoietin ELISA 18

2.4. Stabilitätsversuche von Erythropoietin im Liquor 24

2.5. Klinische Gruppeneinteilung 25

2.5.1. Auswahl der Normalkontrollen 25

2.5.2. Blut-Liquor-Schrankenfunktionsstörungen 26

2.5.3. Neurodegenerative Erkrankungen 27

2.5.4. Depression 28

2.6. Statistische Auswertung 30

3. Ergebnisse 31

3.1. Validierung des Erythropoietin ELISA 31

3.1.1. Wiederfindung 31

3.1.2. Linearität 31

3.1.3. Richtigkeit und Präzision 33

3.1.4. Standardkurven und Sensitivität 34
3.2. Stabilität von Erythropoietin im Liquor cerebrospinalis 35
3.2.1. Langzeitstabilität 35
3.2.2. Stabilität während Einfrier/- Auftauzyklen 35
3.3. Normalwerte von Erythropoietin im Serum und Liquor 36
3.4. Korrelation von Erythropoietin im Liquor mit dem Alter 39
3.5. Unabhängigkeit der Konzentration vom Geschlecht 40
3.6. Unabhängigkeit der Konzentration von der Blut-Liquor-Schranke 41
3.7. Ergebnisse der klinischen Gruppen 43
3.7.1. Erythropoietin im Liquor von ALS Patienten 43
3.7.2. Erythropoietin im Liquor bei Demenzen 44
3.7.3. Erythropoietin im Liquor von Patienten mit Depressionen 45
3.8. Multivariater Gruppenvergleich 47
4. Diskussion 49
4.1. Bedeutung der Studie 49
4.2. Diskussion der Methodik 49
4.2.1. Qualität des Erythropoietin ELISA 49
4.2.2. Herstellung des Liquorkonzentrates 50
4.2.3. Lagerung der Proben 51
4.2.4. Durchführung des Erythropoietin ELISA 52
4.2.5. Auswahl der klinischen Gruppen 52
4.3. Diskussion der Ergebnisse 56
4.3.1. Etablierung von Referenzwerten 56
4.3.2. Stabilität von Erythropoietin im Liquor cerebrospinalis 57
4.3.3. Herkunft von Erythropoietin im Liquor cerebrospinalis 58
4.3.4. Ergebnisse der klinischen Gruppen 59
4.4. Relevanz der Erythropoietin-Messungen im Liquor 61
4.5. Schlussfolgerungen 63
5. Zusammenfassung 64
6. Literaturverzeichnis 66
Danksagung
Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

Å =	Angström
Abb. =	Abbildung
Aβ 1-42 =	Amyloid Beta 1-42
AG =	Aktiengesellschaft
ALS =	Amyotrophe Lateralsklerose
Anti-EPO-AK =	Anti Erythropoietin Antikörper
ARNT =	Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
Bcl-2 =	B-Cell Lymphomagene (B-Zell-Lymphom-2 Proteinfamilie)
BCL-$_{XL}$.=	Long Splicing Variant of a Bcl-2 Related Gene
BFU-E =	Erythroid Burst Forming Unit
bidest. =	bidestillatus
°C =	Grad Celsius
CFU-E =	Erythroid Colony Forming Unit
Co. =	Compagnie
CT =	Computertomographie
CTRL =	Kontrolle
DNA =	Desoxyribonukleinsäure
DSM IV =	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fourth Edition
EAE =	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA =	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPO =	Erythropoietin
EPO-R =	Erythropoietinrezeptor
et al. =	et alii (lateinisch, bedeutet: und andere)
FIH =	Factor Inhibiting Hypoxia Inducible Factor 1
g =	Schwerebeschleunigung der Erde = 9,81 Meter pro Sekunde²
GmbH =	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GBS =	Guillain-Barré-Syndrom
g/l =	Gramm pro Liter
Hb =	Hämoglobinkonzentration
HCP =	Hämopoietic Cell Phosphatase
HIF-1 =	Hypoxia Inducible-Factor 1

Ig =	Immunglobulin
IL-6 =	Interleukin 6
Inc. =	Incorporated
JAK2 =	Januskinase 2
kb =	Kilobasenpaare
kDa =	Kilodalton
KG =	Kommanditgesellschaft
LWK =	Lendenwirbelkörper
MA =	Massachusetts
MAPK =	Mitogen Activated Protein Kinase
µl =	Mikroliter
mg/l =	Milligramm pro Liter
ml =	Milliliter
mmol/l =	Millimol pro Liter
MN =	Minnesota
mRNA =	messenger Ribonukleinsäure
MRT =	Magnetresonanztomographie
MS =	Multiple Sklerose
n =	Anzahl
NaCl =	Natriumchlorid
NF κB =	Nuclear Factor Kappa B
NIH =	National Institutes of Health
NINDS-ADRDA =	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer´s Disease and Related Disorders Association
NINDS-AIREN =	National Institute of Neurological Disorders and Stroke – Association Internationale pour la Recherche et l´Enseignement en Neurosciences
NO =	Stickstoffmonoxid
nm =	Nanometer
N =	Normalität
n. s. =	nicht signifikant
NSE =	Neuronenspezifische Enolase
OD =	Optical Density

p =	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBK / Akt 1=	Proteinkinase B
PC =	Personal Computer
PDH =	Prolylhydroxylase Domänen
PGF2α =	Prostaglandin F2 alpha
Pool-Liquor =	gesammelter Liquor ohne pathologischen Befund
Procc. spinosi =	Proccessi spinosi = Dornfortsätze
Q_{Alb} =	Albuminquotient
Q_{EPO} =	Erythropoietinquotient
R^2 =	lineares Bestimmtheitsmaß
RAS =	Rat Sarcoma Virus Oncogene
rhEPO =	rekombinantes humanes Erythropoietin
SCF =	Stem Cell Factor
St. =	Standard
STAT =	Signal Transducers and Activators of Transcription
Tab. =	Tabelle
TNF =	Tumor Necrosis Factor
UK =	United Kingdom
USA =	United States of America
VC =	Variation Coefficient (Variationskoeffizient)
VEGF =	Vascular Endothelial Growth Factor
WSXWS =	Abfolge von Aminosäuren in Proteinen: Tryptophan-Serin-variable Aminosäure-Tryptophan-Serin
ZNS =	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Erythropoietin im menschlichen Gehirn

Erythropoietin (EPO) ist vor allem für seine die Erythropoese fördernden Eigenschaften bekannt, welche therapeutisch sogar als Dopingmittel im Hochleistungssport zur Leistungssteigerung genutzt werden [34, 45]. Das von den Interstitialzellen der Niere gebildete Hormon bindet hierfür an Rezeptoren auf Progenitorzellen der roten Reihe im Knochenmark und initialisiert über intrazelluläre Signalkaskaden Zellprogramme, die die Apoptose der Zellen verhindern. Folglich reifen vermehrt Erythrozyten heran [34, 44, 46]. Die Tatsache, dass EPO auch in anderen Organsystemen Aufgaben übernimmt, ist erst durch intensive Forschung der letzten Jahre ins Interesse gerückt. Studien zeigten bislang nicht bekannte Produktionsorte wie die Plazenta, den Hoden, das Ovar oder, für uns von besonderem Interesse, das Gehirn [20, 46, 51, 57, 72, 110]. In Zellkulturstudien konnte eine EPO-Produktion durch Astrozyten und Neurone sowie eine Expression des Erythropoietin-Rezeptors (EPO-R) auf Neuronen nachgewiesen werden [51, 72, 75, 100]. Bislang zeigte sich eine wichtige Beteiligung des EPO in der Entwicklung des Nervensystems [51, 57, 67], sowie zahlreiche neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften. Diese wurden in Tierversuchen bei cerebralen Ischämien, Rückenmarksschädigungen oder bei Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) bestätigt [26, 30, 34, 46, 59, 62, 67, 94, 97]. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse machen EPO zu einem vielversprechenden Forschungsobjekt und Hoffnungsträger in Bezug auf neurologische Erkrankungen.

Inwieweit EPO auch diagnostisch eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen spielt oder ob es als diagnostischer Parameter im Liquor cerebrospinalis von Bedeutung ist, ist noch unbeantwortet und daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.2. Erythropoietin außerhalb des zentralen Nervensystems

1.2.1. Produktionsorte und Funktionen

EPO wird während der Fetalzeit in der Leber produziert, wobei eine EPO-mRNA-Expression bei Hepatozyten und Ito-Zellen nachgewiesen werden konnte [25, 35, 61]. Bedingt durch die postnatalen Umstellungen in der Oxygenierung wird die systemische Produktion dann in die Niere verlagert. Dort konnten die peritubulären interstitiellen Zellen als EPO-Produzenten identifiziert werden [34, 60].

In neuerer Zeit konnte gezeigt werden, dass der Cytotrophoblast und der Syncytiotrophoblast EPO produzieren. Das gebildete EPO scheint hierbei Effekte auf die Migration und Differenzierung des Cytotrophoblast zu haben und beeinflusst unter Umständen sogar dessen Überleben [20].

Doch auch in anderen Geweben wie der Lunge, der Milz und dem Hoden wurde EPO-mRNA inzwischen nachgewiesen. In der Muskulatur, dem Darm oder dem Knochenmark wurden bislang keinerlei Hinweise für EPO-Produktion gefunden [104].

Eine der systemischen Hauptfunktionen des EPO ist die sauerstoffabhängige Regulation der Hämatopoese der roten Reihe. Das unter hypoxischen Bedingungen vermehrt gebildete EPO gelangt über den Blutweg in das Knochenmark und bindet dort an zellständige Rezeptoren der Zellreihen BFU-E und CFU-E, beides Progenitorzellen der roten Zellreihe [38, 39]. Durch diese Interaktion wird die Apoptoserate der Zelllinien verringert und es reifen vermehrt Zellen von der BFU-E über die CFU-E, den Normoblasten und den Retikulozyten zum Erythrozyten heran. Es stehen somit mehr Sauerstoffträger zur Verfügung und die bestehende Hypoxie kann vermindert werden [34].

Neuere Studien weisen auf weitere Funktionen des EPO hin: So scheint EPO unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen protektiv und antiapoptotisch auf Kardiomyozyten zu wirken, welches zum einen durch direkte Effekte auf die Kardiomyozyten und zum anderen durch vermehrte Gefäßneubildung vermittelt werden soll [14, 67, 88, 95, 96]. Die Induktion der Angiogenese scheint durch eine vermehrte Migration und Mobilisation von endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark und peripheren Endothelzellen stimuliert zu werden. Insbesondere die vermehrte Anzahl an zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen könnte sich günstig auf die Revaskularisation ischämischer Gewebe auswirken [3, 43, 46, 67].

Diese Mechanismen spielen wahrscheinlich auch eine Rolle im Uterus und an den Ovarien [110]. Zudem zeigt sich EPO protektiv auf hypoxisch-ischämische Modelle der Retina, da durch therapeutische Intervention mit rhEPO (rekombinantes humanes Erythropoietin) größerer morphologischer und funktioneller Schaden vermieden werden konnte [30, 36, 50].

Weitere systemische Effekte des EPO sind die vermehrte Freisetzung von Vasomodulatoren. So werden zum einen Vasokonstriktoren wie Endothelin, Prostaglandin $F_{2\alpha}$, Thromboxan B_2 und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 gebildet [9, 15, 46, 55, 81], aber auch vasodilatative Substanzen wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) werden vermehrt synthetisiert (Tab. 1) [46, 85].

An dieser Stelle sollte zudem erwähnt werden, dass es Varianten von EPO wie Asialo-EPO gibt, welche durch eine veränderte Glykosylierung keine peripheren hämatopoetischen Effekte mehr haben, jedoch in Studien bislang neuroprotektive Eigenschaften aufwiesen [66, 67].

Tab. 1: Tabellarische Darstellung der wichtigsten systemischen Produktionsorte und Funktionen von Erythropoietin (EPO): *In der linken Spalte sind die Produktionsorte und in der rechten Spalte die zugehörigen Funktionen aufgeführt.*

Produktionsorte	Funktionen
Niere: peritubuläre interstitielle Zellen	sauerstoffabhängige Regulation der Hämatopoese → Steigerung der Erythropoese im Knochenmark
Leber: Hepatozyten, Ito-Zellen	EPO-Produktion während Fetalzeit
Plazenta: Cytotrophoblast, Syncytiotrophoblast	Migration und Differenzierung des Cytotrophoblast, Beeinflussung des Überlebens des Cytotrophoblast?
kein spezifischer Produktionsort nachgewiesen	→ Protektion von Kardiomyozyten, Retina unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen → Induktion der Angiogenese → Freisetzung von Vasomodulatoren

1.2.2. Sauerstoffabhängige Expression und intrazelluläre Signalkaskaden

Die Sauerstoffabhängigkeit der EPO und EPO-R Expression gilt sowohl in peripheren Geweben als auch im Gehirn und soll an dieser Stelle deshalb etwas genauer abgehandelt werden. Hierbei ist der Hypoxia-Inducible-Factor HIF-1 von großer Bedeutung. Es handelt sich dabei um einen heterodimeren Transkriptionsfaktor, der aus einer 120 kDa α-Untereinheit und einer 91-94 kDa β-Untereinheit besteht [67]. Die β-Untereinheit ist stabil und dient als Aryl-hydrocarbon-Receptor-Nuclear-Translocator (ARNT), während die α-Untereinheit unter normoxischen Bedingungen instabil ist. Sie wird unter Normoxie an Prolylresten von Enzymen mit Prolylhydroxylase-Domänen (PDH) oder dem Factor-Inhibiting-HIF-1 (FIH) hydroxyliert [70]. Unter hypoxischen Bedingungen sind PDH und FIH inaktiv und es findet keine Hydroxylierung und Degradation der α-Untereinheit statt. So kann HIF-1α dann in den Kern transloziert werden und mit der sich bereits im Kern befindenden β-Untereinheit zum aktiven HIF-1 dimerisieren. Dieses bindet an den Hypoxia-Responsive-Enhancer an der 3´ Region des EPO Gens und aktiviert die Transkription von EPO [67, 70].
Im weiblichen Genitaltrakt hat sich eine östrogenabhängige EPO Genexpression gezeigt [67, 110]. Es wird mittlerweile aber auch vermutet, dass metabolischer Stress wie Hypoglykämie, Anämie, vermehrte Insulinspiegel, erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel oder starke neuronale Depolarisierung die EPO Expression fördern [67].
Alle in peripheren Geweben stattfindenden intrazellulären Signalkaskaden des EPO führen zu vermehrter Proliferation, Differenzierung und verminderter Apoptoserate [46]. Mechanismen, die hierbei eingeschaltet sind, sind unter anderem die Bindung des EPO-Moleküls an seinen zellständigen Rezeptor, dessen Dimerisierung und Aktivierung durch Autophosphorylierung und die dadurch im Weiteren aktivierten Signalwege. Dazu zählen die RAS/MAP-Kinase Kaskade, die Aktivierung von STAT-Proteinen, der Phosphatidylinositol-3-Kinase, NF-κB, die Interaktion mit SCF und die Expression des antiapoptotischen Proteins BCL-$_{XL}$ (Abb. 1) [21, 34, 37, 46, 70, 79, 87, 108].

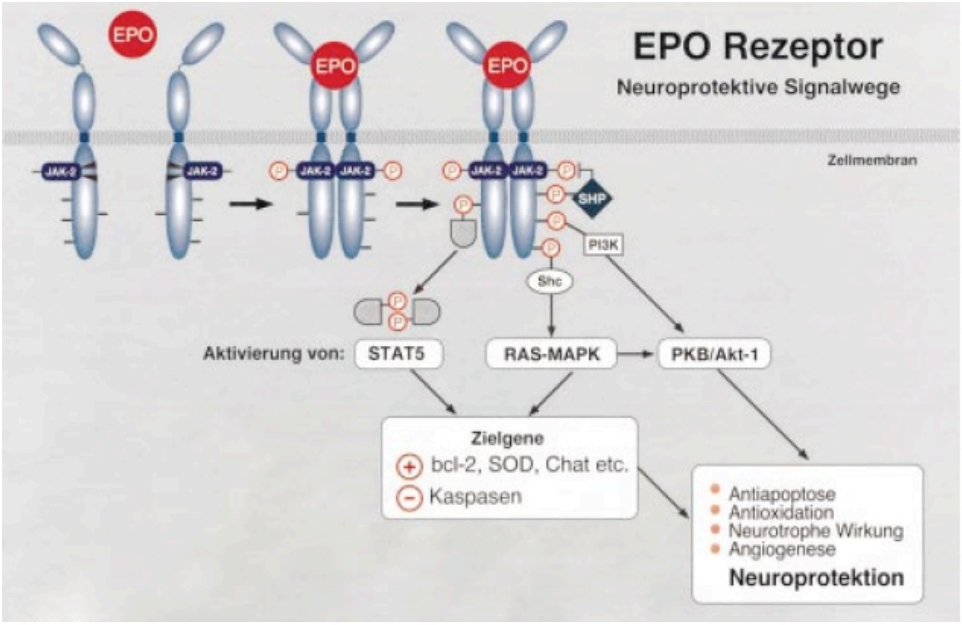

Abb. 1: Intrazelluläre Signalkaskaden von Erythropoietin (EPO): *Schematisch ist hier die intrazelluläre Signaltransduktion nach Bindung von Erythropoietin an den zellständigen Rezeptor dargestellt. Die Bindung von EPO führt zur Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors und der assoziierten JAK-2 (Janus-Tyrosin-Kinase-2). Im Folgenden kommt es zur weiteren Aktivierung von Signalwegen über STAT5 (Signal Transducers and Activators of Transcription 5), RAS-MAPK (Rat Sarcoma Virus Oncogene – Mitogen Acitvated Protein Kinase), welche zu einer veränderten Genexpression und zur Aktivierung der PKB/Akt-1 (Proteinkinase B) führen. Alle Signalwege führen zu vermehrter Antiapoptose, Antioxidation, neurotropher Wirkung und Angiogenese. Weitere Abkürzungen: bcl-2=B-Cell Lymphomagene 2, SOD=Superoxiddismutase. Quelle: http://www.mpg.de/pdf/jahrbuch_2001/jahrbuch2001_233_242.pdf*

1.2.3. Physiko-chemische Daten

EPO weist je nach Autor ein Molekulargewicht von 30,4 bis 35 kDa auf, welches zu 40 % aus dem Kohlenhydratanteil resultiert [27, 54, 67, 70]. Von Bedeutung ist hierbei, dass sich das Gehirn-EPO mit 33 kDa in seinem Molekulargewicht vom Serum-EPO mit 35 kDa unterscheidet. Dies kommt durch eine geringere Glykosylierung des Gehirn-EPO zustande und führt in vitro zu einer höheren Affinität des hirneigenen EPO zu seinem Rezeptor [74, 75, 82].

Das EPO Gen liegt als Einzelkopie in einer 5,4 kb Region der genomischen DNA auf Chromosom 7 und kodiert für ein Polypeptid bestehend aus 193 Aminosäuren. Zunächst wird ein 166 Aminosäuren enthaltendes Peptid generiert, von welchem dann anschließend ein endständiges Arginin entfernt wird, so dass die endgültige Variante des EPO schließlich 165 Aminosäuren umfasst (Abb. 2) [67, 70]. EPO ist an 3 Aspartylresten in Positionen 24, 38 und 83 sowie an einem Serinrest in Position 126 glykosyliert. Diese Glykosylierungen sind zusammen mit den zwei

Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten in Positionen 7 und 160 bzw. 29 und 33 essentiell für die biologische Aktivität des Proteins, da die Auflösung der Disulfidbrücken zum vollkommenen Verlust der biologischen Aktivität führt. Die Glykosylierungen spielen unter anderem eine große Rolle für die Stabilität und Plasmahalbwertszeit von EPO [67, 70, 74, 82].

Der EPO-R gehört zur Cytokin Klasse I Rezeptor Superfamilie und ist ein Homodimer aus zwei identischen Glykoproteinketten zu jeweils 484 Aminosäuren. Jede der Glykoproteinketten besteht jeweils aus einer extrazellulären Domäne mit konservierten Cysteinen und einem WSXWS Motiv, einer hydrophoben transmembranösen Domäne und einer intrazellulären Domäne, die mit der Tyrosinkinase JAK2 assoziiert ist. EPO bindet an beide Untereinheiten des EPO-R. Die Affinität des Rezeptors nimmt mit steigender Glykosylierung von EPO ab [34, 46, 82].

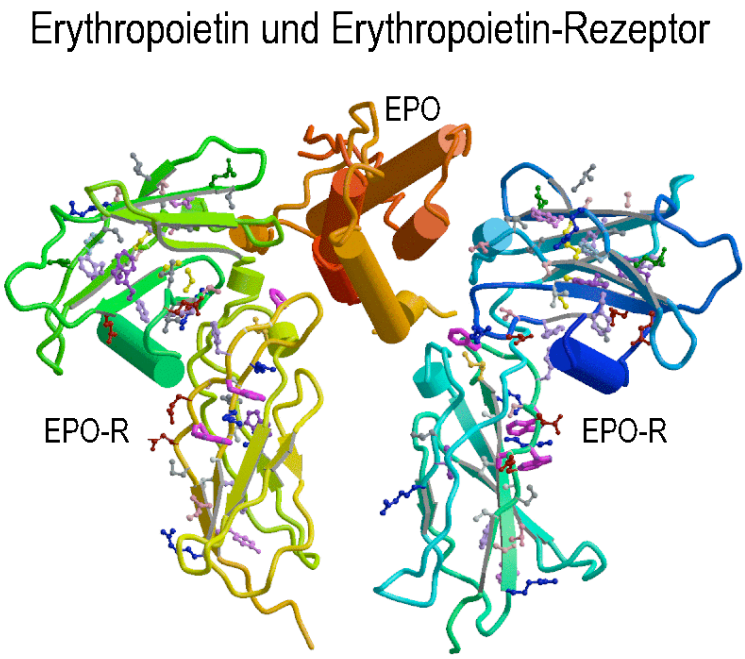

Abb. 2: Dreidimensionale Darstellung der Molekülstruktur von Erythropoietin (EPO) und dem Erythropoietin Rezeptor (EPO-R). *Quelle: modifiziert nach http://www.bmsc.washington.edu/people/adman/sabath/cn4_lab.gif*

1.3. Erythropoietin und Erythropoietin-Rezeptor im Nervensystem

1.3.1. Vorkommen von Erythropoietin und seinem Rezeptor

1993 können Masuda et al. erstmals zeigen, dass Zellkulturlinien neuraler Herkunft den EPO-R exprimieren [13, 75]. Des Weiteren haben Celik et al. gezeigt, dass EPO und der EPO-R auch im Rückenmark von Neuronen und Gliazellen exprimiert werden [16]. Neurone, Gliazellen, Astrozyten, Mikroglia, Myelinscheiden von peripheren menschlichen Nerven und neurovaskuläre Endothelzellen tragen den EPO-R [16, 17, 30, 36, 52, 67, 70, 75, 98, 100].
EPO wird von Astrozyten und Neuronen im zentralen Nervensystem produziert [13, 17, 30, 36, 46, 58, 67, 70, 75, 98, 100]. Die Hauptproduktionsstätten von EPO sind hierbei der Hippocampus, die Capsula interna, der Kortex, das Mittelhirn, cerebrale Endothelzellen und die Astrozyten [18, 23, 46, 67, 72] Aber auch die Amygdala, das Cerebellum, der Plexus choroideus und die Glandula pituaris zeigen EPO Genexpression [34, 70, 98].

1.3.2. Bedeutung von Erythropoietin für die Entwicklung des Nervensystems

Knabe et al. konnten durch Untersuchungen an Mäuseembryonen zeigen, dass ab dem 8. Embryonaltag neuroepitheliale Zellen den EPO-R exprimieren. Nach dem Neuralrohrschluss wird diese Genexpression jedoch wieder verringert. Ab Embryonaltag 11 wird EPO von Neuronen in unterschiedlichen Lokalisationen, wie dem Mittelhirn und dem Synencephalon, exprimiert und zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils hoch- oder herunterreguliert. Außerdem tragen radiale Gliazellen den EPO-R. Die Autoren vermuten aus diesen Beobachtungen heraus, dass die Interaktionen zwischen den radialen Gliazellen und den Neuronen zur Morphogenese des ZNS beitragen [57]. In einer Studie an menschlichen Feten konnten Juul et al. 1998 zeigen, dass EPO- und EPO-R-mRNA in der 5. Woche post conceptionem vor allem in neuroepithelialen Zellen in der periventrikulären Zone zu finden sind. Ab der 10. Woche post conceptionem spiegelt sich die EPO-Immunoreaktivität vor allem in der subventrikulären und ventrikulären Zone wieder, während Zellen mit EPO-R Immunoreaktivität vor allem subventrikulär sind und sich im Folgenden zu Oligodendrozyten und Astrozyten entwickeln. In der

weiteren Entwicklung exprimieren Astrozyten den EPO-R und Neuronen produzieren EPO. Im postnatalen und im adulten Gehirn haben dann beide Zellpopulationen EPO und EPO-R Genexpression [13, 51]. Beide Studien weisen auf eine Beteiligung von EPO an der Entwicklung des menschlichen und tierischen ZNS hin, deren Ausmaß und Wichtigkeit noch nicht vollständig geklärt ist. Es ist möglich, dass die trophischen und antiapoptotischen Effekte mit zur Morphogenese und Entwicklung beitragen. Dies wird durch die Beobachtung von Mäusen mit unzureichenden Mengen an EPO-R gestützt, welche eine erhöhte Apoptoserate mit hypoplastischen Gehirnregionen um den vierten Ventrikel herum aufweisen [70].

1.3.3. Neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften

Viele Studien in vitro wie auch in vivo belegen bereits die neuroprotektiven und neurotrophen Eigenschaften des EPO.
Die meisten Untersuchungen beschäftigten sich hierbei mit ischämischen oder hypoxischen Modellen, bei denen EPO seine positiven Effekte zeigte. Ergebnisse dieser zahlreichen Studien zeigen, dass der Einsatz von rhEPO in Tiermodellen das Infarktvolumen reduziert, die Anzahl der apoptotischen Zellen in der Penumbra reduziert und letztendlich auch das neurologische Resultat verbessert [11, 17, 26, 28, 30, 36, 63, 71, 93, 97-99]. Diese Schlussfolgerungen haben bereits zum ersten therapeutischen Einsatz von rhEPO am Menschen geführt. Ehrenreich et al. konnten die neuroprotektiven Eigenschaften von EPO in ihrer Studie mit Schlaganfallpatienten bestätigen (siehe 1.3.4.) [28]. Wie jedoch EPO diese Effekte ausübt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. So wird eine Beteiligung von EPO an der zerebralen NO-Produktion während hypoxisch-ischämischen Bedingungen vermutet, welche durch EPO gesenkt wird. NO wird mitverantwortlich gemacht für den Gewebsschaden im Gehirn bei hypoxischen oder ischämischen Insulten [62]. Wichtig hierbei ist, dass EPO keinen direkten Einfluss auf die NO-Spiegel im Gehirn hat, d. h. dass EPO erst unter schädigenden Bedingungen seine Wirkung auf die NO-Produktion entfaltet. So wird vermutet, dass EPO spezielle Auswirkungen auf Isoformen der NO-Synthetase hat, welche unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen aktiv sind.

Andere Autoren vermuten die neuroprotektiven Eigenschaften des EPO in der vermehrten Produktion antiapoptotischer Substanzen, im Schutz vor von Glutamat ausgelöster Exzitotoxizität und in der vermehrten Aktivität antioxidativer Enzyme wie der Superoxiddismutase, der Glutathionperoxidase und der Katalase [13, 46, 62, 70]. EPO übt neurotrophe Eigenschaften auf septale cholinerge Neuronen aus, indem diese in ihrer Differenzierung, ihrem Überleben und ihrer Regenerationsfähigkeit gesteigert werden [59].

EPO konnte seine neuroprotektiven Eigenschaften auch bei ischämischen Insulten des Rückenmarks beweisen, indem die Apoptoserate der Motoneurone gesenkt wurde [16]. Aber auch im Falle von stumpfen kortikalen Traumata war es durch rhEPO-Behandlung während eines Behandlungsfensters von bis zu 6 Stunden nach dem Trauma möglich, das Volumen des verletzten Gehirngewebes signifikant zu reduzieren und auch die inflammatorische Reaktion auf die Gewalteinwirkung zu minimieren [11, 17, 30].

Experimente an Mäusen mit Kainat, einem Glutamat-Analogon, das zu epileptischen Anfällen führt, konnten zeigen, dass EPO auch hier protektive Eigenschaften besitzt. Die Anfallsschwere wird durch EPO gesenkt, die Latenzzeit bis zum Auftreten des Anfalls verlängert und die Mortalität der Tiere durch EPO gesenkt. Hierbei ist es wichtig zu erwähnen, dass das Behandlungsfenster für eine erfolgreiche Wirkung von EPO kürzer ist als beim Einsatz unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen. Die Gabe von rhEPO eine halbe Stunde vor der Kainat-Gabe bzw. danach hat keinerlei positive Effekte. Dies führt zu der Annahme, dass die antikonvulsiven Effekte von EPO eher auf Veränderungen der Genexpression als auf direkte antikonvulsive Effekte zurückzuführen sind [11, 17, 30].

Ein weiteres experimentelles Einsatzgebiet von EPO ist die EAE, ein gängiges Tiermodell der Multiplen Sklerose (MS), welches durch Myelin-basisches-Protein und Freund´s Adjuvans ausgelöst wird. Durch die Gabe von EPO konnte die Latenzzeit bis zum Auftreten der ersten klinischen Symptome verlängert, die Schwere der Symptome verringert und nach Absetzen der EPO Therapie ein Rückfall mit folgender Zunahme der Schwere verhindert werden. Das beschriebene Rückfallphänomen kann typischerweise nach Absetzen der Behandlung von MS mit Glukokortikoiden oder Interferonen beobachtet werden und kann klinisch ein großes Problem darstellen. Die beschriebenen

Beobachtungen deuten auf deutliche antiinflammatorische Eigenschaften des EPO im ZNS hin, welche möglicherweise durch Reduktion der im Falle von EAE erhöhten TNF- und IL-6-Spiegel erreicht werden. Jedoch nimmt EPO nicht auf alle durch Adjuvantien ausgelösten inflammatorischen Bedingungen Einfluss, wie der erfolglose Einsatz bei induzierter Arthritis von Lewis Ratten zeigt. Signalkaskaden, die in die antiinflammatorischen Effekte involviert sind, sind die Phosphatidylinositol-3-Kinase sowie die MAP-Kinasekaskade und letztlich wahrscheinlich auch erhöhte Spiegel von Bcl-2 [1, 11, 17, 30, 94].

Weiterhin sollen die Forschungen auf dem Gebiet der Schizophrenie erwähnt werden. Ehrenreich et al. konnten in einer Studie 2004 zeigen, dass rhEPO die kognitiven Funktionen, welche im Falle der Schizophrenie beeinträchtigt sind, in einem Mäusemodell verbessert werden und der durch Haloperidol induzierte Zelltod von Neuronen in Zellkultur verringert wird. So könnte EPO in Zukunft als neuroprotektive Zusatztherapie bei der Behandlung von an Schizophrenie erkrankten Patienten eingesetzt werden [26, 27].

Eine Studie an 13 depressiven Patienten vermutet auch hier eine Beteiligung des endogenen EPO-Systems, da die Patienten mit Depressionen im Gegensatz zur gesunden Kontrolle signifikant erhöhte EPO-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis aufwiesen. Diese erhöhten EPO-Konzentrationen fielen nach einer mehrmonatigen antidepressiven Therapie wieder auf normale Werte zurück. Auf welche Art und Weise EPO hier genau involviert ist, bleibt jedoch bislang unklar [83].

Die Passage des EPO durch die Blut-Hirn- und die Blut-Liquor-Schranke wurde ebenfalls bereits untersucht. Nachdem lange Zeit geglaubt wurde, dass ein Molekül von ungefähr 30kDa wie EPO die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, ist heute klar, dass es wohl durch spezifische Transportmechanismen oder auch durch extrazelluläre nicht-saturierende Prozesse möglich ist, dass EPO auch in therapeutischen Mengen das Gehirn erreicht [6, 27, 53]. Andere Studien zeigen, dass zirkulierendes EPO die Integrität der Blut-Hirn-Schranke stabilisiert und diese z. B. vor durch VEGF induzierter Permeabilitätssteigerung bewahrt [73].

1.3.4. Erster Einsatz von rekombinantem EPO bei Schlaganfallpatienten

Die in vitro Studien über EPO als neuroprotektive Substanz bei cerebralen Ischämien haben EPO zu einem attraktiven therapeutischen Ansatz bei Schlaganfallpatienten gemacht. Ehrenreich et al. berichteten im Jahr 1998 die erste Studie über den Einsatz von rhEPO bei Schlaganfall-Patienten [28].
Es wurden insgesamt 53 Patienten mit Schlaganfall im Bereich der A. cerebri media untersucht. Einschlusskriterien waren ein Alter <80 Jahre und ein definitiver Zeitpunkt des Auftretens erster Symptome, welcher die erste rhEPO Infusion innerhalb der ersten 8 Stunden gewährleistete, sowie gesicherte neurologische Defizite. Intrazerebrale Hämorrhagien wurden durch Schädel CT ausgeschlossen und Infarktzeichen mittels MRT ermittelt. 13 der Patienten dienten als Sicherheitsstudie, um die Gefahrlosigkeit der Therapie und die Passage von rhEPO über die Blut-Hirn-Schranke zu beweisen. Die restlichen 40 Patienten gingen in eine doppelblinde Studie zum Beweis des Konzepts ein, wobei die Verumgruppe rhEPO- und die Placebogruppe NaCl-Infusionen erhielt. Als Studienendpunkte wurden der funktionelle Status nach 30 Tagen, der Behinderungsgrad nach National Institutes Of Health (NIH)/- und Scandinavian Stroke Scales und die Evaluation der Infarktgröße mittels MRT festgelegt. Es stellte sich heraus, dass rhEPO keine unerwünschten Effekte hervorruft und die Blut-Hirn-Schranke passiert. Außerdem konnte die mit rhEPO behandelte Gruppe signifikant bessere Ergebnisse in den Schlaganfallskalen und im klinischen Erscheinungsbild erzielen. Auch die Infarktgröße im MRT war im rhEPO-Arm der Studie tendenziell kleiner [26, 28-30, 46, 70].
Diese Studie muss hervorgehoben werden, da sie der erste erfolgreiche klinische Einsatz einer neuroprotektiven Substanz war und vielversprechend in die Zukunft der Behandlung zahlreicher neurologischer Erkrankungen blicken lässt. Neuere Substanzen wie Asialo-EPO, welche gleiche neuroprotektive Effekte ohne periphere erythropoetische Effekte aufweisen, lassen noch bessere Behandlungsstrategien erhoffen. Da ohne die peripheren erythropoetischen Eigenschaften aber auch die Angiogenese nicht mehr gefördert wird, könnte der Einsatz von Asialo-EPO zur Zellprotektion limitiert sein, was durch weitere Studien zu zeigen wäre [67, 70].

1.4. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Neueste Forschungsergebnisse haben die Anwesenheit von EPO und seinem spezifischen Rezeptor (EPO-R) im zentralen Nervensystem sowie deren Synthese durch Astrozyten und Neurone nachgewiesen [11, 51, 70]. Zudem hat sich EPO als neuroprotektiver Faktor etabliert, welcher die Differenzierung und Regeneration von Neuronen unterstützt und neuroprotektive Effekte unter für Neuronen schädlichen Bedingungen aufweist [1, 13, 30, 57, 70, 93].

Da die neuroprotektive Rolle des EPO durch in vitro Studien gut belegt ist, herrscht nun ein steigendes Interesse die mögliche Beteiligung des EPO-Systems in neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen näher zu verstehen. Bislang sind nur spärliche in vivo Daten zu EPO im Liquor cerebrospinalis bei neurologischen Erkrankungen verfügbar. Außerdem gibt es bisher keinerlei publizierte Daten über die Konzentration von EPO im Liquor in einer größeren Kohorte von Normalkontrollen oder bei Patienten mit neurologischen Erkrankungen.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher zunächst, eine valide und reproduzierbare Methode zur Messung der EPO-Konzentration im Liquor zu etablieren. Nun sollte eine große Kohorte an Normalkontrollen sowie Patienten mit neurodegenerativen und psychiatrischen Erkrankungen auf die Konzentration von EPO im Liquor untersucht werden. Fragestellungen, die sich hieraus ergaben, sind:

- In welchem Konzentrationsbereich ist EPO im Liquor cerebrospinalis messbar und ist hierfür eine Vorbehandlung des Liquors erforderlich? Ist EPO im Liquor stabil?
- Gibt es eine Altersabhängigkeit der EPO-Konzentration im Liquor?
- Gibt es einen möglichen Einfluss des Geschlechts auf die EPO-Konzentration im Liquor?
- Welche Effekte hat die Integrität der Blut-Liquor-Schranke auf die EPO-Konzentration im Liquor?
- Zu welchen Anteilen stammt das im Liquor gefundene EPO aus dem Gehirn bzw. aus dem Blut?
- Gibt es Veränderungen hinsichtlich der Liquor-EPO-Konzentration bei neurologischen oder psychiatrischen Erkrankungen?

2. Material und Methoden

2.1. Probengewinnung und Aufbewahrung

2.1.1. Entnahme der Serum- und Liquorproben

Insgesamt wurden von 159 Patienten der Neurologischen Universitätsklinik Ulm parallel Blut- und Liquorproben entnommen.

Die Venenpunktion wurde stets in der Ellenbeuge nach kurzer Stauungszeit durch vorangehende alkoholische Hautdesinfektion (Kodan® Tinktur Forte farblos, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) unter Verwendung von sogenannten Butterfly-Kanülen (Venofix®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) durchgeführt. Alle durch Venenpunktion gewonnenen Serumproben (S-Monovette®, SARSTEDT AG&Co., Nürmbrecht) wurden anschließend im Labor bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 4500 g zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Osterode).

Die Lumbalpunktion der Patienten erfolgte stets nach gründlicher Überprüfung möglicher Kontraindikationen wie erhöhtem intrakraniellen Druck, Entzündungen oder Infektionen im Punktionsbereich und erhöhter Blutungsgefahr. Die Punktion erfolgte bei sitzenden nach vorne übergebeugten Patienten zwischen den Procc. spinosi LWK 5 und 4 bzw. zwischen LWK 3 und 4. Zuvor wurde die Haut im Punktionsbereich chirurgisch desinfiziert (Kodan® Tinktur Forte farblos, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) und zur Punktion wurden sterile Handschuhe (Peha® Soft puderfrei, Paul Hartmann AG, Heidenheim) verwendet. Die Punktion erfolgte zunächst mit einer Führungskanüle (Introducer 1,20x30 mm, PAJUNK GmbH Medizintechnologie, Geisingen) in leicht kranialer Richtung, dann wurde durch Einführen einer atraumatischen Punktionskanüle nach Sprotte (Sprotte Standard Needle 20 Gauge, PAJUNK GmbH Medizintechnologie, Geisingen) der Liquorraum punktiert. Bei erfolgreicher Punktion tropfte der Liquor cerebrospinalis nach Herausziehen des Mandrins ab. Zur Abgrenzung einer möglichen artifiziellen Blutung wurde stets eine Dreigläserprobe durchgeführt. Insgesamt wurden jeweils ca. 10 ml Liquor in 3 Röhrchen (Polypropylenröhrchen, Firma Falcon, Kalifornien, USA) zur Diagnostik entnommen.

2.1.2. Liquoranalytik

Bevor mit der gezielten EPO-Diagnostik begonnen werden konnte, wurde stets eine Routine-Liquordiagnostik durch das neurochemische Labor der Neurologischen Universitätsklinik Ulm vorgenommen.
Der gewonnene Nativliquor wurde innerhalb von 2 Stunden nach Entnahme mikroskopisch in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer auf die Zellzahl untersucht (Referenzbereich: 0-4 Zellen/µL). Anschließend wurde der Liquor zytologisch untersucht, wobei vor der weiteren Analyse ein Anreicherungsschritt mittels Zytozentrifugation notwendig war. Danach wurde das Präparat nach Pappenheim gefärbt (Normalbefund: zellarmes Präparat mit mehr Lymphozyten als Monozyten, vereinzelt Plexus- oder Ependymzellen). Zur Basisdiagnostik gehörte ebenso die Bestimmung von Glukose und Laktat im Liquor zum Nachweis eines eventuellen anaeroben Glukosestoffwechsels des ZNS (Referenzbereich: Glukose etwa 50 bis 60 % des Blutglukosespiegels, Laktat 1,2-2,1 mmol/l). Weiterhin wurde zur Beurteilung der Blut-Liquor-Schrankenfunktion das Gesamtprotein bzw. der Liquor/Serum Albuminquotient nephelometrisch bestimmt (Referenzbereich: Gesamtprotein 150-450 mg/ml, Albuminquotient $< 8\times10^{-3}$). Die Liquor/Serum Immunglobulinquotienten von IgG, IgA und IgM wurden ebenfalls anhand einer Nephelometrie bestimmt um eine mögliche intrathekale Synthese von Immunglobulinen aufzudecken. Da die Immunglobulinquotienten abhängig von der Funktion der Blut-Liquor-Schranke sind, wurden diese gegen den Albuminquotienten aufgetragen. Die resultierenden Quotientendiagramme wurden anschließend ausgewertet. Einen noch sensitiveren Nachweis, um eine intrathekale Synthese von IgG aufzudecken, lieferte die Bestimmung der oligoklonalen IgG Banden nach isoelektrischer Fokussierung und anschließender Immunfixation in Liquor und Serum (Normalbefund: keine oligoklonalen IgG Banden in Liquor und Serum). An das Basisprogramm wurde im Falle spezifischer Fragestellungen wie bei Verdacht auf eine chronisch entzündliche ZNS-Erkrankung oder bei akuten bis subakuten Infektionskrankheiten der erregerspezifische Antikörperindex mittels quantitativer Ligandenassays bestimmt (Referenzbereich: Liquor/Serum Quotient für erregerspezifische Antikörper geteilt durch Liquor/Serum Immunglobulinquotient von IgG oder IgM: 0,6-1,4). Der Ablauf der Routinediagnostik wird in Abb. 3 nochmals verdeutlicht.

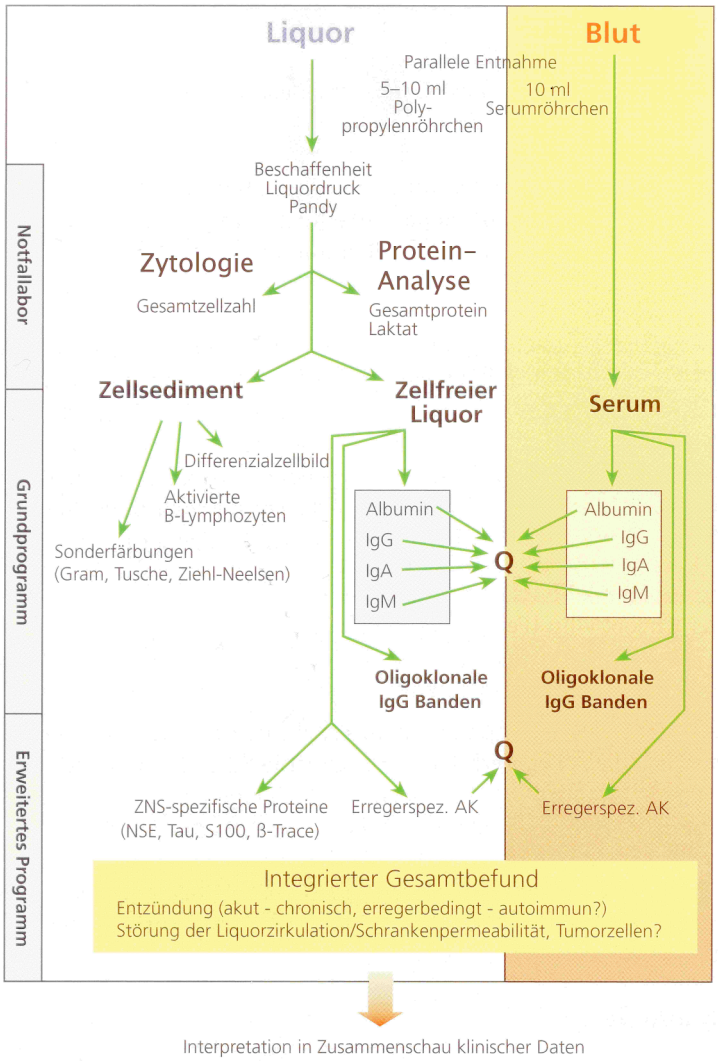

Abb. 3: Schematische Darstellung des Stufenschemas der Liquoranalytik: *Ig = Immunglobulin, AK = Anitkörper, ml = Milliliter, ZNS = Zentrales Nervensystem, Erregerspez. = Erregerspezifisch, NSE = Neuronenspezifische Enolase, Q = Quotient aus Liquor und Serumkonzentration. Quelle: modifiziert nach [111]*

2.1.3. Aliquotierung und Aufbewahrung der Proben

Alle Serum- und Liquorproben wurden unmittelbar nach Bestimmung der in 2.1.2. aufgeführten Parameter in Eppendorfgefäße (Microtube 1.5 ml, SARSTEDT AG&Co., Nürmbrecht) aliquotiert, mit einer einem Patienten eindeutig zuordenbaren Nummer pseudonymisiert und anschließend bei −80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

2.2. Konzentration des Liquor cerebrospinalis

2.2.1. Konzentration des Liquors mittels Zentrifugation

Unmittelbar nach dem Auftauen der aliquotierten Liquorproben im Eisbad wurden alle Proben nach folgendem Schema konzentriert, da durch Vorversuche festgestellt wurde, dass die Normalkonzentration von EPO im nativen Liquor unter dem niedrigsten Detektionsniveau des hier verwendeten Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) lag.

Zur Konzentration des Liquors wurden Filter (Ultrafree®-MC Centrifugal Devices, Amicon® Bioseperations, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), bestehend aus 2 getrennten Anteilen verwendet (Abb. 4). In den oberen Anteil, welcher am Boden eine Filtermembran enthält, wurden zunächst 450 µl unkonzentrierter Liquor gegeben (Pipetten: Eppendorf Reference 100 µl & 200 µl &1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Pipettenspitzen: ep T.I.P.S. Standard 2-200 µl & 50-1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg), während in den unteren Anteil, welcher ein Mikrozentrifugenröhrchen darstellte, 300 µl Aqua bidest. (Aqua B. Braun, Ecotainer®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) eingefüllt wurden. Die Filtermembran ließ keine Moleküle mit einem höheren Molekulargewicht als 5 kDa hindurchdiffundieren, womit sichergestellt war, dass EPO oben im Überstand verblieb.

Nach der ersten Befüllung wurde 15 Minuten bei 4°C und 6800 Umdrehungen pro Minute in einer Zentrifuge (Biofuge®fresco, Hereaus, Kendro® Laboratory Products GmbH, Osterode) zentrifugiert. Anschließend wurde das sich im unteren Teil befindende Filtrat, welches Wasser, kleine Proteine und Moleküle enthielt, verworfen. Danach wurde erneut frisches Aqua bidest. eingefüllt und in den Filter, der nun schon Konzentrat enthielt, 150 µl unkonzentrierter Liquor nachgefüllt. Es wurde erneut 15 Minuten zentrifugiert und anschließend wurde der Nachfüll/-Zentrifugationszyklus so lange wiederholt, bis schließlich 1350 µl Liquor auf 150 µl konzentriert waren.



Abb. 4: Bild der verwendeten Filter zur Konzentration des Liquors: *Auf der linken Seite ist der obere Anteil der Filter dargestellt, dessen Boden die Filtermembran enthält und in den der unkonzentrierte Liquor pipettiert wird. Auf der rechten Seite befindet sich der untere Teil des Filters in den destilliertes Wasser gegeben wurde und in dem der abfiltrierte Teil des Liquors aufgefangen und nach jedem Zyklus verworfen wurde (Quelle: Klinik für Neurologie, Liquorlabor, Universitätsklinikum Ulm).*

2.2.2. Bestimmung des Gesamtproteins des Liquorkonzentrates

Zur genaueren Beurteilung des aus der Konzentration des Liquors resultierenden Konzentrationsfaktors wurde die Gesamtproteinkonzentration vor und nach der Konzentration herangezogen (2.1.2.).
Hierfür wurden 20 µl des Liquorkonzentrates mit 180 µl Verdünnungspuffer (N-Diluent for Nephelometry, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg) vermengt und die Gesamtproteinkonzentration nephelometrisch (BN ProSpec®, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg) bestimmt. Anschließend wurde die Konzentration des Liquors anhand des Verdünnungsfaktors 1:10 rückgerechnet.

2.2.3. Berechnung des Konzentrationsfaktors

Der Konzentrationsfaktor wurde nun wie folgt berechnet: Die Gesamt-proteinkonzentration des konzentrierten Liquors wurde dividiert durch diejenige des unkonzentrierten Liquors.
Dies ist insofern von großer Bedeutung, als dass in dem hier durchgeführten ELISA immer das Liquorkonzentrat eingesetzt wurde und es somit notwendig war, dass die vom ELISA gemessene EPO-Konzentration wieder auf den wahren unkonzentrierten Wert zurückgerechnet wurde.

2.3. Erythropoietin ELISA

2.3.1. Prinzip des Erythropoietin ELISA

Der hier verwendete EPO ELISA (Quantikine® IVD® Erythropoietin (Epo) Kit, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) basierte auf der Antikörper-Sandwichmethode.
Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten waren hierbei mit monoklonalen Mäuseantikörpern gegen EPO beschichtet, an welche das lösliche EPO der Standardlösungen und der Patientenproben binden konnte. Nachdem der Überstand mit ungebundenem Material verworfen wurde, fand eine Inkubation mit dem zweiten Antikörper statt. Es handelte sich hierbei um einen polyklonalen Anti-EPO Antikörper vom Hasen, der zusätzlich noch an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Der Enzym-Anti-EPO-Antikörperkomplex wurde an das immobilisierte EPO in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten gebunden. Nachdem erneut der ungebundene Überstand verworfen wurde, wurde nun ein Chromogen hinzugegeben, welches enzymatisch durch die gebundene Meerrettich-Peroxidase zu einem blauen Farbstoff oxidiert wurde. Nach Zugabe einer Säure als Stopplösung fand dann ein Farbumschlag nach gelb statt.
Anschließend wurde die Extinktion des Farbgemisches photometrisch (Spectra Rainbow, Tecan® Trading AG, Zürich, Schweiz) bestimmt. Da die Menge an EPO in den Standards und Proben direkt proportional zur Menge an Konjugat war, welches an den EPO-Antikörperkomplex gebunden war und dieser wiederum direkt proportional zur Menge an entstandenem Farbstoff, ließ sich anhand der EPO-Konzentrationen der Standards und deren Extinktion eine Standardkurve produzieren, welche die Bestimmung der Konzentrationen der Proben zuließ.

2.3.2. Standardkurve und Sensitivitätserhöhung

Bei den Standards, die im vorliegenden ELISA verwendet wurden, handelt es sich um rekombinantes humanes EPO (rhEPO), welches anhand der Second International Reference Preparation (67/343) kalibriert wurde. Dieses wiederum ist eine vom Urin stammende Form des menschlichen EPO.
Die hier verwendeten Standards enthielten folgende Konzentrationen:

Standard 1: 0 mU/ml
Standard 2: 2,5 mU/ml
Standard 3: 5 mU/ml
Standard 4: 20 mU/ml
Standard 5: 50 mU/ml
Standard 6: 100 mU/ml
Standard 7: 200 mU/ml

Durch zahlreiche Vorversuche mit gesammeltem Liquor ohne pathologischen Befund (im Folgenden als Pool-Liquor bezeichnet) war ersichtlich, dass sich gerade die EPO-Konzentrationen der Kontrollen trotz des hergestellten Liquorkonzentrates häufig im unteren Bereich der Standardkurve befanden. Aus diesem Grund heraus erschien es als sinnvoll einen zusätzlichen Standard zwischen dem ersten und zweiten Standard einzufügen.

Hierfür wurde mit dem im ELISA enthaltenen Verdünnungspuffer für Proben eine 1:330 Verdünnung des größten Standards (Standard 7) hergestellt.

Dafür wurde, wie vom Hersteller R&D Systems vorgeschrieben, 3290 µl Verdünnungspuffer mit 10 µl Standard 7 in einem Polypropylenröhrchen verdünnt. Die aus dieser Verdünnung resultierende Konzentration betrug 0,61 mU/ml (nachfolgend als Standard * bezeichnet).

Der Standard * wurde nun in der Standardkurve stets zwischen Standard 1 und 2 eingefügt, um die Sensitivität, die für die exakte EPO-Bestimmung erforderlich war, zu erhöhen.

2.3.3. Assay-Prozedur

Bevor mit der Prozedur begonnen werden konnte, mussten alle Reagenzien und die Proben Raumtemperatur (20-25°C) erlangen.

Zuerst wurde die genaue Belegung der einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatten eruiert und anschließend konnte die Prozedur gestartet werden:

1. 100 µl ELISA-Verdünnungspuffer (Thimerosal und Natriumazid) wurden in jede Vertiefung pipettiert (Pipette für Punkt 1., 4., 7., 8., 9.: Handy Step®, BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim; Pipettenspitzen: Plastibrand® PD Tips, BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim)

2. Nun wurden in jede Vertiefung je 100 µl Standard (Proteinbase mit keinem bzw. ansteigenden Konzentrationen an rhEPO und Thimerosal), Kontrollen (Erythropoietin Human Serum Controls, Quantikine® IVD®, R&D Systems Europe, Abingdon, Oxon, UK) und Proben gegeben (Pipetten und Pipettenspitzen wie bei 2.2.1.) und die Mikrotiterplatte mit Klebefolie verschlossen. Anschließend folgte eine Inkubationszeit von 60 Minuten auf einem Orbitalschüttler bei 500 Umdrehungen/Minute und Raumtemperatur.
3. Nun wurde der Überstand der Vertiefungen sorgfältig abgegossen und die Mikrotiterplatte auf Zellstoffpapier vorsichtig trocken geklopft. Die Platte wurde nicht ausgewaschen.
4. Es wurden dann 200 µl des EPO-Konjugates (Anti-EPO-AK gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase) in jede Vertiefung pipettiert, die Platte mit Folie abgeklebt und anschließend wurde erneut auf dem Orbitalschüttler für 60 Minuten inkubiert.
5. Während dieser Inkubationsphase wurde für den nächsten Schritt die Waschlösung hergestellt: Hierfür wurden 20 ml des Waschpuffer-konzentrates (2-Chloracetamid) mit 480 ml destilliertem Wasser verdünnt.
6. 10 Minuten vor Ende der Inkubationszeit wurde die Substratlösung für die Farbreaktion frisch hergestellt: Farbreagenz A (0,01 N gepuffertes Hydrogenperoxid) wurde zu gleichen Teilen mit Farbreagenz B (0,35 g/l Tetramethylbenzidin) gemischt und bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln aufbewahrt. Pro Vertiefung wurden jeweils 125 µl der jeweiligen Reagenzien benötigt; so standen für jede Vertiefung insgesamt 250 µl Substrat zur Verfügung. Das Substrat musste innerhalb von 15 Minuten benutzt werden, da ansonsten bereits Farbreaktionen, welche das Ergebnis des ELISA verfälschen, stattgefunden hätten!
7. Nach der zweiten Inkubation wurde der Überstand erneut verworfen und danach wurde jede Vertiefung sorgfältig mit Waschlösung gewaschen. Hierfür wurde jeweils 400 µl Waschpuffer in jede Vertiefung gegeben und anschließend abgegossen. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt und nach dem letzten Mal wurde die Mikrotiterplatte erneut trocken geklopft.

8. Nun wurden jeweils 200 µl der frisch hergestellten Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert, die Platte wieder mit Folie abgedeckt und 20-25 Minuten auf der Laborbank im Dunkeln belassen.
9. Zum Reaktionsstopp wurden nun als letztes 100 µl Stopplösung (2 N Schwefelsäure) in jede Vertiefung pipettiert und die Extinktion innerhalb von 30 Minuten photometrisch bestimmt.

2.3.4. Messung der Extinktion

Unmittelbar nach Stoppen der Farbreaktion wurden die Extinktionen der Mikrotiterplatte photometrisch (Spectra Rainbow, Tecan® Trading AG, Zürich, Schweiz) bestimmt. Dabei kamen eine primäre Wellenlänge von 450 nm, eine Referenzwellenlänge von 600 nm, sowie eine Korrekturwellenlänge von 650 nm zum Einsatz.
Durch eine geeignete PC Software (Easy Fit, SLT Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim) wurde anhand der vom Photometer bestimmten Extinktionen die Standardkurve kreiert und daraus die Konzentrationen der Proben und Kontrollen errechnet. Die Extinktionen mit den zugehörigen EPO-Konzentrationen wurden vom Programm tabellarisch dargestellt und konnten zusammen mit der zugehörigen Standardkurve ausgedruckt werden. Diese gewonnenen Daten waren nun Grundlage für alle weiteren Auswertungen.

2.3.5. Auswertung der Ergebnisse

Die vom Programm bestimmten EPO-Konzentrationen wurden nun mit den geforderten Konzentrationen verglichen, um mögliche Abweichungen von der geforderten Standardkurve zu entdecken und eventuelle Prozedurfehler auszuschließen. Außerdem wurde darauf geachtet, ob die Ergebnisse der Kontrollen, wie vom Hersteller zur Qualitätskontrolle gefordert, in dem vorgeschriebenen Bereich anzutreffen waren.
Zur Beurteilung der EPO-Konzentrationen der Liquorproben mussten die vom Computerprogramm ermittelten Werte erst noch einmal durch den jeweiligen

Konzentrationsfaktor der Probe dividiert werden, um die wahre EPO-Konzentration zu erfahren. Alle Ergebnisse wurden anschließend tabellarisch erfasst.

2.3.6. Richtigkeit und Präzision

Da keine Referenzmethode zur Verfügung stand, wurden bei jeder Messung zwei Kontrollen mitgeführt.

Kontrolle 1: Mittelwert 10,7 mU/ml mit einem Vertrauensbereich von 8,8 bis 12,5 mU/ml

Kontrolle 2: Mittelwert 40,0 mU/ml mit einem Vertrauensbereich von 34,0 bis 46,0 mU/ml

Die Kontrollen dienten dazu die Güte der einzelnen Messungen zu bestätigen. Von der Richtigkeit der Ergebnisse einer Messung war auszugehen, wenn die Kontrollen im vorgeschriebenen Vertrauensintervall lagen. Der Korrelationskoeffizient der Standardkurve sollte ≥0,95 betragen.

Zur Kontrolle der Präzision des verwendeten EPO ELISA wurde der Inter- als auch der Intra-Assay Variationskoeffizient herangezogen.

Für die Bestimmung des Inter-Assay-Variationskoeffizienten wurde die EPO-Konzentration von 3 Proben (mit den Konzentrationen 0,61 mU/ml, 20,0 mU/ml und 100,0 mU/ml) neunmal an 9 aufeinanderfolgenden Tagen auf verschiedenen Mikrotiterplatten bestimmt. Der Variationskoeffizient errechnet sich folgendermaßen:

Variationskoeffizient (%) = Standardabweichung × 1/Mittelwert × 100.

Der Intra-Assay-Variationskoeffizient wurde hierbei nicht separat bestimmt, da der Kit vom Hersteller eine ausgewiesene Intra-Assay-Variation von 3,7 bis 10,3 % hat (Quantikine® IVD® Erythropoietin (Epo) Kit, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA).

2.3.7. Wiederfindung und Linearität des Erythropoietin ELISA

Zur weiteren Validierung des Verfahrens wurden Wiederfindungs- und Linearitätsexperimente anhand von Pool-Liquor nach folgendem Schema durchgeführt:

Vor Beginn der ELISA-Prozedur, welche wie in 2.3.3. beschrieben durchgeführt wurde, mussten folgende Lösungen bereit- bzw. hergestellt werden:

1. Bereitstellung einer unverdünnten Probe Liquorkonzentrat aus Pool-Liquor.
2. **Stock-Lösung:** hierzu wurde der höchste Standard (St. 7) verwendet.
3. **Kontroll-Spike:** 30 µl Stock-Lösung wurden mit 120 µl ELISA Verdünnungspuffer vermischt.
4. **Sample-Spike:** 50 µl Stock-Lösung wurden mit 200 µl Liquorkonzentrat vermischt.
5. Herstellung einer Verdünnungsreihe des Sample-Spike.
6. **1:2 Verdünnung:** 120 µl des Sample-Spike wurden mit 120 µl ELISA Verdünnungspuffer vermischt.
7. **1:4 Verdünnung:** 120 µl der 1:2 Verdünnung wurden mit 120 µl ELISA Verdünnungspuffer vermischt.
8. **1:8 Verdünnung:** 120 µl der 1:4 Verdünnung wurden mit 120 µl ELISA Verdünnungspuffer vermischt.

Bei allen Pipettiervorgängen war darauf zu achten, dass immer dieselbe Pipette mit derselben Pipettenspitzenmarke verwendet wurde. Nach Herstellung der Lösungen konnte mit der Messung nach dem Protokoll aus 2.3.3. begonnen werden.

Nachdem die Ergebnisse der Messung vorlagen, konnte anhand der folgenden Formeln die Wiederfindung bzw. die Linearität in % berechnet werden.

Wiederfindung des Sample-Spike in %:

$$x = \frac{Samplespike - Liquorkonzentrat(mU/ml)}{Kontrollspike(mU/ml)} \times 100$$

Wiederfindung der Verdünnungsreihe in %:

$$x = \frac{Konzentration\ldots Verdünnung(mU/ml)}{\frac{Samplespike(mU/ml)}{2/4/8}} \times 100$$

Das Vertrauensintervall der Wiederfindung lag hierbei zwischen 80 und 100 %. Die dargelegten Experimente wurden je dreimal anhand von Pool-Liquorkonzentraten durchgeführt und anschließend für die jeweilige Wiederfindung der Mittelwert aus allen 3 Versuchen ermittelt.

2.4. Stabilitätsversuche von Erythropoietin im Liquor

Da in der bisherigen Literatur nur die Stabilität von EPO im Serum und Plasma beschrieben ist, war es ein weiteres Ziel der Studie die Stabilität von EPO im Liquor zu untersuchen.
Hierfür sollten zwei Bereiche abgedeckt werden. Zum einen sollten Versuche mit Einfrier- und Auftauzyklen zeigen, wie sich EPO hierbei im menschlichen Liquor verhält und zum anderen sollte die Langzeitstabilität der Liquor-Aufbewahrung bei −80°C geklärt werden.
Für alle folgenden Bestimmungen wurde Pool-Liquor verwendet, welcher nach derselben Methode wie in 2.2.1. beschrieben konzentriert wurde. Das Liquorkonzentrat wurde dann in mehrere Eppendorfgefäße aliquotiert.

Langzeitstabilität:
Die Konzentration des Pool-Liquorkonzentrates eines Aliquots wurde unmittelbar nach dessen Konzentration bestimmt, um einen Ausgangswert für die EPO-Konzentration zu erhalten. Die anderen Aliquots wurden nach der Konzentration bei −80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren. Nach 2,5 Monaten Aufbewahrung wurde das Aliquot des Liquorkonzentrates, aus dem der Ausgangswert bestimmt worden war, aufgetaut und dessen EPO-Konzentration erneut bestimmt.

Stabilität während Einfrier- und Auftauzyklen:

Der Ausgangswert für die Einfrier- und Auftauzyklen war derselbe wie bei den Versuchen zur Langzeitstabilität, da es sich um dasselbe Material handelte. Zwei Aliquots des Liquorkonzentrates wurden direkt nach der Konzentration bei −80°C für 2 Wochen eingefroren. Am 14. Tag wurden beide Proben aufgetaut, für die Messung wurden ihnen dann jeweils 100 µl entnommen und anschließend wurden die beiden Proben wieder bei −80°C eingefroren. An den folgenden 4 Tagen wurden die Proben jeweils erneut aufgetaut, Material zur Messung entnommen und anschließend wieder eingefroren. Zur genauen Identifizierung wurden die Proben nach jedem Auftauzyklus entsprechend gekennzeichnet.

2.5. Klinische Gruppeneinteilung

Die Bestimmung der EPO-Konzentration im Liquor und Serum erfolgte bei insgesamt 159 Patienten der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm.

2.5.1. Auswahl der Normalkontrollen

Von den 159 Patienten, deren Liquor untersucht wurde, wurden 73 Patienten den Normalkontrollen zugeordnet. Bei diesen Patienten lagen keine fokalen neurologischen Defizite vor, die für eine organische Erkrankung sprechen würden. Es wurden allerdings Patienten, die sich mit Spannungskopfschmerzen in der neurologischen Klinik vorstellten, aber keinen Nachweis für eine strukturelle, hämorrhagische oder entzündliche Läsion erbrachten mit in diese Gruppe eingeschlossen.

Innerhalb dieser Gruppe wurden die Normalkontrollen nun nochmals auf Untergruppen verteilt. Zum einen wurden drei Gruppen unterschiedlichen Alters und zum anderen eine alterskorrelierte Kontrollgruppe für die Gruppe der untersuchten Patienten, die an Amyotropher Lateralsklerose (ALS) litten definiert (Tab. 2).

Kontrollgruppe A (CTRL-a): In diese Gruppe wurden alle Normalkontrollen im Alter von 15 bis 36 Jahren eingeschlossen (n=19 Patienten, Tab. 2).

Kontrollgruppe B (CTRL-b): In diese Untergruppe wurden 14 Patienten im Alter von 38 bis 58 Jahren eingeteilt. Aus dieser Gruppe wurden Subjekte alterskorreliert als Kontrolle für die Depressionsgruppe verwendet (Tab. 2).

Kontrollgruppe C (CTRL-c): 20 Patienten im Alter von 54 bis 84 Jahren wurden auf diese Gruppe verteilt. Diese Kontrollgruppe fungierte als Kontrollgruppe für die Demenzgruppe und zum Teil gleichzeitig als alterskorrelierte Kontrollgruppe für die Gruppe der Patienten mit Depressionen (Tab. 2).

Kontrollgruppe ALS (CTRL-ALS): In dieser Gruppe befanden sich die 20 alterskorrelierten Kontrollen der ALS Gruppe im Alter von 50 bis 78 Jahren (Tab. 2).

2.5.2. Blut-Liquor-Schrankenfunktionsstörungen

Um einen möglichen Einfluss einer Blut-Liquor-Schrankenfunktionsstörung (Schrankendysfunktion) auf die EPO-Konzentration im Liquor nachzuweisen, wurden 27 Patienten mit Dysfunktion der Blut-Liquor-Schranke untersucht (Tab. 2):
20 Patienten wiesen eine isolierte Erhöhung des Albuminquotienten im Liquor auf, ohne dass eine strukturelle, hämorrhagische oder inflammatorische Läsion nachweisbar war. Bei weiteren 7 Patienten konnte die Diagnose eines Guillain-Barré-Syndroms [49] mit klassischer zyto-albuminärer Dissoziation gestellt werden, welche die Blut-Liquor-Schrankenfunktionsstörung erklärte.

2.5.3. Neurodegenerative Erkrankungen

Als Vertreter der neurodegenerativen Erkrankungen dienten Patienten mit Demenzerkrankungen (siehe 2.5.3.2.), sowie Patienten, die an ALS leiden (siehe 2.5.3.1.).

2.5.3.1. Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

In die Studie wurden 15 Patienten eingeschlossen, welche anhand der überarbeiteten EL Escorial Kriterien [12] als wahrscheinliche oder definitive ALS angesehen wurden (Tab. 2). Die Diagnose einer ALS wurde sowohl klinisch-neurologisch, als auch elektromyographisch unter elektrophysiologischem, laborchemischen und neuroradiologischem Ausschluss anderer Erkrankungen, die das 1. oder 2. Motoneuron betreffen, gestellt [78]. 12 Patienten konnten dem klassischen Typ der ALS zugeordnet werden, während 3 Patienten einen bulbären Verlaufstyp zeigten [101]. Zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion wurden 9 der ALS Patienten mit Riluzol (zweimal 50 mg pro Tag) behandelt (Rilutek®, Sanofi Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden), während die restlichen ALS Patienten zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei medikamentöse Behandlung erhielten.

2.5.3.2. Demenzerkrankungen

In dieser Gruppe befanden sich insgesamt 21 Patienten mit der Diagnose einer Demenz (Tab. 2). Diese setzt sich aus verschiedenen Subtypen von Erkrankungen zusammen, denen allen ein erworbenes kognitives Defizit gemeinsam ist. Zur Diagnosesicherung wurde durch die Gedächtnissprechstunde bei allen Patienten ein Schädel-MRT, eine Liquoruntersuchung, eine eingehende klinisch-neurologische und neuropsychologische Untersuchung und Anamnese, sowie ein Mini-Mental-Status-Test nach Folstein [19, 65] durchgeführt. Bei den bestimmten Liquorparametern waren für die Sicherung der Diagnose insbesondere der Marker Aβ42 und das Tau-Protein von Bedeutung.
Die größte Untergruppe hierbei stellten 11 Patienten mit der Diagnose einer Alzheimer Demenz, welche anhand der NINDS-ADRDA Kriterien (National

Institute Of Neurological And Communicative Disorders And Stroke – Alzheimer´s Disease And Related Disorders Association) gestellt wurde [77].
Eine weitere Untergruppe bildeten 2 Patienten mit der Diagnose einer Frontotemporalen Demenz (FTD) nach den Kriterien von Neary et al. [84] sowie 3 Patienten mit einer Vaskulären Demenz (VD) gemäß der NINDS-AIREN Diagnosekriterien (National Institute Of Neurological Disorders And Stroke – Association Internationale Pour La Recherche Et l´Enseignement En Neurosciences) [92]. Zudem fanden sich in der Gruppe der Demenzerkrankungen 5 Patienten mit der Diagnose eines Mild Cognitive Impairment (MCI) entsprechend der diagnostischen Kriterien von Petersen et al. [89].
Keiner der Patienten der Demenzgruppe wurde zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion mit Antidementiva behandelt.

2.5.4. Depression

In diese Gruppe wurden 23 Patienten mit der Diagnose einer Major Depression anhand der Kriterien des Diagnostic And Statistical Manual Of Mental Disorders, Fourth Edition, DSM-IV eingeschlossen [5]. Bei diesen Patienten wurde durch die Gedächtnissprechstunde im Rahmen der Abklärung einer verminderten kognitiven Leistungsfähigkeit bei Verdacht auf eine dementielle Erkrankung die Diagnose einer Depression gestellt (Tab. 2). Zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion erhielten alle Patienten bereits eine medikamentöse antidepressive Therapie über einen mittleren Zeitraum von 2 Jahren.

Tab. 2: Demographische Daten der untersuchten Patientengruppen: *Die erste Spalte zeigt die Gruppen mit den jeweiligen Unterteilungen in Subgruppen. In der zweiten Spalte finden sich die jeweiligen Anzahlen der untersuchten Subjekte, in Klammern sind die Anzahlen (n) der männlichen (m) und weiblichen (w) Patienten angegeben. In Spalte drei finden sich die Mittelwerte des Alters (in Jahren) mit der jeweiligen Spannweite in Klammern (Minimum-Maximum). Spalte vier zeigt die mittlere Krankheitsdauer in Jahren, sowie deren Spannweite (Minimum-Maximum). In der letzten Spalte findet sich für die Gruppe der untersuchten Demenzpatienten der Score des Mini-Mental-Status-Test (MMST) für die jeweiligen Subgruppen. Abkürzungen: CTRL-a = Kontrollgruppe A, CTRL-b = Kontrollgruppe B, CTRL-c = Kontrollgruppe C, CTRL-ALS = Kontrollgruppe der ALS Gruppe, Q_{Alb} = Albuminquotient, GBS = Guillain-Barré-Syndrom, ALS = Amyotrophe Lateralsklerose, FTD = Frontotemporale Demenz, VD = Vaskuläre Demenz, MCI = Mild Cognitive Impairment*

Gruppen		**n (w/m)**	**Alter**	**Krankheitsdauer**	**MMST**
Kontroll-gruppen	**CTRL-a**	**19 (9/10)**	**24,4 (15-36)**	/	/
	CTRL-b	**14 (6/8)**	**45,4 (38-58)**	/	/
	CTRL-c	**20 (10/10)**	**70,0 (54-84)**	/	/
	CTRL-ALS	**20 (10/10)**	**61,6 (50-78)**	/	/
Schranken-dysfunktion	**Gesamt**	**27 (21/6)**	**64,2 (32-86)**	/	/
	Isolierte Q_{Alb}-Erhöhung	20	74,3(32-86)	/	/
	GBS	7	54,1(36-63)	/	/
ALS	**Gesamt**	**15 (8/7)**	**61,8 (30-75)**	**1,9 (0,5-12)**	/
	Bulbäre Verlaufsform	3	71,0 (68-75)	1,7 (1-3)	/
	Klassische ALS	12	59,5(30-74)	2,0 (0,5-12)	/
Demenz	**Gesamt**	**21 (10/11)**	**69,2 (54-80)**	**2,0 (0,5-5)**	**24,9 (10-30)**
	Alzheimer Demenz	11	70,5 (54-80)	1,6 (0,5-4)	24,5 (20-30)
	FTD	2	59,5 (55-64)	1,3 (0,5-2)	26
	VD	3	68,3 (63-77)	2 (1-3)	26 (20-30)
	MCI	5	70,8 (58-79)	3 (1-5)	24,6 (10-29)
Depression		**23 (11/12)**	**65,6 (48-80)**	**2,0 (0,25-10,0)**	/

2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Version 10.1.3 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Es wurden Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane und Quantile berechnet und die Ergebnisse graphisch anhand von Balkendiagrammen, Streudiagrammen und Boxplots dargestellt. Aufgrund der Normalverteilung der Daten wurde zum Vergleich zweier unabhängiger Gruppen der Student´s t-test durchgeführt. Zur Überprüfung der Korrelationen wurde der Pearson´sche Korrelationskoeffizient herangezogen. Um Daten mehrerer unabhängiger Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde eine nicht-parametrische ANOVA (Test zur Untersuchung von Mittelwertunterschieden einer Variablen zwischen mehreren Gruppen) angewandt, welcher im Falle eines signifikanten Ergebnisses die Anwendung der Tamhane´s Methode (paarweiser Vergleich der Mittelwerte der Gruppen) folgte. P-Werte, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant anerkannt.

3. Ergebnisse

3.1. Validierung des Erythropoietin ELISA

3.1.1. Wiederfindung

Die Experimente zur Wiederfindung („Spiking“) des EPO ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) wurden wie in 2.3.7. beschrieben durchgeführt und die jeweilige Wiederfindung in % anhand der dort angegebenen Formeln berechnet. Die Wiederfindung betrug für die Wiederfindungsexperimente im Mittel 100 % (Tab. 3).

Tab. 3: Wiederfindung des Erythropoietin ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): *In der ersten Zeile stehen die Erythropoietin-Konzentrationen des Sample-Spike in den jeweiligen 3 Versuchen in mU/ml (Milliunits pro Milliliter), die zweite Zeile zeigt die entsprechenden Erythropoietin-Konzentrationen des Kontroll-Spike und die dritte diejenigen des Liquorkonzentrates. In der letzten Zeile ist die Wiederfindung in % des erwarteten Wertes angegeben.*

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
Sample-Spike	47,11	40,89	55,48
Kontroll-Spike	38,65	38,71	48,99
Liquor-konzentrat	5,67	4,48	6,88
Wieder-findung	**107,2 %**	**94,1 %**	**99,2 %**

3.1.2. Linearität

Die Linearität des hier verwendeten EPO ELISA wurde wie in 2.3.7. beschrieben überprüft und deren Wiederfindung in % anhand der dort angegebenen Formeln berechnet. Die mittlere Wiederfindung der jeweiligen Verdünnungen der Linearitätsexperimente betrug 97,4 % für die 1:2 Verdünnung, 103,6 % für die 1:4 Verdünnung und 96,8 % für die 1:8 Verdünnung (Tab. 4). Die Versuche zeigen, dass der verwendete EPO ELISA linear ist und zudem keine Matrixeffekte das Ergebnis der Messungen verfälschen.

Tab. 4: Linearitätsversuche des Erythropoietin ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): *In der ersten Spalte sind die jeweiligen Versuche der Linearitätsexperimente mit der entsprechenden Verdünnung angegeben. Aus Spalte zwei lassen sich die erwarteten Erythropoietin-Konzentrationen entnehmen und aus Spalte drei die wirklich gemessenen Werte in mU/ml (Milliunits pro Milliliter). Die letzte Spalte liefert die Wiederfindung in % des erwarteten Wertes der Linearitätsversuche.*

	erwarteter Wert	**gemessener Wert**	**Wiederfindung**
1:2 Verdünnung			
1. Versuch	23,56	21,67	92,0 %
2. Versuch	20,45	20,48	100,1 %
3. Versuch	27,74	27,8	100,2 %
1:4 Verdünnung			
1. Versuch	11,78	12,77	108,4 %
2. Versuch	10,22	10,14	99,2 %
3. Versuch	13,87	14,33	103,3 %
1:8 Verdünnung			
1. Versuch	5,89	5,59	94,9 %
2. Versuch	5,11	5,28	103,3 %
3. Versuch	6,94	6,39	92,1 %

Sowohl die Wiederfindungs- als auch die Linearitätsexperimente zeigten Ergebnisse im Bereich von 100 %. Aus Tab. 5 sind die genauen Werte aller Wiederfindungsversuche zu entnehmen.

Tab. 5: Ergebnisse der Wiederfindungs- und Linearitätsexperimente: *In der ersten Zeile sind die jeweiligen Versuche mit Namen (Spiking = Wiederfindungsexperiment) angegeben und in der darunter liegenden Zeile die Wiederfindung in %, wobei in der oberen Zeile Mittelwert ± Standardabweichung und in der unteren Zeile Median (Minimum-Maximum) genannt werden.*

	Spiking	**1:2 Verdünnung**	**1:4 Verdünnung**	**1:8 Verdünnung**
Wieder-findung	100,0±6,6 99,0(94,0-107,0)	97,4±4,7 100,1(92,0-100,2)	103,6±4,6 103,3(99,2-108,4)	96,8±5,8 94,9(92,2-103,4)

3.1.3. Richtigkeit und Präzision

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden bei jeder Messung zwei Kontrollen des Herstellers des EPO ELISA mitgeführt.

Der Vertrauensbereich der Kontrolle 1 wurde lediglich zweimal überschritten, wobei es sich um eine maximale Differenz von 2,1 mU/ml handelte (insgesamt n=26 Kontrollmessungen).

Bei Kontrolle 2 kam es bei insgesamt n=25 Messungen zu 5 Übertretungen des Vertrauensbereichs mit einer maximalen Differenz von 3,9 mU/ml und zu einer Unterschreitung des Vertrauensbereichs mit einer Differenz von 1,2 mU/ml. Die genauen Mittelwerte sind Tab. 6 zu entnehmen.

Tab. 6: Richtigkeit des Erythropoietin (EPO) ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): *In der oberen Zeile sind Mittelwert ± Standardabweichung und in der unteren Zeile Median (Minimum-Maximum) der Erythropoietin-Konzentration in mU/ml (Milliunits pro Milliliter) der Kontrolle 1 und 2 angegeben.*

	Kontrolle 1	**Kontrolle 2**
EPO	11,06±1,24 11,25(8,8-14,6)	41,51±4,19 41,0(32,8-49,9)

Zur besseren Überprüfung der Präzision des verwendeten ELISA Kits wurde der Interassay-Variationskoeffizient im niedrigsten, mittleren und obersten Bereich der Standardkurve bestimmt. Dieser lag zwischen 1,7 und 27,0 % (Tab. 7).

Tab. 7: Interassay-Variationskoeffizient des Erythropoietin ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): *In der linken Spalte sind die erwarteten Erythropoietin-Konzentrationen aufgetragen, die mittlere Spalte zeigt in der oberen Zeile Mittelwert ± Standardabweichung und in der unteren Zeile Median (Minimum-Maximum) der gemessenen Erythropoietin-Konzentration in mU/ml (Milliunits pro Milliliter). Die rechte Spalte zeigt den jeweils zugehörigen Variationskoeffizienten (Interassay-VC) in %.*

Erwartete Konzentration	gemessene Konzentration	Interassay–VC
0,61	0,74±0,20 0,82(0,41-0,97)	27,0 %
20	19,99±0,51 20,28(19,17-20,54)	2,6 %
100	100,68±1,76 100,3(98,59-104,42)	1,7 %

3.1.4. Standardkurven und Sensitivität

Die bei jeder Messung mitgeführte Standardkurve hatte durch den zusätzlich eingesetzten Standard* eine Sensitivität von 0,61 mU/ml und einen Maximalwert von 200 mU/ml, was dem Standard 7 entspricht (Abb. 5).
Der lineare Bereich des EPO ELISA lag zwischen Standard 5, welcher einer EPO-Konzentration von 50 mU/ml entspricht und Standard 7, welcher eine Konzentration von 200 mU/ml aufweist.

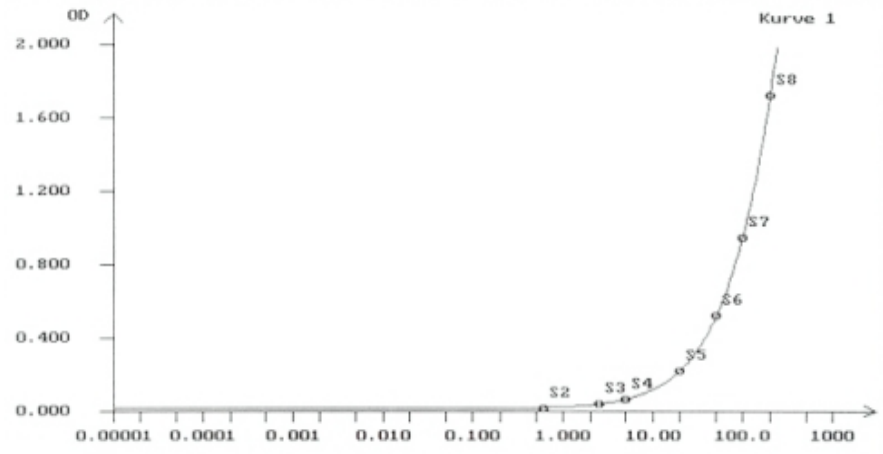

Abb. 5: Bild einer Standardkurve aus dem Auswertungsprogramm Easy Fit (SLT Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim): *Auf der Abszisse sind die Erythropoietin-Konzentrationen in mU/ml (MIlliunits pro Milliliter) angegeben, auf der Ordinate findet sich die Angabe der Extinktion = OD = Opitcal Density, welche photometrisch bestimmt wurde. Die auf der Kurve markierten Punkte stellen die verwendeten Standards dar (S=Standard, nach der Größe des Standards durchnummeriert), der Standard 1 = S1 =0,0 mU/ml und der Standard* = 0,61 mU/ml sind hier auf der Abbildung softwarebedingt nicht angegeben.*

3.2. Stabilität von Erythropoietin im Liquor cerebrospinalis

3.2.1. Langzeitstabilität

Die Gesamtproteinkonzentration des Pool-Liquors betrug 389 mg/l vor der Konzentration und danach 1810 mg/l, welches einem Konzentrationsfaktor von 4,7 entspricht. Dieser wurde allen nachfolgenden Experimenten zur EPO-Stabilität im Liquor zugrunde gelegt und alle angegebenen Werte wurden anhand dessen vom gemessenen Wert ausgehend errechnet.
Direkt nach Konzentration des Pool-Liquors wurde anhand des ELISA die EPO-Ausgangskonzentration im Pool-Liquorkonzentrat bestimmt. Diese betrug im Mittelwert bei Doppelbestimmungen 1,21 mU/ml (bereits auf die wahre Konzentration anhand des Konzentrationsfaktors rückgerechnet).
Ein weiteres Aliquot des Pool-Liquorkonzentrates wurde direkt nach Konzentration für 2,5 Monate bei −80°C eingefroren und anschließend wurde die zugehörige EPO-Konzentration gemessen. Dies lieferte eine um 17,4 % verringerte EPO-Konzentration im Pool-Liquor gegenüber dem Ausgangswert (Tab. 8).

Tab. 8: Bestimmung der Langzeitstabilität von Erythropoietin (EPO) im Liquor: *Angegeben sind die Erythropoietin-Konzentrationen im Liquor in mU/ml (Milliunits pro Milliliter) direkt nach Herstellung des Pool-Liquorkonzentrates, nach 2 Wochen Aufbewahrung, sowie nach 2,5 Monaten Aufbewahrung bei −80°C.*

	Ausgangswert	**nach 2 Wochen**	**nach 2,5 Monaten**
EPO	1,21	1,45	1,00

3.2.2. Stabilität während Einfrier/- Auftauzyklen

Der Ausgangswert der EPO-Konzentration ist derselbe wie bei den Experimenten zur Langzeitstabilität: 1,21 mU/ml.
Unmittelbar nach Konzentration wurde ein weiteres Aliquot des Pool-Liquorkonzentrates für 14 Tage bei −80°C eingefroren und anschließend an 4 aufeinanderfolgenden Tagen die EPO-Konzentration nach dem jeweiligen Einfrier-/Auftauzyklus bestimmt.

Nach dem ersten Zyklus war eine Zunahme von 19,8 % im Vergleich zum Ausgangswert zu verzeichnen, welche beim zweiten Zyklus auf 10,7 % zurückging. Im dritten Zyklus zeigte sich dann erstmals eine 17,4 %ige Reduktion gegenüber der Anfangskonzentration, welche im letzten Einfrier-/Auftauzyklus um weitere 9 % abfiel (Abb. 6).

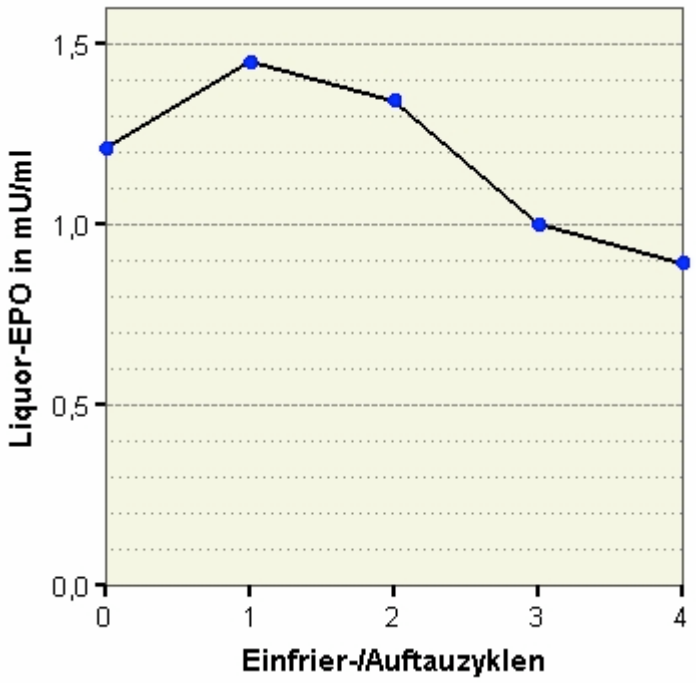

Abb. 6: Erythropoietin (EPO)-Stabilität im Pool-Liquor während Einfrier-/Auftauzyklen: *Auf der Abszisse befindet sich die Nummerierung der 4 Einfrier-/Auftauzyklen, wobei 0=Anfangswert darstellt. Auf der Ordinate sind die jeweils zugehörigen Erythropoietin-Konzentrationen in mU/ml (Milliunits pro Milliliter) angegeben.*

3.3. Normalwerte von Erythropoietin im Serum und Liquor

Die EPO-Konzentrationen der Kontrollgruppen A, B und C wurden für die folgenden Auswertungen herangezogen.

Die jüngste Kontrollgruppe (CTRL-a) mit einem mittleren Alter von 24,4±6,1 Jahren lieferte im Mittel eine um 20,3 % geringere EPO-Konzentration im Serum als die älteste Kontrollgruppe mit einem mittleren Alter von 69,7±8,3 Jahren (p=0,275). Die Kontrollgruppe B (CTRL-b) mit dem Altersmittelwert von 45,4±6,4 Jahren erbrachte eine im Mittleren um 14 % erniedrigte EPO-Konzentration gegenüber CTRL-c (p=0,246; Abb. 7; Tab. 9). Die statistische Auswertung dieser

Daten ergab keinerlei signifikante Unterschiede zwischen CTRL-a und CTRL-b hinsichtlich der EPO-Konzentration im Serum (p=0,748).

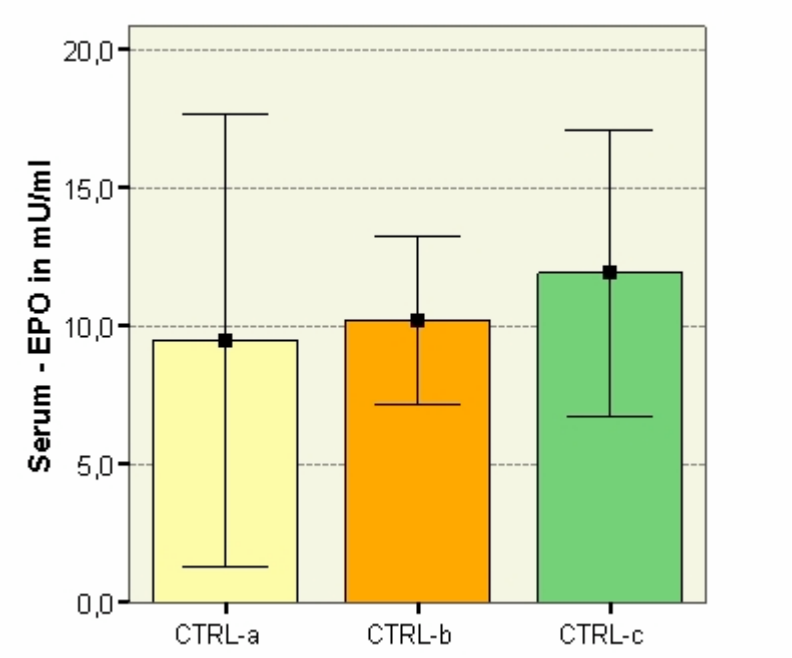

Abb. 7: Vergleich der Mittelwerte der Serum-Erythropoietin-Konzentrationen der Kontrollgruppen: *Auf der Abszisse sind die drei Kontrollgruppen und auf der Ordinate wurden die Mittelwerte ± Standardabweichung der Erythropoietin (EPO)-Konzentration im Serum in mU/ml (Milliunits pro Milliliter) aufgetragen. Die statistische Auswertung ergab keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (p>0,05). CTRL-a = Kontrollgruppe A, CTRL-b = Kontrollgruppe B, CTRL-c = Kontrollgruppe C.*

Der Mittelwert der EPO-Konzentration im Liquor steigt von Kontrollgruppe A (CTRL-a) auf B (CTRL-b) um 14,1 % an und letztlich wurde eine weitere Steigerung der EPO-Konzentration von 114,1 % von Kontrollgruppe B auf C beobachtet (alle Prozentangaben beziehen sich auf CTRL-a). Bezogen auf die EPO-Konzentration von Kontrollgruppe A ergab sich eine Erhöhung der EPO-Konzentration um 128,2 % auf Kontrollgruppe C (Abb. 8, Tab. 9). Die statistische Auswertung ergab im Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest eine Normalverteilung für die drei Kontrollgruppen, so dass die weitere statistische Auswertung anhand des Student´s t-Test durchgeführt wurde. Dieser ergab einen signifikanten Unterschied zwischen CTRL-a und CTRL-c, sowie zwischen CTRL-b und CTRL-c (p<0,001). Zwischen CTRL-a und CTRL-b wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet (p=0,351).

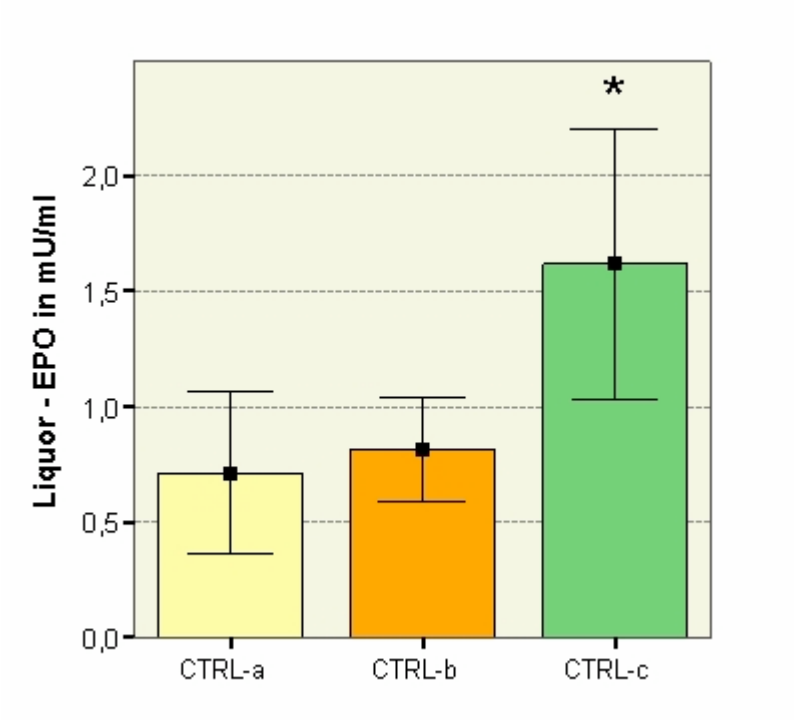

Abb. 8: Mittelwerte der Erythropoietin-Konzentration der Normalkontrollen im Liquor: *Auf der Abszisse sind die drei Kontrollgruppen und auf der Ordinate der Mittelwert ± Standardabweichung der Erythropoietin (EPO)-Konzentration im Liquor in mU/ml (Milliunits pro Milliliter) der jeweiligen Gruppe aufgetragen. Die statistische Auswertung zeigt signifikante Unterschiede zwischen CTRL-a bzw. CTRL-b und CTRL-c (* = p<0,001). CTRL-a = Kontrollgruppe A, CTRL-b = Kontrollgruppe B, CTRL-c = Kontrollgruppe C.*

Tab. 9: Erythropoietin-Konzentrationen der Normalkontrollen: *Es sind der Median (Mininum-Maximum) der Erythropoietin (EPO)-Konzentration in mU/ml (Milliunits pro Milliliter) im Liquor und Serum angegeben. CTRL-a = Kontrollgruppe A, CTRL-b = Kontrollgruppe B, CTRL-c = Kontrollgruppe C.*

Gruppen	EPO Liquor	EPO Serum
CTRL-a	0,70(0,13-1,63)	6,79(1,91-40,79)
CTRL-b	0,83(0,46-1,34)	9,63(6,17-18,23)
CTRL-c	1,83(0,48-2,62)	10,50(4,46-24,71)

3.4. Korrelation von Erythropoietin im Liquor mit dem Alter

Die genauere Betrachtung der EPO-Konzentrationen der Normalkontrollen ergab einen deutlichen Trend zu steigenden Konzentrationen im Alter.

Es wurden die Kontrollgruppen A, B und C zu einer großen Kontrollgruppe zusammengefasst und anschließend die Korrelation der EPO-Konzentration im Liquor mit dem Alter anhand des Pearson´schen Koeffizienten überprüft. Dies ergab eine signifikante Korrelation der Liquor-EPO-Konzentration mit dem Alter ($p<0,01$; $R^2=0,41$, Abb. 9).

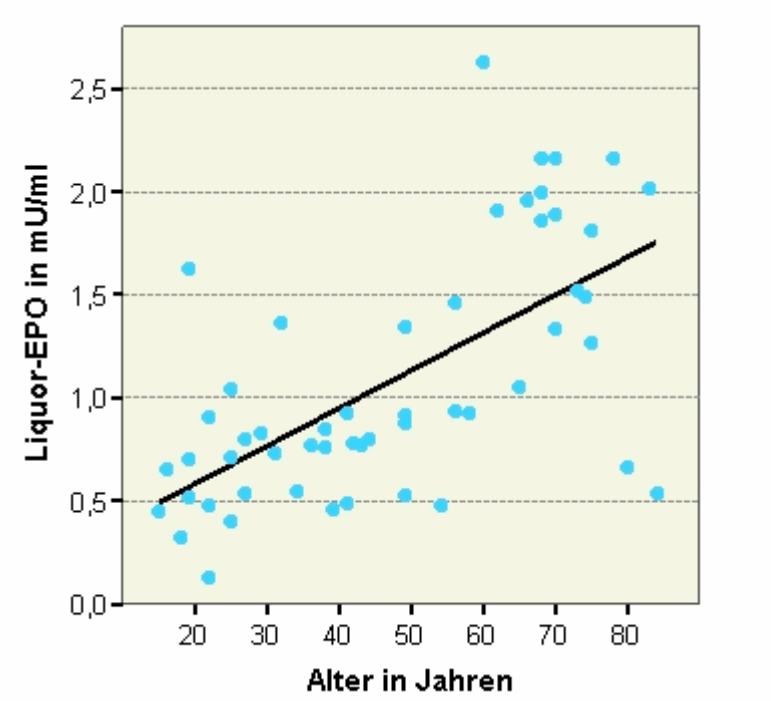

Abb. 9: Abhängigkeit der Erythropoietin-Konzentration im Liquor vom Alter: *Auf der Abszisse ist das Alter in Jahren aufgetragen und auf der Ordinate die entsprechende Erythropoietin (EPO)-Konzentration des Liquors in mU/ml (Milliunits pro Milliliter). Die schwarze Linie entspricht der Regressionsgeraden ($R^2=0,41$, R^2=lineares Bestimmtheitsmaß). Die Formel der Regressionsgeraden ergibt: Erythropoietin-Konzentration = 0,22 + 0,02 × Alter. Die Korrelation ist auf dem Niveau $p<0,01$ statistisch signifikant.*

3.5. Unabhängigkeit der Konzentration vom Geschlecht

Die Kontrollgruppen A, B und C wurden auf mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich ihrer EPO-Konzentration im Liquor untersucht.
In der Kontrollgruppe A waren n=10 weibliche Patienten mit einer im Mittel um 18,5 % höheren EPO-Konzentration im Liquor als die n=9 männlichen Patienten (p=0,482; Tab. 10).
Der Mittelwert der EPO-Konzentration der Frauen (n=8) ergab um 11,5 % niedrigere Werte gegenüber den männlichen Patienten (n=6) der Kontrollgruppe B (p=0,473; Tab. 10).
Die mittleren EPO-Konzentrationen für die Kontrollgruppe C lagen bei den weiblichen Patienten (n=10) um 16,0 % höher als bei den 10 Männern (p=0,364; Tab. 10; Abb. 10).

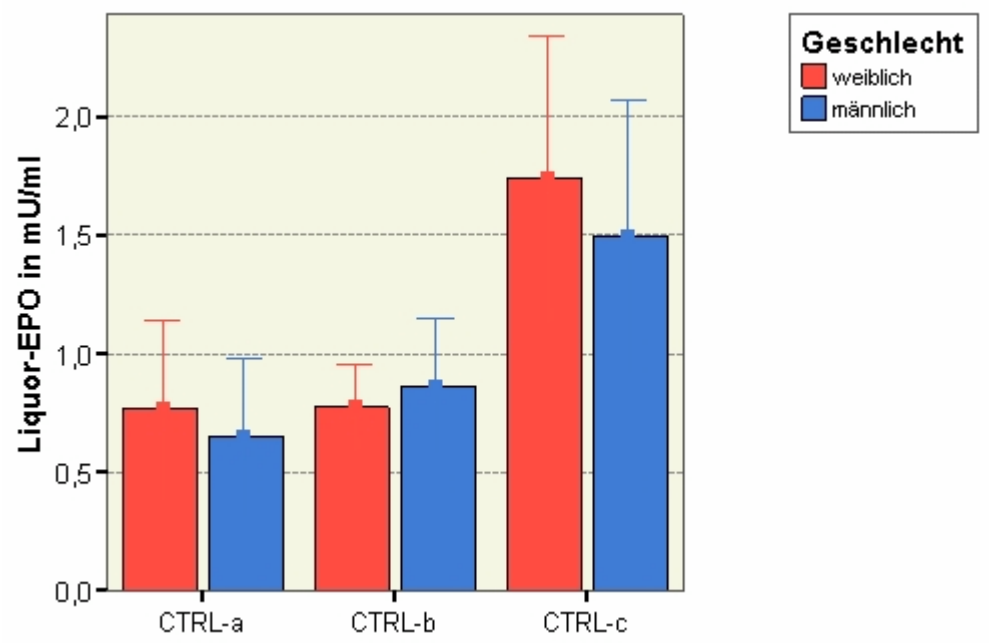

Abb. 10: Unabhängigkeit der Erythropoietin-Konzentration im Liquor vom Geschlecht: *Auf der Abszisse sind die Kontrollgruppen (CTRL-a = Kontrollgruppe A, CTRL-b = Kontrollgruppe B, CTRL-c = Kontrollgruppe C) unterteilt in weiblich=rot und männlich=blau. Die Balken zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung der Erythropoietin (EPO)-Konzentration im Liquor in mU/ml (Milliunits pro Milliliter). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Subjekten gefunden (p>0,05).*

Tab. 10: Erythropoietin (EPO)-Konzentrationen von weiblichen und männlichen Patienten: *Es ist jeweils der Median (Minimum-Maximum) der Erythropoietin-Konzentration der jeweiligen Kontrollgruppe (CTRL-a = Kontrollgruppe A, CTRL-b = Kontrollgruppe B, CTRL-c = Kontrollgruppe C) in mU/ml (Milliunits pro Milliliter) angegeben. In der linken Spalte befinden sich die Werte der weiblichen und in der rechten Spalte diejenigen der männlichen Kontrollen.*

Gruppen	weiblich	männlich
CTRL-a	0,74(0,32-1,63)	0,65(0,13-1,36)
CTRL-b	0,81(0,49-0,94)	0,84(0,46-1,34)
CTRL-c	1,93(0,54-2,62)	1,51(0,48-2,16)

3.6. Unabhängigkeit der Konzentration von der Blut-Liquor-Schranke

Um den Einfluss der Blut-Liquor-Schrankenfunktion auf die EPO-Konzentration im Liquor zu untersuchen, wurde die EPO-Konzentration in Abhängigkeit vom Albuminquotienten, einem anerkannten Marker für die Integrität der Blut-Liquor-Schranke, untersucht.

Die statistische Auswertung hierfür ergab keinerlei signifikante Korrelation zwischen der EPO-Konzentration im Liquor der 27 untersuchten Patienten und dem zugehörigen Albuminquotienten (p=0,523; Abb. 11; Tab. 11). Die Regressionsgerade zeigt bei steigenden Werten des Albuminquotienten einen leichten Trend zu niedrigeren Liquor-EPO-Konzentrationen.

Zur genaueren Analyse wurde für jeden Patienten der Kontrollgruppen nun noch der Quotient aus der EPO-Konzentration im Liquor und dem Serum gebildet (Q_{EPO}=EPO-Liquorkonzentration/EPO-Serumkonzentration). Die statistische Untersuchung auf eine Abhängigkeit des Q_{EPO} vom Albuminquotienten zeigte keine signifikante Korrelation beider Marker (p=0,147; Tab. 12).

Aus dem Mittelwert des Q_{EPO} von circa 0,12 ergibt sich nach Felgenhauer eine rechnerisch ermittelte intrathekale Synthese des EPO von 92 % [33].

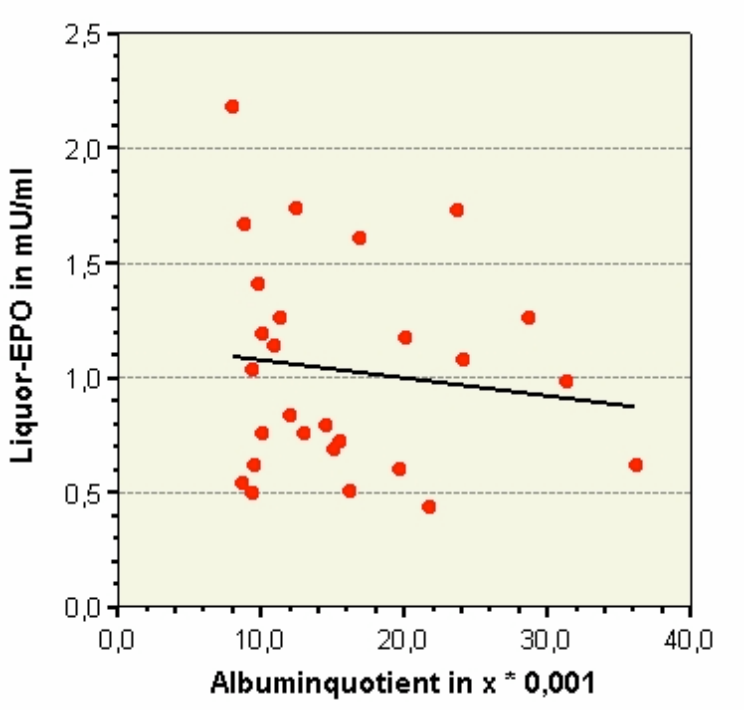

Abb. 11: Unabhängigkeit der Erythropoietin-Konzentration im Liquor vom Albuminquotienten: *Auf der Abszisse ist der Albuminquotient in x*0,001 aufgetragen und auf der Ordinate die Erythropoietin (EPO)-Konzentration im Liquor in mU/ml (Milliunits pro Milliliter). Die Gerade stellt die lineare Regression dar. Die Korrelation zwischen der Erythropoietin-Konzentration im Liquor und dem Albuminquotienten ist nicht signifikant (p>0,05).*

Tab. 11: Erythropoietin-Konzentrationen und Albuminquotient der Patienten mit Schrankendysfunktion: *In der oberen Zeile befinden sich Mittelwert ± Standardabweichung und in der unteren Zeile der Median (Minimum-Maximum) der Erythropoietin (EPO)-Konzentration in mU/ml sowie in der letzten Spalte des Albuminquotienten (Q_{Alb}) in x*0,001.*

Gruppen	EPO Liquor	EPO Serum	Q_{Alb}
Schranken-störung	1,03±0,46 0,99(0,44-2,18)	8,69±4,74 7,90(0,48-19,19)	15,8±7,6 12,9(8,0-36,1)

Tab. 12: Erythropoietinquotient (Q_{EPO}): *In der oberen Zeile befinden sich Mittelwert ± Standardabweichung und in der unteren Zeile der Median (Minimum-Maximum) des Erythropoietinquotienten der Kontrollgruppen. In der rechten Spalte befinden sich die entsprechenden Werte für alle Kontrollgruppen insgesamt. CTRL-a = Kontrollgruppe A, CTRL-b = Kontrollgruppe B, CTRL-c = Kontrollgruppe C.*

Gruppen	CTRL-a	CTRL-b	CTRL-c	insgesamt
Q_{EPO}	0,10±0,06 0,08(0,03-0,23)	0,08±0,02 0,08(0,05-0,12)	0,17±0,11 0,14(0,03-0,45)	0,12±0,08 0,09(0,03-0,45)

3.7. Ergebnisse der klinischen Gruppen

3.7.1. Erythropoietin im Liquor von ALS Patienten

Die mittlere Serumkonzentration der ALS-Gruppe lag um 3,7 % niedriger verglichen mit der alterskorrelierten Kontrollgruppe CTRL-ALS (p=0,788; Tab. 13). Bei Betrachtung der Liquor-EPO-Konzentration fielen um 26,3 % verringerte Werte bei der ALS-Gruppe bezogen auf CTRL-ALS auf.
Der Student´s t-Test lieferte im Vergleich der beiden Gruppen einen signifikanten Unterschied bezüglich der Konzentrationen im Liquor (p=0,018; Abb. 12; Tab. 13).

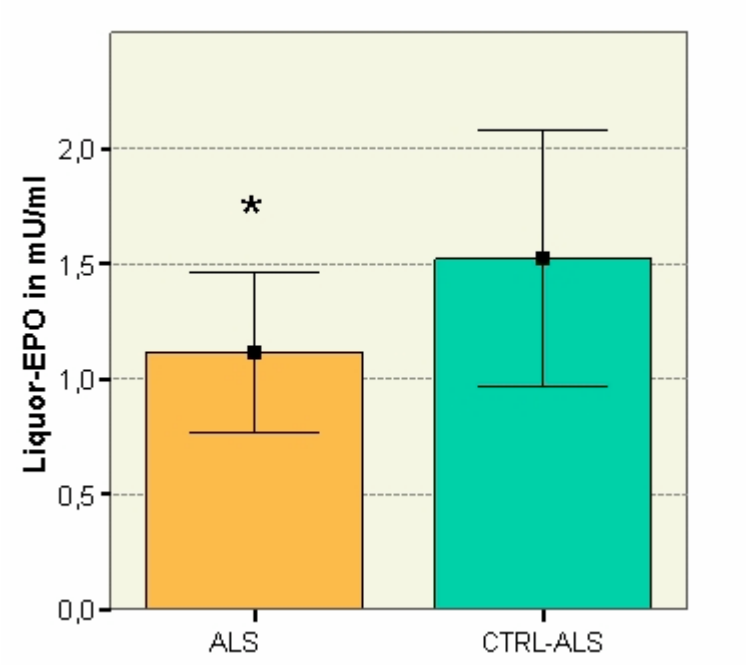

Abb. 12: Vergleich der Mittelwerte der Erythropoietin-Konzentration im Liquor zwischen der ALS (Amyotrophe Lateralsklerose)-Gruppe und der zugehörigen Konrollgruppe (CTRL-ALS): *Auf der Abszisse befinden sich die beiden untersuchten Gruppen und auf der Ordinate die zugehörigen Mittelwerte ± Standardabweichung der Erythropoietin (EPO)-Konzentration in mU/ml (Milliunits pro Milliliter). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist auf dem Niveau p<0,05 statistisch signifikant (*).*

Tab. 13: Erythropoietin-Konzentration der ALS (Amyotrophe Lateralsklerose)-Gruppe: *Es ist der jeweilige Median (Minimum-Maximum) der Erythropoietin (EPO)-Konzentration in mU/ml (Milliunits pro Milliliter) der ALS– und der zugehörigen Kontrollgruppe (CTRL-ALS) im Serum und Liquor angegeben.*

Gruppen	EPO Liquor	EPO Serum
ALS	1,07(0,59-1,67)	10,60(2,40-26,30)
CTRL ALS	1,68(0,48-2,62)	12,50(6,00-19,70)

3.7.2. Erythropoietin im Liquor bei Demenzen

Die EPO-Konzentration im Liquor der Demenzpatienten war im Vergleich zur Kontrollgruppe C (CTRL-c) um 14,8 % erhöht (p=0,40; Abb. 13; Tab. 14), während im Serum annähernd gleiche Werte erzielt wurden und die Werte der Demenzgruppe lediglich um 9,6 % gegenüber der Kontrolle erhöht waren (p=0,576; Tab. 14). In der statistischen Auswertung wurde bezüglich beider Parameter kein signifikanter Unterschied festgestellt (p>0,05).

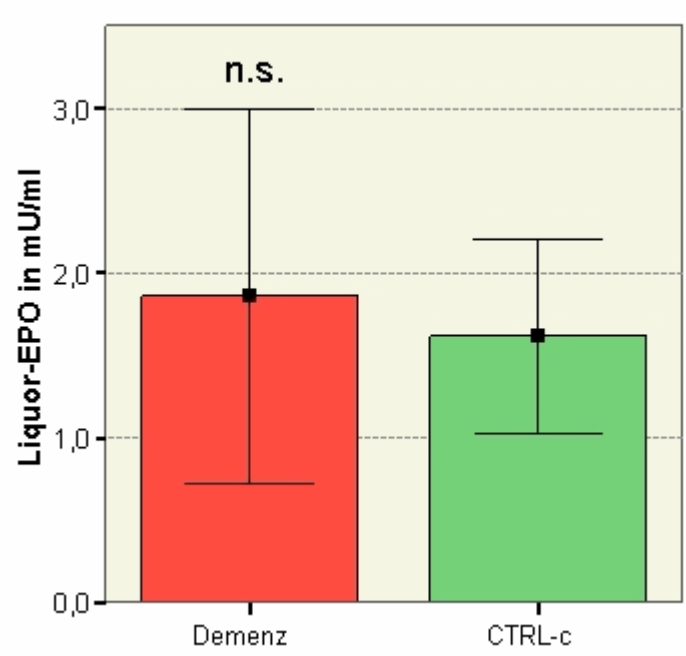

Abb. 13: Vergleich der Mittelwerte der Erythropoietin-Konzentration im Liquor zwischen Demenzgruppe und Kontrollgruppe C (CTRL-c): *Auf der Abszisse sind die zwei untersuchten Gruppen aufgetragen und auf der Ordinate die Mittelwerte ± Standardabweichung der Erythropoietin (EPO)-Konzentration in mU/ml (Milliunits pro Milliliter). Die statistische Auswertung zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (p>0,05, n.s. = nicht signifikant).*

Tab. 14: Erythropoietin-Konzentrationen der Demenzgruppe: *Es ist der jeweilige Median (Minimum-Maximum) der Erythropoietin (EPO)-Konzentration in mU/ml (Milliunits pro Milliliter) der Demenz- und der zugehörigen Kontrollgruppe C (CTRL-c) im Serum und Liquor angegeben.*

Gruppen	EPO Liquor	EPO Serum
Demenz	1,50(0,53-5,10)	11,86(3,99-35,61)
CTRL-c	1,83(0,48-2,62)	10,50(4,46-24,71)

3.7.3. Erythropoietin im Liquor von Patienten mit Depressionen

In der Depressionsgruppe wurden 23 Patienten untersucht. Als Kontrollgruppe fungierten hier 23 Patienten aus den Kontrollgruppen B (CTRL-b) und C (CTRL-c), die entsprechend dem Alter zufällig zugeteilt wurden.

Bezüglich der Serum-EPO-Konzentration zeigten sich in der Kontrollgruppe um 29,3 % erhöhte Werte gegenüber der Depressionsgruppe (p=0,003; Tab. 15). Die Werte beider Gruppen lagen jedoch jeweils im Referenzbereich.

Hinsichtlich der Liquor-EPO-Konzentration ergab sich für die Depressionsgruppe prozentual kein Unterschied zur Kontrollgruppe (p=0,969; Abb. 14; Tab. 15).

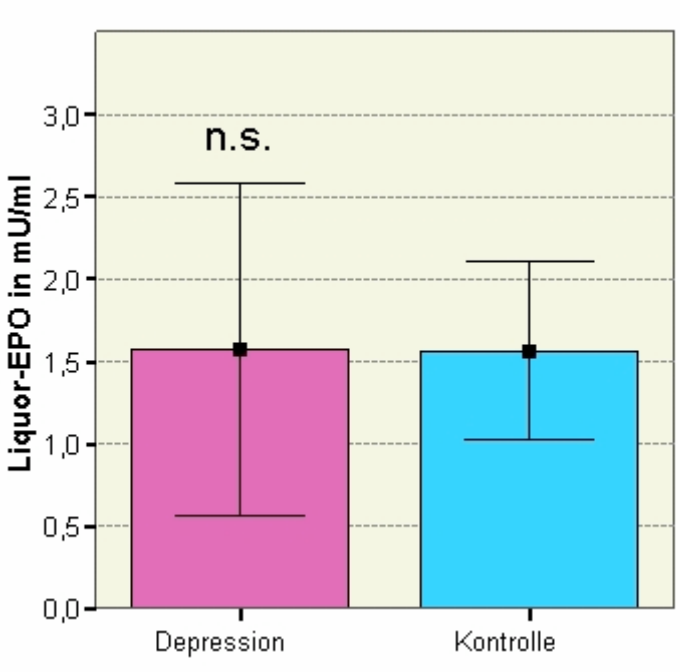

Abb. 14: Vergleich der Mittelwerte der Erythropoietin-Konzentration im Liquor von Depressions- und Kontrollgruppe: *Auf der Abszisse sind die Depressionsgruppe und die zugehörige alterskorrelierte Kontrollgruppe aufgetragen und auf der Ordinate die entsprechenden Mittelwerte ± Standardabweichung der Erythropoietin (EPO)-Konzentration in mU/ml (MIlliunits pro Milliliter). Der Unterschied der beiden Gruppen ist statistisch nicht signifikant (n.s., p=0,969).*

Tab. 15: Erythropoietin-Konzentrationen der Depressionsgruppe: *Es ist der jeweilige Median (Minimum-Maximum) der Erythropoietin (EPO)-Konzentration in mU/ml (MIlliunits pro Milliliter) der Depressions- und der zugehörigen Kontrollgruppe im Serum und Liquor angegeben.*

Gruppen	EPO Liquor	EPO Serum
Depression	1,22(0,52-4,00)	8,70(3,80-18,30)
Kontrolle	1,68(0,48-2,62)	12,50(6,00-19,70)

3.8. Multivariater Gruppenvergleich

Die Durchführung einer univariaten ANOVA (Analysis Of Variance) für alle untersuchten Gruppen lieferte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Liquor-EPO-Konzentration ($p<0,001$; Abb. 15, Tab. 16).
Die Post-Hoc-Analyse nach der Tamhane Methode zeigte statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen CTRL-a, CTRL-c, CTRL-ALS, Demenz und Depression ($p<0,01$). Ebenso wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen CTRL-b, CTRL-c, CTRL-ALS, Demenz und Depression erhalten ($p<0,05$). Außerdem zeigte sich eine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen Demenz und der Schrankendysfunktion ($p<0,05$). In diesem statistischen Verfahren konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ALS und CTRL-ALS festgestellt werden, was im vorangegangenen Vergleich anhand des t-Tests der Fall war.

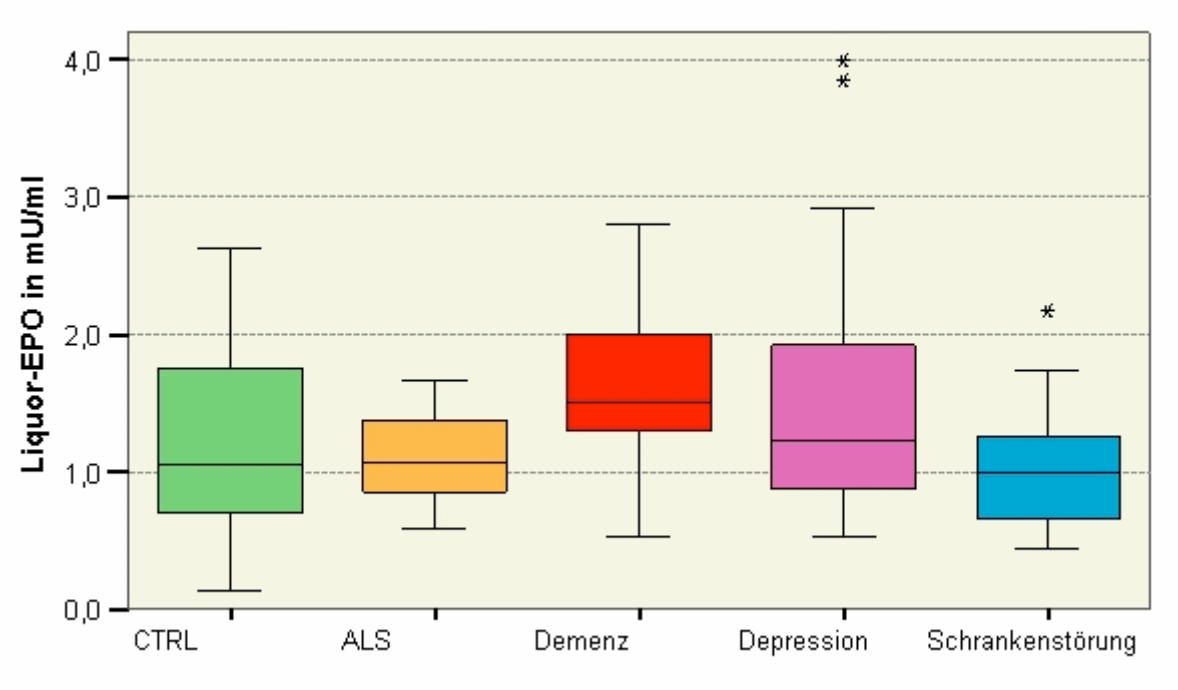

Abb. 15: Boxplots aller untersuchten Gruppen: *Auf der Abszisse sind die Gruppen aufgetragen und auf der Ordinate die Erythropoietin (EPO)-Konzentrationen im Liquor in mU/ml (Milliunits pro Milliliter). Die Mittellinie der Boxen stellt den Median dar, das untere Ende der Boxen das 25 %-Quantil, das obere Ende der Boxen das 75 %-Quantil. Das untere Ende der senkrechten Linie zeigt den Minimalwert und das obere Ende den Maximalwert. Die Sternchen (*) zeigen Ausreißerwerte. CTRL = Kontrollgruppen A, B, C und ALS zusammengefasst; ALS = Amyotrophe Lateralsklerose.*

Tab. 16: Erythropoietin-Konzentrationen und Albuminquotient aller Gruppen: *In der oberen Zeile befinden sich jeweils Mittelwert ± Standardabweichung und in der unteren Zeile Median (Minimum-Maximum) der Erythropoietin (EPO)-Konzentration in mU/ml (Milliunits pro Milliliter) bzw. in der rechten Spalte des Albuminquotienten (Q_{Alb}) in x*0,001. In der statistischen Analyse bestehen bei CTRL-a und CTRL-b gegenüber CTRL-c, CTRL-ALS, der Demenz- und der Depressionsgruppe, sowie bei CTRL-c gegenüber der Gruppe mit Schrankendysfunktion signifikante Unterschiede (p<0,001) bezüglich der Liquor-EPO-Konzentration. Bei den Serum-EPO-Konzentrationen bestehen keinerlei signifikante Unterschiede (n.s. = nicht signifikant). Hinsichtlich des Albuminquotienten besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit Schrankendysfunktion und allen anderen Gruppen (p<0,001). CTRL-a = Kontrollgruppe A, CTRL-b = Kontrollgruppe B, CTRL-c = Kontrollgruppe C, CTRL-ALS = Kontrollgruppe ALS, ALS = Amyotrophe Lateralsklerose.*

Gruppen	EPO Liquor	EPO Serum	Q_{Alb}
CTRL-a	0,71±0,35 0,70(0,13-1,63)	9,48±8,20 6,79(1,91-40,79)	6,1±3,2 4,8(4,0-12,4)
CTRL-b	0,81±0,22 0,83(0,46-1,34)	10,23±3,04 9,63(6,17-18,23)	5,6±2,1 5,1(3,0-10,0)
CTRL-c	1,62±0,59 1,83(0,48-2,62)	11,90±5,18 10,50(4,46-24,71)	5,3±1,5 5,1(3,7-7,7)
CTRL-ALS	1,52±0,56 1,68(0,48-2,62)	12,74±3,80 12,50(6,00-19,70)	6,5±2,6 6,0(3,4-12,3)
ALS	1,12±0,35 1,07(0,59-1,67)	12,27±6,27 10,60(2,40-26,30)	7,1±2,0 7,0(4,0-11,3)
Demenz	1,86±1,14 1,50(0,53-5,10)	13,04±7,47 11,86(3,99-35,61)	7,1±2,2 7,1(4,4-15,0)
Depression	1,57±1,01 1,22(0,52-4,00)	9,01±3,82 8,70(3,80-18,30)	6,8±2,6 6,1(3,3-13,4)
Schranken-dysfunktion	1,03±0,46 0,99(0,44-2,18)	8,69±4,74 7,90(0,48-19,19)	15,8±7,6 12,9(8,0-36,1)
Signifikanz	p<0,001	n.s.	p<0,001

4. Diskussion

4.1. Bedeutung der Studie

Mit dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, eine reproduzierbare Methode zur Messung der EPO-Konzentration im humanen Liquor durch ELISA-Technik zu etablieren. Messungen der Stabilität des EPO im Liquor gaben näheren Aufschluss über geeignete Lagerungsbedingungen und –zeiten.
Die Messung der EPO-Konzentrationen in einer großen Kohorte von Normalkontrollen lieferte erstmals plausible Referenzwerte. Zudem konnte eine signifikante Korrelation der EPO-Konzentration im Liquor mit dem Alter herausgefunden werden, sowie eine Unabhängigkeit von der Funktion der Blut-Liquor-Schranke, welche auf eine vorwiegend intrathekale Herkunft des gemessenen EPO hindeutet [52, 100].
Die Untersuchung neurodegenerativer Erkrankungen lieferte erstmals Hinweise, dass EPO im Liquor bei der ALS verringert sein könnte, während bei Demenzpatienten eine geringe Erhöhung der Werte vorlag. Die Ergebnisse der Depressionsgruppe konnten in der Literatur vorhandene Daten bestätigen [83].

4.2. Diskussion der Methodik

4.2.1. Qualität des Erythropoietin ELISA

Der verwendete EPO ELISA ist im Vergleich zu anderen publizierten Verfahren im Hinblick auf Sensitivität, Präzision und Reproduzierbarkeit als qualitativ hochwertig einzustufen [69, 86]. Der Versuchsaufbau ist gut strukturiert und somit verlässlich reproduzierbar. Durch die Verdünnung des höchsten mitgelieferten Standards konnte die Sensitivität auf 0,61 mU/ml gesteigert werden, welches als Voraussetzung für die Messung von Proben im unteren Teil der Standardkurve von bedeutendem Vorteil ist.
In Bezug auf die Präzision ist der verwendete ELISA von R&D Systems anderen Systemen wie dem Radioimmunoassay (RIA) als gleichwertig einzustufen [69]. Es ist hier jedoch einschränkend hervorzuheben, dass bezüglich der Inter-Assay-Variation im untersten Bereich der Standardkurve bei 0,61 mU/ml

Einschränkungen vorhanden sind, da der Variationskoeffizient bei relativ hohen 27 % zu finden war. Gründe hierfür sind, dass gerade in diesem sehr niedrigen Konzentrationsbereich bereits kleinste Änderungen in der Konzentration einen sehr großen Effekt bezüglich der Standardabweichung ausmachen, was sich negativ auf den Variationskoeffizienten auswirkt. Dieses Phänomen ist jedoch durchgehend auch bei anderen ELISA im unteren Konzentrationsbereich zu finden und somit keine neue Erkenntnis [69, 86]. Da durch die Konzentration des Liquors stets mit Werten oberhalb 1,5 mU/ml gerechnet werden musste, ist davon auszugehen, dass der Variationskoeffizient in diesem Bereich aus Gründen der höheren Konzentration niedriger und damit positiver ausgefallen wäre.
Durch die Experimente zur Wiederfindung und Linearität konnte die Validität zufriedenstellend überprüft werden, so dass von einer guten Qualität des hier verwendeten EPO ELISA ausgegangen werden kann.

4.2.2. Herstellung des Liquorkonzentrates

Betrachtet man die Spannweite, in der sich die EPO-Konzentration der Kontrollen bewegt, so stellt sich schnell heraus, dass durch Verwendung des herkömmlichen ELISA mit dem niedrigsten Standard bei 2,5 mU/ml keine zuverlässigen Messwerte erzielt hätten werden können. Selbst durch Einführung des zusätzlichen Standards bei 0,61 mU/ml wäre eine erfolgreiche Messung jeder Probe nicht ausreichend sicher gestellt gewesen. Daher wurde zur Sicherstellung der Messbarkeit jede Liquorprobe zuvor aufkonzentriert. Hierzu wurden semipermeable Filter verwendet, in denen durch mehrere Zyklen Zentrifugation ca. 1,5 ml Liquor auf 150 µl konzentriert wurden. Als exakter Konzentrationsfaktor diente dann der Quotient aus Gesamtproteinkonzentration nach und vor der Prozedur.
Auch andere Autoren haben um die Messbarkeit des Liquors zu gewährleisten zu verschiedenen Methoden der Konzentration gegriffen. Ehrenreich et al. trockneten den Liquor über Nacht unter Nitrogen und schwemmten das Lyophylisat anschließend auf, um das Konzentrat in den ELISA einzusetzen. Als Konzentrationsfaktor für die anschließende Rückrechnung diente hierbei das Volumenverhältnis vor und nach Konzentration [28]. Verglichen mit der in der

vorliegenden Arbeit angewandten Methode scheint jedoch die Wahl des Konzentrationsfaktors bei Ehrenreich et al. nicht so exakt zu sein, da für alle Proben gleichsam ein gemeinsamer Faktor angenommen wird, ohne sicher zu stellen, dass dies für alle Proben gilt. Felgenhauer et al. haben für ihre Messungen im Liquor ebenfalls die Albuminkonzentration vor und nach der Konzentration zur Ermittlung des korrekten Konzentrationsfaktors herangezogen, obwohl deren Prozedur nicht durch Filtration, sondern durch Verdunstung und anschließende Dialyse gegen 0,1 % Natriumcitrat von statten ging [31]. Letztlich bleibt zu erwähnen, dass nicht hundertprozentig davon ausgegangen werden kann, dass bei der hier angewandten Filtrationsmethode nicht auch ein Teil des im Liquor vorhandenen EPO verloren geht und somit der Messung nicht mehr zur Verfügung steht. Den Herstellerangaben der verwendeten Filter zufolge sollten jedoch Proteine mit einer Molekülgröße entsprechend dem EPO nahezu vollständig zurückgehalten werden. Dennoch scheint auch bei anderen in der Literatur beschriebenen Verfahren nicht sichergestellt, dass während der Prozeduren bereits ein Teil des vorhandenen EPO durch Proteolysevorgänge und Ähnliches verloren geht. Daher ist die Filtration im Allgemeinen als vergleichbar anzusehen, da überdies hinaus die Bedingungen reproduzierbar sind und analytische Störfaktoren durch standardisierte Bedingungen gut ausgeschlossen werden können. Als Maß für den Konzentrationsfaktor ist die Gesamtproteinkonzentration ein guter Anhaltspunkt [31].

4.2.3. Lagerung der Proben

Alle verwendeten Liquor- und Serumproben wurden, bevor sie der EPO-Messung zugeführt wurden, im Liquorlabor der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm bei −80°C gelagert. Da es aus methodischen Gründen nicht möglich ist, alle Patientenproben zur gleichen Zeit zu gewinnen und einzufrieren, liegen bei den untersuchten Patientenproben unterschiedlich lange Lagerungszeiten vor, welche teilweise bis zu 2 Jahre differieren. Diese Lagerungszeit ist beträchtlich, wenn man die durchgeführten Experimente zur Langzeitstabilität von EPO betrachtet. Denn diese zeigen bereits einen beträchtlichen Rückgang der EPO-Konzentration im Liquor nach 2,5 Monaten. Die

ältesten Proben sind hiervon am deutlichsten betroffen und im Allgemeinen wären höhere EPO-Konzentrationen zu erwarten gewesen. Diese Tatsache erscheint nicht ideal, denn so können die erhaltenen Werte nicht als die tatsächlich im Liquor vorhandenen Konzentrationen von EPO angesehen werden.
Die Gruppen wurden jedoch mit gleich vielen Proben langer und kurzer Lagerungszeit bestückt, so dass von diesem Effekt alle Gruppen gleichmäßig betroffen sind und es lediglich Auswirkungen auf die Gesamthöhe der Liquor-EPO-Konzentration und nicht auf den Trend zwischen den Gruppen hat.

4.2.4. Durchführung des Erythropoietin ELISA

Der EPO ELISA wurde, um die Bedingungen möglichst bei jedem Versuch gleich zu erhalten, immer streng nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die einzige Veränderung des Standardprotokolls wurde durch die Einführung des zusätzlichen Standards in der Standardkurve bei jedem Experiment getätigt.
Um die Korrektheit der eigenen Messungen zu kontrollieren, wurden bei jedem Versuch zwei Kontrollen mitgeführt, welche, wie in 3.1.3. beschrieben, fast immer in dem vom Hersteller angegebenen Vertrauensbereich lagen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der EPO ELISA korrekt durchgeführt wurde und die Ergebnisse hiervon nicht wesentlich beeinträchtigt wurden.

4.2.5. Auswahl der klinischen Gruppen

In der Liquorbank der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm sind die vorhandenen Liquorproben nach Diagnose geordnet bei −80°C eingefroren.

Normalkontrollen
Aus dem Probenpool der Patienten ohne neurologische Defizite wurden zunächst randomisiert 73 Patienten ausgewählt. Anschließend wurde durch den Arztbrief sichergestellt, dass tatsächlich keine objektivierbare neurologische Erkrankung vorlag. Patientenproben, bei denen sich anhand des Arztbriefes doch ein neurologisches Defizit herausstellte, wurden ausgeschlossen und durch eine

andere Probe mit korrekter Zuordnung zur Gruppe der Normalkontrollen ersetzt. Die einzige Diagnose, die für die Zuordnung zur Normalkontrolle akzeptiert wurde, waren Spannungskopfschmerzen, deren Genese derzeit umstritten ist. Es wird davon ausgegangen, dass aus einer vermehrten Anspannung der Nackenmuskulatur eine Schwellenwertverstellung des zentralen nozizeptiven Systems resultiert, welche zu einer zentralen Sensibilisierung führt. Auslöser werden weiterhin in einer statisch dynamischen Fehlbelastung aber auch in psychischen Stressoren gesehen [7, 47, 48]. Im Moment gibt es lediglich Anhaltspunkte, dass bei Patienten mit Spannungskopfschmerzen möglicherweise ein relativ höherer Liquordruck, ein erhöhtes Blutvolumen und eine veränderte Hämodynamik vorliegen [42]. Es existieren jedoch bislang keinerlei Hinweise, dass die Zusammensetzung des Liquors durch Spannungskopfschmerzen beeinflusst wird.

Blut-Liquor-Schrankenfunktionsstörungen

In die Gruppe der Blut-Liquor-Schrankenfunktionsstörungen wurden Patienten eingeschlossen, bei denen lediglich eine isolierte Erhöhung des Albuminquotienten ohne neurologisches Defizit oder sonstige strukturelle, hämorrhagische oder entzündliche Läsion des ZNS vorlag. Diese Gruppe wurde durch Proben von Patienten mit einem Guillain-Barré-Syndrom (GBS) ergänzt, da das GBS eine der wenigen Erkrankungen mit extrem hohen Werten des Albuminquotienten bis hin zu einem Bereich von 35×10^{-3} ist und bei dieser Erkrankung die Funktion der Blut-Liquor-Schranke in hohem Maße eingeschränkt ist [10, 49]. Durch diese in einem hohen Maße eingeschränkte Blut-Liquor-Schrankenfunktion dienten die GBS-Proben zum Nachweis einer eventuellen Korrelation der EPO-Konzentration mit der Blut-Liquor-Schrankenfunktion in den hohen Bereichen des Albuminquotienten.

Neurodegenerative Erkrankungen

Um die Relevanz der EPO-Konzentration bei neurologischen Erkrankungen weiter zu untersuchen, wurden mit der ALS und den verschiedenen Subtypen dementieller Erkrankungen Krankheiten aus dem neurodegenerativen Formenkreis ausgewählt.

Amyotrophe Lateralsklerose

Die ALS stellt eine Erkrankung dar, bei welcher selektiv Motoneurone der Degeneration unterliegen. Mechanismen, die hierbei unter Umständen involviert zu sein scheinen, sind: Glutamattoxizität, oxidativer Stress, Proteinaggregation oder Apoptose. Diese neurochemischen Veränderungen bei der ALS stellen letztlich nicht die Ursache, doch aber Konsequenzen aus der Pathogenese der Erkrankung dar [56, 101]. Studien über VEGF, einen weiteren Faktor, der zum Erhalt der Motoneurone unter hypoxischen Bedingungen dient, haben gezeigt, dass dessen Konzentration im Liquor bei ALS erniedrigt ist. Es wird vermutet, dass dies zu einer verminderten VEGF-vermittelten Neuroprotektion mit vermehrtem oxidativen Stress der Motoneurone führt [22]. Ähnliches wurde über das Protein S100β im Liquor von ALS berichtet; auch dieser neuroprotektive Faktor scheint im Laufe der Erkrankung in seiner Konzentration zu sinken. Jedoch erscheint die Aussagekraft dieses Ergebnisses über S100β bei der äußerst geringen Probenanzahl sehr eingeschränkt und sollte nicht überbewertet werden [103]. In Anbetracht dieser Erkenntnisse ist es durchaus sinnvoll, auch die Konzentration von EPO im Liquor von ALS Patienten zu untersuchen, denn auch dieser neuroprotektive Faktor könnte im Falle der ALS beeinträchtigt sein. Dennoch muss die geringe Anzahl an Proben (n=15) kritisch beurteilt werden, was die Aussagekraft der Ergebnisse begrenzt hält und weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven fordert.

Demenzerkrankungen

Als zweite Erkrankung aus dem neurodegenerativen Kreis fungierten Proben der Patienten mit AD, VD, FTD und MCI.

Bei der AD finden sich eine erhöhte Anzahl von Amyloidplaques und Neurofibrillen sowie ein vermehrter nicht-selektiver Untergang von Neuronen und Synapsen [4, 40]. Diese Gruppe wurde als Kontrolle innerhalb der neurodegenerativen Erkrankungen und zur Klärung der Frage, ob sich die EPO-Konzentration im Liquor bei diesen Erkrankungen gleich verhält, ausgewählt.

Um zwischen den unterschiedlichen Demenzformen eine Aussage treffen zu können, befindet sich jedoch eine deutlich zu geringe Anzahl an Proben in den Untergruppen, vor allem bei der VD, FTD und MCI. Somit kann aus den Ergebnissen keine Aussage über Unterschiede zwischen den

Demenzerkrankungen getroffen werden. Die Ergebnisse sollten als Anhaltspunkt für eine mögliche Affektion von EPO bei Demenzerkrankungen dienen.

Depressionen

Eine mögliche Affektion des EPO-Systems war von Nakamura et al. bei Depressionen vermutet worden, nachdem signifikant erhöhte Werte von EPO im Liquor von depressiven Patienten und ein Rückgang nach erfolgter antidepressiver Therapie beobachtet worden war [83]. Durch die Auswahl von 23 Patienten, welche sich zunächst in der Gedächtnissprechstunde wegen Konzentrationsstörungen vorgestellt hatten und bei welchen in der Folge eine Depression diagnostiziert wurde, sollte dieses Ergebnis überprüft werden.

Auch hier konnten die Patienten nur retrospektiv ausgewählt werden, da sie sich initial in der Demenzsprechstunde vorgestellt hatten und nur durch eine Lumbalpunktion eine dementielle Erkrankung ausgeschlossen und in der Folge eine Depression diagnostiziert werden konnte.

Idealerweise hätte zur Überprüfung der Hypothese von Nakamura et al. ein Patientenkollektiv von vor und nach Therapie einer neu diagnostizierten Depression untersucht werden müssen. Dies war jedoch aus Zeit- und Kostengründen nicht möglich.

Da alle ausgewählten Proben von Patienten stammten, welche unterschiedlich lange mit antidepressiven Medikamenten behandelt wurden, kann natürlich keine Aussage darüber getroffen werden, ob die EPO-Konzentration im Liquor in irgendeiner Weise auf eine Depression reagiert. Dies erscheint insofern nicht ideal, als dass dies der eigentlich aussagekräftigere Punkt gewesen wäre. Jedoch kann überprüft werden, ob unter medikamentöser Therapie die EPO-Konzentration gegenüber einer Kontrollgruppe wieder auf demselben Niveau ist.

4.3. Diskussion der Ergebnisse

4.3.1. Etablierung von Referenzwerten

Bislang sind nur wenige Daten über die Liquor-EPO-Konzentration von Kontrollen oder Patienten mit neurologischen Erkrankungen verfügbar [52, 71, 83, 100]. Vor allen Dingen aber wurde bisher noch nie eine Altersabhängigkeit der Liquor-EPO-Konzentration bei Erwachsenen festgestellt. Lediglich eine negative Korrelation von EPO im Liquor mit zunehmenden Alter bis zu 5 Monaten bei Früh- und Neugeborenen wurde berichtet [51, 52]. Das Niveau der veröffentlichten Referenzwerte kleinerer Kontrollgruppen hinsichtlich der EPO-Konzentration im Liquor stimmt mit den hier vorliegenden Werten überein [52, 71, 100].

Die Etablierung von Referenzwerten der EPO-Konzentration im Liquor ist für die zukünftige Interpretation der EPO-Konzentrationen bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen von großer Bedeutung. Wie bereits im Abschnitt 3.4. erwähnt, wurde eine positive Korrelation der EPO-Konzentration mit dem Alter der Normalkontrollen beobachtet (Abb. 9). Diese Tatsache ist im Einklang mit den Beobachtungen von van Engelen et al., dass die Konzentration von anderen ZNS-Proteinen wie der NSE oder S100β mit dem Alter im Liquor ansteigt [105]. Dabei ist ein zugrunde liegender gemeinsamer Mechanismus am wahrscheinlichsten. Es wird davon ausgegangen, dass die erhöhte Konzentration der Proteine auf einen Rückgang der Liquorproduktion und auf eine mit dem Alter assoziierte Ventrikeldilatation zurückzuführen ist. Beide Mechanismen resultieren vermutlich in einem verringerten Liquorumsatz, welcher letztlich die Konzentration verschiedener Liquroproteine beeinflusst [76, 90, 91].

Die erwähnten Faktoren tragen sicherlich alle zu dem beobachteten, altersabhängigen Anstieg der Liquor-EPO-Konzentration bei, jedoch bleibt der genaue Mechanismus ungeklärt und deshalb spekulativ. Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass das EPO-System im Alter zunehmend als eine Art endogenes Schutzsystem hochreguliert wird.

Die Tatsache, dass keine geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Liquor-EPO-Konzentration vorliegen, ist hier erstmals für EPO dargelegt worden. Für andere Proteine des Liquors liegen derzeit keine Daten vor, welche einen Unterschied in der Konzentration zwischen Frauen und Männern zeigen, so dass das Ergebnis für EPO entsprechend zu erwarten war [64, 107].

Die bestimmte mittlere Serum-EPO-Konzentration stimmt mit den vom Hersteller des ELISA angegebenen Daten überein. Dies war bei der Auswahl des Studienkollektivs jedoch zu erwarten gewesen, da keine objektivierbaren renalen Erkrankungen oder eine Anämie vorlagen, welche den Serumspiegel hätten beeinflussen können [45, 71].

4.3.2. Stabilität von Erythropoietin im Liquor cerebrospinalis

Bisherige Studien konnten zeigen, dass EPO im Plasma und Serum vergleichsweise stabil ist [24]. Die vorliegenden Untersuchungen zur Stabilität von EPO im Liquor konnten erstmals darlegen, dass EPO über einen Zeitraum von zwei Wochen bei einer Lagerung von −80°C stabil ist. Im Gegensatz dazu ist ein erheblicher Rückgang der EPO-Konzentration um 17,4 % nach dem dritten Einfrier-/Auftauzyklus zu verzeichnen. Dies deutet darauf hin, dass EPO über einen kurzen Zeitraum hinweg relativ sicher gelagert werden kann. Um die Ergebnisse nicht negativ zu beeinflussen, sollten allerdings nicht mehr als 2 Einfrier-/Auftauzyklen mit Proben zur EPO-Bestimmung durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Kurzzeitstabilität von EPO sind konform mit den Daten zur Stabilität von EPO im Serum, welche ebenfalls einen schnellen Proteolysevorgang ausschließen und somit EPO als stabil über einen Zeitraum von 2 Wochen ausweisen [24]. Bei Einfrier- und Auftauzyklen ist jedoch nach dem dritten Zyklus mit erheblichen Verlusten in der Konzentration zu rechnen. Die wechselnden Temperaturbedingungen scheinen Veränderungen in der Molekularstruktur und Proteolysevorgänge zu beschleunigen. Deshalb erscheint es nicht empfehlenswert, Liquorproben zur EPO-Bestimmung mehr als zweimal aufzutauen.

Das Experiment zur Langzeitstabilität weist darauf hin, dass Liquorproben zur EPO-Bestimmung nicht länger als zweieinhalb Monate gelagert werden sollten. Es scheint, dass nach einer längeren Lagerung (trotz konstanter Temperatur) Veränderungen in der Molekularstruktur von EPO auftreten. Wahrscheinlich spielt ein wachsender Anteil an Proteolyse analog den Experimenten zur Stabilität bei Einfrier-/Auftauzyklen ebenfalls eine Rolle. Beide Mechanismen tragen vermutlich gemeinsam zu dem beobachteten Rückgang der EPO-Konzentration bei, wobei

der genaue Ablauf aus den vorliegenden Ergebnissen nicht abgeleitet werden kann.

4.3.3. Herkunft von Erythropoietin im Liquor cerebrospinalis

Um die Herkunft von EPO im Liquor aufzuklären, wurde, wie durch Felgenhauer beschrieben der Liquor/Serum-Konzentrationsquotient von EPO (Erythropoietin-quotient = Q_{EPO}) berechnet [31, 100]. Der aufgrund des Molekulargewichtes von ca. 30 kDa [34, 37, 74] geschätzte hydrodynamische Radius von EPO lag bei 24 Å [109]. Legt man diese beiden Werte zugrunde, so wäre ein Q_{EPO} von 0,01 zu erwarten gewesen, falls das im Liquor gemessene EPO größtenteils aus dem Blutkompartiment durch passive Diffusion stammen würde [33].
Der Q_{EPO} war mit 0,12 aber deutlich höher, als es für ein Protein, das hauptsächlich aus dem Blut in den Liquor diffundiert, zu erwarten gewesen wäre. Zudem konnte herausgefunden werden, dass der ungefähre Anteil der EPO-Konzentration aus intrathekaler Synthese 92 % beträgt. Weiterhin stellte sich heraus, dass die EPO-Konzentration unabhängig von der Blut-Liquor-Schrankenfunktion ist, welche anhand des Albuminquotienten (Q_{Alb}) bestimmt wurde.
Süssmuth et al. konnten zeigen, dass die Liquorkonzentration von aus dem Blut stammenden Proteinen positiv mit steigendem Q_{Alb} korreliert, während hirnspezifische Proteine wie Tau-Protein oder S100β sich bei eingeschränkter Blut-Liquor-Schrankenfunktion kaum verändern oder ihre Konzentration im Liquor sogar sinkt [102]. Andere Experimente zur Aufklärung der Herkunft von EPO im Liquor untersuchten eine mögliche Korrelation der Liquor-EPO-Konzentration mit der Konzentration im Serum oder verglichen den Q_{EPO} mit dem von ZNS-Proteinen. Diese Studien kommen ebenfalls zu der Schlussfolgerung, dass der größte Anteil der Liquor-EPO-Konzentration aus intrathekaler Synthese stammt [52, 71, 100]. Die Tatsache, dass Marti et al. im Gegensatz zu den hier erhaltenen Resultaten bei ihren Experimenten eine Abhängigkeit der EPO-Konzentration im Liquor vom Q_{Alb} feststellten, lässt sich unter Umständen dadurch erklären, dass die dort verwendeten Patienten an Schädel-Hirn-Traumata litten und daher die dort vorhandene Blut-Liquor-Schrankenfunktionsstörung von unserer zu

unterscheiden ist [71]. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist unter diesen Umständen mit einer Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke oder mit intrazerebralen Blutungen zu rechnen, welche die Ergebnisse mit beeinflussen, so dass diese kritisch zu betrachten sind [41]. Des Weiteren war die Probenanzahl bei Marti et al. weitaus geringer als die hier überprüfte Probenanzahl. Die in der vorliegenden Studie zur Prüfung auf Abhängigkeit der EPO-Konzentration von der Blut-Liquor-Schrankenfunktion eingeschlossenen Patienten zeigten eine solitäre Erhöhung des Q_{Alb} oder hatten die Diagnose eines GBS, welche nicht mit einer derartigen Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke einhergehen. Somit scheint eine Unabhängigkeit der Liquor-EPO-Konzentration von der Blut-Liquor-Schrankenfunktion wahrscheinlich zu sein.

Aus diesen Ergebnissen und der vorhandenen Literatur kann eine hauptsächlich intrathekale Synthese und Herkunft von EPO im Liquor gefolgert werden [52, 71, 100].

Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein gewisser Anteil von EPO im Liquor aus dem vaskulären Kompartiment mittels rezeptor-vermittelter Transportmechanismen in den Liquorraum überführt wird, so dass der geschätzte Anteil an intrathekaler Synthese von 92 % nur als grober Richtwert angesehen werden kann.

4.3.4. Ergebnisse der klinischen Gruppen

4.3.4.1. Erythropoietin bei Patienten mit ALS und Demenz

Die Daten einer kleinen Kohorte von Patienten mit ALS zeigen erstmals signifikant erniedrigte Werte hinsichtlich einer alterskorrelierten Kontrollgruppe und deuten darauf hin, dass die EPO-Konzentration im Liquor bei ALS verringert sein könnte. Die Liquor-EPO-Konzentrationen der untersuchten Demenzpatienten waren gegenüber ihrer Kontrollgruppe leicht erhöht.

Bisherige in vitro als auch in vivo Studien stimmten alle darin überein, dass die EPO-Konzentration im Liquor nach einem neuronalen Schaden hochreguliert wird [27, 28, 70], so dass das vorliegende Ergebnis bei ALS Patienten nicht zu erwarten gewesen wäre. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass bei der ALS ein endogenes neuroprotektives System, zu welchem auch das EPO-System

gehören könnte, geschwächt oder geschädigt ist. Dies würde dazu führen, dass die Zellen nicht mehr in der Lage sind, auf neuronale Schäden oder Stress mit einer zumindest genügend gesteigerten Transkription und Produktion von neuroprotektiven Substanzen wie EPO zu reagieren, und damit auch die Konzentration im Liquor sinkt.

Da es Hinweise darauf gibt, dass auch andere potentiell neuroprotektive Proteine wie VEGF im Liquor von ALS Patienten signifikant verringert sind, deutet dies darauf hin, dass eine tatsächliche Beeinträchtigung der EPO-Synthese vorliegt. Ein weiterer Hinweis auf eine Beeinträchtigung könnte die Tatsache sein, dass, wie EPO, auch VEGF zu den durch HIF-1-regulierten Proteinen gehört, welche möglicherweise Motoneuronen vor hypoxischen Schäden schützen [22]. Auf jeden Fall ist es aber bedeutsam, dass hiermit erstmalig eine signifikante Erniedrigung von EPO bei ALS berichtet werden konnte. Dies liefert für diese kausal nicht therapierbare Erkrankung neue hoffnungsvolle Therapiestrategien, auch wenn diese noch in ferner Zukunft liegen.

Im Falle der Demenz-Gruppe wäre es möglich, dass das EPO-System noch mehr in der Lage ist auf den Untergang von Neuronen zu reagieren als in der ALS-Gruppe, allerdings nicht in ausreichendem Maße. Es bleibt Spekulation, ob die leicht erhöhte EPO-Konzentration im Liquor von Demenzpatienten Folge einer erhöhten intrathekalen Synthese ist. Die Möglichkeit hierzu besteht durchaus, da andere Proteine wie α1-Antichymotrypsin eine positive Korrelation der Synthese mit steigendem Alter und erhöhte mRNA-Spiegel bei Alzheimer Patienten aufweisen [2]. Um dies zu klären bedarf es jedoch genauerer Analysen zur EPO-mRNA-Synthese bei Alzheimer Patienten.

Abschließend muss erwähnt werden, dass um die hier noch offen gebliebenen Fragen mit Sicherheit zu klären, noch weitergehende Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven nötig sind, vor allem deshalb, weil die Anzahl der untersuchten Patienten in beiden Gruppen sehr gering war, so dass eine sichere Aussage über mögliche Beeinträchtigungen des EPO-Systems nicht möglich ist.

4.3.4.2. Erythropoietin bei Depressionen

Die EPO-Konzentration im Liquor der 23 untersuchten Depressionspatienten unterscheidet sich nicht von den entsprechenden Werten der zugehörigen Kontrollgruppe. Diese Beobachtung steht im Einklang mit vorangegangenen Studien von Nakamura et al., welche ebenfalls keinen Unterschied in der EPO-Konzentration von Patienten mit Depressionen nach fünfmonatiger antidepressiver Pharmakotherapie aufzeigten [83]. Es wird vermutet, dass im Falle einer Depression vielleicht als Folge eines hypoxischen Zustandes vermehrt EPO als neuroprotektives Agens produziert wird [83]. Nachdem bereits mehrmals belegt ist, dass die EPO-Produktion im Falle von neuronalem Stress wie Hypoxie oder Traumata erhöht ist, wäre es durchaus vorstellbar, dass es bei Depressionen als Zeichen von neuronalem Stress zu einer Stimulation der EPO-Produktion kommt und folglich die Konzentration im Liquor ansteigt [13, 57, 70]. Es wäre möglich, dass Antidepressiva dann neben den bekannten Effekten auch direkte Auswirkungen auf die EPO-Produktion haben, beziehungsweise diese durch Reduktion des hypoxischen Zustandes beeinflussen [83]. Das vorliegende Ergebnis kann nur die Beobachtung stützen, dass sich nach medikamentöser Therapie die Konzentration von EPO im Liquor wieder normalisiert. Ob und in welchem Umfang jedoch die EPO-Konzentration im Falle einer Depression verändert ist, kann nicht mit Sicherheit vorhergesagt werden.

4.4. Relevanz der Erythropoietin-Messungen im Liquor

Einer der wichtigsten Aspekte der vorliegenden Arbeit ist die methodische Etablierung einer sicheren Messung der Konzentration von EPO im Liquor mit Hilfe einer vorausgehenden Konzentration der Liquorproben. Da die kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (so wie der hier Verwendete) alle als kleinsten Standard und somit untere Nachweisgrenze von 2,5 mU/ml aufweisen [69, 86] und die Liquor-EPO-Konzentration aber deutlich darunter liegt, ist dies als großer Fortschritt anzusehen.

Die Experimente zur Stabilität des EPO tragen dazu bei, dass für künftige Studien ein möglicher Einfluss längerer Lagerung auf die Konzentration beurteilt werden

kann oder bereits vor Beginn klar ist, wie sicher mit den Proben umgegangen werden kann, ohne dass mit Verlusten des Proteins gerechnet werden muss.

Da erstmalig ein größeres Kollektiv an Normalkontrollen hinsichtlich der EPO-Konzentration untersucht wurde und erst dadurch die positive Korrelation mit dem Alter herausgestellt werden konnte, ist jetzt mit den nötigen Referenzwerten die Grundlage für künftige Studien über EPO im Liquor geschaffen worden. Diese Referenzwerte erlauben es, Ergebnisse hinsichtlich einer möglichen pathologischen Komponente zu deuten.

Die Ergebnisse aus den Versuchen zum Einfluss einer Blut-Liquor-Schrankendysfunktion auf die EPO-Konzentration zeigten eine deutliche Unabhängigkeit, die zusammen mit dem errechneten Liquor/Serum-Quotienten von Erythropoietin (Q_{EPO}) auf eine vorwiegend intrathekale Synthese von ca. 92 % hindeuten [32, 52, 100]. Dies ist von großer Bedeutung, da jetzt davon ausgegangen werden kann, dass der größte Teil des im Liquor gemessenen EPO auch aus dem Hirnparenchym stammt und somit in gewisser Weise die Situation im Hirngewebe reflektiert.

Zur Relevanz der gewonnen Daten bezüglich neurodegenerativer Erkrankungen ist Folgendes herauszustellen:

Pathophysiologisch deuten bei der ALS viele Dinge darauf hin, dass neben genetischen Faktoren auch oxidativer Stress und Glutamattoxizität eine große Rolle beim Untergang der Motoneuronen spielen [101]. Die Tatsache, dass eine Vielzahl von in vitro und in vivo Studien belegen, dass rekombinantes EPO gerade auf diese Prozesse neuroprotektiv wirkt [26, 45, 51, 68, 74, 80] und es nun erstmalig einen Hinweis darauf gibt, dass EPO bei ALS vermindert synthetisiert werden könnte, lassen über einen Einsatz von EPO als neue neuroprotektive Strategie bei ALS erstmals spekulieren.

Die bei Demenzen nur geringgradig erhöhten EPO-Konzentrationen deuten nicht sicher auf eine Beteiligung des endogenen EPO-Systems hin. Jedoch kann mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die EPO-Konzentration im Liquor als Marker für dementielle Erkrankungen wie beispielsweise Tau-Protein oder Aβ1-42 angesehen werden können, da hierfür eine zu große Variabilität der Werte mit einer nur leichten Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe vorliegt [4, 8, 106].

Die Ergebnisse hinsichtlich der untersuchten Patienten mit Depressionen unterstützen die in der Literatur vorhandenen Daten zur EPO-Konzentration im

Liquor unter antidepressiver Therapie [83]. Die Daten lassen keine Aussage zu einer möglichen Veränderung der EPO-Konzentration bei Depressionen zu und können somit lediglich als Bestätigung der in der Literatur angegebenen Ergebnisse angesehen werden.

4.5. Schlussfolgerungen

Die gewonnen Daten lassen schlussfolgern, dass anhand der vorliegenden Methode die EPO-Konzentration im Liquor sicher und zuverlässig bestimmt werden kann. Jedoch sollte zukünftig mehr darauf geachtet werden, dass Proben, die für die Bestimmung der EPO-Konzentration herangezogen werden, keine zu langen Lagerungszeiten aufweisen. Dies ist durch die Experimente zur Stabilität, welche bei längerer Lagerung einen deutlichen Rückgang der EPO-Konzentration zeigten, eindeutig bewiesen worden. Darüber hinaus sollten bei den Proben für die EPO-Bestimmung nicht mehr als zwei Einfrier-/Auftauzyklen bis zur Messung vorgenommen werden, da deren negativer Einfluss auf die Konzentration belegt wurde.

Die neu erhaltenen Referenzwerte werden für künftige Arbeiten über EPO im Liquor eine nützliche Deutungsgrundlage sein.

Um letztlich die Herkunft des gemessenen EPO mit absoluter Sicherheit aufzuklären, sollten sich Studien anschließen, die das Gehirn-EPO im Liquor nachweisen, das sich vom Serum-EPO durch eine leicht abweichende Glykosylierung unterscheidet.

Abschließend soll klargestellt werden, dass die Liquor-EPO-Konzentration nicht als diagnostischer Marker für neurodegenerative Erkrankungen dienen kann. Dafür haben sich zu große Konzentrationsüberschneidungen zwischen den verschiedenen Gruppen dargestellt. Sicher ist jedoch, dass es weitere neurologische Erkrankungen gibt, in denen das endogene EPO-System involviert ist, so dass weitere intensive Forschung auf diesem Sektor lohnenswert erscheint. Die gewonnenen Ergebnisse könnten dem neuroprotektiven Protein EPO eine vielversprechende Rolle in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen zuweisen, bei denen ein Mangel an endogenen Schutzmechanismen nachgewiesen ist.

5. Zusammenfassung

Erythropoietin (EPO) hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung bezüglich seiner neuroprotektiven Eigenschaften gewonnen. Es wurde eine Vielzahl an neurologischen Krankheitsbildern untersucht, welche durch Behandlung mit EPO unter experimentellen Bedingungen wesentlich bessere Ergebnisse zeigten. Doch bislang wurde ein größeres Kollektiv an Normalkontrollen hinsichtlich der EPO-Konzentration im Liquor nicht beschrieben. Auch Liquorproben von neurodegenerativen Erkrankungen wurden bislang nicht auf mögliche Veränderungen des endogenen EPO-Systems untersucht.

Hierzu wurde der Liquor cerebrospinalis von 159 Patienten der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm, sowie zugehörige Serumproben auf den Gehalt an EPO untersucht. Der Liquor cerebrospinalis wurde mittels Zentrifugation konzentriert und der Konzentrationsfaktor anhand der Gesamtproteinkonzentration vor und nach der Prozedur bestimmt. Anschließend wurde die EPO-Konzentration von Serum und Liquor mittels eines ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) gemessen.
73 Patienten wurden der Gruppe der Normalkontrollen zugeteilt, welche nochmals in drei dem Alter nach geordneten Gruppen unterteilt wurde. Zudem wurden Experimente zur Stabilität von EPO im Liquor durchgeführt. Um den Einfluss der Blut-Liquor-Schrankenfunktion auf die EPO-Konzentration zu ermitteln, wurde die EPO-Konzentration von 27 Patienten mit isolierter Schrankenfunktionsstörung (zum Beispiel Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom) untersucht und daraus der resultierende Anteil an intrathekaler EPO-Synthese nach Felgenhauer errechnet.
15 Patienten mit der Diagnose einer Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) sowie 21 Patienten mit Demenzerkrankungen wurden als Vertreter neurodegenerativer Erkrankungen ebenfalls untersucht. Zuletzt wurde bei 23 Patienten mit Depressionen unter antidepressiver Therapie die EPO-Konzentration im Liquor gemessen.

Es konnte eine statistisch signifikante positive Korrelation von EPO mit dem Alter gefunden werden, sowie eine Geschlechtsunabhängigkeit der EPO-Konzentration.

Die Stabilitätsexperimente konnten zeigen, dass EPO im Liquor über einen kurzen Zeitraum von 2 Wochen sowie über einen Zeitraum von 2,5 Monaten bei −80°C relativ stabil ist und mit nur geringen Konzentrationsverlusten einhergeht. Hingegen zeigen die Einfrier-/Auftauzyklen, dass nach dem 3. Zyklus mit beträchtlichen Einbußen in der EPO-Konzentration gerechnet werden muss, so dass Liquorproben zur EPO-Messung nicht bedenkenlos eingefroren und anschließend wieder aufgetaut werden können.
Die Experimente zur Abhängigkeit von der Blut-Liquor-Schrankenfunktion ergaben, dass die EPO-Konzentration hiervon unberührt bleibt. Diese lassen zusammen mit dem Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten von EPO eine hauptsächlich intrathekale Synthese des im Liquor gemessenen EPO von 92 % schlussfolgern.
Die EPO-Konzentration der untersuchten Patienten mit ALS war bezüglich der alterskorrelierten Kontrollgruppe signifikant verringert, wogegen bei der Demenzgruppe sogar leicht erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen waren. Die Depressionsgruppe zeigte im Liquor eine gleich hohe EPO-Konzentration wie die Kontrollgruppe.

Die Etablierung von Referenzwerten des EPO im Liquor und deren Korrelation mit dem Alter wird in zukünftigen Studien hilfreich und unentbehrlich zur Interpretation von gemessenen EPO-Werten sein, wenn auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die EPO-Konzentration selbst aufgrund der großen Streubreite nicht als diagnostischen Marker empfehlen können.
Das im Liquor gemessene EPO scheint zum größten Teil aus dem Gehirn und nicht aus dem Blutkompartiment zu stammen, so dass die gemessenen Werte als gute Anhaltspunkte für die EPO-assoziierten Prozesse im zerebralen Gewebe dienen können.
Bezüglich der EPO-Konzentrationen bei neurodegenerativen Erkrankungen ist zu erwähnen, dass diese im Falle der ALS auf eine negative Beteiligung des endogenen EPO-Systems hindeuten.
Eine sichere Aussage hierzu lässt sich allerdings erst durch weitere Untersuchungen mit deutlich größeren Fallzahlen treffen.

6. Literaturverzeichnis

1. Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, Ghezzi P: Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain Res 952: 128-134 (2002)
2. Aldred AR, Brack CM, Schreiber G: The cerebral expression of plasma protein genes in different species. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 111: 1-15 (1995)
3. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M: Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 5978-5982 (1990)
4. Andreasen N, Vanmechelen E, Van de Voorde A, Davidsson P, Hesse C, Tarvonen S, Raiha I, Sourander L, Winblad B, Blennow K: Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community based follow up study. J Neurol Neurosurg Psychiatry 64: 298-305 (1998)
5. Association AP: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th Edition. Aufl, American Psychiatric Association, Washington, DC (1994)
6. Banks WA, Jumbe NL, Farrell CL, Niehoff ML, Heatherington AC: Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa. Eur J Pharmacol 505: 93-101 (2004)
7. Bendtsen L: Central sensitization in tension-type headache--possible pathophysiological mechanisms. Cephalalgia 20: 486-508 (2000)
8. Blennow K, Vanmechelen E, Hampel H: CSF total tau, Abeta42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease. Mol Neurobiol 24: 87-97 (2001)
9. Bode-Boger SM, Boger RH, Kuhn M, Radermacher J, Frolich JC: Recombinant human erythropoietin enhances vasoconstrictor tone via endothelin-1 and constrictor prostanoids. Kidney Int 50: 1255-1261 (1996)
10. Brettschneider J, Claus A, Kassubek J, Tumani H: Isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. J Neurol 252: 1067-1073 (2005)

11. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A: Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 10526-10531 (2000)
12. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL: El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 1: 293-299 (2000)
13. Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, Grasso G, Corica F, Frisina N: Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection. Clin Sci (Lond) 103: 275-282 (2002)
14. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL: Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. Circulation 108: 79-85 (2003)
15. Carlini RG, Dusso AS, Obialo CI, Alvarez UM, Rothstein M: Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells. Kidney Int 43: 1010-1014 (1993)
16. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagiroglu E, Cerami A, Brines M: Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 2258-2263 (2002)
17. Cerami A, Brines M, Ghezzi P, Cerami C, Itri LM: Neuroprotective properties of epoetin alfa. Nephrol Dial Transplant 17 Suppl 1: 8-12 (2002)
18. Chung YH, Kim SI, Joo KM, Kim YS, Lee WB, Yun KW, Cha CI: Age-related changes in erythropoietin immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus of rats. Brain Res 1018: 141-146 (2004)
19. Cockrell JR, Folstein MF: Mini-Mental State Examination (MMSE). Psychopharmacol Bull 24: 689-692 (1988)
20. Conrad KP, Benyo DF, Westerhausen-Larsen A, Miles TM: Expression of erythropoietin by the human placenta. Faseb J 10: 760-768 (1996)
21. Damen JE, Cutler RL, Jiao H, Yi T, Krystal G: Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpR) is essential for binding the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpR-associated PI 3-kinase activity. J Biol Chem 270: 23402-23408 (1995)

22. Devos D, Moreau C, Lassalle P, Perez T, De Seze J, Brunaud-Danel V, Destee A, Tonnel AB, Just N: Low levels of the vascular endothelial growth factor in CSF from early ALS patients. Neurology 62: 2127-2129 (2004)
23. Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M: Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 3717-3720 (1995)
24. Eckardt KU, Kurtz A, Hirth P, Scigalla P, Wieczorek L, Bauer C: Evaluation of the stability of human erythropoietin in samples for radioimmunoassay. Klin Wochenschr 66: 241-245 (1988)
25. Eckardt KU, Ratcliffe PJ, Tan CC, Bauer C, Kurtz A: Age-dependent expression of the erythropoietin gene in rat liver and kidneys. J Clin Invest 89: 753-760 (1992)
26. Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, Jahn H, Jacob S, Herrmann M, Siren AL: Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. Metab Brain Dis 19: 195-206 (2004)
27. Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Behe M, Hasselblatt M, Woldt H, Falkai P, Knerlich F, Jacob S, von Ahsen N, Maier W, Bruck W, Ruther E, Cerami A, Becker W, Siren AL: Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. Mol Psychiatry 9: 42-54 (2004)
28. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Ruther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Siren AL: Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. Mol Med 8: 495-505 (2002)
29. Ehrenreich H, Timner W, Siren AL: A novel role for an established player: anemia drug erythropoietin for the treatment of cerebral hypoxia/ischemia. Transfus Apher Sci 31: 39-44 (2004)
30. Eid T, Brines M: Recombinant human erythropoietin for neuroprotection: what is the evidence? Clin Breast Cancer 3 Suppl 3: S109-S115 (2002)
31. Felgenhauer K: Protein size and cerebrospinal fluid composition. Klin Wochenschr 52: 1158-1164 (1974)
32. Felgenhauer K: The filtration concept of the blood-CSF-barrier as basis for the differentiation of CSF proteins. In: Greenwood J (Hrsg) New Concepts of a Blood-Brain Barrier, Plenum Press, New York, S. 209-217 (1995)

33. Felgenhauer K: Theoretische Grundlagen einer Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen. In: Felgenhauer K, Beuche W (Hrsg) Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen - Liquoranalytik und -zytologie, Diagnose- und Prozeßmarker, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 5-16 (1999)
34. Fisher JW: Erythropoietin: physiology and pharmacology update. Exp Biol Med (Maywood) 228: 1-14 (2003)
35. Flake AW, Harrison MR, Adzick NS, Zanjani ED: Erythropoietin production by the fetal liver in an adult environment. Blood 70: 542-545 (1987)
36. Gassmann M, Heinicke K, Soliz J, Ogunshola O: Non-erythroid functions of erythropoietin. In: Roach RC (Hrsg) Hypoxia:Through the Lifecycle, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, S. 323-330 (2003)
37. Grasso G, Sfacteria A, Cerami A, Brines M: Erythropoietin as a tissue-protective cytokine in brain injury: what do we know and where do we go? Neuroscientist 10: 93-98 (2004)
38. Gregory CJ, Eaves AC: Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. Blood 49: 855-864 (1977)
39. Gregory CJ, Eaves AC: Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. Blood 51: 527-537 (1978)
40. Grutzendler J, Helmin K, Tsai J, Gan WB: Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci 1097: 30-39 (2007)
41. Habgood MD, Bye N, Dziegielewska KM, Ek CJ, Lane MA, Potter A, Morganti-Kossmann C, Saunders NR: Changes in blood-brain barrier permeability to large and small molecules following traumatic brain injury in mice. Eur J Neurosci 25: 231-238 (2007)
42. Hannerz J, Schnell PO, Larsson S, Jacobsson H: Blood pool scintigraphy of the skull in relation to head-down tilt provocation in patients with chronic tension-type headache and controls. Headache 44: 223-229 (2004)
43. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S: Erythropoietin is a

potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. Blood 102: 1340-1346 (2003)

44. Inomata S, Itoh M, Imai H, Sato T: Serum levels of erythropoietin as a novel marker reflecting the severity of diabetic nephropathy. Nephron 75: 426-430 (1997)
45. Jelkmann W: Use of recombinant human erythropoietin as an antianemic and performance enhancing drug. Curr Pharm Biotechnol 1: 11-31 (2000)
46. Jelkmann W, Wagner K: Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. Ann Hematol 83: 673-686 (2004)
47. Jensen R: Pathophysiological mechanisms of tension-type headache: a review of epidemiological and experimental studies. Cephalalgia 19: 602-621 (1999)
48. Jensen R, Olesen J: Tension-type headache: an update on mechanisms and treatment. Curr Opin Neurol 13: 285-289 (2000)
49. Joseph SA, Tsao CY: Guillain-Barre syndrome. Adolesc Med 13: 487-494 (2002)
50. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, Rosenbaum PS, Cerami A, Brines M, Rosenbaum DM: Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 10659-10664 (2002)
51. Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD: Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. Pediatr Res 43: 40-49 (1998)
52. Juul SE, Harcum J, Li Y, Christensen RD: Erythropoietin is present in the cerebrospinal fluid of neonates. J Pediatr 130: 428-430 (1997)
53. Juul SE, McPherson RJ, Farrell FX, Jolliffe L, Ness DJ, Gleason CA: Erytropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin. Biol Neonate 85: 138-144 (2004)
54. Juul SE, Stallings SA, Christensen RD: Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of neonates who sustained CNS injury. Pediatr Res 46: 543-547 (1999)

55. Katho K, Mizuno K, Hashimoto S, Okazaki K, Asahi K, Kuriki K, Yamada D, Fukuchi S: Direct evidence for erythropoietin-induced release of endothelin from peripheral vascular tissue. Life Sci 54: L253-L259 (1994)
56. Kato S, Shaw P, Wood-Allum C, Leigh PN, Shaw C: Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: Dickson DW (Hrsg) Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders, ISN Neuropath Press, Basel, S. 350-368 (2003)
57. Knabe W, Knerlich F, Washausen S, Kietzmann T, Siren AL, Brunnett G, Kuhn HJ, Ehrenreich H: Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing midbrain. Anat Embryol (Berl) 207: 503-512 (2004)
58. Koehne P, Hochhaus F, Felderhoff-Mueser U, Ring-Mrozik E, Obladen M, Buhrer C: Vascular endothelial growth factor and erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of children with hydrocephalus. Childs Nerv Syst 18: 137-141 (2002)
59. Konishi Y, Chui DH, Hirose H, Kunishita T, Tabira T: Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. Brain Res 609: 29-35 (1993)
60. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ: Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. Blood 71: 524-527 (1988)
61. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL: Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. Blood 77: 2497-2503 (1991)
62. Kumral A, Baskin H, Gokmen N, Yilmaz O, Genc K, Genc S, Tatli MM, Duman N, Ozer E, Ozkan H: Selective inhibition of nitric oxide in hypoxic-ischemic brain model in newborn rats: is it an explanation for the protective role of erythropoietin? Biol Neonate 85: 51-54 (2004)
63. Kumral A, Ozer E, Yilmaz O, Akhisaroglu M, Gokmen N, Duman N, Ulukus C, Genc S, Ozkan H: Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. Biol Neonate 83: 224-228 (2003)
64. Kunicki S, Richardson J, Mehta PD, Kim KS, Zorychta E: The effects of age, apolipoprotein E phenotype and gender on the concentration of

amyloid-beta (A beta) 40, A beta 4242, apolipoprotein E and transthyretin in human cerebrospinal fluid. Clin Biochem 31: 409-415 (1998)

65. Kuslansky G, Katz M, Verghese J, Hall CB, Lapuerta P, LaRuffa G, Lipton RB: Detecting dementia with the Hopkins Verbal Learning Test and the Mini-Mental State Examination. Arch Clin Neuropsychol 19: 89-104 (2004)
66. 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: 239-242 (2004)
67. Li F, Chong ZZ, Maiese K: Erythropoietin on a tightrope: balancing neuronal and vascular protection between intrinsic and extrinsic pathways. Neurosignals 13: 265-289 (2004)
68. Malhotra S, Nijhawan S, Rosenbaum DM: Erythropoietin (epoetin) as a protective factor for the brain. Curr Atheroscler Rep 6: 301-306 (2004)
69. Marsden JT, Sherwood RA, Peters TJ: Evaluation of six erythropoietin kits. Ann Clin Biochem 36 (Pt 3): 380-387 (1999)
70. Marti HH: Erythropoietin and the hypoxic brain. J Exp Biol 207: 3233-3242 (2004)
71. Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Trentz O, Bauer C: Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. Kidney Int 51: 416-418 (1997)
72. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M: Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. Eur J Neurosci 8: 666-676 (1996)
73. Martinez-Estrada OM, Rodriguez-Millan E, Gonzalez-De Vicente E, Reina M, Vilaro S, Fabre M: Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. Eur J Neurosci 18: 2538-2544 (2003)
74. Masuda S, Kada E, Nagao M, Sasaki R: In vitro neuroprotective action of recombinant rat erythtropoietin produced by astrocyte cell lines and comparative studies with erythropoietin produced by Chinese hamster ovary cells. Cytotechnology 29: 207-213 (1999)

75. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R: A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. J Biol Chem 269: 19488-19493 (1994)
76. May C, Kaye JA, Atack JR, Schapiro MB, Friedland RP, Rapoport SI: Cerebrospinal fluid production is reduced in healthy aging. Neurology 40: 500-503 (1990)
77. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM: Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. Neurology 34: 939-944 (1984)
78. Mitchell JD, Borasio GD: Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 369: 2031-2041 (2007)
79. Miura Y, Miura O, Ihle JN, Aoki N: Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. J Biol Chem 269: 29962-29969 (1994)
80. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R: Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. Neuroscience 76: 105-116 (1997)
81. Nagai T, Akizawa T, Kohjiro S, Koiwa F, Nabeshima K, Niikura K, Kino K, Kanamori N, Kinugasa E, Ideura T: rHuEPO enhances the production of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. Kidney Int 50: 102-107 (1996)
82. Nagao M, Masuda S, Ueda M, Sasaki R: Erythropoietin processing in erythropoietic system and central nervous system. Cytotechnology 18: 83-91 (1995)
83. Nakamura T, Ebihara I, Shimada N, Koide H: Elevated levels of erythropoietin in cerebrospinal fluid of depressed patients. Am J Med Sci 315: 199-201 (1998)
84. Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, Freedman M, Kertesz A, Robert PH, Albert M, Boone K, Miller BL, Cummings J, Benson DF: Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. Neurology 51: 1546-1554 (1998)

85. Nitta K, Uchida K, Kimata N, Honda K, Kobayashi H, Kawashima A, Yumura W, Nihei H: Recombinant human erythropoietin stimulates vascular endothelial growth factor release by glomerular endothelial cells. Eur J Pharmacol 373: 121-124 (1999)
86. Noe G, Riedel W, Kubanek B, Rich IN: A sensitive sandwich ELISA for measuring erythropoietin in human serum. Br J Haematol 80: 285-292 (1992)
87. Pallard C, Gouilleux F, Charon M, Groner B, Gisselbrecht S, Dusanter-Fourt I: Interleukin-3, erythropoietin, and prolactin activate a STAT5-like factor in lymphoid cells. J Biol Chem 270: 15942-15945 (1995)
88. Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, Matsumoto A, Stamler JS, Koch WJ: Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. J Biol Chem 279: 20655-20662 (2004)
89. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Kokmen E, Tangelos EG: Aging, memory, and mild cognitive impairment. Int Psychogeriatr 9 Suppl 1: 65-69 (1997)
90. Reiber H: Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) - a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. Journal of the Neurological Sciences 122: 189-203 (1994)
91. Reiber H: Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. Restor Neurol Neurosci 21: 79-96 (2003)
92. Roman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, Garcia JH, Amaducci L, Orgogozo JM, Brun A, Hofman A, et al.: Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. Neurology 43: 250-260 (1993)
93. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R: In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 4635-4640 (1998)
94. Sattler MB, Merkler D, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bahr M, Diem R: Neuroprotective effects and intracellular signaling pathways of erythropoietin in a rat model of multiple sclerosis. Cell Death Differ 11 Suppl 2: S181-S192 (2004)

95. Semenza GL: O2-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. J Appl Physiol 96: 1173-1177; discussion 1170-1172 (2004)
96. Silverberg DS, Wexler D, Sheps D, Blum M, Keren G, Baruch R, Schwartz D, Yachnin T, Steinbruch S, Shapira I, Laniado S, Iaina A: The effect of correction of mild anemia in severe, resistant congestive heart failure using subcutaneous erythropoietin and intravenous iron: a randomized controlled study. J Am Coll Cardiol 37: 1775-1780 (2001)
97. Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P: Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 4044-4049 (2001)
98. Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H: Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. Acta Neuropathol (Berl) 101: 271-276 (2001)
99. Solaroglu I, Solaroglu A, Kaptanoglu E, Dede S, Haberal A, Beskonakli E, Kilinc K: Erythropoietin prevents ischemia-reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain. Childs Nerv Syst 19: 19-22 (2003)
100. Springborg JB, Sonne B, Frederiksen HJ, Foldager N, Poulsgaard L, Klausen T, Jorgensen OS, Olsen NV: Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage originates from the brain. Brain Res 984: 143-148 (2003)
101. Strong M, Rosenfeld J: Amyotrophic lateral sclerosis: a review of current concepts. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 4: 136-143 (2003)
102. Sussmuth SD, Reiber H, Tumani H: Tau protein in cerebrospinal fluid (CSF): a blood-CSF barrier related evaluation in patients with various neurological diseases. Neurosci Lett 300: 95-98 (2001)
103. Sussmuth SD, Tumani H, Ecker D, Ludolph AC: Amyotrophic lateral sclerosis: disease stage related changes of tau protein and S100 beta in cerebrospinal fluid and creatine kinase in serum. Neurosci Lett 353: 57-60 (2003)

104. Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ: Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. Am J Physiol 263: F474-F481 (1992)
105. van Engelen BG, Lamers KJ, Gabreels FJ, Wevers RA, van Geel WJ, Borm GF: Age-related changes of neuron-specific enolase, S-100 protein, and myelin basic protein concentrations in cerebrospinal fluid. Clin Chem 38: 813-816 (1992)
106. Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, Six J, van de Voorde A, Martin JJ, Cras P: Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. J Neurochem 61: 1828-1834 (1993)
107. Wiedenhoft A, Muller C, Stenger R, Blum WF, Fusch C: Lack of sex difference in cerebrospinal fluid (CSF) leptin levels and contribution of CSF/plasma ratios to variations in body mass index in children. J Clin Endocrinol Metab 84: 3021-3024 (1999)
108. Wu H, Klingmuller U, Besmer P, Lodish HF: Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. Nature 377: 242-246 (1995)
109. Xenocostas A, Cheung WK, Farrell F, Zakszewski C, Kelley M, Lutynski A, Crump M, Lipton JH, Kiss TL, Lau CY, Messner HA: The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin. Eur J Clin Pharmacol 61: 189-195 (2005)
110. Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R: Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. J Biol Chem 273: 25381-25387 (1998)
111. Zettl UK, Tumani H: Liquor cerebrospinalis. In: Zettl UK, Tumani H (Hrsg) Multiple Sklerose und Liquordiagnostik, Blackwell Publishing Ltd, Malden, Massachusetts, S. 26-60 (2006)

Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. Hayrettin Tumani für die Bereitstellung dieses faszinierenden Themas und die hilfreichen Tipps und Anregungen während der Versuchsphase und dem Abfassen des Papers und der Doktorarbeit.

Besonderen Dank möchte ich vor allen Dingen auch an Dr. Johannes Brettschneider aussprechen, dessen wertvolle inhaltliche Kritik und fachliche Kompetenz in gedanklichen Sackgassen wegweisend waren. Vor allen Dingen möchte ich mich für die hervorragenden Korrekturarbeiten bedanken, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, so viel für die weitere Arbeit in der klinischen Forschung zu lernen.

Zudem möchte ich Dagmar Schattauer meinen herzlichsten Dank sagen. Ohne ihre Hilfe wäre die Etablierung der Methodik mit wesentlich größerem Aufwand verbunden gewesen. Ihre jahrelange Erfahrung im Bereich der Forschung war stets eine unentbehrliche Hilfe. Ohne ihre tatkräftige moralische und experimentelle Unterstützung hätte ich diese Arbeit niemals in so kurzer Zeit und mit so viel Freude fertigstellen können.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern des Liquorlabors der Neurologischen Universitätsklinik Ulm danken, für die Beantwortung von Fragen, für ihre Hilfestellungen und für das allzeit freundliche und kollegiale Arbeitsklima, das während der Anfertigung dieser Arbeit herrschte.

Ein großes Dankeschön möchte ich meinem lieben Christian überbringen, der immer bereitwillig ein offenes Ohr für meine Fragen hatte, jederzeit mit größter Geduld Korrekturen an der Arbeit vornahm, Probleme mit Word und Excel behob und der in allen Belangen der Doktorarbeit ein großes Vorbild und eine wertvolle Inspiration war. Ohne seine Hilfe wäre die Motivation und auch die Qualität der Arbeit niemals so gelungen, wie es nun der Fall ist.

Zuletzt möchte ich den Dank an meine Eltern aussprechen, die mir während meines gesamten Studiums immer das vollste Vertrauen entgegengebracht und mich in jeder Lebenslage unterstützt haben.

Lebenslauf

1. Persönliche Daten

Name:	Karin Ehrnthaller, geb. Widl
Geburtsdatum:	24.04.1982
Geburtsort:	München
Familienstand:	verheiratet
Anschrift:	Pionierstr. 16, 89073 Ulm
Ehemann:	Christian Matthias Ehrnthaller, Arzt
Glaubensbekenntnis:	römisch- katholisch

2. Ausbildung

Grundschule:	Forellenschule von 1988 bis 1992
Gymnasium:	Michaeligymnasium München von 1992 bis 2001
Abschluss:	Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife Juni 2001
Hochschule:	Oktober 2001 bis Juli 200: Studium der Finanz-und Wirtschaftsmathematik an der Technischen Universität München; WS 2002/2003: Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität in München SS 2003 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität Hamburg September 2004: Abschluss des vorklinischen Studienabschnittes durch Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung WS 2004/2005 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität Ulm August 2007 bis Juli 2008: Praktisches Jahr Februar 2008: Mündliche Prüfung der Dissertation 04. November 2008: Abschluss des Medizinstudiums an der Universität Ulm durch Bestehen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung mit der Note sehr gut

3. Publikationen

1. Widl K, Brettschneider J, Schattauer D, Sussmuth S, Huber R, Ludolph AC, Tumani H: Erythropoietin in cerebrospinal fluid: age-related reference values and relevance in neurological disease. Neurochem Res 32: 1163-1168 (2007)
2. Brettschneider J, Widl K, Schattauer D, Ludolph AC, Tumani H: Cerebrospinal fluid erythropoietin (EPO) in amyotrophic lateral sclerosis. Neurosci Lett 416: 257-260 (2007)
3. Brettschneider J, Widl K, Ehrenreich H, Riepe M, Tumani H: Erythropoietin in the cerebrospinal fluid in neurodegenerative diseases. Neurosci Lett 404: 347-351 (2006)