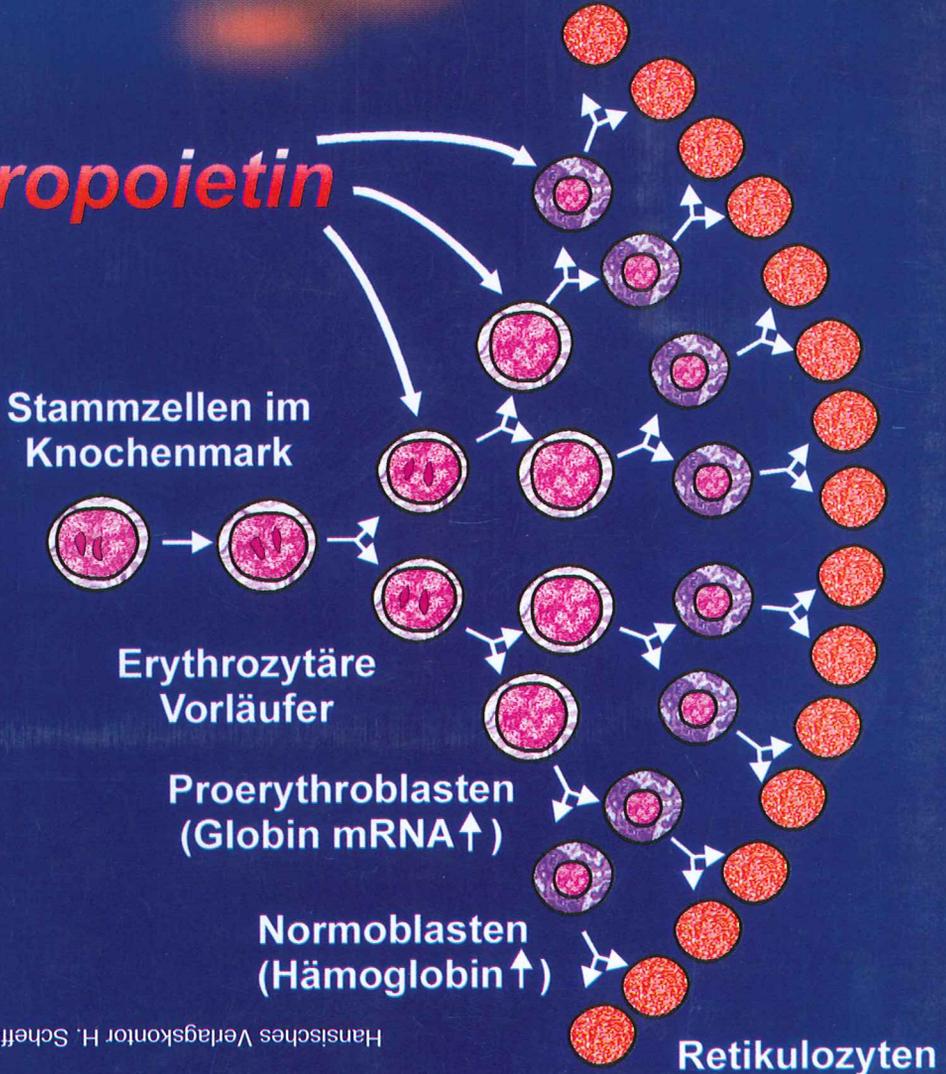


# FOCUS MUL

ZEITSCHRIFT FÜR WISSENSCHAFT, FORSCHUNG UND LEHRE  
AN DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

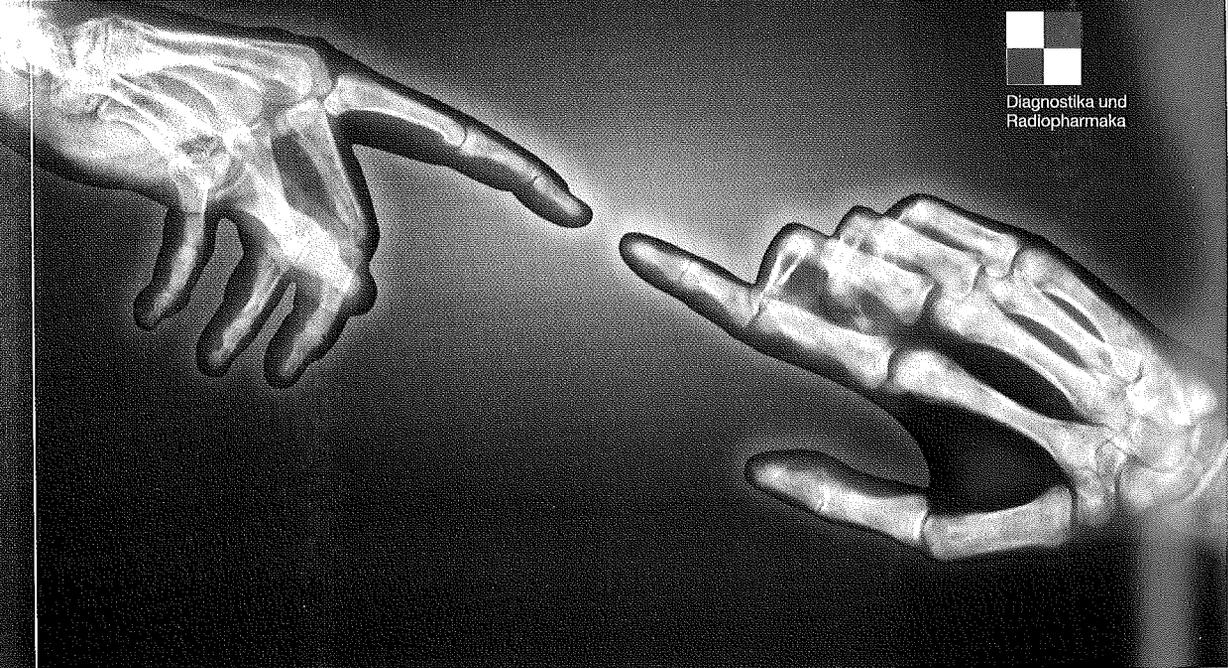
## Erythropoietin



SCHERING



Diagnostika und  
Radiopharmaka



## Wissenschaft plus Partnerschaft

Nur wenn die Diagnose stimmt, kann die Medizin dem Menschen helfen. Als innovativer und zuverlässiger Partner des Arztes erforscht und entwickelt Schering seit mehr als 70 Jahren Kontrastmittel für die bildgebende Diagnostik, zunächst für das Röntgen, später für die MRT und den Ultraschall – und jetzt auch für die nuklearmedizinische Diagnostik.

Für verlässliche Diagnosen als Basis der Therapie.

**Schering  
Diagnostika und  
Radiopharmaka**

**Wissenschaft plus Partnerschaft**

[www.kontrastmittel.de](http://www.kontrastmittel.de)

Hotline: 0 800-566 87 27

# FOCUS MUL

Zeitschrift für Wissenschaft, Forschung und Lehre an der Universität zu Lübeck

19. Jahrgang – Heft 4 – Dezember 2002

## Themenheft „Erythropoietin“

### Inhalt

---

#### Editorial

Erythropoietin: ein Hormon der Blutbildung lenkt den Blick in viele Richtungen  
M. Freund

188

---

#### Thema „Erythropoietin“

Dickes und dünnes Blut: Die Geschichte der Erythropoietinforschung  
W. Jelkmann

192

15 Jahre Erythropoietin in Klinik und Praxis: Eine Erfolgsstory  
H. Pagel

200

Erythropoietin und Gehirn

T. Bachmann, W. Jelkmann und G. Seidel

207

Hypoxie-induzierte Expression des Erythropoietingens: Der Transkriptionsfaktor HIF 1 $\alpha$   
wird in Normoxie abgebaut, in Hypoxie aktiviert

E. Metzén

213

Die Balance der Transkriptionsfaktoren: Entschlüsselung der molekularen Ursache der  
Anämie chronischer Entzündungen

T. Hellwig-Bürgel, K. La Ferla-Brühl, C. Reimann, J. Krajewski und W. Jelkmann

216

Transfusionsmedizinische Aspekte der Erythropoietinsubstitution und alternativer Therapiestrategien  
P. Schlenke und H. Kirchner

221

Regulationsmechanismen hämatopoetischer Stammzellen

K. Terres und S. O. Peters

231

Hypoxie induziert HIF - 3 $\alpha$  auf transkriptioneller Ebene

F. Fröhlich, M. Heidbreder, A. Dendorfer, O. Jöhren, F. Qadri, P. Dominiak

238

---

#### Forschung Aktuell

Akute Hypoxie vermindert die Glukosetoleranz bei gesunden Probanden

K. M. Oltmanns

246

Wenn der Darm die Nerven verliert...

T. Wedel

247

---

#### Aus der Hochschule

Investition in die Zukunft der Wissenschaft

248

Personalia

248

## Erythropoietin: ein Hormon der Blutbildung lenkt den Blick in viele Richtungen

M. Freund\*

Warum halten Sie bei Rot an der Ampel und fahren bei Grün? Haben Sie sich darüber einmal Gedanken gemacht?

„Blut, ein ganz besonderer Saft“, lässt Goethe den Mephisto zu Faust sagen. Seine Farbe ist rot. Im Überlebenskampf unserer Vorfahren signalisierte das rote Blut Gefahr, Verletzung und Tod. Das grüne Laub der Wälder hingegen war gleichbedeutend mit der Möglichkeit zum Versteck, signalisierte Geborgenheit und Sicherheit. Der Einfluss der Farben auf unsere Emotionen wird durch diese archaischen Verhaltensmuster stark beeinflusst (1).

Vielleicht ist es nicht ganz zufällig, dass uns das für die Regulation der Erythropoese entscheidend bedeutsame Erythropoietin mit vielen komplexen Facetten überrascht. Die vorliegende Ausgabe des Focus MUL der Universität zu Lübeck gibt in diesem Sinne einen hervorragenden Einblick.

Die Wissenschaft ist nicht frei von Modeerscheinungen. In der Hämatologie stand in den 60er Jahren die Erforschung der Anämien im Zentrum der Aufmerksamkeit. Grundlage waren die damals verfügbaren biochemischen Techniken. Zahlreiche Erythrozyten-Enzymdefekte und Anomalien des Hämoglobins wurden in dieser Zeit entdeckt. Mit der Entwicklung der modernen Zytostatika wurden die malignen hämatologischen Systemerkrankungen und später die soliden Tumore besser behandelbar. Das Interesse wandelte sich, und die malignen Erkrankungen traten in den Lichtkreis der Forschung.

Erythropoietin wurde im Jahre 1987 als das erste Hämatopoese-stimulierende Zytokin zugelassen. Dabei war die renale Anämie die erste Indikation. Es hängt mit der einseitigen Fokussierung der Hämatologie auf die malignen Erkrankungen zusammen, dass das Interesse für Erythropoietin ungleich geringer war als z. B. für den Granulozyten Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF), Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimu-

lierenden Faktor (GM-CSF) oder Interleukin-3 und Thrombopoietin. Anders als die scheinbar leicht durch Transfusionen zu behebbende Anämie, sind Granulopenie und Thrombopenie bedeutsame Barrieren für die Intensivierung der Chemotherapie.

Dabei ist die pathophysiologische Beziehung zwischen Tumorerkrankung und Anämie seit langem bekannt (2). Ähnlich wie bei der Anämie der chronisch entzündlichen Erkrankungen spielt bei einem erheblichen Teil der Patienten eine relative Verminderung des Erythropoietin-Spiegels eine Rolle. Über die Mechanismen der Anämie der chronisch entzündlichen Erkrankung gibt der Artikel von Hellwig-Bürgel et al. in diesem Heft einen guten Abriss. Die Anämie der chronischen Tumorerkrankung ist weniger spektakulär und sichtbar wie die septische Infektion infolge der Granulopenie (3) oder gar die thrombopenische Blutung.

Die Indikation für die Gabe von Erythrozyten-Transfusionen ist durch das Auftreten von organischen Komplikationen der Anämie bestimmt: Belastungsinsuffizienz, vermehrtes Schlafbedürfnis, wahrgenommene Schwäche oder Auftreten von Erscheinungen der Koronarinsuffizienz u. a. Die relativ enge Indikationsstellung ist notwendigerweise durch die begrenzte Verfügbarkeit von Blutkonserven, die Infektionsrisiken, die besonders für ältere Patienten problematische Volumenbelastung und die Gefahr der Eisenüberladung bei Polytransfusion bedingt und sinnvoll. De facto bestimmen aber diese Überlegungen nicht nur das Transfusionsverhalten der Ärzte, sondern die gesamte Anschauung und Wertung der Anämie.

Im krassen Gegensatz hierzu stehen Ergebnisse zur Korrelation von Lebensqualität und Anämie. Leitgeb merkte 1994 in einer Veröffentlichung an, dass zu diesem Zeitpunkt die Verbesserung der Lebensqualität von Patienten mit renaler Anämie bei steigenden Hämoglobinwerten bereits relativ bekannt war (4), dass es erstaunlicherweise jedoch nur wenig Untersuchungen zum gleichen Problem bei Tumorpatienten gab. Er konnte zeigen, dass Parameter der Lebensqualität in einer linearen Korrelation mit dem Hämoglobinwert korrelieren. Das Neue dabei war, dass die Korrelation sich nicht nur auf den Bereich erstreckte, in dem eine Trans-

\* Prof. Dr. Mathias Freund, Abteilung Hämatologie und Onkologie in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der Universität Rostock, ist Sekretär der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO).

fusionsindikation im klassischen Sinne gestellt wird. Die Verbesserung der Lebensqualität hielt bis zum Erreichen eines normalen Hämoglobinwerts an.

Erythropoietin hatte sich bereits früh bei Tumorpatienten als effektiv erwiesen (6-7)(5), (6), (7). In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass die Verbesserung der Lebensqualität gemessen am Hämoglobinanstieg in einem Bereich zwischen 10 und 12 g/dl (6,2-7,5 mmol/l) sogar ausgeprägter ist als bei niedrigeren Werten (8-9)(8), (9)). Weitere Untersuchungen zeigen, dass die häufig von Tumorpatienten beklagte Abgeschlagenheit am stärksten mit der Schwere der Anämie korreliert ist (10). Zudem gibt es Hinweise, dass Abgeschlagenheit sowohl in der Häufigkeit als auch in ihrer Bedeutung für die Einschränkung der täglichen Aktivitäten eines der bedeutendsten Symptome von Patienten mit Tumorerkrankung unter Chemotherapie ist (11).

Vor diesem Hintergrund ist verständlich, warum die Verbesserung der Lebensqualität einer der deutlichsten Effekte zahlreicher randomisierter Studien zur Therapie der tumorbedingten Anämie mit Erythropoietin ist (12-19)(12), (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19)). Nur durch eine Therapie mit Erythropoietin kann der Hämoglobingehalt nahezu normalisiert werden, wenn der Patient auf die Therapie anspricht. Transfusionen sind durch die o. g. Restriktionen begrenzt und daher kein geeignetes Mittel zur Normalisierung des Hb.

Trotzdem sind diese Möglichkeiten bisher wenig in das Bewusstsein der behandelnden Ärzte in Deutschland eingegangen. Was sind die möglichen Ursachen? Sicherlich führt der auf den auf den Kliniken und Praxen lastende Kostendruck dazu, dass eine Therapie mit kostenträchtigen neuen Medikamenten besonders kritisch betrachtet wird. Doch scheint dies nicht das Hauptproblem zu sein.

Man muss den Verdacht haben, dass die Ärzte Abgeschlagenheit und Beeinträchtigung der täglichen Aktivitäten ihrer Patienten während der kurzen und recht formalisiert ablaufenden Gespräche bei Visite und Praxisbesuch nicht wahrnehmen. In dieser Situation werden „harte“ organische Beschwerden wie Belastungsdyspnoe oder pectanginöse Beschwerden mehr wahrgenommen als die Klage des Patienten über Abgeschlagenheit. Kernproblem ist, dass eine Evaluation von Lebensqualitätsparametern nur mit validierten Messinstrumenten stattfinden kann. Solche Instrumente stehen seit langem zur Verfügung (20-22)(20), (21), (22), werden jedoch praktisch ausschließlich im Rahmen von Studien genutzt. Was nicht gemessen wird, wird auch nicht wahrgenommen. Insofern besteht diesem Lebens- und Leidensbereich der Patienten eine relative Unverständnis von Seiten der Ärzte gegenüber. Die Fortschritte in der Anämitherapie werfen ein Schlaglicht auf diese Defizite. Es wird notwendig sein,

neue Pfade zu beschreiten. Was hindert uns, ebenso wie wir eine Objektivierung mit Hilfe von Laborwerten und bildgebenden Verfahren durchführen, auch die Lebensqualität mit geeigneten Instrumenten zu evaluieren und zu objektivieren? Eine ganz ähnliche Problematik besteht übrigens auch bei der Messung von Schmerz oder beim geriatrischen Assessment.

Unversehens lenkt ein Hormon der Blutbildung den Blick auf ärztliche Verhaltensweisen. Doch damit erschöpft sich die Vielfalt an Befunden und Phänomenen nicht, die mit dieser Substanz verbunden sind.

Relativ lange gibt es bereits experimentelle Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Tumoroxygenierung und Prognose (23). Eindeutig ist mit einem verminderten Hämoglobingehalt des Blutes eine Verschlechterung des Sauerstoffpartialdrucks im Tumor verbunden. In zahlreichen klinischen Untersuchungen bei Tumorerkrankungen finden sich Hinweise auf eine negative Korrelation von Anämie und Prognose (24). Besondere Aufmerksamkeit haben in diesem Zusammenhang Daten zum Zervixkarzinom erregt (25). Trotz zahlreicher Untersuchungen muss das klinische Datenmaterial kritisch gesehen werden, da retrospektiv der ursächliche Zusammenhang nicht eindeutig bewiesen werden kann. Dies kann nur durch die in randomisierten Studien durchgeführte therapeutische Intervention gezeigt werden. Immerhin fand sich in einer klinischen Studie zur Behandlung der Tumoranämie eine Tendenz zur Verbesserung der Prognose bei den Patienten, die eine Behandlung mit Erythropoietin erhalten hatten (14). Kürzlich wurde in einer weiteren randomisierten Studie eine Prognoseverbesserung von Patientinnen mit Zervixkarzinom bei adjuvanter Chemotherapie plus Bestrahlung dann berichtet, wenn sie eine Anämitherapie mit Erythropoietin erhalten hatten (26). Die Ergebnisse sind allerdings bisher nur als Abstract veröffentlicht und präliminär. Weitere Studien bei Tumoren im Hals-Nasen-Ohrenbereich und bei Morbus Hodgkin sind auf dem Weg. Sie werden zur Klärung dieser Fragen beitragen.

Eine weitere Facette im Wirkungsspektrum von Erythropoietin wird im vorliegenden Heft durch den Beitrag von W. Bachmann et al. beleuchtet. Tierexperimentelle Befunde legen nahe, dass Erythropoietin einen protektiven Effekt bei cerebraler Ischämie ausüben könnte. Ob die beobachteten Phänomene allerdings über rein wissenschaftliche Betrachtungen hinaus zu einer klinischen Anwendung führen werden, ist heute noch aus vielen Gründen unklar.

Erythropoietin ist nicht nur ein Hormon der Blutbildung mit vielen Wirkungen, sondern auch die weitere Entwicklung des Medikamentes Erythropoietin nimmt eine interessante Richtung: Hatte man sich bisher bemüht, rekombinante Proteine möglichst naturidentisch

oder zumindest naturähnlich zu gestalten, ist jetzt mit Darbepoetin erstmalig ein biochemisch wesentlich modifiziertes Zytokin auf den Markt gekommen. In mehreren Beiträgen des vorliegenden Heftes wird auf diese Entwicklung eingegangen. Durch die Einführung zweier neuer Glycolysierungsstellen wurde eine günstigere Pharmakokinetik und eine bessere Wirkung erreicht.

Auf den ersten Blick scheint Erythropoietin ein Thema für Spezialisten zu sein. Bei näherem Hinsehen offenbaren sich vielfältige Aspekte, die Ihr Interesse beim Lesen dieses Heftes sicherlich stimulieren werden.

## Literatur

- Jacobs KW, Suess JF. Effects of four psychological primary colors on anxiety state. *Percept.Mot.Skills* 1975;41:207-10.
- Nowrousian MR, Kasper C, Oberhoff C, Essers U, Voigtmann R, Gallasch W et al. Pathophysiology of cancer related anemia. In: Smyth JF, Boogaerts MA, Ehmer BRM. *rh-Erythropoietin in cancer supportive treatment*. New York: Marcel Dekker, 1996:13-34.
- Bodey GP, Buckley M, Sathé YS, Freireich EJ. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann.Intern.Med.* 1966;64:328-40.
- Leitgeb C, Pecherstorfer M, Fritz E, Ludwig H. Quality of life in chronic anemia of cancer during treatment with recombinant human erythropoietin. *Cancer* 1994;73:2535-42.
- Del Mastro L, Venturini M, Lionetto R, Garrone O, Melioli G, Pasquetti W et al. Randomized phase III trial evaluating the role of erythropoietin in the prevention of chemotherapy-induced anemia. *Journal of Clinical Oncology* 1997;15:2715-21.
- Garton JP, Gertz MA, Witzig TE, Greipp PR, Lust JA, Schroeder G et al. Epoetin alfa for the treatment of the anemia of multiple myeloma. A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Arch.Intern.Med.* 1995;155:2069-74.
- Tsukuda M, Yuyama S, Kohno H, Itoh K, Kokatsu T, Kawai S. Effectiveness of weekly subcutaneous recombinant human erythropoietin administration for chemotherapy-induced anemia. *Biotherapy* 1998;11:21-5.
- Glaspy J, Bukowski R, Steinberg D, Taylor C, Tchekmedyan S, Vadhan-Raj S. Impact of therapy with epoetin alfa on clinical outcomes in patients with nonmyeloid malignancies during cancer chemotherapy in community oncology practice. *Procrit Study Group. Journal of Clinical Oncology* 1997;15:1218-34.
- Demetri GD, Kris M, Wade J, Degos L, Cella D. Quality-of-life benefit in chemotherapy patients treated with epoetin alfa is independent of disease response or tumor type: results from a prospective community oncology study. *Procrit Study Group. Journal of Clinical Oncology* 1998;16:3412-25.
- Wang XS, Giral SA, Mendoza TR, Engstrom MC, Johnson BA, Peterson N et al. Clinical factors associated with cancer-related fatigue in patients being treated for leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2002;20:1319-28.
- Curt G, Breitbart W, Cella D, Groopman G, Horning S, Itri L, Johnson D, Miaskowski C, Russell P, Scherr S, and Vogelzang N. Impact of Cancer-Related Fatigue on the Lives of Patients. *Proc.Am.Soc.Clin.Oncol.* 17. 2002.
- Dalton, J. D., Bailey, N. P., Barrett-Lee, P. J., and O'Brien, M. E. R. Multicenter UK audit of anemia in patients receiving cytotoxic chemotherapy. *Proc.Am.Soc.Clin.Oncol.* 1998 (Abs. 1611). 1998.
- Henry DH, Abels RI. Recombinant human erythropoietin in the treatment of cancer and chemotherapy-induced anemia: results of double-blind and open-label follow-up studies. *Seminars in Oncology* 1994;21:21-8.
- Littlewood TJ, Bajetta E, Nortier JW, Vercammen E, Rapoport B. Effects of epoetin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving nonplatinum chemotherapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Oncology* 2001;19:2865-74.
- Gabrilove, J. L., Einhorn, L. H., Livingston, R. B., Winer, E., and Cleeland, C. S. Once-Weekly Dosing of Epoetin Alfa is Similar to Three-Times-Weekly Dosing in Increasing Hemoglobin and Quality of Life. *Proc.Am.Soc.Clin.Oncol.* 18. 1998. Ref Type: Abstract.
- Cascinu S, Fedeli A, Del Ferro E, Luzi FS, Catalano G. Recombinant human erythropoietin treatment in cisplatin-associated anemia: a randomized, double-blind trial with placebo. *Journal of Clinical Oncology* 1994;12:1058-62.
- Cazzola M, Messinger D, Battistel V, Bron D, Cimino R, Enller-Ziegler L et al. Recombinant human Erythropoietin in the anemia associated with multiple myeloma or non-Hodgkin's lymphoma: dose finding and identification of predictors of response. *Blood* 1995;86:4446-53.
- Kurz C, Marth C, Windbichler G, Lahousen M, Medl M, Vavra N et al. Erythropoietin treatment under polychemotherapy in patients with gynecologic malignancies: a prospective, randomized, double-blind placebo-controlled multicenter study. *Gynecol.Oncol.* 1997;65:461-6.
- Osterborg A, Brandberg Y, Molostova V, Iosava G, Abdulkadyrov K, Hedenus M et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of recombinant human erythropoietin, epoetin Beta, in hematologic malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 2002;20:2486-94.
- Bonomi AE, Cella DF, Hahn EA, Bjordal K, Sperner-Unterweger B, Gangeri L et al. Multilingual translation of the Functional Assessment of Cancer Therapy (FACT) quality of life measurement system. *Qual.Life Res.* 1996;5:309-20.
- Cella D. The Functional Assessment of Cancer Therapy-Anemia (FACT-An) Scale: a new tool for the assessment of outcomes in cancer anemia and fatigue. *Semin.Hematol* 1997;34:13-9.
- Selby PJ, Chapman JA, Etazadi-Amoli J, Dalley D, Boyd NF. The development of a method for assessing the quality of life of cancer patients. *Br.J.Cancer* 1984;50:13-22.
- Vaupel P, Thews O, Hoekel M. Tumor oxygenation: Characterization and clinical implications. In: Smyth JF, Boogaerts MA, Ehmer BRM. *rhErythropoietin in cancer supportive treatment*. New York: Marcel Dekker, 1996:205-39.
- Caro JJ, Salas M, Ward A, Goss G. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. *Cancer* 2001;91:2214-21.
- Höckel M, Schlenger K, Höckel S, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression: the clinical evidence in cancer of the uterine cervix. Tumor hypoxia. Pathophysiology, clinical significance and therapeutic perspectives. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1999:65-4.

26. Blohmer, J.U., v.Minckwitz, G., Paepke, S., Thomssen, C., du Bois, A., Kimmig, R., Petry, U., Möbus, V., Würschmidt, J., Böhmer, J., and Lichtenegger, W. Sequential adjuvant chemoradiotherapy with vs. without erythropoietin for patients with

in high-risk cervical cancer – second analysis of a prospective, randomized, open and controlled AGO- and NOGGO- intergroup study. Proc.Am.Soc.Clin.Oncol. 20, Abs. 823. 2002.

## **FOCUS MUL**

Zeitschrift für Wissenschaft, Forschung und Lehre an der Universität zu Lübeck

**Herausgeber:** Das Rektorat der Universität zu Lübeck

**Schriftleitung:** H.-P. Bruch, W. Kühnel, Th. Martinetz, H.H. Wolff

**Gasteditor:** W. Jelkmann

**Wissenschaftlicher Beirat:** T. Aach, H. Arnold, R. Birngruber, J. Born, S. Bulfone-Paus, K. Diedrich, H. v. Domarus, P. Dominiak, W. Dosch, D. v. Engelhardt, H. L. Fehm, A. Ch. Feller, W. Gross, E. Hartmann, M. Herczeg, F. Hohagen, D. Jocham, R. Kessel, H. Kirchner, U. Knölker, D. Kömpf, E. Konecny, H. Laqua, V. Linnemann, E. Machle, P. Müller, D. O. Nutzinger, M. Oehmichen, Th. Peters, S. Pöppel, J. Prestin, H.-H. Raspe, K. R. Reischuk, E. Richter, E.-Th. Rietschel, F. Schmielau, P. Schmucker, A. Schweikard, E. Schwinger, G. Sczakiel, H. H. Sievers, W. Solbach, A.X.Trautwein, H. Weerda, H. D. Weiss, J. Westermann, H. H. Wolff, P. Zabel (alle Universität zu Lübeck)

**Redaktion:** R. Labahn, Telefon (04 51) 5 00 30 04

**Anschrift:** Universität zu Lübeck, Ratzeburger Allee 160, D-23562 Lübeck

**Auflage:** 5.000 Exemplare

**Verlag:** Hansisches Verlagskontor Heinz Scheffler, Mengstraße 16, D-23552 Lübeck, Telefon (04 51) 70 31-01

**Anzeigen:** Hansisches Verlagskontor H. Scheffler, Christiane Kermel

**Druck:** Verlag Schmidt-Römhild KG, Mengstraße 16, 23552 Lübeck, Telefon (04 51) 70 31-01

**Erscheinen:** FOCUS MUL erscheint vierteljährlich

**Redaktionsschluß:** 6 Wochen vorher

**Bezugspreis:** Einzelheft € 9,20, Jahresabonnement € 35,79 zuzügl. Versandkosten. In den Mitgliedsbeiträgen der Gesellschaft der Freunde und Förderer der Universität zu Lübeck enthalten

ISSN 0940-9998

Aus dem Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. W. Jelkmann)

## Dickes und dünnes Blut: Die Geschichte der Erythropoietinforschung

W. Jelkmann

### Zusammenfassung

Angesichts der herausragenden Bedeutung, die das gentechnisch gewonnene Erythropoietin (Epo) in den vergangenen 15 Jahren als Anti-Anämikum erlangt hat, wird an die frühen Tage der Epo-Forschung erinnert. Die Rolle der Erythrozyten als O<sub>2</sub>-Träger wurde in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts erkannt. Die Hypothese der hormonellen Regulation der Erythropoese datiert aus dem Jahr 1906. Der Name „Erythropoietin“ wurde 1948 eingeführt. Das menschliche Hormon wurde 1977 und sein Gen 1985 isoliert. Die Epo-Therapie ist für chronisch Niereninsuffiziente, Tumorkranke und chirurgische Patienten hilfreich.

### Summary

In the light of 15 years' success of the therapy with recombinant human erythropoietin (Epo), the history of early Epo research is recalled. The role of red blood cells in O<sub>2</sub> transport was recognized late in the 19th century. The concept of the humoral regulation of hematopoiesis was published in 1906. The name „erythropoietin“ was introduced in 1948. Human Epo was isolated in 1977 and its gene cloned in 1985. Epo therapy is most useful in the anemias of chronic renal failure or malignancies and in surgical settings.

### Einleitung

Im Alten Testament steht geschrieben: „Denn das Leben des Leibes ist im Blut“ (4. Buch Mose 17, 11). Bis in die frühe Neuzeit wurde die Ursache somatischer oder psychischer Erkrankungen in einer veränderten Zusammensetzung des Blutes gesucht, und die ärztliche Kunst bestand darin, dem Patienten sein „gesundes Blut“ zu erhalten oder zu ersetzen. Am 15. Juli 1667 führten Denis und Emmerz in Frankreich die erste Bluttransfusion am Menschen durch. Der fieberige Patient, ein junger Mann von etwa 16 Jahren, litt nach 20 Aderlässen, die ihm die Ärzte nach und nach verordnet hatten, unter Symptomen einer Anämie. Angeblich besserte die Transfusion von Lammsblut sichtbar seinen Zustand. Bemerkenswerterweise waren es v.a.

ethische Argumente, die kurz darauf zu einem Verbot xenogener Bluttransfusionen führten (Abb. 1). Nach der Entdeckung der menschlichen Blutgruppen ist die allogene Transfusion im vergangenen Jahrhundert eine lebensrettende Behandlungsmethode geworden. Unerwünschte Wirkungen sind febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktionen, Graft-versus-Host-Reaktionen, akute oder verzögerte hämolytische Reaktionen und die Übertragung von Krankheitserregern wie Viren, Protozoen oder Bakterien. Die Indikation zur Anwendung von Blutkomponenten und Plasmaderivaten ist streng zu stellen (57).

Biotechnologische Methoden ermöglichen es seit 20 Jahren, in kultivierten tierischen Zellen, Hefen und Bakterien menschliche Eiweiße herzustellen, die als Arzneimittel genutzt werden. Mehr als 20 verschiedene blutzellmodulierende Proteine werden bereits gentechnisch gewonnen. Einige von diesen wirken als spe-



Abb. 1: Bluttransfusion vom Lamm mit gleichzeitigem Aderlass. Auf der linken Seite des Patienten das Lamm, dessen Blut aus der A. carotis mittels zweier durch ein Stück Darm verbundener Röhrrchen in das eröffnete Gefäß am linken Arm des Patienten geleitet wird. Am rechten Arm ist ebenfalls ein Gefäß eröffnet, aus dem Blut abgelassen wird. Aus Johann Scultet: Appendix ad armamentarium chirurgicum, Amsterdam 1671 (mit Erlaubnis reproduziert aus (48)).

zifische hämatopoietische Wachstumsfaktoren (Tabelle 1), andere beeinflussen überwiegend das Immunsystem. Die hämatopoietischen Faktoren kontrollieren die Knochenmarksaktivität. Sie verhindern den programmierten Zelltod (Apoptose) der myeloischen Stamm- und Vorläuferzellen und gewährleisten damit das kontinuierliche Heranwachsen junger Blutzellen. Zur Produktion von Erythrozyten ist das Hormon Erythropoietin notwendig, ein Glykoprotein, das v.a. in den Nieren synthetisiert wird. Erythropoietinmangel ist Hauptursache renaler Anämien. Früher benötigten etwa 25 % der Dialysepatienten regelmäßige Erythrozytentransfusionen. Heute erübrigt sich die Gabe von Fremdblut, da die renale Anämie durch Substitution mit gentechnisch hergestelltem, sog. rekombinanten humanen Erythropoietin (rhEPO) verhindert wird. Andere Anwendungsgebiete für rhEPO umfassen nicht-renal bedingte transfusionsbedürftige Anämien, wie sie bei malignen Erkrankungen, chronischen Infektionen, Autoimmunerkrankungen oder bestimmten chirurgischen Eingriffen vorkommen.

In Anbetracht des Enthusiasmus über die Möglichkeit der Substitutionstherapie mit rhEPO sollte nicht vergessen werden, dass die heutigen Erfolge in 100 Jahren mühsamer Erforschung der Grundlagen der Erythropoese vorbereitet worden sind.

### Gewebshypoxie und Erythropoese

Die wichtige Rolle der Erythrozyten als O<sub>2</sub>-Transporter im Organismus wurde in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts erkannt (Tabelle 2). Der Pariser Atmungsphysiologe (und spätere Politiker) Paul Bert und sein Mentor Dennis Jourdanet beobachteten während ihrer Hochgebirgsexkursionen, dass die Konzentration der Erythrozyten im Blut von der Sauerstoffversorgung des Organismus abhängt. Den kolonialistischen Bestrebungen Napoleons III folgend war Jourdanet nach

1840	Blutgasanalysen (O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> )	H. Gustav Magnus
1860	Struktur- und Funktionsanalyse des Hämoglobins	Felix Hoppe-Seyler
1870	Gewebeatmung	Alexander Schmidt, Eduard F.W. Pflüger
1870	Hämatopoese im Knochenmark	Ernst Neumann, Guilio Bizzozero
1880	Höhenatmung	Paul Bert
1890	Hämoglobin-O <sub>2</sub> -Dissoziationskurve	Christian Bohr

Tabelle 2: Frühe wegbereitende Untersuchungen zur Atmungsfunktion des Blutes

Mexiko gezogen, wo er als Arzt auf dem Hochland praktizierte. Er veröffentlichte 1861-1876 grundlegende Arbeiten über die Symptomatik der chronischen Bergkrankheit (Monge-Krankheit). Die Höhenkranken hatten dickflüssiges Blut, zeigten jedoch Beschwerden wie anämische Patienten. Sie waren kurzatmig, hatten einen schnellen Puls und neigten zu Ohnmachtsanfällen. Jourdanet prägte den Begriff „Anoxyhémie“ für den O<sub>2</sub>-Mangel im arteriellen Blut. Paul Bert fand, dass das Blut von Tieren, die oberhalb von La Paz in 4000 m Höhe leben, eine höhere Hämoglobinkonzentration und somit größere O<sub>2</sub>-Transportkapazität aufweist als das Blut verwandter Tiere, die im Flachland leben (3). Im Gegensatz zu unserer heutigen Kenntnis glaubten Bert und Jourdanet, dass die Polyglobulie, das „dicke Blut“ der Höhenbewohner, ererbt war. Auch Gustav v. Hüfner (HÜFNERSche Zahl: 1 g Hämoglobin bindet 1,34 ml O<sub>2</sub>), schrieb 1890, dass ein größerer Reichtum

Erythropoietin:	monomeres Glykoprotein, 165 Aminosäuren, 2 Bisulfidbrücken, 3 N- und 1 O-verankerte Kohlenhydratseitenketten, Molekülmasse 30 kDa (40 % Zucker)
Thrombopoietin:	monomeres Glykoprotein aus 332 Aminosäuren, 2 Bisulfidbrücken, 6 Kohlenhydratseitenketten, Molekülmasse 60 kDa (37 % Zucker)
Granulozyten/ Monozyten- Kolonienstimulierender Faktor (GM-CSF)	monomeres Glykoprotein aus 127 Aminosäuren, 2 Kohlenhydratseitenketten, Molekülmasse 14-35 kDa je nach Glykosylierung
Granulozyten- Kolonienstimulierender Faktor (G-CSF)	monomeres Glykoprotein aus 174 (177) Aminosäuren, 2 Bisulfidbrücken, 1 O-verankerte Kohlenhydratseitenkette, Molekülmasse 19,6 kDa (5 % Zucker)

Tabelle 1: Physiologisch-chemischer Aufbau auch therapeutisch eingesetzter hämopoietischer Wachstumsfaktoren

des Blutes an Hämoglobin „durch Generationen hindurch stetig fortgehende Züchtung sich allmählich vom Genus erwerben“ lässt (27).

Diese Vorstellung wurde jedoch noch im selben Jahr von dem französischen Anatomen Viault widerlegt. Viault war aus seiner Heimatstadt Bordeaux in das Hochland von Peru gereist. Nachdem er 23 Tage in der 4392 m hoch gelegenen Stadt Morococha gelebt hatte, war die Zahl seiner Erythrozyten im Blut von 5 auf 8 Millionen/ $\mu$ l Blut angestiegen. Ebenso reagierten die ihn Begleitenden (Dr. Mayorga, einige Bergleute, 1 Hund, 1 Hahn und ein Lama). Viault schloss hieraus, dass die Erythropoiese bei einem erniedrigten  $O_2$ -Gehalt des Blutes akut ansteigt (52). Müntz (42) hatte 1883 auf dem Pic du Midi (2877 m) in den Pyrenäen eine Herde

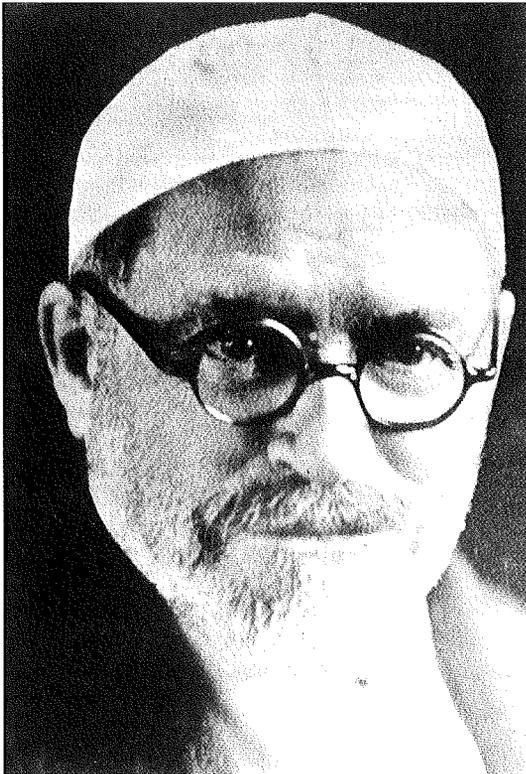


Abb. 2: Paul Carnot (1869-1957), Professor der klinischen Medizin an der Sorbonne. Er postulierte als erster die Existenz eines hämopoietischen Hormons: „Nous avons précédemment constaté, dans le sérum des animaux préalablement saignés et en pleine crise de rénovation sanguine, la présence d'une substance capable d'activer l'hémopoïèse (hémopoïétine) et de provoquer les animaux neufs, une hyperglobulie rapide, considérable et constante.“ (5). Mit Erlaubnis reproduziert aus *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 149, S.6, 1968.

Kaninchen ausgesetzt. Die Nachkommen dieser Tiere zeigten 7 Jahre später einen um 75 % erhöhten Eisen-gehalt des Blutes. Friedrich Miescher hielt 1893 einen Vortrag, in dem er Daten des niedergelassenen Kollegen Dr. F. Egger aus Basel vorstellte, die zeigten, dass bei anämischen Tuberkulosepatienten, die zur Kur in einem alpinen Sanatorium weilten, die Erythrozytenzahlen deutlich zugenommen hatten. Miescher (40) erklärte die gesteigerte Erythropoiese mit einem verminderten  $O_2$ -Partialdruck im Knochenmark.

Die Idee einer hormonellen Regulation der Erythropoiese wurde erstmals 1906 von Paul Carnot formuliert (Abb. 2). Carnot und seine Mitarbeiterin Deflandre unterzogen Kaninchen einem leichten Aderlass (30 ml). Tags darauf wurde erneut eine Blutprobe der Tiere gewonnen und das Serum (5-9 ml) normalen Kaninchen injiziert. Daraufhin stieg deren Erythrozytenzahl im Blut innerhalb von 1-2 Tagen um 20-40 % an. Carnot und Deflandre schlossen hieraus, dass das Serum einen Stoff enthielt, der die Blutbildung stimulierte. Sie nannten den Stoff „Hemopoiétine“ (5; 6). Die spezifischere Bezeichnung „Erythropoietin“ wurde 1948 von Bonsdorff und Jalavisto eingeführt (4).

#### Die Suche des Hormons

Wenn Erythropoietin exogen verabreicht wird, kommt es im Laufe von 3-4 Tagen zur Retikulozytose. Ein Anstieg der Erythrozytenkonzentration ist noch später und nur nach mehrtägiger Gabe des Wachstumsfaktors zu registrieren. Deshalb sind die Ergebnisse von Carnot und Deflandre (5) in der beschriebenen Form nicht reproduzierbar. Außerdem berichtete Carnot, dass das Serum nach Erwärmung auf 56° C inaktiv war, während Erythropoietin ein hitzestabiles Glykoprotein ist, das mehrminütiges Kochen ohne nennenswerten Wirkungsverlust verträgt. Vermutlich beruhten Carnots Befunde auf einem Zufall (z. B. einer Hämokonzentration in den Empfängertieren). Retrospektiv zeigt diese Geschichte jedoch auch, dass manchmal eine innovative Idee zum wissenschaftlichen Fortschritt führen kann, obwohl sie aus einem Fehlbefund abgeleitet wurde. Wahrscheinlich war es kein Zufall, dass die Carnotschen Untersuchungen in die Zeit der Entdeckung innersekretorischer Drüsen und der ersten Hormonisierungen fielen (C. E. Brown-Séquard: Testosteron, 1889; J. Takamine: Adrenalin, 1901; G. L. Zuelzer: Insulin, 1908; E. C. Kendall, Thyroxin, 1915). Carnot untersuchte selbst auch die Wirkung anderer humoraler Wachstumsfaktoren („Cytopoiétines“). Er entdeckte u. a. einen nephropoietischen Faktor (7).

In den Jahren 1910 bis 1930 wurde wiederholt berichtet, dass die Injektion von Serum anämischer oder hypoxämischer Tiere in Empfängertieren die Erythrozytenzahl erhöht (u. a. von C. Gibelli in Genua, P. Müller in Graz, G. Mansfeld und J. Förster in Budapest, A. Zih

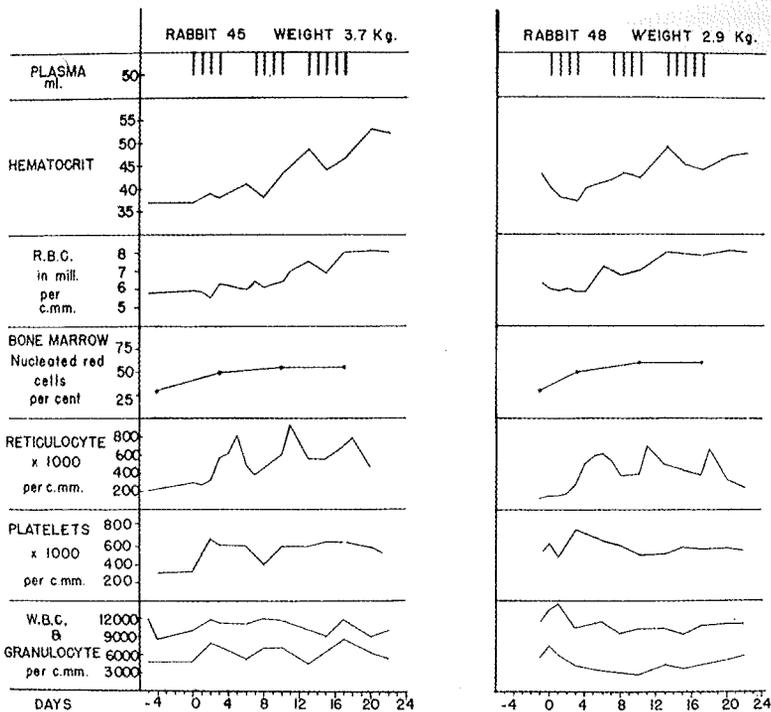


Abb. 3: Allan Erslevs tierexperimenteller Nachweis von Erythropoietin: Die hämatologische Antwort von 2 Kaninchen, denen 13 Infusionen mit je 50 ml Plasma anämischer Artgenossen verabreicht wurden (gekennzeichnet durch die Balken in den oberen Feldern). Mit Erlaubnis reproduziert aus (11).

in Debrecen; Referenzen in (4; 32)). Dennoch wurde die Existenz eines Hämopoietins zunächst angezweifelt (15; 23).

Gerhard Ruhenstroth-Bauer in Tübingen (47) und Kurt Reissmann vom Luftfahrtmedizinischen Institut in Randolph Field (46) weckten 1950 mit ihren Untersuchungen an parabiotischen Tieren erneut Interesse an dem postulierten humoralen erythropoetischen Stoff. Als diese Untersucher ein normales und ein hypoxisches Tier über eine Gewebebrücke verbanden, kam es in beiden Tieren zu einer Steigerung der Erythropoese. Allgemein wird dem in Philadelphia tätigen Hämatologen Allan Erslev zugesprochen, 1953 den eigentlichen Beweis für die Existenz des hämopoetischen Hormons geliefert zu haben. Erslev, ein gebürtiger Däne, verabreichte normalen Kaninchen mehrmals große Volumina (50-200 ml) Blutplasma anämischer Artgenossen (Hämatokrit < 0,2). Die Empfängertiere antworteten mit einer Retikulozytose und längerfristig einer Hämatokriterhöhung (Abb. 3). Die damals von Erslev beschriebenen Effekte gleichen denen, die heute bei der Behandlung mit rhEPO erzielt werden. Erslev sagte schon vor 50 Jahren den möglichen therapeutischen Nutzen des erythropoetischen Serumfaktors voraus: „Conceivably isolation and purification of this factor would provide an agent useful in the treatment of conditions associated with erythropoietic depression, such as chronic infection and chronic renal disease“ (11).

Hjort hatte wie Erslev eine ausgeprägte Retikulozytose in Kaninchen beobachtet, denen Plasma anämischer Tiere verabreicht worden war. Ähnliche Untersuchungen von Krumdieck aus dem Jahre 1943 (36) und Gunther et al. 1951 (24) sind ebenfalls allgemein in Vergessenheit geraten.

### Identifizierung der erythropoietinproduzierenden Organe

Studien an Patienten mit offenem Ductus Botalli hatten in den 50er Jahren ergeben, dass ein O<sub>2</sub>-Mangel in der unteren Körperhälfte allein zur Polyglobulie führen kann (49; 50). Wenig später wurde die wichtige Rolle der Niere bei der Erythropoietinsynthese erkannt. Leon Jacobson und seine Kollegen berichteten 1957, dass beidseitig nephrektomierte Ratten auf eine Cobaltbehandlung oder einen hypoxischen Reiz nicht mit dem normalen Anstieg des Plasmaerythropoietin reagieren (29). Bald darauf folgten Berichte über niedrige Erythropoietinspiegel bei anämischen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (19; 25). Kuratowska und Mitarbeiter (37) und Fisher und Birdwell (17) wiesen 1961 erstmals erythropoetische Aktivität im Blutperfusat isolierter Nieren nach.

Trotz dieser Befunde war lange Zeit umstritten, ob das Hormon Erythropoietin direkt in der Niere entsteht. Es gelang nämlich nicht, das Protein aus der Niere zu extrahieren. Auf der Basis von Inkubationsversuchen mit

Interessanterweise offenbarten Gespräche, die 1991 während der 2. Internationalen Erythropoietinkonferenz in Lübeck (44) geführt wurden, dass Erling Hjort aus Bergen schon viel früher die grundlegende Aussage von Carnot und Deflandre bestätigt hatte (16). Hjorts Befunde von 1936 haben jedoch wenig Beachtung gefunden, da sie in einer norwegischen Zeitschrift publiziert sind (26).

Nierenextrakten und Blutplasma stellten Albert Gordon und Mitarbeiter Ende der 60er Jahre die sog. Erythrogenin-Hypothese auf. Diese besagte, dass die Niere – analog zum Renin-Angiotensinogen-System – bei O<sub>2</sub>-Mangel ein Enzym freisetzt („Erythrogenin“), welches aus einem Plasmaeiweiß Erythropoietin abspaltet (22). Die Erythrogenin-Hypothese fand damals Eingang in zahlreiche Lehrbücher. Heute gilt das Konzept als widerlegt. Ein Enzym mit Erythrogenin-Aktivität wurde niemals identifiziert.

Zweifel an der Erythrogenin-Hypothese kamen erstmals 1974 auf, als Erslev isolierte Kaninchennieren serumfrei perfundierte. Nach mehreren Stunden war im Perfusionsmedium erythropoietische Aktivität nachweisbar (12). 1981 gelang die Extraktion großer Mengen Erythropoietin aus der Niere hypoxischer Ratten (35). Das Hormon wurde v.a. im Gewebe der Nierenrinde und kaum im Nierenmark lokalisiert. Lange Zeit war strittig, ob glomeruläre oder tubuläre Zellen das Hormon synthetisieren (Übersicht in (33)). Spätere in-situ Hybridisierungsexperimente haben eine ganz andere Lösung gegeben. Demnach produzieren spezielle Fibroblasten, die proximalen Tubuluszellen benachbart sind, das Hormon (2). Abgesehen von den peritubulären Zellen der Niere können auch andere Gewebe das Erythropoietin exprimieren (v. a. Zellen in Leber, Milz, Lunge, Knochenmark und Gehirn). Beim Erwachsenen stammt 10-20 % des Plasmaerythropoietins aus der Leber. Vor der Geburt ist die Leber das wichtigste erythropoietinbildende Organ des Menschen (9). Das im Gehirn produzierte Erythropoietin gelangt vermutlich nicht in die Blutbahn, sondern wirkt parakrin als neuronaler Wachstumsfaktor (39).

### Isolierung und chemische Charakterisierung

Der langsame Fortschritt der frühen Erythropoietinforschung beruhte z. T. auf den unbefriedigenden Messmethoden für das Hormon. Seine Konzentration im Blut ist sehr niedrig. Beim Gesunden enthält 1 l Blutplasma etwa 100 ng Erythropoietin. Zum Nachweis des „Erythropoiese stimulierenden Faktors“ (ESF) waren anfänglich ausschließlich biologische Methoden verfügbar. Das Probenmaterial wurde Versuchstieren parenteral verabreicht. Dann wurden Erythrozytenzahlen, Hämoglobinkonzentration und Hämatokrit verfolgt. Ein empfindlicheres Verfahren wurde 1955 von Plzak und Mitarbeitern entwickelt (45). Zur Quantifizierung der Erythropoieserate wurde Ratten radioaktiv markiertes Eisen injiziert und der Eiseneinbau ins Hämoglobin des Blutes ermittelt. Die Methode ließ sich noch verfeinern, indem die endogene Erythropoiese der Tiere durch Nahrungskarenz unterdrückt wurde (18). Später wurde die – noch heute zum Nachweis der Wirksamkeit von rhEPO genutzte – biologische „in vivo Bestimmung in polyzythämischen Mäusen“ entwi-

ckelt. Vor der Verabreichung der Erythropoietinproben und des radioaktiven Eisens erhielten die Tiere Bluttransfusionen (30) oder wurden einem simulierten Höhenaufenthalt ausgesetzt (8). Die traditionelle Angabe von Erythropoietinkonzentrationen in Internationalen Einheiten (IE) basiert auf der biologischen in vivo Bestimmung (1). Da bekannt war, dass Cobalt die Erythropoiese stimuliert (54), wurde 1 IE Erythropoietin der Wirkung von 5 µmol Cobalt gleichgesetzt (1). Biologische in vitro Bestimmungsmethoden in Zellkulturen haben sich als weniger spezifisch zur Quantifizierung des Hormons in biologischen Materialien erwiesen (33). Für die routinemäßige Bestimmung von Erythropoietin im Blutplasma sind heute mehrere kommerzielle immunologische Testbestecke erhältlich. Seit 1992 gibt es eine WHO-akkreditierte rhEPO-Präparation, die als Standard zur Erythropoietinbestimmung eingesetzt werden sollte (51).

Verschiedene Arbeitsgruppen versuchten jahrelang, Erythropoietin aus tierischem Blutplasma zu isolieren. Basierend auf seinen Erfahrungen mit der Erythropoietinanreicherung aus Schafplasma kalkulierte der amerikanische Biochemiker Eugene Goldwasser 1968, dass 3250 l Urin anämischer Patienten nötig wären, um 10 mg reines menschliches Erythropoietin zu gewinnen: „This would represent about three years' daily collection from a single patient, or one month's collection from 36 patients, which does not seem to be an impossible goal“ (21). Es dauerte 9 Jahre, bis Goldwasser und seine Mitarbeiter ihr Ziel erreicht hatten. Aus 2550 l Urin von Patienten mit aplastischer Anämie wurden 10 mg reines Erythropoietin gewonnen (41). Damit konnte die Aminosäuresequenz des Hormons partiell aufgeklärt und das menschliche Erythropoietin isoliert werden (28; 38). Eugene Goldwasser hat in einem lesenswerten sehr persönlichen Rückblick die Probleme, die ein Grundlagenwissenschaftler bei der Zusammenarbeit mit pharmazeutischen Firmen, aber auch mit Drittmittelgebern und konkurrierenden Kollegen, erleben kann, wiedergegeben (20).

Menschliches Erythropoietin ist ein saures Glykoprotein mit einer molekularen Masse von 30 kDa. Der Proteinanteil besteht aus einer einzelnen Peptidkette von 165 Aminosäuren, wobei 4 Cysteinreste 2 Disulfidbrücken ausbilden. Die Zuckerreste, 40 % der gesamten Molekülmasse, bestehen aus 4 antennenartig verzweigten Polysaccharidkomplexen. Drei davon sind an Asparaginsäureresten in den Aminosäurepositionen 24, 38 und 83 befestigt (N-verankert). Die vierte Kette ist an Serin in Position 126 gebunden (O-verankert). Die N-verankerten Polysaccharide weisen strukturelle Unterschiede auf. U. a. variieren sie in der Anzahl der terminalen Sialinsäurereste. Diese Unterschiede bedingen eine Mikroheterogenität des Hormons, die sich als Bandenmuster in der isoelektrischen Fokussierung

zeigt. Die Anzahl der terminalen Sialinsäurereste bestimmen die Lebenszeit des Hormons im Organismus. Durch die Desialinisierung werden Galaktosereste der Zuckerketten frei, die an spezifische Rezeptoren der Zellmembran von Hepatozyten binden, wodurch das Hormon internalisiert wird.

Die molekularen Mechanismen, die die Erythropoietingenexpression steuern, konnten in den vergangenen Jahren weitgehend aufgeklärt werden. Der Arbeitsgruppe von Gregg Semenza in Baltimore gelang es, einen Transkriptionsfaktor zu charakterisieren, der das Erythropoietin unter hypoxischen Bedingungen aktiviert (53). Dieser „Hypoxie-induzierbare Faktor 1“ (HIF-1) bindet an die 3' gelegenen Verstärkerelemente des Erythropoietingens. HIF-1 ist ein dimeres Protein, das aus zwei Untereinheiten – dem O<sub>2</sub>-kontrollierten HIF-1 $\alpha$  und dem konstitutiv vorhandenen HIF-1 $\beta$  – zusammengesetzt ist. Unter normoxischen Bedingungen wird die HIF-1 $\alpha$  Untereinheit ubiquitiniert und in Proteasomen proteolytisch abgebaut. Der HIF-1 Komplex ist nicht nur für die hypoxische Erythropoietingenexpression verantwortlich. Er steuert auch die Expression einer Vielzahl anderer Gene, die Proteine kodieren, welche den Organismus vor Sauerstoffmangel schützen (55).

### Gentechnische Herstellung von rhEPO

Forscherguppen im Genetics Institute, Boston (28), und bei Amgen, Thousand Oaks (38), gelang 1985 unabhängig voneinander die Klonierung des Erythropoietingens. Die genomische DNA ist 5,4 Kilobasenpaare (kb) lang und enthält 4 Introns und 5 Exons. Die Isolierung des Erythropoietingens ermöglichte das Einbringen der Erythropoietin cDNA in Wirtszellen. Zur pharmazeutischen Gewinnung von rhEPO dienen Zellkulturen aus dem Ovar des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen). Da das Erythropoietin zur Transfektion mit anderem genetischen Material (Plasmid und Antibiotikaresistenzgen) kombiniert wurde, wird das Produkt rekombinantes humanes Erythropoietin (rhEPO) genannt (Abb. 4). RhE-

PO verhält sich in Bezug auf seine chemische Struktur und seine immunologischen Eigenschaften wie das native menschliche Hormon.

Kürzlich wurde ein neues rhEPO-ähnliches Medikament zur Anämiebehandlung zugelassen („Novel Erythropoiesis Stimulating Protein“, NESP). Mittels molekularbiologischer Manipulation („site-directed mutagenesis“) wurden zwei zusätzliche Kohlenhydratbindungsstellen in die durch 5 Aminosäureaustausche veränderte Peptidsequenz eingefügt (10). Das hyperglykosylierte NESP hat eine längere Halbwertszeit im Organismus als rhEPO. Somit ist ein längeres Dosierungsintervall möglich. Anti-NESP Antikörper sind bislang nicht beschrieben, jedoch sollte die Antigenität des Produktes langfristig geprüft werden.

### Therapeutische Anwendung

Die Wirksamkeit von exogenem Erythropoietin beim Menschen wurde vor 50 Jahren erstmals von Oliva und Mitarbeitern in Perugia beschrieben (43). Diese Untersucher beobachteten nach der Infusion von Plasma anämischer Patienten in Normalpersonen einen Anstieg der Retikulozytenzahlen. Ursula Essers und Mitarbeiter aus Aachen berichteten 25 Jahre später, dass Plasma von Patienten mit aplastischer Anämie in chronisch Niereninsuffizienten eine Retikulozytose hervorruft (14). Erste Erfahrungen der Behandlung der renalen Anämie mit rhEPO wurden vor 15 Jahren in London (56) und Seattle (13) gesammelt. Eschbach und Mitarbeiter (13) erzielten eine Korrektur der Anämie in allen Patienten, denen der rekombinante Wirkstoff in einer Dosis von mindestens 50 E/kg Körpergewicht 3 x pro Woche intravenös verabreicht wurde. Das Ausmaß des

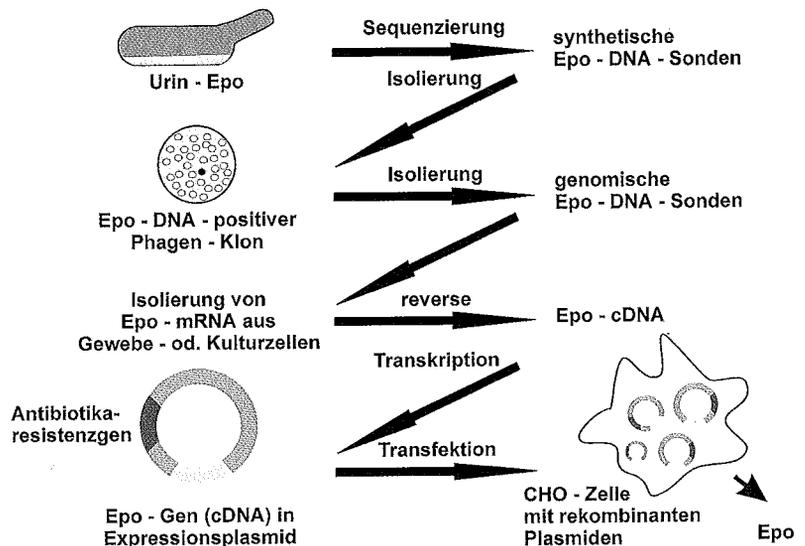


Abb. 4: Schritte der Isolierung und Charakterisierung des Erythropoietingens und der gentechnischen Herstellung von rhEPO.

Hämatokritanstiegs war dosisabhängig. Inzwischen wird rhEPO routinemäßig zur Korrektur der Anämie hämodialysierter oder chronisch peritonealdialysierter Patienten sowie Niereninsuffizienter im Prädialysestadium eingesetzt. Das sehr seltene ungenügende Ansprechen kann folgende Gründe haben: zu niedrige Dosis, Eisenmangel, Aluminiumüberladung, chronische Entzündungen oder Blutverluste. Da rhEPO das Grundleiden der Patienten nicht beseitigt, muss die Substitution zeitlebens fortgesetzt werden, wenn nicht später eine Nierentransplantation durchgeführt wird. In den vergangenen Jahren wurde der Wert der rhEPO-Therapie unter medizinischen und ökonomischen Gesichtspunkten bei verschiedenen anderen Anämieformen geprüft. Behandlungserfolge ergaben sich bei der Anämie frühgeborener Babies und der postpartalen Anämie von Müttern. In einigen europäischen Ländern ist das Medikament zur Behandlung der Anämie bei AIDS, soliden Tumoren, myelodysplastischen Syndromen und Autoimmunerkrankungen zugelassen. In Deutschland wird es bei Tumorpatienten, die sich einer Chemotherapie unterziehen, eingesetzt. Außerdem kann rhEPO zur Unterstützung der autologen Blutgewinnung bei Patienten verwendet werden, die an einem Spendenprogramm zur Fremdblutvermeidung teilnehmen. Durch den perioperativen Einsatz von rhEPO können postoperative Anämien gelindert werden (31; 34).

## Literatur

- Annable L, Cotes PM, Mussett MV (1972) The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull World Health Organ* 47 : 99-112
- Bachmann S, Le Hir M, Eckardt KU (1993) Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J Histochem Cytochem* 41 : 335-341
- Bert P (1878) *La Pression Barométrique. Recherches de Physiologie Expérimentale.* Librairie de l'Académie de Médecine, Paris
- Bonsdorff E, Jalavisto E (1948) A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiol Scand* 16 : 150-170
- Carnot MP, Deflandre C (1906) Sur l'activité hémopoïétique des différents organes au cours de la régénération du sang. *C R Acad Sci Paris* 143 : 432-435
- Carnot P, Deflandre C (1906) Sur l'activité hémopoïétique du sérum au cours de la régénération du sang. *C R Acad Sci Paris* 143 : 384-386
- Carnot P, Lelièvre A (1907) Sur l'activité néphro-poiétique du sang et du rein au cours des régénérations rénales. *C R Acad Sci Paris* 144 : 718-720
- Cotes PM, Bangham DR (1961) Bio-assay of erythropoietin in mice made polycythaemic by exposure to air at a reduced pressure. *Nature* 191 : 1065-1067
- Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, Hofmann D, Abdul NT, Bartmann P, Fandrey J (1998) Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood* 92 : 3218-3225
- Egrie JK, Browne JK (2001) Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Br J Cancer* 84 : 3-10
- Erslev A (1953) Humoral regulation of red cell production. *Blood* 8 : 349-357
- Erslev AJ (1974) In vitro production of erythropoietin by kidneys perfused with a serum-free solution. *Blood* 44 : 77-85
- Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW (1987) Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med* 316 : 73-78
- Essers U, Müller W, Heintz R (1974) Effect of erythropoietin in normal men and in patients with renal insufficiency. *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 11 : 398-402
- Feenders H (1936) Über die hämatopoetische Wirkung des Blutserums bei sekundärer Anämie. *Frankf Ztschr Path* 49 : 411-417
- Fisher JW (1998) A quest for erythropoietin over nine decades. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38 : 1-20
- Fisher JW, Birdwell BJ (1961) The production of an erythropoietic factor by the in situ perfused kidney. *Acta Haematol* 26 : 224-232
- Fried W, Plzak LF, Jacobson LO, Goldwasser E (1957) Studies on erythropoiesis. III. Factors controlling erythropoietin production. *Proc Soc Exp Biol Med* 94 : 237-241
- Gallagher NI, McCarthy JM, Hart KT, Lange RD (1959) Evaluation of plasma erythropoietic-stimulating factors in uremic patients. *Blood* 14 : 662-667
- Goldwasser E (1996) Erythropoietin: a somewhat personal history. *Persp Biol Med* 40 : 18-31
- Goldwasser E, Kung CKH (1968) Progress in the purification of erythropoietin. *Ann N Y Acad Sci* 149 : 49-53
- Gordon AS, Cooper GW, Zanjani ED (1967) The kidney and erythropoiesis. *Semin Hematol* 4 : 337-358
- Gordon AS, Dubin M (1934) On the alleged presence of „hemopoietine“ in the blood serum of rabbits either rendered anemic or subjected to low pressures. *Am J Physiol* 107 : 704-708
- Gunther B, Hodgson G, Tohé J, Quappe O (1951) The inactivation by oxygen of the erythropoietic effect of plasma of rabbits rendered anemic by bleeding. *Acta Physiologica Latinoamerica* 1 : 271-276
- Gurney CW, Goldwasser E, Pan C (1957) Studies on erythropoiesis. IV Erythropoietin in human plasma. *J Lab Clin Med* 50 : 534-540
- Hjort E (1936) Reticulocytøkning efter injeksjon av „anemisk“ serum. *Norsk Mag Laegevidensk* 97 : 270-277
- Hüfner G (1890) Über das Gesetz der Dissociation des Oxyhaemoglobins und über einige daran sich knüpfende wichtige Fragen aus der Biologie. *Arch Anat Physiol* 1-27
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, Kawakita M, Shimizu T, Miyake T (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313 : 806-810

29. Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L (1957) Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 179 : 633-634
30. Jacobson LO, Goldwasser E, Plzak LE, Fried W (1957) Studies on erythropoiesis. IV: Reticulocyte response of hypophysectomized and polycythemic rodents to erythropoietin. *Proc Soc Exp Biol Med* 94 : 243-249
31. Jelkmann W (2000) Use of recombinant human erythropoietin as an antianemic and performance enhancing drug. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 1 : 11-31
32. Jelkmann W (1986) Erythropoietin research, 80 years after the initial studies by Carnot and Deflandre. *Respir Physiol* 63 : 257-266
33. Jelkmann W (1986) Renal erythropoietin: Properties and production. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 104 : 139-215
34. Jelkmann W (1997) Klinische Relevanz von Erythropoietin. *Focus MUL* 14 : 161-169
35. Jelkmann W, Bauer C (1981) Demonstration of high levels of erythropoietin in rat kidneys following hypoxic hypoxia. *Pflügers Arch* 392 : 34-39
36. Krumdieck N (1943) Erythropoietic substance in the serum of anemic animals. *Proc Soc Exp Biol Med* 54 : 14-17
37. Kuratowska Z, Lewartowski B, Michalak E (1961) Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs. *Blood* 18 : 527-534
38. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, Badrawi SM, Lai PH, Goldwasser E (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 : 7580-7584
39. Masuda S, Nagao M, Sasaki R (1999) Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production. *Int J Hematol* 70 : 1-6
40. Miescher F (1893) Über die Beziehungen zwischen Meereshöhe und Beschaffenheit des Blutes. *Correspondenz-Blatt Schweizer Ärzte* 23 : 809-830
41. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E (1977) Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252 : 5558-5564
42. Müntz A (1891) De l'enrichissement du sang en hémoglobine, suivant les conditions d'existence. *C R Acad Sci Paris* 112 : 298-301
43. Oliva G, Chiuini F, Tramontana C (1949) On the humoral regulation of the normoerythropoiesis. *Acta Med Scand* 133 : 27-30
44. Pagel H, Weiss C, Jelkmann W (1992) *Pathophysiology and Pharmacology of Erythropoietin*. Springer-Verlag, Berlin
45. Plzak LF, Fried W, Jacobson LO, Bethard WF (1955) Demonstration of stimulation of erythropoiesis by plasma from anemic rats using Fe<sup>59</sup>. *J Lab Clin Med* 46 : 671-678
46. Reissmann KR (1950) Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood* 5 : 372-380
47. Ruhlenstroth-Bauer G (1950) Versuche zum Nachweis eines spezifischen erythropoetischen Hormons. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 211 : 32-56
48. Schlich Th (1991) Kulturgeschichte der Transplantation: Geben und Nehmen. *Spektrum Nephrol* 4 : 3-6
49. Schmid R, Gilbertsen AS (1955) Fundamental observations on the production of compensatory polycythemia in a case of patent ductus arteriosus with reversed blood flow. *Blood* 10 : 247-251
50. Stohlman F, Rath CE, Rose JC (1954) Evidence for a humoral regulation of erythropoiesis. *Blood* 9 : 721-733
51. Storing PL, Gaines DR (1992) The International Standard for Recombinant DNA-derived Erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. *J Endocrinol* 134: 459-484
52. Viault F (1890) Sur l'augmentation considérable du nombre des globules rouges dans le sang chez les habitants des hauts plateaux de l'Amérique du Sud. *C R Acad Sci Paris* 111 : 917-918
53. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 5510-5514
54. Weissbecker L (1950) Die Kobalttherapie. *Dtsch Med Wochenschr* 75 : 116-118
55. Wenger RH, Gassmann M (1999) HIF-1 and the molecular response to hypoxia in mammals. In: Storey K (ed) *Environmental Stress and Gene Regulation*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 25-45
56. Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR, Cotes PM (1986) Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* 2 : 1175-1178
57. Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer und vom Paul-Ehrlich-Institut (2000) Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Deutscher Ärzte-Verlag, Köln

# 15 Jahre Erythropoietin in Klinik und Praxis: Eine Erfolgsstory

H. Pagel

Der Grundstein für die „Karriere“ von Erythropoietin als Therapeutikum wurde im Jahre 1977 gelegt, als Takaji Miyake aus dem Labor von Eugene Goldwasser in Chicago seine Arbeit zur Reindarstellung von humanem Erythropoietin publizierte (Miyake et al. 1977). Dies war die Voraussetzung für die Klonierung des Erythropoietingens (Jacobs et al. 1985; Lin et al. 1985) und damit für die Herstellung des rekombinanten humanen Erythropoietins (rhuEpo; Lin et al. 1985; Wiczorek et al. 1989). Die ersten Ergebnisse der klinischen Anwendung von Erythropoietin wurden bereits kurz darauf, nämlich Ende 1986 bzw. Anfang 1987 publiziert (Winearls et al. 1986; Eschbach et al. 1987), womit erstmals ein gentechnisch hergestelltes Produkt als Medikament angewendet wurde und der bisher 15jährige „Siegessäug“ von rhuEpo begann. Schnell hat sich rhuEpo zu dem Medikament mit den weltweit höchsten Umsatzzahlen entwickelt. Indikation, für die rhuEpo zunächst zugelassen wurde, war die renale Anämie infolge einer chronischen Niereninsuffizienz, an der allein in Deutschland 40 bis 50.000 Patienten leiden.

## Renale Anämie

Im Verlauf chronisch progredienter Nierenerkrankungen kommt es zu vielfältigen Funktionsstörungen, von denen fast alle Organsysteme betroffen sind (Magen-Darm-Trakt, zentrales und peripheres Nervensystem, Muskulatur, Gelenke und Knochen, Herz- und Kreislaufsystem, Haut, Lunge, Immunsystem). Parallel zur Einschränkung der exkretorischen Nierenfunktion entwickelt sich i.d.R. eine renale Anämie. Behandlungsbedürftig wird die Anämie spätestens, wenn die glomeruläre Filtrationsrate der Niere auf unter 30 % der Norm abgefallen ist (GFR < 40 ml/min). Sofern nicht weitere Komplikationen hinzu kommen, ist die Anämie hyporegenerativ, normozytär und normochrom und verschlimmert sich mit weiter abnehmender Nierenfunktion. Unbehandelt fällt der Hämatokrit im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz häufig bis auf 0,18-0,30, entsprechend einer Hämoglobin-Konzentration im Blut von 6-10 g/dl. Die relative (in %) oder absolute (in Mio/mm<sup>3</sup>) Retikulozytenzahl im Blut ist im unteren Normbereich oder vermindert. Trotz ausgeprägter Anämie ist der histologische Knochenmarksbefund zunächst unauffällig. Die Patienten sind kurzatmig, tachykard, kältesensitiv und psychisch und physisch nur wenig belastbar.

Hauptursache der renalen Anämie ist der relative oder absolute Erythropoietinmangel (Adamson und Eschbach 1990). Unklar ist nach wie vor, was der Grund für diese mangelhafte renale Erythropoietinbildung ist. Verminderte Empfindlichkeit der erythropoietinbildenden Zellen auf einen hypoxischen Reiz („Hypoxieresistenz“) oder irreversible Zerstörung eines mehr oder weniger großen Teiles dieser Zellpopulation wurden diskutiert (Chandra et al. 1988). Unklar ist weiterhin, weshalb der Erythropoietinmangel niereninsuffizienter Patienten nicht durch eine gesteigerte hepatische Erythropoietinbildung kompensiert werden kann, obgleich die Fähigkeit der Leber zur Erythropoietinsynthese lebenslang persistiert (Chandra et al. 1985).

Eine Reihe von Faktoren können die Anämie nierenkranker Patienten aggravieren. Durch Destabilisierung der Zellmembran ist die Lebenszeit der Erythrozyten im urämischen Milieu verkürzt, oft sogar halbiert (~ 60 statt normalerweise 100-120 Tage). Werden Erythrozyten von einem urämischen Patienten einem Nierengesunden injiziert, so weisen diese Zellen eine normale Überlebenszeit auf.

Durch Ankopplung urämischer Toxine („uremic middle molecules“) an Erythropoietinrezeptoren der hämatopoietischen Stammzellen wird eine relative Resistenz gegen Erythropoietin erzeugt, was zur Hemmung der Erythropoese im Knochenmark führt. Außerdem inhibieren die Toxine den Eiseneinbau in das Hämolektil.

Die Beteiligung der Folsäurecoenzyme an der Biosynthese von Purinen und Pyrimidinen zeigt ihre fundamentale Bedeutung für die Zellteilung. Da die hämatopoietischen Zellen des Knochenmarks eine besonders hohe Teilungsrate haben, sind Störungen des Blutbildes (megaloblastische Anämie) ein frühes und besonders gravierendes Zeichen eines ernährungsbedingten Folsäuremangels. Eine gleichartige Symptomatik zeigt sich auch beim Cobalaminmangel (Vitamin B<sub>12</sub>, perniziöse Anämie).

Mit zunehmender Niereninsuffizienz wird in den Nieren immer weniger biologisch wirksames Cholecalciferol (1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub>) gebildet. Der Serumphosphatwert steigt an, die Konzentration an ionisiertem Kalzium sinkt. Die resultierende Hypokalzämie stimuliert die Nebenschilddrüse zur vermehrten Freisetzung von Parathormon. Dieser sekundäre Hyperpara-

rathyreoidismus führt zur fibrösen Umwandlung des Knochenmarks und hat so einen suppressiven Effekt auf die Hämatopoese.

Die urämischen Patienten verlieren Blut infolge ihrer gesteigerten Blutungsneigung (okkulte Blutungen im Gastrointestinaltrakt, gynäkologische Blutungen) und durch therapeutische Maßnahmen (Dialyse, Diagnostik, etc.; 500 bis 1500 ml pro Jahr). Diese Blutverluste werden von einem Gesunden problemlos kompensiert; bei eingeschränkter Erythropoese können sie jedoch eine erhebliche zusätzliche Belastung darstellen.

In der Zeit, bevor rhuEpo als Medikament verfügbar war, benötigte ein großer Teil der urämischen Patienten regelmäßig Transfusionen von Erythrozytenkonzentrationen. Obgleich das Risiko einer Krankheitsübertragung durch Blutkonserven äußerst gering ist, können Virusinfektionen (vor allem mit Hepatitisserregern) nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zudem können häufige Erythrozytentransfusionen zur Hämochromatose mit konsekutiver Splenomegalie und Leberzirrhose führen. Schließlich kann eine mögliche Sensibilisierung gegen fremde Histokompatibilitätsantigene den Erfolg einer späteren Nierentransplantation beeinträchtigen.

### Die „rhuEpo-Ära“

Die Transfusionsbedürftigkeit niereninsuffizienter Patienten entfällt fast gänzlich, seit das gentechnisch hergestellte Erythropoietin zur Behandlung der renalen Anämie zur Verfügung steht. Nahezu alle Patienten antworten von Behandlungsbeginn an mit dem erwarteten Anstieg der Retikulozyten- bzw. Erythrozytenzahl. Innerhalb von 10 bis 12 Wochen kommt es zur deutlichen Erhöhung der körperlichen Leistungsfähigkeit und des subjektiven Wohlbefindens. Mit der Korrektur der Anämie nimmt die Lebensqualität der Patienten zu (Wiedererlangung der Arbeitsfähigkeit, Appetitzunahme, Rückkehr sexueller Libido und Potenz, psychisches Wohlbefinden, Abnahme der Schlafstörungen, Verschwinden von Depressionen etc.). Bei weiblichen Patienten kann es unter rhuEpo zum Wiedereinsetzen der Menstruation kommen, was den ärztlichen Hinweis auf eine mögliche Schwangerschaft notwendig macht.

Echokardiographische Untersuchungen haben gezeigt, dass die anämieinduzierte Hyperdynamik des Herzens nachlässt. Linksventrikulärer Durchmesser, enddiastolisches Füllungsvolumen und Herzindex nehmen ab. EEG-Analysen evozierter Potentiale weisen darauf hin, dass die Hirnfunktionen sich verbessern.

RhuEpo beseitigt allerdings nicht das Grundleiden der niereninsuffizienten Patienten, sondern muss als Palliativum betrachtet werden. Einzige zur Zeit mögliche kausale Therapie einer terminalen Niereninsuffizienz ist die Nierentransplantation. Ansonsten muss die Ery-

thropoietin-Substitution lebenslang fortgesetzt werden.

Selten kommt es zum ungenügenden Ansprechen auf die rhuEpo-Therapie (bei 2-3 % aller Patienten). Häufigster Grund hierfür ist ein funktioneller Eisenmangel. Spätestens wenn die Serumferritinwerte auf unter 100 µg/l gefallen sind und/oder die Transferrinsättigung < 20 % beträgt, muss die rhuEpo-Therapie von einer adäquaten Eisensupplementation begleitet werden. Chronische Entzündungen oder dialysebedingte Aluminiumintoxikationen können ebenfalls den Erfolg der rhuEpo-Therapie einschränken.

### Einige alte (Rand-)Probleme

Gravierendste Nebenwirkung einer rhuEpo-Therapie ist ein Anstieg des Blutdruckes, der bei 10 bis 20 % der Patienten vorkommen kann. In erster Linie sind Patienten betroffen, die anamnestisch eine Hochdruckneigung aufweisen. Dieser Komplikation kann leicht begegnet werden durch engmaschige Blutdruckkontrollen, konsequente medikamentöse Einstellung des Blutdruckes und „Einschleichen“ in die rhuEpo-Therapie mit einer eher moderaten Anfangsdosis.

Die Ursache für den rhuEpo-induzierten Blutdruckanstieg konnte bisher nicht restlos geklärt werden. Zumindest in Konzentrationen, die therapeutisch erreicht werden, wirken rhuEpo-Präparate nicht direkt vasokonstriktiv (Pagel et al. 1989). Der Blutdruckanstieg beruht zum Teil auf der Anhebung des Hämatokrits und der damit verbundenen Zunahme der Vollblutviskosität. Zudem nimmt die hypoxieinduzierte Dilatation der Widerstandsgefäße ab. Die Entwicklung oder Aggravierung eines Hypertonus hängt von der Steilheit des Hämatokritanstieges ab. Gerade letzteres ist das wesentliche Argument für die Empfehlung, die rhuEpo-Therapie mit einer niedrigen initialen Dosis zu beginnen.

Unter der rhuEpo-Therapie kommt es häufig zur Verkürzung der Blutungszeit. Die Zahl der Thrombozyten im Blut steigt leicht an, überschreitet jedoch i.d.R. nicht den Normalbereich. Dieser Nebeneffekt ist häufig günstig, da urämische Patienten nicht selten unter einer gesteigerten Blutungsneigung leiden. Andererseits kann es v. a. bei Hämodialyse-Patienten erforderlich werden, die Thrombozytenaggregation und die Plasmagerinnung medikamentös zu senken, um einen Verschluss des Dialyse-Shunts zu verhindern.

Die Kalium- bzw. Phosphatkonzentration im Plasma kann unter der rhuEpo-Therapie zunehmen. Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine erhöhte orale Zufuhr bedingt durch den gesteigerten Appetit der Patienten. Kontrollen der diesbezüglichen Plasmaspiegel sowie diätetische Hinweise an den Patienten sind daher angebracht.

Schließlich kann rhuEpo, wie andere gentechnisch hergestellte Proteine, leichte und passagere grippeähnliche Symptome hervorrufen (Kopf- und Gelenkschmerzen, Hitzewallungen, Mattigkeit).

### Ein neues (Rand-)Problem

RhuEpo ist mit dem endogen gebildeten Hormon weitestgehend identisch. Die Primärstruktur des Proteinerückgrates des Moleküls von 165 Aminosäuren wird durch das humane Erythropoietin vorgegeben, sodass der Proteinanteil von rhuEpo identisch ist mit dem des nativen Erythropoietins. Der aus vier Seitenketten bestehende Kohlenhydratanteil ist dem des endogenen Hormons sehr ähnlich. Allerdings lassen sich Mikroheterogenitäten in der Glykosylierung sowohl zwischen endogenem und rekombinantem Erythropoietin als auch zwischen den Präparaten zweier Hersteller (Epoetin alfa/Janssen-Cilag; Epoetin beta/Roche) nachweisen. Ein weiteres Präparat, bei dem durch Modifizierung der Proteinstruktur zwei zusätzliche Bindungsstellen für Zuckerseitenketten zwecks Verlängerung der biologischen Halbwertszeit geschaffen wurden (Darbepoetin alfa/Amgen), wurde kürzlich zugelassen. Alle Präparate haben sich bisher als kaum immunogen erwiesen. Trotz der Behandlung von weltweit einigen Millionen Patienten ist bis vor etwa zwei Jahren lediglich über eine Handvoll von Fällen mit „absoluter rhuEpo-Therapieresistenz“ berichtet worden – Therapieresistenz, die vermutlich auf die Bildung von neutralisierenden Antikörpern unter der rhuEpo-Therapie zurückzuführen war. Diese Fälle scheinen sich in jüngster Zeit zu häufen.

In einer kürzlich erschienenen Publikation (Casadevall et al. 2002) wird über 13 Patienten berichtet, bei denen Antikörper gegen Erythropoietin im Plasma nachgewiesen und charakterisiert werden konnten. Nach inoffiziellen Verlautbarungen sind den europäischen Behörden inzwischen rund 140 entsprechende Fälle gemeldet worden, wobei bei rund der Hälfte der Fälle der Antikörpernachweis gesichert ist. Bei allen übrigen Patienten muss bisher von einer Verdachtsdiagnose gesprochen werden (Eckardt, pers. Mitteilung).

Alle bisher publizierten Fälle von Antikörperbildung unter einer rhuEpo-Therapie beziehen sich auf Patienten mit Niereninsuffizienz. Neueste Untersuchungen, die allerdings noch einer Bestätigung bedürfen, berichten von bis dato drei Antikörper-positiven onkologischen Patienten.

Die Antikörper neutralisieren nicht nur das applizierte, sondern fatalerweise auch das residuale endogene Erythropoietin, was zur schweren aplastischen Anämie (PRCA, „pure red cell anemia“) mit zwingendem Transfusionsbedarf von Erythrozytenkonzentraten führt.

Die Gründe für das scheinbar zunehmende Auftreten der Antikörper gegen Erythropoietin sind unklar. Die Antikörper richten sich offenbar gegen den Proteinanteil, was allerdings nicht ausschließt, dass die Unterschiede im Kohlenhydratanteil die Immunisierung hervorgerufen haben. In den bisher beschriebenen Fällen von Antikörperbildung haben die Patienten rhuEpo ausnahmslos subkutan erhalten, sodass es nahe liegt, dass die Interaktion von lokal deponiertem rhuEpo mit antigenpräsentierenden Zellen der Haut die Antikörperbildung fördert. Die Antikörper sind kreuzreaktiv mit Epoetin alfa und beta sowie Darbepoetin, sodass ein Wechsel des Präparates bei Verdacht auf Antikörperbildung nicht angezeigt ist. Immunsuppressive bzw. zytostatische Therapieversuche (Steroide, Ciclosporin A, Cyclophosphamid) hatten insgesamt nicht den erwünschten Erfolg, führten jedoch zum allmählichen Abfall der Antikörpertiter.

Insgesamt wurden bisher weltweit schätzungsweise 4 Millionen Patienten wegen ihrer renalen Anämie mit rhuEpo behandelt. Gemessen an der Gesamtzahl der behandelten Patienten ist also die Zahl derer mit – gesicherter oder vermuteter – Antikörperbildung nach wie vor sehr niedrig. Dennoch scheint es ratsam, die diesbezügliche weitere Entwicklung genau zu beobachten (Maier-Lenz 2002) – insbesondere vor dem Hintergrund, dass, wie erwähnt, seit einiger Zeit ein Präparat mit verändertem Eiweißanteil auf dem Markt ist.

### Weitere Indikationen

Bei der Behandlung der renalen Anämie niereninsuffizienter Patienten hat sich rhuEpo rasch und eindrucksvoll als wirksam erwiesen und gehört seit geraumer Zeit zur Standardtherapie für Dialysepatienten. Gern wurde der therapeutische Fortschritt durch die Einführung von rhuEpo in Klinik und Praxis mit dem, wie er durch die Einführung der Antibiotika in der Mitte des letzten Jahrhunderts erzielt wurde, gleichgesetzt. Dadurch hat rhuEpo bereits früh Beachtung auch außerhalb der Nephrologie gefunden. Ein Überblick über die Indikationen, für die die verschiedenen rhuEpo-Präparate zur Zeit zugelassen sind, ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

RhuEpo wird nunmehr auch zur Therapie von Anämien im Prädialysestadium eingesetzt. Die Korrektur der Anämie hat keine negativen Auswirkungen bezüglich der Progredienz der Nierenerkrankung (Lim et al. 1990).

Eine Reihe von tumorassoziierten Anämien sprechen gut auf rhuEpo an. Bestimmte, v.a. platinhaltige Zytostatika (Cisplatin, Carboplatin), scheinen die Erythropoietinsekretion zu hemmen. Hier kann durch rhuEpo die chemotherapieinduzierte Hemmung der Erythropoese überwunden werden.

Präparat	Indikation
Epoetin alfa	<ul style="list-style-type: none"> <li>– renale Anämie bei hämodialysierten Kindern und Erwachsenen sowie peritonealdialysierten Erwachsenen</li> <li>– renale Anämie bei Erwachsenen im Prädialysestadium</li> <li>– Anämie bei Erwachsenen mit soliden Tumoren, malignen Lymphomen und multiplem Myelom</li> </ul>
Myelom	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Steigerung der autologen Blutgewinnung vor elektiven operativen Eingriffen</li> <li>– „Boosterung“ der Erythropoese vor größeren chirurgischen Eingriffen</li> </ul>
Epoetin beta	<ul style="list-style-type: none"> <li>– renale Anämie bei Patienten im Dialyse- und Prädialysestadium</li> <li>– Anämie bei Erwachsenen mit soliden Tumoren unter Chemotherapie mit platinhaltigen Zytostatika</li> </ul>
Zytostatika	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Anämie bei Erwachsenen mit multiplem Myelom, Non-Hodgkin-Lymphom und chronisch lymphatischer Leukämie</li> <li>– Steigerung der autologen Blutgewinnung vor größeren operativen Eingriffen</li> <li>– Vorbeugung der Frühgeborenenanämie bei Kindern mit einem Geburtsgewicht zwischen 750 u. 1500 g, Geburt vor der 34. Schwangerschaftswoche</li> </ul>
Darbepoetin	<ul style="list-style-type: none"> <li>– renale Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz bei Erwachsenen und Kindern ab 11 J.</li> <li>– Anämien bei Erwachsenen mit soliden Tumoren unter Chemotherapie</li> </ul>
Für alle Präparate gilt eine strenge Indikationsstellung während Schwangerschaft und Stillperiode.	

Tabelle 1: Indikationen für rekombinantes humanes Erythropoietin (*rhuEpo*)

Ogleich zugelassen, ist der Wert von *rhuEpo*-Gaben bei transfusionsbedürftigen Frühgeborenen strittig. Zwar kann die Frühgeborenen-Anämie mit *rhuEpo* korrigiert werden; die Inzidenz von Apnoe und Bradykardie ist jedoch unabhängig vom Schweregrad der Anämie.

Für die operative Medizin ist *rhuEpo* hingegen ein besonders interessantes Medikament. Bei längerfristig planbaren chirurgischen Eingriffen kann die Erythropoese präoperativ aktiviert werden, um vermehrt eigene Blutkonserven zur autologen Transfusion kollektieren zu können. Das Infektionsrisiko mit Fremdblut kann so umgangen werden. Die *rhuEpo*-Therapie kann außerdem einige Tage vor chirurgischen Eingriffen begonnen werden, um die Erythropoese frühzeitig zu aktivieren. Die Behandlung mit *rhuEpo* kann postoperativ fortgesetzt werden, sodass intraoperative Blutverluste möglichst rasch ausgeglichen werden.

Wie weiter oben bereits erwähnt, ist neben Epoetin alfa und beta vor Kurzem ein weiteres Präparat zur Behandlung der Anämie urämischer Patienten zugelassen worden: das Darbepoetin, auch bekannt unter dem Akronym NESP (= Novel Erythropoiesis Stimulating Protein). Darbepoetin wurde dieser Tage auch zur Behand-

lung von Patienten mit soliden Tumoren unter Chemotherapie zugelassen.

Zur Produktion von Darbepoetin wurden Mutationen in das Erythropoietingen eingeführt, sodass zwei der 165 Aminosäuren des Erythropoietinmoleküls ausgetauscht sind. Diese stellen zwei zusätzliche Bindungsstellen für Zuckerseitenketten dar. Im Vergleich zum nativen Erythropoietin bzw. zum *rhuEpo* besitzt Darbepoetin – neben der O-Glykosylierung – fünf statt drei N-glykosidisch gebundene Zuckerseitenketten. Dadurch wird die biologische Halbwertszeit von etwa 8 auf über 25 Stunden verlängert (Macdougall et al. 1999). Dies erlaubt längere Applikationsintervalle: Während *rhuEpo* 2- bis 3mal pro Woche gegeben werden muss, reicht für Darbepoetin wöchentlich eine einmalige Gabe (Sunder-Plassmann und Hörl 2001). Ob und inwieweit der Patient davon auch langfristig Vorteile hat, muss die Zukunft zeigen. Auf die Möglichkeit einer gesteigerten Immunogenität von Darbepoetin durch die Veränderungen seines Proteinanteiles wurde bereits hingewiesen. Dass Darbepoetin die chronisch überstrapazierten Krankenkassenbudgets entlasten wird, darf angezweifelt werden, zumal Darbepoetin, bezogen auf eine Gewichtseinheit, knapp doppelt so teuer ist wie Epoetin alfa bzw. beta.

## Und was bringt die Zukunft ...?

Obleich zur Behandlung der Anämie im Prädialysestadium zugelassen, erhält gemäß einer europaweit durchgeführten Studie (Valderrabano et al. 2000) bis dato nur etwa jeder zehnte Patient rhuEpo bereits vor Beginn der Hämodialyse. Die Hämoglobin-Konzentration im Blut beträgt dann im Mittel nur 8,7 g/dl. Auf der anderen Seite konnte durch eine retrospektive Studie eindrücklich gezeigt werden, dass eine inverse Korrelation zwischen dem Hämatokrit und der Überlebenszeit niereninsuffizienter Patienten besteht (Ma et al. 1999). Die wahrscheinlichste Erklärung für die Verbindung zwischen dem Ausmaß der Anämie und der Prognose für den Patienten ist, dass es durch die Anämie zur linksventrikulären Hypertrophie kommt, u. zw. sowohl im Dialyse- (Foley et al. 1996) wie auch im Prädialysestadium (Levin et al. 1999). Zur Vermeidung dieser Komplikationen scheint es angebracht, die rhuEpo-Therapie deutlich früher als heute üblich zu beginnen. Dabei sollte der Hämatokrit auf einen Wert von 0,33 bis 0,36 eingestellt werden (Hämoglobin-Konzentration im Blut 11 bis 12 g/dl; European Best Practice Guidelines 1999).

Anämien nicht-renaler Genese sind bereits in das Indikationsspektrum von rhuEpo aufgenommen worden (tumorassoziierte Anämien, Frühgeborenen-Anämie, „Anämien“ durch größere operative Eingriffe). Ein Patientenkollektiv, das diesbezüglich noch weitgehend unberücksichtigt geblieben ist, ist das der Diabetiker. Bereits vor Eintritt der Dialysepflichtigkeit entwickeln diese Patienten häufig Gefäßschäden und linksventrikuläre Dysfunktionen (Chantrel et al. 1999). Obleich bisher keine systematischen Analysen vorliegen, scheint die Anämie dieser Patienten eine wichtige Komponente bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie zu sein (Dikow et al. 2002). Wenn es auch bislang durch klinische Studien nicht hinreichend belegt ist, so ist es doch vorstellbar, dass die frühzeitige Behandlung der Anämie zu einer Verminderung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität diabetischer Patienten beitragen kann. Ein Abfall der Hämoglobin-Konzentration auf unter 11 g/dl sollte in jedem Fall vermieden werden.

Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz leiden gelegentlich an einer Anämie. Es konnte gezeigt werden, dass rhuEpo die Symptome der Herzinsuffizienz verbessert und eine Progression der Erkrankung abschwächt (Silverberg et al. 2000). Es gibt allerdings auch gegenteilige Befunde (Besarab et al. 1998), so dass weitere Studien hierzu erforderlich sind.

Rund 90 % aller Patienten, die mehr als 3 Tage intensiv-medizinisch betreut werden müssen, haben eine Hämoglobin-Konzentration im Blut unterhalb der Norm. Iatrogene und gastrointestinale Blutverluste

verursachen einen erheblichen Transfusionsbedarf. Außerdem haben Intensivpatienten im Verhältnis zu ihrer jeweiligen Hämoglobin-Konzentration einen zu niedrigen Erythropoietinspiegel (Ahsen et al. 1999), verursacht vermutlich durch den inhibitorischen Effekt inflammatorischer Zytokine (Jelkmann et al. 1991). Durch Gaben hoher Dosen von rhuEpo kann dieser inflammatorische „Erythropoiese-Block“ überwunden und der Transfusionsbedarf um rund 50 % gesenkt werden (Corwin et al. 1999).

Erythropoietin und sein Rezeptor werden auch im Gehirn produziert (Marti et al. 1996). Das Erythropoietin aus dem Gehirn erscheint jedoch nicht systemisch, da es die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann. Ebenso wie in der Niere ist auch die zerebrale Erythropoietin-Expression bei Hypoxie gesteigert, was zur verbesserten Protektion neuronaler Zellen vor Hypoxieschäden führt (Morishita et al. 1997). Erste Tierversuche deuten darauf hin, dass intradural verabreichtes rhuEpo hypoxieinduzierte Gehirnschäden vermindert (Marti et al. 2000). Allerdings ist die Verabreichung von rhuEpo direkt in die Ventrikel des Gehirns kein klinisch nutzbarer Applikationsweg. Durch weitere Studien muss also eine Möglichkeit erarbeitet werden, dass zirkulierendes Erythropoietin in das Gehirn aufgenommen werden kann. RhuEpo könnte so vom reinen Anti-anämikum zum Notfall-Medikament avancieren, das auch bei Patienten mit einem Schlaganfall oder traumatischen Hirnschäden angewendet werden kann (nähere Informationen hierzu im Artikel von Bachmann in dieser Ausgabe).

Es steht zu erwarten, dass der Bedarf an rhuEpo in naher Zukunft erheblich steigen wird, zumal die benötigten Dosen bei einigen der erwähnten potentiellen Indikationen deutlich höher sind als bei der Behandlung der renalen Anämie. Die Zukunft von rhuEpo wird demnach auch stark von seinem Preis abhängen. Dieser wird sicherlich fallen, wenn in absehbarer Zeit einzelne Patente auslaufen werden. Daneben gibt es aber auch Bemühungen, kostengünstigere Erythropoietin-Generika oder Applikationsmethoden für Erythropoietin zu entwickeln.

Die zur Zeit auf dem Markt befindlichen Erythropoietin-Präparate werden produziert, indem das humane Erythropoietin in eine Nagetier-Zelllinie eingeführt wird (Chinese Hamster Ovary Cells [CHO-Cells]; nähere Informationen hierzu im Artikel von Jelkmann in dieser Ausgabe). Derzeit gibt es Bemühungen, Erythropoietin durch den Prozess der Genaktivierung zu produzieren („Gene Activation“, gaEpo). Dabei soll das endogene - eigentlich „stumm“ geschaltete - Erythropoietin menschlicher Zellen aktiviert werden (Tsuchiya et al. 2002). Noch scheitert dieses Verfahren in erster Linie an patentrechtlichen Unklarheiten.

Ein weiterer Ansatz, rhuEpo zu ersetzen, ist die Entwicklung der sogenannten „Epo-Mimetika“. Hierbei handelt es sich um kleine Proteine mit weniger als 20 Aminosäuren ohne jegliche Sequenzhomologie zum nativen Erythropoietin. Sie binden aber ebenfalls an den Erythropoietin-Rezeptor und aktivieren ihn (Livnah et al. 1996). Inzwischen wurden nicht-peptidische Epo-Mimetika entwickelt (Qureshi et al. 1999), die vielleicht sogar bei oraler Applikation erythropoietisch aktiv sind.

Schließlich wird derzeit – parallel zur überaus wichtigen Diskussion zu deren ethischer Problematik – die prinzipielle Machbarkeit einer Erythropoietin-Gentherapie untersucht (Hamamori et al. 1995; Svensson et al. 1997).

## Literatur

- Adamson JW, Eschbach JW (1990) Treatment of the anemia of chronic renal failure with recombinant human erythropoietin. *Annu Rev Med* 41: 349-360
- Ahsen N von, Müller C, Serke S, Frei U, Eckardt KU (1999) Important role of nondiagnostic blood loss and blunted erythropoietic response in the anemia of medical intensive care patients. *Crit Care Med* 27: 2630-2639
- Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, Schwab SJ, Goddard DA (1998) The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N Engl J Med* 339: 584-590
- Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian JJ, Martin-Dupont P, Michaud P, Papo T, Ugo V, Teyssandier I, Varet B, Mayeux P (2002) Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 346: 469-475
- Chandra M, Miller ME, Garcia JF, Mossey RT, McVicar MI (1985) Serum immunoreactive erythropoietin levels in patients with polycystic kidney disease as compared with other hemodialysis patients. *Nephron* 39: 26-29
- Chandra M, Clemons GK, McVicar MI (1988) Relation of serum erythropoietin levels to renal excretory function: Evidence for lowered set point for erythropoietin production in chronic renal failure. *J Pediatr* 113: 1015-1021
- Chantrel F, Enache I, Bouiller M, Kolb I, Kunz K, Petitjean P, Moulin B, Hannedouche T (1999) Abysmal prognosis of patients with type 2 diabetes entering dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 14: 129-136
- Corwin HL, Gettinger A, Rodriguez RM, Pearl RG, Gubler KD, Enny C, Colton T, Corwin MJ (1999) Efficacy of recombinant human erythropoietin in the critically ill patient: A randomized double blind placebo-controlled trial. *Crit Care Med* 27: 2346-2350
- Dikow R, Schwenger V, Schomig M, Ritz E (2002) How should we manage anaemia in patients with diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 17 (Suppl 1): 67-72
- European Best Practice Guidelines for the Management of Anaemia in Patients with Chronic Renal Failure (1999). *Nephrol Dial Transplant* 14 (Suppl 5): 1-50
- Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW (1987) Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *N Engl J Med* 316: 73-78
- Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE (1996) The impact of anemia on cardiomyopathy, morbidity, and mortality in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 28: 53-61
- Hamamori Y, Samal B, Tian J, Kedes L (1995) Myoblast transfer of human erythropoietin gene in a mouse model of renal failure. *J Clin Invest* 95: 1808-1813
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, Kawakita M, Skimuzu T, Miyake T (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313: 806-810
- Jelkmann W, Pagel H, Wolff M, Fandrey J (1991) Monokines inhibiting erythropoietin production in human hepatoma cultures and in isolated perfused rat kidneys. *Life Sci* 50: 301-308
- Levin A, Thompson CR, Ethier J, Carlisle EJ, Tobe S, Mendelssohn D, Burgess E, Jindal K, Barrett B, Singer J, Djurdjev O (1999) Left ventricular mass index increase in early renal disease: Impact of decline in hemoglobin. *Am J Kidney Dis* 34: 125-134
- Lim VS, Fangman J, Flanagan MJ, DeGowin RL, Abels RT (1990) Effect of recombinant human erythropoietin on renal function in humans. *Kidney Int* 37: 131-136
- Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, Badrawi SM, Lai PH, Goldwasser E (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7580-7584
- Livnah O, Stura EA, Johnson DL, Middleton SA, Mulcahy LS, Wrighton NC, Dower WJ, Jolliffe LK, Wilson IA (1996) Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: The EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science* 273: 464-471
- Ma JZ, Ebben J, Xia H, Collins AJ (1999) Hematocrit level and associated mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 10: 610-619
- Macdougall IC, Gray SJ, Elston O, Breen C, Jenkins B, Browne J, Egrie J (1999) Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 10: 2392-2395
- Maier-Lenz H (2002) Erythropoietin - Kommentar zur Erfassung, Bewertung und Berichterstattung unerwünschter Wirkungen von Arzneimitteln. *Onkologie* 9: 994-ff.
- Marti HH, Wenger RH, Rivas LH, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M (1996) Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 8: 666-676
- Marti HH, Bernaudin M, Petit E, Bauer C (2000) Neuroprotection and angiogenesis: Dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiol Sci* 15: 225-229
- Miyake T, Kung CK, Goldwasser E (1977) Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252: 5558-5564
- Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R (1997) Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 76: 105-116
- Pagel H, Jelkmann W, Weiss C (1989) Erythropoietin and blood pressure. *Horm Met Res* 21: 224

28. Qureshi SA, Kim RM, Konteatis Z, Biazzo DE, Motamedi H, Rodrigues R, Boice JA, Calaycay JR, Bednarek MA, Griffin P, Gao YD, Chapman K, Mark DF (1999) Mimicry of erythropoietin by a nonpeptide molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12156-12161
29. Silverberg DS, Wexler D, Blum M, Keren G, Sheps D, Leibovitch E, Brosh D, Laniado S, Schwartz D, Yachnin T, Shapira I, Gavish D, Baruch R, Koifman B, Kaplan C, Steinbruch S, Iaina A (2000) The use of subcutaneous erythropoietin and intravenous iron for the treatment of the anemia of severe, resistant congestive heart failure improves cardiac and renal function and functional cardiac class, and markedly reduces hospitalizations. *J Am Coll Cardiol* 35: 1737-1744
30. Sunder-Plassmann G, Hörl WH (2001) The clinical potential of novel erythropoiesis stimulating protein. *Expert Opin Biol Ther* 1: 733-739
31. Svensson EC, Black HB, Dugger DL, Tripathy SK, Goldwasser E, Hao Z, Chu L, Leiden JM (1997) Long-term erythropoietin expression in rodents and non-human primates following intramuscular injection of a replication-defective adenoviral vector. *Hum Gene Therapy* 8: 1797-1806
32. Tsuchiya T, Kominato Y, Ueda M (2002) Human hypoxic signal transduction through a signature motif in hepatocyte nuclear factor 4. *J Biochem* 132: 37-44
33. Valderrabano F, Hörl WH, Jacobs C, Macdougall IC, Parrondo I, Cremers S, Abraham IL (2000) Evaluating anaemia and initiating treatment. *Nephrol Dial Transplant* 15 (Suppl 4): 8-14
34. Wiczorek L, Hirth P, Schöpe KB, Scigalla P, Krüger D (1989) Molekulare Biologie von Erythropoietin. In: Gurland HJ, Koch KM, Schoeppe W, Scigalla P (Hrsg) *Innovative Aspekte der klinischen Medizin*, Bd 1. Springer, Berlin, pp 55-70
35. Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR, Cotes PM (1986) Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* II: 1175-1178

VERÖFFENTLICHUNGEN  
ZUR GESCHICHTE DER HANSESTADT LÜBECK  
HERAUSGEGEBEN VOM ARCHIV DER HANSESTADT  
REIHE B BAND 30

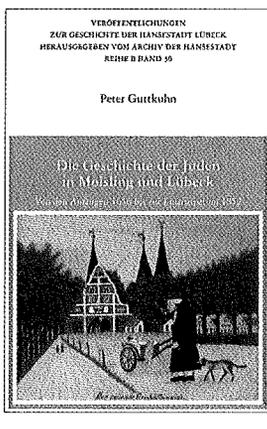
## Die Geschichte der Juden in Moisling und Lübeck

Von den Anfängen 1656 bis zur Emanzipation 1852

von Peter Guttkuhn

22 Abb. auf 272 Seiten, Festeinband im Format A5

ISBN 3-7950-0468-3 · € 15,-



Für Ihre Bestellung wenden Sie sich bitte an

Verlag Schmidt-Römhild · Mengstr. 16 · 23552 Lübeck

Tel.: (04 51) 70 31 - 2 13 · Fax: (04 51) 70 31 - 2 81

Internet: [www.schmidt-roemhild.de](http://www.schmidt-roemhild.de) · E-mail: [msr-vertrieb@t-online.de](mailto:msr-vertrieb@t-online.de)

oder an den örtlichen Buchhandel

**SCHMIDT  
RÖMHILD**

# Erythropoietin und Gehirn

T. Bachmann<sup>1</sup>, W. Jelkmann<sup>2</sup> und G. Seidel<sup>1</sup>

## Zusammenfassung

Erythropoietin (Epo) ist außer im Nierengewebe auch in Leber, Lunge und vor allem im Gehirn nachweisbar. Tierversuche haben gezeigt, dass cerebrale Hypoxie die Epo mRNA Expression in neuronalen Zellen und Astrozyten steigert. Epo-Rezeptoren sind sowohl auf Neuronen als auch endothelialen Zellen und Astrozyten nachweisbar. *In vitro* verhindert die Präkonditionierung mit Epo dosisabhängig den Glutamat- und NMDA-induzierten Zelltod. Ebenso schützt Epo *in vitro* vor einer Hypoxie-induzierten Apoptose und dem Zelltod durch NO. Epo reduziert im Tierversuch das Infarktolumen bei fokalen Ischämien, verhindert corticale Ischämien und Ischämie-induzierte Lernschwächen und fördert den Erhalt von Neuronen und Synapsen. Ob die neuroprotektiven Effekte von Epo ausschließlich über einen direkten anti-apoptotischen oder auch einen indirekten angiogenen Effekt vermittelt werden, ist unklar. Therapeutisch könnte Epo möglicherweise bei cerebralen Ischämien, Schädel-Hirntraumata und entzündlichen oder neurodegenerativen ZNS-Erkrankungen eingesetzt werden. Eine erste klinische Studie zur neuroprotektiven Wirksamkeit bei Hirninfarkten wird andernorts bereits durchgeführt.

## Abstract

Erythropoietin (Epo) is not only produced in the kidneys but also in liver, lung and brain. Cerebral hypoxia stimulates Epo mRNA expression in astrocytes and neuronal cells. Epo-receptors have been demonstrated on neurons, endothelial cells and astrocytes. *In vitro* Epo protects against glutamate- and NMDA-induced cell death in a dose-dependent way, but preconditioning of the cells with the growth factor appears to be necessary. Epo protects also against hypoxia-induced apoptosis and NO-induced cell death. In animal models it reduces volumes of brain ischemia, protects the cortex from hypoxic damage and leads to survival of neurons and synapses. Epo is also effective in trauma and inflammatory diseases of the brain. In addition to its neuroprotectivity Epo exhibits neurotrophic and angiogenic activity. Whether Epo acts exclusively by inhibiting apoptosis or by stimulating angiogenesis is unclear. It is hoped that in the near future Epo can be used clinically in cerebral ischemia, brain trauma, inflamm-

tory diseases and neurodegenerative diseases. A clinical study of neuroprotective effectiveness of Epo in cerebral ischemia has been initiated recently.

## Einleitung

Erythropoietin (Epo), ein 30 kDa großes Glykoprotein, ist das wesentliche Hormon der O<sub>2</sub>-geregelten Homöostase der Erythropoese. Epo wirkt über Bindung an einen spezifischen transmembranären Rezeptor. Zusätzlich zu seiner Funktion als Wachstumsfaktor kann Epo den apoptotischen Zelltod unreifer Proerythroblasten aufhalten und somit deren Differenzierung zu Erythrozyten fördern (22, 46, 47).

Beim Erwachsenen wird Epo hauptsächlich in den Nieren und in der Leber produziert (25). Bereits 1992 konnten Tan et al. jedoch zeigen, dass Epo mRNA bei der Ratte auch in anderen Organen nachweisbar ist (53), so in Lunge, Milz, Hoden und im Gehirn. Nach Stimulation der Tiere durch eine anämische oder arterielle Hypoxie war im Gehirn eine signifikante Vermehrung von Epo mRNA nachweisbar. Diesen Beobachtungen folgte die Entdeckung des sog. „hypoxia-inducible transcription factor“ (HIF-1), der – in allen bisher untersuchten Körperzellen vorkommend – ein Korrelat des „biologischen“ „Oxygen Sensing“ darstellt. HIF-1 kontrolliert die O<sub>2</sub>-abhängige Expression einer Vielzahl von Genen, einschließlich derer für Epo und den „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) (55). Hypoxische Hirnzellen akkumulieren HIF-1 (3, 29). Interessanterweise persistiert die gesteigerte Epo Genexpression im Gehirn bei langdauernder hypoxischer Reizung, während sie in der Niere bereits nach 4 h wieder abnimmt (14). Weiterhin war der Befund, dass Epo im Gehirn gebildet wird, die Frage auf, ob und - wenn ja - welche physiologische Funktion der erythropoietische Wachstumsfaktor im Gehirn spielt. Da das Hormon aufgrund seiner Größe und Struktur die Blut-Hirn-Schranke normalerweise nicht überwinden kann, tritt systemisch gebildetes Epo nicht ins Gehirn über und umgekehrt (27, 33). Insofern liegt die Hypothese nahe, dass das im Gehirn gebildete Epo eine spezifische lokale Funktion wahrnimmt. In diesem Übersichtsartikel wird der augenblickliche Stand der Forschung hinsichtlich „Epo und Gehirn“ und seiner Rolle im zentralen Nervensystem (ZNS) dargestellt.

## Bildungs- und Wirkort

Epo mRNA konnte bei mehreren Tierspezies im Gehirn nachgewiesen werden, so neben der Maus und Rhesusaffen auch beim Menschen in Cortex, Hippocampus und anderen Hirnregionen (17, 35). Versuche mit Mäusen und Affen haben gezeigt, dass nach Reizung der Tiere durch inspiratorische Hypoxie (8 % O<sub>2</sub>) oder Kohlenmonoxidexposition die Epo mRNA Konzentration im Gehirn je nach Reizstärke bis 20-fach gegenüber dem Ausgangswert ansteigt (35). Als Hauptbildungsort von cerebralem Epo sind hauptsächlich Astrozyten und in geringerem Ausmaß neuronale Zellen identifiziert worden (4, 24, 35, 39). In Zellkulturen zeigen Astrozyten unter Hypoxiebedingungen 100-fach erhöhte Epo mRNA Konzentrationen und sezernieren vermehrt Epo (35). Neuroblastomzelllinien zeigen dagegen nur eine Verdopplung der Epo mRNA Konzentration unter Hypoxie (26). Nicht nur direkt im Hirngewebe, sondern auch im Liquor cerebrospinalis des Menschen kann Epo nachgewiesen werden (34). Beim Vergleich des elektrophoretischen Verhalten im SDS-Polyacrylamid-Gradientengel erscheint das cerebrale Epo kleiner (scheinbare molekulare Masse 33 kDa) als das systemische Epo (35 kDa). Dies ist möglicherweise durch den geringeren Sialinsäuregehalt der cerebralen Form bedingt (39). Menschliche Mikroglia und Oligodendrocyten exprimieren in der Zellkultur kein Epo (42).

Der Epo Rezeptor und seine mRNA sind beim Säuger v. a. im Hippocampus, der Capsula interna, Cortex und Mittelhirn nachweisbar (19). Untersuchungen an Epo-Rezeptor defizienten Mäusen haben gezeigt, dass die Epo-Wirkung für die fetale Hirnentwicklung essentiell ist (58). Zellkulturstudien deuten an, dass die Epo-Rezeptor-Moleküle exprimierenden Zellen im Gehirn überwiegend Neuronen sind (26, 38). Unter hypoxischen Bedingungen nimmt die neuronale Epo-Rezeptor mRNA-Expression zu (15). Daneben besitzen auch endotheliale Zellen und Astrozyten den Epo-Rezeptor (26, 38). Daher ist es wahrscheinlich, dass Epo mehrere Funktionen im ZNS ausübt, nämlich sowohl auf neuronaler als auch auf glialer und endothelialer Ebene.

## Die Rolle von Epo im Gehirn

### *Effekte von Epo in vivo*

Es ist zu vermuten, dass Epo beim Menschen bei unterschiedlichen Gehirnerkrankungen eine funktionelle Rolle spielt. Die Bindung von Epo an seinen neuronalen Rezeptor verursacht an der Zielzelle einen Calciumeinstrom und erhöht den intrazellulären Anteil von Monoaminen (38). Epo vermehrt in embryonalen Neuronen der Maus die Acetylcholintransferaseaktivi-

tät, und es unterstützt das Überleben cholinergischer Neuronen der erwachsenen Ratte (30). Im Tierversuch mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich während cerebraler Ischämien das zelluläre Expressionsmuster von Epo und seines Rezeptors in Neuronen, Endothel- und Gliazellen in Abhängigkeit von der Dauer der cerebralen Ischämie ändert (5). Unter anderem findet in der ischämischen Penumbra eine Hochregulierung des Epo-Rezeptors statt (5, 44). Untersuchungen an transgenen Mäusen, die vermehrt Epo im Gehirn produzieren, haben jedoch ergeben, dass die Tiere nach einem Verschluss der A. cerebri media Hirninfarkte von gleicher Größe entwickelten wie nicht Epo-transgene Kontrolltiere (56).

Im murinen Tiermodell konnte für exogen zugeführtes Epo bei fokalen cerebralen Ischämien eine interessante Wirkung belegt werden: 24 Stunden vor Okklusion der A. cerebri media mittels Elektrokoagulation wurden die Tiere mit intracerebroventrikulärer Injektion von 0,4 µg/kg rekombinantem menschlichen Epo behandelt (rh-Epo; 1 µg = 33 pmol = 130 E). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war das Infarktvolume in der mit Epo behandelten Gruppe um 47 % reduziert (5). Wenn Epo zum Zeitpunkt der Okklusion verabreicht wurde, blieb es ohne Effekt, was für einen präkonditionierenden Mechanismus spricht (5, 33). In Mongolischen Rennmäusen verhinderte die Injektion von Epo direkt in den lateralen Hirnventrikel neuronale Schäden jedoch auch, wenn das Medikament erst nach der Ischämiephase (3-minütige Okklusion beider Aa. carotidae) appliziert wurde (11). Untersuchungen an Kaninchen haben gezeigt, dass die systemische Epo-Gabe (1000 E/kg i.p.) nach Subarachnoidalblutung den Ischämieschaden begrenzt (1) und die Überlebenschance der Tiere erhöht (8). Sirén und Mitarbeiter fanden bei intraperitonealer Epo - Gabe (5000 E/kg Körpergewicht) in Ratten sogar eine 75%ige Reduktion des Hirninfarktvolume (50). Im gleichen Versuchstier konnten mittels 28-tägiger kontinuierlicher intraventriculärer Infusion von Epo eine Ischämie-induzierte Lernschwäche und corticale Infarkte verhindert und das Überleben von Thalamusneuronen gefördert werden (44). Nach einer globalen cerebralen Hypoxie durch bilaterales Abklemmen beider Aa. carotides internae verhindert die intraventriculäre Epo-Gabe den Zelltod hippocampaler Neurone und erhöht die Anzahl intakter Synapsen in dieser Region (45). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte im Tierversuch zeigen, dass das endogene cerebrale Epo essentiell für das Überleben cerebraler Neurone ist: Während mäßiger Ischämien, die an sich nicht zum Zelltod führen, führte die Infusion löslichen Epo-Rezeptors, der das endogene Epo bindet und neutralisiert, zum Absterben der neuronalen Zellen (45).

In jüngster Zeit wurde berichtet, dass systemisch (intraperitoneal) appliziertes Epo im Tiermodell auch beim Hirntrauma und der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) als Äquivalent der multiplen Sklerose wirksam ist (6). Die Kontusionen der mit Epo behandelten Tiere waren signifikant schwächer als die unbehandelten Tiere, und sowohl eine 24-stündige Vorbehandlung als auch eine 3-6 Stunden nach Hirntrauma begonnene Behandlung erzielten gleiche Effekte (6). Eine 3 Tage nach EAE Induktion begonnene und über die folgenden 5 Tage fortgesetzte Therapie mit rh-Epo (5000 E/kg) verzögerte den Beginn der Erkrankung und verminderte die Schwere der Symptomatik (6). Im Tierversuch konnte außerdem gezeigt werden, dass Epo, abgesehen von seinen neuroprotektiven Effekten, auch die Angiogenese stimuliert (43).

Seit Jahren ist bekannt, dass einzelne große Proteine selektiv in das ZNS transportiert werden, nachdem sie an das Kapillarendothel gebunden worden sind (7). Mittlerweile konnte experimentell gezeigt werden, dass systemisch appliziertes Epo die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, wenn extrem hohe Dosen eingesetzt werden (6).

#### *Effekte von Epo in vitro*

Hirnschädigungen durch Hypoxämie oder Ischämien führen zu einer übermäßigen lokalen Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren wie z. B. Glutamat. Neuronale Schäden bei derartigen Störungen werden über die sog. Glutamat-Neurotoxizität erklärt (16). Eine anhaltende Überschreitung der Glutamatkonzentration im Extrazellulärraum (um ca. einen Faktor 500 im Vergleich zum Normalwert) führt zum Zelluntergang. Die Glutamat-Neurotoxizität wird über Bindung von Glutamat u. a. an den NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor vermittelt (40). Dabei kommt es zu einem vermehrten Einstrom von Calcium- und Natriumionen. Störung der mitochondrialen Funktion, Produktion von freien Radikalen und Zellschwellung führen dann zum Zelltod. *In vitro* ließ sich dieser Glutamat-induzierte Zelltod bei hippocampalen und corticalen Neuronen verhindern, indem die entsprechenden Zellen mit Epo vorbehandelt wurden (41). Dieser protektive Effekt war dosisabhängig und maximal, wenn die Epo Konzentration zwischen 30 und 300 pM lag. Gleichzeitig führte der Zusatz von löslichem Epo-Rezeptor (und somit Neutralisation des Wachstumsfaktors) zu einer kompletten Aufhebung der Epo-Wirkung, und die Zellen starben ab (41). Der neuroprotektive Effekt wurde nur beobachtet, wenn die Zellen mindestens 8 Stunden vor der Glutamat Zugabe mit Epo behandelt wurden, was für einen präkonditionierenden Mechanismus spricht. Allerdings reichte auch schon eine 5-minütige Inkubation mit 30 pM Epo 24 Stunden vor Glutamat Gabe aus, den gleichen Effekt zu erreichen wie eine

kontinuierliche Inkubation der Neurone mit der gleichen Dosis Epo über 24 Stunden (41).

Bislang ist unklar, ob Epo seinen neuroprotektiven Effekt über eine Hemmung der Glutamat Freisetzung, eine vermehrte Glutamat Wiederaufnahme oder eine Desensitivierung des Glutamat Rezeptors erzielt (28). Bernaudin und Mitarbeiter haben gezeigt, dass eine 24-stündige Vorbehandlung corticaler Neurone der Maus mit 300 pM Epo einen Zellschaden durch Zugabe von NMDA verhindert (5). Wenn Epo und NMDA gleichzeitig gegeben werden, bleibt der neuroprotektive Effekt aus (5). Auch dies deutet auf einen präkonditionierenden Mechanismus. Exogenes Epo (100 pM) verhindert das Absterben hypoxischer hippocampaler Zellen in Primärkulturen aus dem Rattenhirn (31). Ebenso können *in vitro* hohe Dosen Epo (3 nM) Neuroblastomzellen vor einer Hypoxie-induzierten Apoptose schützen (26). Außerdem schützt Epo neuronale Zellkulturen vor einem NO-induzierten Zelltod (45). Diese Resultate deuten darauf hin, dass Epo seinen neuroprotektiven Effekt über eine Reduktion der NO-vermittelten Bildung von freien Radikalen entfaltet oder deren Toxizität mindert (9). Sirén und Mitarbeiter konnten kürzlich zeigen, dass Epo neben einer Hemmung der Apoptose in Neuronenkulturen nicht nur neuroprotektive, sondern auch neurotrophe Einflüsse auf spinale Motoneurone von Ratten hat (50). Bereits früher ist eine neurotrophe Peptidsequenz im Epo-Molekül identifiziert worden (10). Epo wirkt selektiv auf neuronale Zellen und verhindert nicht Hypoxieschäden an multiplierten Astrozyten (48).

#### **Steuerung der cerebralen Epo Produktion**

Neben der hypoxischen Induktion der Epo Produktion im Gehirn ist an Astrozytenkulturen eine dosisabhängige Stimulierung der Epo Produktion durch Insulin und Insulin-like growth factors (IGF) demonstriert worden (36). Dieser Effekt war nicht von der Sauerstoffkonzentration der Zellkultur beeinflusst. Die Insulin/IGF-induzierte Konzentrationserhöhung von Epo mRNA in Astrozyten wird wahrscheinlich über eine Aktivierung bestimmter Tyrosinkinase vermittelt. Der stimulierende Effekt von Insulin und IGF ist offenbar spezifisch für die Epo Produktion im Gehirn, da die genannten Faktoren in anderen Zelllinien oder Gewebekulturen die Epo Synthese nicht beeinflussen (36, 37, 52).

#### **Mechanismen der neuroprotektiven Wirkung von Epo**

Die Arbeitsgruppe um Marti (33) postuliert zwei Mechanismen, über die Epo seinen neuroprotektiven Effekt entwickeln könnte: einen direkten mit Hemmung der hypoxie- bzw. ischämieabhängigen Apoptose sowie einen indirekten Mechanismus, der über das proangiogene Potential von Epo wirksam wird.

Neben der bereits erwähnten Wirkung auf Glutamat bzw. seinen Rezeptor könnte Epo in Analogie zum anti-apoptischen Effekt auf erythrozytäre Vorläufer im Knochenmark (47) die neuronale Apoptose über eine Aufrechterhaltung der Expression von Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> aufhalten (54). Digicaylioglu und Lipton zeigten kürzlich, dass die Epo-assoziierte neuroprotektive Wirkung wahrscheinlich über Jak2 und NF-κB Signalkaskaden vermittelt wird (20). Daneben kann eine Inaktivierung oder Antagonisierung von Caspasen nicht ausgeschlossen werden (32). Außerdem erhöht Epo das zytosolische Calcium in Neuronen (2, 51).

Epo könnte auch über eine Hochregulierung von Enzymen, die Sauerstoffradikale spalten (59), oder über eine Inhibierung von Enzymen, die ATP verbrauchen, so z. B. Polyadenosin-Ribose-Polymerase (PARP) (33), neuroprotektiv wirken (32). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Mäuse, die homozygot defizient für das PARP Gen sind, besonders gut vor hypoxischen und ischämischen cerebralen Ereignissen geschützt sind (32).

Die indirekte Neuroprotektion durch Hypoxie/Ischämie-induziertes Epo könnte über eine Stimulierung der Angiogenese im Gehirn vermittelt werden. Da endotheliale Zellen und hämatopoietische Zellen wahrscheinlich vom gleichen entwicklungsgeschichtlichen mesenchymalen Vorläufer (Hämangioblasten) abstammen, ist es plausibel, dass endotheliale Zellen Träger des Epo-Rezeptors sind und durch Epo stimuliert werden können (33). Ähnliche molekulare Mechanismen wie bei der Erythropoese könnten auch bei der endothelialen Neoangiogenese eine Rolle spielen. Tatsächlich hemmt Epo auch die Apoptose endothelialer Zellen (33). Eine Hypothese dazu besagt, dass Epo über eine Aktivierung des VEGF (vascular endothelial growth factor)/VEGF-Rezeptor Systems wirkt. VEGF ist der wichtigste Regulator endothelialen Zellwachstums und der embryonalen Vaskulogenese, aber auch der pathologischen Angiogenese bei Tumorwachstum oder Ischämien (21). Außerdem unterstützt VEGF das Überleben endothelialer Zellen (21). VEGF wird im gesunden Gehirn gebildet. Durch Hirnischämien wird es verstärkt induziert. VEGF kann im Stadium der Post-Ischämie nach topischer Aufbringung auf die Hirnoberfläche des reperfundierten Gehirns den Ischämie-Schaden reduzieren (23).

### Ausblick

Trotz der dargestellten regulativen Prozesse reicht bei vielen Individuen das Ausmaß der physiologischen Epo Produktion im Gehirn nicht aus, suffizient einem akuten hypoxischen oder ischämischen Ereignis wie beim Schlaganfall, Schädel-Hirn-Trauma oder epileptischen Anfall entgegenzuwirken. Die genannten experimentellen Arbeiten zeigen, dass das cerebrale Epo

- Hirninfarkt, Hirnblutung
- Schädel-Hirn-Trauma
- Epilepsie
- Neurodegenerative Erkrankungen (M. Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose, M. Alzheimer, andere Demenzen)
- Entzündliche ZNS - Erkrankungen (Encephalomyelitis disseminata, AIDS-assoziierte Encephalomyelitis modifiziert nach (12)

*Tabelle 1. Innovative neuroprotektive Anwendungsmöglichkeiten für rh-Epo*

durch Hypoxie und Ischämie hochreguliert wird und die Expression von Epo und seines Rezeptors durch Ischämien moduliert werden kann. Bei der Betrachtung der Zellkulturbefunde ist zu beachten, dass in der Regel sehr hohe Epo-Konzentrationen eingesetzt wurden (30 pM → 3 nM), die deutlich über der normalen Konzentration im menschlichen Plasma (ca. 3 pM) lagen. Epo ist tierexperimentell in der Lage, das Infarktvolumen zu verkleinern, ob durch direkten neuroprotektiven Effekt oder indirekte Effekte wie Angiogenese oder beides muss offen bleiben. Die bisherigen Daten deuten an, dass das cerebrale Epo eine physiologischen Schutzmechanismus des Säugetiergehirns darstellt. Die Übertragbarkeit der experimentellen Arbeiten in die klinische Praxis ist noch schwierig, obwohl Epo auch therapeutisch vielversprechende Ansätze birgt (13, 51). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die möglichen neuen Anwendungsmöglichkeiten des Präparates beim Menschen.

Kürzlich wurde eine neuroprotektive klinische Studie mit rh-Epo bei Schlaganfallpatienten begonnen (The Göttingen EPO-Stroke Trial) (49). Die initiale Sicherheitsprüfung ergab, dass intravenös appliziertes rh-Epo bei akuten Schlaganfallpatienten die Blut-Hirn Schranke überwindet (49). Es bleibt aber die Frage offen, ob und inwieweit auch beim Menschen eine Präkonditionierung vor einem pathologischen Ereignis stattfinden muss, damit der neuroprotektive Effekt eintreten kann. Weiterhin ist völlig unklar, in welchen Dosen und in welchem Zeitfenster rh-Epo systemisch gegeben werden muss und welche Nebenwirkungen zu beachten sind (Polyglobulie). V. a. bleibt zu prüfen, ob die erwartete neuroprotektive Wirkung durch hämodynamische Nachteile (Hyperviskosität) eingeschränkt wird. Eine zukunftsweisende Strategie haben Dame et al. vorgeschlagen (18). Da rh-Epo normalerweise die Blut-Hirnschranke kaum passieren kann, müssen systemisch sehr hohe Dosen appliziert werden. Dame et al. haben daher vorgeschlagen, statt rh-Epo kleine Epo-mimetische Peptide (57) zu verabreichen, die klein

sind (2 kDa), aber den Epo-Rezeptor in gleicher Weise aktivieren wie der natürliche Ligand.

## Literatur

- Alafaci C, Salpietro F, Grasso G, Sfacteria A, Passalacqua M, Morabito A, Tripodo E, Calapai G, Buemi M, Tomasello F (2000) Effect of recombinant human erythropoietin on cerebral ischemia following experimental subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol* 406 : 219-225
- Assandri R, Egger M, Gassmann M, Niggli E, Bauer C, Forster I, Gorlach A (1999) Erythropoietin modulates intracellular calcium in a human neuroblastoma cell line. *J Physiol* 516 : 343-352
- Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, Semenza GL, Ferriero DM, Sharp FR (2000) Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol* 48 : 285-296
- Bernaudo M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, MacKenzie ET, Petit E (2000) Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 30 : 271-278
- Bernaudo M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E (1999) A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19 : 643-651
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A (2000) Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 10526-10531
- Broadwell RD, Balin BJ, Salzman M (1988) Transcytotic pathway for blood-borne protein through the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 632-636
- Buemi M, Grasso G, Corica F, Calapai G, Salpietro FM, Casuscelli T, Sfacteria A, Aloisi C, Alafaci C, Sturiale A, Frisina N, Tomasello F (2000) In vivo evidence that erythropoietin has a neuroprotective effect during subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol* 392 : 31-34
- Calapai G, Marciano MC, Corica F, Allegra A, Parisi A, Frisina N, Caputi AP, Buemi M (2000) Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol* 401 : 349-356
- Campana WM, Misasi R, O'Brien JS (1998) Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin. *Int J Mol Med* 1 : 235-241
- Catania MA, Marciano MC, Parisi A, Struriale A, Buemi M, Grasso G, Squadrito F, Caputi AP, Calapai G (2002) Erythropoietin prevents cognition impairment induced by transient brain ischemia in gerbils. *Eur J Pharmacol* 437 : 147-150
- Cerami A (2001) Beyond erythropoiesis: Novel applications for recombinant human erythropoietin. *Semin Hematol* 38 : 33-39
- Cerami A, Brines, M.L., Ghezzi P, Cerami CJ (2001) Effects of epoetin alfa on the central nervous system. *Semin Oncol* 28 : 66-70
- Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M, Sasaki R (2000) Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279 : E1242-E1248
- Chin K, Yu X, Beleslin-Cokic B, Liu C, Shen K, Mohrenweiser HW, Noguchi CT (2000) Production and processing of erythropoietin receptor transcripts brain. *Mol Brain Res* 81 : 29-42
- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1 : 623-634
- Dame C, Bartmann P, Wolber E-M, Fahnenstich H, Hofmann D, Fandrey J (2000) Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system. *Dev Brain Res* 125 : 69-74
- Dame C, Juul SE, Christensen RD (2001) The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonatol* 79 : 228-235
- Digitaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M (1995) Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 3717-3720
- Digitaylioglu M, Lipton SA (2001) Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 412 : 641-647
- Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18 : 4-25
- Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ (1999) GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* 94 : 87-96
- Hayashi T, Abe K, Itoyama Y (1998) Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 18 : 887-895
- Inoue N, Takeuchi M, Ohashi H, Suzuki T (1995) The production of recombinant human erythropoietin. *Biotechnol Annu Rev* 1 : 297-313
- Jelkmann W (1992) Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 72 : 449-489
- Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD (1998) Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* 43 : 40-49
- Juul SE, Stallings SA, Christensen RD (1999) Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of neonates who sustained CNS injury. *Pediatr Res* 46 : 543-547
- Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M (2001) Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical. *J Biol Chem* 276 : 39469-39475
- Kietzmann T, Knabe W, Schmidt-Kastner R (2001) Hypoxia and hypoxia-inducible factor modulated gene expression in brain: involvement in neuroprotection and cell death. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251 : 170-178
- Konishi Y, Chui DH, Hirose H, Kunishita T, Tabira T (1993) Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Res* 609 : 29-35
- Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Krueck H, Heyer A, Unzicker C, Siren AL, Ehrenreich H (2000) Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuroreport* 11 : 3485-3488
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79 : 1431-1568

33. Marti HH, Bernaudin M, Petit E, Bauer C (2000) Neuroprotection and angiogenesis: Dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiol Sci* 15 : 225-229
34. Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Trentz O, Bauer C (1997) Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int* 51 : 416-418
35. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M (1996) Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 8 : 666-676
36. Masuda S, Chikuma M, Sasaki R (1997) Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. *Brain Res* 746 : 63-70
37. Masuda S, Nagao M, Sasaki R (1999) Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production. *Int J Hematol* 70 : 1-6
38. Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F, Tabira T, Sasaki R (1993) Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 268 : 11208-11216
39. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R (1994) A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 269 : 19488-19493
40. Michaelis EK (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54 : 369-415
41. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R (1997) Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 76 : 105-116
42. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU (2001) Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 60 : 386-392
43. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F (1999) Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 93 : 2627-2636
44. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R (1998) Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 253 : 26-32
45. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R (1998) In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 4635-4640
46. Silva M, Benito A, Sanz C, Prosper F, Ekhterae D, Nunez G, Fernandez-Luna JL (1999) Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem* 274 : 22165-22169
47. Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nunez G, Fernandez-Luna JL (1996) Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 88 : 1576-1582
48. Sinor AD, Greenberg DA (2000) Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity. *Neurosci Lett* 290 : 213-215
49. Siren AL, Ehrenreich H (2001) Erythropoietin – a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251 : 179-184
50. 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 (2001) Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 4044-4049
51. Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H (2001) Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 101 : 271-276
52. Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Bürgel T (2002) Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by insulin and interleukin-1 $\beta$  involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Letters* 512 : 157-162
53. Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ (1992) Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol* 263 : F474-F481
54. Wen TC, Sadamoto Y, Tanaka I, Zhu PX, Nakata K, Ma YJ, Hata R, Sakanaka M (2002) Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J Neurosci Res* 67 : 795-803
55. Wenger RH, Gassmann M (1997) Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* 378 : 609-616
56. Wiessner C, Allegrini PR, Ekatostramis D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M (2001) Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 : 857-864
57. Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, Kashyap AK, Barbone FP, Mulcahy LS, Johnson DL, Barrett RW, Jolliffe LK, Dower WJ (1996) Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* 273 : 458-464
58. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin C-S, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Constantini F, Noguchi CT (2002) Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 129 : 505-516
59. Zaman K, Ryu H, Hall D, O'Donovan K, Lin KI, Miller MP, Marquis JC, Baraban JM, Semenza GL, Ratan RR (1999) Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. *J Neurosci* 19 : 9821-9830

# Hypoxie-induzierte Expression des Erythropoietingens: Der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$ wird in Normoxie abgebaut, in Hypoxie aktiviert

E. Metzzen

## Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 spielt eine zentrale Rolle bei der Anpassung von Zellen an Sauerstoffmangelzustände. Die  $\alpha$ -Untereinheit von HIF-1 wird in Normoxie an Proline564 hydroxyliert und dadurch für den schnellen, proteasomalen Abbau markiert. Bei Sauerstoffmangel unterbleibt diese Veränderung und die Expression von Zielgenen wird induziert. Die Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  erfolgt in humanen Zellen durch 3 Enzyme, die als PHD1, PHD2 und PHD3 bezeichnet werden. Unsere Untersuchungen zeigen, dass jedes einzelne dieser Enzyme die hypoxische Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  unterdrückt. PHD1, PHD2 und PHD3 fungieren daher als Sauerstoffsensoren in vivo.

## Summary

The transcription factor HIF-1 is essential for the cellular adaptation to reduced oxygen availability. The  $\alpha$ -subunit of HIF-1 is hydroxylated on Proline564 in normoxia and thus targeted for almost instantaneous proteasomal degradation. In hypoxia HIF-1 $\alpha$  remains unmodified and subsequently induces target gene expression. In human cells 3 enzymes termed PHD1, PHD2, and PHD3 hydroxylate HIF-1 $\alpha$ . We show that each of these enzymes suppresses the stabilization of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia. Therefore, PHD1, PHD2, and PHD3 function as oxygen sensors in vivo.

Das Hormon Erythropoietin (EPO) dient der Anpassung des Organismus an Sauerstoffmangelzustände. Bei normaler O<sub>2</sub>-Versorgung der Gewebe ist nur wenig EPO im Blut nachweisbar. Tritt jedoch ein O<sub>2</sub>-Mangel auf, z. B. durch Aufenthalt in größerer Höhe, dann kann die EPO-Konzentration im Blut um ein Vielfaches zunehmen, was zur vermehrten Bildung von Erythrozyten führt. Weitere, eher gewebespezifische Anpassungsreaktionen an O<sub>2</sub>-Mangel sind die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) und die vermehrte Transkription der Gene glycolytischer Enzyme. Alle diese Vorgänge werden maßgeblich durch einen Transkriptionsfaktor gesteuert, der als Hypoxie Induzierbarer Faktor 1 (HIF-1) bezeichnet wird (11). HIF-1 bindet an regulatorische Abschnitte hypoxie-induzierbarer Gene, rekrutiert für die Transkription notwendige Co-faktoren und aktiviert dadurch die Transkription der

Zielgene (2). Zur Zeit ist von ca. 50 Genen bekannt, dass sie durch HIF-1 induziert werden können. Dieser Weg der hypoxischen Genregulation ist in allen Geweben vorhanden. Daher ist HIF-1 von zentraler Bedeutung für die Anpassung an O<sub>2</sub>-Mangelzustände (14). Die Struktur des aktiven HIF-1 Komplexes konnte 1995 aufgeklärt werden (13). HIF-1 besteht aus 2 Protein-Untereinheiten, die beide kontinuierlich gebildet

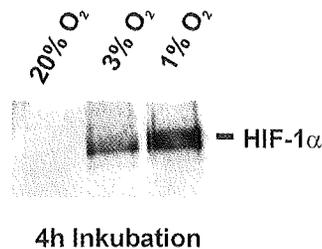


Abb. 1: Anreicherung von HIF-1 $\alpha$  in hypoxischen (3 % bzw. 1 % O<sub>2</sub>) humanen cerebralen Zellen (Linie HCN-1a, HIF-1 $\alpha$  Western Blot).

werden. Die  $\beta$ -Untereinheit, die auch als ARNT bezeichnet wird (Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator), ist ständig im Zellkern vorhanden. Hingegen ist die  $\alpha$ -Untereinheit nur bei O<sub>2</sub>-Mangel nachweisbar (Abb. 1). Dies bedeutet, dass ein aktiver HIF-1 Komplex, der ja aus beiden Untereinheiten bestehen muss, nur in Hypoxie zustandekommt. Daher werden Hypoxie-induzierbare Gene in Normoxie kaum, in Hypoxie jedoch vermehrt exprimiert. Es stellte sich nun die Frage, wie die sauerstoffabhängige Regulation der  $\alpha$ -Untereinheit von HIF-1 bewerkstelligt wird.

Abbildung 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen regulatorischen Domänen des HIF-1 $\alpha$  Moleküls. Während die N-terminale Hälfte des Proteins für die Dimerisierung mit HIF-1 $\beta$  und die DNA-Bindung erforderlich ist, enthält die C-terminale Hälfte zwei Abschnitte, die Zielgene aktivieren (Transaktivierungsdomänen) und eine sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (O-DDD: Oxygen-dependent degradation domain). Wenn man die O-DDD isoliert und mit gentechnischen Methoden in das Gen eines anderen Proteins einbaut, dann wird dieses Protein sauerstofflabil (9). Der Abbau von HIF-1 $\alpha$  erfolgt durch Bindung des Tumorsuppressor-Proteins pVHL (von-Hippel-Lindau-Protein) (8) und anschließende Polyubiquitynierung.

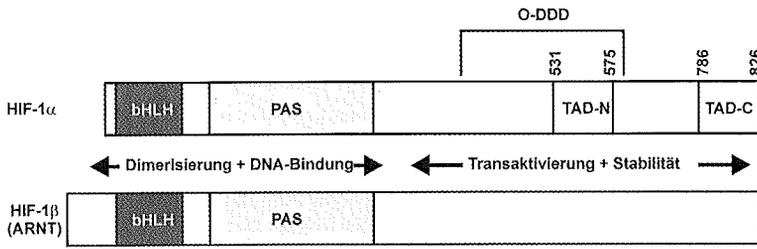


Abb. 2: Aufbau des HIF-1 Heterodimers (bHLH: „Basic helix loop helix“-Domäne, PAS: PER, ARNT, SIM-gleiche Domäne, TAD: Transaktivierungsdomäne, O-DDD: „Oxygen-dependent degradation domain“). Vereinfacht nach: (12)

Das polyubiquitinierte HIF-1 $\alpha$  wird dann innerhalb weniger Minuten in Proteasomen abgebaut (5; 10). Es blieb lange unklar, warum HIF-1 $\alpha$ , das aus normoxischen Zellen gewonnen worden war, pVHL bindet, während HIF-1 $\alpha$  aus hypoxischen Zellen dies nicht tut. Erst mehrere Jahre nach der Identifizierung von HIF-1 konnte von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen (6; 7) geklärt werden, wie der sauerstoffabhängige, initiale Schritt des normoxischen HIF-1 $\alpha$  Abbaus erfolgt. Dazu wurden Zellextrakte mit synthetisch hergestellter O-DDD inkubiert und daraufhin untersucht, unter welchen Bedingungen sie die O-DDD so modifizieren können, dass sie rekombinant hergestelltes VHL bindet. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl normoxische als auch hypoxische Zellen diese Fähigkeit besitzen, dass Abkühlung auf 4° C die Aktivität deutlich hemmt und dass Erhitzen auf 60° C die Aktivität zerstört. Zusammen sprachen diese Befunde dafür, dass die Extrakte ein Enzym oder mehrere Enzyme enthielten, die HIF-1 $\alpha$  oxidativ modifizieren können. Weiterhin wurden O-DDD-Versionen synthetisiert, die verschiedene oxidative Veränderungen enthielten. Nur eine einzige Veränderung führte dazu, dass die synthetische O-DDD unabhängig von einer Behandlung mit Zellextrakt VHL band: die Hydroxylierung eines Prolyrestes, der im nativen HIF-1 $\alpha$  in Position 564 steht. Wurde dieser Prolyrest durch Alanin ersetzt, dann konnte die O-DDD unter keinen Umständen pVHL binden. Massenspektrometrisch konnte zudem gezeigt werden, dass synthetische O-DDD nach Behandlung mit Zellextrakt eine um 16D vergrößerte Masse besitzt, d. h. ein Sauerstoffatom hinzugewonnen hat. All diese Befunde beweisen, dass HIF-1 $\alpha$  in Anwesenheit von O<sub>2</sub> durch enzymatische Prolylhydroxylierung des Pro 564 destabilisiert wird (Abb. 3).

Nach der Veröffentlichung dieser Befunde lag es nahe, nach Enzymen zu suchen, die die beschriebene Prolylhydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  ausführen können. Wiederum identifizierten zwei Arbeitsgruppen die humanen HIF-1 $\alpha$  Prolylhydroxylasen gleichzeitig (1; 3). Die Identifikation dieser Enzyme gelang innerhalb weniger Monate, weil sie Ähnlichkeit mit bekannten Prolylhydroxylasen besitzen. So enthält Kollagen-Prolylhydroxylase, die HIF-1 $\alpha$  nicht hydroxylieren kann, eine 2-Histidin-1-Carboxylat-Gruppe von Aminosäu-

ren, die ein Fe<sup>2+</sup>-Ion im katalytischen Zentrum des Enzyms bindet (4). Durch Suche dieses Motivs in Gendatenbanken wurden bisher 3 humane Enzyme cloniert und charakterisiert, die den Abbau des humanen HIF-1 $\alpha$  einleiten können. Diese HIF-1 $\alpha$ -Prolylhydroxylasen wurden als PHD1, PHD2 und PHD3 (prolyl hydroxylase domain containing protein, (3)) bezeichnet. Nach unseren eigenen Untersuchungen ist jede einzelne dieser Prolylhydroxylasen in der Lage, die Induktion eines cotransfizierten, hypoxie-induzierbaren Reportergens zu unterdrücken (Abb. 4). Wir haben außerdem Fusionsproteine, die aus einem PHD und einem grün fluoreszierenden Protein bestehen, in humanen Osteosarkomzellen der Linie U2OS exprimiert. Unseren Untersuchungen zufolge ist PHD1 ausschließlich im Zellkern lokalisiert, PHD2 ist ein cytosolisches Protein und PHD3 verteilt sich homogen in Zellkern und Cytoplasma. Nach hypoxischer Inkubation versuchten wir weiterhin, endogenes HIF-1 $\alpha$  mittels Immunhisto-

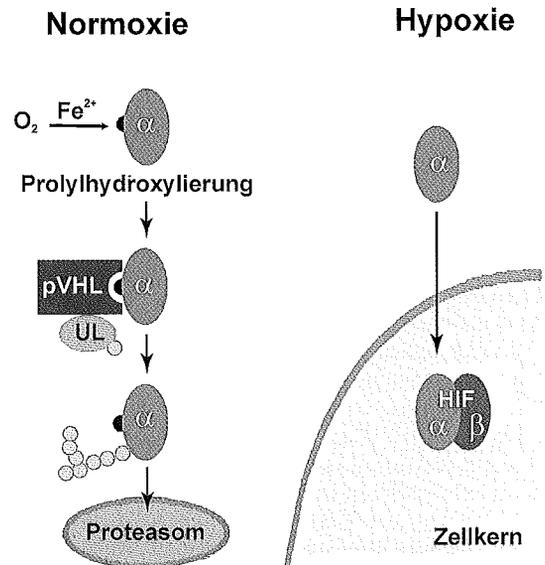


Abb. 3: Destabilisierung des HIF-1 $\alpha$  durch enzymatische Prolylhydroxylierung (pVHL: von Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein, UL: Ubiquitin-Ligase). Modifiziert nach: (15)

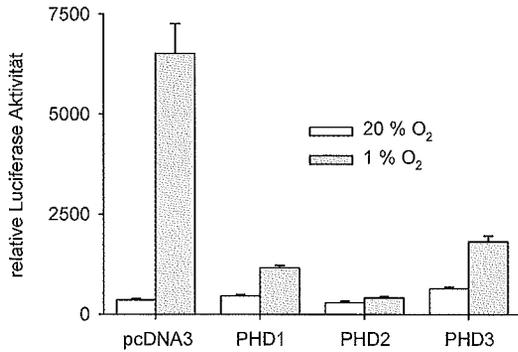


Abb. 4: Effekt einer transienten Überexpression von HIF-1 $\alpha$ -Prolylhydroxylasen auf ein hypoxie-induzierbares Luciferase-Reportergen in Normoxie und Hypoxie in U2OS Zellen.

chemie nachzuweisen (Abb. 5). Wir fanden, dass alle PHD-GFP Fusionsproteine die Induktion von HIF-1 $\alpha$  unterdrücken, wobei dieser Effekt bei PHD2 und PHD3 deutlicher ausgeprägt war als bei PHD1. Dies bedeutet, dass die Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  in vivo durch diese Enzyme verhindert wird. Aufgrund dieser Eigenschaft sind die humanen HIF-1 $\alpha$ -Prolylhydroxylasen Sauerstoffsensoren in vivo.

Die Kenntnis der HIF-1 $\alpha$  Regulation wird es möglicherweise erlauben, therapeutisch in Vorgänge wie die Tumorangio-genese einzugreifen, und ist daher von hoher medizinischer Relevanz.

## Literatur

1. Bruck RK, McKnight SL (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294 : 1337-1340
2. Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF-1 $\alpha$  in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* 18 : 1905-1914
3. Epstein ACR, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzger E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107 : 43-54
4. Hegg EL, Que L (1997) The 2-His-1-carboxylate facial triad-an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *Eur J Biochem* 250 : 625-629
5. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation-domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 7987-7992
6. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohm M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin Jr. WG (2001) HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 292 : 464-468

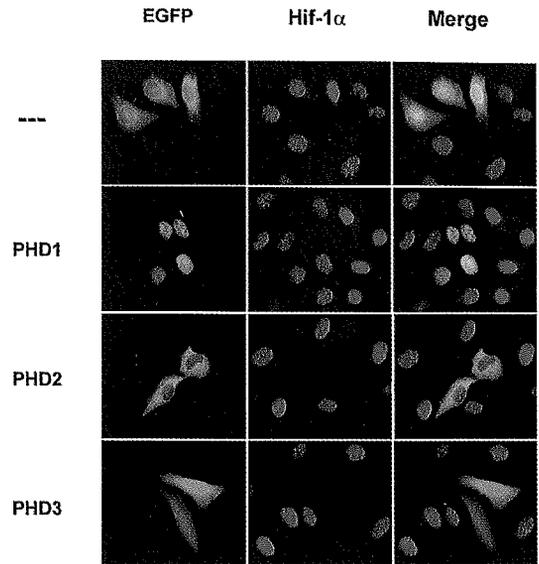


Abb. 5: Immunfluoreszenz – Darstellung von PHD-EGFP Fusionsprotein (linke Spalte), endogenem HIF-1 $\alpha$  (Mitte) und Kombination beider Spalten (rechts). Die U2OS Zellen wurden vor der Fixierung 4 Stunden lang bei 1 % O<sub>2</sub> inkubiert.

7. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292 : 468-472
8. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399 : 271-275
9. Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the  $\alpha$  subunit. *J Biol Chem* 272 : 11205-11214
10. Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272 : 22642-22647
11. Semenza GL (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8 : 588-594
12. Semenza GL (1999) Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 78:1551-78
13. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 5510-5514
14. Wenger RH (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J* 16 : 1151-1162
15. Zhu H, Bunn HF (2001) Signal transduction. How do cells sense oxygen? *Science* 292 : 449-451

# Die Balance der Transkriptionsfaktoren: Entschlüsselung der molekularen Ursache der Anämie chronischer Entzündungen

T. Hellwig-Bürgel, K. La Ferla-Brühl, C. Reimann, J. Krajewski und W. Jelkmann

## Zusammenfassung

Die Anämie chronisch entzündlicher Erkrankungen beruht partiell auf einem Erythropoietin (Epo) Mangel. Die proentzündlichen Zytokine Interleukin (IL-1) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) hemmen die Epo-Expression. Um den Mechanismus dieser Hemmung zu ergründen, haben wir eine Zellkulturstudie zum Einfluss von IL-1 und TNF- $\alpha$  auf Transkriptionsfaktoren durchgeführt, welche das Epo-Gen kontrollieren. Molekularbiologische Analysen (Westernblot, DNA-Bindung, Reportergene, Oligo-Decoy) an Epo produzierenden menschlichen Hepatomzellen (HepG2) zeigten, dass die Zytokine zwei Transkriptionsfaktoren aktivieren, welche die Epo-Expression unterdrücken, nämlich NF- $\kappa$ B und GATA-2. Die Befunde geben eine mechanistische Erklärung für den Epo Mangel bei entzündlichen Prozessen. Darüber hinaus wird deutlich, dass die Epo-Expression nicht nur durch aktivierende, sondern auch durch inhibierende Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird.

## Summary

The anemia of chronic diseases (ACD) is associated with inappropriately low levels of circulating erythropoietin (Epo). The proinflammatory cytokines interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) inhibit Epo gene expression. In a study of the molecular mechanisms of this inhibition the effects of IL-1 and TNF- $\alpha$  on transcription factors in control of the Epo gene in human hepatoma cell cultures (HepG2) were investigated. Results by Western blotting, electrophoretic mobility shift assays, reporter gene assays and oligo decoy approaches indicated that the cytokines activate two transcription factors that suppress the Epo gene, namely NF- $\kappa$ B and GATA-2. The present findings do not only provide an explanation for the impaired Epo synthesis in inflammation but add further evidence in favour of the concept that Epo gene expression is balanced by positive and negative *trans*-acting factors.

## Einleitung

Die Aufrechterhaltung einer konstanten Anzahl roter Blutkörperchen im Körper ist eine fulminante Leistung. Pro Sekunde werden ungefähr 2,3 Millionen Re-

tikulozyten gebildet und in die Zirkulation entlassen, die gealterte und vom mononukleären Phagozytensystem aussortierte Erythrozyten ersetzen. Die Erythropoese wird durch das Hormon Erythropoietin (Epo) geregelt. Die Hauptursache der Anämie bei entzündlichen und malignen Erkrankungen („Anemia of chronic diseases“, ACD) ist ein relativer Epo-Mangel (7). Durch Gabe von rekombinantem humanen Epo ist eine ACD korrigierbar (9; 11). Die proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1 (IL-1) und Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) unterdrücken die Epo-Genexpression sowohl *in vitro* (2; 3) als auch *in vivo* (4). Unserer Arbeitsgruppe gelang es kürzlich, die molekularen Mechanismen dieses Effektes teilweise aufzuklären.

## Biochemische Grundlagen

Die Transkription von Strukturgenen erfolgt im Wesentlichen durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase 2 (RNA-Pol 2). Die Menge einer bestimmten mRNA in einer Zelle hängt überwiegend davon ab, wie oft dieses Enzym mit den Promotorsequenzen eines Gens in Wechselwirkung tritt und nachfolgend eine Transkription initiiert. Die Interaktion zwischen der RNA-Pol 2 und den Promotorsequenzen ist ein stochastischer Vorgang. Um die Bindungswahrscheinlichkeit zu erhöhen, gibt es sogenannte Transkriptionsfaktoren (TFs). Diese helfen der RNA-Pol 2 bei der Erkennung und Bindung der regulatorischen DNA-Abschnitte. Neben positiv regulierenden TFs gibt es auch negativ regulierende, deren Dissoziation von der DNA eine effiziente Transkription erst ermöglicht. TFs haben spezifische Erkennungssequenzen in den Promotor- und Enhancer-Bereichen der jeweiligen Gene. Das Vorhandensein oder Fehlen verschiedener Bindungsstellen ist dabei u.a. für die gewebsspezifische Expression eines Gens verantwortlich.

Das Epo-Gen besitzt sowohl im 5'-Promotorbereich als auch im 3'-gelegenen Enhancer mehrere Bindungsstellen für TFs (Abb. 1). Der wichtigste positiv regulierende TF für die hypoxisch gesteigerte Epo-Transkription ist der Hypoxie Induzierbare Faktor 1 (HIF-1), der eine Bindungsstelle im 3'-Enhancer hat (1; 12; 14). Unter normoxischen Bedingungen ist dieser TF in Zellen und im Gewebe nicht nachweisbar. Erst unter Sauerstoffmangelbedingungen wird die  $\alpha$ -Untereinheit

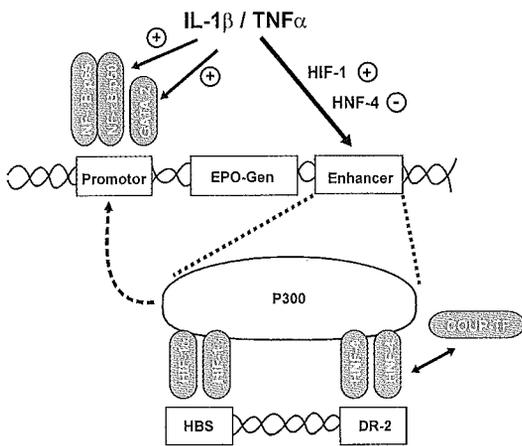


Abb. 1: Schema des Erythropoietin-Gens (EPO-Gen) mit den 5' und 3' gelegenen regulatorischen Abschnitten und den potenziellen Bindungsstellen für relevante Transkriptionsfaktoren. Die Wirkungen der Zytokine IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  sind durch die Pfeile mit den entsprechenden Effekten auf den jeweiligen Transkriptionsfaktor symbolisiert. NF- $\kappa$ B: Nukleärer Faktor kap $\alpha$  B, GATA-2: GATA-bindender Transkriptionsfaktor 2, HIF-1: Hypoxie-Induzierbarer Faktor 1, HNF-4: Hepatocyten Nukleärer Faktor 4, COUP-TF: „chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor“.

des dimeren HIF-1 stabilisiert und damit einer Analyse zugänglich (10).

### Fragestellung

Unsere Untersuchungen zielten darauf ab, die molekularen Mechanismen aufzuklären, durch die die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  die Epo-Produktion unterdrücken. Da HIF-1 als wichtigster TF für die Epo-Genexpression beschrieben war, wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass IL-1 und TNF- $\alpha$  die Menge oder die Funktion von HIF-1 reduzieren könnten. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden Untersuchungen an der menschlichen Epo produzierenden Hepatom-Zelllinie HepG2 durchgeführt.

### Ergebnisse

Als wir den Einfluss von IL-1 und TNF- $\alpha$  auf HIF-1 im Zellkulturmodell mit HepG2-Zellen untersuchten, machten wir eine aufregende Beobachtung. Entgegen unserer Hypothese führte die Stimulation der Zellen mit IL-1 zu einer Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 unter normoxischen Bedingungen (TNF- $\alpha$  steigerte nur die Aktivität) (Abb. 2, A und B). Demnach konnte HIF-1 nicht der Vermittler der verminderten Epo-Transkription sein (5).

lieren. Dafür transfizierten wir HepG2-Zellen mit zwei unterschiedlichen Expressionsplasmiden (8). Das erste codierte für I $\kappa$ -B $\alpha$ , ein Protein, das eine Untereinheit (p65) von NF- $\kappa$ B solange im Zytoplasma zurückhält,

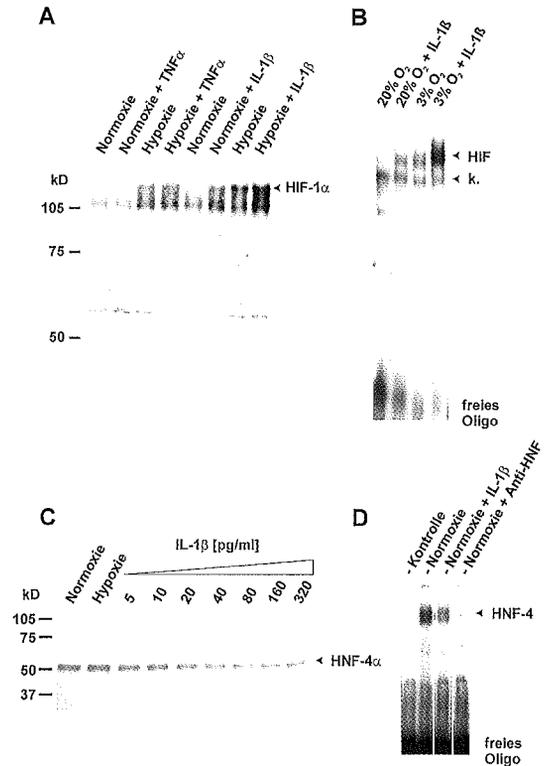


Abb. 2: A: HIF-1 $\alpha$  Westernblot mit Kernextrakten (KE) von HepG2 Zellen, die unter normoxischen (5% CO $_2$ , Rest Raumluft) oder hypoxischen Bedingungen (3% O $_2$ , 5% CO $_2$ , Rest N $_2$ ) 4 Stunden mit oder ohne Zytokine inkubiert wurden (10 ng/ml TNF- $\alpha$ ; 300 pg/ml IL-1 $\beta$ ). Der Grad der Schwärzung ist proportional der Menge des HIF-1 $\alpha$  Proteins. B: HIF-1 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) der Zellextrakte. In diesem Ansatz wird ein kurzes, radioaktiv markiertes, synthetisches Oligonukleotid mit der Bindungssequenz für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor (TF) zusammen mit einem KE inkubiert. Ist der entsprechende TF aktiviert worden, bindet er an das Oligonukleotid und kann durch Elektrophorese von dem ungebundenen Oligonukleotid (freies Oligo) getrennt werden. Der Grad der Schwärzung ist proportional der DNA-Bindung von HIF-1. C: HNF-4 $\alpha$  Westernblot. Die IL-1 $\beta$  Dosis-Wirkungsbeziehung wurde mit normoxischen HepG2 Zellen gewonnen (4 Stunden Inkubation). D: HNF-4 EMSA der Zellen. Kontrolle: kein KE in der Reaktion, Anti-HNF: Reaktion inkubiert mit einem Antikörper gegen HNF-4 $\alpha$ , der die Bindung von HNF-4 an die DNA verhindert.

Es war bekannt, dass für eine maximale hypoxische Induktion des Epo-Gens die Bindungsstelle für den Hepatozyten Nukleären Faktor 4 (HNF-4) essentiell ist (1). Nach Literaturangaben bildet HNF-4 über das p300/CBP (ein Adaptorprotein) einen großen Komplex mit HIF-1, welcher seinerseits die RNA-Pol 2 bindet, dirigiert und fördert (Abb. 1). Also untersuchten wir den Einfluss der Zytokine auf HNF-4. Unser Vorhaben gestaltete sich schwieriger, als zunächst angenommen, da an die Bindungssequenz von HNF-4 auch andere TFs wie z.B. COUP-Tf und RXR binden, welche die HNF-Wirkungen antagonisieren können. Tatsächlich bekamen wir einen ersten Hinweis darauf, dass die Modulation eines TFs möglicherweise die Ursache für eine verminderte Epo-Transkription sein könnte, denn IL-1 reduzierte sowohl die HNF-4 Menge im Zellkern als auch die DNA-Bindungs-fähigkeit (Abb. 2, C und D). Daraus konnten wir den Schluss ziehen, dass, obwohl die HIF-1 Menge für sich allein erhöht ist, der Komplex aus HIF-1, p300/CBP und HNF-4 nur in verringertem Maße zur Verfügung steht.

Der 5'-Promotorbereich des Epo-Gens ist durch das Fehlen einer typischen TATA-Box gekennzeichnet. Die entsprechende Sequenz ist durch einen Basenaustausch in GATA verändert (Abb. 1). An diese Sequenz binden die sogenannten GATA-TFs (hämopoietische TFs). Aus der Literatur war bekannt, dass GATA-2 ein negativ regulierender Faktor für das Epo-Gen ist (6; 13). Das bedeutet, unter normoxischen Bedingungen ist GATA-2 an die DNA gebunden und verhindert eine Anlagerung der RNA-Pol 2. Unter hypoxischen Bedingungen dissoziiert GATA-2 von der DNA und ermöglicht auf diese Weise die Transkription. Wir fanden heraus, dass IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  die GATA-2 DNA-

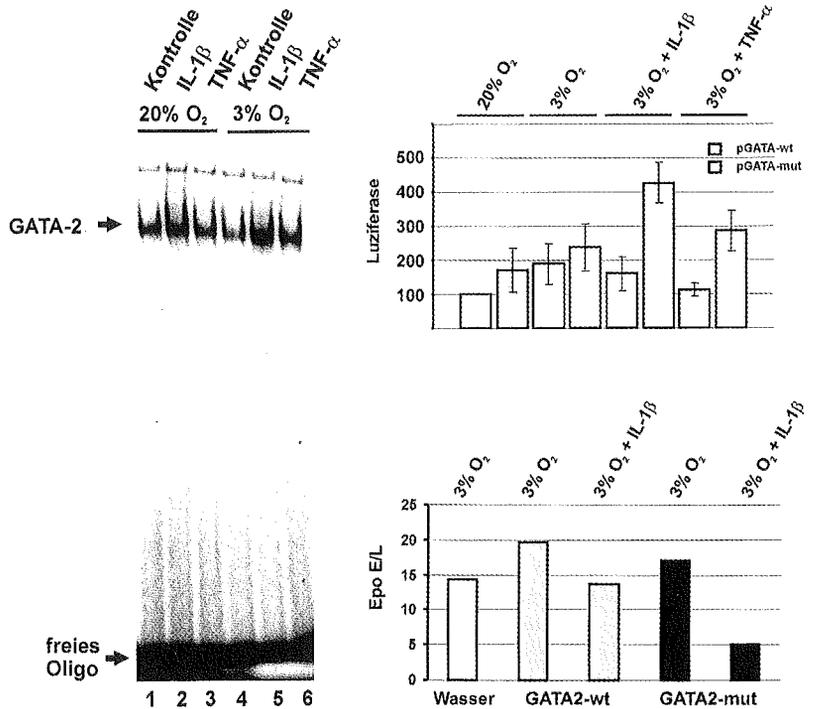


Abb. 3: A: GATA-2 EMSA mit KE aus HepG2 Zellen, die 4 Stunden den experimentellen Bedingungen ausgesetzt waren. B: Relative Aktivität eines Luziferase-Reportergenkonstrates unter der Kontrolle eines GATA-Elements (pGATA-wt) oder eines in TATA veränderten Elementes (pGATA-mut). C: Oligo-Decoy Versuch. Hier wird die zelluläre Funktion eines TFs in vivo gehemmt. Anschließend bestimmt man die Expressionsrate geeigneter Zielgene. Wird GATA-2 unter hypoxischen Bedingungen gehemmt, ist die Epo Produktion im Vergleich zur Wasserkontrolle leicht gesteigert. IL-1 $\beta$  wirkt bei gehemmter GATA-2 Funktion kaum. Im Kontrolllexperiment mit einem Oligonukleotid mit veränderter GATA-2 Bindungsstelle (und damit keiner GATA-2 Hemmung) führt IL-1 $\beta$  Stimulation zu einer deutlichen Reduktion der Epo Produktion.

Bindung erhöhen (Abb. 3 A) und, da GATA-2 ein negativ regulierender TF ist, die Expression eines GATA-2 abhängigen Reportergens vermindern (Abb. 3 B) (8). Desweiteren konnten wir mit einem Oligo-Decoy Ansatz zeigen, dass die durch die Zytokine induzierte Reduktion der Epo-Proteinmenge aufgehoben wurde, wenn wir die Funktion von GATA-2 verminderten (Abb. 3 C).

Weiter 5'-gelegen von der GATA-2 Bindungsstelle finden sich mehrere Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B (Abb. 1). NF- $\kappa$ B ist der vermutlich wichtigste TF für die Vermittlung von Entzündungsreaktionen. Ein vereinfachtes Schema zur NF- $\kappa$ B Aktivierung ist in Abb. 4 gezeigt. Im allgemeinen werden durch NF- $\kappa$ B Aktivierung die entsprechenden Zielgene vermehrt abgelesen. Hier galt es nun, einen negativen Effekt mit diesem TF zu korre-

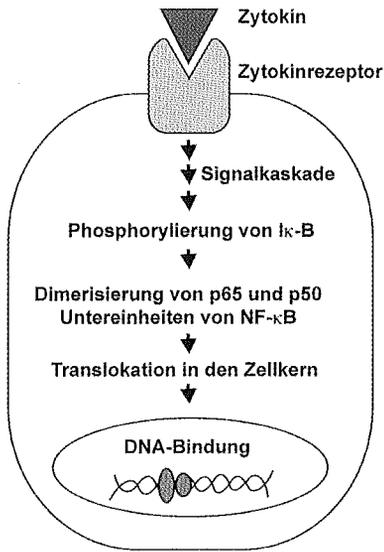


Abb. 4: Schema zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Im Ruhezustand liegen die beiden Untereinheiten von NF- $\kappa$ B (p65 und p50) getrennt voneinander im Zytoplasma vor. Inhibitorische Proteine (I $\kappa$ -B Proteine) sind mit den Untereinheiten assoziiert und halten diese im Zytoplasma. Wird durch eine Zytokin-Rezeptor-Interaktion eine intrazelluläre Signalkaskade gestartet, werden die inhibitorischen Proteine phosphoryliert und damit funktionslos. Daraufhin dimerisieren die p65 und p50 Untereinheiten, translozieren in den Zellkern und binden an ihre Zielsequenzen.

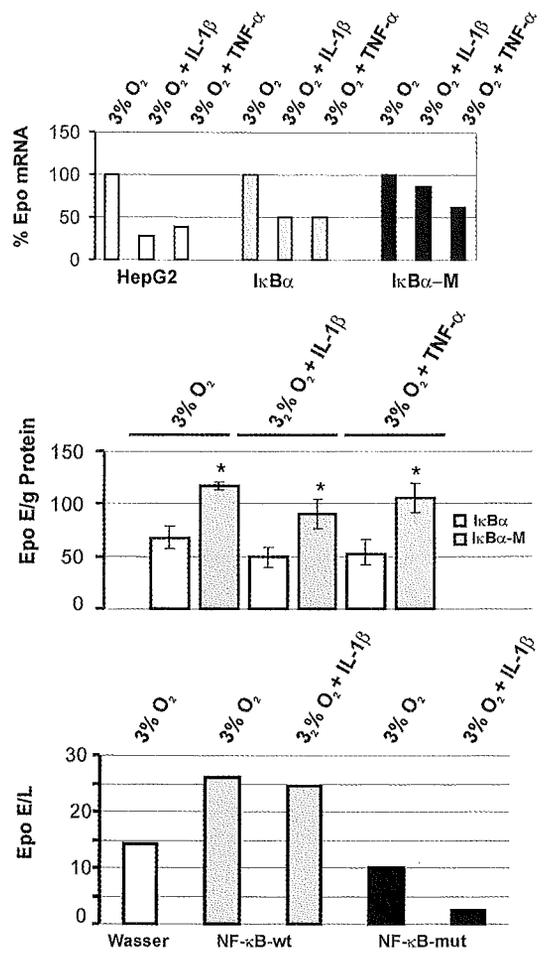


Abb. 5: A: Einfluss einer Zytokinbehandlung auf den Epo mRNA Gehalt hypoxischer genmanipulierter Hepatomzellen. HepG2: Ausgangszelllinie, in der Zytokine die Epo mRNA reduzieren. I $\kappa$ B $\alpha$ : HepG2 Zellen, die I $\kappa$ B $\alpha$  überexprimieren. Auch hier reduzieren die Zytokine die Epo mRNA. I $\kappa$ B $\alpha$ -M: HepG2 Zellen, die eine mutierte Form von I $\kappa$ B $\alpha$  überexprimieren. Diese Form von I $\kappa$ B $\alpha$  kann nicht phosphoryliert werden, NF- $\kappa$ B kann somit nicht aktiviert werden. Hier zeigen die Zytokine nur eine schwache Reduktion der Epo mRNA. B: Sezerniertes Epo im Zellkulturüberstand. I $\kappa$ B $\alpha$ -M überexprimierende Zellen zeigen unter allen Versuchsbedingungen eine vermehrte Epo Produktion im Vergleich zu I $\kappa$ B $\alpha$  überexprimierenden HepG2 Zellen. C: NF- $\kappa$ B Oligo-Decoy Versuch. Die *in vivo* Hemmung von NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B-wt) führt auch unter IL-1 $\beta$  Stimulation zu einer deutlich gesteigerten Epo Produktion im Vergleich zur Kontrolle (Wasser). Ein Oligonukleotid mit veränderter NF- $\kappa$ B Bindungsstelle (NF- $\kappa$ B-mut) ist nicht in der Lage, die NF- $\kappa$ B Funktion *in vivo* zu hemmen, und somit produzieren diese Zellen unter IL-1 $\alpha$  Stimulation nur wenig Epo.

bis durch Zytokinstimulation I $\kappa$ -B $\alpha$  phosphoryliert wird. Das zweite codierte für eine mutierte Form von I $\kappa$ -B $\alpha$ , die nicht mehr phosphoryliert werden kann, wohl aber die p65 Untereinheit von NF- $\kappa$ B binden kann. Stimulierten wir diese Zellen mit Zytokinen, so blieb die Reduktion sowohl von Epo-mRNA als auch sezerniertem Epo in den mit dem mutierten I $\kappa$ -B $\alpha$  transfizierten Zellen aus (Abb. 5, A und B). Auch dieses Ergebnis konnten wir mit einem Oligo-Decoy Experiment, bei dem wir die NF- $\kappa$ B Funktion einschränkten, bestätigen (Abb. 5 C).

### Schlussfolgerungen

Unter normoxischen Bedingungen halten sich die Aktivitäten der vier für die Epo-Transkription wichtigen TFs die Waage (Abb. 6). Auffällig ist dabei, dass die zwei positiv regulierenden Abschnitte 3' des Gens lokalisiert und die negativ regulierenden Abschnitte im 5' Promotor zu finden sind. Gewebshypoxie verschiebt das Gleichgewicht der TFs in Richtung vermehrter Epo-Produktion (durch vermehrte HIF-1 Aktivität und verminderte GATA-2 Aktivität, HNF-4 und NF- $\kappa$ B

**“Normoxische” Homöostase  
“steady state” Epo Produktion**

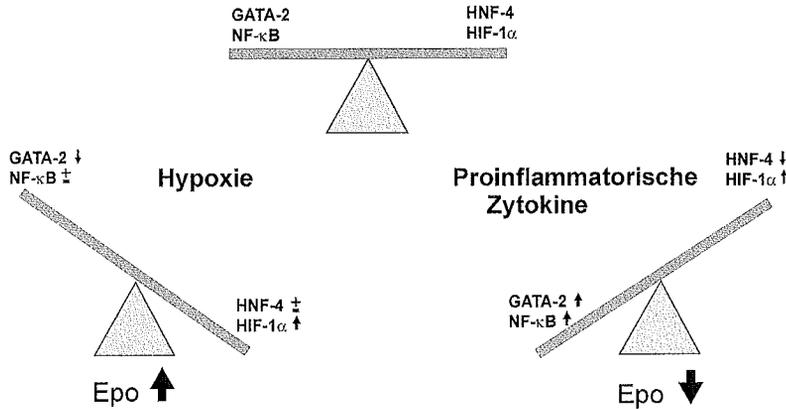


Abb. 6: Schema des Gleichgewichtes der Transkriptionsfaktoren. Im Ausgangszustand halten sich positive und negative Effekte die Waage. Hypoxie oder proinflammatorische Zytokine bringen die Waage zur einen oder anderen Seite aus dem Gleichgewicht. Die Folge ist eine gesteigerte oder verminderte Epo Produktion.

bleiben dabei unverändert). Entzündungsmediatoren stören dieses Gleichgewicht in gegensinniger Richtung, da GATA-2 und NF-κB Aktivitäten gesteigert werden. Die erhöhte HIF-1 Aktivität kann die negativen Effekte von GATA-2 und NF-κB alleine nicht ausgleichen, da der Kooperationspartner HNF-4 vermindert wird. Durch das Studium der einzelnen TFs können wir nun die Entstehung einer ACD, zumindest im Modell, erstmals kausal erklären. Ferner lassen sich durch das Verständnis der molekularen Ursachen einer verminderten Epo-Produktion prospektiv auch neue Konzepte für die Behandlung von Patienten mit chronisch entzündlichen oder malignen Erkrankungen ableiten.

**Danksagung**

Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (SFB 367-C8). Der Bericht fasst Befunde zusammen, die im Rahmen der Promotionsvorhaben von Katia La Ferla-Brühl, Christian Reimann und Jochen Krajewski gewonnen worden sind.

**Literatur**

1. Bunn HF, Poyton RO (1996) Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 76 : 839-885
2. Fandrey J, Huwiler A, Frede S, Pfeilschifter J, Jelkmann W (1994) Distinct signaling pathways mediate phorbol-ester-induced and cytokine-induced inhibition of erythropoietin gene expression. *Eur J Biochem* 226 : 335-340
3. Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA (1992) Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood* 79 : 1987-1994

4. Frede S, Fandrey J, Pagel H, Hellwig T, Jelkmann W (1997) Erythropoietin gene expression is suppressed after lipopolysaccharide or interleukin-1 beta injections in rats. *Am J Physiol* 273 : R1067-R1071
5. Hellwig-Bürgel T, Rutkowski K, Metzgen E, Fandrey J, Jelkmann W (1999) Interleukin-1β and tumor necrosis factor-α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94 : 1561-1567
6. Imagawa S, Yamamoto M, Ueda M, Miura Y (1996) Erythropoietin gene expression by hydrogen peroxide. *Int J Hematol* 64 : 189-195
7. Jelkmann W (1998) Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res* 18 : 555-559
8. La Ferla K, Reimann C, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T (2002) Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-κB. *FASEB J* 10.1096: fj 02-0168fje
9. Pincus T, Olsen NJ, Russell IJ, Wolfe F, Harris ER, Schnitzer TJ, Boccagno JA, Krantz SB (1990) Multicenter study of recombinant human erythropoietin in correction of anemia in rheumatoid arthritis. *Am J Med* 89 : 161-168
10. Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272 : 22642-22647
11. Schreiber S, Howaldt S, Schnoor M, Nikolaus S, Bauditz J, Gasche C, Lochs H, Raedler A (1996) Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 334 : 619-623
12. Semenza GL (1994) Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematol Oncol Clin North Am* 8 : 863-884
13. Tsuchiya T, Okada M, Ueda M, Yasukochi Y (1997) Activation of the erythropoietin promoter by a point mutation from GATA to TATA in the -30 region. *J Biochem (Tokyo)* 121 : 193-196
14. Wenger RH (2000) Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 203 : 1253-1263

# Transfusionsmedizinische Aspekte der Erythrozytensubstitution und alternativer Therapiestrategien

P. Schlenke und H. Kirchner

## Einleitung

„Wo damals die Grenzen der Wissenschaft waren, da ist jetzt die Mitte“

G. C. Lichtenberg

Dieser Aphorismus gilt im besonderen Maße für die medizingeschichtliche Betrachtung von Blut und Bluttransfusion. Hippokrates überlieferte seine Überzeugung, dass Blut dem Menschen das Bewusstsein verleihe und Epilepsie als Bewusstseinsstörung durch Blutleere im Gehirn entstehe (14). Die mystische Interpretation, Blut sei „Sitz des Lebens“ oder „Lebenssaft“ hat sich bis in den Sprachgebrauch der Gegenwart erhalten.

Die allmähliche naturwissenschaftliche Aufklärung der vielfältigen physiologischen Funktionen von Blutbestandteilen und das Verständnis für pathologisch veränderte Krankheitszustände hat im wesentlichen im letzten Jahrhundert stattgefunden. Seit der ersten überlieferten Bluttransfusion (1666) von Hund zu Hund durch den Physiologen R. Lower in Oxford im Auftrag der „Royal Society“ musste über ein Vierteljahrtausend vergehen, um die durch unvermeidliche Fehlschläge für tot erklärte „Chirurgia transfusoria“ zu einer „Medicina transfusoria“ zu entwickeln (24). Mit dem Beginn der serologischen Ära gelang der Durchbruch der Transfusionsmedizin, deren Stellenwert in Diagnostik und Therapie heute unumstritten ist. Im Jahr 1901 entdeckte Karl Landsteiner (Abb. 1) die individuellen Eigenschaften des Blutes durch Nachweis von drei Isoagglutininen und erkannte den Zusammenhang zu den historischen Erfolgen und Misserfolgen therapeutischer Menschenbluttransfusionen (20). Von Decastello beschrieb ein Jahr später die 4. Blutgruppe mit Fehlen der Isoagglutinine und Unempfindlichkeit gegenüber einer Agglutination (45). Somit war die Grundlage der antigenen ABO-Blutgruppeneigenschaften gelegt und eine gefahrlose Transfusion prinzipiell ermöglicht. R. Ottenberg und W. Schultz sind zirka 10 Jahre später die Vorreiter, eine Vorprüfung von Blutkörperchen und Serum mithilfe eines in-vitro Agglutinationstestes zu verlangen (8, 33). Der Hamburger F. Oehlecker postulierte

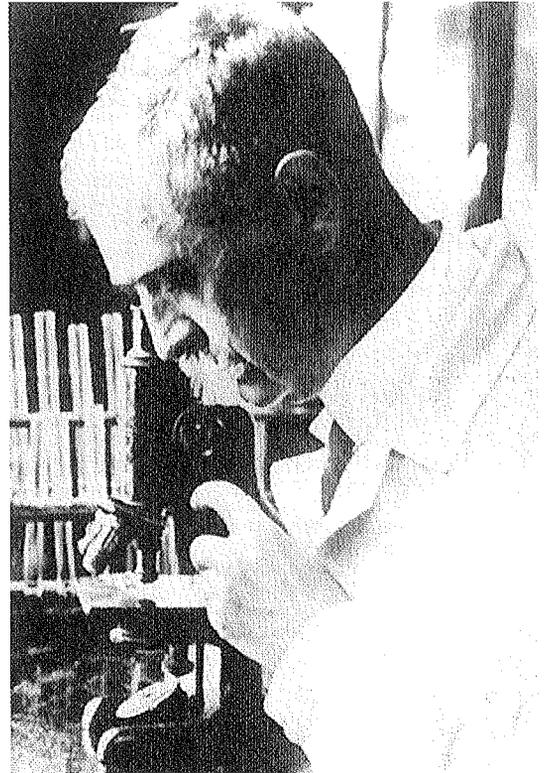


Abb. 1: Karl Landsteiner (1868-1943) erhielt 1930 den Nobelpreis für Medizin für seine Entdeckung der ABO-Blutgruppen.

darüber hinaus eine biologische Vorprobe (in vivo) zum Nachweis von Unverträglichkeitsreaktionen (29). Anfang der zwanziger Jahre wurde in den Vereinigten Staaten von Amerika am Rockefeller-Institut das erste Blutdepot auf der Basis von durch Natriumzitrat ungerinnbar gemachten Vollblut eingerichtet, während man in Deutschland an der Übertragung von Frischblut festhielt und erst Anfang der fünfziger Jahre systematisch wissenschaftlich ausgerichtete blutgruppenserologische Laboratorien und Blutspendezentralen einrichtete.

## Gewinnung und Lagerung von Erythrozytenkonzentraten

Die kostbarste Ressource der Transfusionsmedizin ist das von freiwilligen Blutspendern gespendete Blut. Im Vorwort zu den Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) wird der Dank der Ärzteschaft und die Anerkennung für diese uneigennützigte Hilfestellung öffentlich ausgesprochen (31). Der Spende ausreichender Mengen Vollblut zur Herstellung von Blutkomponenten kommt daher nicht nur eine medizinische, sondern auch eine gesundheitspolitische Bedeutung zu (Abb. 2).

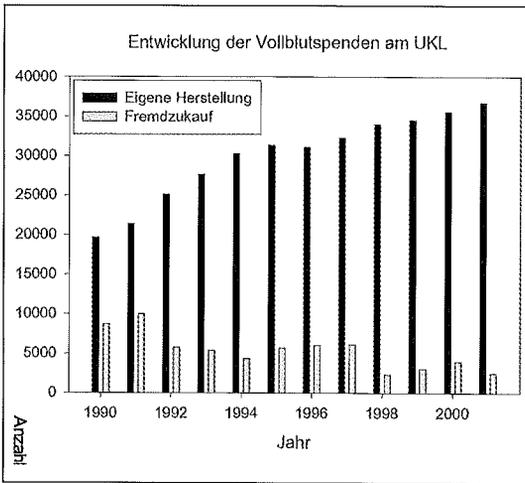


Abb. 2: Die Vollblutspenden konnten in einem Zeitraum von zirka 10 Jahren um 75 % gesteigert werden, während der anteilige Zukauf von 31 % auf 6 % abnahm.

Durch die Fortschreibung der Richtlinien (Neufassung 2000) soll dem schnellen wissenschaftlichen Fortschritt der Hämotherapie Rechnung getragen werden und eine kontinuierliche Anpassung an den neuesten Stand der Wissenschaft und Technik erfolgen (31). Unter Berücksichtigung des im Juli 1998 in Kraft getretenen Transfusionsgesetzes wurde besonderes Augenmerk auf die Qualitätssicherung bei Gewinnung und Anwendung von Blutprodukten gerichtet (43). Nur gesunde Personen, die keinen permanenten oder zeitlich begrenzten Ausschlussgrund gemäß den aktuell gültigen Richtlinien aufweisen, werden nach ärztlicher Beurteilung zur Spende zugelassen. Vor Freigabe der aus der Spende hergestellten Blutkomponenten müssen die in Tab. 1 aufgeführten Laboruntersuchungen durchgeführt und unbedenklich sein. Trotzdem bleibt für den Empfänger ein nicht gänzlich auszuschließendes minimales Restinfektionsrisiko z. B. infolge des diagnosti-

Parameter	Anforderung
ABO, Rhesus	Bestimmt
Anti-HIV1/2-Antikörper	Negativ
Anti-HCV-Antikörper	Negativ
HBs-Antigen	Negativ
HCV-Genom (NAT)	Negativ
Antikörper gegen Treponema pallidum	Negativ
ALT (25°C)	Frauen ≤45U/l, Männer ≤68U/l

Tab. 1: Laboruntersuchungen vor Freigabe der Spende

schen Fensters oder durch noch nicht identifizierte Erreger („unknown virus“) (Tab. 2).

Nach ärztlicher Prüfung der Spendetauglichkeit erfolgt eine Vollblutspende von 450 bzw. 500 ml innerhalb von 10-12 Minuten. Nach modernem Standard werden heute geschlossene Vierbeutelssysteme mit integriertem Leukozytenfilter und vorgefüllten Stabilisatorlösungen zur Vollblutspende verwendet (Abb. 3). Als Kunststoff für die Blutbeutelssysteme wird Polyvinylchlorid (PVC) und Weichmacher wie z. B. Di-2-ethylhexylphthalat (DEHP) verwendet (11). Alle Stabilisatorlösungen müssen chemisch rein, pyrogenfrei und steril sein. Durch eine Zweistufen-Methode zur Konservierung der Erythrozyten konnte eine Hämolyserate unter 1 % bei sechswöchiger Lagerung gewährleistet werden (40). Ein Beispiel hierfür ist das CPD/SAGM-System (15). Im Primärbeutel, der zur Antikoagulation 63 bzw. 70 ml CPD- oder CPD-A1 enthält, erfolgt die Durchmischung mit Vollblut (Tab. 3). Der zugesetzte Phosphatpuffer dient der Stabilisierung des pH-Wertes, die Dextrose als Energielieferant. Adenin kann hinzugefügt werden, um die ADP-Bildung in Erythrozyten zu fördern.

Nach Zwischenlagerung des Vollblutes über mindestens zwei Stunden (zur Phagozytose von potenziell vorhandenen Bakterien) erfolgt durch Zentrifugation eine Auftrennung der einzelnen Blutbestandteile

Parameter	Restrisiko
Hepatitis B	< 1 : 250.000
Hepatitis C	< 1 : 300.000 / < 1 : 1.Million*
HIV (Aids)	~ 1 : 1-3 Millionen
Fehltransfusion (fatal)	~ 1 : 300.000
* nach Einführung der HCV-PCR	

Tab. 2: Geschätzte Restinfektionsrisiken in der BRD (36, 37)

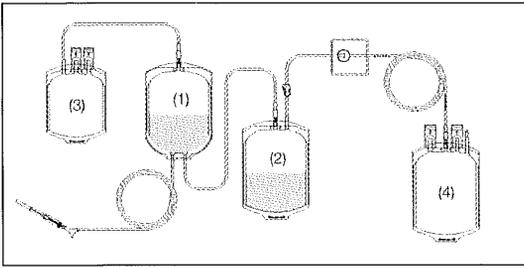


Abb. 3: A: Schema eines sterilen, vorgefüllten Vierbeutel-systems mit integriertem Leukozytenfilter (1) Vollblutbeutel (Antikoagulant), (2) Erythrozytentransferbeutel (Stabilisator), (3) Plasmalagerungsbeutel, (4) Erythrozytenlagerungsbeutel nach Filtration

gemäß ihres spezifischen Gewichtes und nachfolgende Fraktionierung an vollautomatisierten und durch optische Sensoren gesteuerte Geräte (16). Hierbei entsteht aus einer Vollblutspende ein gefrorenes Frischplasma, ein Erythrozytenkonzentrat und der sogenannte „buffy coat“, der Leukozyten und Thrombozyten enthält (Abb. 4). „Buffy coat“ freie Erythrozytenkonzentrate zeigen eine geringere Tendenz zur Mikroaggregatbildung, haben eine geringere Leukozytenkontamination ( $< 1 \times 10^9$ ) und erlauben die simultane Herstellung von gepoolten Thrombozytenkonzentraten aus „buffy coats“ (11, 18).

Die Erythrozyten werden in einer additiven Konservierungslösung (100 ml SAG-M) resuspendiert und verfügen über einen mittleren Hämatokrit von zirka 60 %, gute Fließeigenschaften und einen sehr geringen Anteil

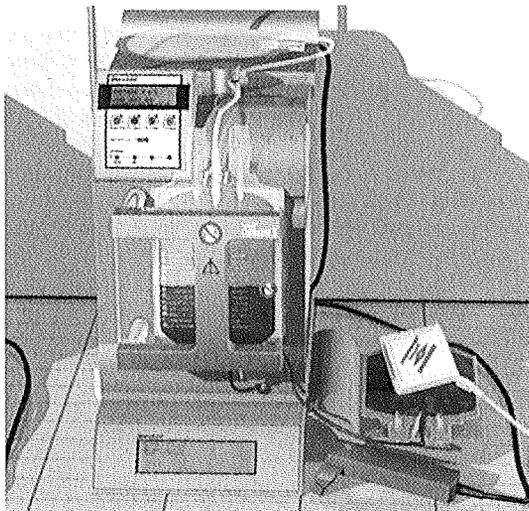


Abb. 4: Zentrifugation und Auftrennung von Vollblut in Erythrozytenkonzentrat, gefrorenes Frischplasma und „Buffy Coat“ mittels Optipress II

an isoagglutininhaltigem Restplasma (Tab. 3). Mannitol dient der Stabilisierung der Erythrozytenmembran. Durch die Verwendung solcher Additivlösungen kann die Lagerzeit von Erythrozytenkonzentraten von 35 auf 42 Tage verlängert werden. Zur Beurteilung der Lagerungsfähigkeit werden einerseits in-vitro Parameter des Erythrozytenstoffwechsels bestimmt und andererseits in-vivo eine Wiederfindungsrate von  $> 70\%$  24 Stunden nach Transfusion gefordert. Erythrozytenkonzentrate werden in speziellen erschütterungsfreien und temperaturüberwachten Kühlschränken bei  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Nach einmonatiger Lagerungszeit ist der ADP-Gehalt der Erythrozyten weitgehend normal und die morphologische Veränderungen und Hämolyserate sind gering. Im Anschluss steigt jedoch der Nachweis von freiem Hämoglobin, so dass üblicherweise die Haltbarkeit auf 35 Tage beschränkt bleibt (15). Ein aktuelles Beispiel für die Validation der Herstellung und Lagerung von Erythrozytenkonzentraten, die für die Zulassung eines Fertigarzneimittels beim Paul-Ehrlich-Institut erforderlich ist, ist in Tab. 4 wiedergegeben (27).

Vollblutentnahme 450ml	Erythrozytenkonservierung
CPD-Antikoagulation 63ml	SAGM-Stabilisator 100ml
3,27 g Zitronensäure	8,8 g Natriumchlorid
26,3 g Tri-Natriumzitat	0,169 g Adenin
25,5 g Dextrose	9,0 g Dextrose
2,51 g Natriumdihydrogenphosphat	5,25 g Mannitol

Tab. 3: Zweistufen-Methode zur Konservierung von Erythrozyten: Zusammensetzung des CPD/SAGM-Systems

Eine Kryokonservierung von Erythrozyten in der Gasphase über flüssigem Stickstoff auf der Basis von Glycerinzusatz hat sich als Standardverfahren nicht durchgesetzt. Das automatisierte Einfrieren, Wiederauftauen, die notwendige Entfernung des Kryoprotektivums verursachen einen zu hohen Zeitaufwand und erhebliche Mehrkosten (26). Die In-vivo Anwendung ist gegenwärtig nur bei der Versorgung von Patienten mit seltenen Antigenmustern (Bombay-Typ, Rhesus-Null) oder mit Antikörpern gegen häufige und damit schwer zu umgehende Antigene (anti-Cellano, anti-Lutheran<sup>b</sup>, anti-Colton<sup>a</sup>) indiziert. Darüber hinaus ist die Langzeitlagerung von Erythrozytenkonzentraten der Blutgruppe 0 Rhesus negativ für zivile oder militärische Katastrophen von Bedeutung.

Kontaminierende Leukozyten in Blutkomponenten können unerwünschte Reaktionen im Empfängerorganismus auslösen (30). Hierzu zählen die febrile, nicht hämolytische Transfusionsreaktion, die Alloimmuni-

n=12	Leukozyten ( $\times 10^6$ )		WBC $\log_{10}$ Reduktion	Hämoglobin (g/Einheit)		Erythrozyten- wiederfindungs- rate nach Filtration
	vor	nach		vor	nach	
450 ml	Filtration	Filtration				
Gruppe 1	1144 $\pm$ 435	0.01 $\pm$ 0.09	5.1 $\pm$ 0.3	63.0 $\pm$ 3.1	44.7 $\pm$ 3.0	71.0 $\pm$ 3.0
Baxter	(496-1891)	(0.005-0.014)	(4.6-5.5)	(60.1-69.7)	(40.8-51.7)	(66.1-76.7)
Gruppe 2	781 $\pm$ 240	0.06 $\pm$ 0.07	4.4 $\pm$ 0.6	60.9 $\pm$ 4.2	41.2 $\pm$ 3.3	68.3 $\pm$ 3.3
	(429-1403)	(0.008-0.091)	(3.3-5.2)	(53.5-67.4)	(34.6-45.4)	(65.7-78.3)

Tab. 4: Leukozytenreduktion und Hämoglobinkonzentration nach Leukofiltration des Erythrozytenkonzentrates (Validierung für Paul Ehrlich Institut, Zulassungsantrag) (27)

sierung gegen Merkmale des Gewebekompatibilitätssystems (HLA-Antigene), die Transmission leukozytenassoziierter Viren (CMV, EBV, HTLV) und Bakterien (*Yersinia enterocolitica*), die Spender-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host Disease) in immun-supprimierten Patienten und die Suppression von Immunreaktionen bei dem Prozess der Wundheilung oder Auseinandersetzung mit Tumorzellen. In vielen Ländern Europas, jedoch noch nicht in den USA, wurde die generelle Leukozytendepletion eingeführt. Seit Mai 2001 werden in Deutschland ausschließlich Erythrozytenkonzentrate in Verkehr gebracht, die mit  $<1 \times 10^6$  Leukozyten belastet sind. Es finden Leukozytenfilter Anwendung, die bereits steril im Beutelsystem integriert geliefert werden und aufgrund ihres Fasermaterials, der Anzahl an „layer“ und der Faserschichtdicke in der Regel eine Leukozytenreduktion um 4-5log Stufen gewährleisten (27). Mechanische Siebefekte und die Adhäsion an Fasern oder festgehaltenen Thrombozyten sind für die Effizienz von zentraler Bedeutung. Es herrscht ein breiter Konsens, dass eine deutliche Reduktion der oben aufgeführten unerwünschten Nebenwirkungen, insbesondere der HLA-Alloimmunisierung als Hauptursache febriler, nicht hämolytischer Transfusionsreaktionen zu erwarten ist (41). Strittig war jedoch die Einführung einer generellen Leukozytendepletion – also ungeachtet des Patientengutes (einmaliger vs. chronischer Transfusionsbedarf) – unter Berücksichtigung erheblicher Zusatzkosten. Auf die Bestrahlung kann auch bei Verwendung leukozytendepletierter Erythrozytenkonzentrate nicht verzichtet werden, da eine transfusionsassoziierte GvHD auch bei sehr geringer Leukozytenrestzahl auftreten kann.

#### Therapie mit homologen Erythrozytenkonzentraten

Die Behandlung von Anämien oder akutem Blutverlust erfolgt, wenn eine kausale Therapie nicht oder nur eingeschränkt möglich ist, gegenwärtig ausschließlich

durch die Substitution mit Erythrozytenkonzentraten (10). Als Anämie gelten Hämoglobinwerte  $< 125$  g/l beim Mann und  $< 115$  g/l bei der Frau. Grundsätzlich werden Bildungsstörungen der Erythropoese im Knochenmark oder Hämoglobinsynthesstörungen einerseits von Umsatzstörungen durch Destruktion oder Verlust von Erythrozyten unterschieden. Hierbei sind Blutausstriche, Erythrozytenindizes, Retikulozytenzählungen und Knochenmarkpunktionen wichtige differentialdiagnostische Werkzeuge (3).

Der Nachweis einer Anämie ist keine Diagnose. Die bei einer Anämie auftretende Verminderung der  $O_2$ -Transportkapazität kann zunächst durch verschiedene Mechanismen (Atmung, Kreislauf, Erythropoietinregelkreis) kompensiert werden. Eine Transfusion sollte – mit Ausnahme der akuten Lebensgefahr – nicht gegeben werden, bevor die Ursache der Anämie geklärt und die diagnostischen Untersuchungen initiiert wurden. Darüber hinaus ist in der Regel zu fordern, dass die Anämie therapierefraktär gegenüber Eisen, Vitamin B12, Folsäure und EPO ist. Mit Einschränkung kann auch eine zusätzliche Therapie durch Transfusion indiziert sein, insbesondere um ein rasches diagnostisches oder therapeutisches Vorgehen zu ermöglichen. Darüber hinaus ist die Verbesserung der Lebensqualität (sowohl durch Steigerung der körperlichen als auch der kognitiven Leistungsfähigkeit) ein häufig verwendetes und nachvollziehbares Argument, die transfusionsmedizinische Intervention, insbesondere bei Tumorpatienten, die infolge ihrer Grunderkrankung oder durch Chemo- und Strahlentherapie anämisch geworden sind, freizügiger zu gestalten (6, 10).

Ein optimaler und generell anwendbarer Transfusionstrigger für die Gabe von Erythrozytenkonzentraten ist nicht bekannt. Zur Orientierung hat sich im Standard eine Transfusionsnotwendigkeit bei Unterschreitung des Hämoglobinwertes unter 80 g/l durchgesetzt. Während jüngere, kardiopulmonal gesunde Individuen auch Hämoglobinkonzentrationen unter 80 g/l tolerieren, sollten bei älteren Patienten mit koronarer Herzerkrankung

kung Hämoglobinkonzentrationen größer 100 g/l angestrebt werden (1, 13). Eine Kanadische Studie zeigte eine vergleichbare 30 Tage Mortalität von 18.7 % versus 23.3 % für intensivpflichtige Patienten, die bei Unterschreitung von 70 g/l bzw. 100 g/l Hämoglobin transfundiert wurden. Darüber hinaus ist zu beachten, dass der Transfusionsbedürftige – soweit es sein klinischer Zustand zulässt – ein möglichst normales, seiner Aktivität zugeschnittenes Leben weiterführen kann. Im Gegensatz hierzu kann die Erkrankung selbst, z. B. wenn eine allogene Knochenmarktransplantation angestrebt wird, eine restriktivere Transfusionsstrategie nahelegen, um eine Alloimmunisierung gegen erythro-, leuko- oder thrombozytäre Antigene zu vermeiden.

Ein leukozytendepletiertes Erythrozytenkonzentrat enthält zirka 50-60 g Hämoglobin und führt zu einem Hämoglobinanstieg um 10 g/l (27). Die durchschnittliche Überlebenszeit der transfundierten Erythrozyten beträgt maximal 60 Tage. Eine wichtige Voraussetzung für die korrekte und risikoarme Transfusion von Erythrozytenkonzentraten ist die Beachtung der Blutgruppenserologie (AB0, Rhesusfaktor D, Antikörpersuchtest und Kreuzprobe) und aller notwendigen Maßnahmen bei Einleitung der Transfusion durch den Arzt (Identifikation, „Bedside-Test“, Patientenbeobachtung).

### Die Bedeutung der autologen Blutspende

Die autologe Bluttransfusion ist definiert als Gabe von patienteneigenen Blutbestandteilen zum Ausgleich eines Blutverlustes während eines operativen Eingriffes. Hierunter subsumieren sich prinzipiell drei verschiedene Verfahren, die präoperative Eigenblutspende bei elektiven Eingriffen, die perioperative Hämodilution und die intraoperative maschinelle Gewinnung und Aufbereitung von Wund- und Drainageblut. Nachfolgend wird nur auf die Bedeutung des erstgenannten Verfahrens eingegangen. Das gespendete Vollblut wird analog zu homologen Blutspenden zu Einzelprodukten weiterverarbeitet. Die Transfusion von Vollblutkonserven ist wegen Mikroaggregatbildung, Verlust an Gerinnungsfaktoren und Akkumulation von Leukozytenzerfallsprodukten als nicht optimal anzusehen und bei längerer Lagerung als obsolet zu bezeichnen.

Das erklärte Ziel der autologen Bluttransfusion ist die generelle Vermeidung der Restrisiken einer homologen Bluttransfusion und sekundär die Einsparung von homolog gewonnenen Blutkomponenten (44). Neben der autologen Bluttransfusion gehören die Etablierung blutsparender Operationstechniken und die Tolerierung niedriger postoperativer Hämatokritwerte zu einem fremdblut-sparenden Gesamtkonzept (2). Nach dem BGH-Urteil von 1991 und den aktuellen Richtlinien zur Hämotherapie müssen Patienten über die Risiken der Fremdblutübertragung aufgeklärt werden, so-

weit eine Bluttransfusion „ernsthaft in Betracht kommt“ (10 % Wahrscheinlichkeit) (4). Auf die Alternative einer Eigenblutspende ist dann hinzuweisen, wenn sie in ihrer Durchführung prinzipiell möglich ist. Hervorgerufen durch das unerwartete Auftreten von HIV und dem Nachweis, dass eine Transfusion vom Spender zum Empfänger durch Bluttransfusion auftreten kann, gewann die autologe Blutspende Ende der achtziger und Anfang der neunziger Jahre an Bedeutung. Obwohl die Virus-Screening-Teste kontinuierlich an Sensitivität und Spezifität zugenommen haben als auch die Spenderauswahl nach immer restriktiveren Kriterien erfolgte und derzeit ein HIV-Übertragungsrisiko in der Bundesrepublik Deutschland von > 1 : 1 Million angenommen wird, ist die Bevölkerung skeptisch gegenüber der Sicherheit von Blutprodukten (36, 37). Hieraus kann nur gefolgert werden, dass eine gesundheitspolitisch verantwortlich geführte Öffentlichkeitsarbeit den gegenwärtigen Stand von Wissenschaft und Technik widerspiegeln sollte und die Bevölkerung über die derzeitigen Risiken der HIV-, Hepatitis- und BSE-Übertragung aufklärt.

Die präoperative Eigenblutspende kann nur bei chirurgischen Elektiveingriffen Anwendung finden. In der Regel werden mindestens zwei bis maximal vier Vollblutentnahmen durchgeführt. Eine starre Altersgrenze existiert nicht. Der Patient sollte jedoch kreislaufstabil sein und über einen ausreichenden Hämoglobinwert verfügen. Absolute Kontraindikationen sind u. a. Anämien, hämatogene Infektionen z. B. durch *Yersinia enterocolitica*, die bei Konservenverkeimung zu einem gefürchteten Endotoxinschock führen und hämodynamisch wirksame kardiale Erkrankungen (frischer Herzinfarkt, instabile Angina pectoris etc.). Schwangerschaft oder Tumorleiden stellen keine absoluten Kontraindikationen dar, müssen jedoch bei einer Risiko-Nutzen-Analyse zurückhaltend beurteilt werden, zumal die Unbedenklichkeit einer Eigenblutspende schwer fassbar ist.

Der Patient und entnehmende Arzt müssen zusammen das Für-und-Wider einer Eigenblutspende abwägen. Das kumulative Risiko sollte hierbei nicht größer sein als bei Fremdblutübertragung. Von entscheidender Bedeutung für den klinischen Erfolg einer Eigenblutspende ist die weitgehende Nachbildung der Erythrozyten vor Beginn der Operation unter Beachtung der maximalen Lagerungszeit der Erstspende (47). Eine frühzeitige orale Eisensubstitution ist empfehlenswert, da mit jeder Spende dem Körper 250 mg Eisen verloren gehen. Ein Hämoglobinwert von 110 g/l sollte in der Regel im Verlauf der Eigenblutspenden nicht unterschritten werden. Die erythrozytäre Rekonstitution innerhalb eines 4 Wochen-Intervalls erfolgt in der Regel nur zur Hälfte. Für viele Patienten bedeutet die Eigenblutspende einige Wochen vor Operation in praxi eine

chronische Hämodilution (10). Bei Mitbeachtung strenger Transfusionstrigger kann unter Umständen bei Nichtgabe des Eigenblutes ein niedriger Hämoglobinwert postoperativ resultieren als vor Erstspende. Die Erfahrung lehrt jedoch, dass bei deponiertem Eigenblut die Transfusionsstrategie freizügiger gehandhabt wird. In Hinblick auf das gegenwärtig geschätzte Risiko einer tödlich verlaufenden Hämolyse nach AB0-inkompatibler Transfusion (Fehltransfusion durch Administrationsfehler) und des verbleibenden Risikos einer bakteriellen Kontamination müssten Eigenblutempfänger eher eine erhöhte, denn erniedrigte transfusionsbedingte Mortalität aufweisen (12, 22). Ebenso sollte zukünftig gesundheitspolitisch berücksichtigt werden, dass der Verwurf von nicht benötigtem Eigenblut bei Erythrozytenkonzentraten bis zu 50 %, bei gefrorenem Frischplasma bis zu 75 % betragen kann. Auf diesen Erkenntnissen basierend sind in England Richtlinien publiziert worden, die eine autologe präoperative Eigenblutspende nur bei einer Transfusionswahrscheinlichkeit von 50 % empfehlen (42).

Zahlreiche Kosten-Nutzen-Analysen sind zu diesem Thema in Abhängigkeit zum operativen Verfahren erschienen. Als effektives Maß für eine sinnvolle medizinische Maßnahme werden 50.000 \$ oder weniger für ein sogenanntes „quality-adjusted life year“ (QALY) angesehen. Die Kosten der Eigenblutspenden liegen bei orthopädischen, herzchirurgischen, urologischen und gynäkologischen Eingriffen bei \$ 235.000 bis £ 23.643.000 per „QALY“ (2). Die Einführung der Nukleinsäureamplifikationstechnik (NAT oder PCR) für den Nachweis des HCV-Genoms ist hierbei nicht berücksichtigt. Eine Erythropoietingabe zur Förderung der Eigenblutspendetauglichkeit ist nur in Ausnahmefällen sinnvoll. Zweifelsohne erlaubt die Gabe von Erythropoietin in den meisten Fällen eine Proliferationsinduktion der Erythropoese, diese kann jedoch in der überwiegenden Zahl auch durch Eisengabe allein erreicht werden (5, 10). Dagegen ist die Anwendung von Erythropoietin allein bei hämatologisch/onkologischen Patienten zur Reduktion der Transfusionsfrequenz als auch zur Verbesserung der Lebensqualität zu erwägen (23, 35).

### Universale Erythrozyten

Mit der Entdeckung der AB0-Blutgruppen-Antigene auf Erythrozyten und den assoziierten Isoagglutininen im Serum durch Karl Landsteiner am Anfang des 20. Jahrhunderts war der Hauptgrund der Immunreaktion erkannt und der Weg für eine erfolgreiche Blutübertragung geebnet. Die gesamte Logistik der Blutgewinnung, Konservendistribution und Transfusion einschließlich der Phänotypisierung von Spender und Empfänger basiert auf der Beachtung der AB0-Regel.

Die Elimination der AB0-Eigenschaften auf Erythrozyten würde einer Revolution in der Transfusionsmedizin gleichkommen. Dem Begriff der „universalen Erythrozyten“ können unterschiedliche Bedeutungen zukommen. Herkömmlich wird die Blutgruppe 0 als Universalspenderblut in Hinsicht auf Erythrozyten betrachtet, weil diese die AB0-Eigenschaften nicht tragen und Empfängern mit AB0-Antikörpern transfundiert werden können. Bei der Bereitstellung kompatibler Erythrozytenkonzentrate wird jedoch auch das Rhesus-Merkmal D und mit Einschränkung weitere Rhesusmerkmale und das Kell-Antigen berücksichtigt. Darüber hinaus verfügen Patienten zum Teil über präformierte Alloantikörper, die gegen weit mehr als hundert weitere Blutgruppenantigene gerichtet sein können. Wahrhaft „universale Erythrozyten“ würden für alle diese Antigenysteme negativ sein.

Zwei grundsätzlich verschiedene Ansätze werden gegenwärtig international verfolgt; einerseits die dauerhafte Entfernung von Antigenen auf der Oberfläche von Erythrozyten und andererseits die Maskierung immunogener Strukturen, so dass deren Erkennung durch das Immunsystem ausbleibt (25).

Die AB0-Blutgruppen unterscheiden sich nur durch ein endständiges Monosaccharid an dem Vorläuferoligosaccharid: N-acetylgalaktosamin für Blutgruppe A, Galaktose für Blutgruppe B und kein zusätzliches Monosaccharid für Blutgruppe 0 (H-Antigen). Die in der New Yorker Arbeitsgruppe um Jack Goldstein Anfang der achtziger Jahre durchgeführten Studien gelten als Pionierleistungen auf dem Gebiet der enzymatischen Konversion von AB0-Blutgruppen (9). Es konnte durch Verwendung einer alpha-Galaktosidase aus der Kaffeebohne die erfolgreiche Modifikation von Erythrozyten der Blutgruppe B zu 0 demonstriert werden. Ebenso waren die modifizierten Erythrozyten physikalisch und funktionell intakt. Erst kürzlich wurden neue Daten aus einer Phase II Studie publiziert, die belegen, dass die Transfusion von enzymatisch konvertierten B-zu-0-Erythrozyten auf Empfänger mit der Blutgruppe A oder 0 sicher und effektiv war (19). Weder akute Transfusionsreaktionen noch Hämolysen wurden berichtet. Auffällig waren jedoch serologische Besonderheiten, so einerseits steigende anti-B-Titer und Positivität in der Verträglichkeitsprobe. Für diese Phänomene kann eine Immunisierung gegen restliche B-Epitope und gegen Neoantigene verantwortlich sein.

Aus der Sichtweise klinisch orientierter Transfusionsmedizin ist die praktische Relevanz einer B-zu-0-Konvertierung als gering einzustufen, weil nur wenige Individuen die Blutgruppe B besitzen und diese nachfolgend auch durch enzymatisch behandelte Erythrozyten mitversorgt werden müssten. Dagegen ist die Konversion der Blutgruppe A-zu-0 eine Herausforderung, die einen wesentlichen Einfluss auf die Versorgung der

Bevölkerung haben könnte. Bei diesem Szenario wäre eine Bedarfsdeckung durch Erythrozyten der Blutgruppe 0 und A-zu-0 möglich, die AB0-Serologie nur noch mit Einschränkung erforderlich und die AB0-Fehltransfusionen – noch heute die gefürchtetsten und lebensbedrohlichsten Transfusionsreaktionen (1 : 30.000, tödlich > 1 : 300.000) würden nicht mehr auftreten (21, 25). Bedauerlicherweise ist aufgrund der biochemischen Komplexität des A-Antigens eine vollständige enzymatische Degradation bis heute nicht möglich (17, 19). Während endständige Epitope der Exoglykosidase zugänglich sind, sind Zuckerreste an inneren Positionen enzymresistent. Nur wenn es der Forschung gelänge dieses Problem zu lösen, werden „universale Erythrozyten“ eine transfusionsmedizinisch relevante Zukunft haben.

Neuere Ansätze versuchen Antigene auf Erythrozyten zu maskieren. Diese sogenannten „stealth red blood cells“ können nicht vom Immunsystem erkannt werden, so dass sowohl eine Alloimmunisierung als auch eine Antigen-Antikörperreaktion bei vorbestehendem Antikörper ausbleibt. Die Oberfläche der Erythrozyten wird bei dieser Methode mit Polyether-Polymeren (PEG) „umhüllt“ (34). Unterschiedliche Molekulargewichte, kovalente Bindungen zu Proteinen und „Linker“-Moleküle werden zur Zeit erprobt (25). PEG-behandelte Erythrozyten sollen im Idealfall eine Protektion gegenüber größeren Molekülen, wie z. B. Antikörpern aufweisen, während eine Interaktion zwischen Erythrozyten und

kleineren Molekülen wie z. B. Glukose und Sauerstoff aufrecht erhalten wird. Studien belegen die Reduktion der Antigenität und Immunogenität von Antigenen des AB0-, Rhesus-, Kell-, Duffy- und Kidd-Systems auf PEG-modifizierten Erythrozyten. Bei Anwendung niedriger PEG-Konzentrationen konnte keine signifikante Beeinträchtigung der Erythrozytenverformbarkeit und der Sauerstoffbindungs- und -transportkapazität nachgewiesen werden (28). Daten zur vollständigen PEG-Blockade und klinische Ergebnisse am Menschen liegen zur Zeit noch nicht vor. Sollte diese noch junge Forschungsdisziplin erfolgreich sein, hätte sie eine hohe Relevanz in der Versorgung sowohl von Patienten mit Antikörpern gegen hochfrequente Antigene, multiplen Antikörpern und Autoantikörpern als auch für Patienten mit chronischem Transfusionsbedarf und hohem Risiko einer Alloimmunisierung. Die Etablierung „universaler“ Erythrozyten würde den Prozess beginnend bei spenderseitigen Vollblutentnahme bis zur empfangenseitigen Transfusion revolutionieren.

### Künstliche Sauerstoffträger

In dem letzten Jahrzehnt wurden erhebliche Fortschritte auf dem Gebiet der künstlichen Sauerstoffträger („red blood cell substitutes“) gemacht. Einige Pharmazeutika sind von der vorklinischen Prüfung bis zu klinischen Phase III Studien gereift (39). Grundsätzlich werden zwei Strategien, die Verwendung von Perfluorcarbonemulsionen einerseits und die Hämoglobin-De-

Produktname	Produkt	Plasma-HWZ, MG	Kl. Phase / Indikation
Oxygent (Alliance)	60% Perfluorocetyl bromid	4-15 h < 0,2 µm Größe	Phase III Gestoppt 1/2001
Hemassist (Baxter)	Humanes Hämoglobin, Vernetzt	2-11 h 64 kD	Phase III Gestoppt 9/1998
Hemopure (Biopure)	Bovines Hämoglobin, Glutaraldehyd-vernetzt	9-24 h ~250 kD	Phase III Europa, USA Elektive OP, periop.
Hemolink (Hemosol)	Humanes Hämoglobin, o-Raffinose vernetzt	14-20 h ~120-180 kD	Phase III Zulass.antrag Kanada Herzchir.,perioperativ
PolyHeme (Northfield)	Humanes Hämoglobin, Glutaraldehyd-vernetzt	24 h ~150 kD (64 -500)	Phase III Zulass.antrag USA Trauma, perioperativ
VTR-PHP (Apex Bioscience)	Humanes Hämoglobin Polyoxyethylen-konjugiert	~40 h ~106 kD	Phase III Septischer Schock
Optro (Somatogen-Baxter)	Rekombinant	64 kD	Phase II gestoppt

Tab.5: Künstliche Sauerstoffträger: Stand klinischer Prüfungen Anfang 2002 (modifiziert nach Dinkelmann & Northoff (7))

private an-dererseits, unterschieden. Eine Übersicht ist in Tabelle 5 abgebildet (7).

Intrazelluläres Hämoglobin von Erythrozyten ist weitgehend vor Degradation oder Oxidation zu Methämoglobin geschützt und hat keinen direkten Kontakt zu Geweben. Die lange Überlebenszeit von Hämoglobin in Erythrozyten kann nicht auf künstliche Sauerstoffträger übertragen werden. Perfluorcarbon-Emulsionspartikel im Plasma werden durch das retikuloendotheliale System innerhalb von mehreren Tagen aus der Zirkulation abgebaut. Ihr Vorteil gegenüber Hämoglobinderivaten liegt in ihrer synthetischen Herstellung, d. h. der fehlenden Kontamination mit Pathogenen und der Möglichkeit einer „large-scale“ Produktion. Zur Zeit ist das Pharmazeutikum Oxygent (Alliance Pharmaceutical), eine Emulsion aus Perfluoroktylbromid und Phospholipiden, in Phase II und III Studien zur klinischen Erprobung. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit wird das Produkt zur akuten normovolämischen Hämodilution und bei akutem Blutverlust zur Vermeidung oder Überbrückung herkömmlicher Erythrozytentransfusionen eingesetzt (38, 46).

Sauerstoffträger auf Basis von Hämoglobinderivaten verfügen über den Vorteil, dass der Prozess der Sauerstoff- und Kohlendioxidbeladung und -freisetzung bereits gut verstanden ist. Darüber hinaus ist die Lagerung bei 4°C oder Raumtemperatur bis zu zwei Jahren möglich. Hämoglobin humanen oder tierischen Ursprungs wird aufgereinigt, sterilisiert und virusinaktiviert. Trotzdem sind Bedenken im Rahmen Prionenmediierter Erkrankungen, insbesondere die Möglichkeit die neue Variante der Jacob-Creutzfeldt Erkrankung zu übertragen, geäußert worden.

Einige Probleme sind mit der Gabe von freien Hämoglobinen verbunden. Freies, natives Hämoglobin in Plasma ist ein Tetramer, welches schnell zu Dimeren dissoziiert und potentiell nephrotoxisch wirkt. Gegenwärtige Hämoglobinderivate werden durch Crosslinking z. B. durch Glutaraldehyd, Polymerisation und Oberflächenkonjugation mit PEG so modifiziert, dass ein schneller Abbau aus der Zirkulation verhindert werden kann (39). Die Halbwertszeit solcher Produkte beträgt gegenwärtig 1 bis 2 Tage. Die Ergebnisse vor-klinischer pharmakologischer und toxikologischer Studien sind nicht für alle Produkte abgeschlossen, darüber hinaus fehlen Auswertungen klinischer Studien. Ein grundsätzliches Problem sind hypertensive Effekte infolge von Vasokonstriktion, die sowohl im Menschen als auch im Tier durch freies Hämoglobin verursacht werden können (32). Die Bildung von Hämoglobinmetaboliten, die Immunogenität von modifizierten Hämoglobinen und die negative Beeinflussung bakterieller Sepsis sind Gegenstand derzeitiger Studien. Eine endgültige Beurteilung der Aussichten, Hämoglobinderivate in die klinische Transfusionsmedizin er-

folgreich einzubringen, kann heute noch nicht getroffen werden. Es werden derzeit Präparate aus abgelaufenen humanen Erythrozytenkonzentraten, Rinderhämoglobine und rekombinant hergestellte Hämoglobine entwickelt (39). In weiterer Zukunft mag es möglich werden, dass transgene Kühe humanes Hämoglobin synthetisieren und in ihre Milch sezernieren.

Gemäß den Anforderungen der nationalen, europäischen oder amerikanischen Aufsichtsbehörden muss für jedes neue Therapeutikum auf diesem Gebiet ausreichend sicher der Nachweis der Sicherheit und Effektivität erbracht werden. Insbesondere klinische Studien mit den Endpunkten Patientenmortalität und Reduktion der Transfusion konventioneller Erythrozytenkonzentrate stehen noch aus. Trotz einiger Rückschläge in jüngster Zeit ist die Idee nicht-zellulärer „red blood cell substitutes“ weiterhin aufregend; hierbei steht nicht die generelle Ablösung der homologen Erythrozytentransfusion im Vordergrund, sondern die Ergänzung konventioneller Transfusionsstrategien im Notfall, zur perioperativen Hämodilution, bei Versorgungsengpässen, immunhämatologischen Problempatienten oder im Katastrophenfall.

## Literatur

1. Bracey AW, Radovancevic R, Riggs SA (1999). Lowering the hemoglobin threshold for transfusion in coronary artery bypass procedures: effect on patient outcome. *Transfusion* 39:10-1077
2. Brecher ME, Goodnough LT (2001). The rise and fall of preoperative autologous blood donation (Editorial). *Transfusion* 41:1459-1461
3. Bron D, Meuleman N, Mascaux C (2001). Biological Basis of Anemia. *Sem Oncol* 28 (Suppl.8):1-6
4. Bundesgerichtshof: BGH-Urteil vom 17.12.1991.AZ: VI ZR 40/91
5. Coyle D, Lee KM, Fergusson DA (2000). Cost effectiveness of Epoetin- ( to augment preoperative autologous blood donation in elective cardiac surgery. *Pharmacoeconomics* 18:161-171
6. Consensus statement on red cell transfusion (1994). *Transfus Med* 4:177-178
7. Dinkelmann S, Northoff H (2002). Artificial oxygen carriers - A critical analysis. *Infus Ther Transfus Med* 29:167-174
8. Epstein AA, Ottenberg R (1908). A simple method of performing serum reactions. *Proc New York Pathol Soc* 8:117-123
9. Goldstein J, Siviglia G, Hurst R, Lenny L, Reich L (1982). Group B erythrocytes enzymatically converted to group O survive normally in A, B, and O individuals. *Science* 215:168-170
10. Goodnough LT, Brecher ME, Kanter MH, AuBuchon JP (1999). *Transfusion Medicine. First Part: Blood transfusion. Second Part: Blood conservation.* *New Engl J Med* 340:438-447, 525-533
11. Gullikson H, Karlmann G, Segerlind A, Gullbring B (1986). Preservation of red blood cells : content of microaggregates and di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) in red blood cells stored in

- saline-adenine-glucose-mannitol (SAGM) medium. Vox Sang 50:16-20
12. Haditsch M, Binder L, Gabriel C, Muller-Uri P, Watschinger R, Mittermayer H (1994). Yersinia enterocolitica-septicemia in autologous blood transfusion. Transfusion 34:907-909
  13. Hebert PC, Wells G, Blajchman MA, Marshall J, Martin C, Pagliarello G, Tweedale M, Schweitzer I, Yerisir E (1999). A multicenter, randomized controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. N Engl J Med 340:409-417
  14. Hippokrates, De morbis I, Kap30 (VI, 200 Litre).
  15. Högmann CF, Hedlund DK (1985). Storage of red cells in a CPD/SAGM system using terephthalic PVC. Vox Sang 49:177-180
  16. Högmann CF, Eriksson L, Ring M (1992). Automated blood component preparation with the Opti system: three years' experience. Beitr Infusionsther 30:100-107
  17. Hoskinas LC, Boulding ET (2001). Changes in immunologic properties of group A RBCs during treatment with an A-degrading exo-(N-acetylgalactosaminidase. Transfusion 41:908-916
  18. Klüter H, Müller-Steinhardt M, Danzer S, Wilhelm D, Kirchner H (1995). Cytokines in platelet concentrates prepared from pooled buffy coats. Vox Sang 69:38-43
  19. Kruskal MS, AuBuchon JP, Anthony KY, Herschel L, Pickard C, Biehl R, horowitz M, Brambilla DJ, Popovsky MA (2000). Transfusion to blood group A and O patients of group B RBCs that have been enzymatically converted to group O. Transfusion 40:1290-1298
  20. Landsteiner K. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Bluteserums und der Lymphe. Centralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskrankh Abt 1900;27:357-362.
  21. Linden JV, Paul B, Dressler KP. A report of 104 transfusion errors in New York state. Transfusion 1992;32:601-606.
  22. Linden JV, Albany NY (1994). Autologous blood errors and incidents. Transfusion 34:112 (Abstract).
  23. Littlewood TJ (2001). Erythropoietin for the treatment of anemia associated with hematological malignancy. Hematol Oncol 19:19-30
  24. Lower R (1666). The method observed in transfusing the blood (!) out of one animal into another. Philos Trans 1 20:353-358
  25. Lublin DM (2000). Universal RBCs. (Editorial) Transfusion 40:1285-1289
  26. Meryman HT, Hornblower M (1972). A method for freezing and washing red blood cells using a high glycerol concentration. Transfusion 12:145-156
  27. Müller-Steinhardt M, Hennig H, Kirchner H, Schlenke P (2002). Prestorage WBC filtration of RBC units with soft-shell filters: filtration performance and impact on RBCs during storage for 42 days. Transfusion 42:153-158
  28. Murad KL, Mahany KL, Brugnara C, Kuypers FA, Eaton JW, Scott MD (1999). Structural and functional consequences of antigenic modulation of red blood cells with methoxypropyl(ethylene glycol). Blood 93:2121-2127
  29. Oehlecker F (1928). Ist die Bluttransfusion völlig ungefährlich, wenn vorher eine Blutgruppenbestimmung gemacht worden ist? Med Klin 24:1421-1424
  30. Pietersz RNI, Stenecker I, Reesink HW (1993). Prestorage leukocyte depletion of blood products in a closed system. Transfus Med Rev 7:17-24
  31. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) herausgegeben von Bundesärztekammer, Paul Ehrlich Institut. Köln, Deutscher Ärzteverlag 2000
  32. Rioux F, Drapeau G, Marceau F (1995). Recombinant human hemoglobin (rHb1.1) selectively inhibits vasorelaxation elicited by nitric oxide donors in rabbit isolated aortic rings. J Cardiovasc Pharmacol 25:587-594

**Was wir für Sie tun, hat ...**



**...Hand und Fuß**

- ◆ Orthopädie-Technik
- ◆ Rehabilitations-Technik
- ◆ Sanitätshaus
- ◆ Care-Center



**Schütt & Grundei**

Sanitätshaus am Klinikum®

Osterweide 2c

☎ 04 51 / 89 07 - 133

direkt  
gegenüber der  
UKL

33. Schultz W (1910). Über Bluttransfusion bei Menschen unter Berücksichtigung biologischer Vorprüfungen. Berlin Klin Wochenschr 47:407ff,1457ff
34. Scott MD, Murad KL, Koumpouras F, Talbot M, Eaton JW (1997). Chemical camouflage of antigenic determinants : stealth erythrocytes. Proc Natl Acad Sci USA 94:7566-7571
35. Seidenfeld J, Piper M, Flamm C, Hasselblad V, Armitage JO, Bennett CL, Gordon MS, Lichtin AE, Wade JL 3rd, Woolf S (2001). Epoetin treatment of anemia associated with cancer therapy: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. J Natl Cancer Inst 93:1204-1214
36. Seifried E, Roth WK (2001). Increase of safety of blood products by virus NAT testing and its cost-benefit (Abstract V19.1) Infus Ther Transfus Med 28(Suppl)45
37. Seifried E, Findhammer S, Roth WK (2002). Status of NAT screening for HCV, HIV and HBV – experiences of the German Red Cross Blood Donation Services. In: Advances in Transfusion Safety. – 2001. Eds.: Brown F, Seitz R. Dev Biol Basel, Karger 108:23-27
38. Stern SA, Dronen SC, McGoron AJ, Wang X, Chuffins K, Millard R, Keipert PE, Faithfull NS (1995). Effect of supplemental perfluorocarbon administration on hypotensive resuscitation of severe uncontrolled hemorrhage. A J Emerg Med 13:269-275
39. Stowell CP, Levin J, Spiess BD, Winslow RM (2001). Progress in the development of RBC substitutes. Transfusion 41:287-299
40. Strauss D (1981). The two-step preservation of red blood cells . A contribution to improve their viability and their therapeutic efficiency. Acta Biol Med Ger 40-5:721-725
41. The trial to reduce alloimmunization to platelets study group (no authors listed). Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. N Engl J Med 1997;337:1861-1869
42. Thomas MJG, Gillon J, Desmond MJ (1996). Consensus conference on autologous transfusion: preoperative autologous donation. Transfusion 36:633-639
43. Transfusionsgesetz, 1. Juli 1998. Bundesgesetzblatt I, S.1752ff
44. Vamvakas EC (2000). Autologous transfusion and other approaches to reduce allogeneic blood exposure. Baillière's Clin Haematol 13:533-547
45. Von Decastello A, Sturli A (1902). Über die Isoagglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen. MMW 49:1090-1095
46. Wahr JA, Trouwborst A, Spence RK, Henny CP, Cernaianu AC, Graziano GP, Tremper KK, Flaim KE, Keipert PE, Faithfull NS (1996). A pilot study of the effects of perflubron emulsion, AF0104, on mixed venous oxygen tension in anesthetized surgical patients. Anesth Analg 82:103-107
47. Weisbach V, Corbière C, Strasser E, Zingsem J, Zimmermann R, Eckstein R (2001). The variability of compensatory erythropoiesis in treated autologous blood donation. Transfusion 41:179-183

# Regulationsmechanismen hämatopoetischer Stammzellen

K. Terres und S. O. Peters

## Einleitung

In der folgenden Übersicht gehen wir auf einige biologische Besonderheiten von Blutstammzellen ein. Dabei werden wir zunächst die ontogenetische Entwicklung beschreiben und anschließend die für die klinische Transplantation wichtigen Zusammenhänge des Zellzyklus und die Regulation hämatopoetischer Stammzellen mittels Wachstumsfaktoren erläutern. Ein größerer Abschnitt dieser Übersicht beschreibt einige der für die Anhaftung der Blutstammzellen im Knochenmark und Blutgefäß wichtigen Oberflächenmoleküle.

Die Grundlage aller Blutzellen bildet ein kleiner Pool pluripotenter Stammzellen. Eine Stammzelle ist definiert als Zelle, die sowohl zur Selbsterneuerung als auch zur Differenzierung fähig ist. Diese beiden Vorgänge halten sich die Waage, so dass die Stammzellpopulation während des gesamten Lebens ungefähr gleich groß bleibt. Die für eine bestimmte Zelllinie determinierten Vorläuferzellen können sich unter normalen Umständen nicht mehr selbst erneuern. Sie haben die Aufgabe, die verloren gegangenen und durch natürliche Mechanismen zerstörten reifen Zellen fortlaufend zu ersetzen. Im Durchschnitt müssen im Knochenmark allein für den Ersatz verbrauchter Zellen täglich etwa  $2 \times 10^{11}$  Erythrozyten und  $10^{10}$  Granulozyten produziert werden. Menschliche Stammzellen können im Rahmen der Selbsterneuerung etwa 50 Zellteilungen durchlaufen und reichen somit dank einer bemerkenswerten numerischen Expansion während der Differenzierung zu reiferen Zellen aus, um das hämatopoetische System eines erwachsenen Menschen für seine gesamte Lebensdauer aufrechtzuerhalten.

In den letzten zwei Jahrzehnten sind viele Wachstumsfaktoren identifiziert worden, die als essenzielle extrazelluläre Faktoren bei der Zellproliferation und -differenzierung gelten. Einige, z. B. stem cell factor (SCF), Interleukin 3 (IL-3) und granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), spielen dabei für viele verschiedene Vorläuferzellen des Blutes eine Rolle. Andere, wie beispielsweise Erythropoietin (EPO), granulocyte-stimulating colony factor (G-CSF) und Thrombopoietin (TPO), üben ihre Wirkung auf Vorläuferzellen einer ganz bestimmten Zelllinie aus.

Eine bedeutende Rolle kommt dem Knochenmarkstroma, auch microenvironment genannt, zu. Es produziert

zum einen viele Regulationsfaktoren, zum anderen ermöglicht es zelluläre Interaktionen, die für das Überleben und die Funktion des Stammzellkompartiments wichtig sind.

Dieses hämatopoetische microenvironment des Knochenmarks besteht aus vielen verschiedenen Zelltypen, die als extrazelluläre Matrix zusammengefasst werden. Zu ihnen gehören Makrophagen, Fibroblasten, Adipozyten, Endothelzellen und Osteoblasten. Zudem exprimieren Stammzellen Integrine, sog. Adhäsionsmoleküle, die mit ihren jeweiligen Rezeptoren und auch extrazellulären Matrixmolekülen, wie z. B. Fibronectin, innerhalb des Knochenmarkstromas interagieren.

## Embryonalphase

Stammzellen entstehen im Verlauf der embryonalen Entwicklung. Bei Säugetieren erscheinen im extraembryonalen Dottersack erste Blutzellen, die sog. embryonalen, kernhaltigen Erythrozyten. Sie exprimieren bestimmte Transkriptionsfaktoren und bestimmen somit das hämatopoetische Schicksal aller nachfolgenden Zellen. Im Embryo wandern die vom Mesoderm abstammenden Vorläuferzellen z. B. in die Aorta, die Gonaden und die Mesonephrosregion (29). Wenn die Entwicklung fortschreitet, wandern hämatopoetische Stammzellen (HSZ) in die fetale Leber. Während dieses Aufenthalts können einige HSZ in die jeweiligen Vorläuferzellen für die myeloische und lymphatische Zellreihe differenzieren. Kurz vor der Geburt siedeln sich die HSZ im Knochenmark an, dem Ort, an dem die Blutbildung während der gesamten Lebenszeit stattfindet.

Anders als epitheliale und embryonale Stammzellen liegen HSZ nicht eng beieinander. Das mag erklären, warum es ein langer Weg ist, bis sie ihre eigene Nische gefunden haben. Sogar im erwachsenen Organismus werden Stammzellpopulationen und deren Vorläuferzellen mit einem limitierteren Potenzial in peripherem Blut, der Milz, Leber und Knochenmark gefunden.

## Die Entdeckung der Stammzelle

1949 und 1951 zeigten Jacobsen et al. und Lorenz et al. erstmals, dass intravenös injiziertes Knochenmark letal bestrahlte Tiere vor dem Tod infolge hämatopoetischer Insuffizienz retten konnte (23, 27). 1961 zeigten Till

und McCulloch, dass dies auch mit HSZ, die aus der Milz stammen, möglich ist (46). Sie injizierten bestrahlten Mäusen hämatopoetisches Gewebe, das multipotente Vorläuferzellen enthielt, die sie colony-forming unit-spleen nannten (CFU-S). Diese Vorläuferzellen reichert sich an der Milzoberfläche an und bildeten in den darauf folgenden Wochen Kolonien aus, die sowohl ausdifferenzierte Blutzellen als auch eine kleine Anzahl undifferenzierter CFU-S-Zellen enthielten. Die beiden Forscher folgerten, dass die CFU-S aufgrund von Selbsterneuerungsprozessen entstanden sein mussten. Das Auszählen dieser von Stammzellen abgeleiteten Kolonien auf der Milzoberfläche lässt dabei einen Rückschluss auf die Menge der transplantierten Stammzellen zu.

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, können HSZ eingeteilt werden in Longterm-HSZ (LT-HSZ), die aufgrund ihres hohen Potenzials zur Selbsterneuerung die hämatopoetische Rekonstruktion während des gesamten Lebens gewährleisten, und Shortterm-HSZ (ST-HSZ), die nur in einer begrenzten Zeitspanne zur Rekonstruktion beitragen (51). Diese ST-HSZ werden im CFU-S-Versuch erfasst. Aus ihnen können keine LT-HSZ hervorgehen; sie erneuern sich jedoch selbst oder differenzieren in multipotent progenitors (MPP, Vorläuferzellen). Jedes Differenzierungsstadium stellt dabei einen funktionell irreversiblen Reifungsschritt dar.

Aufgrund dieser ersten Stammzellversuche definierte man Anfang der 60er Jahre eine HSZ als eine Zelle, die zum einen radioprotektiv, zum anderen in der Lage ist, in Zellen aller hämatopoetischen Reihen auszdifferenzieren, und darüber hinaus die Möglichkeit zur Selbsterneuerung aufweist. Nach Größe, Dichte und Expression bestimmter Zelloberflächenmarker (Abb. 2) wurden die HSZ schließlich unterteilt (43). Die HSZ wurden zunächst bei Mäusen über die Expression des stem cell antigen (SCA-1<sup>+</sup>), die geringe Expression des

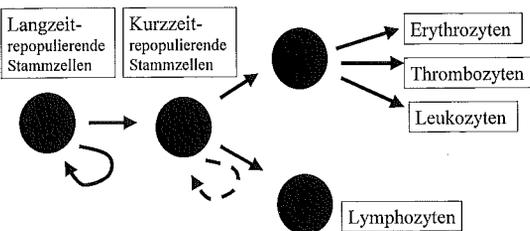


Abb. 1: Hierarchischer Stammbaum der Blutbildung. Aus der frühen langzeitrepopulierenden Stammzelle (verantwortlich für langzeitrepopulation nach Transplantation) mit uneingeschränktem Selbsterneuerungspotenzial entwickeln sich kurzzeitrepopulierende Stammzellen mit eingeschränktem Selbsterneuerungspotenzial, die in alle Zelltypen der Blutbildung ausreifen.

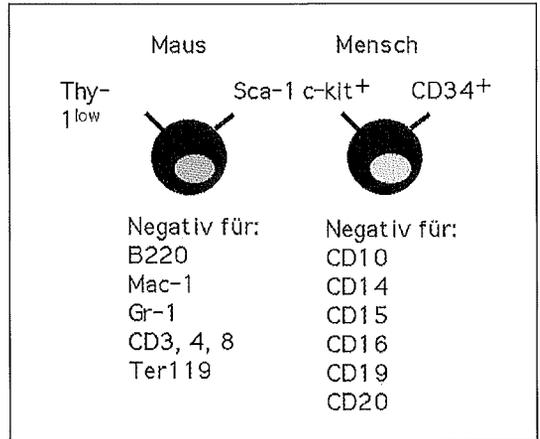


Abb. 2: Charakteristische Oberflächenmoleküle hämatopoetischer Stammzellen der Maus und des Menschen

Thy-1-Markern (Thy-1<sup>low</sup>) und über das völlige Fehlen eines hämatopoetischen linienspezifischen Markers (lin<sup>-</sup>) definiert. Diese SCA<sup>+</sup>Thy-1<sup>low</sup>lin<sup>-</sup>-Zellen machen circa 0,05 % der Knochenmarkzellen aus (43, 48). Beim Menschen entspricht diese Population von HSZ in etwa CD34<sup>+</sup>HLADR<sup>-</sup>lin<sup>-</sup>-Zellen. Diese Zellen spielen in der klinischen Stammzelltransplantation eine entscheidende Rolle. CD34 ist ein transmembranöses Zelloberflächensialomucin, das von frühen hämatopoetischen Zellen und auf Endothelzellen exprimiert wird (5).

Das Auftreten des MHC-Klasse-II-Moleküls (MHC: major histocompatibility complex) HLADR an der Oberfläche von HSZ gilt als einer der ersten Schritte im Zuge der hämatopoetischen Differenzierung (38). Ob die früheste HSZ HLADR<sup>+</sup> oder HLADR<sup>-</sup> ist, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Huang und Verstappen konnten zeigen, dass aus einer pluripotenten CD34<sup>+</sup>HLADR<sup>-</sup>-Stammzelle eine Population hervorgeht, die zum einen CD34<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>-HSZ, zum anderen CD34<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>-HSZ und HLADR<sup>-</sup>-Stromazellen enthielt (16). Da diese HLADR<sup>+</sup>-Zelle ebenfalls Ausgang aller Zellen der Hämatopoese ist, wird sie als echte Stammzelle angesehen (17) und könnte somit der ST-HSZ entsprechen. Ein möglicher Grund für die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen ist die Selbsttoleranz während der Ontogenese.

Bislang ging man davon aus, dass sich die meisten HSZ normalerweise in einem Ruhezustand (G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus) befinden. Nur 3–4 % der LT-HSZ ausgewachsener Mäuse befinden sich in S/G<sub>2</sub>/M-Phasen des Zellzyklus (32). Vermutlich durchlaufen die meisten Vorläuferzellen und ein Teil der LT-HSZ – wenn auch langsam – regelmäßig den Zellzyklus (36). Bei Säugetieren, deren HSZ mittels Wachstumsfaktoren

aus dem Knochenmark in das Blut mobilisiert wurden, befanden sich die HSZ innerhalb des Knochenmarks und der Milz zunächst im Zellzyklus. Die aus dem peripheren Blut isolierten HSZ waren jedoch in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase (49).

Die Differenzierung einer Stammzelle bis hin zu einer reifen Blutzelle ist abhängig von ihrer Antwort auf eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren. SCF (stem cell factor, c-kit ligand) nimmt dabei eine außerordentliche Rolle ein und wird hauptsächlich von Stromazellen des Knochenmarks gebildet (55, 19). HSZ exprimieren den SCF-Rezeptor c-kit, eine Tyrosinkinase (55, 22). SCF ist beteiligt an der Selbsterneuerung der HSZ und an der Ausschleusung von Zellen aus dem HSZ-Pool. Dabei reagieren HSZ nicht auf einen Wachstumsfaktor allein, sondern auf einen Cocktail verschiedener Faktoren. So wird beispielsweise durch die Kombination von SCF mit IL-1, IL-3 und IL-6 die Proliferation entlang der myeloischen und erythrozytären Linie initiiert, während die Zugabe von G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) oder GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) die Differenzierung der HSZ zu myeloischen Vorläuferzellen begünstigt (6). Eine wirkungsvolle Kombination zur In-vitro-Behandlung von HSZ besteht aus IL-3, IL-6, IL-11 und SCF (35).

Kit ist der Ligand für SCF. Die Mehrzahl CD34<sup>+</sup>-hämatopoetischer Zellen sind kit<sup>+</sup>. Die unreifsten Untergruppierungen von CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimieren CD33, CD38, HLADR und c-kit (45). Im Verlauf ihrer weiteren Differenzierung in die reifen Zelllinien bilden hämatopoetische Stammzellen sequenziell spezifische Rezeptoren für weitere Wachstumsfaktoren (z. B. Epo, GM-CSF) aus (28). Während der Differenzierung in erythrozytäre Zellen verlieren die unreifen CD34<sup>+</sup>kit<sup>+</sup>-Zellen allmählich ihre CD34-Expression. Gleichzeitig wird der Erythropoietin-Rezeptor (EPO-R) hochreguliert (8). Reifere Normoblasten behalten den EPO-Rezeptor während des Ausreifens selbst nach Verlust des Transferrinrezeptors und c-kit.

Stromazellen werden als Hauptbildungsort für Wachstumsfaktoren angesehen. HSZ und Stromazellen leiten sich beide vom Mesoderm ab und wurden bislang als unterschiedliche Entitäten angesehen. Singer et al. beschrieben jedoch gemeinsame Vorläuferzellen für Stromazellen- und hämatopoetische Zellen (40).

CD34<sup>+</sup>-HSZ sind zur hämatopoetischen Rekonstitution befähigt. Stromazellen sind CD34<sup>-</sup>. Von Knochenmarkstroma abgeleitete fibroblastenähnliche CD34<sup>-</sup>-Zellen könnten Ausgangspunkt sein für CD34<sup>+</sup>-Zellen, von denen sich hämatopoetische Kolonien ableiten lassen und die für eine Langzeitkultivierung geeignet sind (20). Wichtige Wachstumsfaktoren der CD34-Differenzierung in Richtung hämatopoetischer Vorläuferzel-

len sind SCF und IL-6. Unter besonderen Umständen kann IL-6 diese Progression in eine CD34<sup>+</sup>-HSZ umkehren. Diese Eigenschaft kann man sich im Rahmen der klinischen Stammzelltransplantation zunutze machen (21).

Immerhin konnte für menschliche CD34<sup>+</sup> fibroblastenähnliche Zellen gezeigt werden, dass sich HSZ aus ihnen entwickeln können. Sie exprimieren c-kit und mesenchymale Marker wie z. B. Osteocalcin.

### **Die Rolle von Adhäsionsmolekülen bei der Mobilisierung und dem Homing von CD34<sup>+</sup>-Zellen**

Adhäsionsmechanismen zwischen HSZ und dem Knochenmarkstroma spielen eine zentrale Rolle bei Migration, Zirkulation und Proliferation von HSZ, sowohl während der Embryogenese als auch postnatal (50). Die beteiligten Moleküle zählen zu den  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrinen, zu den Selektin- und Superimunglobulinfamilien und wurden erstmals im Kontext mit Leukozyten bei Entzündungsprozessen beschrieben (42, 44, 25). Die jeweils entsprechenden Liganden werden auf Endothelzellen und akzessorischen Knochenmarkzellen exprimiert oder sind Teil der extrazellulären Matrix des Knochenmarkstromas. L-Selektin z. B., das den initialen Kontakt zwischen Leukozyten und dem Endothel vermittelt, wird stark auf zirkulierenden CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen exprimiert. Man nimmt daher an, dass es eine Rolle bei dem Homing – dem Einnisten – von Stammzellen nach Transplantation spielt (30).

Die  $\beta$ 1-Integrine very late antigen 4 (VLA-4, CD29/CD49d) und VLA-5 (CD29/CD49e) scheinen ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion hämatopoetischer Vorläuferzellen an das Knochenmarkstroma zu spielen. Bei VLA-4 gilt dies sowohl für die Mobilisierung als auch für das Homing von CD34<sup>+</sup>-Zellen (37, 53, 14). VLA-4 wird auf der Mehrzahl mononukleärer hämatopoetischer Zellen exprimiert und bindet an vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) und das extrazelluläre Matrixprotein Fibronektin. Der Beginn der VLA-1-vermittelten Mobilisierung hängt von einem aktiven SCF-c-kit-Signalisierungsweg ab (34). Zirkulierende CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimieren weniger VLA-4 als knochenmarkständige CD34<sup>+</sup>-Zellen. Studien mit Mäusen und Primaten haben gezeigt, dass die Anzahl zirkulierender hämatopoetischer Vorläuferzellen nach systemischer Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen VLA-4 signifikant erhöht ist. Es lässt sich daher folgern, dass das Festhalten der Stammzellen in der Knochenmarknische bzw. das Freisetzen von CD34<sup>+</sup>-Zellen und deren Zirkulation im Organismus an das Vorhandensein von VLA-4 geknüpft ist (30, 37, 34, 52, 26, 9).

Weitere Studien konnten eine funktionelle Veränderung des VLA-4-Rezeptors auf mobilisierten CD34<sup>+</sup>-

Zellen zeigen. Dabei verhielt sich die Anzahl zirkulierender CD34<sup>+</sup>-Zellen invers zu dem Aktivierungs-, nicht jedoch zu dem Expressionsgrad von VLA-4 (26). Der funktionelle Status eines Rezeptors kann schneller verändert werden als der Gehalt der Proteinexpression an der Zelloberfläche. Die Mechanismen, die bei der Inaktivierung von VLA-4 auf zirkulierenden CD34<sup>+</sup>-Zellen mitwirken, sind nicht eindeutig geklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass z. B. Magnesiumionen eine Aktivierung des VLA-4-Rezeptors bewirken (26).

Neben VLA-4 ist das  $\beta$ 2-Integrin leukocyte function-associated molecule-1 (LFA-1, CD18/CD11a) an der Interaktion von hämatopoetischen CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen und Knochenmarkstroma beteiligt. Intercellular adhesion molecule-1 und -2 (ICAM-1 und ICAM-2) sind Liganden für LFA-1 und gehören zur Superimunglobulinfamilie. Auf zirkulierenden CD34<sup>+</sup>-Zellen ist die LFA-1-Expression niedriger als auf jenen im Knochenmark (30). Adhäsion an und Migration durch das Endothel kann durch monoklonale Antikörper gegen LFA-1 gehemmt werden (30, 31).

Weitere Adhäsionsmoleküle, die eine Rolle spielen, sind platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), CD18 und CD44. Die Liganden für CD44, Hyaluronsäure und Fibronektin, werden von Stromazellen sezerniert. Antikörper gegen CD44 verhindern die Adhäsion im Knochenmark und mobilisieren Vorläuferzellen (24, 33). Antikörper gegen PECAM-1 und CD18 verhindern die Migration humaner primitiver Zellen durch das Endothel (54). Neben dem engen Zusammenspiel von Rezeptoren und Gegenrezeptoren auf HSZ und Stromazellen gibt es Hinweise dafür, dass gap junctions zwischen einzelnen Stromazellen sowie zwischen hämatopoetischen Zellen und Stromazellen bestehen (38).

Stromazellen produzieren stroma cell derived factor-1 (SDF-1), ein Chemokin, das eine große Rolle bei der Stammzellmigration spielt (1). CXCR-4 ist der zelluläre Rezeptor für SDF-1 und wird in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus von CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimiert. CXCR-4 dient als Korezeptor für T-Zell-trope HIV-1-Stämme (7). SDF-1 wirkt chemotaktisch auf Stammzellen und Vorläuferzellen und unterstützt während der embryonalen Entwicklung die Wanderung der Stammzellen von der Leber ins Knochenmark. Es ist denkbar, dass ein vom Knochenmark ausgehender Gradient dieses Chemokins die Stammzellen aus dem peripheren Blut in das Knochenmark und letztendlich in ihre Nische leitet (Abb. 3). Mäuse, die nicht zur Produktion von SDF-1 bzw. CXCR-4 fähig sind, sterben perinatal u. a. an einer extremen Knochenmarkinsuffizienz. Studien mit Embryonen in einem frühen Entwicklungsstadium solcher defizienten Tiere haben gezeigt, dass die Myelopoese davon unberührt bleibt. Daher wird angenommen, dass der beobachtete Defekt der Myelopoese

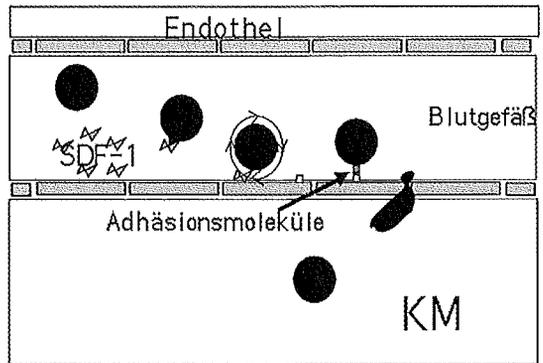


Abb. 3: Homing-Vorgänge transplanteder Blutstammzellen. Die HSZ findet ihren Weg nach der Transplantation aus dem Blutgefäß SDF-1-vermittelt durch das Endothel in das Knochenmark.

im neonatalen Knochenmark eine Konsequenz der verschlechterten Migration der Stammzellen ist. Studien haben gezeigt, dass myeloetische Vorläuferzellen bei o. g. defizienten Tieren in normaler Anzahl in der Leber gefunden werden, was dafür spricht, dass diese Zellen aus anderen Regionen ihren Weg in die Leber bereits gefunden haben (2).

Neben Zytokinen und Wachstumsfaktoren sind eine Reihe von Transkriptionsregulatoren für die Aufrechterhaltung der Hämatopoese bekannt. Transkriptionsfaktoren spielen in der Feinregulation der Genexpression auf DNA-Ebene eine entscheidende Rolle. So ist der Transkriptionsfaktor GATA-2 essenziell für die Proliferation und das Überleben hämatopoetischer Vorläuferzellen (47). Die Expression eines weiteren Transkriptionsfaktors, PU.1, scheint die Differenzierung von HSZ zu bewirken (11).

Studien mit transgenen und Knockout-Mäusen lassen allerdings den Schluss zu, dass es sich nicht um ein geradliniges Modell handelt, in dem z. B. ein Transkriptionsfaktor für die Ausbildung einer Zellreihe verantwortlich ist. Es scheint, dass HSZ viele der vermeintlich auf spezielle Zelllinien beschränkten Transkriptionsfaktoren koexprimieren (15).

Des Weiteren sind noch keine Kandidatenproteine bekannt, die als differenzierungsspezifische Signale dienen könnten. So aktiviert EPO-R u. a. JAK2, STAT5, Grb2, SHC, ras, raf, Mitogen-aktivierte Proteinkinase, die Phosphatasen SHP1 und SHP2, Proteinkinase C, PIP-3-Kinase und Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ). Diese Signalkaskade ist jedoch nicht EPO-R-spezifisch, sondern kann durch eine Vielzahl anderer Wachstumsfaktor-rezeptoren aktiviert werden (40, 12). In einer Studie wurde ein nativer Zytokinrezeptor durch einen heterologen Rezeptor ersetzt. Erythrozytäre Vorläuferzellen wurden mit retroviralen Konstrukten infiziert, die den

Prolaktinrezeptor, einen nicht hämatopoetischen Rezeptor, kodierten. Diese Zellen wurden in vitro mit Prolaktin, jedoch ohne Zugabe von EPO kultiviert. Überraschenderweise wurde eine Differenzierung zu Erythrozyten beobachtet. Goldsmith et al. konnten zeigen, dass die zytoplasmatische Domäne von drei weiteren Rezeptoren derselben Subfamilie in ähnlicher Weise die EPO-R-vermittelte erythrozytäre Differenzierung in vitro ersetzt (growth-hormone receptor, G-CSF receptor, c-mpl) (12).

### Alternative Differenzierung

Neuartige Studienergebnisse revolutionieren die Stammzellforschung im Verlauf der letzten Jahre. Während man bislang davon ausging, dass Knochenmarkstammzellen im Erwachsenenalter lediglich der Blutbildung dienen, zeigte sich, dass sich aus HSZ möglicherweise andere Gewebe ableiten lassen. Transplantationsstudien an Nagetieren zeigten, dass Stammzellen aus dem Knochenmark nicht nur Blutzellen, sondern auch Leber-, Muskel- und andere Gewebe bilden könnten (13, 10, 18). Umgekehrt können Zellen aus Muskelgewebe zur Blutbildung beitragen (Abb. 4), wobei bislang unklar ist, ob die Stammzelle mesenchy-

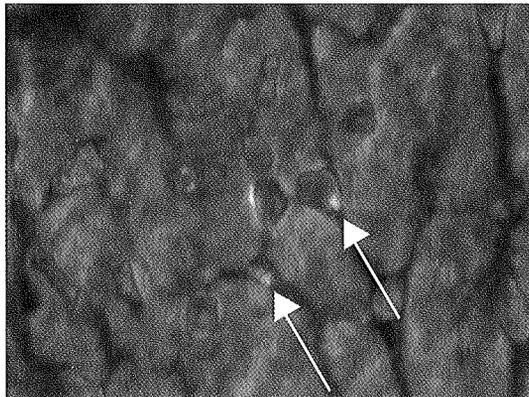


Abb. 4: Im Tiermodell lassen sich 12 Wochen nach Transplantation von männlichem Knochenmark im Herzen der weiblichen Empfängertiere männliche Zellen nachweisen. Das Bild zeigt das im Original grün markierte männliche Y-Chromosom inmitten negativer weiblicher Zellen (FISH-Technik/Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung).

malen oder hämatopoetischen Ursprungs ist (3, 4). Solange früheste Stammzellen nicht eindeutig einer Zelllinie zugeordnet werden können, wird die Möglichkeit der alternativen Differenzierung spekulativ bleiben.

### Schlusswort

Die Möglichkeit der Isolierung von Stammzellen und eine Fülle neuartiger Erkenntnisse über die embryonale

Stammzellentwicklung eröffnet dem medizinischen Feld der Transplantationsmedizin enorme Möglichkeiten. Bei der Einführung in die klinische Medizin muss äußerste Sorgfalt gelten, um neben vermeintlichem Nutzen die Risiken der Verfahren rechtzeitig zu entdecken. So ist denkbar, dass sich aus manipulierten embryonalen Stammzellen bösartige Tumoren entwickeln. Die Stammzellbiologie wirft eine Reihe ethischer Fragen auf. In besondere Kritik ist die Verwendung embryonaler Stammzellen geraten, die nur zum Zwecke der medizinischen Verwendung gewonnen werden. Derzeitige Forschungsbemühungen zielen darauf hin, somatische (d. h. körpereigene) Stammzellquellen zu ergründen, die den Gebrauch embryonaler Stammzellen ersetzen. Adulte Stammzellen bieten im Vergleich zu embryonalen Stammzellen möglicherweise eingeschränkte therapeutische Anwendbarkeit, besitzen jedoch den Vorteil, dass ethische Bedenken gering sind.

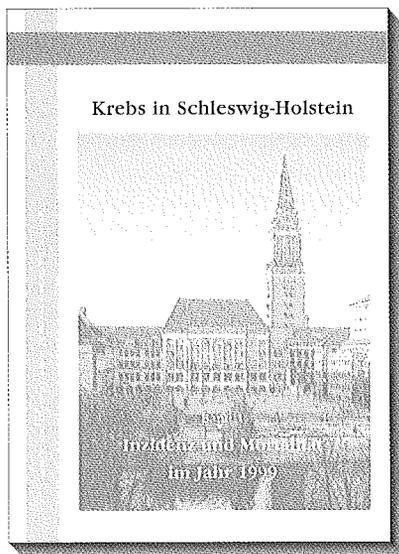
Die Möglichkeit der genetischen Manipulation embryonaler Stammzellen (therapeutisches Klonen) stellt einen derzeit nicht überschaubaren Eingriff in die Natur dar. Hier müssen strenge gesetzliche Regulativen die Menschheit vor Missbrauch schützen.

### Literatur

1. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC (1997) The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34<sup>+</sup> progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 185: 111-120
2. Arroyo A, Yang J, Rayburn H, Hynes RO (1996) Differential requirements for  $\alpha 4$  integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell* 85: 997-1008
3. Bauermeister K, Kaczmarek PM, Ivandic BT, Branke B, Wiedemann G, Wagner T, Peters SO (2001) Localisation of Bone Marrow-Derived Cells in Cardiac Tissue in Anthracycline-Induced Cardiomyopathy and Myocardial Infarction. *Blood* 98 (a)
4. Bauermeister K, Branke B, Simon JP, Nadrowitz R, Wagner T, Peters SO (2001) Low competitive engraftment potential of hematopoietic progenitor cells from muscle tissue. *Experimental Hematology* 29 (a): 85
5. Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C Lasky, LA (1994) Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 84: 2554-2561
6. Bernstein ID, Andrews RG, Zsebo KM (1991) Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> cells, and the generation of colony-forming cell progeny from CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> cells cultured with interleukin-3 (IL-3), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), or granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). *Blood* 77: 2316-2321
7. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Soderstrom J, Springer TA (1996) The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382: 829-833

8. Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T (1991) Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* 77: 2583-2590
9. Craddock CF, Nakamoto B, Andrews RG, Priestley GV, Papayannopoulou T (1997) Antibodies to VLA4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. *Blood* 90: 4779-4788
10. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279 (5356): 1528-1530
11. Glimcher LH, Singh H (1999) Transcription factors in lymphocyte development- T and B cells get together. *Cell* 96: 13-23
12. Goldsmith MA, Mikami A, Yun Y, Liu KD, Thomas L, Pharr P, Longmore GD (1998) Absence of cytokine receptor-dependent specificity in red blood cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7006-7011
13. Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, Mi T, Wang H, Pocius J, Hartley JC, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK (2001) Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 938: 208-218
14. Hamamura K, Matsuda H, Takeuchi Y, Habu S, Yagita H, Okumura K (1996) A critical role of VLA-4 in erythropoiesis in vivo. *Blood* 87: 2513-2517
15. Hu M, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C, Enver T (1997) Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* 11: 774-785
16. Huang S, Terstappen LW (1994) Formation of hematopoietic microenvironment and hematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 368: 664 (correction)
17. Huang S, Terstappen LW (1994) Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> hematopoietic stem cells. *Blood* 83: 1515-1526
18. Jackson KA, Mi T, Goodell MA (1999) Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14482-14486
19. Huss R, Hong D-S, Beckham C, Kimball L, Myerson DH, Storb R, Deeg HJ (1995) Ultrastructural localization of stem cell factor in canine marrow-derived stromal cells. *Exp Hematol* 23: 33-40
20. Huss R, Hong DS, McSweeney PA, Hoy CA, Deeg HJ (1995) Differentiation of canine marrow cells with hematopoietic characteristics from an adherent stromal cell precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 748-752
21. Huss R, Günther W, Schumm M (1997) CD34-negative hematopoietic stem cells isolated from human peripheral blood cells as ultimate precursors of hematopoietic progenitors. *Infusionsther Transfusionsmed* 24: 404-409
22. Ikuta K, Weissman IL (1992) Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1502-1506
23. Jacobsen LO, Marks EK, Robson MJ (1949) Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. *J Lab Clin Med* 34: 1538-1543
24. Khaldoynidi S, Denzel A, Zöllner M (1996) Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells. *J Leukoc Biol* 60: 579-592
25. Kinashi T, Springer TA (1994) Adhesion molecules in hematopoietic cells. *Blood Cells* 20: 25-44
26. Lichterfeld M, Martin S, Burkly L, Haas R, Kronenwett R (2000) Mobilization of CD34<sup>+</sup> haematopoietic stem cells is associated with a functional inactivation of the integrin very late antigen 4. *Br J Haematol* 110: 71-81
27. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR (1951) Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 12: 179-201
28. McKinstry WJ, Li CL, Rasko JE, Nicola NA, Johnson GR, Metcalf D (1997) Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 89: 65-71
29. Medvinsky A, Dzierzak E (1996) Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the A/GM region. *Cell* 86: 897-906
30. Möhle R, Murea S, Kirsch M, Haas R (1995) Differential expression of L-selectin, VLA-4, and LFA-1 on CD34<sup>+</sup> progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF-enhanced recovery. *Exp Hematol* 23: 1535-1542
31. Möhle R, Moore MA, Nachman RL, Rafii S (1997) Transendothelial migration of CD34<sup>+</sup> and mature hematopoietic cells: an in vitro study using a human bone marrow endothelial cell line. *Blood* 89: 72-80
32. Morrison SJ, Wright DE, Cheshier SH, Weissman IL (1997) Review: Hematopoietic stem cells: Challenges to expectations. *Curr Opin Immunol* 9: 216-221
33. Oostendorp RA, Spitzer E, Brandl M, Eaves CJ, Dormer P (1998) Evidence for differences in the mechanisms by which antibodies against CD44 promote adhesion of erythroid and granulopoietic progenitors to marrow stromal cells. *Br J Haematol* 101: 436-445
34. Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B (1998) Anti-VLA4/VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway. *Blood* 91: 2231-2239
35. Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ (1996) Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood* 87: 30-37
36. Pietrzyk ME, Priestley GV, Wolf NS (1985) Normal cycling patterns of hematopoietic stem cell subpopulations: an assay using long-term in vivo BrdU infusion. *Blood* 66: 1460-1462
37. Prosper F, Stroncek D, McCarthy JB, Verfaillie CM (1998) Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of alpha4 beta1 integrin expression and function. *J Clin Invest* 101: 2456-2467
38. Radka SF, Charron DJ, Brodsky FM (1986) Review: Class II molecules of the major histocompatibility complex considered as differentiation markers. *Hum Immunol* 16: 390-400
39. Rosendaal M, Mayen A, de Koning A, Dunina-Barkovskaya T, Krenacs T, Ploemacher R (1997) Does transmembrane communication through gap junctions enable stem cells to overcome stromal inhibition? *Leukaemia* 11: 1281-1289
40. Singer JW, Charbord P, Keating A, Nemunaitis J, Raugi G, Wight TN, Lopez JA, Roth GJ, Dow LW, Fialkow PJ (1987) Simian virus-40 transformed adherent cells from human long-term cultures: cloned cell lines produce cells with stromal and adherent hematopoietic characteristics. *Blood* 70: 464-471
41. Socolovsky M, Constantinescu SN, Bergelson S, Sirotkin A, Lodish HF (1998) The prolactin receptor rescues EpoR<sup>-/-</sup> erythroid progenitors and replaces EpoR in a synergistic interaction with c-kit. *Adv Protein Chem* 52: 141-198

42. Soligo D, Schiro R, Luksch R, Manara G, Quirici N, Parravicini C, Lambertenghi, Deliliers G (1990) Expression of integrins in human bone marrow. *Br J Haematol* 76: 323-332
43. Spangrude GJ, Müller-Sieburg CE, Heimfeld S, Weissman IL (1988) Two rare populations of mouse Thy-1low bone marrow cells repopulate the thymus. *J Exp Med* 167: 1671-1683
44. Teixeira J, Hemler ME, Greenberger JS, Anklesaria P (1992) Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Invest* 90: 358-367
45. Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR (1991) Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> progenitor cells. *Blood* 77: 1218-1227
46. Till JE, McCulloch EA (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14: 213-222
47. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss MJ, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH (1994) An early hematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371: 221-226
48. Uchida N, Weissman IL (1992) Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1<sup>low</sup> Lin-Sca-1<sup>+</sup> cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med* 175: 175-184
49. Uchida N, He D, Friera AM, Reitsma M, Sasaki D, Chen B, Tsukamoto A (1997) The unexpected G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood. *Blood* 89: 465-472
50. Verfaillie CM, Hurley R, Bhatia R (1994) Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 16: 201-224
51. Weissman IL (2000) Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100: 157-168
52. Yamaguchi M, Ikebuchi K, Hirayama F, Sato N, Mogi Y, Ohkawara J, Yoshikawa Y, Sawada K, Koike T, Sekiguchi S (1998) Different adhesive characteristics and VLA-4 expression of CD34<sup>+</sup> progenitors in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> versus S<sup>+</sup>G<sub>2</sub>/M phases of the cell cycle. *Blood* 92: 842-848
53. Yanai N, Sekine C, Yagita H, Obinata M (1994) Roles for integrin very late activation antigen-4 in stroma-dependent erythropoiesis. *Blood* 83: 2844-2850
54. Yong KL, Watts M, Shaun TN, Sullivan A, Ings S, Linch DC (1998) Transmigration of CD34<sup>+</sup> cells across specialized and nonspecialized endothelium requires prior activation by growth factors and is mediated by PECAM-1 (CD31) *Blood* 91: 1196-1205
55. Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, Broudy VC, Martin FH, Atkins HL, Hsu RY, Birkett NC, Okino KH, Murdock DC (1990) Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63: 213-224



## Krebs in Schleswig-Holstein

Band 1

Inzidenz und Mortalität im Jahr 1999

Krebsregister Schleswig-Holstein –  
Institut für Krebs epidemiologie e.V.

von Alexander Katalinic, Miriam Holzmann,  
Carmen Bartel und Heiner Raspe

88 Seiten mit diversen Statistiken und Tabellen, kartoniert, Format A4  
ISBN 3-7950-0771-2, € 10,00

Das Krebsregister Schleswig-Holstein liefert wichtige Beiträge zur Beurteilung der Gesundheitslage und zur Krebsbekämpfung in Schleswig-Holstein. So bündelt es flächendeckend die Meldungen von Krebsneuerkrankungen, wertet diese aus und stellt die Ergebnisse für Forschung, Gesundheitswesen und -politik zur Verfügung. Ihm kommt daher ein hoher gesundheitspolitischer Stellenwert zu.

Zu beziehen über den Buchhandel oder direkt bei

Verlag Schmidt-Römhild · Mengstr. 16 · 23552 Lübeck · Tel.: (04 51) 70 31-213 · Fax: 70 31-2 81  
E-Mail: sgoerss@schmidt-roemhild.de · Internet: www.schmidt-roemhild.de

## Hypoxie induziert HIF-3 $\alpha$ auf transkriptioneller Ebene

F. Fröhlich, M. Heidbreder, A. Dendorfer, O. Jöhren, F. Qadri, P. Dominiak

### Zusammenfassung

Die Rolle des Hypoxie-induzierbaren Faktors-(HIF)-1 $\alpha$  bzw. -1 $\beta$  ist hinsichtlich seiner Zellantwort auf Hypoxie gut dokumentiert. Im Gegensatz dazu ist für die Faktoren HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$  bezüglich ihrer Organverteilung und Synthese-Regulation bisher nur sehr wenig bekannt.

Wir analysierten daher mittels der „real-time“-RT-PCR die mRNA-Expression aller bislang bekannten HIF-Untereinheiten, sowie die mRNAs ihrer Zielgene Erythropoietin (EPO) und Glukosetransporter 1 (GLUT1) an Ratten, die einer moderaten systemischen Hypoxie (65 mmHg) für eine Zeitspanne von 30 oder 120 Minuten ausgesetzt waren.

Bereits unter Normoxie waren für HIF-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -2 $\alpha$  und -3 $\alpha$  hohe mRNA-Mengen im zerebralen Cortex, im Hippocampus und in der Lunge nachweisbar. Myokardiales und Lebergewebe enthielten dagegen nur relativ geringe Mengen an HIF-spezifischen mRNAs. Die Expression von HIF-1 $\alpha$ , -1 $\beta$  und -2 $\alpha$  blieb auf mRNA-Ebene durch die moderate Hypoxie unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu führten die gewählten Versuchsbedingungen in allen Organen – mit Ausnahme der Leber – zu einem signifikanten Anstieg der HIF-3 $\alpha$ -mRNA.

Als Indikator für die Aktivierung des HIF-Systems wurden die HIF-Zielgene EPO und GLUT1 herangezogen. Nach zwei Stunden Hypoxie konnte ein signifikanter Anstieg dieser Zielgene im zerebralen Cortex, Hippocampus, Herz, Leber und Niere gemessen werden.

Im Westernblot zeigte sich im zerebralen Cortex eine Zunahme der Proteinspiegel der verschiedenen HIF-Untereinheiten, die mit der zunehmenden Dauer der Hypoxie korrespondierte.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass nur HIF-3 $\alpha$  auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, und dieser Untereinheit möglicherweise eine Bedeutung als schnell reagierende Komponente des HIF-Systems zum Schutz vor hypoxischen Schäden zukommt.

### Summary

The role of the hypoxia-inducible factor (HIF) subunits 1 $\alpha$  and 1 $\beta$  in response to cellular hypoxia is well established, whereas only little is known about HIF-2 $\alpha$  and

HIF-3 $\alpha$  with respect to their organ distribution and transcriptional regulation by hypoxia. Therefore, we investigated mRNA levels of all HIF subunits, and of their target genes encoding for erythropoietin (EPO) and glucose-transporter 1 (GLUT1) in rats undergoing a moderate systemic hypoxia (65 mmHg) for 30 or 120 min by real-time RT-PCR. Under normoxia, persistently high mRNA levels of all HIF subunits were detectable in cerebral cortex, hippocampus and lung, the heart contained the lowest amounts. In all organs analyzed, hypoxia did not affect mRNA levels encoding for HIF-1 $\alpha$ , -1 $\beta$  and -2 $\alpha$ . HIF-3 $\alpha$  mRNA levels increased in all organs examined after hypoxia was terminated. A significant rise of EPO and GLUT1 mRNA levels, indicating the activation of the HIF system, occurred in cortex, hippocampus, heart, liver and kidney after 2 h of hypoxia. Protein levels of all HIF subunits, determined in the cortex by immunoblotting, showed a marked increase corresponding to the duration of hypoxia. We suggest that induction on transcriptional level is a unique feature of HIF-3 $\alpha$ , which therefore may represent a rapidly reacting component of the HIF system in protection against hypoxic damage.

### Einleitung

Die Aufrechterhaltung der O<sub>2</sub>-Homöostase ist essenziell für die Existenz aller höher entwickelten Organismen. Auf zellulärer Ebene nimmt die Familie der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) eine zentrale Funktion in der Adaption auf Hypoxie ein [1]. Diese Anpassung beruht vor allem auf der Aktivierung des Energiestoffwechsels, der Angiogenese und der Erythropoese [2]. Ermöglicht wird dies durch Hochregulierung HIF-abhängiger Zielgene, was wiederum zur vermehrten Bildung von verschiedenen Glukosetransportern (GLUT) [3], glykolytisch wirksamen Enzymen [4], vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) [5] und Erythropoietin (EPO) [6] führt.

Das wissenschaftliche Augenmerk liegt momentan besonders auf HIF-1, einem Heterodimer, das sich aus einer redoxsensitiven  $\alpha$ -Untereinheit und einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit zusammensetzt [7]. Unter physiologischen Bedingungen wird HIF-1 $\alpha$  durch Proteolyse schnell abgebaut. Erst seit kurzer Zeit ist bekannt, dass dieser Abbau durch Prolyl-Hydroxylasen initiiert wird [8]. An der „Oxygen-Dependent-De-

gradation“-(ODD)-Domäne [9] des HIF-1 $\alpha$ -Proteins werden Prolyl-Reste hydroxyliert. Diese Hydroxylierung wiederum ist O<sub>2</sub>-abhängig [10]. An die hydroxylierte ODD-Domäne bindet dann das „von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein“ (pVHL) [11] und führt schließlich zum Abbau des HIF-1 $\alpha$ -Proteins durch das Ubiquitin-Proteasomen-System [12]. Aufgrund dieses Regulationsmechanismus werden die Prolyl-Hydroxylasen mittlerweile funktionell als intrazelluläre „Sauerstoffsensoren“ angesehen.

Tritt eine Hypoxie ein, unterbleibt die Hydroxylierung; das HIF-1 $\alpha$ -Protein bleibt „stabilisiert“ und transloziert in den Zellkern. Hier bildet es mit der HIF-1 $\beta$ -Untereinheit ein Heterodimer, welches wiederum unter Rekrutierung von Koaktivatoren [13,14] an das „Hypoxia Responsive Element“ (HRE) des entsprechenden Zielgens bindet [15].

Nach HIF-1 $\alpha$ , dessen Funktion und Regulation mittlerweile gut etabliert sind, wurden noch weitere zwei HIF- $\alpha$  Klassen entdeckt, das HIF-2 $\alpha$  und das HIF-3 $\alpha$ .

HIF-2 $\alpha$  weist funktionell Ähnlichkeiten mit HIF-1 $\alpha$  bezüglich der Proteinstabilisierung unter Hypoxie und der Dimerisation mit HIF-1 $\beta$  auf [16, 17]. Studien an murinen Stammzellen ergaben, dass HIF-2 $\alpha$  jedoch mehr eine Rolle in der Adaption auf Hypoglykämie zukommen scheint [18]. Über HIF-3 $\alpha$  ist kaum etwas bekannt. Möglicherweise ist auch diese HIF-Untereinheit in die Adaption auf Hypoxie involviert, wird wie HIF-2 $\alpha$  aber restriktiver exprimiert [19].

Die vorliegende Studie soll dazu beitragen, Veränderungen der momentan bekannten HIF-Untereinheiten während einer moderaten Hypoxie auf mRNA- und Proteinebene zu analysieren, besonders die Bedeutung von HIF-3 $\alpha$ . Zu diesem Zweck untersuchten wir die Expressionsmuster von HIF-1 $\alpha$ , -2 $\alpha$ , -3 $\alpha$  und -1 $\beta$  sowie der HIF-Zielgene GLUT1 und EPO mittels „real-time“-RT-PCR und Westernblot, wobei besonders frühe Phasen der Adaption auf Hypoxie erfasst werden sollten.

## Material und Methoden

### Versuchstiere

Männliche Wistar-Ratten (280-300g) wurden drei Gruppen von je 5 Tieren randomisiert zugeordnet und für einen Zeitraum von 0 h, 0,5 h oder 2 h einer systemischen normobaren Hypoxie in einer geschlossenen Kammer ausgesetzt, in welcher der Sauerstoffpartialdruck von 130 mm Hg durch Substitution von Stickstoff auf 65 mm Hg gesenkt wurde. Unmittelbar nach Ende der Hypoxie wurden die Versuchstiere getötet, die Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

### RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die Gewebe wurden in Guanidinisothiocyanat- und Mercaptoethanol-haltigen Puffern lysiert und homogenisiert [20]. Die Gesamt-RNA wurde anschließend über Silicagelmatrix-Säulen gereinigt und mit DNase I behandelt (RNeasy Kit, Qiagen, Hilden). Erst-Strang-cDNA wurde aus 1  $\mu$ g RNA in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden (dNTPs), RNase-Inhibitor, Oligo-(Desoxythymidin)<sub>15</sub>-Primern und AMV-Reverse-Transkriptase synthetisiert (Promega, Mannheim).

### Quantitative „real-time“ polymerase chain reaction (PCR)

Wie beschrieben [21], wurde die „real-time“-RT-PCR auf einem Gene-Amp 5700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Langen) unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green I durchgeführt, welcher unspezifisch in Doppelstrang-DNA interkaliert und somit in der PCR-Reaktion zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führt. Die Überprüfung der PCR-Produkt-Spezifität erfolgt nach Abschluss der PCR-Reaktion mittels Agarose- und Schmelzkurven-Analyse. Die PCR wurde in Anwesenheit der entsprechenden Sense- und Antisense-Primer, 100 ng cDNA und 1,25 E HotGoldStar DNA-Polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgien) mit 40 der folgenden Zyklen durchgeführt: 30 s Denaturierung bei 95°C, Primer-Hybridisierung und Elongation 1 min bei 60°C.

Die Quantifizierung der initialen mRNA-Kopienanzahl erfolgte mit der Zyklus-Schwellenwert-Methode [22]. Mittels Verdünnung bekannter Mengen der amplifizierten cDNA-Fragmente wurden Standardkurven erstellt. Für jede Probe wurde die Schwellenwert-Zykluszahl (C<sub>p</sub>) bei einem Fluoreszenz-Schwellenwert von 0,3 (R<sub>n</sub>) bestimmt und die entsprechende Zahl der mRNA-Kopien berechnet. Als interner Standard wurde die Anzahl der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-(GAPDH)-mRNA-Kopien bestimmt [23].

### Proteinextraktion und Westernblotting

Wie schon beschrieben [24], wurden die Proteine aus den verschiedenen Gewebeproben extrahiert und die Proteinkonzentrationen mit der Lowry-Methode bestimmt. Gleiche Mengen an Protein wurden in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Polyvinyliden-Difluorid-(PVDF)-Membran transferiert. Die Retention im Gel wurde durch Coomassie-Blau-Färbungen kontrolliert.

Für die Detektion der Zielproteine wurden Antikörper verwendet, die spezifisch mit HIF-1 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ , Aktin (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), HIF-1 $\beta$  (Becton Dickinson, Heidelberg) und HIF-2 $\alpha$  (Abcam, Bad Nauheim) reagieren. Diese Immunkomplexe wurden dann mit Peroxidase konjugierten anti-Maus- oder

anti-Kaninchen-Antikörpern markiert und durch Chemilumineszenz detektiert. Resultierende Banden wurden mit einer CCD-Kamera (ChemIDoc System, Quantity One Software, Bio-Rad, München) quantifiziert.

## Ergebnisse

### Expression von HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$ , HIF-2 $\alpha$ und HIF-3 $\alpha$ unter Normoxie

Die mRNA-Mengen der HIF-1 $\alpha$ -, HIF-1 $\beta$ -, HIF-2 $\alpha$ - und HIF-3 $\alpha$ -Untereinheiten wurden mittels „real-time“-RT-PCR analysiert. Das Amplifikationsprodukt der GAPDH war in allen Proben nachweisbar, ein Beleg für die Integrität der mRNA. Die Expression der HIF-mRNA unter Normoxie ist in Abb. 1 als mittlere Kopienanzahl pro 100 ng cDNA zusammengefasst. Da das zentrale Nervensystem als besonders empfindlich gegenüber Hypoxie gilt [25], entschieden wir uns, zwei funktionell unterschiedliche Regionen im Gehirn, den zerebralen Cortex und den Hippocampus zu untersuchen.

In allen Geweben war bereits unter Normoxie eine deutliche basale Expression aller HIF-Untereinheiten nachweisbar, ein Hinweis auf deren konstitutive Expression in diesen Geweben. Die Höhe der mRNA-Expression schien von der Art des Gewebes abhängig zu sein. Die höchste basale Expression trat im zerebralen Cortex, im Hippocampus und in der Lunge auf, was auf alle HIF-Untereinheiten zutraf. Vor allem in der Lunge war eine besonders hohe mRNA-Kopienanzahl zu beobachten, insbesondere im Fall von HIF-2 $\alpha$ . Die ermittelten Kopienzahlen lagen hier im Vergleich zum Herzen mehr als 100fach höher. Die Verteilungsmuster der verschiedenen HIF- $\alpha$ -Untereinheiten waren – auf einzelne Organe bezogen – ähnlich.

### Veränderung der EPO und GLUT1 mRNA Mengen unter Hypoxie

Der Sauerstoffpartialdruck, der in dieser Studie verwendet wurde, entspricht einer Höhe von etwa 5100 m. Diese Höhe wird normalerweise vom Säugetierorganismus für einige Stunden ohne Folgen toleriert [26]. Um die Aktivierung des HIF-Systems unter dieser moderaten Hypoxie nachzuweisen, wurden die HIF-Zielgene GLUT1 [3] und EPO [6] analysiert. In allen untersuchten Organen war unter Normoxie EPO-mRNA ausnahmslos nicht nachweisbar. Wie erwartet, trat nach 120 min Hypoxie ein ausgeprägter Anstieg der EPO-mRNA in der Niere auf, während in allen anderen Organen die EPO-mRNA-Expression weiter unter der Nachweisgrenze blieb.

Im Gegensatz zu EPO waren schon unter Normoxie vergleichsweise hohe GLUT1-mRNA-Mengen im zerebralen Cortex, Hippocampus und der Lunge nachweisbar. Eine 120minütige Hypoxie bewirkte signifi-

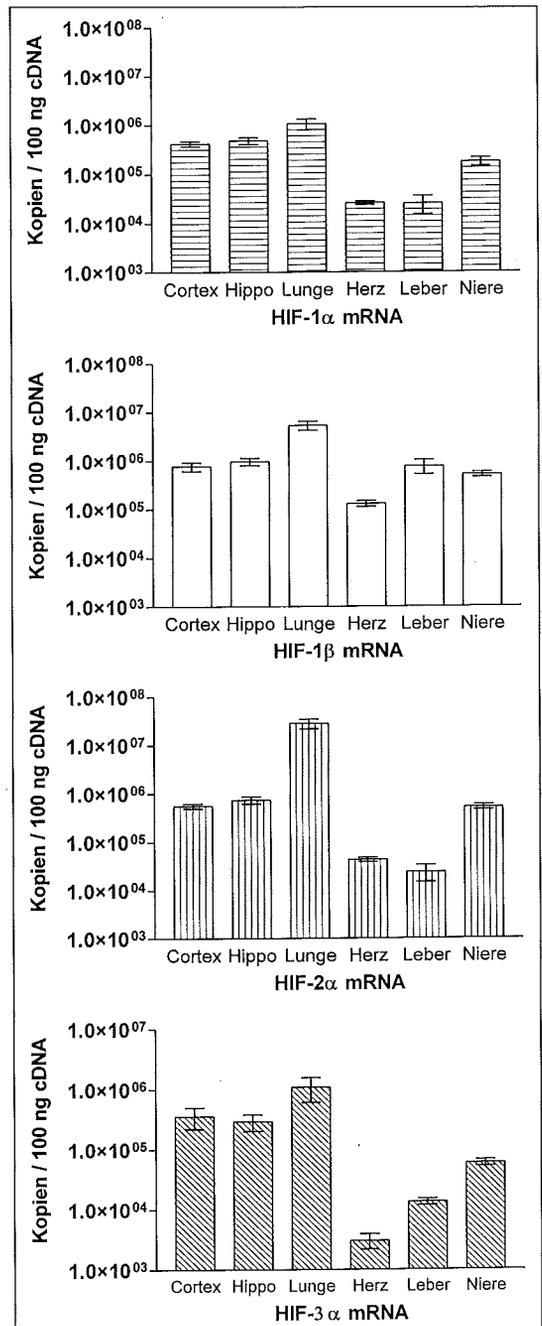


Abb. 1: HIF-1 $\alpha$ -, HIF-1 $\beta$ -, HIF-2 $\alpha$ - und HIF-3 $\alpha$ -mRNA-Gehalt im zerebralen Cortex, Hippocampus (Hippo), Lunge, Herz, Leber und Niere bei männlichen Wistar-Ratten in der „real-time“-RT-PCR unter normoxischen Bedingungen. Die ermittelten mRNA-Spiegel sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM in einer halblogarithmischen Skalierung dargestellt.

kante Anstiege der GLUT1-mRNA-Mengen im zerebralen Cortex, im Hippocampus und in der Leber. Demnach war die moderate Hypoxie ausreichend, um das HIF-System inklusive seiner Zielgene GLUT1 und EPO zu aktivieren.

#### *HIF-1 $\alpha$ -, HIF-1 $\beta$ -, HIF-2 $\alpha$ - und HIF-3 $\alpha$ -mRNA-Spiegel unter Hypoxie*

Um mögliche Änderungen auf transkriptioneller Ebene aufzudecken, untersuchten wir die mRNA-Konzentrationen von HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$  während eines 30- und 120minütigen Hypoxie-Intervalls. In allen Geweben zeigte sich, dass moderate Hypoxie zu keinen signifikanten Veränderungen der mRNA-Mengen von HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$  und HIF-2 $\alpha$  führte.

Überraschenderweise stiegen jedoch die HIF-3 $\alpha$ -mRNA-Spiegel signifikant mit zunehmender Dauer der Hypoxie an. Dieses Phänomen war nicht auf einzelne Organe beschränkt, sondern trat mit Ausnahme der Leber in allen Organen auf (Abb. 2). Der halbnormale Sauerstoffpartialdruck war somit zwar nicht ausreichend, um signifikante Veränderungen der mRNA-Mengen von HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$  und HIF-2 $\alpha$  herbeizuführen, wohl aber suffizient, um die Transkription von HIF-3 $\alpha$  zu aktivieren.

#### *Proteinspiegel von HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$ , HIF-2 $\alpha$ und HIF-3 $\alpha$ während Normoxie und Hypoxie*

Aus dem Westernblot resultierten spezifische Banden mit den erwarteten Molekulargewichten von 120 kDa für HIF-1 $\alpha$ , 92 kDa für HIF-1 $\beta$ , 118 kDa für HIF-2 $\alpha$  und 73 kDa für HIF-3 $\alpha$  (Abb. 3). In Organproben aus dem zentralen Nervensystem waren alle HIF-Untereinheiten bereits unter normalen Bedingungen detektierbar. Mit Ausnahme von HIF-1 $\beta$  trat bei allen anderen  $\alpha$ -Proteinen nach 30 min systemischer Hypoxie ein gradueller Anstieg der Proteinspiegel auf, der sich nach 2 h Hypoxie weiter verstärkte, ein Indiz für die Stabilisierung der HIF-Proteine. In peripheren Organen wurden nur in der Lunge HIF-spezifische Signale gefunden, in den übrigen Organen lagen die Proteinspiegel auch nach 2 h Hypoxie unter dem Detektionslimit.

#### **Diskussion**

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Expression von HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$  unter physiologischen Bedingungen und unter moderater Hypoxie untersucht, mit Augenmerk auf frühe Phasen der Adaption an Gewebshypoxie. In der „real-time“-RT-PCR wurde unter Normoxie eine konstitutive Expression aller HIF-Untereinheiten nachgewiesen, die organspezifisch ausgeprägt zu sein schien.

Besonders hohe basale Expressionsraten traten bei unseren Untersuchungen im Gehirn und der Lunge auf.

Im Falle des zentralen Nervensystems stützt dieser Befund frühere Ergebnisse, dass HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  im ZNS bei der Protektion vor hypoxischen Folgeschäden eine wichtige Rolle spielen [27].

Unsere Ergebnisse bestätigten auch vorangegangene Studien, in denen im Lungengewebe von adulten Mäusen sehr hohe Mengen an HIF-2 $\alpha$ -spezifischer mRNA gefunden wurde [16]. Für diese  $\alpha$ -Untereinheit wird eine wichtige Rolle für die Gewebshomöostase in der reifenden und adulten Lunge angenommen [17].

Aufgrund der sehr unterschiedlichen mRNA-Mengen der verschiedenen HIF-Untereinheiten in den von uns untersuchten Geweben kann spekuliert werden, dass das HIF-System organbezogene Bedeutung hat, wobei dem ZNS und möglicherweise der Lunge eine höhere Priorität zukommen. Im Gegensatz dazu stehen das Herz und die Leber. In diesen Organen erbrachte die „real-time“-PCR durchweg sehr niedrige HIF-mRNA-Mengen. Es ist denkbar, dass in diesen Organen unter moderater Hypoxie andere beziehungsweise zusätzliche Mechanismen für die Protektion gegen Gewebshypoxie aktiv sind. Diese Annahme unterstützen Untersuchungen, die zeigten, dass sich das Expressionsmuster von HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  nach der Geburt verändert [28]. In der genannten Studie wurde beispielsweise im Falle des Herzens eine massive Herabregulierung dieser beiden Untereinheiten bei adulten Mäusen im Vergleich zu fetalem Gewebe beobachtet.

Bezüglich HIF-3 $\alpha$  liegen nur wenige Befunde zum Expressionsmuster vor. In früheren Northern-Blot-Analysen bei Mäusen wurde HIF-3 $\alpha$ -mRNA vorwiegend im Thymus und in niedrigeren Mengen in Lunge, Gehirn, Herz und Niere nachgewiesen [19]. Mittels „real-time“-RT-PCR beobachteten wir die höchsten Mengen an HIF-3 $\alpha$ -mRNA in der Lunge, dem zerebralen Cortex und dem Hippocampus, während Herz und Leber die geringsten Mengen an HIF-3 $\alpha$ -mRNA enthielten.

Das in unserer Studie verwendete Modell der moderaten Hypoxie war auf der anderen Seite jedoch suffizient, um die Zielgene EPO und GLUT1 in einigen, wenn auch nicht allen Organen zu aktivieren. Nach Beendigung der 2stündigen Hypoxie ließ sich nur in der Niere ein Anstieg der EPO-mRNA konstatieren; das bedeutet, dass auch durch die moderate Hypoxie das HIF-System aktiviert werden konnte. Jedoch war die Hypoxie nicht stark oder lange genug, um in anderen Organen –beispielsweise dem Gehirn – die Bildung von EPO zu induzieren. Mehrere Studien konnten belegen, dass EPO im Falle einer Ischämie im ZNS eine wichtige Rolle beim Überleben von Neuronen nach Hypoxie zukommen könnte [29]. Unter moderater Hypoxie, beziehungsweise in einer frühen Phase der Hypoxie scheinen andere Faktoren ausschlaggebend zu sein für die Protektion gegen Hypoxie. Hierfür könnte GLUT1 in Betracht kommen, denn schon basal fand

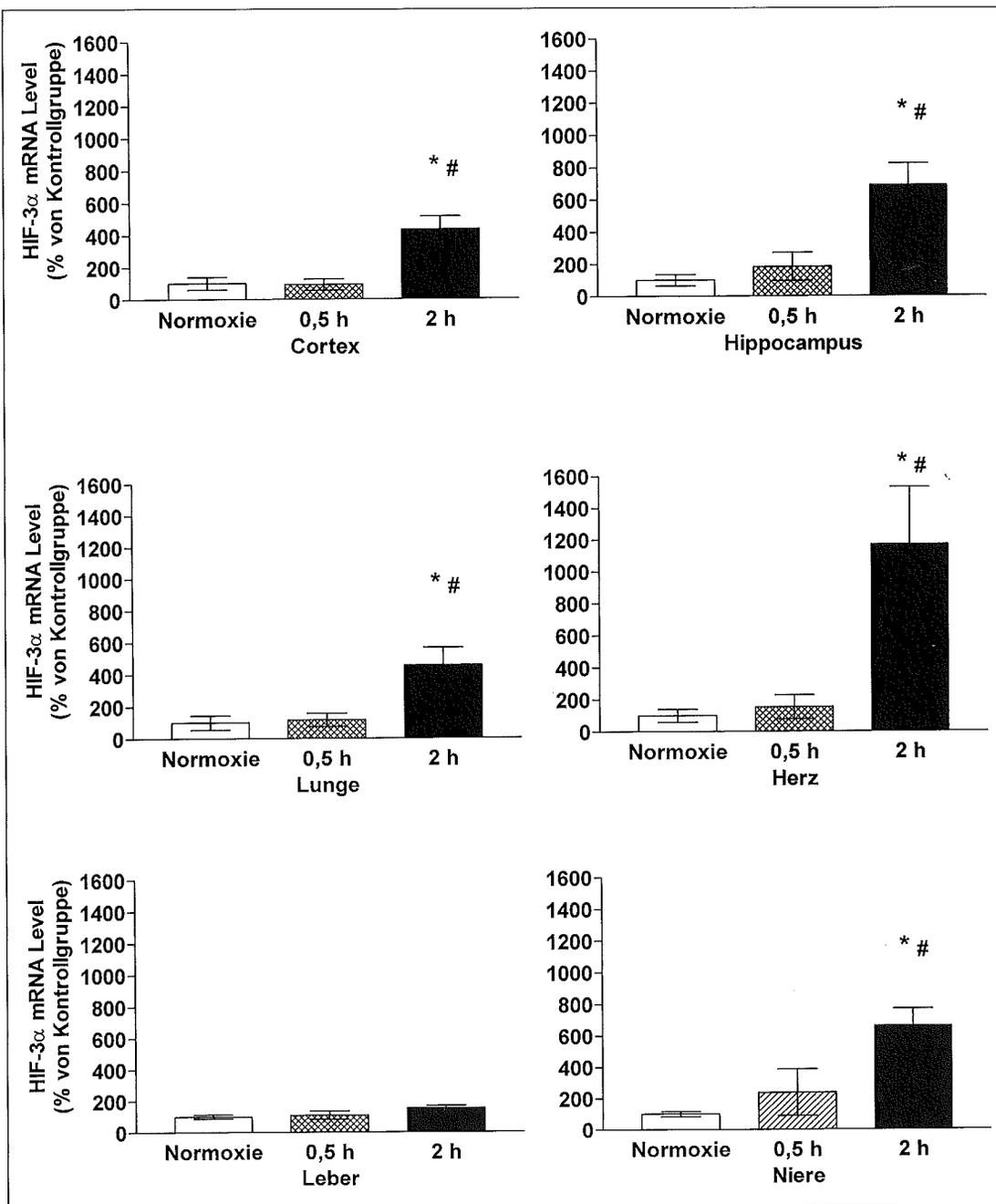


Abb. 2: Prozentuale Veränderungen der HIF-3 $\alpha$ -mRNA-Mengen unter systemischer Hypoxie (65 mmHg, 0,5 bzw. 2 h) im Vergleich zu normoxischen Kontrollbedingungen in verschiedenen Organen von Ratten in der „real-time“-RT-PCR. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM aufgetragen; \*:  $p < 0,05$  gegen die Kontrolle, #:  $p < 0,05$  gegen 0,5 h Hypoxie.

sich sowohl im zerebralen Cortex als auch im Hippocampus ein hoher Gehalt an GLUT1-mRNA. Die mRNA-Spiegel stiegen nach 30minütiger Hypoxie an

und lagen nach Beendigung der Hypoxie doppelt so hoch wie unter Kontrollbedingungen. Diese Annahme wird zusätzlich untermauert durch die im Westernblot

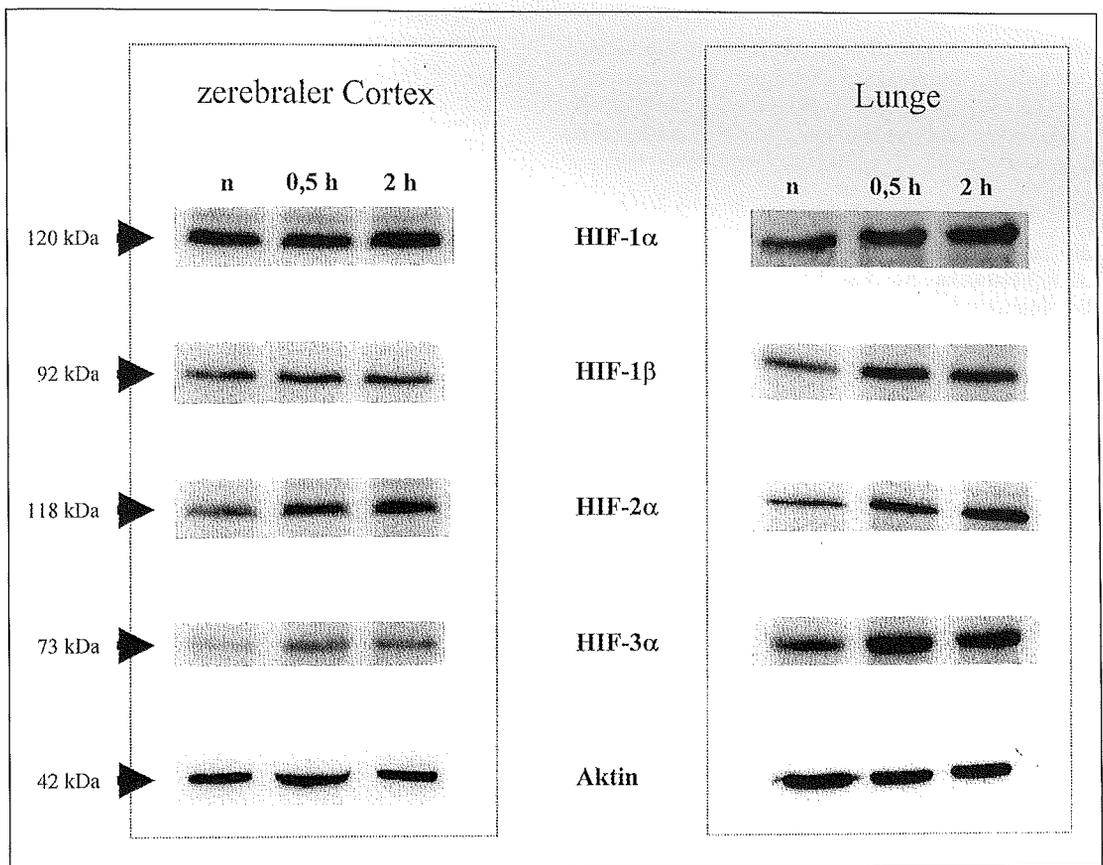


Abb. 3. Analyse der HIF-1 $\alpha$ -, HIF-1 $\beta$ -, HIF-2 $\alpha$ - und HIF-3 $\alpha$ -Proteinspiegel während Normoxie (n) und unter Hypoxie (65 mmHg, 0,5 bzw. 2 h) mittels Westernblotting. Die linke Seite der Abbildung zeigt repräsentative Immunoblots aus dem zerebralen Cortex, die rechte Seite die Signale aus Lungengewebe. Zum zerebralen Cortex vergleichbare Proteinspiegel wurden im Hippocampus gefunden (nicht dargestellt). In den übrigen Organen verblieben die Proteinmengen auch nach 2 h Hypoxie unter dem Detektionslimit.

beobachtete Protein stabilisierung, die für die Aktivierung von HIF spricht.

Die mRNA-Expression von HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$  und HIF-2 $\alpha$  dagegen wurde durch moderate Hypoxie weder im ZNS noch in peripheren Organen beeinflusst. Dieser Befund deckt sich mit früheren Studien, in denen gezeigt wurde, dass eine Steigerung der HIF-1-Proteinspiegel in hypoxischem Gewebe im Northern Blot nicht mit einem Anstieg der mRNA einherging [30]. Dies scheint auch für HIF-2 $\alpha$  zuzutreffen, da hier in der „real-time“-RT-PCR ebenfalls keine Veränderungen auf mRNA-Ebene nachzuweisen waren.

Überraschenderweise bildete HIF-3 $\alpha$  hierbei die Ausnahme. Bis auf das Lebergewebe war die moderate Hypoxie ausreichend, in allen anderen Geweben einen signifikanten Anstieg der HIF-3 $\alpha$ -kodierenden mRNA herbeizuführen. Der Anstieg ging im Westernblot mit

einer Erhöhung der Proteinspiegel einher, so dass ebenfalls von einer hypoxischen Stabilisierung des HIF-3 $\alpha$  ausgegangen werden kann. Dies ist wiederum ein Indiz für die Beteiligung von HIF-3 $\alpha$  hinsichtlich der zellulären Antwort auf Gewebhypoxie. Kietzmann und Kollegen [31] wiesen nach, dass HIF-3 $\alpha$ -mRNA vorwiegend in der perivenösen Zone des Leberzinus exprimiert wird, was die Autoren darauf zurückführten, dass in diesem Teil des Azinus aufgrund des physiologischen Sauerstoffgefälles der niedrigste O<sub>2</sub>-Partialdruck vorherrscht. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass in Mäusen der HIF-3 $\alpha$ -Locus unter massiver Hypoxie alternativ gespleisst zu werden scheint [32]. Die Studie zeigte, dass diese Variante wiederum identisch ist mit einem inhibitorischen Per/ARNT/Sim-Protein (IPAS), das als natürlicher Antagonist des HIF-Systems fungiert [33]. IPAS wird in Geweben besonders stark exprimiert, in denen trotz

permanenter hypoxischer Konditionen eine Neovaskularisation unterbleibt, wie zum Beispiel im Epithel der Cornea [34]. Die genauen Zusammenhänge zwischen den verschiedenen HIF-Untereinheiten und IPAS, insbesondere bei Hypoxie, müssen jedoch noch weiter aufgeklärt werden.

## Danksagung

Die Autoren danken Herrn Prof. Dr. G. Sczakiel (Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Lübeck) für die Möglichkeit, das Gene-Amp 5700 Sequence Detection System benutzen zu dürfen.

## Literatur

- Wang GL, Semenza GL (1993) General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4304-4308
- Wenger RH (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J* 16: 1151-1162
- Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A (2001) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 276: 9519-9525
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269: 23757-23763
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer N, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16: 4604-4613
- Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ (1994) Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6496-6500
- Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252: 954-958
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7987-7992
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG (2001) HIF- $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 292: 464-468
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh W, Ratcliffe PJ (2001) Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-472
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature (London)* 399: 203-204
- Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272: 22642-22647
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *EMBO J* 17: 6573-6586
- Wang GL, Semenza GL (1993) Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 268: 21513-21518
- Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 272: 11205-11214
- Tian H, McKnight SL, Russell DW (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11: 72-82
- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4273-4278
- Brusselmans K, Bono F, Maxwell P, Dor Y, Dewerchin M, Collen D, Herbert JM, Carmeliet P (2001) Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *J Biol Chem* 276: 39192-39196
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 $\alpha$ . *Gene Expr* 7: 205-213
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- Jöhren, O, Neidert, SJ, Kummer, M, Dendorfer, A, Dominiak, P, (2001) Preproorexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 142: 3324-3331
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-1030
- Tso JY, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R (1985) Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 13: 2485-2502
- Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, Nienstedt J, Dominiak P, Dendorfer A (2002) Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKC $\epsilon$ -isoform. *Cardiovasc Res* 55: 583-589
- Erecinska M, Silver IA (2001) Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* 128: 263-276
- Hackett PH, Roach RC (2001) High-altitude illness. *N Engl J Med* 345: 107-114
- Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR (1999) Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur J Neurosci* 11: 4159-4170
- Madan A, Varma S, Cohen HJ (2002) Developmental stage-specific expression of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the HIF-1 protein in the mouse and human fetus. *Mol Genet Metab* 75: 244-249

29. 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 (2001) Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4044-4049
30. Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M, Candinas D (2001) HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J* 15: 2445-2453
31. Kietzmann T, Cornesse Y, Brechtel K, Modaressi S, Jungermann K (2001) Perivenous expression of the mRNA of the three hypoxia-inducible factor  $\alpha$ -subunits, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$ , in rat liver. *Biochem J* 354: 531-537
32. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L (2002) Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3  $\alpha$  locus. *J Biol Chem* 277: 32405-32407
33. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L (2001) Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414: 550-554

Aus der Medizinischen Klinik I (Direktor Prof. Dr. H.-L. Fehm) und dem Institut für Neuroendokrinologie (Direktor Prof. Dr. J. Born) der Universität zu Lübeck

## Akute Hypoxie vermindert die Glukosetoleranz bei gesunden Probanden

K. M. Oltmanns

Erkrankungen des Respirationstraktes, die zu akuter oder chronischer Hypoxie führen, wie z. B. das Schlafapnoesyndrom (SAS) oder chronisch hypoxische Lungenerkrankungen, sind häufig mit verminderter Glukosetoleranz assoziiert und damit einer Vorstufe des Diabetes mellitus. Beim SAS führt eine Therapie mit Continous Positive Airway Pressure (CPAP) zur Aufhebung der nächtlichen Hypoxien und verbessert damit die Glukosetoleranz signifikant. Kürzlich publizierte Studienergebnisse zeigen, dass die Adipositas zwar der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines Diabetes mellitus ist, eine schwere SAS-Erkrankung aber unabhängig vom Körpergewicht zu diesem Risiko beiträgt, d. h. das SAS ist unabhängig vom Body Mass Index mit Glukoseintoleranz assoziiert. Allgemein sind Erkrankungen des Respirationstraktes sowohl durch chronisch rezidivierende oder persistierende Hypoxien als auch durch gestörte Schlafarchitektur und verschiedene Begleiterkrankungen charakterisiert. Ein kausaler Zusammenhang zwischen Hypoxie und Glukoseintoleranz wurde zwar seit langem vermutet, konnte durch diese Einflussfaktoren bisher aber nicht nachgewiesen werden. Das Ziel unserer Studie war daher, die Auswirkungen akuter Hypoxie auf den Glukosemetabolismus gesunder Probanden zu untersuchen.

Zu diesem Zweck führten wir im Crossover-Design euglykämische Glukoseclamp-Untersuchungen mit 14 gesunden männlichen Probanden über 6 Stunden mit jeweils einer Interventionsphase von Hypoxie bzw. Normoxie durch. 3 Stunden nach Beginn der Clamp-Untersuchung wurde eine akute Hypoxie über einen Zeitraum von 30 Minuten durch ein Absenken der Sauerstoffsättigung auf 75 % induziert oder unter der Kontrollbedingung im normalen Bereich von 96 % belassen. Insulin wurde kontinuierlich in einer Rate von 1,5 mU min<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> infundiert und die Plasma-Glukose durch Dextroseinfusionen konstant zwischen 80 und 100 mg/dl gehalten. Die Dextroseinfusionsraten gaben anschließend Aufschluss über die Glukosetoleranz im Verlauf der Untersuchungen: Je weniger Dextrose infundiert werden musste, um die Plasma-Glukose konstant zu halten, desto niedriger war die Glukosetoleranz. Eine Aktivierung der Stresssysteme wie der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse und des Sympathischen Nervensys-

tems untersuchten wir anhand von Katecholamin- und Cortisolspiegeln, Pulsrate, Blutdruck sowie Fragebögen zu Angstsymptomen.

Bis zur Intervention nach 3 Stunden blieben die Dextroseinfusionsraten unter beiden Bedingungen gleich. Nach Induktion der Hypoxie war die infundierte Dextrosemenge im Vergleich zur Kontrollbedingung vermindert ( $P < 0.01$ ). Dieser signifikante Unterschied hielt auch über die Intervention hinaus an und war erst 2 Stunden später wieder aufgehoben. Die Adrenalinkonzentration ( $P < 0.01$ ), die Pulsrate ( $P < 0.01$ ) sowie die Angstsymptome ( $P < 0.05$ ) stiegen unter Hypoxie signifikant an, während Noradrenalin, Cortisol und systolischer/diastolischer Blutdruck in beiden Bedingungen gleich waren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass akute Hypoxie die Glukosetoleranz bei gesunden Probanden vermindert. Wir folgern daraus, dass Hypoxie eine Rolle bei der Entstehung und Progression von Glukoseintoleranz in chronisch hypoxischen Erkrankungen spielt. Dieser Effekt ist vermutlich über eine sympathische Aktivierung vermittelt. Da es der Skelettmuskulatur möglich ist, selbst über ATP-sensitive Kaliumkanäle einen ATP-Abfall zu registrieren, wäre es aber auch denkbar, dass ein solcher Abfall durch Sauerstoffmangel im Citratzyklus ausgelöst wird. Dies führt zu einer Öffnung der ATP-sensitiven Kaliumkanäle und damit analog wie bei einer Hypoglykämie zu einem Absinken der Glukoseaufnahme in den Muskel. Unsere Daten erklären aber nicht den Mechanismus der nachgewiesenen Glukoseintoleranz. Daher bleiben diese Erklärungen nur Spekulation. Offen bleibt ebenfalls, ob unsere Ergebnisse, die unter einer akuten Hypoxie gewonnen wurden, ohne weiteres auf rezidivierende oder chronisch persistierende Krankheitszustände übertragbar sind. Trotzdem sind unsere Ergebnisse von klinischer Bedeutung, denn sie sollten den Arzt veranlassen, Patienten mit chronisch hypoxischen Erkrankungen engmaschig im Hinblick auf ihren Glukosestoffwechsel zu überwachen, damit ein neu auftretender Diabetes so frühzeitig wie möglich behandelt werden kann. Umgekehrt empfehlen wir bei Patienten mit Typ 2 Diabetes, insbesondere in schwer einstellbaren Fällen, immer auch an ein Schlafapnoesyndrom als aggravierenden Faktor zu denken und entsprechende Diagnostik bei Verdacht durchzuführen.

## Wenn der Darm die Nerven verliert...

T. Wedel

Was ergibt die Verbindung von Gastroenterologie und Neurologie? Das Fachgebiet der sog. Neurogastroenterologie. Obwohl man schon seit über 100 Jahren weiß, dass sich die größte Ansammlung von Nervenzellen (ca. 150 Millionen) im Gastrointestinaltrakt befindet, hat das „little brain within the gut“ erst in den letzten 10 Jahren eine wissenschaftliche Renaissance erfahren. Gründe dafür sind u. a. die verbesserten Nachweis- und Untersuchungsmethoden sowie die Erkenntnis, dass sich zahlreiche Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes auf Störungen des enterischen Nervensystems zurückführen lassen – wie z. B. die Achalasie, Gastroparese, Pylorusstenose, intestinale Pseudoobstruktion, das Megakolon oder die sog. Slow-transit Constipation.

Die interdisziplinäre Arbeitsgruppe „Neurogastroenterologie“ (Institut für Anatomie, Klinik für Chirurgie, Klinik für Kinderchirurgie, Abteilung für Neuropathologie des Instituts für Pathologie sowie externe Kooperationspartner) beschäftigt sich mit der strukturellen Organisation und den elektrophysiologischen Eigenschaften des menschlichen enterischen Nervensystems. Die Untersuchungen konzentrieren sich dabei insbesondere auf das Kolon, da dieser Abschnitt des Gastrointestinaltraktes eine Prädilektionsstelle sowohl für angeborene als auch erworbene Innervationsstörungen ist. Die klinisch daraus resultierenden Passagestörungen erweisen sich unter konservativen Maßnahmen häufig als therapieresistent und erfordern in schweren Fällen eine Kolonteilresektion.

Mit Hilfe spezieller Präparationstechniken, bei denen die Darmwand in ihre einzelnen Schichten zerlegt wird, und standardisierter morphometrischer Analysen werden die intramural gelegenen Nervengeflechte hinsichtlich ihrer Architektur, Gangliendichte, Nervenzellverteilung und ihres Neurotransmittergehaltes untersucht. So konnte bei der bisher als idiopathisch bezeichneten Slow-transit Constipation eine signifikante Abnahme der Nervenzellanzahl und der Gangliendichte nachgewiesen werden. Dieses neuronale Defizit spiegelt sich u. a. in einem entsprechend veränderten Kontraktilitätsverhalten der betroffenen Kolonsegmente unter Organbadbedingungen wieder: Eine elektrische und pharmakologische Stimulation der enteri-

schen Nervengeflechte führt zu unzureichenden glattmuskulären Antworten – eine Beobachtung, mit der sich die Konsequenzen einer morphologischen Texturstörung des enterischen Nervensystems auf funktionaler Ebene belegen lassen.

Als „physiologischer Partner“ des enterischen Nervensystems ist in neuerer Zeit eine weitere Zellpopulation in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses gerückt – die sog. interstitiellen Cajal-Zellen. Sie gelten als intestinale Schrittmacher und fungieren wie ein Relais zwischen Nervenfasern und glatten Muskelzellen, indem sie neuronale Stimuli amplifizieren und die rhythmischen Slow-wave-Aktivitäten der Darmwand generieren. Ausgehend von tierexperimentellen Befunden konnte die Arbeitsgruppe die Schrittmacherzellen auch an menschlichem Darmgewebe identifizieren und morphometrisch untersuchen. Dabei zeigte sich, dass es bei kolorektalen Motilitätsstörungen zu einer Abnahme von Cajal-Zellen kommt – sowohl bei Patienten mit der oben erwähnten Slow-transit Constipation als auch bei Patienten mit Megakolon.

Die erhobenen Befunde legen nahe, beide morphologische Entitäten – enterische Nervenzellen und intestinale Schrittmacherzellen – bei Patienten mit chronischen Passagestörungen des Kolorektrums in den diagnostischen Algorithmus miteinzubeziehen. Zur Zeit wird deshalb geprüft, inwieweit bereits vor einem größeren operativen Eingriff durch die Entnahme von Ganzwandbiopsien eine aussagekräftige histopathologische Diagnostik durchgeführt werden kann. Ziel ist es, aufgrund der klinischen, funktionellen und neuropathologischen Befundkonstellation solche Patienten zu selektionieren, die von einer operativen Therapie dauerhaft profitieren.

Die Klinik für Chirurgie verfügt über eine langjährige Expertise zur Diagnose und Behandlung gastrointestinaler Motilitätsstörungen und ist zur überregionalen Anlaufstelle für das betroffene Patientenkontingent geworden. Damit sind optimale Voraussetzungen gegeben, um die Erkenntnisse der neurogastroenterologischen Grundlagenforschung in klinisch orientierte Studien umzusetzen. Bleibt zu hoffen, dass der Darm der einzige bleibt, der die Nerven verliert ...

## Investition in die Zukunft der Wissenschaft

**Förderprogramm der Universität zu Lübeck und des Forschungszentrums Borstel für junge Wissenschaftler wird für weitere drei Jahre von der Deutschen Forschungsgemeinschaft mit 835.000 Euro finanziert**

B. Brand

„Human capital“ ist mittlerweile das Schlagwort in den Strategien von Wirtschaft und Wissenschaft zur Entwicklung neuer Technologien. Gemeinsam haben die Universität zu Lübeck und das Forschungszentrum Borstel dieses Schlagwort in ein anspruchsvolles Förderprogramm für besonders qualifizierte und talentierte Nachwuchswissenschaftler umgesetzt. Dieses international ausgerichtete Programm mit der Bezeichnung „Graduiertenkolleg 288 (Strukturen und Mediatoren der Zellinteraktion)“ wurde erstmals 1997 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zur Finanzierung vorgeschlagen. Es ermöglicht Studenten der Medizin und der Naturwissenschaften innerhalb von drei Jahren sowohl ihre Doktorarbeit anzufertigen als auch ein für sie speziell zusammengestelltes Fortbildungsprogramm zu nutzen. „Es geht uns nicht nur darum den jungen Wissenschaftlern technisches Können zu vermitteln, sondern auch ihre wissenschaftliche Kreativität zu fördern und ihr ethisches Verantwortungsbewusstsein zu schärfen“, erklärt Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann, Sprecher des Graduiertenkollegs und Leiter des Instituts für Physiologie an der Universität zu Lübeck. „Der Erfolg des Graduiertenkollegs in den letzten 6 Jahren basiert in

erster Linie auf den hervorragenden Leistungen der Stipendiaten und zeigt, dass unsere Initiative den richtigen Weg gewählt hat, Nachwuchswissenschaftler langfristig für die Forschung zu begeistern“, so Prof. Jelkmann. Den Blick über den Tellerrand des eigenen Fachbereiches zu werfen, Grenzen medizinischer und naturwissenschaftlicher Forschung abzubauen und die interdisziplinäre Zusammenarbeit in der Wissenschaft zu pflegen, sind heute Voraussetzungen für den Erfolg.

Zu Beginn des Jahres werden 13 neue Stipendiaten in das immunologisch ausgerichtete Programm des Graduiertenkollegs aufgenommen, das sich schwerpunktmäßig der Analyse entzündlicher und reparativer Gewebereaktionen widmet. Besonderes Interesse gilt den Strukturen und Mechanismen der Wechselwirkung von bakteriellen Organismen mit ihren Wirtszellen, die mittels molekularbiologischer, zellbiologischer und immunologischer Methoden untersucht werden. Ziel dieser Arbeiten ist, ein besseres Verständnis für die komplexen Zusammenhänge derjenigen Prozesse zu entwickeln, die zu infektiösen und entzündlichen Erkrankungen führen und gegebenenfalls neue Therapieansätze aufzuzeigen.

## Personalia

### Fachgesellschaften

Prof. Dr. rer. nat. Ewald K o n e c n y , Universitätsinstitut für Medizintechnik Lübeck, wurde von der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik für die Jahre 2003 bis 2006 in den Ausschuss für die Verleihung des Ehrenrings des Vereins Deutscher Elektrotechniker (VDE) berufen. Prof. Konecny war von 1993 bis 2002 Kuratoriumsvorsitzender des Instituts für Systemtechnik und Innovationsforschung der Fraunhofergesellschaft.

Prof. Dr. med. Hans-Felix P i p e r , früherer Direktor der Universitätsaugenklinik Lübeck, wurde die Ehren-

mitgliedschaft der Bielschowsky-Gesellschaft für Schielforschung verliehen. Damit wurden seine besonderen Verdienste auf dem Gebiet der Schielforschung und Neuroophthalmologie anerkannt.

### Preise

Prof. Dr. med. Dieter J o c h a m , Direktor der Universitätsklinik für Urologie Lübeck, wurde mit Prof. Helmut Wassermann von der Fachhochschule München für das gemeinsame Projekt zur Kunstharnblase der Innovationspreis des Bundesministeriums für Bildung und Forschung zur Förderung der Medizintechnik verliehen. Der mit 200.000 Euro dotierte Preis wurde auf der Medica 2002 in Düsseldorf überreicht.

Dipl.-Phys. Ralf B r i n k m a n n , Medizinisches Laserzentrum Lübeck, wurde für die Entwicklung eines schonenderen Laserverfahrens für die Augenheilkunde der Innovationspreis des Bundesministeriums für Bildung und Forschung zur Förderung der Medizintechnik verliehen. Der mit 200.000 Euro dotierte Preis wurde auf der Medica 2002 in Düsseldorf überreicht.

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Andrea K r u s e , Universitätsinstitut für Immunologie und Transfusionsmedizin Lübeck, wurde mit dem „Award for the best oral presentation at the 8th Congress of the Alps Adria Society for Immunology of Reproduction“ in Weimar ausgezeichnet. Die Arbeitsgruppe von Dr. Kruse untersucht die Regulation der Leukozyten-Einwanderung in den schwangeren Uterus der Maus und insbesondere die Bedeutung ausgewählter vaskulärer Adhäsionsmoleküle für die Rekrutierung von Leukozyten-Subpopulationen. Das Forschungsprojekt geschieht in Zusammenarbeit mit der Stanford University (USA) und in Drittmittelförderung durch das Graduiertenkolleg GRK 288 C5.

Dr. med. dent. Samer H a k i m , Universitätsklinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie Lübeck, wurde für seine Arbeit „Anatomische und szintigraphische Studie zur 3-dimensionalen Lokalisation der Kopfspeichel- und Tränendrüsen und deren szintigraphische Darstellung beim Hauskaninchen“ mit dem Wissenschaftspreis der Schleswig-Holsteinischen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde ausgezeichnet.

Drei Mitarbeiter der Universitätsfrauenklinik Lübeck haben auf dem diesjährigen Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe in Düsseldorf herausragende Preise gewonnen. Es handelt sich um den hoch angesehenen Walter-Hohlweg-Preis 2002, der mit 8.000 Euro dotiert ist, für Dr. Oliver T r e e c k . Dr. Treeck hat eine wichtige experimentelle Arbeit über die Wachstumsbeeinflussung von Karzinomzellen aus der Gebärmutter geschrieben. Jeweils mit 3.000 Euro dotierte Forschungsstipendien der Firma Noripharma erhielten Dr. Jörg E n g e l und Dr. Andreas S c h r o e r . Dr. Engel, der zu GnRH-Analoga forscht, nutzt das Stipendium für einen Studienaufenthalt bei Prof. Schally in Tucson (USA), Nobelpreisträger für Medizin. Dr. Schroer tritt einen Forschungsaufenthalt bei Prof. Schlegel an der Conell University in New York (USA) an und wird seine Arbeiten zur vorzeitigen Ovarialinsuffizienz fortführen.

### **Forschungsförderung**

Prof. Dr. rer. soc. Rolf V e r l e g e r , Priv.-Doz. Dr. med. Ferdinand B i n k o f s k i , beide Universitätsklinik für Neurologie Lübeck, und Dr. med. Christian B ü c h e l , Klinik für Neurologie am Universitätsklinikum

Eppendorf, Hamburg, wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft eine zweijährige Sachbeihilfe im Wert von ca. 110.000 Euro für das Projekt „fMRT-Studien zur Bahnung durch unidentifizierbare Reize“ bewilligt. Der Antrag baut auf dem gemeinsamen Projekt „NeuroImage Nord“ der Universitäten Hamburg, Lübeck und Kiel auf. Aufgrund gemeinsamer Anträge wurde der hier verwendete Hochleistungs-Magnetresonanztomograph am UKE von der DFG finanziert. Die Stelle von Herrn Binkofski wird aufgrund eines gemeinsamen Antrags vom Bundesministerium für Bildung finanziert.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) hat ein gemeinsames Projekt der Universitäten Lübeck und Toulouse (Frankreich) bewilligt und übernimmt die Finanzierung für Personal und Sachmittel für zunächst zwei Jahre. Das Thema des Forschungsvorhabens lautet „Optisch und thermisch schaltbarer Spin-Zustand in Eisenkomplexen“. Projektleiter sind Prof. Dr. Alfred X. T r a u t w e i n , Direktor des Instituts für Physik der Universität zu Lübeck, und sein französischer Fachkollege Prof. Dr. Jean-Pierre T u c h a g u e s .

Priv.-Doz. Dr. med. Christine K l e i n , Universitätsklinik für Neurologie Lübeck, wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft ein Heisenberg-Stipendium bewilligt. Dr. Klein arbeitet auf dem Gebiet der molekulargenetischen Untersuchungen verschiedener Dystonie und Parkinson-Syndrome. Kooperationen bestehen mit den Universitäten Kiel und Hamburg sowie mit der Harvard University, Boston (USA), dem Albert-Einstein-College aus Madison und dem Toronto-Western-Hospital (Kanada). Sie wird während der Stipendiumszeit jeweils halbjährige Forschungsaufenthalte in Toronto und Boston verbringen.

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Volker S c h ü n e m a n n , Universitätsinstitut für Physik Lübeck, wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogramms „Hochfeld-EPR in Biologie, Chemie und Physik“ für sein Projekt „High-field EPR studies in reaction intermediates of NO synthase“ Sachmittel für zwei Jahre bewilligt.

### **Gastwissenschaftler und Gastwissenschaftlerinnen**

Prof. Dr. Francis Ann W a l k e r , Department of Chemistry, University of Arizona in Tucson (USA), ist in den Jahren 2003/2004 während eines halbjährigen Forschungsaufenthalts am Universitätsinstitut für Physik Lübeck tätig. Damit soll die wissenschaftliche Kooperation der beiden Institute in Lübeck und Tucson gefördert werden. Der Aufenthalt wird mit dem Preisgeld des Humboldt Research Award for Senior U.S. Scientists finanziert, der Frau Prof. Walker von der Alexander von Humboldt-Stiftung verliehen wurde.

# Medizinische Gesellschaft zu Lübeck

Sitzung am Donnerstag, 27. Juni 2002

## Forschung an embryonalen Stammzellen

*Aktuelle Aspekte der bioethischen Debatte zur Forschung an menschlichen embryonalen Stammzellen und Embryonen in Deutschland*

Die gegenwärtige wissenschaftliche, gesellschaftliche und politische Auseinandersetzung mit aktuellen und in die Zukunft weisenden Fragen der Biotechnologie basiert auf jüngsten wissenschaftshistorischen Meilensteinen bzw. Entdeckungen der Reproduktionsbiologie, Embryologie, Zellbiologie und Genetik. Aus diesen Erkenntnissen werden von Wissenschaftlern, Laien, Politikern und Journalisten völlig divergierende Gegenwarts- und Zukunftsszenarien gezeichnet. Von den einen werden diese Erkenntnisse mit großen Hoffnungen betrachtet, von den anderen mit größter Besorgnis. Die Biotechnologie und Forschung an menschlichen Stammzellen und Embryonen stellt uns vor grundlegende Fragen: Wann beginnt menschliches Leben? Wann wird der potentielle Mensch zum Grundrechtsträger? Sind grundgesetzlich zugesichertes Recht und der Schutz der Menschenwürde in Gefahr? Wird durch genetische Diagnostik und Manipulation in den Schöpfungsplan eingegriffen? Wird das Recht auf medizinische therapeutische Hilfe kranker Menschen verletzt? Wird die Freiheit der Forschung begrenzt? Dürfen verwaiste (überzählige) in vitro entstandene Embryonen für hochrangige Forschung gespendet werden?

Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen, die aus jüngsten Embryonalstadien (aus Blastomeren einer Morula oder aus Embryoblastzellen einer Blastozyste) isoliert und unter besonderen Bedingungen in vitro unbegrenzt kultiviert werden können. Diese „besonderen“ Bedingungen beinhalten z. B. bei der Maus die Effekte des Wachstumsfaktors LIF, der auf eine in vitro-Differenzierung dieser Zellen hemmend wirkt. Zur Definition embryonaler Stammzellen (ES) gehört ihr

weitgehend noch nicht differenzierter Zustand, d. h. ihre Pluripotenz. Bei ES-Zellen der Maus gelingt es routinemäßig, diese in Blastozysten zu injizieren, so dass zum Beweis ihrer Pluripotenz eine Integration in die vorhandenen Embryoblastzellen nachgewiesen werden kann. Es gelingt indessen nicht, aus einer einzelnen isolierten ES-Zelle einen ganzen, individuellen „geklonten Embryo“ herzustellen.

Die Möglichkeit, pluripotente menschliche Stammzellen in Kultur zu halten, eröffnet eine neue Dimension medizinischer Forschung. Erstmals wird es möglich, die weitgehend unverstandenen, komplexen Prozesse der menschlichen Morphogenese und Organentwicklung in vitro zu untersuchen und die Grundlagen der embryonalen Differenzierung bis zur molekular-genetischen Ebene zu studieren. Im Speziellen bedeutet das, Markermoleküle für die Unterscheidung von differenzierten und undifferenzierten Zellen zu identifizieren. Ferner werden die Unterschiede zwischen embryonalen Stammzellen (embryonic stem cells) und embryonalen Keimzellen (embryonic germ cells) wissenschaftlich definiert sowie Methoden für eine kontrollierte In-vitro-Induktion embryonaler Zelldifferenzierung entwickelt.

Am 25.4.2002 hat der Gesetzgeber für Deutschland im neuen Stammzell-Import-Gesetz entschieden, dass hochrangige Forschung und therapeutische Entwicklungen in der Biotechnologie und Medizin unter Verwendung von importierten embryonalen Stammzellen, die aus verwaisten in vitro entstandenen menschlichen Blastozysten hergestellt wurden, erfolgen darf. Solche „verwaisten“ Embryonen wurden von ihren genetischen Eltern (im Ausland) nicht mehr zur Erzeugung einer Schwangerschaft beansprucht und können nun für hochrangige wissenschaftliche Arbeiten gespendet werden. Ungeachtet dessen gilt, dass keinesfalls Zell-Linien verwendet bzw. importiert werden dürfen, welche aus Embryonen stammen, die eigens für die Forschung in vitro gezeugt wurden.

M. Beier, Aachen



# Das Akademiker-Trio:

3 Spitzenweine im Set,  
jetzt statt 20,10 nur

17,50  
EUR

Top-Angebot

## PRIMULA ROSSO

Ein altes Weinland wird wiederentdeckt: Sizilien. PRIMULA ROSSO, die Cuvee aus Nero d'Avola und Sangiovese bekam im Gambero Rosso (der ital. Weinbibel) ein Glas.

BEI UNS NUR  
6,90  
EUR

## VERDICCHIO DEI CASTELLI DI JESI

Eines der italienischen Weißwein-highlights vom Supererzeuger Garofoli (zwei Gläser im Gambero Rosso).

BEI UNS NUR  
5,60  
EUR

## VINA HERMINIA

Der „Aufsteiger des Jahres“ in der Zeitschrift „Alles über Wein“: Ein Rioja der Extraklasse. Crianza 98, ein Jahr Fass- und ein Jahr Flaschenlagerung.

BEI UNS NUR  
7,60  
EUR

probieren,  
erleben &  
entscheiden

## WEINFORUM

SEIT 1723



Weinf. Wilhelm Ulex  
Osterweide 16  
23562 Lübbeck  
Tel. 0451 - 50 11 00  
Fax: 0451 - 50 11 01

[www.weinform-wilhelm-ulex.de](http://www.weinform-wilhelm-ulex.de) - [info@weinform-wilhelm-ulex.de](mailto:info@weinform-wilhelm-ulex.de)



Wir  
begleiten Sie

Steigende Forderungen nach Kosteneffizienz und Behandlungsqualität im Gesundheitswesen stellen Klinikpersonal und Krankenhaus-Management vor neue Herausforderungen. Im Mittelpunkt Ihres Interesses stehen transparente Prozesse, integrierte Lösungen, Qualität und Wirtschaftlichkeit. Wir kalkulieren dabei alle Bereiche der Patientenprozesskette mit ein: vom Notfall über die Anästhesie, den OP und die Intensivmedizin bis zum Home-Care-Bereich.

Unser Wissen und unsere Erfahrung sind das Ergebnis von über 100 Jahren Zusammenarbeit - mit Partnern wie Ihnen auf der ganzen Welt. Darum bieten wir Ihnen individuelle Lösungen, vom Einzelgerät bis zu integrierten Systemlösungen mit Patienten-Daten-Management. Plus technischer Dienstleistungen, Prozessmanagement, Training, Personalentwicklung und Versorgungsmanagement. Das bedeutet für Sie: prozessorientierte Lösungen aus einer Hand.

**Dräger**  
MEDICAL