

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt -

**Hemisphärenspezifische Wirkung von Erythropoetin
auf die GABAerge Transmission
in dem Prälimbischen Cortex**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Dik, Andre
aus Nowo-Kulundinka/Russland

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz
1. Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. med. Weiqi Zhang
2. Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2016

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Weiqi Zhang
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth

ZUSAMMENFASSUNG

Hemisphärenspezifische Wirkung von Erythropoetin auf die GABAerge Transmission in dem Prälimbischen Cortex

Dik Andre

Erythropoetin (EPO) ist ein Glykoprotein, bei dem neben seiner vorbekannten hämatopoetischen Wirksamkeit ein neuroprotektiver und modulatorischer Effekt auf das zentrale Nervensystem (ZNS) mit klinischer und funktionaler Relevanz entdeckt wurde. Trotz nachgewiesener modulatorischer Wirkung von EPO auf das inhibitorische System neuronaler Netzwerke blieb weiterhin unklar auf welche Weise EPO diese Wirkung entfaltet. Studien, die eine Konzentrationsänderung von Dopamin sowie freier intrazellulärer Kalziumionen unmittelbar nach der EPO-Gabe zeigten, lassen eine mögliche Rolle von EPO als Neurotransmitter vermuten. Um dem nachzugehen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche derartige Wirkungsweise von EPO mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik untersucht. Dabei wurden sIPSC (*spontaneous inhibitory postsynaptic currents*) von Zellen in der II/III. Zellschicht des Prälimbischen Cortex (PrL) abgeleitet. Die Aufnahmen der Ableitungen wurden anschließend vor und nach der EPO-Gabe, seitendifferenziert miteinander verglichen. Neben insgesamt zwei statistisch nicht signifikanten Wirkungstypen von EPO konnten zwei weitere Wirkungstypen ermittelt werden, die statistisch signifikant waren und eine Hemisphärenspezifität zeigten. Dabei wurde linkshemisphärisch die Frequenz der GABAergen Transmission eine Minute nach der EPO-Gabe für eine halbe Stunde gesteigert und rechtshemisphärisch hingegen gesenkt. Die Wirkungstypen traten auch innerhalb eines und desselben Individuums zur gleichen Zeit auf. Innerhalb der Hemisphären selbst gab es keine eindeutige Ortsspezifität. Die Amplitude blieb während dessen unverändert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine rasche Veränderung der synaptischen Transmission unter EPO. Somit weist das Erythropoetin eine für die Neurotransmitter typische Wirkungsweise auf. Seine Wirkungsweise ist dabei möglicherweise genauso, wie die beiden Hemisphären es selbst sind: intraindividuell asymmetrisch aber dennoch durch entgegengesetzten Charakter in ihrer Wirkung ausbalanciert.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2016

Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:
**Hemisphärenspezifische Wirkung von Erythropoetin auf die GABAerge
Transmission in dem Prälimbischen Cortex**

in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie unter der Anleitung von
Univ.-Prof. Dr. med. Weiqi Zhang

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum

Name/Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGS-UND TABELLENVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	II
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Der Prälimbische Cortex	1
1.1.1. Die Topographie und die Funktion	2
1.1.2. Die hemisphärenspezifischen Unterschiede im links-rechts Vergleich	4
1.2. Erythropoetin und seine Rolle beim zentralen Nervensystem.....	8
1.2.1. Die Bedeutung für die neurologischen Erkrankungen	10
1.2.2. Die Bedeutung für die psychiatrischen Erkrankungen	12
1.3. Die Fragestellung und die Ziele der Arbeit	13
2. MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1. Die Versuchsvorbereitung	15
2.1.1. Die elektrophysiologischen Lösungen	15
2.1.2. Die Hirnschnittpräparation.....	15
2.1.3. Die Pharmakologie.....	17
2.2. Versuchsdurchführung und Auswertung.....	17
2.2.1. Die Patch-Clamp-Ableitung	17
2.2.2. Die experimentelle Konfiguration	20
2.2.3. Die Datenauswertung und die Statistik	21
3. ERGEBNISSE.....	23
3.1. Vier ortsspezifische Wirkungstypen von EPO auf die sIPSC	23
3.1.1. Wirkungstyp I.....	25
3.1.2. Wirkungstyp II.....	27
3.1.3. Wirkungstyp III	29
3.1.4. Wirkungstyp IV	30
3.1.5. Die Ortsspezifität der Wirkungstypen innerhalb des PrL	33

Inhaltsverzeichnis

3.2.	Die entgegengesetzte interhemisphärische EPO-Wirkung	36
3.3.	Die meisten Wirkungstypen von EPO sind intraindividuell	38
4.	DISKUSSION	42
4.1.	EPO ein Neuromodulator mit direkter und schneller Wirkung	42
4.2.	Die Mechanismen der hemisphärenspezifischen EPO-Wirkung	47
4.3.	Die Bedeutung der hemisphärenspezifischen EPO-Wirkung	52
5.	ZUSAMMENFASSUNG	57
6.	LITERATURVERZEICHNIS	58
7.	DANKSAGUNG	75
8.	CURRICULUM VITAE	76

Abbildungs-und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Die Präfrontale Regulation der Stressachse und des Angstverhaltens	6
Abb. 2	Störung der präfrontalen Regulation durch den chronischen Stress	7
Abb. 3	Die Signalwege von EPO	9
Abb. 4	Die Ganzzell-Ableitung innerhalb des PrL	18
Abb. 5a	Wirkungstyp I	25
Abb. 5b	Wirkungstyp I	26
Abb. 6a	Wirkungstyp II	27
Abb. 6b	Wirkungstyp II	28
Abb. 7a	Wirkungstyp III	29
Abb. 7b	Wirkungstyp III	30
Abb. 8a	Wirkungstyp IV	31
Abb. 8b	Wirkungstyp IV	32
Abb. 9	Das Koordinatensystem der einzelnen Ableitungen	34
Abb. 10a	Wirkungstyp II und IV im direkten Seitenvergleich	36
Abb. 10b	Wirkungstyp II und IV im direkten Seitenvergleich	37
Abb. 10c	Wirkungstyp II und IV im direkten Seitenvergleich	38
Abb. 11	Intraindividuelles Nebeneinander von Wirkungstyp II und IV	40
Abb. 12	Die Gesamtübersicht aller Daten der EPO-Wirkung auf die Frequenz	41
Tab. 1	Die Übersicht von mehrfach abgeleiteten Individuen	39

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AP5	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BL	Nucleus basolateralis amygdalae
C57BL/6	Labormaus vom Stamm C57BL/6 (Black 6)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CD131	betha common chain eine Komponente des GM-CSF-,II-3-, und II-5-Rezeptor
Cg1	Cingulärer Cortex Area 1
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dion
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPO	Erythropoetin
EPO-R	Erythropoetin-Rezeptor
fmi	Forceps minor corporis callosi
GABA	γ -Aminobuttersäure
H ₂ O	Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HHAS	hypothalamo-hypophysär-adrenerge Stressachse
Hipp	Hippocampus
Hz	Hertz, SI-Einheit für die Frequenz
I.E./l	Internationale Einheiten pro Liter
IL	Infralimbischer Cortex

Abkürzungsverzeichnis

IZA	Interkalierende Zellen der Amygdala
KCl	Kaliumchlorid
kHz	Kilohertz
MAPK	mitogen-activated protein kinase,
mbar	Millibar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml/min	Milliliter pro Minute
mm	Millimeter
mmol/l	Millimol pro Liter
MO	Medialer Orbitaler Cortex
mosm/l	Milliosmol pro Liter
mPFC	medialer Präfrontaler Cortex
mV	Millivolt
μmol/l	Mikromol pro Liter
Na ₃ ATP	Adenosin-5'-triphosphat Trinatriumsalz
Na ₃ GTP	Guanosin-5'-triphosphat Trinatriumsalz
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Nca	Nucleus striae terminalis
NF-κB	Nukleare Faktor κB bestehend aus Untereinheiten p50, p65 und IκB
NO	Stickstoffmonoxid

Abkürzungsverzeichnis

NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
Nph	Nucleus paraventricularis hypothalami
Nst	Nucleus striae terminalis
P	Phosphorylierung
pA	Picoampere
PFC	Präfrontaler Cortex
pH	Wasserstoffionenexponent
PI3K/AKT	Phosphoinositid-3-Kinase/Serin/Threonin-Kinase
PrL	Prälimbischer Cortex
SI	Internationales Einheitensystem
sIPSC	spontaneous inhibitory postsynaptic currents
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription Protein
ZNS	Zentrales Nervensystem
7-NI	7-Nitroindazol

Bis auf die Dosis von Erythropoetin wurden alle verwendeten Parameter und Messwerte dieser Arbeit dem Internationalen Einheitensystem (SI) entsprechend wiedergegeben. Auf die Verwendung von deutschen Fachbegriffen wurde soweit diese vorhanden und sinnvoll waren ein großer Wert gelegt. Englische Fachbegriffe wurden immer dann verwendet, wenn deutsche Fachbegriffe fehlten oder keine eindeutige Bezeichnung darstellten. Englische Fachbegriffe sind in dieser Arbeit genauso wie ein Zitat in der Einleitung kursiv markiert.

1. Einleitung

“Hoffnung gegen alle Hoffnungslosigkeit erfahren, Enttäuschung ohne jede Selbsttäuschung ertragen, das Nein mit dem Ja ersticken!” (Unbekannter Autor 2014)

Die neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen bleiben auch im 21. Jahrhundert schwer therapeutisch zugänglich und sind oft neben den hohen gesellschaftlichen Kosten auch mit hoher Mortalität sowie persönlichen schweren Schicksalen ohne Hoffnung auf Heilung verbunden (Stern et al. 2001). Nicht selten überschneiden sich sowohl neurologische als auch psychiatrische Erkrankungen. Diese haben häufig nicht nur gemeinsame Ursprünge und Ursachen bei ihrer Entstehung, sondern können aufgrund der ähnlichen Pathophysiologie mit gleichen Substanzen therapiert werden (Hackett et al. 2014). Relativ oft liegt der gemeinsame Ursprung im Präfrontalen Cortex. Dieser ist aufgrund seiner Ausdehnung, Lage und Blutversorgung bei neurologischen Erkrankungen wie Schlaganfall, Multipler Sklerose oder Morbus Alzheimer häufig betroffen und spielt bei psychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen, Angststörung oder Schizophrenie mit oder ohne einer vorausgehenden neurologischen Erkrankung eine zentrale Rolle (Goto et al. 2010; Förstl 2005). Die gemeinsame Ursache ist letztendlich ein durch akuten oder chronischen metabolischen Stress in Form von Hypoxie und Inflammation verursachter Schaden neuronaler Netzwerke, begleitet von einer funktionalen Störung der hemisphärischen Asymmetrie dieser Hirnregion mit daraus resultierenden Funktionseinbußen und Verhaltensaberrationen (Goto et al. 2010; Sun and Walsh 2006). Ein vielversprechender Ansatz mit dem man dieser stressinduzierten Pathophysiologie in naher Zukunft begegnen möchte ist die Therapie mit Erythropoetin, einem hämatopoetischen Hormon, dessen neuentdeckten neuroprotektiven Eigenschaften ein neues Kapitel im Kampf gegen die „Hoffnungslosigkeit“ und gegen das „Ertragen“ eröffnen könnten (Hand and Brines 2011).

1.1. Der Prälimbische Cortex

Das Interesse an dem Präfrontalen Cortex (PFC) der Maus als Ganzes und somit auch an dem Prälimbischen Cortex (PrL) als deren Bestandteil ist, aufgrund der relativ leichten genetischen Manipulierbarkeit dieser Spezies, der Entwicklung neuer

wissenschaftlicher Verfahren sowie neuer Erklärungsmodelle für die neuropsychiatrischen Erkrankungen anhand dieser Hirnregion, in den letzten Jahren vermehrt gewachsen (van den Bos et al. 2014; Kovacevic et al. 2005; MacKenzie-Graham et al. 2004). Nach der erstmaligen rein zytoarchitektonischen Beschreibung dieses Hirnareales beim Menschen durch Brodmann vor mehr als einem Jahrhundert (Zilles and Amunts 2010), gelang es nach der Etablierung der anterograden Markierungstechnik, die Existenz des PFC auch bei anderen Säugern durch die Anfärbung dessen Projektionsbahnen aus den mediodorsalen Thalamuskernen nachzuweisen (Akert and Hartmann-von Monakow 1980; Krettek and Price 1977; Leonard 1969). Und obwohl anfangs neben den Primaten die Ratte, als der Maus am nächsten stehende Spezies, im Mittelpunkt solcher Untersuchungen stand, wurde vermehrt auch an Mäusen in dieser Richtung geforscht (Hao et al. 2008; Ventura et al. 2007). Nichtsdestotrotz gibt es noch sehr wenig Literatur darüber, sodass man aufgrund vorliegender analytischer Vergleiche auch in dieser Arbeit weiterhin annehmen muss, dass der PFC einer Maus im Großen und Ganzen homolog zu dem einer Ratte ist (Guldin et al. 1981). Auch wenn die Erkenntnisse an Nagern aufgrund des immensen Speziesunterschieds nur bedingt und mit größter Vorsicht auf den Menschen übertragbar sind (Ahn et al. 2006; Sweeney and Kernick 2002), sind sie dennoch enorm wichtig für die Entschlüsselung des PrL mit seinen Funktionen.

1.1.1. Die Topographie und die Funktion

Nicht zu unterschätzen ist zudem die gute und für die elektrophysiologische Versuche einfache Zugänglichkeit dieser Hirnregion, denn wie der Name bereits suggerieren lässt, erstreckt sich der sechs-schichtige PFC gut identifizierbar im Lobus frontalis rostral zur Motorischen und Prämotorischen Hirnrinde. Sein wissenschaftlicher Ursprung reicht bis an die erstmalige Beschreibung einer granulären Hirnrinde beim Menschen als Area frontalis durch K. Brodmann zurück, für die sich der heutige akademische Name über Jahrzehnte etabliert hat (Groenewegen et al. 1997). Auch bei der Maus wird die Lokalisation des PFC seinem Namen gerecht, doch anders als beim Menschen ist er jedoch agranulär (Van De Werd et al. 2010). In Anlehnung an die Ratte kann man den PFC der Maus der Anatomie, Zytoarchitektur und Funktion entsprechend weiter in drei Abschnitte gliedern, den dorsomedialen, den orbitofrontalen und den ventromedialen

Abschnitt (Franklin and Chudasama 2012). Der ventromediale PFC unterteilt sich in den Prälimbischen (PrL) und den Infralimbischen Cortex (IL). Speziell der Prälimbische Cortex, der im Fokus der Versuchsreihen dieser Arbeit stand, liegt jeweils links und rechts an der medialen Wand der Hemisphären. Er erstreckt sich nach rostral oberhalb der Medialen Orbitalen Hirnrinde und nach kaudal oberhalb des Infralimbischen Cortex. Nach dorsal wird der PrL von dem rostralen Anteil des Gyrus cinguli begrenzt (Franklin and Paxinos 2007). Neuere immunhistochemische Färbetechniken in Kombination mit bekannter Nissle-Färbetechnik haben diese Eingrenzung von PrL auch auf zytoarchitektonischer Basis bestätigt und dessen Grenzen weiter präzisiert (Van De Werd et al. 2010). Er erreicht über gegenseitige Projektionen überwiegend kognitive und limbische Gehirnanteile, solche wie Striatum, basolaterale Amygdalakerne, Nucleus accumbens, orbitofrontale Rinde, paraventriculäre und mediodorsale Thalamuskern, agranuläre und granuläre Inselrinde sowie Claustrum (Vertes 2004). Die Gehirn-MRT-Aufnahmen speziell bei Mäusen zeigten, bis auf die nur bei den Ratten vorhandene Verbindung des PrL zum Hirnstamm, eine sehr hohe Übereinstimmung beider Spezies in der Vernetzung dieser Hirnregion mit anderen Hirnanteilen (Gutman et al. 2012). In Anlehnung an die Primaten ist der PrL der Nagetiere homolog zu dessen Dorso-Lateralem Präfrontalem- und Dorsalem Anteriem Cingularem Cortex, welcher die kognitiven und emotionalen Prozesse wesentlich beeinflusst (Milad and Quirk 2012; Vertes 2006; Vertes 2004). Durch zahlreiche Untersuchungen an Ratten und Primaten wird diesen homologen Hirnregionen eine zentrale Rolle bei der Inhibitionskontrolle, dem Arbeitsgedächtnis, der Aufmerksamkeitskontrolle, dem Planen von Handlungen sowie dem zielgerichteten, instrumentellen Verhalten zugeschrieben. (van den Bos et al. 2014; Balleine and O'Doherty 2010; Repovs and Baddeley 2006; Dalley et al. 2004; Fuster 2001; Barbas 2000; Laroche et al. 2000; Ongur and Price 2000; Smith and Jonides 1999; Petrides 1996; Petrides 1995; Barbas 1995). Auch bei Mäusen ist der PrL in die Prozesse der exekutiven Funktionen integriert, die eine situationsangepasste, flexible und zielgerichtete Handlung ermöglichen. Der Ausfall eben dieser Hirnregion führt unmittelbar zum Verlust oder zur deutlichen Störung dieser Flexibilität mit resultierender Verhaltensänderung im Vergleich zu Individuen mit einem intakten PrL (Granon and Changeux 2012). Anhand weiterer Läsions- und Antagonisierungsversuche

am PrL konnte dessen wichtige Rolle beim Abrufen des Lang- und Kurzzeitgedächtnisses nachgewiesen werden (DeVito et al. 2010; Blum et al. 2006). Ebenfalls konnte anhand von Läsionsversuchen ein inhibitorischer Einfluss des PrL auf die hormonelle hypothalamo-hypophysär-adrenerge Stressachse (HHAS) gezeigt werden (Radley et al. 2006). Eine andere, im Zusammenhang mit dem Stress recht gut erforschte Funktion des PrL ist die Aktivierung des Angst- und Suchtverhaltens (Gass and Chandler 2013; Peters et al. 2009). Mikrostimulationsversuche in dieser Region führten zu einer Verstärkung des Angstverhaltens bei Ratten (Vidal-Gonzalez et al. 2006), eine medikamentöse Antagonisierung hingegen hemmte deren Angstreaktion (Corcoran and Quirk 2007). Der PrL moduliert speziell über die exzitatorischen Afferenzen zu den basolateralen Kernen der Amygdala die Expression der konditionierten Angst, die sich als Angststarre äußert (Sierra-Mercado et al. 2011). Der wichtigste Transmitter ist hierbei das Glutamat, welches deutlich bei einem Stressreiz in dem gesamten medialen PFC ansteigt (Moghaddam 1993). Die Dauer der Angststarre korreliert während eines bedingten Reizes unmittelbar mit der gleichzeitigen Aktivitätsdauer der Neurone im dem PrL (Burgos-Robles et al. 2009). Der wichtigste inhibitorische Antagonist zu den von PrL angesteuerten Hirnarealen ist der IL, welcher für die Auslöschung der Angstkonditionierung sorgt und mit PrL gegenseitig negativ gekoppelt ist (siehe Abb. 1) (Sotres-Bayon and Quirk 2010). Auch bei den Mäusen ist dieser Zusammenhang nachgewiesen worden (Walker et al. 2011). Die heterogenen Aufgaben des PrL sind aufgrund seiner zahlreichen Verknüpfungen anhand der ortsspezifischen Vernetzung nachvollziehbar. Der PrL unterliegt somit einem lange schon bekannten Prinzip nach dem die funktionalen Eigenschaften eines Interneurons, als dem kleinsten Baustein neuronaler Netzwerke, weniger von seiner Ontogenese, als vielmehr von seiner lokalen Umgebung abhängig sind (Fishell 2007).

1.1.2. Die hemisphärenspezifischen Unterschiede im links-rechts Vergleich

Umso heterogener, jedoch auch interessanter erscheint der PrL, wenn man ihn als eine seitenautonome, asymmetrische Funktionseinheit im interhemisphärischen Links-Rechts-Vergleich betrachtet. Bereits seit den späten siebziger Jahren ist auch bei niederen Säugetieren und Vögeln die evolutionär bedingte, anatomische, chemische und funktionelle Hemisphärenasymmetrie bekannt. Aus zahlreichen Untersuchungen zur

Hemisphärenlateralisation bei Ratten und anderen Tierarten geht hervor, dass ähnlich wie beim Menschen, die Hemisphären jeweils für sich hochspezifische Funktionen besitzen (Denenberg 1983). So ist die rechte Seite überwiegend neben der emotionalen und räumlichen Verarbeitung für die Modulation des Stressverhaltens zuständig, die linke hingegen ist vermehrt bei Prozessen der Motorik und sozialen Kommunikation beteiligt (Cerqueira et al. 2008). Daraus darf man jedoch nicht eine strikte Regel ableiten, denn es gibt ähnlich wie bei den Rechts- und Linkshändern unter den Menschen, auch individuelle Unterschiede innerhalb der Tierarten. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Lateralisation nicht ausschließlich nur pränatal vorbestimmt ist, sondern auch einem dynamischen Prozess unterliegt, der sich unter dem Einfluss von Umweltfaktoren während der individuellen Entwicklung geschlechtsabhängig vollzieht (Sullivan et al. 2014; 2004; Denenberg 1983). Neben der funktionalen Lateralisation gibt es speziell in der III. Schicht des PrL morphologische Asymmetrie. Die Pyramidenzellneurone der rechten Seite weisen dabei verglichen mit der linken Seite durchschnittlich längere Fortsätze des Dendritenbaums auf (Czeh et al. 2008). Gerade diese Neurone, deren Fortsätze beidseits bis in die I. Schicht hinein reichen, erhalten und verarbeiten Information vom Thalamus, Hippocampus und der Amygdala (Cerqueira et al. 2008). Aufgrund dessen sind sie in die modulierenden Prozesse der oben beschriebenen Funktionen stark eingebunden. Interessanterweise reagieren die Pyramidenzellneurone im rechten PrL nur auf moderaten Stress mit einer geringen Reduktion ihrer Dendritenlänge und Dornfortsatzanzahl (Perez-Cruz et al. 2009). Die linke Seite hingegen reagiert auf massiven Stress, welcher mittels Glukokortikoidapplikation simuliert werden kann, mit einer deutlichen Volumenreduktion und scheint daher stressvulnerabler als der rechte PFC zu sein (Cerqueira et al. 2005). Wie bereits oben erwähnt, nimmt vor allem der rechte mediale PFC nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell über die Steuerung der HHAS eine dominante Rolle bei der Stressreaktion ein (Sullivan 2004). Beim Menschen führt eine Läsion der rechten Seite zur Senkung des Sympathikotonus infolgedessen das Herzzeitvolumen und der Blutdruck ebenfalls sinken. Eine Läsion der linken Seite hingegen hat einen entgegengesetzten Effekt (Hilz et al. 2001). Dabei gilt Dopamin, das beim moderaten Stresspegel links und bei hohem jedoch vermehrt im rechten PFC gebildet wird, als molekulares Äquivalent der Stressmodulation und als protektiver

Faktor gegenüber Stress. In diesem Zusammenhang wird das hemisphärisch-
 asymmetrische Konstrukt der Stressverarbeitung verständlich. Die linke kognitive Seite
 bewältigt moderate alltägliche Stresssituationen und lässt hierbei keine Aggravation zu,
 welche sich schädlich auf das individuelle Verhalten oder die Körperfunktionen
 ausüben könnte. Die rechte, emotionale Seite hingegen, wird immer dann aktiv, wenn
 bei massiven Stresssituationen eine Verhaltensänderung oder körperliche
 Alarmbereitschaft durch die Aktivierung von HHAS für die Situationsbewältigung
 notwendig ist. Doch gerade in solchen Situationen, in denen eine Überreaktion der
 Stressantwort schädlich sein kann, reguliert der linke PFC über die inhibierenden
 kommissuralen Projektionen den rechten PFC herunter. (Sullivan 2004). Auch bei
 niederen Säugetieren, wie zum Beispiel den Ratten, zeichnet sich aus einer Übersicht
 zahlreicher Versuche, eine ähnliche schematische Verschaltung beider PFC-Regionen
 (siehe Abb. 1) (Cerqueira et al. 2008).

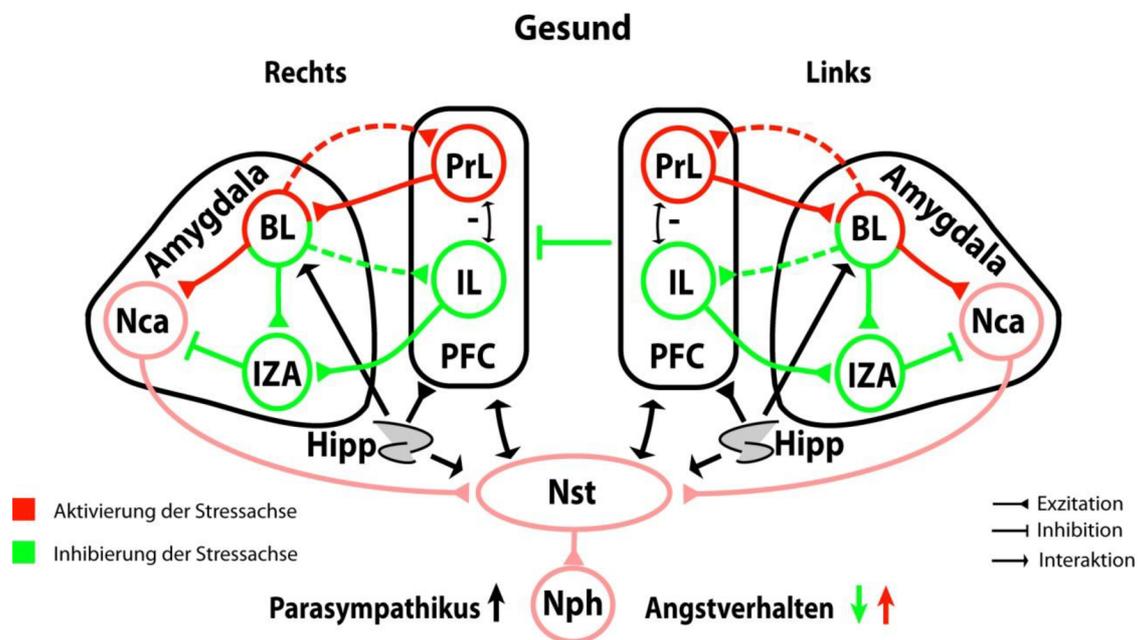


Abb. 1 Die präfrontale Regulation der Stressachse und des Angstverhaltens

Bei gesunden Individuen werden die Reize aus der Umwelt im PFC verarbeitet und mit
 Informationen aus anderen Hirnarealen wie dem Hippocampus verglichen. Bei Gefahr
 stimuliert der PrL zusammen mit dem Hippocampus den basolateralen Kern der
 Amygdala (BL), nachdem er zuvor von ihm selbst oder anderen Hirnarealen wie dem
 Hippocampus stimuliert wurde. BL stimuliert daraufhin den Nucleus centralis
 amygdalae (Nca), der über den Nucleus strialis terminalis (Nst) und Nucleus
 paraventricularis hypothalami (Nph) die HHAS stimuliert und somit auch die
 Expression des Angstverhaltens fördert. (Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite).

dominiert (Robinson et al. 1984). Bei gesunden Probanden reguliert der linke ventromedialen PFC die negativen Affekte durch eine Inaktivierung der Amygdala herunter. Dagegen wird bei depressiven Patienten die Amygdala vermehrt vom rechten ventromedialen PFC aktiviert, wodurch die negativen Affekte verstärkt werden (Cerqueira et al. 2008). Berücksichtigt man die Analogie des ventromedialen PFC zum IL der Nager, so wird es deutlich, dass der PrL aufgrund seiner reziprok inhibitorischen Verbindungen zum IL, bei der Affektvermittlung beteiligt sein muss. Eine weitere funktionale Asymmetrie des PFC besteht beim Prozess der Problemlösung, an dem das Arbeitsgedächtnis, als ein weiterer, wichtiger, funktionaler Bereich von PrL, stark beteiligt ist. Bei menschlichen Individuen konnte gezeigt werden, dass der linke PFC vermehrt an der Problemlösung beteiligt ist, wenn genaue Informationen aus der Umwelt vorliegen, wohingegen der rechte PFC bei unvollständiger oder doppeldeutiger Information vermehrt eingebunden wird. Der rechte PFC initiiert anschließend eine kreative Problemlösung, welche wiederum durch den linken PFC der rationalen Welt angepasst wird. Im Vergleich zum einseitig ausgerichteten System ermöglichen beide Seiten in gegenseitig-ausbalancierter Ergänzung ein breiteres Spektrum an Problemlösungen (Goel 2014; 2009; 2007). Auch hier scheint die wechselseitige Balance ebenfalls eine entscheidende Rolle zu spielen. Daher ist es absolut notwendig die präfrontalen Rindenareale, zu denen auch der PrL gehört, als seitenindividuelle, sich gegenseitig regulierende und ausbalancierte Einheit zu betrachten. Eine profundere Erkenntnis über die Balance dieser Rindenareale könnte unser Verständnis sowohl für die grundlegenden gesunden als auch pathologischen Hirnfunktionen verbessern und neue Therapieansätze bei neurologischen sowie psychiatrischen Erkrankungen hervorbringen.

1.2. Erythropoetin und seine Rolle beim zentralen Nervensystem

1906 wurde zum ersten Mal von Carnot und Deflandre ein humoraler hämatopoetischer Faktor vermutet, der als Reaktion auf eine Anämie die Blutmenge hochreguliert. Jedoch verging fast ein halbes Jahrhundert bis dieser Faktor als ein Glykoprotein identifiziert wurde und seinen uns heute bekannten Namen Erythropoetin (EPO) bekam (Jelkmann 1986). Die Forschungen folgender Jahre konzentrierten sich auf die zentrale Rolle von EPO bei der Hämatopoese, bei der es als antiapoptotischer Proliferations- und

Differenzierungsfaktor die erythroiden Progenitorzellen stimuliert (Lombardero et al. 2011). Angeregt durch Hypoxie, wird das fertige 165 Aminosäuren große Glykoprotein überwiegend in den Nieren gebildet (Maiese et al. 2012). Bei den erythroiden Progenitorzellen bindet es an die jeweilige extrazelluläre Domäne zweier Zytokinrezeptoren, wobei deren Homodimerisierung über intrazelluläre Januskinase-2-Aktivierung eine durch weitere Phosphorylierung von Signalproteinen vermittelte Signalkaskade in Gang setzt an deren Ende die Transkription von erythrozytären Genen steht (siehe Abb. 3) (Alnaeeli et al. 2012).

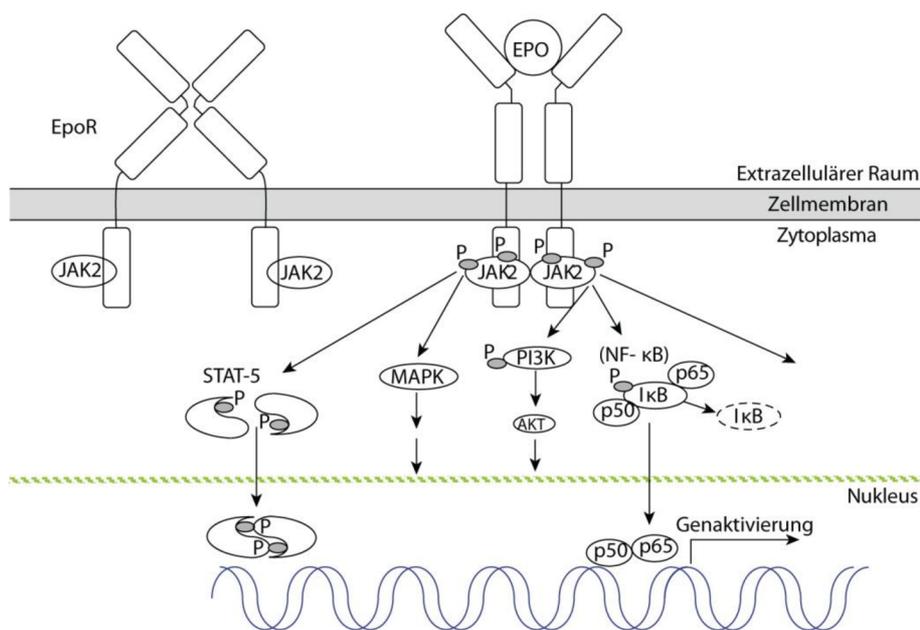


Abb. 3 Die Signalwege von EPO

Durch die Bindung von EPO an das homodimere EPO-Rezeptor (EPO-R) auf der Zelloberfläche kommt es zu dessen Konformationsänderung, wobei die intrazellulären Domänen des Rezeptors so nah zusammen kommen, dass die assoziierten Januskinasen (JAK2) sich gegenseitig durch Transphosphorylierung aktivieren. Aktivierte JAK2 setzen durch Phosphorylierung (P) weiterer Signalproteine wie Signal Transducers and Activators of Transcription Protein (STAT), mitogen-activated protein kinase (MAPK), Phosphoinositid-3-Kinase/Serin/Threonin-Kinase (PI3K/AKT) sowie Nukleare Faktor κ B (NF- κ B) die Signalkaskade fort, an deren Ende eine Genexpression steht. Untereinheiten des NF- κ B (p50, p65 und I κ B).

Quelle: Modifiziert nach (Alnaeeli et al. 2012).

Zahlreiche gewonnen Erkenntnisse auf diesem Gebiet ermöglichten am Ende des letzten Jahrhunderts bei Patienten mit erythropoetischen Defiziten eine standardisierte therapeutische Anwendung des mittlerweile in ausreichend großen Mengen

hergestellten rekombinanten EPO (Jacobs et al. 1985). Und obwohl Erythropoetin relativ stark im Fokus der Forschungen stand, wurden erst zu Beginn dieses Jahrhunderts auch weitere, außerhalb von Erythropoese liegende bedeutende Funktionen von EPO entdeckt. Dabei ist dessen neuentdeckte Rolle im zentralen Nervensystem (ZNS), im Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen, heute von großem Interesse für die Wissenschaft. (Broxmeyer 2013).

1.2.1. Die Bedeutung für die neurologischen Erkrankungen

Die Erkenntnis über das Vorliegen eines von der Hämatopoese unabhängigen autokrinen/parakrinen EPO/EPO-Rezeptor-Systems im Gehirn war ausschlaggebend für die weitere Forschung an diesem Glykoprotein in seiner Rolle als potentiell Heilmittel für neurologische Erkrankungen. Die ersten Schritte zu dieser Erkenntnis begannen mit der Entdeckung der hypoxieinduzierbaren mRNA von EPO und seinem Rezeptor im zentralen Nervensystem sowohl beim Menschen als auch bei niederen Säugetieren wie der Maus (Marti et al. 1997; Digicaylioglu et al. 1995). Vor allem die Neurone des Neocortex und des Hippocampus beider Spezies weisen die höchste Dichte an EPO-R auf, wobei die Gefäße und die Astrozyten hingegen das meiste orthotope Erythropoetin produzieren (Juil et al. 1999; Liu et al. 1997). Die EPO-R-Anzahl und die produzierte EPO-Menge im Gehirn schwankt entwicklungsabhängig und ist in der Fetalphase am höchsten (Liu et al. 1997). Im adulten Gehirn kommt es nach einer Verletzung zu einer lokalen Induktion des autokrinen/parakrinen EPO/EPO-R-Systems im Bereich der Penumbra, ansonsten ist die EPO-Menge und die EPO-R-Anzahl im erwachsenen Alter deutlich reduziert (Hand and Brines 2011; Liu et al. 1997). Der Beweis für die Autarkie des Erythropoetins im Gehirn ist weiterhin zum einen die starke Undurchlässigkeit der Blut-Hirnschranke für das nephrogene EPO und zum anderen das Vorkommen eines anderen, nicht hämatopoetischen, heterodimeren EPO-Rezeptortyps (Juil et al. 2004; Jubinsky et al. 1997). Dieser Rezeptor-Typ bestehend aus einem EPO-Rezeptormonomer, der gepaart mit CD131 ist, kommt neben anderen nicht hämatopoetischen Gewebearten insbesondere vermehrt im Gehirn vor. Der Rezeptor weist zwar eine geringere Affinität für EPO auf, doch wird ihm eine entscheidende Rolle bei der Neuroprotektion im ZNS zugeschrieben (Sanchez et al. 2009; Brines et al.

2004). Es bleibt zwar weiterhin unklar, welcher der beiden Rezeptoren nun in dieser Funktion dominiert und ob es noch weitere Rezeptoren gibt, bekannt sind jedoch die intrazellulären, EPO-R vermittelten Signalwege nach einer Hirnverletzung und dementsprechend der Effekt von EPO auf das verletzte Hirngewebe im adulten Entwicklungsstadium (Chateauvieux et al. 2011). In der vulnerablen Umgebung um den zerstörten Kernbereich bei einem Hirnschaden, reguliert EPO die Expression der antiapoptotischen Proteine hoch, die der Apoptose-induzierenden Proteine dagegen herunter und verhindert somit ein Überschießen des programmierten Zelltodes im vulnerablen Areal (Kumral et al. 2006; Wei et al. 2006; Spandou et al. 2004). Es induziert die Angiogenese in schlecht durchbluteten Bereichen, verbessert die lokale Durchblutung über die Induktion der vasoaktiven Substanz Stickstoffmonoxid (NO) und wirkt antioxidativ (Su et al. 2011; Wang et al. 2011; Li et al. 2008; Kumral et al. 2005). Zudem inhibiert es die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, reduziert das zytotoxische Ödem über die Induktion von Aquaporinen in Astrozyten und mindert die Exzitotoxizität des bei einer Verletzung freigesetzten Glutamats durch Senkung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration. Alles zusammen führt zum Erhalt von mehr Penumbra (Andoh et al. 2011; Gunnarson et al. 2009; Shen et al. 2009). Experimente an EPO- und EPO-R-defizienten Knockout-Mäusen sowohl präpartal während der ZNS-Entwicklung als auch postpartal nach einem hypoxischen Hirnschaden, zeigen die bedeutende Rolle des Erythropoetins auch in der Neurogenese (Tsai et al. 2006). Ähnlich seiner Aufgabe eines differenzierenden Faktors in der Erythropoese, induziert das EPO die Differenzierung der pluripotenten Zellen im Gehirn zu neuronalen Progenitorzellen und ermöglicht bei einem Schlaganfall deren Migration zum infarzierten Bereich (Iwai et al. 2007; Shingo et al. 2001). So wirkt das EPO nicht nur schadensbegrenzend, sondern auch reparaturfördernd auf das ZNS ein und wird somit seiner neuroprotektiven und neuroregenerativen Rolle gerecht. Sowohl für die embryonale Gehirnentwicklung als auch für das adulte Gehirn selbst ist EPO von großer Bedeutung, weil es das neurologische, vaskuläre und immunologische System und somit die damit assoziierten Erkrankungen wie Schlaganfall, Alzheimer, Parkinson, Multiple Sklerose Retinopathie oder Polyneuropathie in ihrem Verlauf positiv zu beeinflussen vermag (Maiese et al. 2012).

1.2.2. Die Bedeutung für die psychiatrischen Erkrankungen

Der Gedanke, das Erythropoetin als neues Therapeutikum bei unheilbaren neurologischen Erkrankungen einzusetzen, ist mindestens genauso alt wie der Gedanke es als mögliches Mittel bei schlecht therapierbaren psychiatrischen Erkrankungen wie Depression oder Schizophrenie zu verwenden. Da viele psychiatrische Erkrankungen zum Teil pathophysiologisch auf einer erworben beeinträchtigten Neuroplastizität beruhen, für die ein chronisch neurogener Schaden ursächlich ist, erscheint so ein Gedanke aufgrund der oben beschriebenen Potenz des EPO neuronale Netzwerke auch im adulten Gehirn zu schützen und zu reparieren gar nicht mal so abwegig (Goto et al. 2010). Versuche an Mäusen, Ratten und Menschen bestätigten zudem einen nicht hämodynamischen Einfluss von EPO und seiner synthetischen Derivate auf die Stärke der synaptischen Verknüpfungen, auf die Gedächtnis-Netzwerke und auf die Neuroplastizität im Hippocampus gesunder Individuen mit daraus folgender Verbesserung der kognitiven Leistungen, welche häufig beim organischen Hirnschaden oder psychiatrischen Erkrankungen eingeschränkt sind (Ding et al. 2013; Adamcio et al. 2008; Miskowiak et al. 2008; 2007a; Mogensen et al. 2008). Noch häufiger als ein akuter organischer Hirnschaden kommt ein Hirnschaden durch chronischen Stress, welcher inflammatorische Prozesse aktiviert, zustande. Diese Prozesse wiederum führen zu einer nachhaltigen Volumenreduktion des Hippocampus, zu den damit verbundenen kognitiven Einschränkungen und zur Entstehung einer Depression (Miskowiak et al. 2012). Das molekulare Korrelat für eine mögliche antidepressive Wirkung von EPO ist die Stimulierung eines Wachstumsfaktors namens BDNF, welcher im Hippocampus und der Großhirnrinde des Vorderhirns protektive Eigenschaften gegenüber Stressfaktoren aufweist (Hayley and Litteljohn 2013). Dafür muss EPO nicht einmal exogen zugeführt werden, denn durch mehrfache Anwendungen einer Elektrokonvulsion bei Ratten, wurde ein EPO-Anstieg im Gehirn zusammen mit einer antidepressiven Wirkung beobachtet (Girgenti et al. 2009). So könnte auch EPO eines jener zahlreichen Hormone oder gar Neurotransmitter sein, welcher eine antidepressive Wirkung nach der Elektrokonvulsionstherapie auch beim Menschen entfaltet. Der reduzierte Verlust von der grauen Substanz und eine Verbesserung der kognitiven Leistungen nach der EPO-Applikation, stellt das morphologische Korrelat für dessen Wirksamkeit bei Schizophrenieerkrankten dar (Fond et al. 2012). Auch die emotionalen

Prozesse wie Stimmung oder Angst, welche vom Hippocampus und anderen Bestandteilen des limbischen Systems gesteuert werden und häufig bei psychiatrischen Erkrankungen wie Depression oder Angststörung im Ablauf gestört sind, werden ebenfalls von EPO bei beiden Spezies beeinflusst (Osborn et al. 2013; Miskowiak et al. 2007b). So reduziert bei den Mäusen das carbomyelierte EPO-Derivat ihr Angstverhalten (Leconte et al. 2011). Im Zusammenschau all dieser Erkenntnisse wird die Bedeutung von EPO für die Psychiatrie deutlich, weckt sie doch Hoffnungen, dass in nächster Zukunft durch moderne, nebenwirkungsarme, ZNS-spezifische EPO-Derivate und durch einfachere Applikationsmethoden, neue Therapiemöglichkeiten für schwer behandelbare psychiatrische Erkrankungen zur Verfügung stehen werden (Hayley and Litteljohn 2013).

1.3. Die Fragestellung und die Ziele der Arbeit

Die Aussicht darauf, dass Erythropoetin in naher Zukunft bei bisher prognostisch ungünstigen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen als ein neues therapeutisches Mittel einzusetzen, forcierten in der letzten Dekade die Erforschung seiner Rolle im zentralen Nervensystem (Alnaeeli et al. 2012). Doch obwohl die neu gewonnen Erkenntnisse unser Bild vom ursprünglich rein erythropoetischen Zytokin zum neuroprotektiven Agens enorm verändert haben, erfuhr EPO dennoch auch Rückschläge auf diesem Gebiet und generierte zu seiner Rolle im ZNS mehr Fragen als Antworten. Diese Rückschläge zeigen uns deutlich, dass die bisherige Wirkung von EPO auf das ZNS nicht hinreichend verstanden ist. Der Fehlschlag EPO als Therapeutikum in großen Studien erfolgreich anzuwenden ist nicht zuletzt durch eine einseitige Fokussierung auf dessen alleinige langzeitliche neuroprotektive Wirkungskomponente mit verursacht (Hand and Brines 2011). Weitere mögliche Wirkungen und Nebenwirkungen im ZNS sind bisher nur wenig beachtet worden. Um diesen Umständen Rechnung zu tragen, möchte ich mich durch diese Arbeit seiner potentiellen direkten Wirkung als Neuromodulator auf das inhibitorische System neuronaler Netzwerke zuwenden. Die Fähigkeit von EPO bereits zwei Tage nach dessen Applikation sowohl die Konzentrationen anderer Neurotransmitter wie Monoamine oder Acetylcholin in embryonalen Nervenzellkulturen zu steigern als auch die GABAerge Transmission solcher kultivierten Neurone zu beeinflussen, gibt deutliche

Hinweise auf seine modulatorische Rolle im ZNS (Wojtowicz and Mozrzymas 2008; Tabira et al. 1995). Auch das Vorhandensein anderer bisher wenig erforschter EPO-R-Typen lässt weitere, über diese Rezeptoren im Gehirn vermittelten Effekte von EPO erwarten (Sanchez et al. 2009). Zwar konnte anhand von vitalen Hirnschnitten des Hippocampus ein langzeitlicher Einfluss auf die GABAerge Transmission bei, mehrere Wochen im Voraus, mit EPO behandelten Mäusen, nachgewiesen werden (Adamcio et al. 2008), dennoch blieb der Nachweis einer unmittelbaren Wirkung von EPO auf die neuronale Transmission, Sekunden bis Minuten nach dessen Applikation auf beliebige Hirnareale adulter Individuen, weiterhin aus. Für den fehlenden Nachweis ist auch im Hinblick auf spätere klinische Studien, die Untersuchung der GABAergen Transmission am PrL bestens geeignet, da dieses Rindenareal als Ursprungsort für bedeutende psychiatrische und neurologische Erkrankungen gilt (Goto et al. 2010), deren Verlauf durch EPO in einigen Studien positiv beeinflusst werden konnte (Miskowiak et al. 2012). Um dabei nichts zu übersehen und die Versuchsreihen so real wie möglich zu gestalten, wende ich mich auch hierbei einer bisher nur wenig beachteten wissenschaftlichen Betrachtungsweise zu, nämlich einem hemisphärenspezifischen links-rechts Seitenvergleich bezüglich einer möglichen EPO-Wirkung.

Mit dieser Vorgehensweise möchte ich dabei folgende Fragen beantworten:

- a) Übt EPO eine direkte Wirkung auf die synaptische GABAerge Transmission unmittelbar nach seiner Applikation im PrL aus?
- b) Wenn ja, ist diese Wirkung innerhalb des PrL überall gleich?
- c) Gibt es seitenspezifische Unterschiede dieser Wirkung?
- d) Sind diese Unterschiede inter- oder intraindividuell?

2. Material und Methoden

Die elektrophysiologischen Experimente und die anschließende Auswertung der Daten wurden durch den Autor selbst im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Bis zur Organentnahme erfolgte die Aufzucht sowie die anschließende Dekapitation der Versuchsmäuse unter strenger Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes (Stand 2011).

2.1. Die Versuchsvorbereitung

Zuerst wurden elektrophysiologische Lösungen hergestellt, welche für die darauffolgende Hirnpräparation und anschließende Patch-Clamp-Ableitung dienen.

2.1.1. Die elektrophysiologischen Lösungen

Alle Chemikalien für die elektrophysiologischen Lösungen wurden bis auf $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Germany) von (Roth, Germany) hergestellt.

Die extrazelluläre Elektrolytlösung für die Hirnschnittpräparation (in mmol/l)

3 KCl, 1.25 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 6 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 26 NaHCO_3 , 0.2 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 Glucose, 220 Sucrose (pH 7.4, 310-320 mosm/l)

Die extrazelluläre Elektrolytlösung für die Versuchsdurchführung (in mmol/l)

126 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 1 MgSO_4 , 26 NaHCO_3 , 2 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 Glucose (pH 7.4, 310-320 mosm/l)

Die intrazelluläre auf KCl basierende Elektrolytlösung (in mmol/l)

140 KCl, 2 MgCl_2 , 1 CaCl_2 , 10 HEPES, 0.5 Na_3GTP , 10 EGTA, 4 Na_3ATP (pH 7.2, 300-310 mosm/l)

2.1.2. Die Hirnschnittpräparation

Das Präparieren koronarer Frontalhirnschnitte erfolgte nach der etablierten, in (Adamcio et al. 2008) beschriebenen Methode, die für den Prälimbischen Cortex geringfügig angepasst wurde. Als Hirnsponder diente die gut erforschte und somit mit anderen Forschungsergebnissen besser vergleichbare, zwischen 84 und 108 Tage adulte C57BL/6 Maus. Da unter anderem ein Hemisphärenvergleich angestrebt wurde, dienten ausschließlich männliche Individuen als Organspender, um die bekannten geschlechtsspezifischen Alterationen im Seitenvergleich auszuschließen (Sullivan et al.

2014). Zudem eigneten sich männliche Individuen als Versuchstiere am besten, da bei allen Versuchstieren von einem relativ konstanten Geschlechtshormonspiegel auszugehen war. Die Tiere wurden für die Organentnahme von der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung in Münster, nach einer Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein Westfalen (Aktenzeichen: 8.87-51.05.20.09.194), zur Verfügung gestellt. Vor der Dekapitation wurden die Tiere tief mit Isofluran (DeltaSelcet, Germany) anästhesiert. Nach der Enthauptung und Eröffnung der Schädelkalotte mittels einer feinen Schere entlang der Sagittalnaht und anschließendem seitlichem Aufklappen beider Scheitelbeine mit einer Pinzette, wurde das gesamte Gehirn mit einem feinen Spatel von der Schädelbasis gehoben und für zwei Minuten in eine eiskalte, mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) (3-4 ml/min) begaste sowie auf den pH-Wert von 7,4 äquilibrierte, künstlich-hergestellte, Liquor-äquivalente Hirnpräparierlösung (siehe Kap. 2.1.1) gelegt. Bevor das Gehirn mit Sofortklebstoff (Loctite 401, Henkel, Germany) an eine Metallscheibe geklebt und in ein Vibratom eingespannt wurde, erfolgte nach Entfernung des Kleinhirns eine Markierung der linken und der rechten Hirnseite mit einem feinen Skalpell (Aesculap instruments, Germany). Dabei wurden oberflächliche Hirnschnitte in sagittaler Ausrichtung entlang der Hirnbasis gesetzt, sodass die Integrität des weiter dorsal liegenden PrL und seiner benachbarten Strukturen erhalten blieb. Die rechte Seite wurde mit einem und die linke mit zwei parallelen Schnitten markiert. Mit einem Vibratom (752M vibroslice, Campden Instruments, Loughborough, UK) wurden danach ca. 300-350 µm dünne Hirnschnitte von dem PrL angefertigt. Die präparierten Hirnschnitte wurden schließlich in eine bereits mit der endständigen Aufnahmelösung (siehe Kap. 2.1.1) gefüllten und in einem auf 33 °C erhitzten Warmwasserbadbehälter (Water bath D8, Haake, Germany) stehende Inkubationskammer (Eigenbau) gelegt und für eine Stunde stehen gelassen. Vor den elektrophysiologischen Aufnahmen ruhten die Hirnschnitte nach der Inkubation für weitere 30 Minuten bei Zimmertemperatur in der Aufnahmelösung. Auch die Aufnahmelösung wurde kontinuierlich während des gesamten Prozesses vor und während der Ableitungen mit Carbogen begast. An jedem experimentellen Tag wies sowohl die Hirnpräparier- als auch die Aufnahmelösung annähernd die gleiche gemessene Osmolarität von ca. 310 mosm/l auf.

2.1.3. Die Pharmakologie

Alle Pharmaka bis auf das Erythropoetin wurden ca. 5 Minuten vor Beginn der jeweiligen Patch-Clamp-Ableitung in die Aufnahmelösung appliziert und sind während des ganzen Experiments in der Lösung enthalten gewesen. EPO wurde erst nach einer Kontrollaufnahme von 3 Minuten in die Aufnahmelösung gegeben, in der es bis zum Ende der Ableitung verblieb.

(DL)-AP₅ (50 µmol/l) DL-2-Amino-5-Phosphonovaleriansäure, NMDA-Rezeptor Antagonist (Tocris, UK).

CNQX (10 µmol/l) 6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2,3-Dion Disodium, AMPA-Rezeptor Antagonist (Tocris, UK).

Strychnin (12 µmol/l) (-)-Strychnine, Glycin-Rezeptor Antagonist (Sigma-Aldrich, Germany).

EPO (5 I.E./ml) Epoetin alfa, (ERYPO® Janssen-Cilag GmbH, Germany)

Bei der Herstellung von EPO für die Versuchszwecke wurde 1 ml ERYPO® aus einer Fertigspritze mit 9 ml Aqua ad injectabilia (B Braun Melsungen AG, Germany) verdünnt und auf 100 Röhrchen (Eppendorf) zu je 100 µl aufgeteilt und eingefroren. Beim Versuch wurde EPO direkt in die Ableitkammer appliziert und erreichte in der Aufnahmelösung, die den Hirnschnitt umspülte eine Konzentration von 5 I.E./ml. Für die Wahl des Präparats und dessen Dosis diente mit einer geringen Modifikation für eine direkte EPO-Applikation die Veröffentlichung von (Adamcio et al. 2008).

2.2. Versuchsdurchführung und Auswertung

Nach der Inkubation der Hirnschnitte erfolgte unter entsprechenden Pharmaka die Patch-Clamp-Ableitung von sIPSC (*spontaneous inhibitory postsynaptic currents*) einer Pyramidenzelle in der II/III. Hirnzellschicht des PrL vor und nach der EPO-Gabe. Dieses Vorgehen erlaubte es die sIPSC nur jeweils einer Pyramidenzelle pro Hirnschnitt aufzuzeichnen.

2.2.1. Die Patch-Clamp-Ableitung

Der Hirnschnitt wurde in einer Ableitkammer platziert, um es bei Zimmertemperatur mit der Aufnahmelösung samt oben beschriebenen Pharmaka im geschlossenen und mit

Material und Methoden

Carbogen begasten Kreislauf kontinuierlich zu umspülen. Im Kreislauf beförderte eine peristaltische Wasserpumpe (505LA, Watson Marlow, USA) die Aufnahmelösung mit einer konstanten Geschwindigkeit von 2-3 ml/min. Eine U-förmige Platin-Iridium Harfe mit Nylon-Fäden bespannt, fixierte den Hirnschnitt während des Versuchs auf einer und derselben Position. Mithilfe eines über der Ableitkammer montierten Lichtmikroskops (Axioskop 2 FS plus, Zeiss, Germany) erfolgte zunächst die Identifizierung des PrL anhand der lokalen Anatomie in Übereinstimmung mit dem Maushirnatlas von (Franklin and Paxinos 2007). Anhand der zuvor bei der Hirnschnittpräparation gesetzten basalen Seitenmarkierungen konnte die jeweilige Hemisphäre erkannt werden. Ebenso wurde die grobe Lokalisation für die beabsichtigte Ableitung innerhalb des PrL identifiziert und in ein Koordinatensystem aus dorsalen, medianen und ventralen Anteilen eingetragen (siehe Abb. 4, Beschreibung folgt auf der nächsten Seite).

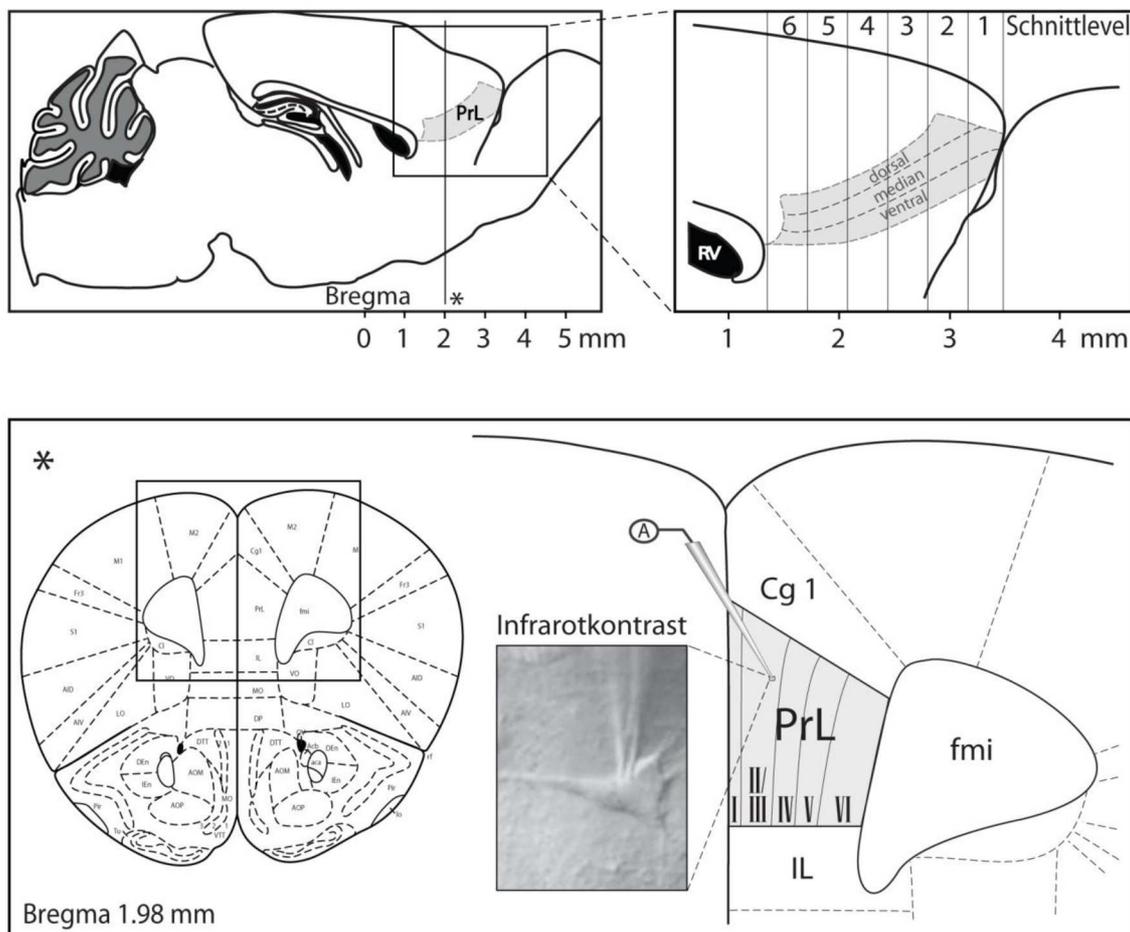


Abb. 4 Die Ganzzell-Ableitung innerhalb des PrL

In der Sagittalansicht ist die Erstreckung des PrL grau markiert zu sehen. Vom PrL können bis zu sechs 300-350 μm große Hirnschnitte angefertigt werden und jeder davon kann visuell annähernd in dorsalen, medianen und ventralen Bereich unterteilt werden. Im unteren mit * markiertem Bild ist der Präfrontale Cortex im koronaren Anschnitt dargestellt, so wie man ihn auch während der Experimente erkennen konnte. Auf dem vergrößerten koronaren Schnitt sind schematisch die Zellschichten, römisch I-VI mit einer in der II/III. Schicht gesetzten, mit A wie Aufnahme gekennzeichneten Elektrode dargestellt. Eine Originalaufnahme zeigt die Ganzzell-Konfiguration während der Patch-Clamp-Ableitung. Die Bregma dient als Bezugspunkt für die Lage des PrL und der Hirnschnitte. Die Entfernung ist in Millimetern (mm) von der Bregma angegeben. Cg: Cingulärer Cortex Area 1; IL: Infralimbischer Cortex; fmi: Forceps minor corporis callosi.

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an (Franklin and Paxinos 2007) mit dem durch Prof. W. Zhang freundlicherweise zur Verfügung gestellten Foto.

Die zusätzliche Anwendung eines 40x Wasserimmersionsobjektivs mit infrarotem Differentialinterferenzkontrast erlaubte eine genaue Erkennung von vitalen Pyramidenzellen in der II/III. Nervenzellschicht des PrL. Diese Zellen zeichneten sich durch ihre Helligkeit, eine glatte Oberfläche mit scharfer Begrenzung zu ihrer Umgebung und einem nicht sichtbaren Zellkern aus (Edwards and Konnerth 1992). Vor der Ableitung wurde die benötigte Messelektrode, auch als Patch-Pipette bezeichnet, mit einem horizontalen Elektrodenziehgerät (Flaming micropipette puller P87, Sutter instrument, USA) aus Borosilikatglas-Kapillaren (BF150F-10) hergestellt. Mit einer intrazellulären Lösung gefüllte Pipette (siehe Kap. 2.1.1) wurde dann in den Elektrodenhalter eingespannt. Der Widerstand einer solchen Messelektrode betrug in der Aufnahmelösung 4 bis 8 $\text{M}\Omega$. Bei allen folgenden Patch-Clamp-Ableitungen wurde eine Ganzzell-Konfiguration im Voltage-Clamp-Modus durchgeführt, wobei dadurch indirekte Messungen von Ionenströmen durch alle Membrankanäle einer Zelle, nach deren Membrandurchbruch und Anlegung einer konstanten Spannung durch die Patch-Pipette an die Zellmembran, ermöglicht wurden (Fenwick et al. 1982). Um diesen experimentellen Zustand zu erreichen, wurden einige typische Standardschritte durchgeführt. Zunächst wurde die Patch-Pipette unter visueller Kontrolle an eine Pyramidenzelle im zuvor identifizierten PrL herangeführt. Zur Vermeidung von Verschmutzungen der Pipettenspitze durch Neuropil und totes Zellgewebe auf dem Weg zur Pyramidenzelle wurde ihr Inhalt auf ein leichtes Überdruckniveau (50 mbar) angehoben. Nach entsprechender Einstellung des Patch-Clamp-Verstärkers (WPC-100, ESF, Göttingen, Germany) in den Voltage-Clamp-Modus glich man an der Patch-

Pipette, welche in die Aufnahmelösung tauchte, die Offset-Spannung aus. Ebenso wurde vor und während der Ganzzell-Ableitung die Kompensation des Serienwiderstands approximiert. Sobald sich die Pipettenspitze ganz nah an der Zelloberfläche befand, erfolgte deren weitere vorsichtige Heranführung an die Zellmembran über einen Mikromanipulator (Göttingen, Germany) soweit, bis eine kleine überdruckbedingte Ausbeulung über der Elektrodenspitze an der Zellmembran sichtbar wurde. Danach unterband man den Überdruck und applizierte einen kleinen Unterdruck an die Elektrode durch ein leichtes Ansaugen der Zelle. Ein leichter Anstieg des positiven Widerstands an der Elektrode zeigte zusätzlich, wie nah die Pipettenspitze an der Membran war. Infolge dieses Manövers entstand zwischen der Elektrode und der Zellmembran ein sogenanntes *giga seal*, ein hochohmiger Widerstand im Gigaohm-Bereich. Eine Haltespannung von -70 mV unterstützte die Bildung vom *giga seal*. Nach der Kompensierung der Membrankapazität erfolgte durch kurze aber kräftige Saugpulse die Durchbrechung der Zellmembran. Dadurch war dann ein elektrischer Zugang zum Zytosol gewährleistet und eine Ganzzell-Ableitung im Voltage-Clamp-Modus konnte beginnen (siehe Abb. 4). Eine detaillierte Beschreibung zur Ganzzell-Ableitung liefern (Fenwick et al. 1982; Hamill et al. 1981). Während der Aufzeichnung wurden die gemessenen Ionenströme durch die Zellmembrankanäle mit einer Eckfrequenz von 1 kHz durch einen vier-poligen Bessel Filter gefiltert. Anschließend wurden diese mit einem A/D-Wandler (Digidata 1322A, Molecular Devices, USA) nach einer Abtastrate von 5 kHz digitalisiert und auf einem Personal Computer gespeichert. Daten von Zellen, die während der Signalaufzeichnung einen Serienwiderstand unter 20 M Ω , einen Membranwiderstand über 200 m Ω oder Leckströme unter 200 pA nicht erreichten, wurden nicht in die weitere Datenverwertung aufgenommen und anschließend verworfen. Das gleiche geschah mit den Daten von Zellen, deren jeweilige Amplitude den zweifachen Wert des jeweiligen Hintergrundrauschens unterschritt oder deren anfängliche Grundfrequenz in der Kontrollaufnahme nicht zwischen 2,5 und 8 Hz lag.

2.2.2. Die experimentelle Konfiguration

Nach Applikation aller bis auf EPO oben erwähnten Medikamente, erfolgte die Positionierung der Patch-Pipette an eine Pyramidenzelle in der II/III. Schicht des PrL. AP₅ und CNQX dienten zur Ausschaltung der exzitatorischen Komponente der

postsynaptischen Ionenströme. Strychnin verhinderte eine mögliche Wirkung von Glycin, das im EPO-Präparat laut Hersteller enthalten war. Insgesamt erlaubte die Kombination aus allen drei Medikamenten die Aufzeichnung von transmembranären Ionenströmen, die aufgrund der GABAergen Transmission postsynaptisch zustande kamen. Sie werden als *spontaneous inhibitory postsynaptic currents* (sIPSC) bezeichnet (Edwards et al. 1990). Um eventuelle Änderungen der Transmission anhand der Frequenz und Amplitude der sIPSC im zeitlichen Verlauf unter dem Einfluss von EPO zu untersuchen, wurde das Medikament erst nach der dreiminütigen Kontrollaufnahme, die dem späteren Vergleich diente, in die Ableitkammer hineingepumpt und für 27 Minuten beobachtet. Aufgrund noch fehlender wissenschaftlicher Erkenntnisse über die Kurzzeitwirkung von EPO, war diese Beobachtungszeitspanne orientierend an der bereits erforschten intrazellulären Signalkaskade gewählt worden. Diese endet etwa 30 bis 60 Minuten nach Bindung von EPO an EPO-R (Verdier et al. 2000). Andererseits stellte die Aufnahmezeit allein durch den mechanischen Stress, der die intrazellulären Signalwege während der Ableitung negativ beeinflusst, zugleich selbst einen methodenbedingten limitierenden Faktor dar und war daher begrenzt (Hamill and McBride 1997).

2.2.3. Die Datenauswertung und die Statistik

Die gewonnenen Daten wurden von MiniAnalysis 6.0.3 (Synaptosoft, USA) ausgelesen und die Ergebnisse in Form von Amplitude und Frequenz jedes einzelnen, erfassten Ionenstroms in die Excel-Tabelle (Microsoft Office 2007, USA) übertragen. Die Daten von Zellen, welche die oben in (Kap. 2.2.1) beschriebenen Kriterien nicht erfüllten, wurden keiner Datenverarbeitung unterzogen und aus der Statistik ausgeschlossen. Bei der Auszählung wurden nur solche sIPSC als tatsächlich stattgefundenere Ereignisse gewertet, deren Amplitude das Doppelte der Hintergrundgeräuschamplitude überstieg. Bei den auf diese Weise erfassten Parameter wurden pro aufgezeichnete Minute, vor und nach der EPO-Gabe, die Durchschnittswerte mit entsprechenden Standardfehlern berechnet und bei den Ergebnissen präsentiert (Mittelwert \pm Standardfehler). Dabei stellte n die Anzahl der durchgeführten Aufnahmen dividiert durch die Anzahl der dazugehörigen Individuen dar. Die weitere Berechnung und das Kurvendesign wurde mit Hilfe der kommerziellen Software pClamp 10.1 (Molecular Devices, USA), Prism 5

(GraphPad, USA) und Illustrator CS 5 (Adobe Systems Incorporated, USA) erstellt. Durch einen t-Test mit Welch Korrektur, welcher je nach Konstellation verbunden oder unverbunden bzw. einseitig oder zweiseitig war, wurde ein P-Wert berechnet. Als statistisch signifikant galten Werte unter 0,05 ($p < 0,05$). Neben dem unverbundenen links versus rechts Vergleich der EPO Wirkung, wurden auch die sIPSC einer und derselben Zelle vor und nach der EPO-Gabe im verbundenen t-Test miteinander verglichen. Die Entscheidung nach einer einseitigen oder zweiseitigen Durchführung des t-Tests hing von der Tendenz der sIPSC-Kurven im zeitlichen Verlauf ab.

3. Ergebnisse

3.1. Vier ortsspezifische Wirkungstypen von EPO auf die sIPSC

Nachdem ein langzeitlicher Wirkungsnachweis von EPO auf die GABAerge Transmission in adulten und um Wochen im Voraus behandelten Mäusen erbracht wurde (Adamcio et al. 2008), war es notwendig die unmittelbare Wirkung von EPO auf die neuronale Transmission, Minuten nach dessen Applikation auf ein vitales Hirnschnitt zu untersuchen. Zwar ist bereits erwiesen, dass EPO innerhalb von zwei Tagen die Konzentrationen anderer Neurotransmitter wie Monoamine oder Acetylcholin in embryonalen Nervenzellkulturen steigern kann und somit als ein Modulator infrage kommt (Tabira et al. 1995), doch beweist die Steigerung der Neurotransmitter allein noch lange nicht ihr Wirkungspotential auf die neuronalen Netzwerke. Auch blieb es bisher nicht erwiesen, ob EPO die Transmission sofort nach dessen Applikation messbar verändern kann. Um dies klären zu können wurde das erythropoetische Zytokin in der nachgewiesenen langzeitwirksamen Dosis von 5 I.E./ml, direkt den akuten Hirnschnitten einer Maus ohne deren Vorbehandlung mit EPO zugeführt. Im Vorfeld wurde mittels CNQX, AP 5 und Strychnin eine Bedingung für die isolierte Untersuchung der GABAergen Transmission mittels einer Patch-Clamp-Ableitung im Ganzzellmodus geschaffen (siehe Kap. 2.). Die Ableitung von akuten Hirnschnitten entsprach dabei am ehesten dem in vivo Zustand und war somit der Realität am nächsten (Gibb and Edwards 1994). Der PrL als ein wichtiger Ort für die Entstehung einiger neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen (Goto et al. 2010), die positiv durch die EPO-Gabe beeinflussbar sind (Miskowiak et al. 2012), stand im Fokus dieser Versuchsreihen. Die Pyramidenzellen aus der II/III. Schicht, welche mit Hilfe der inhibierenden Interneurone die afferente Information aus anderen Rindengebieten prozessieren und weiterleiten (Cerqueira et al. 2008), eigneten sich dabei hervorragend zur elektrophysiologischen Untersuchung modulatorischer Eigenschaften von EPO mittels Patch-Clamp-Ableitung. Aufgrund eines innerhalb des PrL möglichen ortsspezifischen Modulationsunterschieds wurde der genaue Ort der Ableitung auch seitenbezogen stets identifiziert und notiert. Zum Vergleich dienten die Amplitude und die Frequenz der sIPSC. Die Ergebnisse wurden einzeln, zunächst seitenpezifisch bezüglich der Amplitude und der Frequenz untereinander verglichen.

Ähnliche Kurvenverläufe einzelner Aufnahmen wurden zusammengefasst. Die Gesamtaufnahmezeit von 30 Minuten aller Ableitungen unterteilt sich in drei Abschnitte. Die drei minütige Kontrollaufnahme stellt den ersten Abschnitt dar und liefert zum Vergleich die Ausgangswerte für die folgenden zwei Abschnitte, nämlich für die frühe und die späte Phase nach der EPO-Gabe. Demnach kristallisieren sich aus der Gesamtheit aller sIPSC-Aufnahmen etwa 4 verschiedene Wirkungstypen von EPO heraus.

Für die in diesem Kapitel mit * gekennzeichneten Abbildungen gilt folgendes:

Das vorliegende Laufdiagramm stellt den zeitlichen Verlauf der Amplitude und der Frequenz 3 Minuten vor und 27 Minuten nach der EPO-Gabe dar. Die einzelnen Punkte repräsentieren die errechneten Mittelwerte zum jeweiligen Zeitpunkt mit den entsprechenden beidseitigen Fehlerbalken, welche den Standardfehler dieser Mittelwerte anzeigen. Gestrichelt sind die Hilfslinien, die als Mittelwerte aus den ersten 3 Minuten vor der EPO-Gabe ermittelt wurden. Sie sind jeweils mit dem fiktiven Wert zum Zeitpunkt -3 (siehe Laufdiagramm) zu Beginn der Aufnahme (eigentlicher Aufnahmezeitpunkt 0) identisch. Die oberen Grafiken zeigen die Originalaufnahmen der sIPSC. Sie sind im Laufdiagramm mittels grauer Säulen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten markiert. re bedeutet rechts, li bedeutet links.

Für die in diesem Kapitel mit ** gekennzeichneten Abbildungen gilt folgendes:

Es ist jeweils für die Amplitude und die Frequenz ein zusammenfassendes Säulendiagramm mit einem verbundenen zweiseitigen t-Test zu sehen. Die Säulen orientieren sich nach der Zeitachse des jeweiligen Laufdiagramms und stellen zusammengefasste Mittelwerte innerhalb der unten gekennzeichneten Zeitspanne dar. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler dieser Mittelwerte an. Die Farbe repräsentiert die Hemisphären (rot für die linke und blau für die rechte Hemisphäre). Die in die Säulen eingetragenen Ziffern stehen für n, die Anzahl der durchgeführten Aufnahmen dividiert durch die Anzahl der dazugehörigen Individuen. $P < 0,05$ spricht für eine gegebene Signifikanz, wobei n. s. für nicht signifikant steht.

3.1.1. Wirkungstyp I

Charakteristisch für diesen Wirkungstyp ist der nach oben gerichtete Trend der Frequenz schon in der frühen Phase nach der EPO-Gabe, bei gleichzeitiger tendenzieller Reduktion der Amplitude und anschließender Umkehr der Tendenz beider Parameter in die jeweils entgegengesetzte Richtung im weiteren Aufnahmeverlauf (siehe Abb.5a).

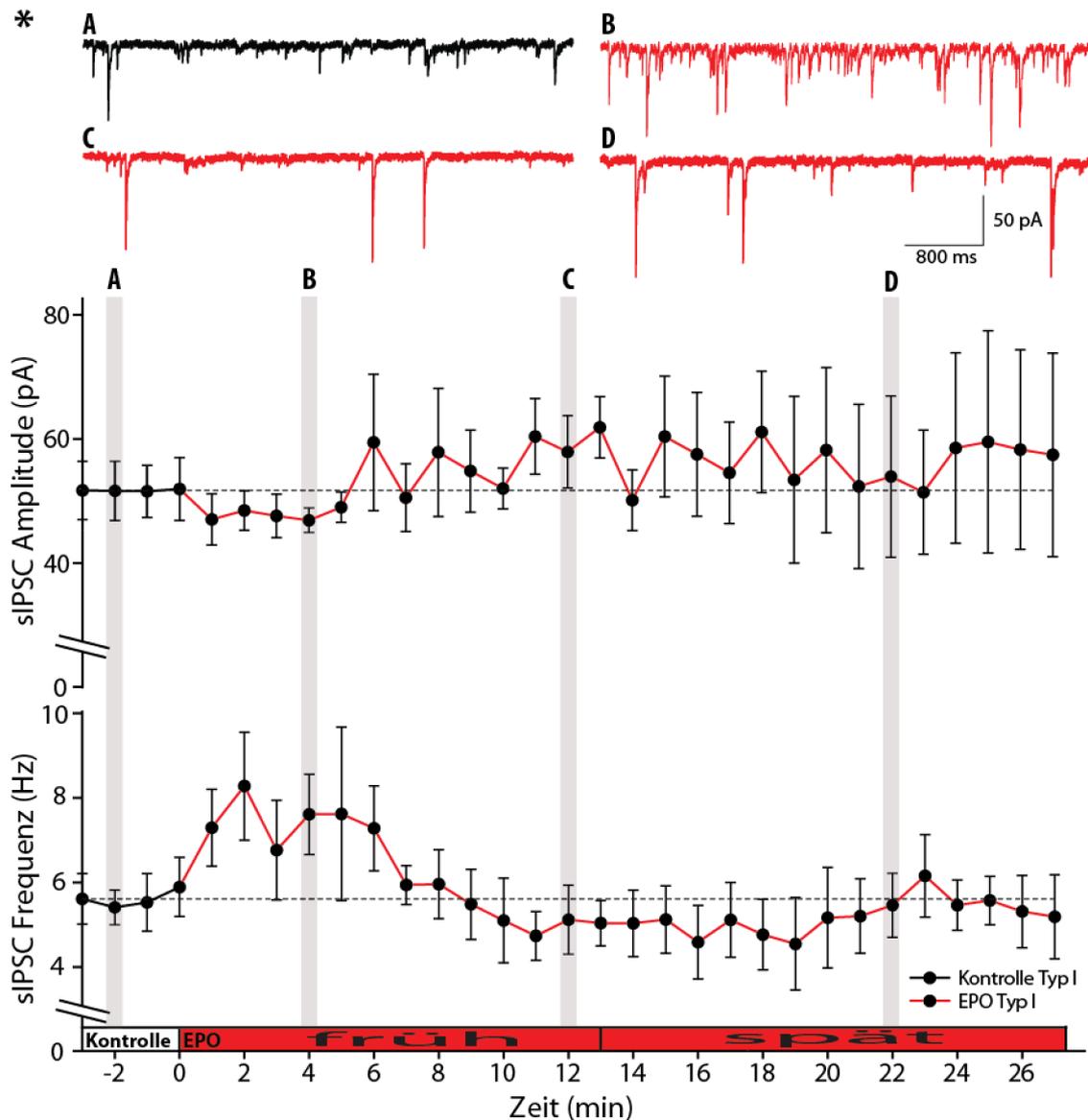


Abb. 5a Wirkungstyp I

EPO steigert tendenziell, bei einer gleichzeitigen tendenziellen Amplitudensenkung, nur innerhalb der ersten 6 Minuten die Frequenz der sIPSC. Vor allem ist die Frequenzsteigerung im Laufdiagramm und am Aufnahmebeispiel (B) zu Beginn der frühen Phase deutlich erkennbar. Ab der 8. Minute kehrt sich diese Tendenz für beide Parameter bis zur 22. Minute um. Die folgende Steigerung der Amplitude ist am ehesten versuchsbedingt aufgrund der im Verlauf reduzierten Zellzahl (von 4 auf 3) entstanden.

* (siehe Beschreibung Kap. 3.1).

Doch sowohl die Änderung der Frequenz (Kontrolle: $5,6 \pm 0,6$ Hz; EPO früh: $6,3 \pm 0,7$ Hz, $P > 0,05$; EPO spät: $5,0 \pm 0,7$ Hz, $P > 0,05$) als auch der Amplitude (Kontrolle: $51,7 \pm 4,0$ pA; EPO früh: $53,4 \pm 3,9$ pA, $P > 0,05$; EPO spät: $58,6 \pm 9,6$ pA, $P > 0,05$) bleiben im verbundenen zweiseitigen t-Test statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 5b).

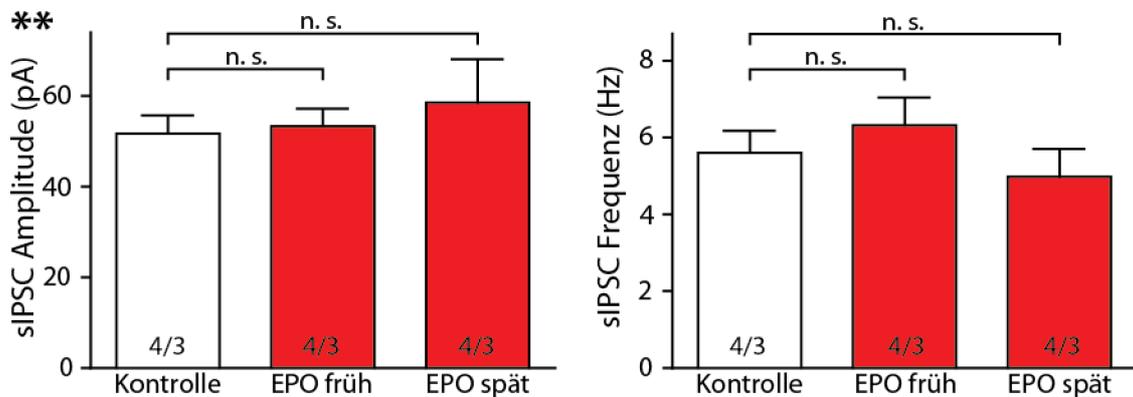


Abb. 5b Wirkungstyp I

Anhand der Histogramme ist im beidseitigen und verbundenen t-Test weder bei der Amplitude, noch bei der Frequenz eine statistische Signifikanz zwischen Kontrollaufnahme und Aufnahme nach der EPO-Gabe zu sehen.

** (siehe Beschreibung Kap. 3.1).

Am ehesten wird die Signifikanz aufgrund der geringen Anzahl der abgeleiteten Zellen ($n=4/3$) nicht erreicht. Die Tendenz zu einer Frequenzsteigerung durch sIPSC mit geringerer Amplitude ist dennoch insbesondere innerhalb der ersten 6 Minuten nach der EPO-Gabe deutlich erkennbar (Kontrolle: $5,6 \pm 0,6$ Hz; EPO 6 Minuten: $7,5 \pm 0,8$ Hz), sodass die Signifikanz nur knapp verfehlt wird ($P=0,07$). Auch eine lokal unterschiedliche Anflutungszeit von EPO aufgrund seiner molekularen Größe (Tao and Nicholson 1996) bedingt durch die unterschiedliche Tiefe der abgeleiteten Pyramidenzellen innerhalb des Hirnschnittes, könnte eine größere Streuung der Frequenzänderung innerhalb des zeitlichen Verlaufs verursachen, und dadurch die Signifikanz negativ beeinflussen. So tritt die Wirkung von EPO bei tiefer liegenden abgeleiteten Zellen viel später auf als bei denen, die oberflächlich im Hirnschnitt liegen und daher schneller durch das Glykoprotein erreicht werden. Insgesamt ergibt sich dann bezüglich des Wirkungseintritts ein recht unscharfes frequenzbezogenes Wirkungsprofil von EPO. Wie dem auch sei, ist dieser Wirkungstyp stumm, da er im Allgemeinen bis zum Beweis des Gegenteils, durch eine höhere Anzahl an Ableitungen, keine signifikante Änderung von Frequenz oder Amplitude nach der EPO-Gabe zeigt.

3.1.2. Wirkungstyp II

Charakteristisch für die Pyramidenzellgruppe vom Wirkungstyp II ist ein Anstieg der Frequenz von sIPSC nach der EPO-Gabe, welcher über die gesamte Aufnahmezeit im Vergleich zur Kontrolle konstant auf einem alternierend höheren Niveau verbleibt (siehe Abb. 6a). Die Amplitude schwankt im gesamten Verlauf der Aufnahme, ohne dabei eine definitive Tendenz nach oben oder unten aufzuweisen (Kontrolle: $41,0 \pm 2,6$ pA; EPO früh: $44,0 \pm 2,6$ pA; EPO spät: $41,8 \pm 3,4$ pA).

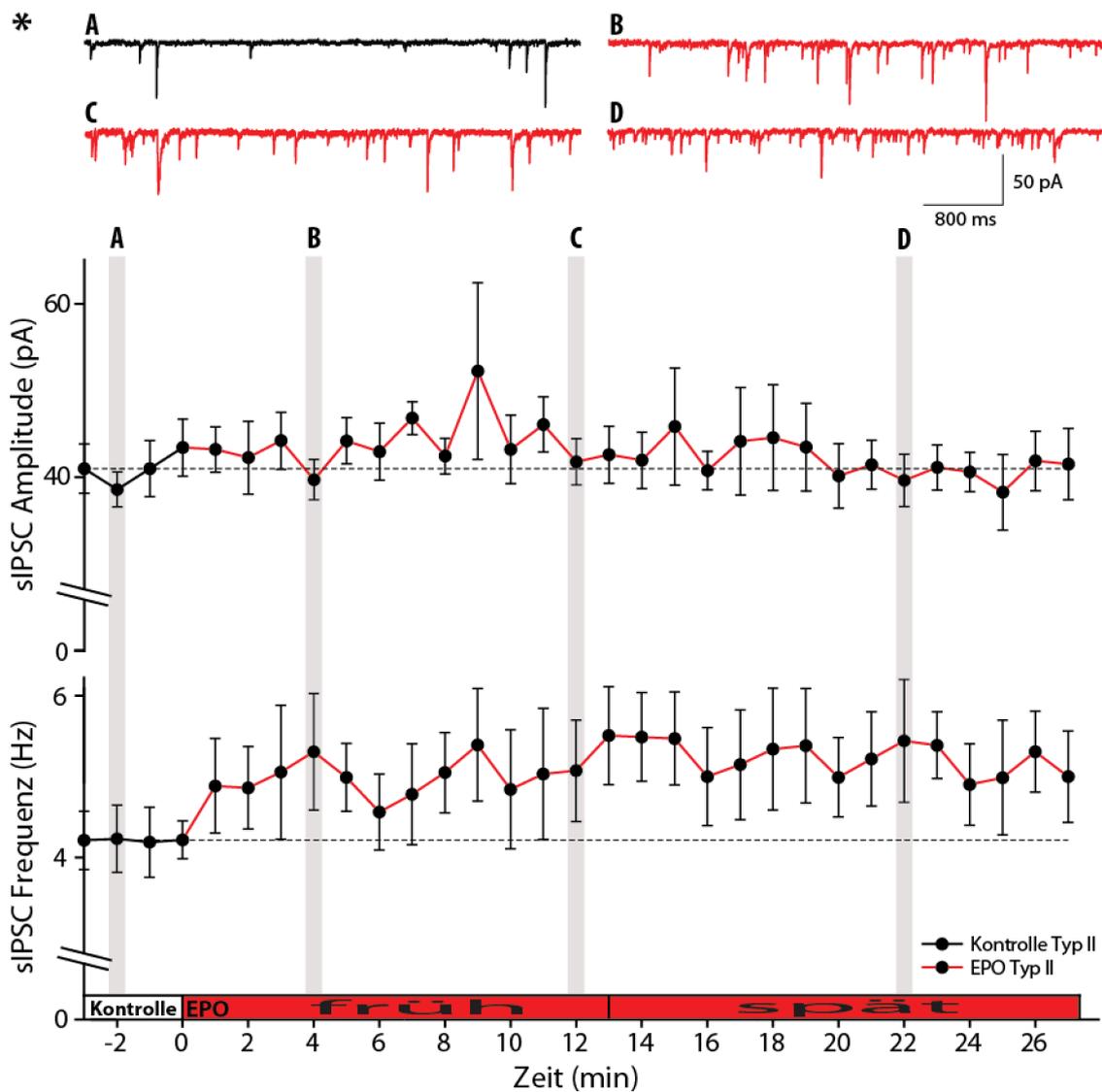


Abb. 6a Wirkungstyp II

EPO erhöht bereits in den ersten Minuten nach dessen Applikation langfristig die Frequenz von sIPSC. Die Amplitude schwankt dagegen undulierend und weist bei einem gleichzeitig hohen Standardfehler nur vereinzelte Ausreißer nach oben oder unten.

* (siehe Beschreibung Kap. 3.1).

Im Gegensatz zur Amplitude weist die Änderung der Frequenz von sIPSC durch EPO (Kontrolle: $4,2 \pm 0,3$ Hz; EPO früh: $5,0 \pm 0,5$ Hz; EPO spät: $5,2 \pm 0,5$ Hz) zusätzlich eine statistische Signifikanz (EPO früh und EPO spät: $P=0,03$) auf. Bei der Amplitude ist die unbedeutende Änderung nach der EPO-Gabe auch statistisch nicht signifikant (EPO-früh und spät $P>0,05$) (siehe Abb. 6b).

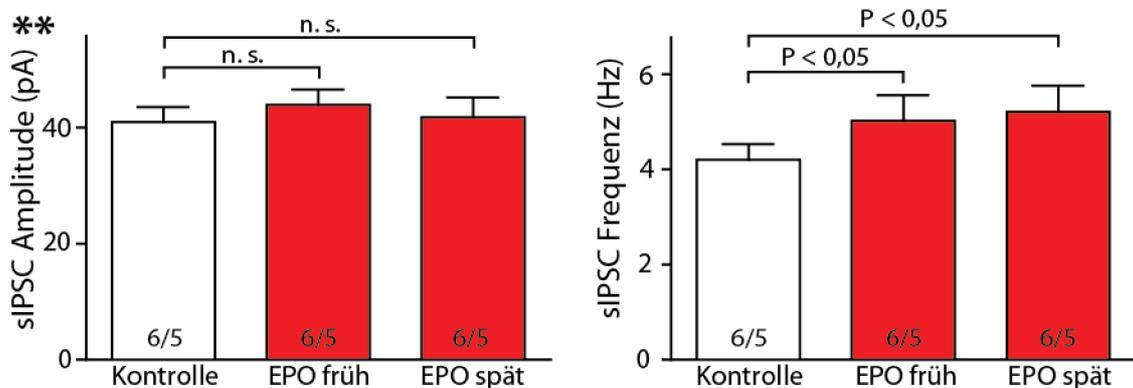


Abb. 6b Wirkungstyp II

Bei der Frequenz ist anhand der Histogramme im beidseitigen und verbundenen t-Test eine statistische Signifikanz zwischen Kontrollaufnahme und Aufnahme nach der EPO-Gabe, sowohl zum früheren als auch zum späteren Zeitpunkt zu sehen. Bei der Amplitude besteht keine statistische Signifikanz.

** (siehe Beschreibung Kap. 3.1).

Im Vergleich zum Wirkungstyp I, liefert der II. Wirkungstyp einen deutlichen Hinweis, dass Erythropoetin direkten Einfluss auf die GABAerge Transmission durch Frequenzsteigerung hat. Ähnlich dem Typ I setzt dieser Effekt bereits innerhalb der ersten Minute nach der EPO-Gabe ein. Anders als bei dem bisher bekannten modulierenden Effekt auf die GABAerge Transmission, der über die Genaktivierung und Expression nach 48 Stunden verzögert auftritt (Wojtowicz and Mozrzymas 2008), könnte es ein Beleg für die sofortige Wirkung von EPO sein. Im Vergleich zum Wirkungstyp I, mit der tendenziell nur kurz andauernden Frequenzänderung, ist der Wirkungstyp II langanhaltend. Eine genaue Wirkungsdauer ist jedoch nur schwer mit Hilfe dieser experimentellen Konfiguration zu bestimmen, denn es ist zu berücksichtigen, dass proportional zur Aufnahmezeit die Vitalität der Pyramidenzellen und die Integrität zytosolischer Signalproteine durch mechanischen Stress immer weiter abnimmt, sodass die Datenaufnahmekriterien (siehe Kap. 2.2.1) zum späteren Zeitpunkt nicht mehr erfüllt werden und die später Aufnahme nur bedingt mit der Kontrolle vergleichbar ist (Hamill and McBride 1997).

3.1.3. Wirkungstyp III

Charakteristisch für den Wirkungstyp III ist die unveränderte Frequenz und Amplitude nach der EPO-Applikation. Sowohl bei der Frequenz (Kontrolle: $5,8 \pm 0,8$ Hz; EPO früh: $5,6 \pm 0,8$ Hz; EPO spät: $5,7 \pm 0,8$ Hz) als auch bei der Amplitude (Kontrolle: $57,9 \pm 8,8$ pA; EPO früh: $56,4 \pm 9,1$ pA; EPO spät: $51,4 \pm 10,0$ pA) schwanken zwar beide Größen im Verlauf, zeigen jedoch nur bei der Amplitude eine geringfügige Tendenz nach unten, die mit relativ hohen Standardfehlern vergesellschaftet ist (siehe Abb. 7a).

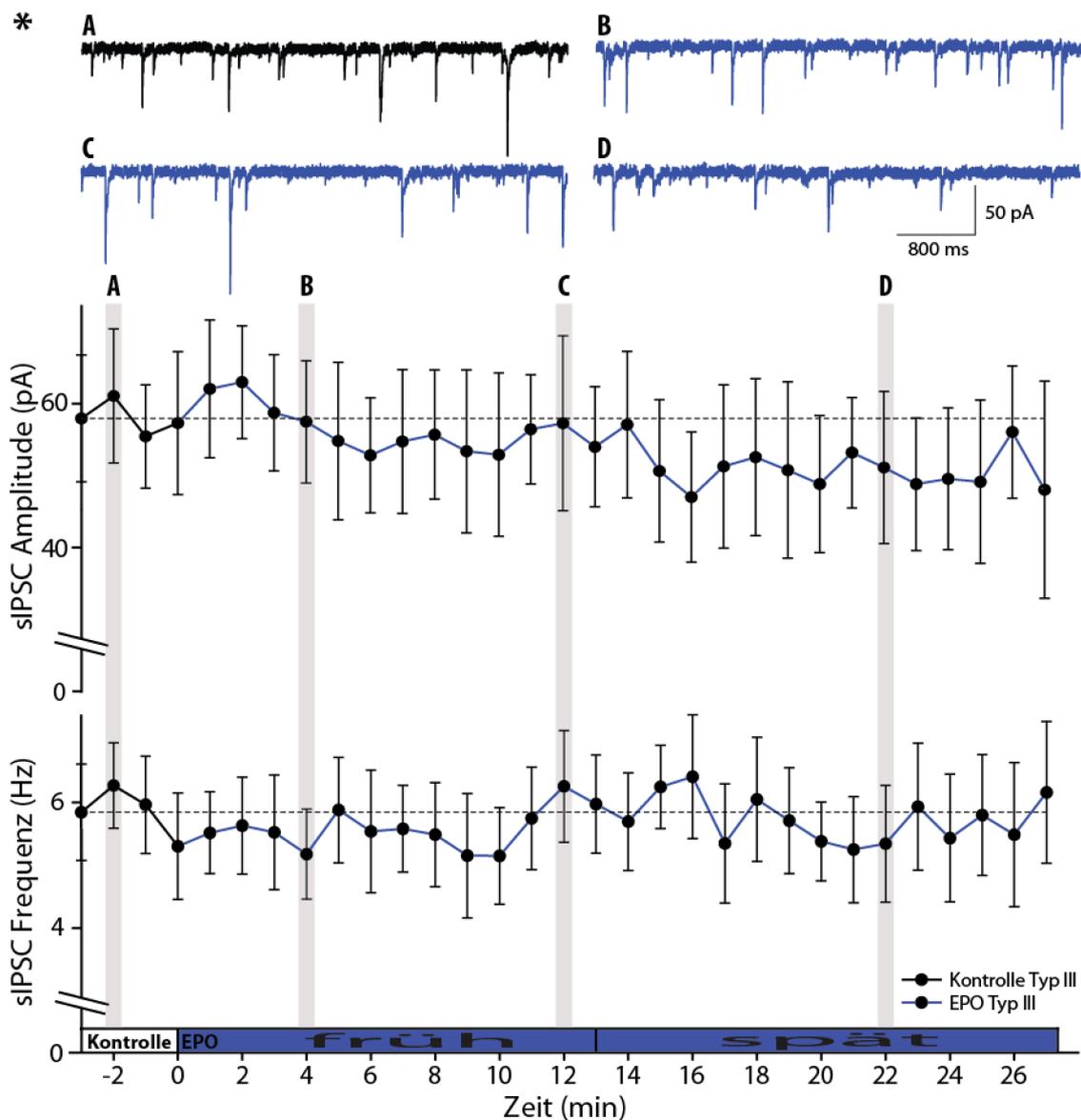


Abb. 7a Wirkungstyp III

EPO verändert bei insgesamt 5 Aufnahmen, weder die Amplitude, noch die Frequenz. Der Kurvenverlauf ist undulierend. Auch die Originalaufnahmen von sIPSC weisen keine wesentlichen Veränderungen auf.

* (siehe Beschreibung Kap. 3.1).

Zudem kann kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollwerten bei der Frequenz und bei der Amplitude nach der EPO-Applikation, festgestellt werden (EPO früh und spät $P > 0,05$) (siehe Abb. 7b).

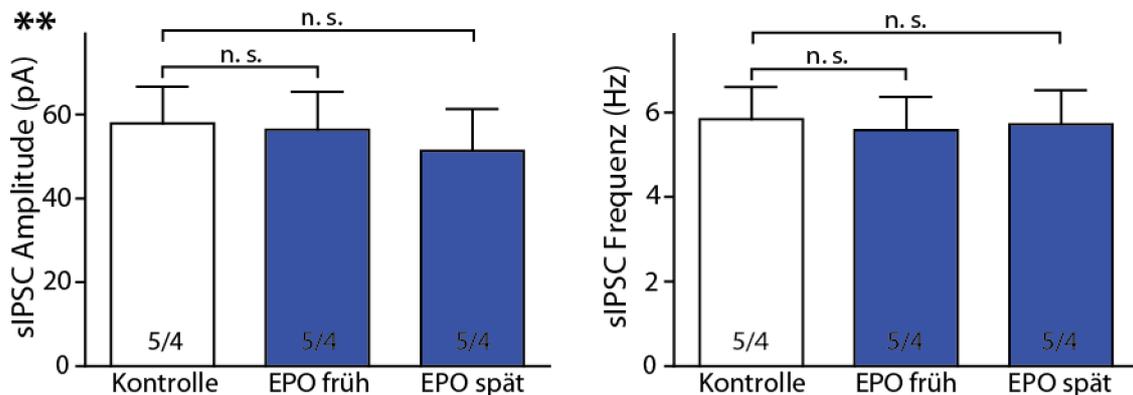


Abb. 7b Wirkungstyp III

Im Säulendiagramm sind keine wesentlichen Änderungen in der Amplitude oder Frequenz während der gesamten Aufnahme nach der EPO-Gabe zu sehen. Im Vergleich zur Kontrolle ergibt sich bei den Parametern unter EPO, im beidseitigen verbundenen t-Test, keine statistische Signifikanz. ** (siehe Beschreibung Kap. 3.1).

Aus den Ergebnissen lässt sich keine Wirkung von EPO auf die zu diesem Wirkungstyp zugeordneten Pyramidenzellen im rechten PrL nachweisen. Anders als beim Wirkungstyp I, bei dem zumindest eine Tendenz in der EPO-Wirkung zu verzeichnen ist, sind die Werte von Frequenz und Amplitude in der frühen und späten Phase nach der EPO-Gabe annähernd gleich. Somit würde auch eine höhere Anzahl an Ableitungen dieses Ergebnis eher nicht ändern. Von der statistischen Seite aus betrachtet ist dieser Wirkungstyp dem Wirkungstyp I in der gegenüberliegenden Hemisphäre sehr ähnlich und ist ebenfalls als stumm zu bezeichnen. Bei bestimmten Zellgruppen weist EPO in beiden Hemisphären keine sofortige Wirkung auf die Frequenz und die Amplitude auf. Diese Erkenntnis ist von großer Bedeutung, denn das Vorhandensein solcher stummer Wirkungstypen könnte die Erklärung dafür liefern, warum die bisherigen Versuche zum Nachweis der unmittelbaren Wirkung von EPO auf die neuronalen Netzwerke häufig keine eindeutigen Ergebnis lieferten oder aufgrund solcher Resultate sogar zur Annahme der Nullhypothese führten (Wojtowicz and Mozrzymas 2008).

3.1.4. Wirkungstyp IV

Charakteristisch für den Wirkungstyp IV ist eine Minderung der Frequenz von sIPSC nach der EPO-Gabe, die im Vergleich zur Kontrolle über die gesamte Zeit konstant auf

dem nahezu gleichen Niveau verbleibt und somit das Gegenteil zum kontralateralen Wirkungstyp II darstellt. Auch die Amplitude schwankt ähnlich dem Wirkungstyp II im gesamten Verlauf der Aufnahme, jedoch weist diese im Gegensatz dazu eine Tendenz nach unten auf (siehe Abb. 8a).

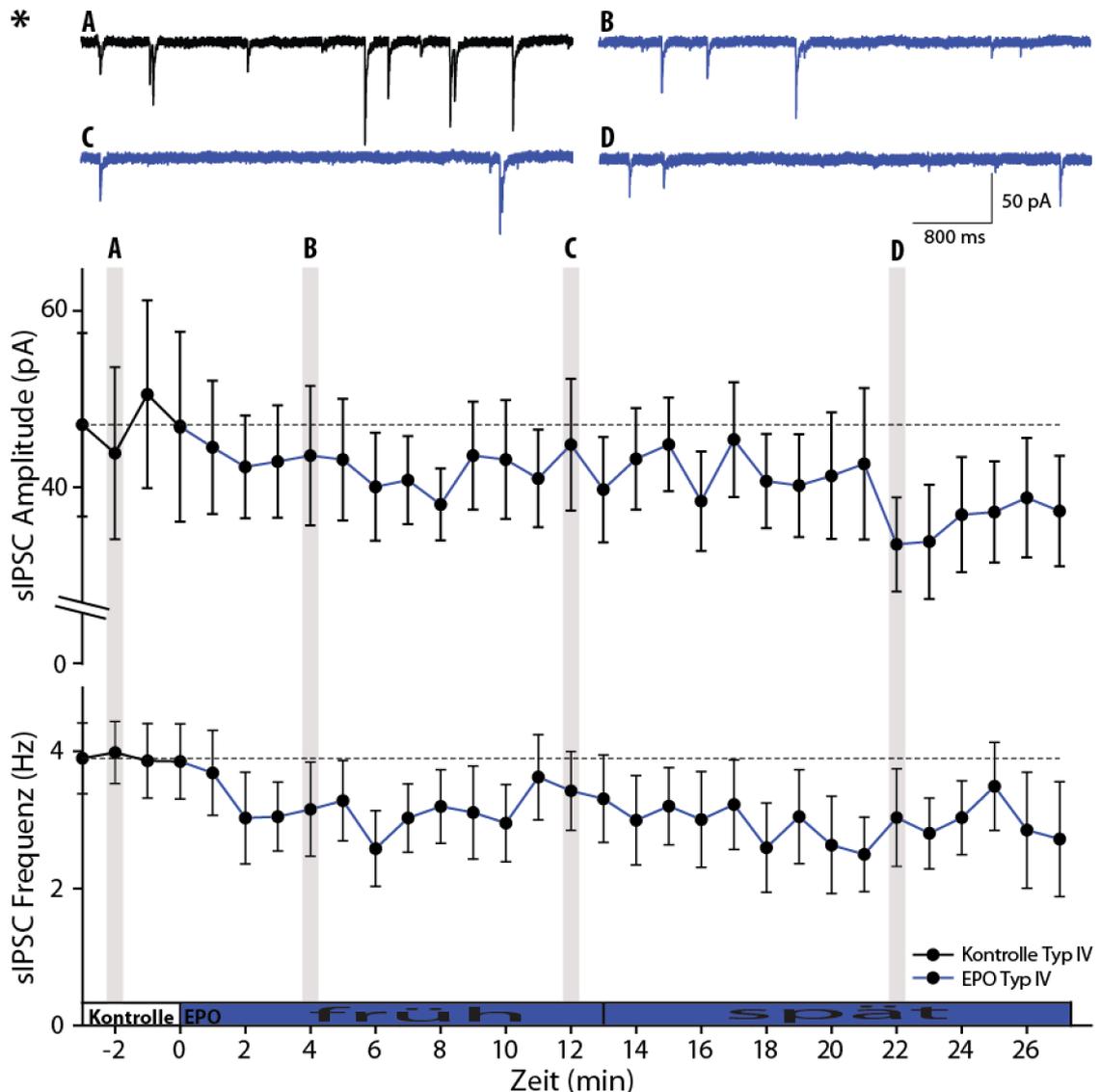


Abb. 8a Wirkungstyp IV

EPO verringert langfristig, bereits in den ersten zwei Minuten nach dessen Applikation, die Frequenz bis zum Aufnahmeschluss in der 27. Minute. Die Amplitude zeigt eine Tendenz nach unten, weist jedoch gleichzeitig auch einen hohen Standardfehler und insgesamt einen undulierenden Verlauf mit hohen Sprüngen innerhalb kurzer Zeitspannen auf. Der deutliche Kurvenknick in der 22. Minute ist am ehesten versuchsbedingt aufgrund der im Verlauf reduzierten Zellzahl (von 7 auf 5) entstanden. Die Originalaufnahmen der sIPSC oben im Bild, zeigen ebenfalls einen negativen Effekt von EPO auf die Frequenz und die Amplitude.

* (siehe Beschreibung Kap. 3.1).

Im Gegensatz zur Amplitude (Kontrolle: $47,1 \pm 10,3$ pA; EPO früh: $42,5 \pm 6,0$ pA; EPO spät: $41,5 \pm 5,7$ pA; EPO spät und EPO früh $P > 0,05$) weist die Änderung der Frequenz von sIPSC durch EPO (Kontrolle: $3,9 \pm 0,5$ Hz; EPO früh: $3,2 \pm 0,6$ Hz; EPO spät: $3,0 \pm 0,5$ Hz) zusätzlich im beidseitigen verbundenen t-Test eine statistische Signifikanz (EPO früh $P = 0,02$ und EPO spät: $P = 0,01$) auf (siehe Abb. 8b).

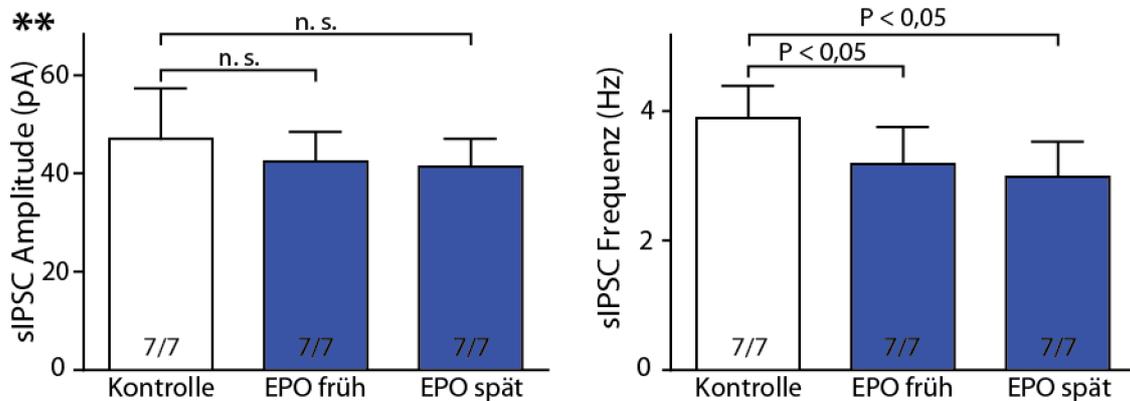


Abb. 8b Wirkungstyp IV

Bei der Frequenz ist anhand der Histogramme, im beidseitigen und verbundenen t-Test, eine statistische Signifikanz zwischen der Kontrollaufnahme und der Aufnahme nach der EPO-Gabe, sowohl zum früheren als auch zum späteren Zeitpunkt zu sehen. Für die Amplitude besteht keine statistische Signifikanz.

** (siehe Beschreibung Kap. 3.1).

Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass das EPO nicht nur eine steigernde sondern auch eine reduzierende Wirkung auf die Frequenz der sIPSC hat. Ähnlich dem Wirkungstyp II tritt die Frequenzminderung sofort nach der EPO-Applikation auf und hält über die gesamte Aufnahmezeit an. Um tendenziell vorhandene Wirkung auf die Amplitude statistisch zu bestätigen, ist eine höhere Anzahl an zu untersuchenden Pyramidenzellen notwendig. Doch angesichts der bereits vorhandenen recht großen Menge an Aufnahmen (7 Aufnahmen bei 7 Individuen) würde die Änderung der Amplitude nicht all zu groß ausfallen, sodass hier die Frequenzänderung im Mittelpunkt steht.

Zusammenfassend zeichnet sich ein heterogenes Bild der EPO-Wirkung auf die sIPSC der Pyramidenzellen in der II/III. Schicht des PrL ab.

Der Wirkungstyp I ist statistisch nicht signifikant und steht nur tendenziell für eine unmittelbar starke jedoch kurzfristige Wirkung von EPO. Diese Wirkung ist ausschließlich im linken PrL verzeichnet und somit seitenspezifisch.

Der Wirkungstyp III ist bezüglich der Frequenz und der Amplitude sowohl statistisch als auch tendenziell im Kurvenverlauf als stumm zu bezeichnen und lässt sich nur im rechten PrL nachweisen. Eine mögliche Fehleinschätzung dieses Typs durch Selektion fehlerhafter Aufnahmen, kommt aufgrund dessen gegebener Seitenspezifität weniger infrage, denn würde man annehmen, dass die Werte genau die misslungenen Aufnahmen der gesamten Versuchsreihe repräsentieren, so müsste deren Verteilung zumindest über beide Hemisphären bei einer relativ hohen Aufnahmeanzahl (7/7) zufällig und somit annähernd gleich sein. Dies ist jedoch bei keinem der Wirkungstypen der Fall.

Die Wirkungstypen II und IV liefern den Beweis für eine sofortige und langfristige EPO-Wirkung auf die Frequenz der GABAergen Transmission in beiden Hemisphären. Diese Wirkung scheint sogar entgegengesetzt und hemisphärenspezifisch zu sein (siehe Kap. 4.2).

Trotz zahlreicher Unterschiede in der EPO Wirkung gibt es dennoch einige Gemeinsamkeiten: a) wenn EPO wirksam ist, dann tritt die Wirkung innerhalb einer Minute ein; b) der zeitliche Verlauf der Kurven aller Wirkungstypen ist undulierend; c) bei allen vier Wirkungstypen zeigt EPO keinen deutlichen Einfluss auf die Amplitude der GABAergen Transmission. Weitere Gemeinsamkeiten bedürfen größerer Aufmerksamkeit und werden weiter unten explizit in eigenen Kapiteln beschrieben.

3.1.5. Die Ortsspezifität der Wirkungstypen innerhalb des PrL

Aufgrund der heterogenen Wirkung von EPO auf die Frequenz der sIPSC stellt sich berechtigt die Frage, ob diese innerhalb des PrL ortsgebunden ist. Allein die Verknüpfung des PrL zu zahlreichen Hirnarealen (siehe Kap. 1.1.1) könnte bereits eine verschaltungsabhängige lokale Differenz in der Modulation der GABAergen Transmission durch EPO vermuten lassen. Zudem wurde bereits erwähnt, dass die funktionalen Eigenschaften eines Interneurons, dem kleinsten und wichtigsten modulatorischen Baustein neuronaler Netzwerke, weniger von seiner Ontogenese und seinen spezifischen Eigenschaften als vielmehr von seiner lokalen Umgebung abhängig sind (Fishell 2007). Gibt es womöglich genau begrenzte Bereiche innerhalb des linken und des rechten PrL, auf die sich die vier Wirkungstypen unmittelbar beschränken? Um diese Frage zu beantworten, wurde der Ort jeder einzelnen Ableitung im Vorfeld der

Aufnahmen anhand des Hirnatlas der Maus (Franklin and Paxinos 2007) identifiziert und in ein speziell dafür erstelltes Koordinatensystem (siehe Abb. 9) eingetragen.

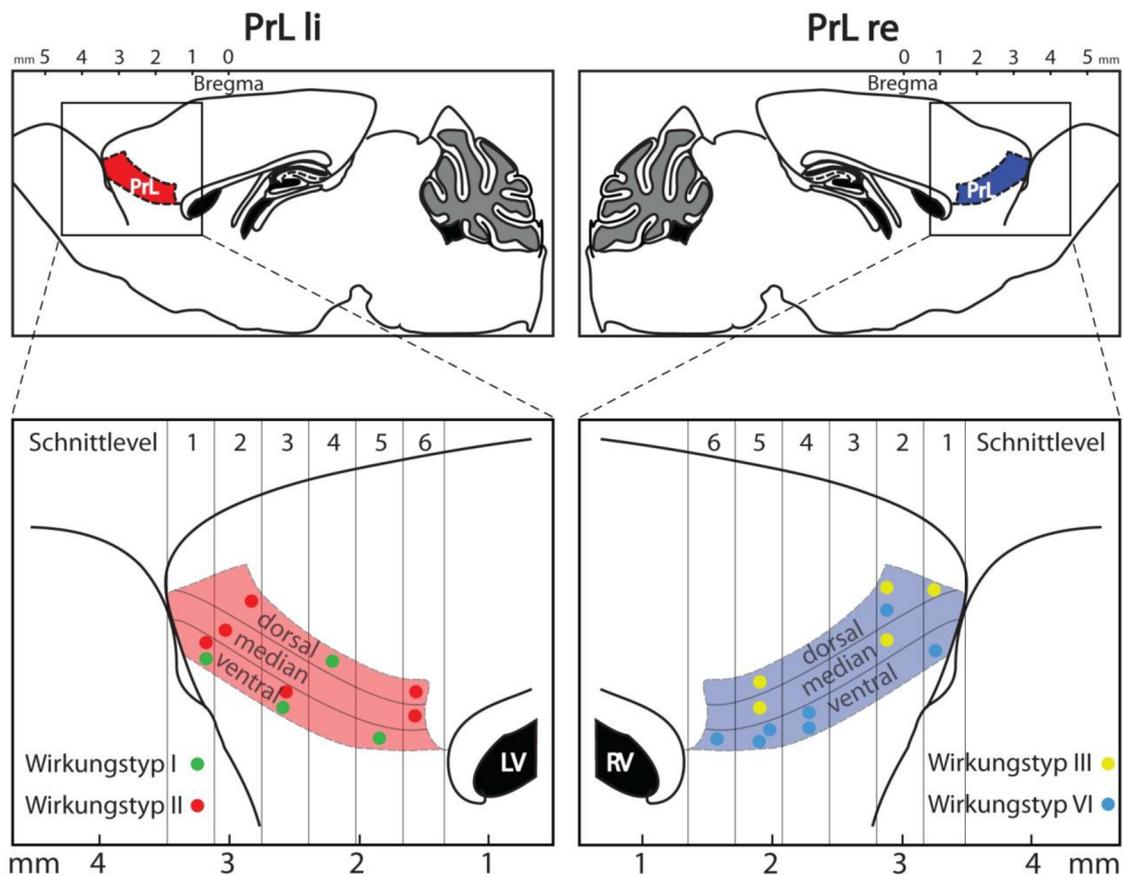


Abb. 9 Das Koordinatensystem der einzelnen Ableitungen

Es ist eine Gehirnschnittkarte mit den Koordinaten der jeweiligen sIPSC-Aufnahmen schematisch dargestellt. Die oberen beiden Bilder zeigen jeweils einen sagittalen Hemisphärenanschnitt, in der II/III. Zellschichtebene einer Maus, mit der entsprechend markierten Ausdehnung des Prälimbischen Cortex (PrL), links (rot) und rechts (blau). Die unteren beiden Bilder stellen jeweils die Vergrößerung der oberen Hirnschnittbilder dar. Die farblich markierten Areale sind in sechs frontale Schnittlevel entlang der sagittalen Achse und in drei horizontal übereinander liegenden Ebenen (dorsal, median, ventral) in transversaler Richtung unterteilt. Den eingezeichneten Aufnahmeorten sind vier verschiedenen Wirkungstypen von EPO zugeordnet und entsprechend farblich markiert. Aufnahmen der Wirkung von Typ I und Typ II befinden sich nur auf der linken, die von Typ III und Typ IV sind nur auf der rechten Seite vorzufinden. LV und RV bezeichnen die rostralen Ausläufer der Seitenventrikel der jeweils rechten und linken Hemisphäre. Die projizierte Bregma dient als Landmarke für die metrischen Angaben der Sagittalachsenlänge in Millimetern (mm).

Quelle: Eigene Darstellung mit Hilfe von (Franklin and Paxinos 2007).

Wie bereits im Kapitel 4.1 deutlich wurde, sind die Wirkungstypen definitiv hemisphärenspezifisch. So erstrecken sich Typ I und II nur auf der linken und Typ III

und IV nur auf der rechten Seite des PrL. Im Gegensatz zu der interhemisphärischen Spezifität der Wirkungstypen ist deren intrahemisphärische Spezifität nicht eindeutig gegeben, da es gewisse Überlappungen in der Verteilung innerhalb der Hemisphären gibt. So beschränkt sich Typ I bis auf eine Ausnahme überwiegend auf die ventralen Anteile des PrL, die rostral mit medialem orbitalem Cortex (MO) und kaudal mit IL direkt benachbart sind. Bekanntlich kommunizieren benachbarte Hirnregionen durch Assoziationsfasern miteinander (Bähr and Frotscher 2009), so kommunizieren auch der PrL und der IL über gegenseitige inhibitorische Projektionen untereinander (Sotres-Bayon and Quirk 2010). Wirkungstyp I könnte also auf der linken Seite zumindest hypothetisch nach der EPO-Gabe in solch eine Kommunikation zwischen PrL und IL involviert sein. Der Wirkungstyp II hingegen, zeigt eher eine gleichmäßige Verteilung über den gesamten untersuchten Rindenareal. Diese Verteilung verleitet zu der Annahme, dass dieser Wirkungstyp eine allgemeine Modulation der GABAergen Transmission vom Großteil der ablaufenden Prozesse des inhibitorischen Systems im linken PrL nach der EPO-Gabe widerspiegelt. Doch nur eine Vervollständigung der Koordinatenkarte durch die Ableitung von Zellen in den noch leer stehenden Quadranten und insbesondere die Erhöhung der Fallzahl vom Wirkungstyp I könnten die tatsächliche Verteilung beider Wirkungstypen von EPO weiter präzisieren und ihr intrahemisphärisches Nebeneinander näher beleuchten. Auf der rechten Seite zeichnet sich aufgrund der ausreichenden Fallzahl für beide Wirkungstypen, ein deutlicheres Bild ihrer Verteilung ab. So ist der bezüglich Frequenz und Amplitude stummer Wirkungstyp III, in der gesamten sagittalen Ausdehnung überwiegend median und dorsal verteilt. Der Wirkungstyp IV hingegen erstreckt sich bis auf zwei Ausnahmen überwiegend im ventro-kaudalen Bereich, in direkter Nachbarschaft zum IL. Doch auch hier müsste das Koordinatensystem vervollständigt werden, bevor man endgültige Rückschlüsse zu der realen Verteilung und sich daraus möglicherweise ergebenden Funktionen ziehen kann. Eine Überinterpretation und eine Übersimplifizierung sind zu vermeiden, denn das Koordinatensystem für beide Hemisphären fügt sich aus den Daten von 14 verschiedenen Individuen zusammen. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass aufgrund der individuellen intrahemisphärischen Unterschiede, die Verteilung der Wirkungstypen auf einem vereinten Bild sich unscharf darstellt. Nichtsdestotrotz, wird das Koordinatensystem seiner Rolle zur groben Orientierung dennoch gerecht.

Sachlich zusammengefasst ist die Wirkung von Erythropoetin auf die inhibitorische Transmission, in dem Prälimbischen Cortex zwar absolut vom interhemisphärischen Ort der sIPSC-Aufnahme, jedoch nur bedingt vom intrahemisphärischen Ort abhängig.

3.2. Die entgegengesetzte interhemisphärische EPO-Wirkung

Wie bereits durch Wirkungstyp II und IV beschrieben, hat EPO nachweislich eine sofortige und relativ langandauernde Wirkung auf die Frequenz der GABAergen Transmission der Pyramidenzellen in der II/III. Schicht des PrL. Schaut man sich den zeitlichen Verlauf beider Effekte an, so wird eine Tendenz zur Frequenzsteigerung auf der einen und eine Tendenz zur Frequenzsenkung auf der anderen Seite offensichtlich. Noch deutlicher stellen sich diese entgegengesetzten Wirkungen in einem direkten Vergleich beider Wirkungstypen (siehe Abb. 10a) dar.

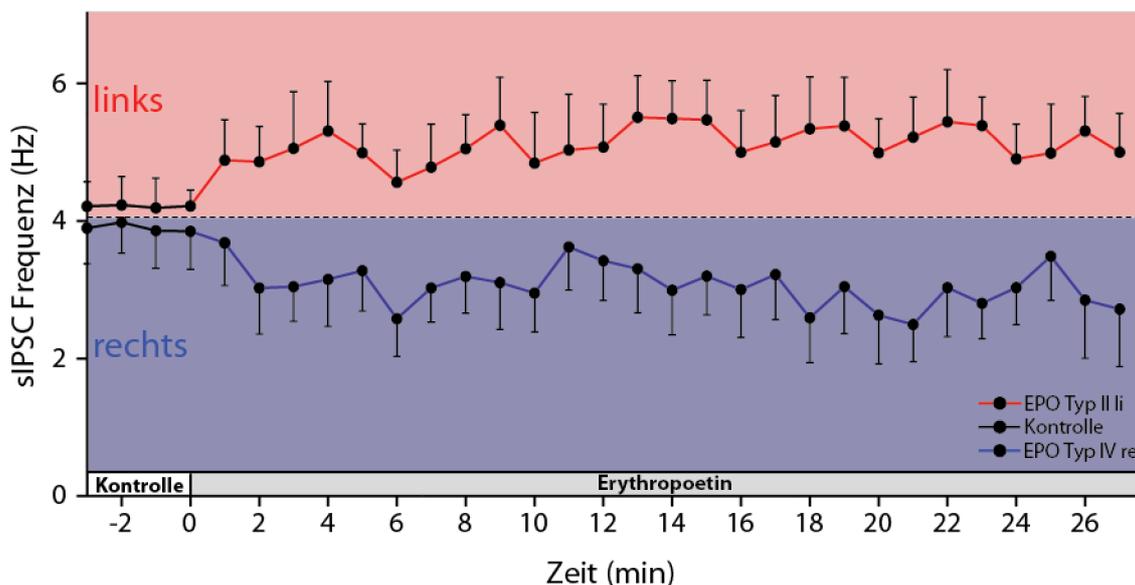


Abb. 10a Wirkungstyp II und IV im direkten Seitenvergleich

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Frequenz auf der linken (rot) und der rechten Seite (blau), 3 Minuten vor und 27 Minuten nach der EPO-Gabe. Die einzelnen Punkte repräsentieren die errechneten Mittelwerte zum jeweiligen Zeitpunkt mit entsprechenden einseitigen Fehlerbalken, welche den Standardfehler dieser Mittelwerte anzeigen. Die Hilfslinie (gestrichelt) ist als Mittelwert aus den ersten 3 Minuten beider Seiten vor der EPO-Applikation ermittelt worden. Die Werte zum Zeitpunkt -3, zu Beginn der Aufnahme, stellen den Mittelwert der drei folgenden Kontrollaufnahmewerte der jeweiligen Seite dar und sind daher fiktiv.

Vor der EPO-Gabe liegen die Frequenzwerte auf einem nahezu gleich hohem Niveau, unmittelbar nach der EPO-Gabe ist eine deutliche seitenabhängig entgegengesetzte

Frequenzwertänderung über 27 Minuten bis zum Schluss der Aufnahmen mit geringen Schwankungen zum Mittelwert der Kontrollen (gestrichelte Linie) zu verzeichnen. Um diese entgegengesetzte Wirkung auch statistisch zu verwerthen, wurde zunächst in einem zweiseitigen unverbundenen t-Test geprüft, ob die Kontrollen beider Seiten, bereits im Vorfeld aufgrund eventueller postnatal divergenter Entwicklung der Hemisphären sich bezüglich der Frequenz der GABAergen Transmission unterscheiden (Stevenson et al. 2008) oder sich dennoch ähneln (siehe Abb. 10b).

Kontrolle

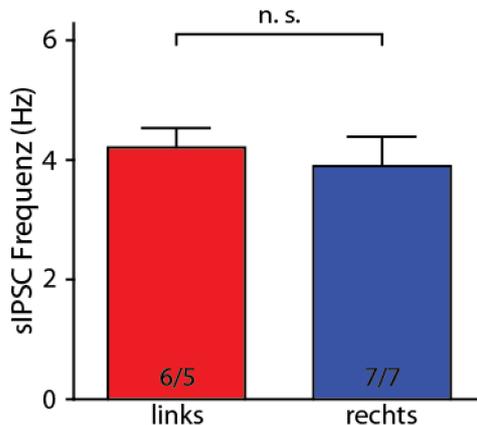


Abb. 10b Wirkungstyp II und IV im direkten Seitenvergleich

Das Histogramm zeigt, dass die durchschnittlichen Frequenzen der Kontrollaufnahmen der linken und der rechten Seite vor der EPO-Gabe im zweiseitigen unverbundenen t-Test sich nicht signifikant unterscheiden (n. s.).

Die Frequenzwerte beider Hemisphären liegen vor der EPO-Gabe auf annähernd gleichem Niveau (Kontrolle links: $4,2 \pm 0,3$ Hz; Kontrolle rechts: $3,9 \pm 0,5$ Hz) und auch die negative Signifikanz ($P=0,6$) spricht mit großer Wahrscheinlichkeit für die Gleichheit beider Kontrollen. Ein möglicher Störfaktor, der schon zu Beginn in Form von unterschiedlich hohen Frequenzwerten beider Seiten vor der EPO-Gabe eine entgegengesetzte Wirkung unter EPO suggerieren könnte, ist somit unwahrscheinlich und erlaubt eine statistische Überprüfung beidseitiger Frequenzwerte nach der EPO-Applikation. Weil die Frequenzen im Verlauf nach der EPO-Gabe deutlich auseinander weichen und ihre Distanz im Verlauf zueinander beibehalten (siehe Abb. 10a), ist ein deutlich negativer Trend rechts sowie ein positiver Trend links zu verzeichnen. Somit ist schon im Vorfeld eine Formulierung einer Negativ- bzw. Positivhypothese bezüglich der Frequenzänderung nach der EPO-Gabe im gegenseitigen Vergleich zulässig. Anders als beim Vergleich der Kontrollen, in denen es nicht fest stand, ob die eine Seite höhere oder niedrigere Frequenz aufweisen könnte, ist der Trend nach der EPO-Gabe eindeutig und erlaubt daher die Wahl eines einseitigen unverbundenen t-Tests (siehe Abb. 10c auf der nächsten Seite).

Erythropoetin

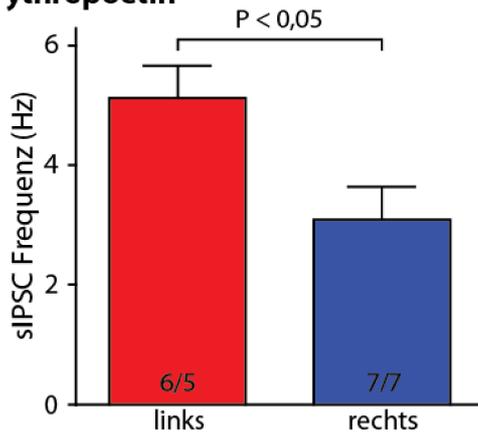


Abb. 10c Wirkungstyp II und IV im direkten Seitenvergleich

Das Histogramm zeigt, dass im einseitigen und unverbundenen t-Test die Frequenz der linken Seite unter EPO statistisch signifikant höher bzw. die Frequenz der rechten Seite statistisch signifikant niedriger ist.

Die durchschnittlichen Frequenzwerte beider Hemisphären liegen nach der EPO-Gabe weit auseinander (EPO links: $5,1 \pm 0,5$ Hz; EPO rechts: $3,1 \pm 0,6$ Hz). Die Frequenz der linken Seite ist dabei statistisch signifikant höher bzw. die Frequenz der rechten Seite statistisch signifikant niedriger, im Vergleich zur jeweiligen kontralateralen Seite ($P=0,01$).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich herleiten, dass das Erythropoetin bei nahezu gleichen Frequenzausgangswerten der linken und der rechten Seite im direkten Seitenvergleich, bereits nach kurzer Zeit hemisphärenabhängig und entgegengesetzt die Frequenz der sIPSC der Pyramidenzellen in der II/III. Schicht des Prälimbischen Cortex von Mäusen verändert.

3.3. Die meisten Wirkungstypen von EPO sind intraindividuell

Die vier beschriebenen Wirkungstypen von EPO auf das inhibitorische System neuronaler Netzwerke und die hemisphärenspezifisch entgegengesetzte Natur dieser Wirkung lassen die Frage offen, ob bei der Anzahl von 14 Versuchsindividuen diese Variabilität auf den interindividuellen Unterschieden beruht oder ob diese Wirkungstypen zur gleichen Zeit in ein und demselben Individuum nebeneinander vorkommen. Für die interindividuellen Unterschiede würde die unterschiedliche Entwicklung der Hemisphärenlateralisation und somit auch der PrL innerhalb einer Spezies sprechen (Denenberg 1983). So wie es innerhalb der menschlichen Spezies Links- und Rechtshänder gibt, besteht eine unilaterale Spezialisierung bezüglich der präferierten Gliedmaßen und anderen Gehirnfunktionen auch bei niederen Säugetieren wie der Ratte oder der Maus. Die Lateralisation ist nicht von vornherein determiniert,

sondern kann durch äußere Einflüsse im Entwicklungsverlauf innerhalb einer Art und sogar eines Geschlechts variieren (Denenberg 1983). Dies könnte zu der Annahme führen, dass auch die Wirkung von EPO auf die Hemisphären bei männlichen Mäusen je nach Individuum variiert. Andererseits werden die neuronalen Netzwerke beider Hemisphären durch gleiche globale Neurotransmittersysteme beeinflusst (Benninghoff and Drenckhahn 2008). Zudem nutzen beide Hemisphären gemeinsame Mechanismen der Kommunikation und Datenverarbeitung, sodass auch ein Bestehen mehrerer Wirkungstypen von EPO, innerhalb eines Individuums zur gleichen Zeit, nebeneinander nachvollziehbar ist (Agnati et al. 2006). Eine Annäherung zur Lösung dieser Frage liefert ein Vergleich der Wirkungstypen von 8 Mäusen, bei denen es gelang mehrere Pyramidenzellen im Gehirn abzuleiten (siehe Tab. 1).

	links		rechts	
	Wirkungstyp I	Wirkungstyp II	Wirkungstyp III	Wirkungstyp IV
Maus 1	✓ ✓			
Maus 2		✓ ✓		
Maus 3			✓ ✓	
Maus 4	✓			✓
Maus 5	✓			✓
Maus 6		✓		✓
Maus 7		✓		✓
Maus 8		✓	✓	

Tab. 1 Die Übersicht von mehrfach abgeleiteten Individuen

In der Tabelle sind mehrfach abgeleitete Individuen, nach dem Wirkungstyp geordnet, dargestellt. Das Zeichen ✓ steht stellvertretend für die jeweils durchgeführte Versuchsaufnahme. Zum besseren interhemisphärischen Vergleich wurde die linke Seite rot und die rechte blau markiert. Mäuse bei denen parallel zwei statistisch signifikante, entgegengesetzte Wirkungstypen registriert wurden, sind farbig besonders hervorgehoben.

Die Tabelle bestätigt zunächst aufgrund mehrfacher Ableitungen der Maus 1 bis 3 die Wiederholbarkeit von Messungen der ersten drei Wirkungstypen innerhalb eines Individuums auf einer PrL-Seite. Die Ergebnisse sind also nicht nur interindividuell (siehe Anzahl der Versuche und Individuen zum jeweiligen Wirkungstyp), sondern auch

intraindividuell reproduzierbar. Doch am aufschlussreichsten sind die Ergebnisse der letzteren 5 Individuen, die auf eine variable intraindividuelle hemisphärenspezifische Wirkung von EPO hinweisen. Insbesondere Maus 6 und 7 bestätigen diese Hypothese, weil sie die beiden statistisch signifikanten Wirkungstypen nebeneinander aufweisen (siehe Abb. 11).

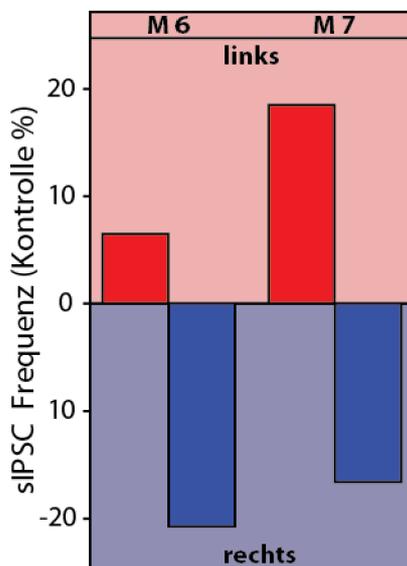


Abb. 11 Intraindividuelles Nebeneinander von Wirkungstyp II und IV

Dargestellt sind die durchschnittlichen Frequenzen der sIPSC nach Gabe von Erythropoetin. Sie sind in Relation zum jeweiligen Durchschnitt der Kontrollaufnahmen gesetzt worden. Verglichen werden dabei jeweils die linke (rot) und die rechte Seite (blau) einer Maus (M), bei insgesamt 2 Individuen.

Die linke Seite erfährt bei beiden Individuen eine durchschnittliche Frequenzsteigerung über 27 Minuten nach EPO-Gabe (Maus 6: 6,5 %; Maus 7: 18,5 %), die rechte hingegen eine Frequenzsenkung (Maus 6: -20,3%; Maus 7: -16,6 %). Stellenweise erreicht diese Änderung auch höhere prozentuale Werte. Demnach beeinflusst Erythropoetin, seitenabhängig und entgegengesetzt die Frequenz von sIPSC der Pyramidenzellen ein und desselben Individuums in der II/III. Schicht des Prälimbischen Cortex.

Zwar ist es nicht gelungen mehr als zwei unterschiedliche Aufnahmen an einem Individuum zu machen, um endgültig zu klären, ob alle vier Wirkungstypen innerhalb eines Individuums auftreten könnten, dennoch liefert deren hohe Anzahl an intraindividuell variablen Kombinationen einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Wirkungstypen, weniger interindividuell determiniert sind, sondern vielmehr die Wirkungsbreite von EPO innerhalb eines Individuums widerspiegeln.

Aus der wissenschaftlichen Sicht ist dieses Erkenntnis wichtig für das weitere Verständnis über die Funktion der ortsabhängig variablen Wirkungen von EPO im PrL eines und desselben Individuums. Dagegen mahnt dieses Erkenntnis, experimentell betrachtet, zu großer Vorsicht bei der Datengewinnung und deren Interpretation, denn

ein Zusammenführen aller Ergebnisse in eine Grafik (siehe Abb. 12), wie es häufig bei der Datenauswertung geschieht, ergibt zunächst aufgrund der zum Teil entgegengesetzten Effekte von EPO auf die Frequenz der sIPSC keine sichtbare Wirkung.

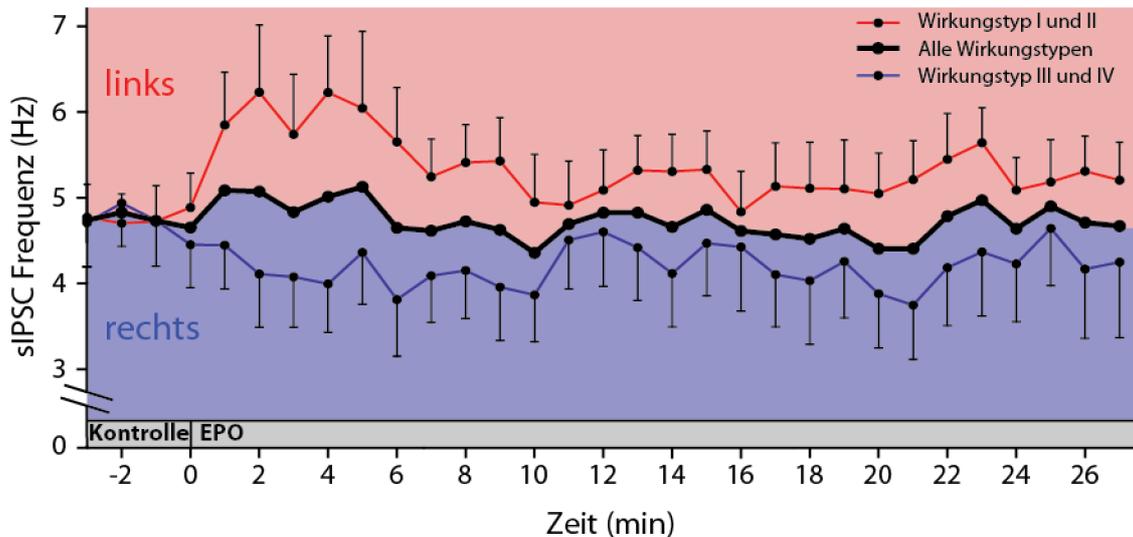


Abb. 12 Die Gesamtübersicht aller Daten der EPO-Wirkung auf die Frequenz
 Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Frequenz auf der linken (rot) und der rechten Seite (blau), 3 Minuten vor und 27 Minuten nach der EPO-Gabe. Die einzelnen Punkte repräsentieren die errechneten Mittelwerte zum jeweiligen Zeitpunkt mit entsprechenden Fehlerbalken, welche den Standardfehler dieser Mittelwerte anzeigen. Die stark hervorgehobene schwarze Linie in der Mitte des Laufdiagramms stellt die Durchschnittswerte der Frequenz aller Versuchsaufnahmen, unabhängig von deren Lateralisation dar.

Die schwarze Linie innerhalb der Grafik zeigt keinen Effekt von EPO auf die Frequenz, denn durch das Zusammenführen aller Daten ohne einen lokalen Bezug oder einer Zuordnung zu einem Wirkungsmuster werden diese Effekte maskiert. Aus diesem Grund müssen trotz der intraindividuell gleichzeitig bestehenden, heterogenen Wirkung von EPO, welche zu einer gemeinsamen Betrachtungsweise aller Wirkungstypen als Ganzes verleitet, die Effekte dennoch für sich allein isoliert betrachtet werden. Einerseits wird dadurch eine Übersimplifizierung der EPO-Wirkung verhindert, andererseits verringert so eine Betrachtungsweise die Gefahr etwas dabei zu übersehen. Auf diese Weise eröffnet sich für uns eine bisher unbekannt neue EPO-Eigenschaft in der Umgebung neuronaler Netzwerke.

4. Diskussion

In dieser experimentellen Arbeit wurde die Wirkung von Erythropoetin auf die GABAerge Transmission, der Pyramidenzellen in der II/III. Schicht, der vitalen Hirnschnitte vom Prälimbischen Cortex adulter männlicher Mäuse untersucht. Nach unseren Erkenntnissen ist das Ergebnis dieses Experiments einzigartig, weil bisher weder der Nachweis einer sofortigen Wirkung von EPO auf das inhibitorische System neuronalen Netzwerke noch ein interhemisphärischer Vergleich dieser Wirkung in der fachspezifischen Literatur beschrieben wurde. Die gewonnenen Erkenntnisse dieser Versuchsreihe lassen sich wie folgt zusammenfassen: 1) Erythropoetin hat eine sofortige Wirkung auf die Frequenz jedoch keine Wirkung auf die Amplitude der sIPSC von Pyramidenzellen in der II/III. Nervenzellschicht des PrL; 2) es gibt zwei statistisch signifikante unterschiedliche Wirkungstypen von EPO; 3) die Wirkungstypen sind im interhemisphärischen Vergleich des PrL seitenspezifisch und haben einen entgegengesetzten Effekt auf die Frequenz; 4) intrahemisphärisch sind die Wirkungstypen nur bedingt an lokale Grenzen gebunden; 5) die Wirkungstypen treten parallel bei einem und demselben Individuum zur gleichen Zeit auf. Diese Ergebnisse unterstreichen die vielseitige Funktion des Erythropoetin im zentralen Nervensystem und eröffnen ein neues Kapitel in seiner Rolle als modulierendes Agens neuronal inhibitorischer Transmission, bei der Aufrechterhaltung einer Balance zwischen dem rechten und dem linken Prälimbischen Cortex.

4.1. EPO ein Neuromodulator mit direkter und schneller Wirkung

Nach aktuellem Stand der Forschung spielt das Erythropoetin sowohl bei der Entwicklung neuronaler Netzwerke als auch bei deren Protektion im adulten Gehirn nach akutem oder chronischem Schaden eine wichtige Rolle (Maiese et al. 2012). Dass das EPO nun auch als ein möglicher Modulator neuronaler Transmission infrage kommt, ist an sich nicht neu. So ist eine Beeinflussung der Langzeitpotenzierung als Zeichen für eine langfristig veränderte neuronale Transmission durch EPO bereits in anderen Hirnarealen wie dem Hippocampus nachgewiesen worden (Adamcio et al. 2008; Wojtowicz and Mozrzymas 2008). Neu ist dagegen, dass EPO nicht wie bisher über die Neuroplastizität, sondern unmittelbar nach seiner Applikation innerhalb einer Minute die GABAerge Transmission beeinflusst und somit als ein chemischer,

endogener Neuromodulator zu fungieren scheint. Für diese neue Rolle erfüllt EPO bereits folgende Kriterien, die von M. D. Berry tabellarisch aufgelistet wurden (Berry 2004). EPO wird von den Neuronen sowohl synthetisiert als auch von EPO-Rezeptoren, trotz deren, verglichen mit der Embryonalzeit, deutlich reduzierten Zahl, im adulten Gehirn gebunden (Chateauvieux et al. 2011). Nach einer Stimulation durch einen akuten oder chronischen Schaden wird EPO vermehrt im Gehirn gebildet und freigesetzt (Bernaudin et al. 2000). Es existieren intrazelluläre Signalwege für EPO, welche durch Genaktivierung die neuronalen Netzwerke langfristig verändern (Chateauvieux et al. 2011). Bei all diesen Kriterien bleiben dennoch manche davon nicht erfüllt. So wurde EPO bei dieser Versuchsreihe in einer zwar therapeutischen aber physiologisch nicht erreichbaren Konzentration von 5 I.E./ml appliziert. Die durchschnittliche Konzentration von EPO im Serum ist aber um ein tausendfaches geringer (Foley 2008). Zudem kann EPO die Blut-Hirnschranke, welche in unserer Versuchsreihe völlig fehlte, in einer physiologisch geringen Konzentration in vivo kaum passieren (Chateauvieux et al. 2011). Nichtsdestotrotz ist zumindest im Serum eine Konzentration von bis zu 1,6 I.E./ml nach Stimulierung durch Hypoxie möglich (Abbrecht and Littell 1972). Desweiteren ist es anzunehmen, dass nach einer Stimulation die EPO-Konzentration im Gehirn durch auto- oder parakrine Ausschüttung durchaus auch höhere Werte, lokal begrenzt, erreichen kann. Ähnlich den Neuropeptiden ist eine große Konzentration von EPO für eine ausgeprägte Wirkung auch gar nicht notwendig, denn durch die konsekutive Expression und die parakrine Sekretion reichen im Vergleich zu klassischen Neurotransmittern viel geringere Mengen des Effektors aus, um eine Wirkung auszulösen (Nicholls et al. 2001). Wie dem auch sei, könnten Versuche mit unterschiedlichen EPO-Dosierungen in Zukunft zur Erfüllung dieses Kriteriums beitragen. Ein weiteres Kriterium, welches unerfüllt bleibt, ist ein Nachweis fehlender Wirkung von EPO durch die Blockade von GABA, denn typisch für einen Neuromodulator ist seine absolute Abhängigkeit der Wirkung vom eigentlichen Neurotransmitter (Berry 2004). Eine Versuchskonfiguration bei der nach der Detektion der EPO-Wirkung Bicucullin zur GABA-Blockade appliziert wird, wäre experimentell sinnvoll. Eine Aufhebung der Wirkung würde dabei auf eine neuromodulatorische Charaktereigenschaft von EPO hinweisen. Doch auch eine Fortsetzung der Wirkung wäre sehr aufschlussreich. Sie würde dann nämlich auf die Existenz eines metabotropen

EPO-Rezeptors im Gehirn hindeuten, welches ähnlich den bekannten Neuropeptiden über einen eigenen intrazellulären Signalmechanismus die synaptische Übertragung ohne GABA als Vermittler beeinflussen könnte (Nicholls et al. 2001). Die in dieser Arbeit beschriebene Versuchskonfiguration kann ein solches Wirkungsprinzip von EPO nicht ausschließen. Zwar wurde standardmäßig mittels von CNQX, AP5 und Strychnin die GABAerge Transmission untersucht, dennoch würde auch eine direkte Veränderung der synaptischen Transmission durch einen GABA-unabhängigen Signalweg von EPO sich unabhängig von seiner exzitatorischen oder inhibitorischen Eigenschaft, auf die synaptische Übertragung im Zusammenschau gewonnener Daten auswirken. Solch eine Wirkung wäre allerdings nur dann möglich, wenn die aufgenommene Zelle selbst postsynaptisch EPO-R aufweisen würde, denn anders lokalisierte Rezeptoren würden demzufolge eine Signalkaskade mit ferner EPO-Wirkung über die Transmitter wie GABA voraussetzen. Bei zukünftigen Versuchsreihen könnte man daher versuchen, auf den unmittelbar elektrophysiologisch abgeleiteten Zellen, immunhistochemisch die entsprechenden Rezeptoren zu detektieren. Die Wahl der richtigen Antikörper für die EPO-R stellt dabei die größte Herausforderung dar, denn es mehren sich Hinweise darauf, dass es neben dem klassischen homodimeren EPO-R auch weitere bisher nicht näher erforschte Rezeptoren für EPO gibt (Chateauvieux et al. 2011; Sanchez et al. 2009). Diese weisen zwar eine geringere Affinität zu EPO als ein gewöhnlicher zentraler EPO-R auf, jedoch sind sie viel stärker in die weiter unten beschriebenen, schnellen Signalwege von EPO integriert. Die elektrophysiologische oder immunhistochemische Differenzierung zwischen der GABA-abhängigen oder der GABA-unabhängigen Wirkung von EPO sollte daher das primäre Ziel zukünftiger Versuchsreihen zu diesem Thema sein. Unabhängig davon bleibt ein weiteres wichtiges neuromodulatorisches Kriterium, nämlich ein bereits bekannter schneller intrazellulärer Signalweg von EPO im ZNS, welcher seine experimentell erhobene, sofortige Wirkung erklären könnte, unerfüllt. Jedoch gibt es Hinweise, dass einer der wahrscheinlichen Hauptakteure bei einem solchen Signalweg möglicherweise das freie Kalziumion sein könnte. So steigert EPO über die Aktivierung der Proteinkinase C in künstlich gezüchteten Phäochromozytom (PC12)-Zellen die intrazelluläre Konzentration freier Kalziumione (Hand and Brines 2011). Diese Kalziumione kommen von extrazellulär und deren Influx nach intrazellulär kann mittels EGTA unterbunden werden (Masuda et

al. 1993). Kalzium ist auch insofern ein bedeutender Kandidat, als dass es neben den bisher bekannten überwiegend langsamen Signalwegen von EPO (Chateauvieux et al. 2011) alternativ aufgrund seiner Beteiligung bei zahlreichen intrazellulären Signalkaskaden für den Beginn eines schnellen intrazellulären Signalwegs infrage kommt (Berridge 2004). Eine Entschlüsselung eines solchen Signalwegs könnte letztendlich die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse auf molekularer Ebene bestätigen. In Zukunft könnte man daher mithilfe von Kalzium-Imaging die Änderung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration nach der EPO-Gabe in vitalen Hirnschnitten messen (Higley and Sabatini 2008). Die kalziumvermittelte Wirkung mittels intrazellulär applizierter Chelatoren für Kalzium wie EDTA oder Kalziumkanalblocker wie Nicardipin während der Patch-Clamp-Ableitung zu beenden oder von vorn herein zu verhindern, wäre ebenfalls eine Option, um diesen Signalweg zu prüfen (Koshimura et al. 1999; Masuda et al. 1993). Allerdings könnte EPO grundsätzlich entsprechend dem anatomischen und funktionellen Aufbau einer Synapse sowohl präsynaptisch durch veränderte Neurotransmitterausschüttung als auch postsynaptisch durch veränderte rezeptorvermittelte Neurotransmitterwirkung den gemessenen Effekt auf die synaptische Übertragung durch Kalzium triggern, sodass unter Umständen, ein auf die Zielzelle selbst begrenztes Kalzium-Imaging oder eine intrazelluläre EDTA-Applikation ergebnislos wäre. Es wäre also interessant auch unabhängig vom eigentlichen Signalweg zu wissen, ob der Signalursprung von EPO prä-, postsynaptisch oder sogar beidseitig an der Synapse lokalisiert ist. Eine Erforschung der EPO-Wirkung mithilfe der Patch-Clamp-Ableitungen von inhibitorischen synaptischen Miniaturströmen könnte diese Wissenslücke schließen (Edwards et al. 1990).

Neben Kalzium könnten auch andere Komponenten des schnellen Signalwegs nach der EPO-Applikation von großem Interesse sein. Zwar sind viele weitere Signalproteine durch intrazelluläre Konzentrationserhöhung freier Kalziumione aktivierbar (Higley and Sabatini 2008), doch der wahrscheinlichste Kandidat, der hierdurch die Wirkung von EPO weiterleitet ist Stickstoffmonoxid (NO). Er wird nach der Aktivierung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) durch EPO in den Neuronen gebildet (Koshimura et al. 1999). Eine Verknüpfung zwischen EPO-R und der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) ist außerdem auch bei den intrazerebralen Gefäßen

beschrieben worden (Su et al. 2011). Bemerkenswert ist hierbei der besondere EPO-R-Typ mit Rezeptoruntereinheit CD 131, der sowohl auf den Neuronen als auch auf dem Endothel zerebraler Gefäße vorkommt und die Signalkaskade über Kalzium und NO in Gang setzt (Su et al. 2011; Masuda et al. 1993). Ähnlich wie bei der neuroprotektiven Wirkung von EPO, bei der neben dem Hirngewebe die Gefäße eine wichtige Rolle in der endgültigen Effektvermittlung spielen (Santhanam and Katusic 2006), könnte EPO nicht nur über die Neurone sondern auch über die Gefäße auf die unmittelbare synaptische Transmission Einfluss nehmen. Nach der EPO-Applikation kann sowohl neuronal als auch endothelial produziertes NO aufgrund seiner Eigenschaften das benachbarte Gewebe perfundieren (Nicholls et al. 2001) und die im Versuch gemessene Veränderung bei der synaptische Übertragung bewirken. Eine in unserem Labor durchgeführte kleine Versuchsreihe am linken PrL (Ergebnisse nicht dargestellt) hat ergeben, dass der zuvor gemessene Effekt von EPO durch einen NOS-Inhibitor 7-Nitroindazol (7NI) deutlich gemindert wird. Eine höhere Fallzahl und eine längere Inkubation mit dem NOS-Inhibitor könnte sehr wahrscheinlich die bereits gemessene Tendenz auch statistisch bestätigen. Experimente mit Dexamethason, welches ähnlich dem EPO überwiegend für seinen langsamen neuromodulatorischen Effekt über Genexpression bekannt ist, zeigten, dass das freigesetzte Stickstoffmonoxid eine wichtige Rolle in der synaptischen Transmission spielt, indem es die Frequenz der GABAergen Transmission direkt beeinflusst (Di et al. 2009). Der Grundstein für die Erforschung schneller Signalwege für EPO ist also noch vor den Ergebnissen dieser Arbeit bereits gelegt worden, deren weitere Aufdeckung ist prinzipiell durch Experimente möglich. Schwierig ist es allerdings die experimentelle Unterscheidung zwischen dem endothelialen und neuronalen Ursprung des Signalwegs vor allem dann, wenn man unter realen Bedingungen mit vitalen Hirnschnitten arbeitet. Selektive NOS-Blocker könnten dennoch dabei helfen die Rolle der jeweiligen Gewebesorte in der synaptischen Übertragung getrennt voneinander zu erforschen. Die Gefahr einiger NOS-Blocker wie 7-NI besteht jedoch darin, dass sie durch die Aktivierung anderer Transmittersysteme, die im Fokus der Versuche stehende synaptische Übertragung sekundär stören könnten (Moore and Handy 1997). Nicht ausgeschlossen ist es auch, dass EPO selbst nicht über GABA oder NO, sondern über andere Transmitter wie Dopamin, Acetylcholin oder Serotonin die Änderung sekundär in der synaptische

Übertragung verursacht. Für Dopamin spricht dessen neuromodulatorische Rolle in der asymmetrischen Stressverarbeitung durch PrL (Sullivan et al. 2014) und dessen vermehrte Freisetzung durch EPO bereits wenige Minuten nach der EPO-Applikation in kultivierten Phäochromozytom (PC12)-Zellen (Koshimura et al. 1999; Masuda et al. 1993). Hierbei spielt freier Kalzium am Anfang der Signalkaskade ebenfalls eine wichtige Rolle, indem es neben der kurzfristigen Dopaminfreisetzung auch dessen Synthese über die Hochregulation der Tyrosinhydroxylase steigert (Masuda et al. 1993). Zu guter Letzt sollte neben der Modulation der chemischen Transmission auch an eine mögliche Modulation der elektrischen Transmission durch EPO gedacht werden. Bekanntermaßen kommunizieren die Neurone über die Connexone mit benachbarten Zellen, wodurch die Ionenströme direkt weiter geleitet werden können (Budde 2003). Genau wie die chemische Synapse unterliegt die elektrische Synapse zahlreichen Modifikationsprozessen durch chemische Neurotransmitter wie Dopamin (Pereda et al. 2013). Die in dieser Arbeit angewendete Patch-Clamp-Technik in Ganzzellkonfiguration ergibt nur ein Gesamtbild der detektierten Membranströme, die durch beide Synapsenarten vermittelt werden. Dieses Verfahren kann daher einen möglichen Anteil elektrischer Synapsen an der Frequenzänderung durch EPO nicht vom Anteil chemischer Synapsen unterscheiden. Eine experimentelle Überprüfung des Ionenstromanteils an der synaptischen Übertragung durch gap junctions unter EPO ist nach der völligen Ausschaltung der chemischen Transmission mit AP5, CNQX, Strychnin und Bicucullin bei gleichzeitiger extrazellulärer Stimulation nahe des Ableitungsortes mittels Patch-Clamp-Technik in Ganzzellkonfiguration und Voltage-Clamp-Modus möglich (Pereda et al. 2013).

Die Erkenntnisse dieser Arbeit kombiniert mit den Ergebnissen anderer Autoren schließen Erythropoetin als potentiellen Neuromodulator mit sofortiger Wirkung auf die neuronalen Netzwerke keinesfalls aus, sondern weisen eher im Gegenteil darauf hin, dass EPO nahezu alle Kriterien dafür bereits erfüllt oder durch weitere Experimente nachweislich erfüllen könnte.

4.2. Die Mechanismen der hemisphärenspezifischen EPO-Wirkung

Der Nachweis einer sofortigen Wirkung von EPO auf die Frequenz der sIPSC war in dieser Arbeit genauso überraschend, wie die Anzahl an hemisphärenspezifischen

Wirkungstypen und deren zum Teil entgegengesetzten Natur (siehe Wirkungstyp II und VI). Die anatomische und funktionelle Asymmetrie der Hemisphären und somit einzelner Hirnregionen wie dem PrL ist bereits bekannt, neu allerdings ist, dass eine potentiell neuromodulatorische Substanz wie EPO diese Asymmetrie durch messbar unterschiedliche und entgegengesetzte Effekte widerspiegelt. Um zu verstehen wie eine und dieselbe Substanz mehrere unterschiedliche Wirkungen, die zum Teil entgegengesetzt sind, innerhalb eines Individuums aufweisen kann, sollte zunächst die Funktionalität anderer bereits gut untersuchter Neurotransmitter und Neuromodulatoren betrachtet werden. Unter Vernachlässigung einer ortsspezifischen und hemisphärenabhängigen Wirkung können Dopamin, Norepinephrin und Serotonin über verschiedene Rezeptorsubtypen, welche verschiedene Signalwege in Gang setzten, zahlreiche und zum Teil entgegengesetzte Wirkungen im ZNS auslösen. (Sarbadhikari and Saha 2006). Auch EPO besitzt nach der Entdeckung einer weiteren, neben dem bekannten Rezeptorhomodimer, CD 131 EPO-Rezeptor-Komponente, mindestens zwei unterschiedliche Rezeptorsubtypen im ZNS (Sanchez et al. 2009). Die Variabilität an Verknüpfungen von EPO-R mit unterschiedlichen *second messenger* ist sogar um ein vielfaches höher (siehe Abb. 3), sodass auch hier zum Teil entgegengesetzte Wirkungen je nach Rezeptorkonstellation zu erwarten sind. Dennoch bleibt diese Annahme höchst spekulativ, da es vor allem über die schnellen Signalwege von EPO, die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen, nur wenig bekannt ist. Eine substantielle Grundlage für schnelle Signalwege könnte, wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, das Kalziumion liefern. Aufgrund der Variabilität und der räumlichen Trennung der durch Kalzium getriggerten möglichen Signalwege, wären die vier Wirkungstypen von EPO selbst durch nur einen einzigen Rezeptortyp nicht nur intraindividuell, sondern sogar innerhalb einer und der selben Zelle vorstellbar (Higley and Sabatini 2008). Doch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eher das Gegenteil. Die Wirkung von EPO scheint einer intrahemisphärischen Gesetzmäßigkeit zu folgen, die unter anderem durch eine hemisphärenspezifische Rezeptorverteilung erklärt sein könnte, sodass alle Wirkungstypen nicht in einem und demselben Gebiet ableitbar sind. Dabei scheint die rechte Seite überwiegend Rezeptorsubtypen zu besitzen, welche im Durchschnitt die GABAerge Transmission nach der EPO-Gabe hemmen. Die linke Seite dagegen weist Rezeptorsubtypen auf, welche die inhibitorisch synaptische Übertragung umgekehrt unter EPO steigern. Dabei

ist eine intraindividuell spezifische Verteilung von Rezeptoren zwischen den Hemisphären nicht neu und wurde bereits bei anderen Neurotransmittern und Neuromodulatoren nachgewiesen (Sarbadhikari and Saha 2006). Auch wenn die einzelnen Subtypen nicht absolut auf die jeweilige Hemisphäre beschränkt sein sollten und die Rezeptorsubtypen der jeweiligen kontralateralen Seite sich ebenfalls in beiden Hemisphären zu geringeren Anteilen befinden könnten, darf man nicht vergessen, dass mittels der Ganzzell-Ableitung gleich ein größeres Netzwerk aus Neuronen experimentell betrachtet wird, bei dem sich in der Summe nur der eine Wirkungstyp durchschnittlich detektieren lässt, welcher durch das am häufigsten in der jeweils abgeleiteten Hirnregion vorkommenden EPO-R-Subtyp vermittelt wird. Desweiteren haben sowohl die hemisphärenspezifischen Zellrezeptoren als auch deren spezifische lateralisierte Verteilung eine zum Teil klar definierte molekulare Basis, denn je nach Hemisphäre sind andere Gene aktiv, die letztendlich den links- und rechtsseitigen hemisphärischen Phänotyp prägen (Alqadah et al. 2013). Dabei können die molekularen, anatomischen und funktionalen Asymmetrien randomisiert (zufällig) und oder direktional (gerichtet) auftreten (Sagasti 2007). In dieser Arbeit deutet die hemisphärenspezifische EPO-Wirkung bei allen Versuchstieren auf eine gerichtete Asymmetrie der Hemisphärenfunktion unter EPO hin, da die Wirkungstypen stets spezifisch und regelmäßig auf nur eine der beiden Hemisphären begrenzt sind. Anders als die randomisierte Asymmetrie, welche sich erst nach einem postnatalen Entwicklungsprozess auskristallisiert, ist die gerichtete Asymmetrie zu Beginn embryonaler Entwicklung des Nervensystems bereits vorhanden (Sagasti 2007). Hierdurch scheint es fast unmöglich zu sein, elektrophysiologisch die EPO-Wirkung vor der Determinierung der Lateralisation zu prüfen. Andererseits setzt eine frühe strukturelle Lateralisation nicht unbedingt eine funktionelle Lateralisation im ZNS voraus. So befindet sich die sprachdominante Hemisphäre bei Patienten mit Kartagener Syndrom, bei denen die Lateralisation der inneren unpaaren Organe häufig aufgrund einer Mutation nicht mehr gerichtet, sondern randomisiert auftritt, trotzdem überproportional häufig auf der linken Seite (Lin and Burdine 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass es vor allem im zentralen Nervensystem neben der gerichteten entwicklungsunabhängigen pränatalen Asymmetrie, eine gerichtete postnatale Lateralisation zu geben scheint, welche während der postnatalen Entwicklung durch die

Umgebung beeinflussbar ist. Bereits in der Vergangenheit wurde Corpus calossum als eine wichtige anatomische Struktur solch einer entwicklungsabhängigen Lateralisation identifiziert (Denenberg 1983). In Zukunft könnte die Erforschung von EPO-R-Subtypen und deren interhemisphärischen Verteilung in adulten Individuen mit genetischen und immunhistochemischen Methoden, einen Aufschluss über deren bereits pränatal determinierte asymmetrische Natur erbringen. Die Anstrengungen, die dafür unternommen wurden, liegen Jahre zurück und sind leider nicht unter dem Aspekt der hemisphärenspezifischen Verteilung von EPO-R gemacht worden (Marti et al. 1997; Digicaylioglu et al. 1995). Durch elektrophysiologische Experimente mit weitaus jüngeren Individuen aus der frühen postnatalen Periode wäre es interessant zu erfahren, ob die asymmetrische EPO-Wirkung in frühen Lebensstadien besteht und ob sie durch postnatale mechanische Manipulation am Corpus calossum im späteren Entwicklungsstadium der Individuen beeinflussbar ist.

Eine andere mögliche Ursache für variable und teils entgegengesetzten EPO-Effekte könnte die paradoxe bidirektionale EPO-Wirkung sein, bei der, die für die jeweilige Hemisphäre individuelle Wirkungs-dosis für die vorhandene Variabilität ausschlaggebend sein könnte. Allgemein ist bekannt, dass einige Substanzen anstelle einer erwarteten Wirkung unter bestimmten Bedingungen eine entgegengesetzte Wirkung zeigen (Smith et al. 2012). Untersuchungen der Dosis-Wirkungsbeziehungen von EPO auf Phäochromozytom (PC12)-Zellen zeigten zum Teil einen umgekehrt U-förmigen Zusammenhang (Koshimura et al. 1999). So führten höhere Dosen von EPO zu einem viel geringeren Effekt als erwartet (Masuda et al. 1993). Somit scheint ein mögliches Dosis-Optimum für EPO zu existieren. Weit höhere Dosen von EPO wurden dabei nicht weiter untersucht, sodass ein entgegengesetzter Effekt von EPO im zentralen Nervensystem bisher nur in dieser Arbeit beobachtet wurde. An anderen Organen wie der Lunge konnte jedoch gezeigt werden, dass je nach Dosierung EPO positive oder negative Effekte zumindest langfristig hervorrufen kann, in dem es protektiv oder destruktiv auf das Lungengewebe einwirkt (Kakavas et al. 2011). Angenommen die beiden Hemisphären besitzen aufgrund der gegebenen Asymmetrie jeweils ein eigenes Dosis-Optimum für EPO, so würde eine Über-oder Unterdosierung der rechten Seite zu geringerem beziehungsweise keinem Effekt von EPO führen (siehe Wirkungstyp III) oder sogar einen negativen Effekt aufweisen (siehe Wirkungstyp IV).

Würde die gleiche Dosis von EPO auf der linken Seite im optimalen Bereich liegen, so würde infolgedessen ein positiver Effekt auftreten (siehe Wirkungstyp I und II). Somit könnte nur ein einziger Rezeptortyp von EPO aufgrund seiner asymmetrischen Verteilung auf beide Hemisphären und gegebenen lokalen hemisphärenspezifischen Faktoren für unterschiedliche Effekte von EPO verantwortlich sein. Ein weiterer Hinweis auf ein hemisphärenspezifisches Dosisoptimum ist aus der Tabelle 1 zu entnehmen. Es gibt zwar zahlreiche intraindividuelle Kombinationen der Wirkungstypen, jedoch kommen der linksseitige Wirkungstyp I und II, ebenso wie der rechtsseitige Wirkungstyp III und IV nicht gemeinsam nebeneinander in einem Individuum vor. Dies könnte entweder mit der geringen Versuchszahl von 8 Individuen, deren Gehirn mehrfach abgeleitet wurde, zusammen hängen oder ein indirekter Hinweis dafür sein, dass für jeden Wirkungstyp von EPO, ein intraindividuelles und intrahemisphärisches Dosisoptimum besteht, welches bei der regelmäßigen Gabe von 5 I.E./ml EPO links überwiegend erreicht, rechts hingegen bis hin zum entgegengesetzten Effekt verfehlt wird. Dieses Dosisoptimum müsste individuell so stabil sein, dass es pro Individuum und Hemisphäre nur jeweils ein einziger Wirkungstyp bei unverändert bleibender EPO-Dosis detektiert werden konnte (siehe Tab. 1). Eine zukünftige Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung von EPO auf beide Hemisphären, bei der eine Hemisphäre eines Individuums durch unterschiedliche Dosierungen von EPO untersucht wird, könnte diese Hypothese überprüfen. In der oben aufgeführten Annahme, dass EPO über weitere signalweiterleitende Substanzen wie Dopamin oder Stickstoffmonoxid seine Wirkung entfaltet (Koshimura et al. 1999), könnte auch deren Rezeptorverteilung und Mengenoptimum indirekt für die beschriebenen Effekte von EPO verantwortlich sein. So könnte die in beiden Hemisphären durch das gleiche EPO-Rezeptor freigesetzte Menge an Dopamin aufgrund der unterschiedlichen hemisphärenspezifischen Verteilung der dopaminergen Rezeptorsubtypen (Sarbadhikari and Saha 2006), ebenso zu unterschiedlichen elektrophysiologisch messbaren, hemisphärenspezifischen Effekten führen. Auch mit dem Stickstoffmonoxid als Effektvermittler wären die aufgezeichneten verschiedenen Wirkungstypen von EPO vorstellbar. Bekanntermaßen wird die Konzentration von NO, der dann als *second messenger* die GABAerge Transmission beeinflussen könnte, durch EPO sowohl in Neuronen als auch im Endothel erhöht (Su et al. 2011; Koshimura et al. 1999). So

könnte die Konzentration von NO in der Umgebung der Zellen, welche in der Nähe großer Gefäße abgeleitet wurden nach einer Zeit (ca. 6 Minuten) so stark ansteigen, dass die initial starke Frequenzsteigerung über NO durch EPO nicht mehr vermittelt wird (siehe Wirkungstyp I), da das Dosisoptimum überschritten wäre. Die abseits großer Gefäße abgeleiteten Zellen hingegen würden einen kontinuierlichen Effekt zeigen (siehe Wirkungstyp II), weil die NO-Konzentration in ihrer Umgebung im konstanten optimalen Bereich verbliebe und die Wirkung daher kontinuierlich messbar wäre. Unter der Berücksichtigung, dass die Hemisphären anatomisch, funktional und molekular asymmetrisch sind, könnte die rechte Seite im Durchschnitt mit geringeren Dosen von NO, die durch EPO erzeugt werden auskommen beziehungsweise bei höheren Dosen keinen Effekt zeigen (siehe Wirkungstyp III) oder sogar einen entgegengesetzten Effekt bewirken (siehe Wirkungstyp IV). Bei zukünftigen Experimenten sollte daher auf jeden Fall die Nähe des Ableitungsortes zu großen Gefäßen mit viel Endothelgewebe berücksichtigt werden, da dieser Umstand für die intrahemisphärische Effektivität von EPO infrage kommt.

Die aufgestellten Theorien zum Mechanismus, der zum Teil entgegengesetzten EPO-Wirkung, schließen EPO als einen möglichen Neuromodulator keinesfalls aus, sondern zeigen eher, dass seine bidirektionale hemisphärenabhängige Wirkungsweise mit seinen Eigenschaften als Neuromodulator durchaus vereinbar ist. Die Neuromodulatoren dienen gerade dazu, ein anatomisch vorstrukturiertes Netzwerk in ein funktionelles zu konfigurieren (Pflueger 2007). Betrachtet man zwei Netzwerke, in diesem Falle die des linken und des rechten PrL, die anatomisch und strukturell asymmetrisch sind, so wird es offensichtlich, dass ein und derselbe Modulator wie EPO dementsprechend funktional asymmetrische und zum Teil entgegengesetzte Wirkungen in diesen Netzwerken hervorrufen kann.

4.3. Die Bedeutung der hemisphärenspezifischen EPO-Wirkung

Die Rolle von Erythropoetin im hämatopoetischen System ist ausführlich studiert worden, wobei das Wissen darüber seit Jahren erfolgreich in Therapiestrategien bei Anämien unterschiedlichster Ursachen umgesetzt wird (Lombardero et al. 2011). Das Endergebnis der therapeutischen und physiologischen Wirkung von EPO ist eine Erhöhung des Blutvolumens durch eine Steigerung der Sauerstoffträgeranzahl

(Chateauvieux et al. 2011). Infolgedessen kommt es zu einer verbesserten Herz-Kreislaufleistung, die eine Versorgung der Organe mit Sauerstoff gewährleistet. Auf den ersten Blick haben die Ergebnisse dieser Arbeit nichts mit dem Herz-Kreislauf zu tun, doch unter differenzierter Betrachtung wird deutlich, dass Erythropoetin durch eine zentral vermittelte Erhöhung des Blutdruckes und der Herzfrequenz, die Herz-Kreislaufleistung parallel zur Erythropoese steigern könnte. Wie in dieser Arbeit gezeigt, führt Erythropoetin zentral zu einer Erhöhung der Frequenz der GABAergen Transmission im linken PFC und zu deren Senkung im rechten PFC. Unter der Annahme, dass eine stressbedingte Überfunktion des rechten PFC, welche zusammen mit der Unterfunktion des linken PFC zu einem gesteigerten Sympathikotonus führt (Cerqueira et al. 2008), kann EPO durch eine Drosselung der Inhibition im rechten PFC (siehe Wirkungstyp IV) begleitet von einer Steigerung der Inhibition im linken PFC (siehe Wirkungstyp II) ebenfalls sympathomimetisch wirken. Aufgrund der besonderen Verknüpfung zwischen dem rechten und dem linken PFC (siehe Abb. 1) wird deutlich, dass durch Steigerung der Inhibition auf der linken Seite (siehe Wirkungstyp II), die inhibitorisch nach kontralateral projiziert, die rechte Seite in ihrer Funktion möglicherweise weiter enthemmt wird. Eine Enthemmung der rechten Seite durch gesteigerte Inhibition links und eine ipsilaterale Senkung der eigenen Inhibition, könnten gemeinsam zu einer Potenzierung des rechtsseitig vermittelten Sympathikotonus mit all den Folgen für den Herzkreislauf führen (siehe. Abb. 2). So erscheint es auch von physiologischer Seite aus betrachtet als plausibel, dass EPO bei einer Hypoxie zur besseren Durchblutung hypoxischer Organe, nicht nur die Sauerstoffträgeranzahl langfristig erhöht, sondern auch kurzfristig über Steigerung der Herzfrequenz und des Blutdruckes die Herz-Kreislaufleistung verbessern könnte. Eine bekannte Nebenwirkung der EPO-Therapie ist zudem der Hypertonus, welcher möglicherweise einen aggravierten Zustand der sympathomimetisch verursachten Blutdrucksteigerung darstellen könnte. Zudem zeigte eine Metaanalyse, dass die Entwicklung einer Hypertension während der Therapie mit EPO-Derivaten zwar dosis- jedoch nicht hämoglobinabhängig ist (Koulouridis et al. 2013). Dies könnte ein Hinweis auf die zentral verursachte Hypertension durch EPO sein, welcher gleichzeitig indirekt die Hypothese über die zentrale blutdrucksteigernde Wirkung von EPO stützt. Zwar ist die Bluthirnschranke für EPO nur wenig permeabel (Chateauvieux et al. 2011), was

gegen eine derartige Gleichschaltung der peripheren und zentralen EPO-Funktion sprechen würde, doch kann eine Erhöhung von verschiedenen Metaboliten chronisch kranker, dialysepflichtiger Patienten, welche die größte Behandlungsgruppe durch EPO in der Metaanalyse repräsentieren (Koulouridis et al. 2013), zur Aufhebung der Bluthirnschranke führen. Interessant wäre es daher in Zukunft zu erfahren, ob der Hypertonus überwiegend zentral durch den gesteigerten Sympathikotonus oder peripher durch erhöhte Erythropoese vermittelt wird. Eine pathophysiologische Erklärung dafür wird leider nicht durch diese Arbeit hinreichend erbracht. So bleibt die Wirkung von EPO auf den IL, einem wichtigen Bestandteil des PFC bei der Regulation des Hypertonus bisher unerforscht. Auch ist es kaum möglich den rechten und den linken PFC in einer gemeinsamen Ableitung miteinander vereint zu untersuchen, da die commissurale Bahnen, über welche die beiden Rindenareale kommunizieren, (siehe Abb. 1) bei der Anfertigung vitaler Hirnschnitte zerstört werden. Zumindest aber wäre ipsilateral eine erhaltene Kommunikation zwischen dem PrL und dem IL in einem Hirnschnitt vorstellbar, sodass diese unter EPO-Einfluss elektrophysiologisch untersucht werden könnte. Interessant wäre es dabei auch zu erfahren, wie sich die gegenseitig inhibitorische Kontrolle zwischen dem PrL und dem IL nach der EPO-Gabe ipsilateral verändert und dadurch den Sympathikotonus beeinflusst.

Eine weitere gut erforschte Funktion von EPO im ZNS, die durch Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nur zum Teil gestützt wird, ist die Neuroprotektion beim akuten und chronischen Stress. Zwar beruhen die antiapoptotischen, antiinflammatorischen und antioxidativen Effekte von EPO auf Aktivierung von Genen, die erst nach mehrmaliger Applikation von EPO mit einer Zeitverzögerung aktiv werden (Chateauvieux et al. 2011), dennoch scheint auch die sofortige Wirkung von EPO ein neuroprotektives Potential zu besitzen. Die linke Seite des PFC, zu dem auch der in dieser Arbeit im Fokus stehende PrL gehört, ist stressanfälliger als die rechte Seite (Cerqueira et al. 2008). Eine Steigerung der GABAergen Transmission durch Frequenzerhöhung links nach der EPO-Ausschüttung (siehe Wirkungstyp II) könnte also eine neuroprotektive Wirkung auf den linken PrL ausüben, indem dieser vor übermäßiger Exzitotoxizität geschützt wird. Welche Funktion in diesem Zusammenhang die gleichzeitige intraindividuelle Deaktivierung des inhibitorischen Systems im rechten PrL hat, bleibt allerdings unklar. Der rechte PFC, der unter Stress hypertrophiert (Cerqueira et al.

2008), könnte durch eine Drosselung des inhibitorischen Systems vermehrt auf bisher unbekannte Weise in seiner kompensatorischen Funktion von EPO profitieren. Allerdings würde es dann auch bedeuten, dass Erythropoetin die stressbedingte Symptomatik durch Desinhibition des rechten PFC verstärkt (siehe Abb. 2). Aus klinischen Studien geht jedoch hervor, dass eine Verabreichung von EPO eher eine positive Auswirkung auf schwer therapierbare psychiatrische Erkrankungen wie Depression und Angststörung zeigt und daher die stressbedingte Symptomatik eher lindert als verstärkt (Miskowiak et al. 2012). Über die gesteigerte rechtsseitige Exzitation nach Drosselung des inhibitorischen Systems unter EPO, wäre auch eine vermehrte ipsilaterale Aktivierung der AMPA-Rezeptoren vorstellbar, welche erwiesenermaßen einen neuroprotektiven Effekt unter chronischem Stress vermittelt (Cerqueira et al. 2008). Isoliert betrachtet, lassen sich die EPO-Wirkungstypen mit den bisher bekannten neuroprotektiven Eigenschaften von EPO durchaus vereinbaren. Eine gemeinsame intraindividuelle Betrachtungsweise aller Wirkungstypen steht jedoch, ähnlich wie es bei ihrer entgegengesetzten Wirkungsweise der Fall ist, in einem Widerspruch zur Neuroprotektion. Nur eine differenziertere und detailliertere Betrachtungsweise einzelner Kommunikationswege, samt der Faserqualitäten und Neurotransmitter kann die aufgetauchten Fragen beantworten und bestehende Widersprüche beseitigen. Bisher ist nur ein kleiner Anteil an Kommunikationswegen durch diese Arbeit erfasst worden. In erster Linie wurde die hemisphärenspezifische Wirkung von EPO auf die GABAerge Transmission in der II/III. Pyramidenzellschicht des PrL erhoben, deren apikale Dendriten wichtige Afferenzen aus dem limbischen System wie Amygdala und Hippocampus erhalten und deren basalen Dendriten hingegen Afferenzen aus dem Thalamus empfangen (Cerqueira et al. 2008). Bereits im gesunden Zustand gibt es hemisphärenspezifische Asymmetrien in der Dendritenlänge und deren Besetzung mit Dornfortsätzen. Auf Stress reagieren die Pyramidenzellen ebenfalls seitenspezifisch. Bei Ratten kommt es rechts zu einer Längenreduktion der apikalen Dendriten, links hingegen kommt es zu einer Abnahme der Dornfortsätze auf basalen Dendriten ohne einer apikalen oder basalen Längenänderung (Perez-Cruz et al. 2009). Eine stressbedingte Veränderung der anatomischen Verhältnisse im PrL führt bekanntlich zu psychopathologischen Verhaltensaberrationen (Goto et al. 2010). Hierbei könnte das Erythropoetin als Neuromodulator, die durch Stress neu

geschaffenen anatomischen Verhältnisse funktional kompensieren und dadurch die Verhaltensflexibilität und das Arbeitsgedächtnis aufrecht erhalten. In klinischen Studien führte die Applikation von EPO bereits zur Linderung von psychiatrischen Symptomen und zur Verbesserung der Verhaltensflexibilität und des Arbeitsgedächtnis (Miskowiak et al. 2012). Somit könnte Erythropoetin, neben der Neuroprotektion des ZNS, eine wichtige Rolle bei der funktionale Anpassung der neuronalen Kommunikation an die durch Stress erzeugten anatomischen Veränderungen spielen. Dabei könnte EPO direkt oder über die Erhöhung von Dopamin (Koshimura et al. 1999) die synaptische Transmission modulieren (Stevenson et al. 2008). Anders als bisher gedacht, könnte diese Modulation nicht nur als langfristiger und verspäteter Effekt (Adamcio et al. 2008), sondern wie in dieser Arbeit gezeigt, unmittelbar nach der ersten EPO-Gabe innerhalb weniger Minuten auftreten. Dennoch ist das Wissen über die interhemisphärische Asymmetrie von dem PFC und seiner Verknüpfung mit anderen Hirnarealen trotz großer Fortschritte der letzten Jahre noch zu gering. Umso mehr bedarf EPO in seiner neuentdeckten, möglicherweise neuromodulatorischen Rolle, einer weiteren Aufklärung und einer tiefgreifenden Erforschung für ein neues Zeitalter im Kampf gegen die neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen. Das wahre Potential von EPO liegt auch Jahrzehnte nach seiner Entdeckung immer noch größtenteils verborgen und hält noch viele wissenschaftliche Überraschungen für uns bereit.

5. Zusammenfassung

Erythropoetin (EPO) ist ein Glykoprotein, welches neben seiner peripheren und überwiegend hämatopoetischen Wirksamkeit einen neuroprotektiven und modulatorischen Effekt auf das zentrale Nervensystem (ZNS) entfalten kann. Durch Studien an Schlaganfallpatienten und an Patienten mit psychiatrischen Erkrankungen, bei denen EPO deutlich schadensbegrenzend und symptomverbessernd wirkte, wurde die klinische und funktionale Relevanz von EPO für das ZNS bewiesen.

In vorhergehenden Studien wurde seine modulatorische Wirkung auf das inhibitorische System neuronaler Netzwerke entdeckt. Unklar blieb dennoch, ob EPO sofort und direkt an den Neuronen wirksam ist oder ob der gemessene neuromodulatorische Effekt aufgrund einer veränderten Neuroplastizität zeitlich verzögert auftritt. Weitere Studien zeigten, dass EPO in der Lage ist, unmittelbar nach dessen Gabe die Konzentration von Dopamin und freier intrazellulärer Kalziumionen zu beeinflussen. Diese Eigenschaft von EPO und sein neuromodulatorisches Potential lassen vermuten, dass es innerhalb kurzer Zeit als ein möglicher Neurotransmitter selbst auf das inhibitorische System neuronaler Netzwerke einwirken könnte.

Um dem nachzugehen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine derartige Wirkungsweise von EPO mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik untersucht. Dabei wurden sIPSC von Zellen in der II/III. Zellschicht des gut zugänglichen und psychopathologisch bedeutsamen Prälimbischen Cortex (PrL) abgeleitet. Die Aufnahmen der Ableitungen wurden anschließend vor und nach der EPO-Gabe seitendifferenziert miteinander verglichen.

Sowohl im linken als auch im rechten PrL konnten insgesamt zwei statistisch signifikante Wirkungstypen von EPO ermittelt werden. Dabei wurde links die Frequenz der GABAergen Transmission eine Minute nach der EPO-Gabe für eine halbe Stunde gesteigert und rechts hingegen gesenkt. Die Wirkungstypen traten auch innerhalb eines und desselben Individuums zur gleichen Zeit auf. Es wurden zwei weitere nicht statistisch signifikante Wirkungstypen von EPO detektiert, wobei einer regelmäßig rechtsseitig auftrat und kein Effekt zeigte, der andere trat links auf und wies eine starke aber kurzzeitige Frequenzerhöhung auf. Das Vorkommen des jeweiligen Wirkungstyps war eindeutig hemisphärenspezifisch. Innerhalb der Hemisphären waren die

Wirkungstypen aber nur bedingt ortsspezifisch. Die Amplitude blieb während dessen unverändert.

Die Veränderung der Frequenz der sIPSC nach der EPO-Gabe in der II/III. Schicht des PrL beweist die funktionelle Relevanz von EPO für die sofortige synaptische Transmission. Das Erythropoetin wirkt nicht nur über die langwierige genetische Expression neuromodulatorischer Proteine, sondern auch sofort nach dessen Applikation, wie ein Neurotransmitter. Seine Wirkungsweise ist dabei möglicherweise genauso, wie die beiden Hemisphären es selbst sind: intraindividuell asymmetrisch aber dennoch durch entgegengesetzten Charakter in ihrer Wirkung ausbalanciert.

6. Literaturverzeichnis

Abbrecht P H, Littell J K (1972) Plasma Erythropoietin in Men and Mice during Acclimatization to Different Altitudes. *Journal of Applied Physiology* 32 (1): 54-58.

Adamcio B, Sargin D, Stradomska A, Medrihan L, Gertler C, Theis F, Zhang M, et al. (2008) Erythropoietin Enhances Hippocampal Long-Term Potentiation and Memory. *BMC Biology* 6: 37-7007-6-37.

Agnati L F, Leo G, Zanardi A, Genedani S, Rivera A, Fuxe K, Guidolin D (2006) Volume Transmission and Wiring Transmission from Cellular to Molecular Networks: History and Perspectives. *Acta Physiologica (Oxford, England)* 187 (1-2): 329-344.

Ahn A C, Tewari M, Poon C S, Phillips R S (2006) The Limits of Reductionism in Medicine: Could Systems Biology Offer an Alternative? *PLoS Medicine* 3 (6): e208.

Akert K, Hartmann-von Monakow K (1980) Relationships of Precentral Premotor and Prefrontal Cortex to the Mediodorsal and Intralaminar Nuclei of the Monkey Thalamus. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 40 (1): 7-25.

Alnaeeli M, Wang L, Piknova B, Rogers H, Li X, Noguchi C T (2012) Erythropoietin in Brain Development and Beyond. *Anatomy Research International* 2012: 953264.

Alqadah A, Hsieh Y W, Chuang C F (2013) microRNA Function in Left-Right Neuronal Asymmetry: Perspectives from *C. Elegans*. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 158.

Andoh T, Echigo N, Kamiya Y, Hayashi M, Kudoh I, Goto T (2011) Effects of Erythropoietin on Intracellular Calcium Concentration of Rat Primary Cortical Neurons. *Brain Research* 1387: 8-18.

Bähr M, Frotscher M (2009) Marklager Assoziationsfasern. Neurologisch-Topische Diagnostik. *Georg Thieme Verlag KG, Würzburg (Deutschland)*, 9. Aufl. S 366-369.

Balleine B W, O'Doherty J P (2010) Human and Rodent Homologies in Action Control: Corticostriatal Determinants of Goal-Directed and Habitual Action. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35 (1): 48-69.

Barbas H (2000) Connections Underlying the Synthesis of Cognition, Memory, and Emotion in Primate Prefrontal Cortices. *Brain Research Bulletin* 52 (5): 319-330.

Barbas H (1995) Anatomic Basis of Cognitive-Emotional Interactions in the Primate Prefrontal Cortex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 19 (3): 499-510.

Benninghoff A, Drenckhahn D (2008) Innerer Aufbau. In: Drenckhahn D, Waschke J (Hrsg) Taschenbuch Anatomie. *Elsevier GmbH, München (Deutschland)*, 1. Aufl. S 424-425.

Bernaudin M, Bellail A, Marti H H, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, Mackenzie E T, Petit E (2000) Neurons and Astrocytes Express EPO mRNA: Oxygen-Sensing Mechanisms that Involve the Redox-State of the Brain. *Glia* 30 (3): 271-278.

Berridge M J (2004) Calcium Signal Transduction and Cellular Control Mechanisms. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1742 (1-3): 3-7.

Berry M D (2004) Mammalian Central Nervous System Trace Amines. Pharmacologic Amphetamines, Physiologic Neuromodulators. *Journal of Neurochemistry* 90 (2): 257-271.

Blum S, Hebert A E, Dash P K (2006) A Role for the Prefrontal Cortex in Recall of Recent and Remote Memories. *Neuroreport* 17 (3): 341-344.

Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, et al. (2004) Erythropoietin Mediates Tissue Protection through an Erythropoietin and Common Beta-Subunit Heteroreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (41): 14907-14912.

Broxmeyer H E (2013) Erythropoietin: Multiple Targets, Actions, and Modifying Influences for Biological and Clinical Consideration. *The Journal of Experimental Medicine* 210 (2): 205-208.

Budde T (2003) Synaptische Übertragung. In: Budde T, Meuth S (Hrsg) Fragen Und Antworten Zu Den Neurowissenschaften. *Verlag Hans Huber*, Bern (Schweiz), 1. Aufl. S 93-94.

Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Quirk G J (2009) Sustained Conditioned Responses in Prelimbic Prefrontal Neurons are Correlated with Fear Expression and Extinction Failure. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (26): 8474-8482.

Cerqueira J J, Almeida O F, Sousa N (2008) The Stressed Prefrontal Cortex. Left? Right! *Brain, Behavior, and Immunity* 22 (5): 630-638.

Cerqueira J J, Catania C, Sotiropoulos I, Schubert M, Kalisch R, Almeida O F, Auer D P, Sousa N (2005) Corticosteroid Status Influences the Volume of the Rat Cingulate Cortex - a Magnetic Resonance Imaging Study. *Journal of Psychiatric Research* 39 (5): 451-460.

Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M, Diederich M (2011) Erythropoietin, Erythropoiesis and Beyond. *Biochemical Pharmacology* 82 (10): 1291-1303.

Corcoran K A, Quirk G J (2007) Activity in Prelimbic Cortex is Necessary for the Expression of Learned, but Not Innate, Fears. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (4): 840-844.

Czeh B, Perez-Cruz C, Fuchs E, Flugge G (2008) Chronic Stress-Induced Cellular Changes in the Medial Prefrontal Cortex and their Potential Clinical Implications: Does Hemisphere Location Matter? *Behavioural Brain Research* 190 (1): 1-13.

Dalley J W, Cardinal R N, Robbins T W (2004) Prefrontal Executive and Cognitive Functions in Rodents: Neural and Neurochemical Substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28 (7): 771-784.

Denenberg V H (1983) Lateralization of Function in Rats. *The American Journal of Physiology* 245 (4): R505-9.

DeVito L M, Lykken C, Kanter B R, Eichenbaum H (2010) Prefrontal Cortex: Role in Acquisition of Overlapping Associations and Transitive Inference. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 17 (3): 161-167.

Di S, Maxson M M, Franco A, Tasker J G (2009) Glucocorticoids Regulate Glutamate and GABA Synapse-Specific Retrograde Transmission Via Divergent Nongenomic Signaling Pathways. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (2): 393-401.

Digicaylioglu M, Bichet S, Marti H H, Wenger R H, Rivas L A, Bauer C, Gassmann M (1995) Localization of Specific Erythropoietin Binding Sites in Defined Areas of the Mouse Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (9): 3717-3720.

Ding J, Li Q Y, Yu J Z, Wang X, Lu C Z, Ma C G, Xiao B G (2013) Carbamylated Erythropoietin Ameliorates Hypoxia-Induced Cognitive and Behavioral Defects with the Generation of Choline Acetyltransferase-Positive Neurons. *Journal of Neuroscience Research* 91 (1): 73-82.

Edwards F A, Konnerth A (1992) Patch-Clamping Cells in Sliced Tissue Preparations. *Methods in Enzymology* 207: 208-222.

Edwards F A, Konnerth A, Sakmann B (1990) Quantal Analysis of Inhibitory Synaptic Transmission in the Dentate Gyrus of Rat Hippocampal Slices: A Patch-Clamp Study. *The Journal of Physiology* 430: 213-249.

Fenwick E M, Marty A, Neher E (1982) A Patch-Clamp Study of Bovine Chromaffin Cells and of their Sensitivity to Acetylcholine. *The Journal of Physiology* 331: 577-597.

Fishell G (2007) Perspectives on the Developmental Origins of Cortical Interneuron Diversity. *Novartis Foundation Symposium* 288: 21-35; discussion 35-44, 96-8.

Foley R N (2008) Erythropoietin: Physiology and Molecular Mechanisms. *Heart Failure Reviews* 13 (4): 405-414.

Fond G, Macgregor A, Attal J, Larue A, Brittner M, Ducasse D, Capdevielle D (2012) Treating Patients with Schizophrenia Deficit with Erythropoietin? *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 66 (5): 375-382.

Förstl F (2005) Frontalhirn Funktionen Und Erkrankungen. *Springer Medizin*, Heidelberg (Deutschland), 2. Aufl. S 449.

Franklin K B J, Chudasama Y (2012) Prefrontal Cortex. In: Watson C, Paxinos G, Puelles L (Hrsg) *The Mouse Nervous System*. *academic press*, London (UK), S 727-737.

Franklin K, Paxinos G (2007) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. *academic press* San Diego (USA), 3. Aufl.

Fuster J M (2001) The Prefrontal Cortex--an Update: Time is of the Essence. *Neuron* 30 (2): 319-333.

Gass J T, Chandler L J (2013) The Plasticity of Extinction: Contribution of the Prefrontal Cortex in Treating Addiction through Inhibitory Learning. *Frontiers in Psychiatry* 4: 46.

Gibb A J, Edwards F A (1994) Patch Clamp Recording from Cells in Sliced Tissues. In: Ogden D C (Hrsg) *Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook*. *Company of Biologists*, Cambridge (UK), 2. Aufl. S 255-274.

Girgenti M J, Hunsberger J, Duman C H, Sathyanesan M, Terwilliger R, Newton S S (2009) Erythropoietin Induction by Electroconvulsive Seizure, Gene Regulation, and Antidepressant-Like Behavioral Effects. *Biological Psychiatry* 66 (3): 267-274.

Goel V (2014) Creative Brains: Designing in the Real World. *Frontiers in Human Neuroscience* 8: 241.

Goel V, Stollstorff M, Nakic M, Knutson K, Grafman J (2009) A Role for Right Ventrolateral Prefrontal Cortex in Reasoning about Indeterminate Relations. *Neuropsychologia* 47 (13): 2790-2797.

Goel V, Tierney M, Sheesley L, Bartolo A, Vartanian O, Grafman J (2007) Hemispheric Specialization in Human Prefrontal Cortex for Resolving Certain and Uncertain Inferences. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 17 (10): 2245-2250.

Goto Y, Yang C R, Otani S (2010) Functional and Dysfunctional Synaptic Plasticity in Prefrontal Cortex: Roles in Psychiatric Disorders. *Biological Psychiatry* 67 (3): 199-207.

Granon S, Changeux J P (2012) Deciding between Conflicting Motivations: What Mice make of their Prefrontal Cortex. *Behavioural Brain Research* 229 (2): 419-426.

Groenewegen H J, Wright C I, Uylings H B (1997) The Anatomical Relationships of the Prefrontal Cortex with Limbic Structures and the Basal Ganglia. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)* 11 (2): 99-106.

Guldin W O, Pritzel M, Markowitsch H J (1981) Prefrontal Cortex of the Mouse Defined as Cortical Projection Area of the Thalamic Mediodorsal Nucleus. *Brain, Behavior and Evolution* 19 (3-4): 93-107.

Gunnarson E, Song Y, Kowalewski J M, Brismar H, Brines M, Cerami A, Andersson U, Zelenina M, Aperia A (2009) Erythropoietin Modulation of Astrocyte Water Permeability as a Component of Neuroprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (5): 1602-1607.

Gutman D A, Keifer O P, Jr, Magnuson M E, Choi D C, Majeed W, Keilholz S, Ressler K J (2012) A DTI Tractography Analysis of Infralimbic and Prelimbic Connectivity in the Mouse using High-Throughput MRI. *NeuroImage* 63 (2): 800-811.

Hackett M L, Kohler S, O'Brien J T, Mead G E (2014) Neuropsychiatric Outcomes of Stroke. *Lancet Neurology* 13 (5): 525-534.

Hamill O P, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F J (1981) Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 391 (2): 85-100.

Hamill O P, McBride D W, Jr (1997) Induced Membrane Hypo/Hyper-Mechanosensitivity: A Limitation of Patch-Clamp Recording. *Annual Review of Physiology* 59: 621-631.

Hand C C, Brines M (2011) Promises and Pitfalls in Erythropoietin-Mediated Tissue Protection: Are Nonerythropoietic Derivatives a Way Forward? *Journal of Investigative Medicine : The Official Publication of the American Federation for Clinical Research* 59 (7): 1073-1082.

Hao Y, Yang J, Sun J, Qi J, Dong Y, Wu C F (2008) Lesions of the Medial Prefrontal Cortex Prevent the Acquisition but Not Reinstatement of Morphine-Induced Conditioned Place Preference in Mice. *Neuroscience Letters* 433 (1): 48-53.

Hayley S, Litteljohn D (2013) Neuroplasticity and the Next Wave of Antidepressant Strategies. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 218.

Higley M J, Sabatini B L (2008) Calcium Signaling in Dendrites and Spines: Practical and Functional Considerations. *Neuron* 59 (6): 902-913.

Hilz M J, Dutsch M, Perrine K, Nelson P K, Rauhut U, Devinsky O (2001) Hemispheric Influence on Autonomic Modulation and Baroreflex Sensitivity. *Annals of Neurology* 49 (5): 575-584.

Iwai M, Cao G, Yin W, Stetler R A, Liu J, Chen J (2007) Erythropoietin Promotes Neuronal Replacement through Revascularization and Neurogenesis After Neonatal Hypoxia/Ischemia in Rats. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 38 (10): 2795-2803.

Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill S D, Kaufman R J, Mufson A, Seehra J, Jones S S, Hewick R, Fritsch E F (1985) Isolation and Characterization of Genomic and cDNA Clones of Human Erythropoietin. *Nature* 313 (6005): 806-810.

Jelkmann W (1986) Erythropoietin Research, 80 Years After the Initial Studies by Carnot and Deflandre. *Respiration Physiology* 63 (3): 257-266.

Jubinsky P T, Krijanovski O I, Nathan D G, Tavernier J, Sieff C A (1997) The Beta Chain of the Interleukin-3 Receptor Functionally Associates with the Erythropoietin Receptor. *Blood* 90 (5): 1867-1873.

Juul S E, McPherson R J, Farrell F X, Jolliffe L, Ness D J, Gleason C A (2004) Erythropoietin Concentrations in Cerebrospinal Fluid of Nonhuman Primates and Fetal Sheep Following High-Dose Recombinant Erythropoietin. *Biology of the Neonate* 85 (2): 138-144.

Juul S E, Yachnis A T, Rojiani A M, Christensen R D (1999) Immunohistochemical Localization of Erythropoietin and its Receptor in the Developing Human Brain. *Pediatric and Developmental Pathology : The Official Journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 2 (2): 148-158.

Kakavas S, Demestiha T, Vasileiou P, Xanthos T (2011) Erythropoietin as a Novel Agent with Pleiotropic Effects Against Acute Lung Injury. *European Journal of Clinical Pharmacology* 67 (1): 1-9.

Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Tanaka J, Kato Y (1999) Effects of Erythropoietin on Neuronal Activity. *Journal of Neurochemistry* 72 (6): 2565-2572.

Koulouridis I, Alfayez M, Trikalinos T A, Balk E M, Jaber B L (2013) Dose of Erythropoiesis-Stimulating Agents and Adverse Outcomes in CKD: A Metaregression Analysis. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation* 61 (1): 44-56.

Kovacevic N, Henderson J T, Chan E, Lifshitz N, Bishop J, Evans A C, Henkelman R M, Chen X J (2005) A Three-Dimensional MRI Atlas of the Mouse Brain with

Estimates of the Average and Variability. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 15 (5): 639-645.

Krettek J E, Price J L (1977) The Cortical Projections of the Mediodorsal Nucleus and Adjacent Thalamic Nuclei in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology* 171 (2): 157-191.

Kumral A, Genc S, Ozer E, Yilmaz O, Gokmen N, Koroglu T F, Duman N, Genc K, Ozkan H (2006) Erythropoietin Downregulates Bax and DP5 Proapoptotic Gene Expression in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Biology of the Neonate* 89 (3): 205-210.

Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, Genc K, Genc S, Sonmez U, Yilmaz O, Duman N, Uysal N, Ozkan H (2005) Protective Effects of Erythropoietin Against Ethanol-Induced Apoptotic Neurodegeneration and Oxidative Stress in the Developing C57BL/6 Mouse Brain. *Brain Research. Developmental Brain Research* 160 (2): 146-156.

Laroche S, Davis S, Jay T M (2000) Plasticity at Hippocampal to Prefrontal Cortex Synapses: Dual Roles in Working Memory and Consolidation. *Hippocampus* 10 (4): 438-446.

Leconte C, Bihel E, Lepelletier F X, Bouet V, Saulnier R, Petit E, Boulouard M, Bernaudin M, Schumann-Bard P (2011) Comparison of the Effects of Erythropoietin and its Carbamylated Derivative on Behaviour and Hippocampal Neurogenesis in Mice. *Neuropharmacology* 60 (2-3): 354-364.

Leonard C M (1969) The Prefrontal Cortex of the Rat. I. Cortical Projection of the Mediodorsal Nucleus. II. Efferent Connections. *Brain Research* 12 (2): 321-343.

Li G, Ma R, Huang C, Tang Q, Fu Q, Liu H, Hu B, Xiang J (2008) Protective Effect of Erythropoietin on Beta-Amyloid-Induced PC12 Cell Death through Antioxidant Mechanisms. *Neuroscience Letters* 442 (2): 143-147.

Lin S Y, Burdine R D (2005) Brain Asymmetry: Switching from Left to Right. *Current Biology : CB* 15 (9): R343-5.

Liu C, Shen K, Liu Z, Noguchi C T (1997) Regulated Human Erythropoietin Receptor Expression in Mouse Brain. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (51): 32395-32400.

Lombardero M, Kovacs K, Scheithauer B W (2011) Erythropoietin: A Hormone with Multiple Functions. *Pathobiology : Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology* 78 (1): 41-53.

MacKenzie-Graham A, Lee E F, Dinov I D, Bota M, Shattuck D W, Ruffins S, Yuan H, et al. (2004) A Multimodal, Multidimensional Atlas of the C57BL/6J Mouse Brain. *Journal of Anatomy* 204 (2): 93-102.

Maiese K, Chong Z Z, Shang Y C, Wang S (2012) Erythropoietin: New Directions for the Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences* 13 (9): 11102-11129.

Marti H H, Gassmann M, Wenger R H, Kvietikova I, Morganti-Kossmann M C, Kossmann T, Trentz O, Bauer C (1997) Detection of Erythropoietin in Human Liquor: Intrinsic Erythropoietin Production in the Brain. *Kidney International* 51 (2): 416-418.

Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F, Jr, Tabira T, Sasaki R (1993) Functional Erythropoietin Receptor of the Cells with Neural Characteristics. Comparison with Receptor Properties of Erythroid Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (15): 11208-11216.

Milad M R, Quirk G J (2012) Fear Extinction as a Model for Translational Neuroscience: Ten Years of Progress. *Annual Review of Psychology* 63: 129-151.

Miskowiak K, Inkster B, O'Sullivan U, Selvaraj S, Goodwin G M, Harmer C J (2008) Differential Effects of Erythropoietin on Neural and Cognitive Measures of Executive Function 3 and 7 Days Post-Administration. *Experimental Brain Research* 184 (3): 313-321.

Miskowiak K, O'Sullivan U, Harmer C J (2007a) Erythropoietin Enhances Hippocampal Response during Memory Retrieval in Humans. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (11): 2788-2792.

Miskowiak K, O'Sullivan U, Harmer C J (2007b) Erythropoietin Reduces Neural and Cognitive Processing of Fear in Human Models of Antidepressant Drug Action. *Biological Psychiatry* 62 (11): 1244-1250.

Miskowiak K W, Vinberg M, Harmer C J, Ehrenreich H, Kessing L V (2012) Erythropoietin: A Candidate Treatment for Mood Symptoms and Memory Dysfunction in Depression. *Psychopharmacology* 219 (3): 687-698.

Mogensen J, Boyd M H, Nielsen M D, Kristensen R S, Mala H (2008) Erythropoietin Improves Spatial Delayed Alternation in a T-Maze in Rats Subjected to Ablation of the Prefrontal Cortex. *Brain Research Bulletin* 77 (1): 1-7.

Moghaddam B (1993) Stress Preferentially Increases Extraneuronal Levels of Excitatory Amino Acids in the Prefrontal Cortex: Comparison to Hippocampus and Basal Ganglia. *Journal of Neurochemistry* 60 (5): 1650-1657.

Moore P K, Handy R L (1997) Selective Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase--is no NOS really Good NOS for the Nervous System? *Trends in Pharmacological Sciences* 18 (6): 204-211.

Nicholls J G, Martin R A, Wallace B G, Fuchs P A (2001) Cellular and Molecular Biochemistry of Synaptic Transmission. In: Nicholls J G, Martin R A, Wallace B G, Fuchs P A (Hrsg) From Neuron to Brain. *Sinauer Associates, Massachusetts (USA)*, 4. Aufl. S 243-290.

Ongur D, Price J L (2000) The Organization of Networks within the Orbital and Medial Prefrontal Cortex of Rats, Monkeys and Humans. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 10 (3): 206-219.

Osborn M, Rustom N, Clarke M, Litteljohn D, Rudyk C, Anisman H, Hayley S (2013) Antidepressant-Like Effects of Erythropoietin: A Focus on Behavioural and Hippocampal Processes. *PloS One* 8 (9): e72813.

Pattwell S S, Lee F S, Casey B J (2013) Fear Learning and Memory Across Adolescent Development: Hormones and Behavior Special Issue: Puberty and Adolescence. *Hormones and Behavior* 64 (2): 380-389.

Pereda A E, Curti S, Hoge G, Cachope R, Flores C E, Rash J E (2013) Gap Junction-Mediated Electrical Transmission: Regulatory Mechanisms and Plasticity. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1828 (1): 134-146.

Perez-Cruz C, Simon M, Czeh B, Flugge G, Fuchs E (2009) Hemispheric Differences in Basilar Dendrites and Spines of Pyramidal Neurons in the Rat Prelimbic Cortex: Activity- and Stress-Induced Changes. *The European Journal of Neuroscience* 29 (4): 738-747.

Peters J, Kalivas P W, Quirk G J (2009) Extinction Circuits for Fear and Addiction Overlap in Prefrontal Cortex. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 16 (5): 279-288.

Petrides M (1996) Specialized Systems for the Processing of Mnemonic Information within the Primate Frontal Cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 351 (1346): 1455-61; discussion 1461-2.

Petrides M (1995) Impairments on Nonspatial Self-Ordered and Externally Ordered Working Memory Tasks After Lesions of the Mid-Dorsal Part of the Lateral Frontal Cortex in the Monkey. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15 (1 Pt 1): 359-375.

Pflueger H. (2007): Lehrerfortbildung: Neuromodulation und Verhalten. Neurobiologie-Neurobiology, *Freie Universität Berlin*, 8/9/2014. http://www.neurobiologie.fu-berlin.de/menu/lectures-courses/winter-0708/Lehrerfortbildung_26Okt07/LehrerfortbildgNeuromodulationPflueger_72dpi.pdf.

Radley J J, Arias C M, Sawchenko P E (2006) Regional Differentiation of the Medial Prefrontal Cortex in Regulating Adaptive Responses to Acute Emotional Stress. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (50): 12967-12976.

Repovs G, Baddeley A (2006) The Multi-Component Model of Working Memory: Explorations in Experimental Cognitive Psychology. *Neuroscience* 139 (1): 5-21.

Robinson R G, Kubos K L, Starr L B, Rao K, Price T R (1984) Mood Disorders in Stroke Patients. Importance of Location of Lesion. *Brain : A Journal of Neurology* 107 (Pt 1) (Pt 1): 81-93.

Sagasti A (2007) Three Ways to make Two Sides: Genetic Models of Asymmetric Nervous System Development. *Neuron* 55 (3): 345-351.

Sanchez P E, Navarro F P, Fares R P, Nadam J, Georges B, Moulin C, Le Cavorsin M, et al. (2009) Erythropoietin Receptor Expression is Concordant with Erythropoietin but Not with Common Beta Chain Expression in the Rat Brain Throughout the Life Span. *The Journal of Comparative Neurology* 514 (4): 403-414.

Santhanam A V, Katusic Z S (2006) Erythropoietin and Cerebral Vascular Protection: Role of Nitric Oxide. *Acta Pharmacologica Sinica* 27 (11): 1389-1394.

Sarbadhikari S N, Saha A K (2006) Moderate Exercise and Chronic Stress Produce Counteractive Effects on Different Areas of the Brain by Acting through various Neurotransmitter Receptor Subtypes: A Hypothesis. *Theoretical Biology & Medical Modelling* 3: 33.

Shen Y, Yu H M, Yuan T M, Gu W Z, Wu Y D (2009) Erythropoietin Attenuates White Matter Damage, Proinflammatory Cytokine and Chemokine Induction in Developing Rat Brain After Intra-Uterine Infection. *Neuropathology : Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 29 (5): 528-535.

Shingo T, Sorokan S T, Shimazaki T, Weiss S (2001) Erythropoietin Regulates the in Vitro and in Vivo Production of Neuronal Progenitors by Mammalian Forebrain Neural

Stem Cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (24): 9733-9743.

Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk G J (2011) Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 36 (2): 529-538.

Smith E E, Jonides J (1999) Storage and Executive Processes in the Frontal Lobes. *Science (New York, N.Y.)* 283 (5408): 1657-1661.

Smith S W, Hauben M, Aronson J K (2012) Paradoxical and Bidirectional Drug Effects. *Drug Safety : An International Journal of Medical Toxicology and Drug Experience* 35 (3): 173-189.

Sotres-Bayon F, Quirk G J (2010) Prefrontal Control of Fear: More than just Extinction. *Current Opinion in Neurobiology* 20 (2): 231-235.

Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, Karkavelas G, Simeonidou C, Kaiki-Astara A, Guiba-Tziampiri O (2004) Erythropoietin Prevents Hypoxia/Ischemia-Induced DNA Fragmentation in an Experimental Model of Perinatal Asphyxia. *Neuroscience Letters* 366 (1): 24-28.

Stern S L, Dhanda R, Hazuda H P (2001) Hopelessness Predicts Mortality in Older Mexican and European Americans. *Psychosomatic Medicine* 63 (3): 344-351.

Stevenson C W, Halliday D M, Marsden C A, Mason R (2008) Early Life Programming of Hemispheric Lateralization and Synchronization in the Adult Medial Prefrontal Cortex. *Neuroscience* 155 (3): 852-863.

Su K H, Shyue S K, Kou Y R, Ching L C, Chiang A N, Yu Y B, Chen C Y, Pan C C, Lee T S (2011) Beta Common Receptor Integrates the Erythropoietin Signaling in Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Journal of Cellular Physiology* 226 (12): 3330-3339.

Sullivan R M (2004) Hemispheric Asymmetry in Stress Processing in Rat Prefrontal Cortex and the Role of Mesocortical Dopamine. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 7 (2): 131-143.

Sullivan R M, Dufresne M M, Siontas D, Chehab S, Townsend J, Laplante F (2014) Mesocortical Dopamine Depletion and Anxiety-Related Behavior in the Rat: Sex and Hemisphere Differences. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*.

Sun T, Walsh C A (2006) Molecular Approaches to Brain Asymmetry and Handedness. *Nature Reviews.Neuroscience* 7 (8): 655-662.

Sweeney K, Kernick D (2002) Clinical Evaluation: Constructing a New Model for Post-Normal Medicine. *Journal of Evaluation in Clinical Practice* 8 (2): 131-138.

Tabira T, Konishi Y, Gallyas F, Jr (1995) Neurotrophic Effect of Hematopoietic Cytokines on Cholinergic and Other Neurons in Vitro. *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 13 (3-4): 241-252.

Tao L, Nicholson C (1996) Diffusion of Albumins in Rat Cortical Slices and Relevance to Volume Transmission. *Neuroscience* 75 (3): 839-847.

Tsai P T, Ohab J J, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, Liu X, Wu H, Carmichael S T (2006) A Critical Role of Erythropoietin Receptor in Neurogenesis and Post-Stroke Recovery. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (4): 1269-1274.

Unbekannter Autor. (2014): Hoffnung. Psychiatriegespräch, *Engels, F.*, 6/23/2014. http://psychiatriegespraech.de/psychiatriekultur/gedichte_und_prosa/hoffnung/.

Van De Werd H J, Rajkowska G, Evers P, Uylings H B (2010) Cytoarchitectonic and Chemoarchitectonic Characterization of the Prefrontal Cortical Areas in the Mouse. *Brain Structure & Function* 214 (4): 339-353.

van den Bos R, Koot S, de Visser L (2014) A Rodent Version of the Iowa Gambling Task: 7 Years of Progress. *Frontiers in Psychology* 5: 203.

Ventura R, Morrone C, Puglisi-Allegra S (2007) Prefrontal/Accumbal Catecholamine System Determines Motivational Salience Attribution to both Reward- and Aversion-Related Stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (12): 5181-5186.

Verdier F, Walrafen P, Hubert N, Chretien S, Gisselbrecht S, Lacombe C, Mayeux P (2000) Proteasomes Regulate the Duration of Erythropoietin Receptor Activation by Controlling Down-Regulation of Cell Surface Receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (24): 18375-18381.

Vertes R P (2006) Interactions among the Medial Prefrontal Cortex, Hippocampus and Midline Thalamus in Emotional and Cognitive Processing in the Rat. *Neuroscience* 142 (1): 1-20.

Vertes R P (2004) Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. *Synapse (New York, N.Y.)* 51 (1): 32-58.

Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch S L, Quirk G J (2006) Microstimulation Reveals Opposing Influences of Prelimbic and Infralimbic Cortex on the Expression of Conditioned Fear. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 13 (6): 728-733.

Walker A G, Ummel J R, Rebec G V (2011) Reduced Expression of Conditioned Fear in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease is Related to Abnormal Activity in Prelimbic Cortex. *Neurobiology of Disease* 43 (2): 379-387.

Wang L, Chopp M, Teng H, Bolz M, Francisco M A, Aluigi D M, Wang X L, et al. (2011) Tumor Necrosis Factor Alpha Primes Cerebral Endothelial Cells for Erythropoietin-Induced Angiogenesis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31 (2): 640-647.

Wei L, Han B H, Li Y, Keogh C L, Holtzman D M, Yu S P (2006) Cell Death Mechanism and Protective Effect of Erythropoietin After Focal Ischemia in the Whisker-Barrel Cortex of Neonatal Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 317 (1): 109-116.

Wojtowicz T, Mozrzymas J W (2008) Erythropoietin Affects GABAergic Transmission in Hippocampal Neurons in Vitro. *Cellular & Molecular Biology Letters* 13 (4): 649-655.

Zilles K, Amunts K (2010) Centenary of Brodmann's Map--Conception and Fate. *Nature Reviews.Neuroscience* 11 (2): 139-145.

7. Danksagung

Die Fertigstellung meiner Dissertation wäre ohne der enormen Hilfe seitens der Menschen, welche mich über die Jahre meiner Arbeit begleitet und unterstützt haben nicht möglich gewesen. Auf diesem Weg möchte ich einen besonderen Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Weiqi Zhang für die freundliche Überlassung des spannenden Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes aussprechen. Ich danke ihm dafür, dass er mich unterstützt, gefördert und gefordert hat. Er gab mir durch intensive begleitende Gespräche immer wieder neue Ideen und Inspirationen, welche maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich bei Herrn Prof. Sven Meuth bedanken.

Mein besonderer Dank geht auch an Ming für seine praktische Hilfestellung bei der Umsetzung meiner Ideen im Labor. Er unterstützte mich stets freundlich, geduldig und uneingeschränkt bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Dissertation. Dankbar anerkennen will ich auch die Bereitschaft mir gegenüber all seine praktischen Erfahrungen in der Elektrophysiologie zu demonstrieren und zu erklären.

Christa und Oliver danke ich für die zahlreichen Diskussionen und Ratschläge, welche mir immer wieder neue Blickwinkel auf meine Arbeit eröffneten.

Kathrin, Henriette, Christiane, Marna und Jens danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die mir geholfen hat die schwierigen Zeiten und zähen Passagen meiner Arbeit zu überstehen. Sie motivierten mich ungemein von Beginn bis zum Ende der Promotion.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Freundin Mascha bedanken, die mir auch während der Anfertigung der Dissertation liebevoll zur Seite standen. Sie sorgten dafür, dass ich zuhause nach getaner Arbeit immer wieder neue Kräfte sammeln konnte.

Curriculum Vitae
