

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

Aus dem Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration

Direktor: Prof. Dr. A. Rolfs

Erythropoetin und die Rolle von Sauerstoff bei der Proliferation und
Differenzierung der humanen mesenzephalen Progenitorzellen ReNcell VM

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von
Anne-Katrin Giese
aus Neustrelitz

Rostock, 22. Juni 2012

Dekan: Prof. Dr. E. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Rolfs, Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration,
Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Wree, Institut für Anatomie, Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. A. Storch, Klinik für Neurologie, Technische Universität
Dresden

Datum der Einreichung: 15.04.2015

Verteidigungsdatum: 23.05.2012

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 22. Juni 2012

Inhaltverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	iv
1 Einleitung.....	1
1.1 Neuronale Stammzellen und neurodegenerative Erkrankungen.....	1
1.2 Hypoxie und das Gehirn.....	4
1.2.1 „Physiologische“ Hypoxie <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	4
1.2.2 Hypoxie-induzierte zelluläre Reaktionen via HIF-1 α	5
1.2.3 „Artifizielle“ Hypoxie in Zellkultur und Tiermodellen.....	7
1.2.4 Hypoxie und Wnt-Signaling.....	9
1.3 Erythropoetin und das Gehirn.....	11
1.3.1 Erythropoetin – ein Gewebe-protectiver Faktor.....	11
1.3.2 Erythropoetin als neuroprotectiver Faktor.....	13
1.3.3 Neuroprotective Derivate von Erythropoetin.....	14
2 Zielsetzung.....	17
3 Material und Methoden.....	18
3.1 Material.....	18
3.1.1 Geräte.....	18
3.1.2 Software.....	19
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	19
3.1.4 Chemikalien.....	19
3.1.4.1 Zellkulturmedium, Pufferlösungen und Wachstumsfaktoren... 20	
3.1.4.2 Pufferlösungen.....	21
3.1.5 Antikörper.....	23
3.1.6 Reaktionskits.....	23
3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Zellkultur.....	24
3.2.1.1 Kultur der ReNcell VM-Zellen.....	24
3.2.1.2 Kultur der HCD-57-Zellen.....	25
3.2.1.3 Kultur der HEK-293-Zellen.....	25
3.2.2 Zellproliferationsassay.....	25
3.2.3 Die Messung der metabolischen Aktivität mit dem WST1-Assay.....	26
3.2.4 Proteinanalyse.....	27
3.2.4.1 Proteinextraktion.....	27

Inhaltsverzeichnis

3.2.4.2	Proteinquantifizierung.....	27
3.2.4.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	27
3.2.4.4	Western Blot.....	28
3.2.4.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	29
3.2.5	Durchflusszytometrie.....	29
3.2.5.1	Zellzyklusanalyse.....	29
3.2.5.2	Antikörperfärbung von neuronalen Proteinen.....	30
3.2.5.3	TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL-Assay).....	30
3.2.6	Luciferase-Reporter-Gen-Assay.....	31
3.2.7	CEPO.....	32
3.2.8	Statistische Analysen.....	32
4	Ergebnisse.....	33
4.1	Expression des Hypoxie-induziblen Faktors 1 α und des Erythropoetin- Rezeptors in hNPZ.....	33
4.1.1	Die HIF-1 α -Expression in hNPZ.....	33
4.1.2	Die EpoR-Expression der hNPZ.....	34
4.2	Keine Alteration der Proliferationsrate der hNPZ nach Exposition mit Hypoxie und EPO-Applikation.....	35
4.2.1	Konstante Verdopplungszeiten von hNPZ nach Exposition mit Hypoxie und EPO-Applikation.....	35
4.2.2	Kontrolle des Proliferationsassays: Wachstum der HCD-57-Zellen....	37
4.3	Anstieg der metabolischen Aktivität der hNPZ nach Exposition mit Hypoxie und EPO-Applikation.....	38
4.3.1	Erhöhte metabolische Aktivität nach einem Tag Differenzierung mit EPO.....	38
4.3.2	Konstante metabolischen Aktivität nach drei Tagen Differenzierung bei Applikation von EPO.....	40
4.3.3	Gesteigerte metabolische Aktivität unter hypoxischen Kulturbedingungen.....	41
4.4	Kein Unterschied im Zellzyklus der hNPZ unter normoxischen und hypoxischen Kulturbedingungen.....	42
4.5	Die Differenzierung der hNPZ.....	44
4.5.1	Versuchsschema zur Untersuchung der Differenzierung.....	44

Inhaltsverzeichnis

4.5.2 Induktion der Neurone durch Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen.....	45
4.5.3 Induktion der β III-Tubulin ⁺ -Neurone durch Proliferation in Hypoxie....	47
4.5.4 Vergleich der Anzahl der Neurone unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.....	48
4.6 Der anti-apoptotische Effekt von Hypoxie und EPO auf differenzierte hNPZ.....	50
4.7 Die β -Catenin-Akkumulation durch EPO und Hypoxie bei hNPZ.....	52
4.8 Induktion der TCF-Aktivität nach Applikation von EPO.....	53
4.9 CEPO – ein neuroprotektives Erythropoetin.....	54
4.9.1 Konstante Proliferationsrate von hNPZ nach Exposition mit CEPO.....	54
4.9.2 Konstante metabolische Aktivität der hNPZ nach Applikation von CEPO.....	56
4.9.3 Kombination von Hypoxie und CEPO erhält die neuronale Differenzierung der hNPZ.....	57
5 Diskussion.....	60
5.1 Expression von HIF-1 α und EPO-Rezeptor bei Hypoxie und EPO.....	60
5.2 Proliferation von hNPZ mit Hypoxie und EPO.....	62
5.3 Erhöhte Differenzierung durch Hypoxie.....	63
5.4 EPO als GSK-Inhibitor bei hNPZ.....	69
5.5 Neuroprotektive Eigenschaften von CEPO <i>in vitro</i>	71
5.6 Neuroprotektion durch Hypoxie, EPO und CEPO <i>in vivo</i>	72
6 Zusammenfassung.....	75
7 Thesen.....	77
8 Literaturverzeichnis.....	79
9 Anhang.....	I

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
APC	<i>Adenomatous-polyposis-coli-proteine</i> (Adenomatöse polyposis coli-Protein)
bcl	<i>B-cell lymphoma 9-proteine</i> (B-Zell-Lymphom-9-Protein)
BDNF	<i>bone marrow derived growth factor</i> (vom Knochenmark abstammender Wachstumsfaktor)
BSA	bovines Serumalbumin
CEPO	carbamyliertes Erythropoetin
CK	Casein Kinase
CMYC	c-myc
CXCR	<i>CXC chemokine receptor</i> (Chemokinrezeptor mit CXC-Motiv)
d	Tag(e)
D	Differenzierung
DAPI	4', 6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (nach Dulbecco modifiziertes Eagle-Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dsh	<i>Dishevelled</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	<i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i> (Enzymgekoppelter Immunoabsorbenz-Assay)
EPO	Erythropoetin
et al.	<i>et alii</i>
FCS	fetales Kalbsserum

Abkürzungsverzeichnis

FGF	<i>fibroblast growth factor</i> (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FIH	<i>Factor inhibiting HIF-1</i> (HIF-1 inhibierender Faktor)
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreuung)
Fz	<i>frizzled</i>
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase
h	human, Stunde(n)
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i> (Salzlösung, balanciert nach Hanks)
HIF	Hypoxie-induzibler Faktor
hrEPO	humanes rekombinantes Erythropoetin
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
k	Kilo
l	Liter
LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i> (Lymphozyten-fördernder Faktor)
m	Milli, Maus
min	Minute
MAP	mitogen aktiviertes Protein
MAPK	MAP-Kinase
N	Nano
Na	Natrium
NPZ	Neurale Progenitorzellen
Nrp	Neuropilin
OD	Optische Dichte
P	Proliferation
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCP	<i>planar cell polarity</i> (planare Zellpolarität)

Abkürzungsverzeichnis

PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> (von Thrombozyten abgeleiteter Wachstumsfaktor)
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
pVHL	von Hippel-Lindau-Protein
rpm	Rotationen pro Minute
s.	siehe
SDF	<i>stromal cell derived factor</i> (von Stromazellen abgeleiteter Faktor)
SDS	<i>sodium dodecylsulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEM	<i>standard error of mean</i> (Standardfehler)
SSC	<i>sideward scatter</i> (Seitwärtsstreuung)
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i> (Signalüberträger und Aktivator der Transkription)
SVZ	subventrikuläre Zone
Tab.	Tabelle
TCF	<i>T-cell enhanced factor</i> (T-Zell fördernder Faktor)
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-) aminomethan
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Neuronale Stammzellen und neurodegenerative Erkrankungen

Stammzellen sind der Ausgangspunkt eines jeden mehrzelligen Organismus und sind durch ihre Fähigkeiten, sich ständig durch Zellteilung zu erneuern, sowie zur Differenzierung in spezialisierte Zelltypen charakterisiert. Die befruchtete Eizelle ist bis vier Zellteilungen lang totipotent, was bedeutet, dass sie potentiell dazu fähig ist, jeden Zelltyp des Körpers zu generieren. Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen, die in der Lage sind, bis auf die Trophoblasten der Plazenta, alle somatischen Zelltypen eines Organismus zu bilden. Aus den pluripotenten Stammzellen des Embryoblasten entstehen im Laufe der Entwicklung drei Keimblätter, das *Ektoderm*, *Mesoderm* und *Entoderm*, aus denen dann Gewebe-spezifische multipotente Stammzellen hervorgehen, die wiederum die somatischen Zellen des Körpers hervorbringen (Goh et al., 2003).

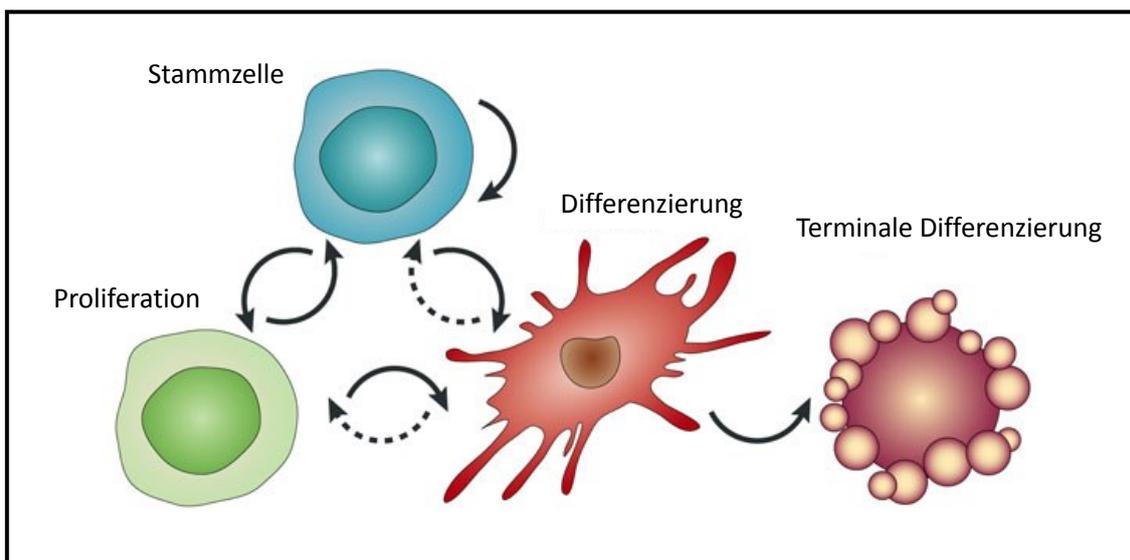


Abb. 1.1: Proliferation und Differenzierung. Bei der Proliferation erfolgt eine symmetrische Zellteilung und die Zellen sind in der Lage, sich selbst zu erneuern, während durch eine asymmetrische Zellteilung differenzierte Zellen entstehen, die dann weiter differenzieren können (s. schwarze Pfeile). Unter bestimmten Umständen können differenzierte Zellen in ihren proliferierenden oder multipotenten Stammzellstatus zurückgeführt werden (s. gestrichelte Pfeile) (adaptiert nach Zipori, 2004).

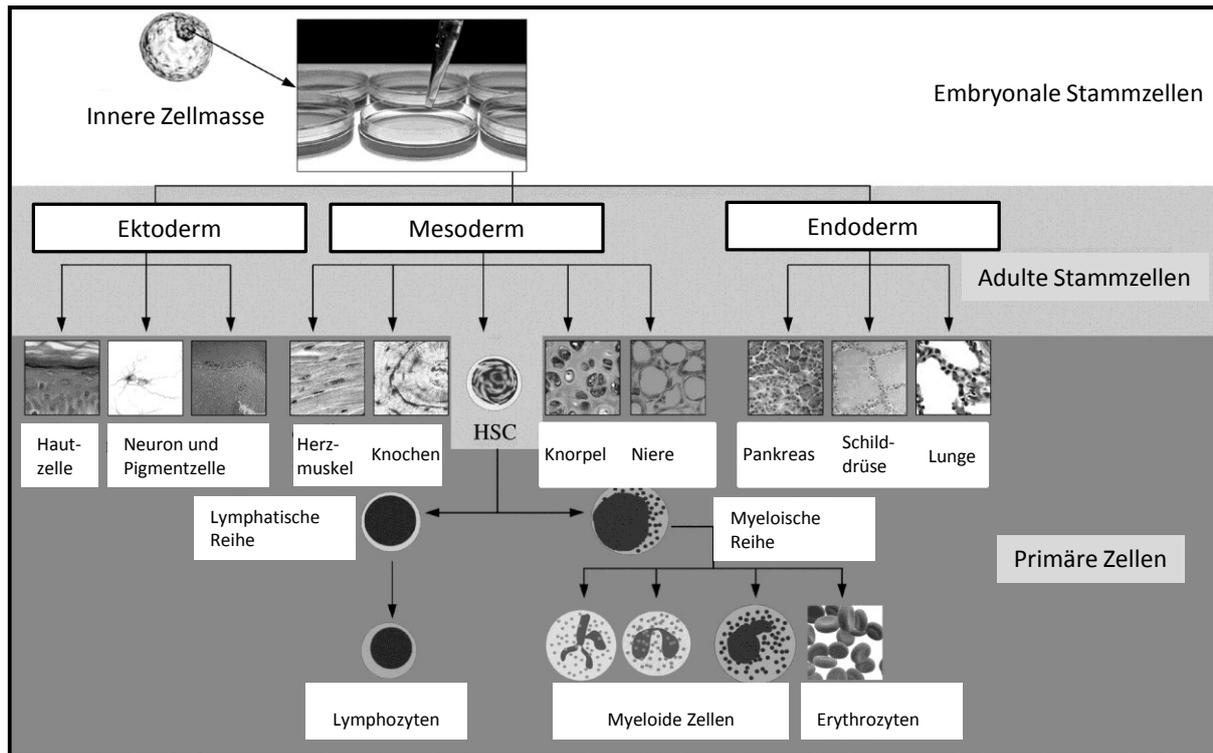


Abb. 1.2: Stammzellgenese. Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse der *Blastozyste* isoliert. Aus diesen embryonalen Stammzellen können die adulten Stammzellen der drei Keimblätter (*Ektoderm*, *Mesoderm*, *Endoderm*) gezüchtet werden, die wiederum zu spezifischen Primärzellen differenzieren können (adaptiert nach Placzek et al., 2009).

Im *Neuroektoderm* entstehen aus den neuronalen Stammzellen drei Zellreihen: Neurone, Astroglia und Oligodendrozyten (McKay et al., 2004). Es wurde lange angenommen, dass die Neurogenese mit der Geburt abgeschlossen sei und Neurone zu den permanent postmitotischen Geweben gehören und somit bei akuten oder chronischen Hirnschäden keinerlei Regeneration möglich sei (Rakic et al., 1985; Schwab, 1996; Qiu et al., 2000). Anders verhält es sich mit labilen Geweben wie dem lymphatischen oder hämatopoetischen System, der Haut oder den Schleimhäuten im Respirations- und Gastrointestinaltrakt, die eine hohe regenerative Potenz besitzen und Schäden sehr gut kompensieren können (Anderson et al., 2001; Blau et al., 2001).

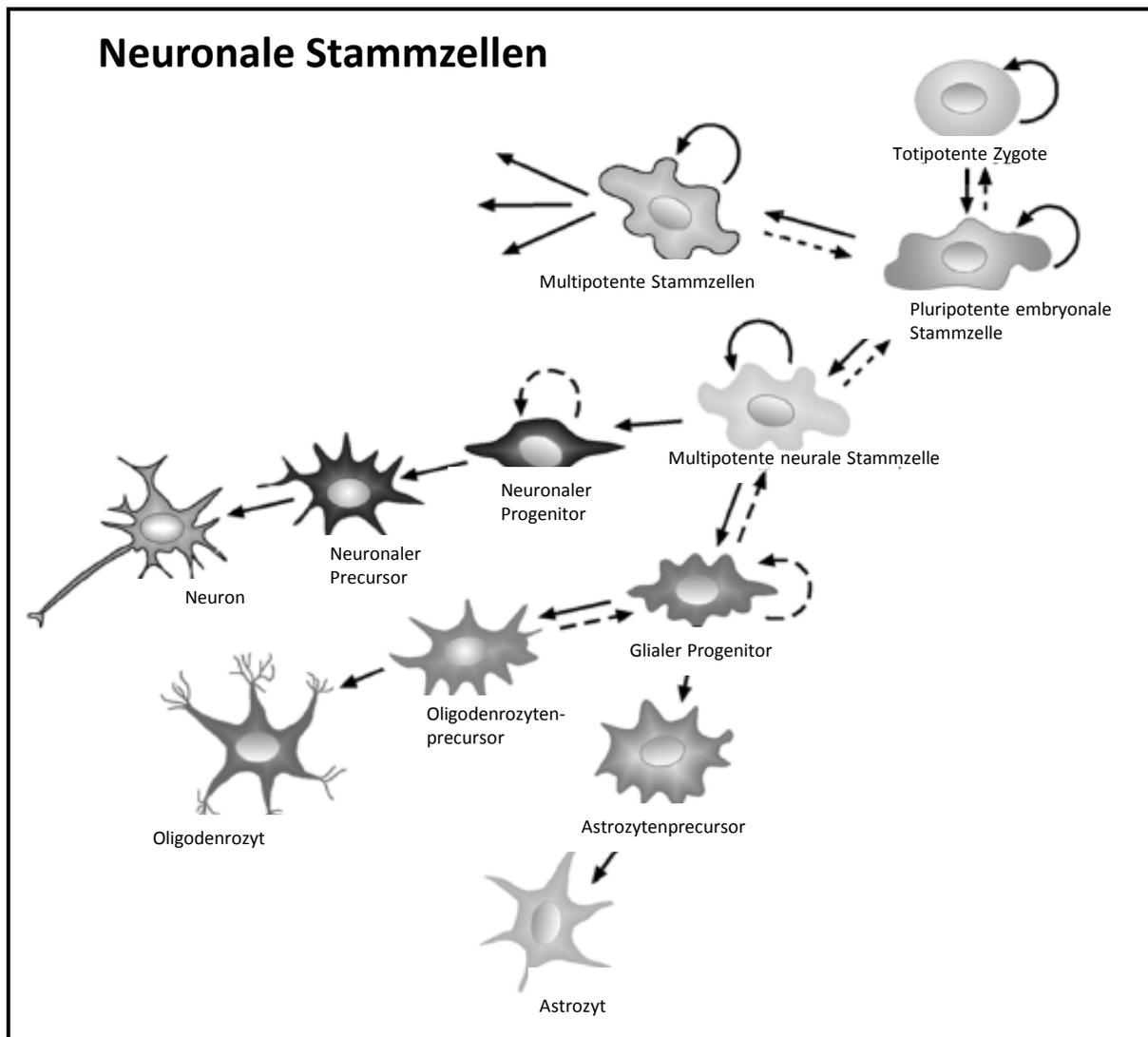


Abb. 1.3: Entstehung der NPZ aus pluripotenten embryonalen Stammzellen. Die multipotente neurale Stammzelle kann entweder zu neuronalen Progenitorzellen oder in gliale Progenitorzellen (und später zu Oligodendrozyten und Astrozyten) differenzieren. Potentiell reversible Prozesse sind durch getrichelte Pfeile markiert (adaptiert nach Sakaguchi et al., 2005).

Es konnten jedoch neurogene Areale, wie die *subventrikuläre Zone* und die *subgranuläre Zone* des *Gyrus dentatus* im *Hippocampus*, im adulten Zentralnervensystem (ZNS) nachgewiesen werden (Madri et al., 2009). Dies gab Anlass zu Spekulationen sowohl über Zellersatztherapien bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Huntington oder Multiple Sklerose (Guzman, 2009, Santilli et al., 2010) als auch bei akuten Ereignissen wie Schlaganfall (Pendharkar et al., 2010).

Für Zellersatztherapien im ZNS werden verschiedene Herangehensweisen diskutiert. So wird zum einen der direkte Ersatz von Zellen über eine Transplantation erwogen (Pendharkar et

Einleitung

al., 2010), zum anderen können die transplantierten Zellen auch als Vehikel für die Genterapie neurodegenerativer Krankheiten genutzt werden (Storch et al., 2004). Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Umgestaltung der bereits genannten neurogenen Zonen und eine Amplifikation der intrinsischen Stammzellressourcen (Chopp et al., 2008), zum Beispiel durch die Anwendung neurotrophischer (Im et al., 2010) oder neuroprotektiver (Brines et al., 2010) Substanzen.

Für *in vitro*-Studien und Transplantationsexperimente kommen entweder primäre Zellkulturen oder mittels transduziertem Onkogen immortalisierte Zelllinien in Frage. Während bei der Primärkultur die Verfügbarkeit der Zellen problematisch ist (Palmer et al., 2001), kann bei immortalisierten Zelllinien die Transduktion zu Veränderungen im Verhalten der Zellen führen. Der Vorteil einer immortalisierten Zelllinie ist jedoch, dass die genotypisch und phänotypisch stabil ist und somit eine standardisierte Zellkultur mit einer stabilen Anzahl von Neuronen ermöglicht (Lee et al., 2007).

Es wurden mehrere neuronale Zelllinien in der Literatur beschrieben, unter anderem C17.2 aus murinem Kleinhirn (Ryder et al., 1990); die humane Zelllinie H6 aus 15 Wochen alten Telencephalon (Flax et al., 1998); Mes2 aus dem ventralen Mittelhirn eines 8 Wochen alten humanen Fötus (Lotharius et al., 2002) sowie ReNcell VM-Zellen, die aus dem ventralen Mittelhirn eines 10 Wochen alten Fötus isoliert wurde (Donato et al., 2007) und hier für die Experimente verwendet wurde.

ReNcell VM-Zellen proliferieren in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) und *Epidermal Growth Factor* (EGF) und beginnen mit der Differenzierung bei Wachstumsfaktorentzug (Hoffrogge et al., 2006, Morgan et al., 2009, Schmöle et al., 2010). Ein großer Vorteil der ReNcell VM-Zellen ist ihre hohe proliferative Potenz und ihre schnelle Differenzierung. Eine Limitation dieses Modells ist jedoch die fehlende Anwendbarkeit für Transplantationsstudien, da diese Zellen durch eine Transfektion mit v-myc immortalisiert worden sind. Dennoch lassen sich durch dieses Modell wichtige Erkenntnisse für die Proliferation und Differenzierung von hNPZ gewinnen, die sich dann auch auf Transplantationsmodelle anwenden lassen.

1.2 Hypoxie und das Gehirn

1.2.1 „Physiologische“ Hypoxie *in vivo* und *in vitro*

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Protokollen etabliert, die die Differenzierung induzieren, wobei die Zellen generell mit einem Umgebungssauerstofflevel von 20% kultiviert werden (Donato et al., 2007). Dabei sind innerhalb des adulten Gehirns die Sauerstofflevel wesentlich geringer und variieren je nach Hirnregion zwischen 1% und 5% Sauerstoff – 2,5 – 5,3% in der grauen Substanz, 0,8-2,1% in der weißen Substanz, 1,4-2,1% im *Hypothalamus*, 2,6-3,9% im *Hippocampus* und am niedrigsten mit 0,1-0,8% in *Pons* und *Fornix* (Zhu et al., 2005).

Auch während der embryonalen Entwicklung ist Hypoxie dominierend, da während des ersten Trimesters die Vaskularisation des Gewebes noch nicht sehr ausgeprägt ist (Caniggia et al., 2000). Daher erlangte der Umgebungssauerstoffgehalt an Bedeutung, wenn es um die Optimierung der Zellkultur spezifischer Zelltypen und den Einfluss von Hypoxie auf das Wachstum und die Differenzierung der Stammzellen geht und die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen studiert werden (Zhao et al., 2008).

“Hypoxie” bezeichnet einen Sauerstoffgehalt unterhalb des normalen Sauerstoffgehaltes der der Atmosphäre von 20% O₂. De Fillipis et al. (2011) definierten verschiedene Abstufungen der Hypoxie und unterteilten diese in „milde“ (2,5-5% O₂) und „schwere“ Hypoxie (< 1% O₂). Einige Autoren wie Fan et al. (2009) sprechen bei „milder“ Hypoxie auch von „physiologischer“ Hypoxie, da der Sauerstoffgehalt im ZNS zwischen 1-5% O₂ schwankt. Diese Einteilung beruht auf der Beobachtung, dass Hypoxie in neuronalem Gewebe nur in bestimmten Grenzen toleriert wird und eine „schwere“ Hypoxie zur Apoptose führt (Acker T. und Acker H., 2004).

Dahingegen fördert “milde” Hypoxie die Fähigkeit embryonaler Stammzellen sich selbst zu erneuern (Millman et al., 2009) und ist eine entscheidende Komponente innerhalb der Stammzellnischen unseres Organismus. So findet sich nicht nur in der neuralen Stammzellnische (1-8% O₂) ein niedriger Sauerstoffgehalt, sondern auch in der mesenchymalen (2-8% O₂) und hämatopoetischen (1-6% O₂) Stammzellnische (Moyheldin et al., 2010).

1.2.2 Hypoxie-induzierte zelluläre Reaktionen via HIF-1 α

Hypoxie induziert im Gewebe eine Reihe verschiedenster zytoprotektiver Reaktionen, indem sie die Neurogenese und Angiogenese fördert und anti-inflammatorisch wirkt (De Fillipis et al., 2011). Eine Schlüsselrolle bei diesen zellulären Antworten hat der Hypoxie-induzierbare-Faktor (HIF) (Zhao et al., 2008). HIF ist ein dimerer Transkriptionsfaktor mit 3 Isoformen, der aus einer Sauerstoff-labilen α -Untereinheit und einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit besteht (Semenza et al., 2000). Von den drei Isoformen ist die HIF-1 α -Untereinheit am wichtigsten und auch am besten untersucht (Zhang et al., 2006).

Die HIF-1 α -Untereinheit ist Substrat des Enzyms Prolyl-4-Hydroxylase, das Sauerstoff als Ko-Faktor benötigt. So werden zwei Prolin-Reste in Position 402 und 564 im HIF-1 α -Protein hydroxyliert und können vom von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) gebunden werden und über eine E3-Ubiquitin-Ligase nach Polyubiquitinylierung der proteasomalen Degradierung zugeführt werden (Salceda et al., 1996; Pacary et al., 2006).

Hypoxie inhibiert diesen Prozess, da der Ko-Faktor für die Prolyl-4-Hydroxylase fehlt. Somit wird HIF-1 α stabilisiert und kann an HIF-1 β binden und in den Nukleus translozieren, um dort nach Bindung an das Hypoxie-responsible Element (HRE) über 60 verschiedene Gene zu aktivieren (Huang et al., 1998). Zu den durch Hypoxie regulierten Prozessen gehören die Glykolyse, Angiogenese, der Zellzyklus und die Erythropoese (Zhao et al., 2008). Unter anderem werden EPO, VEGF, PDGF-b, bFGF, bcl-2 (Zhu et al., 2005), BDNF und FGF-2 (Kokaia and Lindvall, 2003) über HIF-1 α induziert.

Diese physiologische Reaktion auf niedrige Sauerstoffkonzentrationen spielt eine zentrale Rolle für die Regulation der neuronalen Stammzellen und ist essentiell für eine normale Architektur des ZNS (Panchision et al., 2009). So führt ein Mangel an HIF-1 α zu einer Beeinträchtigung der Bildung des *Mesenzephalons* (Milosevic et al., 2007). Der Sauerstoffgehalt der Umgebung kann HIF-1 α -abhängig die Expression von Pluripotenzgenen regulieren, so dass wichtige Stammzellmarker wie Oct4, nanog und Sox2 bei Hypoxie vermehrt exprimiert werden (Szablowska-Gadomska et al., 2011). Auf diese Art und Weise ist Hypoxie direkt an der Gestaltung der neurovaskulären Nische beteiligt. Eine Optimierung der Expression nachgeschalteter durch HIF-1 α aktivierter Faktoren wie Nrp-1, CXCR4 und SDF-1 die Regenerationsfähigkeit des neuronalen Gewebes zu maximieren (Madri, 2009).

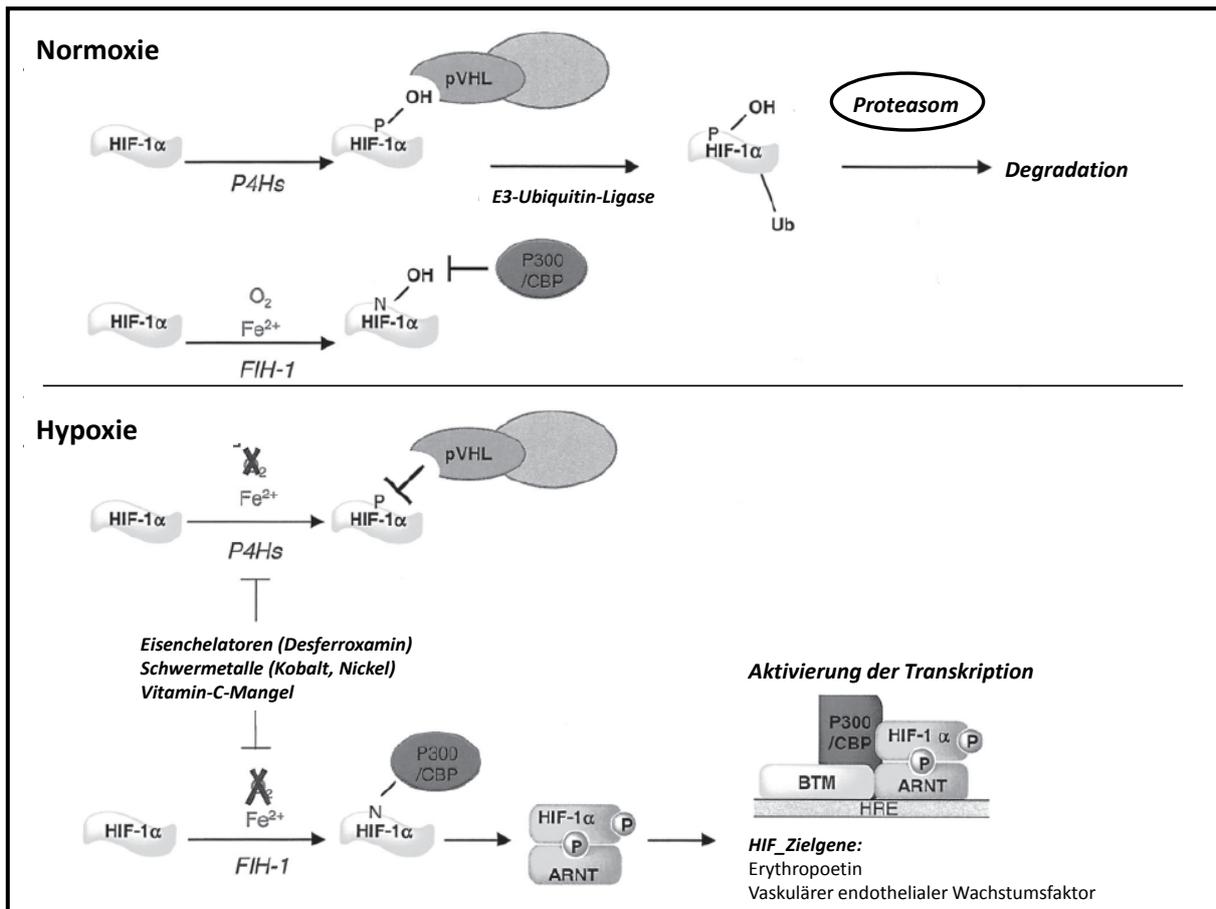


Abb. 1.4: HIF-1 α -Signalweg. Bei Normoxie wird HIF-1 α kontinuierlich an pVHL gebunden und durch Ubiquitinylierung der proteasomalen Degradation zugeführt. Der HIF-1 inhibierende Faktor (FIH) verhindert eine Bindung von HIF-1 an dem Hypoxie-responsiven Element und verringert somit die Aktivierung von Zielgenen der Hypoxie. Fehlt jedoch der Sauerstoff für die Bindung an pVHL oder die Reaktion mit dem FIH, wird HIF-1 α stabilisiert und zusammen mit HIF-1 β (ARNT) in den Nucleus transloziert und kann dort die Zielgene der Hypoxie aktivieren (adaptiert nach Pacary et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Hypoxie vielfältige, Zell- und Gewebe-typische Reaktionen auslöst, die bis jetzt noch nicht komplett verstanden und vor allem von dem Schweregrad der Hypoxie abhängig sind (Fan et al., 2009). Wichtiger Bestandteil ist jedoch die Regulation der Proliferation und Differenzierung von neuronalen Progenitorzellen, wobei bei murinen neuronalen Progenitorzellen die Neurogenese durch Hypoxie induziert werden konnte (Studer et al., 2000; Shingo et al., 2001).

1.2.3 „Artifizielle“ Hypoxie in Zellkultur und Tiermodellen

Die oben beschriebenen von HIF-1 α -vermittelten Prozesse werden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eingesetzt, um die Neurogenese von neuronalen Stammzellen zusätzlich zu induzieren und Zellen vor Apoptose zu schützen.

Dafür werden die Hypoxie-gesteuerten Effekte auf die Proliferation und Differenzierung von neuronalen Stammzellen genutzt. Es wurde bereits in einigen *in vitro* Systemen, wie bei *mesenzephalen* Rattenzellkulturen, beschrieben, dass Hypoxie die neuronale Differenzierung fördert (Zhang et al., 2006). Zu ähnlichen Resultaten führte die Überexpression von HIF-1 α bei Normoxie (Zhao et al., 2008), was noch einmal die Rolle von HIF-1 α bei der Induktion von Neuronen durch Hypoxie unterstreicht (Xie et al., 2005).

Studer et al. (2000) berichteten über eine erhöhte Anzahl von neuronalen Zellen und zeigten trophische und proliferative Effekte von erniedrigtem Sauerstoff in neuralen Ratten-Vorläuferzellen. Auch bei primären neuronalen Maus-Stammzellen konnte Hypoxie sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung in Neurone steigern (Horie et al., 2008), allerdings trat auch ein vermehrter Zelltod auf – ein weiterer Indikator für die Zell- und Gewebe-spezifischen Reaktion auf Hypoxie.

Auch *in vitro* werden die neuroprotektiven Effekte von Hypoxie genutzt. Murine neuronale Stammzellen, die vor einer Transplantation Hypoxie ausgesetzt waren, zeigten ein besseres Überleben als jene ohne hypoxische Präkonditionierung (Theus et al., 2008), so dass dies die therapeutische Effektivität einer Stammzelltransplantation entscheidend verbessern könnte.

Nicht nur bei Stammzelltransplantationen kann Hypoxie eine Rolle spielen, sondern auch bei der Rekrutierung endogener neuronaler Stammzellen nach Neurodegeneration. So berichteten Santilli et al. (2010) von einer durch milde Hypoxie (2,5% und 5% O₂) verbesserten Proliferation und Multipotenz humaner neuronaler Progenitorzellen (hNPZ), während schwere Hypoxie (1% O₂) eine erhöhte Apoptoserate nach sich zog.

Dies führte zu Spekulationen über die Rolle von Hypoxie bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Multipler Sklerose sowie bei akuten Hirnschäden wie einem Schlaganfall, einer Hirnblutung oder einer traumatischen Hirnverletzung (Santilli et al., 2010). Bereits 2001 berichteten Yagita et al. von einer erhöhten

Einleitung

Neurogenese im *Hippocampus* in einem Rattenmodell des Schlaganfalls, allerdings nur in jungen Ratten. Nakatomi et al. (2002) waren die ersten, die die Regeneration von *hippocampalen Pyramidenneuronen* in adulten Ratten nach einer globalen Ischämie beschrieben und die endogene Rekrutierung von neuronalen Stammzellen nachweisen konnten.

So kann milde Hypoxie im geschädigten Gewebe ruhende endogene neuronale Stammzellen aktivieren und in das Gewebe integrieren (Zádori et al., 2011). Diese endogenen Zellen können Ansatzpunkt für eine Therapie mit neuroprotektiven oder neurotrophen Substanzen sein, die es dann ermöglichen, die regenerativen Fähigkeiten des neuronalen Gewebes weiter zu aktivieren (Sims et al., 2009).

Dementsprechend erhöhen *in vivo* globale und fokale Ischämie die Proliferation und neuronale Differenzierung von Nervenzellen in der *Subventrikulärzone* (Arvidsson et al., 2002) und in der *Subgranulärzone* des *Gyrus dentatus* (Kee et al., 2001, Yagita et al., 2001).

1.2.4 Hypoxie und der Wnt-Signalweg

Es bleibt dennoch die Frage, wie Hypoxie dazu in der Lage ist, über HIF-1 α die Proliferation und Differenzierung von neuronalen Stammzellen zu lenken. Eine mögliche Antwort auf diese Frage kann der Wnt-Signalweg liefern (Zhang et al., 2011).

Der Wnt-Signalweg ist in die Proliferation, Differenzierung, den Zelltod und die morphologische Umgestaltung von Axonwachstum, Synapsenbildung und Dendritenentwicklung involviert (Freese et al., 2010). Wenn ein Wnt-Ligand an einen Frizzled (Fz-)-Rezeptor bindet, wird einer der drei Wnt-Signalwege aktiviert.

1. Wnt/ β -catenin-Signalweg (kanonischer Signalweg)
2. Planar-Cell-Polarity (PCP)-Signalweg
3. Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg

Bei dem kanonischen Signalweg spielt β -Catenin eine zentrale Rolle. Es wird konstitutiv exprimiert und durch einen, aus GSK-3 β , APC, Axin und CK1 bestehenden Degradationskomplex phosphoryliert und anschließend über die E3-Ubiquitin-Ligase-Einheit polyubiquitinyliert und dem proteasomalen Abbau zugeführt (Caspi et al., 2008). Aktiviert jedoch ein Wnt-Ligand einen Fz-Rezeptor, führt dies zu einer Stabilisierung des zytosomalen

Einleitung

β -Catenins und dessen Translokation in den *Nucleus* (Novak und Dedhar, 1999). Dort bindet β -Catenin an TCF (*T-cell factor*) und LEF (*lymphoid enhancer binding factor*) und verdrängt den Repressor *Groucho*. Anschließend werden über Deazetylierung von Histonen, Chromatinverdichtung und Einbeziehung von Co-Aktivatoren, wie bcl, die Transkription von Wnt-Zielgene aktiviert (Coombs et al., 2008).

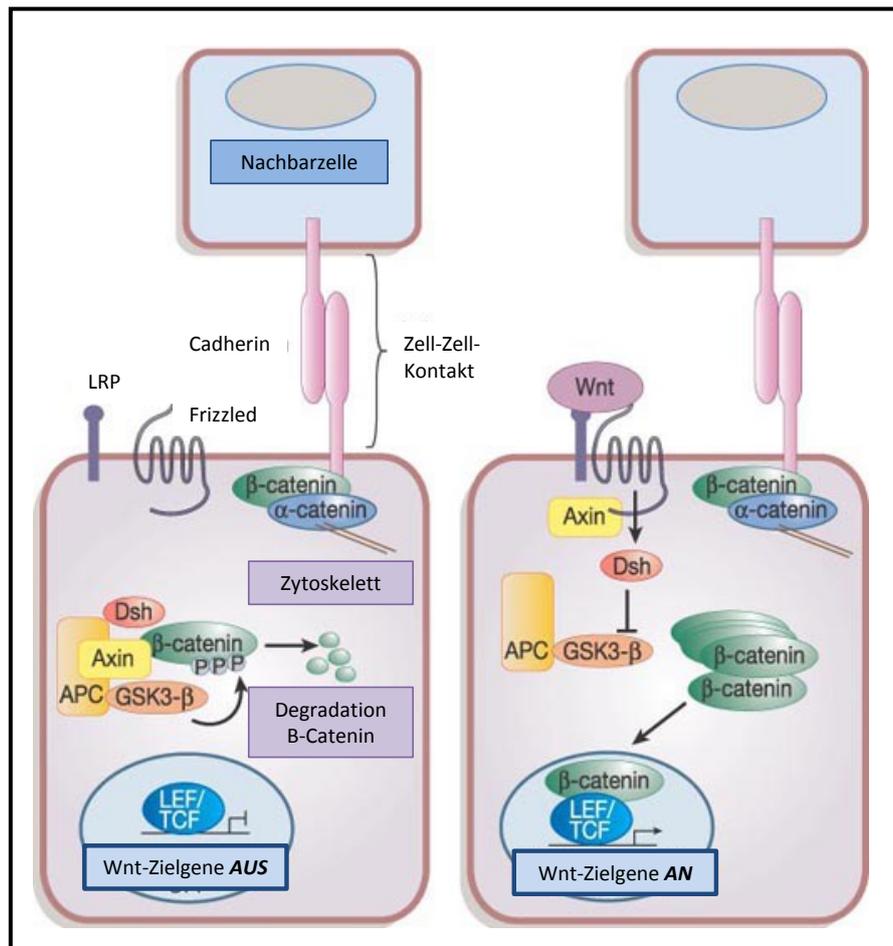


Abb. 1.5: Der kanonische Wnt-Signalweg. Unter normalen Bedingungen wird β -Catenin kontinuierlich durch einen Degradationskomplex aus GSK-3 β , APC, Axin und Dsh abgebaut. Bindet jedoch ein Wnt-Ligand an einen Fz-Rezeptor inhibiert dies die Anordnung des Degradationskomplexes, β -Catenin wird stabilisiert und in den Nucleus transloziert, wo es die Wnt-Zielgene aktiviert (adaptiert nach Reya und Clevers, 2005).

Der PCP- und der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg werden gemeinsam als “nicht-kanonischer” Signalweg bezeichnet, beide führen nach Aktivierung des Fz-Rezeptors durch einen Wnt-Liganden zu intrazellulären, β -Catenin-unabhängigen Reaktionen. Während der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg über einen G-Protein-gekoppelten second messenger intrazelluläres Calcium

Einleitung

mobilisiert (Sugimura und Li, 2010), wird beim PCP-Signalweg über eine Rho-GTPase und JNK eine kurzfristige Reorganisation des Zytoskeletts induziert (Wansleben et al., 2011).

Für die Hypoxie-induzierten Veränderungen in hNPZ ist der kanonische Signalweg von besonderer Bedeutung. HIF-1 α kann den Wnt/ β -Catenin-Signalweg unterstützen, in dem es die β -Catenin-Aktivierung steigert und die Expression von LEF und TCF in neuronalen Stammzellen fördert. Eine Deletion von HIF-1 α führt zu einer Behinderung von Wnt-abhängigen Prozessen wie der Proliferation und Differenzierung (Mazumdar et al., 2010).

GSK-3 β spielt eine essentielle Rolle in der Degradation von β -Catenin und damit in der Regulierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Daher sind GSK-Inhibitoren von besonderem Interesse, da mit ihrer Hilfe der kanonische Signalweg und somit die Proliferation und Differenzierung moduliert werden kann (Schmöle et al., 2010). So ein GSK-Inhibitor ist auch Erythropoetin, das gleichzeitig durch HIF-1 α reguliert wird (Li et al., 2004).

1.3 Erythropoetin und das Gehirn

1.3.1 Erythropoetin – ein Gewebe-protektiver Faktor

Erythropoetin (EPO) gehört zur Klasse I der Zytokin-Superfamilie (Chen et al., 2006) und ist klassischerweise dafür bekannt die Erythropoese sauerstoffabhängig zu regulieren (Liu et al., 2006). Es ist ein aus 165 Aminosäuren bestehendes globuläres Glykoprotein-Hormon mit vier α -Helices und wird auf Chromosom 7 mit einer einzelnen Kopie verschlüsselt und hat ein Molekulargewicht von 30,4 kDa. Die Aktivität des Hormons wird durch vier glykosylierte Seitenketten bestimmt (Maiese et al., 2005). EPO wird in der fetalen Leber und der adulten Niere gebildet (Zanjani et al., 1977, Dame et al., 1998).

Der EPO-Rezeptor besteht aus 508 Aminosäuren und besitzt eine extrazelluläre Domäne, eine einzelne Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre Domäne und ist als homodimerer Rezeptor angeordnet (Noguchi et al., 1991).

Nach Bindung von EPO an seinen Rezeptor dimerisiert dieser und assoziiert sich mit JAK2, was zu einer Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des EpoR und zur Aktivierung verschiedenster Signalwege wie PI-3K/Akt, MAP/MAPK und STAT5 führt. Anschließend wird der Rezeptor internalisiert und degradiert (Chen et al., 2006).

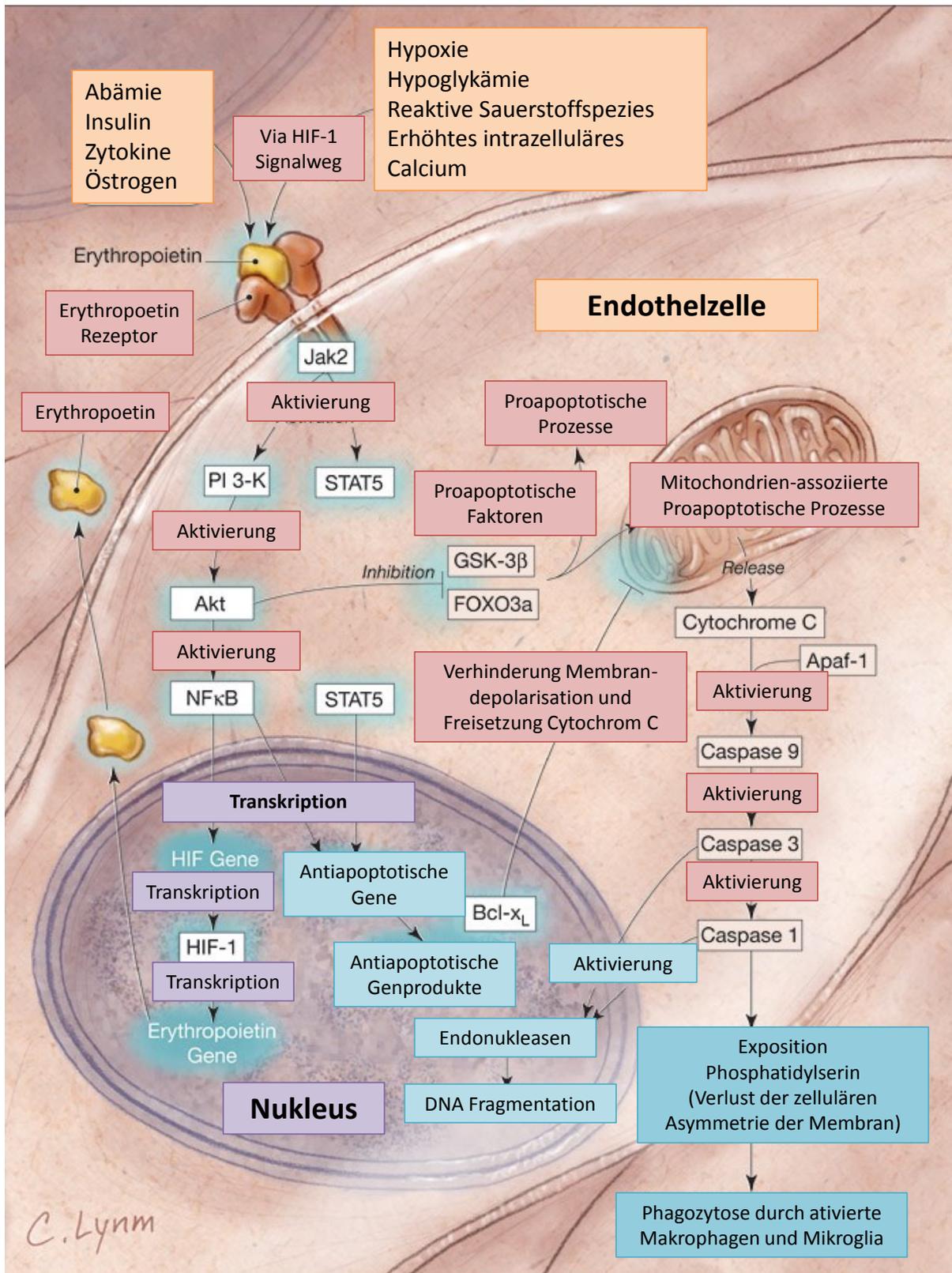


Abb. 1.6: EPO-Signalweg. Nach Aktivierung des EPO-Rezeptors durch EPO, HIF oder andere Stimuli erfolgt die intrazelluläre Aktivierung verschiedener Signalwege. Von besonderem Interesse sind die Aktivierung der HIF-1-Transkription, die aktivierten anti-apoptischen Prozesse und die Inhibition von GSK-3β (adaptiert nach Maiese et al., 2005).

Einleitung

Masuda et al. (1993) konnten erstmalig nachweisen, dass der EpoR nicht nur auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, sondern auch auf neuronalem Gewebe.

In den darauffolgenden Jahren wurden EPO und sein Rezeptor auf verschiedensten Geweben nachgewiesen. Es fand sich eine lokale EPO-Produktion im *Hippocampus*, der *Capsula interna*, dem *Cortex* und dem *Mesenzephalon*. Der EpoR wurde auf Neuronen, Astrozyten und Mikroglia gefunden (Maiese et al., 2005, Arcasoy et al., 2008), wobei neuronale Stammzellen höhere Level an EPO-Rezeptor aufweisen als differenzierte Neurone (Chen et al., 2007).

Auch in anderen Geweben wie dem Herz (Wu et al., 1999), der Niere (Westenfelder et al., 1999) und der Retina (Grimm et al., 2002) konnte der EPO-Rezeptor nachgewiesen werden.

EPO zeigte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Modellen für schwere Hypoxie neuroprotektive und neuroregenerative Eigenschaften, in dem es anti-apoptotisch und anti-inflammatorisch wirkt (van der Kooij et al., 2008).

Dies gab Anlass dazu, EPO nicht länger als reines hämatopoetisches Hormon sondern als pleiotropes, Gewebe-protectives Zytokin anzusehen (Savino und Ciliberto, 2004), dass auch die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann (Brines et al., 2004).

1.3.2 Erythropoetin als neuroprotektiver Faktor

EPO ist nicht nur wichtig bei der Neuroprotektion und Neuroregeneration gefährdeter beziehungsweise bereits geschädigter Nervenzellen (Demers et al., 2005), sondern ist auch für die normale Proliferation und Aufrechterhaltung der neuronalen Stammzellen (Chen et al., 2007) und Entwicklung des ZNS notwendig (Yu et al., 2002). Somit könnte EPO zusätzlich zu Wachstumsfaktoren in der Zellkultur supplementiert werden, um die Differenzierung zu induzieren oder zu verstärken.

Da EPO durch Hypoxie induziert wird, haben sowohl Studer et al. (2000) als auch Shingo et al. (2001) versucht, die durch Hypoxie in embryonalen Rattenzellen verursachten Veränderungen der Proliferation und Differenzierung mit EPO bei Normoxie zu imitieren.

Diese potentiell neuroprotektiven Eigenschaften (Rabie und Marti, 2008) wurden in einer Reihe verschiedenster Krankheitsmodelle getestet, darunter unter anderem: zerebrale Ischämie (Bernaudin et al., 1999, Osredkar et al., 2010), Multiple Sklerose (Ehrenreich et al.,

Einleitung

2007), Schizophrenie (Ehrenreich et al., 2004), intrazerebrale Blutung (Grasso et al., 2009, Seyfried et al., 2009), retinale Degeneration (Grimm et al., 2004), Schädel-Hirn-Trauma (Shein et al., 2008, Xiong et al., 2010) und Morbus Parkinson (Xue et al., 2007).

Allerdings ist bis jetzt noch nicht genau geklärt, wie EPO *in vivo* auf das ZNS wirkt. Es könnte über eine vermehrte Erythropoese eine besseren Sauerstoff- und Eisenversorgung des ZNS induzieren. Genauso denkbar wäre eine direkte anti-apoptotische Wirkung von EPO auf die Neurone oder eine Änderung des Mikromilieus über die Wirkung von EPO auf Astroglia oder Blutgefäße (Brines und Cerami, 2005, Ghezzi und Brines, 2004).

Am vielversprechendsten schien die Therapie der akuten zerebralen Ischämie mit EPO (Sirén et al., 2009). Eine Meta-Analyse von 16 Tierstudien über die Therapie von Schlaganfällen mit EPO bestätigte die Effizienz von EPO (Minnerup et al., 2009). Jedoch konnte eine multi-zentrische EPO-Studie bei Schlaganfallpatienten diese Erwartungen nicht erfüllen, es gab im Gegenteil sogar häufiger tödliche Komplikationen als in der Kontrollgruppe (Ehrenreich et al., 2009). Obwohl eine genaue Ursache nicht eruiert werden konnte, können unter anderem Multimorbidität und die Kombination von thrombolytischen Medikamenten mit EPO dies verursacht haben.

Die Studie von Ehrenreich et al. (2009) unterstreicht den großen Nachteil der *in vivo*-Applikation von EPO – nämlich seine primär erythropoetischen Eigenschaften, die gleichzeitig Nebenwirkungen wie hypertensive Entgleisung, Thromboembolie, die Formation von Antikörpern gegen EPO mit konsekutiver isolierter aplastischer Anämie (Maiese et al., 2004) hervorruft.

Daher sind nicht-erythropoetische, neuroprotektive EPO-Derivate wünschenswert, da diese möglichst die protektiven und anti-apoptotischen Eigenschaften von EPO behalten sollten, jedoch ohne die hämatopoetischen Nebenwirkungen (Brines et al., 2008).

1.3.3 Neuroprotektive Derivate von Erythropoetin

Es gibt verschiedene Ansätze nicht-erythropoetische, neuroprotektive Derivate von EPO zu konstruieren, dazu gehören synthetische Substanzen, die von der Tertiärstruktur von EPO

Einleitung

hergeleitet sind, aber auch chemisch veränderte EPO-Substanzen wie Asialo-EPO (Wang et al., 2004) und CEPO (Leist et al., 2004).

Asialo-EPO ist ein neuroprotektives EPO-Derivat, das durch die totale enzymatische Desialysierung von humanem rekombinanten EPO entstanden ist. Durch die Desialysierung hat Asialo-EPO eine sehr kurze Plasma-Halbwertszeit – so kurz, dass die Hämatopoese nicht aktiviert wird. Es kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden und erwies sich in Modellen für zerebrale Ischämie und Rückenmarkskompression als neuroprotektiv (Erbayraktar et al., 2003, Grasso et al., 2004).

Carbamyliertes EPO (CEPO) ist ebenfalls ein nicht-erythropoetisches, neuroprotektives EPO-Derivat (Leist et al., 2004). Sämtliche Lysine des humanen rekombinanten EPO-Moleküls werden durch Carbamylierung homocitrulliniert. CEPO hat keine Bioaktivität bei erythropoetischen Zellen und bindet nicht an den klassischen EPO-Rezeptor, ist aber neuroprotektiv (Noguchi et al., 2007). Es gibt Spekulationen über einen heterodimeren „neuronalen“ EPO-Rezeptor der eine Untereinheit aus dem klassischen EPO-Rezeptor besitzt und eine gemeinsame β -Untereinheit aus dem Heterozepor, den GM-CSF, IL-3 und IL-5 teilen (Brines et al., 2004). Allerdings ist die Existenz eines solchen Rezeptors umstritten (Um et al., 2006).

Dennoch hat sich in vielen *in vivo*-Modellen gezeigt, dass CEPO neuroprotektiv ist. So zeigten Adembri et al. (2008) eine reduzierte Apoptoserate nach CEPO-Anwendung bei einem mechanischen Schädel-Hirntrauma in einem Rattenmodell. Ebenso in einem Rattenmodell konnte ein reduziertes Infarktvolume nach intravenöser CEPO-Injektion bei Schlaganfall durch Doggrell et al. (2004) nachgewiesen werden. Bei schwerer chronische Hypoxie in Ratten konnte CEPO die Apoptoserate reduzieren ohne die Erythropoese der Versuchstiere zu verändern (Fantacci et al., 2006). Auch bei der Hemisektion des Rückenmarks konnte durch intraperitoneale Injektion von CEPO ähnlich neuroprotektive Effekte erreicht werden, wie bei der Anwendung von EPO (King et al., 2007).

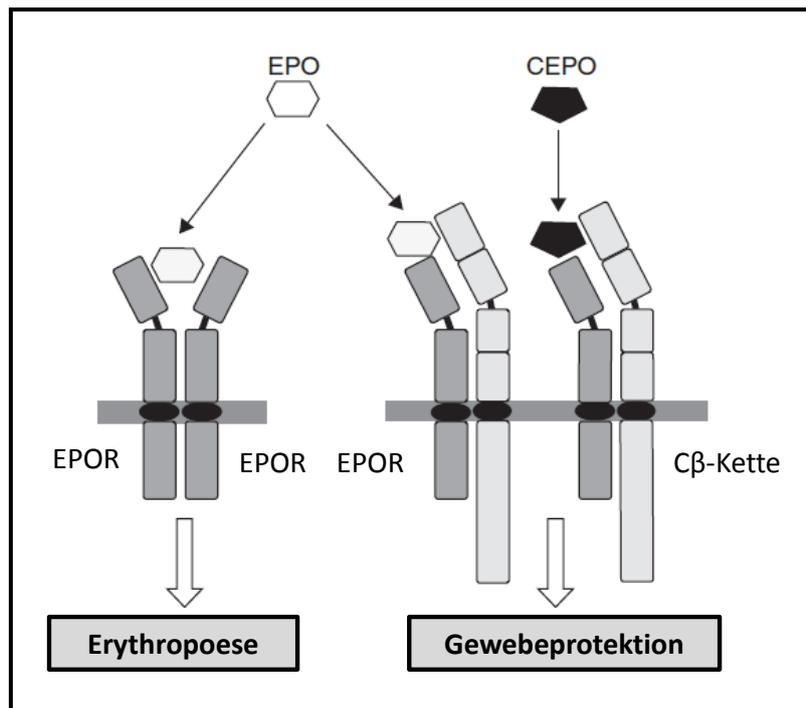


Abb. 1.7: Aufbau des EPO-Rezeptors. Der „klassische“ EPO-Rezeptor ist ein homodimerer Rezeptor aus zwei identischen Untereinheiten, während der „neuronal“ EPO-Rezeptor, ein heterodimerer Rezeptor, aus einer „klassischen“ EPO-Rezeptoruntereinheit und einer Common- β -Kette der Heterorezeptoren von GM-CSF, IL-3 und IL-5 bestehen soll (adaptiert nach Dumont und Bischoff, 2010).

CEPO soll vor allem funktionale Defizite reduzieren, die durch Neuroinflammation nach Verletzung des Gewebes entstehen (Villa et al., 2007) und kann die Größe der Läsion und den Zellverlust begrenzen, in dem es die Angiogenese und Neurogenese fördert (Xiong et al., 2011).

Trotz allem sind die zellulären Vorgänge bei der neuroprotektiven Wirkung von CEPO noch nicht sehr gut verstanden.

2 Zielsetzung

Zellersatztherapien für neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Huntington oder Morbus Parkinson, erfordern die Anwendung humaner neuronaler Progenitorzellen (hNPZ). Jedoch sind die Zellkulturen von hNPZ im Sinne einer hohen „Ausbeute“ an Neuronen noch nicht sehr effektiv. So müssen die Zellkulturbedingungen optimiert werden, damit die Anzahl der zur Transplantation oder anderen Versuchen zur Verfügung stehenden Neurone erhöht werden kann.

Während der embryonalen Entwicklung besteht eine geringere O₂-Konzentration im Gehirn von 1% bis 5% O₂, während die Standardzellkultur von 20% O₂ wie in der Raumluft zum Maßstab hat. Studien an murinen Zelllinien zeigten einen positiven Einfluss von Hypoxie auf neuronale Zellkulturen, im Sinne einer erhöhten Proliferationsrate, einer gesteigerten Neurogenese und einer reduzierten Apoptoserate. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit evaluiert werden, welchen Einfluss verminderte Sauerstoffkonzentrationen und EPO auf die Proliferation und die Differenzierung von hNPZ haben und durch welche Mechanismen diese reguliert werden. Dafür wurden die folgenden Aspekte genauer untersucht:

- die Expression von HIF-1 α und des EPO-Rezeptors bei hNPZ
- die Proliferation und die metabolische Aktivität der hNPZ
- der Zellzyklus und die Differenzierung der hNPZ
- die Apoptoserate der hNPZ, um eine anti-apoptische Aktivität von Hypoxie und EPO zu verifizieren
- mögliche Mechanismen und Schlüsselfaktoren für die Wirkungsweise von Hypoxie und EPO zu analysieren, wie zum Beispiel die Aktivierung anti-apoptotische Prozesse oder des Wnt-Signalweges
- die neuroprotektiven Eigenschaften des EPO-Derivates CEPO

3 Material und Methoden

3.1 Material¹

3.1.1 Geräte

Agarosegelkammer	Mini-subII, Bio-Rad, München
Analysewaage	MCBA 100 Sartorius, Göttingen
Cell-Counter	CASY, Roche, Mannheim
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Becton Dickenson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Biozero, Keyence, Neu-Isenburg
Inkubator	Binder, Tuttlingen
Kamera	DS2M, Nikon, Kingston, UK
Kühlzentrifugen	Universal 30 RF (Rotor E1174); Hettich, Tuttlingen Universalzentrifuge, Z383K, Hermle, Wehingen
Luminometer	LB 9508, Berthold, Regensburg, Schweiz
Mikroskop	Eclipse, TS100, Nikon, Kingston, UK
Nucleofector	NucleofactorII, Amaxa, Lonza, Köln
pH-meter	Mettler-Toledo, Gießen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
plate reader	Magellan, Tecan, Crailsheim
Schüttelinkubator	Thermomixer 5436; Eppendorf, Hamburg
SDS-PAGE-Kammer	Criterion, Bio-Rad, München
Semi-Dry-Transfer-Kammer	Trans-Blot SD, Bio-Rad, München
Spannungsquelle	PowerPacHC, Bio-Rad, München
Sterilwerkbank	Antares 48, Heraeus, Berlin
Tischzentrifugen	Mikroliterzentrifuge, Z233MK-2, Hermle, Wehingen
Vakuumpumpe	Univac Pumpstation; UniEquip, Martinsried
Vortexer	MS1, IKA, Sigma-Aldrich, Hamburg

¹ Sämtliche genannten Produkte werden ohne ®- oder ™-Bezeichnung aufgelistet. Nicht genannte Zeichen schließen nicht aus, dass es sich um geschützte Produkte handelt.

Material und Methoden

3.1.2 Software

CellQuest Pro (BD Bioscience)

Graph Pad Prism 5

Microsoft Office 2003

NCBI Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Greiner, Solingen; Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg; Eppendorf, Hamburg; Braun, Melsungen; Sarstedt, Nümbrecht; Roth, Karlsruhe.

Criterion Precast Gel	BioRad, München
FACS-Röhrchen 5ml	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Handschuhe, nitril	Kimberly-Clark, Koblenz
Kyroröhrchen	Nunc, Roskilde, DK
Nitrocellulosemembran, Hybond-ECL	Amersham, Freiburg
Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15, 50 ml	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Whatman Filterpapier 58*58cm	GE Healthcare, Dassel
Zellkulturschalen mit 6-,24-,48- Kavitäten	Greiner Bio-One, Solingen
Zellkulturflasche T75	Greiner Bio-One, Solingen
Zellkulturpipetten 5,10, 25ml	Greiner Bio-One, Solingen

3.1.4 Chemikalien

Regelmäßig genutzte Basis-Chemikalien wurden, wenn nicht anders angezeigt, von Calbiochem, Merck, Darmstadt; Fluka, Sigma-Aldrich, Hamburg; Merck, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Hamburg; und Roth, Karlsruhe mit dem Grad „pro analysis“ erworben.

3.1.4.1 Zellkulturmedium, Pufferlösungen und Wachstumsfaktoren

DMEM

(Dulbecco´s Modified Eagle Medium) 4,5g/l Glucose

Invitrogen, Darmstadt

DMEM/F12

Invitrogen, Darmstadt

GlutaMax

Gibco/Invitrogen, Darmstadt

Heparin-Natriumsalz

Invitrogen, Darmstadt

Pen/Strep 100x

PAA Laboratories, Cölbe

Gentamycin

Invitrogen, Darmstadt

B27

Invitrogen, Darmstadt

bFGF

Roche, Mannheim

EGF

Roche, Mannheim

HBSS (Hank´s balanced salt solution)

Invitrogen, Darmstadt

FCS (Fetales Kalbsserum)

Invitrogen, Darmstadt

Trypsin/EDTA

Invitrogen, Darmstadt

Trypsin-Inhibitor

Sigma-Aldrich, Hamburg

Trypsin/Benzonase-Lösung

25U/ml Benzonase in Trypsin-EDTA

Trypsin-Inhibitor/Benzonase-Lösung

1% HSA, 25U/ml Benzonase, 0.55 mg/ml Trypsin-Inhibitor in DMEM/F12

Benzonase

Merck, Darmstadt

Maus-Laminin

Trevigen, Gaithersburg, USA

hrEPO

R&D Systems, Minneapolis, USA

Bestellnr.: 287-TC

ERYPO

Janssen-Cilag, Neuss

Bestellnr.: ERYPO 3000 FS, N3

CEPO

Lundbeck, Valby, DK,

Charge CMC-A-0013 (nicht frei
erhältliche Probe)

Material und Methoden

3.1.4.2 Pufferlösungen

RIPA-Puffer (Lysepuffer für die Proteinextraktion, Radioimmunoprecipitations-Assay-Puffer)

20 mM Tris pH 7.4

137 mM NaCl

0.1% SDS

0.1% Natriumdesoxycholat

1% Triton X-100

10% Glycerol

2 mM EDTA

1 mM EGTA

1 mM NaF

20 mM Natriumpyrophosphate

Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (Roche; Mannheim)

5-facher Probenpuffer für SDS-PAGE

50 mM Tris

2% SDS

5% Glycerol

5% β -Mercaptoethanol

0.2 mg/ml Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer

250 mM Tris

188 mM Glycin

3,5 mM SDS

SDS-Transferpuffer

48 mM Tris

39 mM Glycin

3,5 mM SDS

20% Methanol

Material und Methoden

Blocklösung für Western Blot

TBST mit 2% BSA (Roth)

TBS

20 mM Tris-HCl

150 mM NaCl, pH 7,6

TBST

TBS mit 0,1% Tween 20

Fixierungslösung für FACS

1% PFA in PBS

Saponinpuffer für FACS

0.5% BSA

0.5% Saponin

0.02% NaN₃ in PBS

Waschpuffer für FACS

0.5% BSA

0.02% NaN₃ in PBS

TUNEL-Permeabilisationslösung (FACS)

0,1% Triton X-100 in 0,1% Natriumzitat

PBS

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

8.1 mM Na₂HPO₄

1.5 mM KH₂PO₄

Waschpuffer für ELISA

0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.2-7.4

Material und Methoden

IC-Diluent #1/Blocklösung für ELISA

1% BSA in PBS, pH 7.2-7.4

IC-Diluent #4 für ELISA

1 mM EDTA

0.5% Triton X-100 in PBS, pH 7.2-7.4

3.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper:

βIII-Tubulin, TuJ1, SC-51670, Santa Cruz, Heidelberg (1:100)

Actin; AC-15; Sigma-Aldrich, Hamburg (1:10000)

Bcl-2 (C2); SC-7382, Santa Cruz, Heidelberg (1:500)

EPO-Rezeptor (M20); SC-697, Santa Cruz, Heidelberg (1:1000)

GAPDH; SC-32233, Santa Cruz, Heidelberg (1:2500)

HIF1 α , SC-10970, Santa Cruz, Heidelberg (1:500)

Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor 488, goat@mouse, A-11029, Invitrogen, Darmstadt (1:10000)

Alexa Fluor 680, goat@rabbit, A-21076, Invitrogen, Darmstadt (1:10000)

Alexa Fluor 800, goat@mouse, A-21057, Invitrogen, Darmstadt (1:10000)

IRDye 800CW, goat@mouse, Rockland 610-131-003, BIOMOL, Hamburg (1:10000)

IRDye 800CW, goat@rabbit, Rockland 611-131-122, BIOMOL, Hamburg (1:10000)

3.1.6 Reaktionskits

Amaya Nucleofector Kit V, VCA-1003, Amaya, Lonza, Gaithersburg, USA)

Bicinchoninicinsäureassay, Nr. 23225, Pierce, ThermoScientific, Rockford, USA

Dual Luciferase Assay Kit, E1910, Promega, Madison, USA

In Situ Cell Death Detection Kit, Nr. 1168-4795-910, Roche, Mannheim

WST1-Kit, Nr. 0501-5944-001, Roche, Mannheim

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Kultur der ReNcell VM-Zellen

Für die Studien über Proliferation und Differenzierung humaner neuronaler Progenitorzellen wurden ReNcell VM-Zellen (nachfolgend VM-Zellen genannt) verwendet, die ReNeuron (Guildford, UK) zur Verfügung stellte und durch Millipore (Billerica, USA) vertrieben werden. Die VM-Zellen sind eine mit v-myc retroviral immortalisierte Zelllinie, die aus dem ventralen Mittelhirn eines zehn Wochen alten humanen Fötus generiert wurde. Die adhärenzte Zelllinie wird bei 5% CO₂ und 37°C in laminierten Kulturschalen (Laminin, Trevigen, Gaithersburg, USA) kultiviert (Hoffrogge et al., 2006, Donato et al., 2007). Die Dauerkultur der VM-Zellen erfolgte in T75-Flaschen, eine Passage der Zellen geschah bei 80-85% Konfluenz. Dafür wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und anschließend für rund zwei Minuten mit Trypsin/Benzonase behandelt. Es folgte eine mikroskopische Kontrolle des Ablöses der Zellen. Das Ergänzen von Trit/Benz resultierte im Abstoppen der Reaktion. Anschließend folgte eine Resuspension der Zellen und eine Zentrifugation für 5 min bei Raumtemperatur und 1500 rpm. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellett in 10 ml Proliferationsmedium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels CASY-Cell-Counter (s. 3.2.2) und mit nachfolgender Überführung der Zellen in eine laminierte T75-Flasche. Die Versuche mit den VM-Zellen wurden in Laminin beschichteten Kulturschalen verwendet. Die jeweilige Größe der Kulturschale ist bei den einzelnen Methoden aufgeführt. Für die Beschichtung wurde das Laminin 1:100 mit kaltem DMEM/F12 verdünnt und in die Kulturschale pipettiert, so dass der Boden vollständig bedeckt war. Die Lamininlösung musste mindestens eine Stunde bei 37°C inkubieren, anschließend erfolgte die Entfernung der Lösung sowie ein Waschen der Kulturschalen mit HBSS, danach konnten die VM-Zellen ausplattiert werden. Das Proliferationsmedium enthielt zwei Wachstumsfaktoren: basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Epidermal Growth Factor (EGF). Ein Entzug der Wachstumsfaktoren induzierte die Differenzierung, dafür wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und Differenzierungsmedium wurde hinzugefügt. Ein justierbarer Inkubator, dessen Sauerstoffgehalt mittels Stickstoffzufuhr auf 3% O₂ reduziert wurde, diente für die Hypoxie-Studien. Die Versuche mit EPO erfolgten sowohl mit humanem rekombinanten

Material und Methoden

Erythropoitin (hrEPO), das ausschließlich für den wissenschaftlichen Gebrauch gedacht ist, als auch mit dem Medikament Epoitin α (ERYPO).

3.2.1.2. Kultur der HCD-57-Zellen

Die murine EPO-abhängige Zelllinie HCD-57 (Bittorf et al., 1997) wurde als Positivkontrolle ausgewählt. Dies ist eine Suspensionszelllinie und die Zellen wurden in RPMI-Medium unter Zugabe von 10% FCS und 1% Gentamycin sowie verschiedene EPO-Mengen kultiviert. Die HCD-57-Zellen dienten als Kontrolle für Western Blots des EpoR als auch für Proliferationsstudien unter EPO-Applikation.

3.2.1.3 Kultur der HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden als Negativkontrolle des EpoR für die Western Blots genutzt, da diese Zelllinie den EpoR nicht exprimiert (Kirkeby et al. 2007). Die HEK-293-Zellen wurden in T75-Flaschen kultiviert. Für die Proteinextraktion erfolgte das Ablösen der Zellen mit 2,5 ml Trypsinogen/Benzoase, nach der Inkubation wurde die Reaktion mit 5 ml HEK-293-Zellkulturmedium abgestoppt. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in einem 15 ml-Reagenzröhrchen wieder resuspendiert, die Proteinextraktion und –bestimmung erfolgt wie unter 3.2.5.1 und 3.2.5.2 beschrieben.

3.2.2 Zellproliferations-Assay

Zur Analyse der Proliferation der VM-Zellen kam der CASY-Cell-Counter zur Anwendung. Für den Zellproliferation-Assay wurden 10.000 VM-Zellen pro Kavität einer laminierten 48-Kavitäten-Kulturschale ausplattiert. Nach 24 Stunden Proliferation erfolgten ein Waschschrift mit HBSS und ein Medienwechsel zu Proliferationsmedium mit verschiedenen EPO-Konzentrationen. Als Kontrolle wurde für hrEPO humanes Serumalbumin (HSA) benutzt, da dies das Lösungsmittel für hrEPO ist. Für ERYPO wurde PBS genutzt, da Epoitin α in einer Salzlösung suspendiert ist. Zusammen mit der EPO-Applikation erfolgte auch der Wechsel zu Hypoxie, so dass sowohl der Einfluss der Epo-Applikation als auch der Einfluss der Hypoxie und eine Kombination von beidem zu vergleichen waren. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte eine Nullwertmessung, anschließend wurden über drei Tage alle 24 Stunden pro Kondition drei Proben gemessen. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit HBSS gewaschen

Material und Methoden

und mit Trypsin/Benzonase-Lösung behandelt. Ein Ablösen der Zellen wurde unter mikroskopischer Kontrolle bestätigt, bevor die Reaktion mit Trypsin-Inhibitor/Benzonase-Lösung abgestoppt wurde und die Zellen resuspendiert wurden. Die Zellsuspension wurde 1:200 mit CASYton verdünnt (50 µl Zellsuspension und 10 ml CASYton). Die Zahl der lebenden Zellen wurde dann mit dem CASY-Cell-Counter bestimmt. Der CASY-Cell-Counter arbeitet mit einer Exklusionsmethode für elektrische Ströme (electric current exclusion method). Diese Methode basiert auf den verschiedenen elektrischen Eigenschaften lebender Zellen, die in CASYton (Innovatis, Deutschland), einem isotonischen und iso-osmotischen Elektrolyt, suspendiert sind. Als Kontrolle für den Zellproliferations-Assay wurden HCD-57-Zellen verwendet, da diese EPO-abhängig proliferieren. Es wurden 5000 Zellen/Kavität auf einer 48-Kavitäten-Kulturschale ausplattiert. Die Epo-Applikation erfolgte bereits mit dem Ausplattieren der Zellen, da für die HCD-57-Zellen Epo essentiell ist. Die Suspensionszellen wurden in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Danach erfolgten ebenfalls eine Verdünnung mit CASYton und eine Messung mit dem CASY-Cell-Counter.

3.2.3 Die Messung der metabolischen Aktivität mit dem WST-1-Assay

Die metabolische Aktivität wurde durch das Reagenz WST-1 (Roche, Deutschland) bestimmt. Dieser kalorimetrische Assay misst die metabolische Aktivität der viablen Zellen basierend auf der Zunahme des Formazanprodukts von WST-1, das durch die Metabolisierung von WST-1 durch mitochondriale Dehydrogenasen in lebenden Zellen entsteht. Die Zellen wurden für drei Tage in 96-well-Platten proliferiert, woraufhin ein Mediumwechsel zu Differenzierungsmedium erfolgte. Die Zellen wurden entweder in 20% oder 3% O₂ für einen zusätzlichen Zeitraum von 24h oder 72h kultiviert. Das WST-1-Reagenz wurde mit einer finalen Verdünnung von 1:10 hinzugegeben und die Zellen inkubierten 2 weitere Stunden. Die Absorption des durch die metabolische Aktivität der Zellen entstehenden Formazanproduktes wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Photometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bestimmt. Die optischen Dichte wurden verglichen, indem diese auf die entsprechende Kontrolle normiert wurde.

3.2.4 Proteinanalyse

3.2.4.1 Proteinextraktion

Die Proteinanalyse erfolgte mit Gesamtzelllysaten. Dafür wurden die VM-Zellen auf 6-Kavitäten-Platten kultiviert und je nach Versuch proliferierende, differenzierte, mit EPO- oder Hypoxie-behandelte Zellen extrahiert. Die Zellen wurden mit HBSS gewaschen, und mit eiskaltem RIPA-Puffer, der einen Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Mischung (Roche, Mannheim, Deutschland) enthielt, 10 min auf Eis inkubiert. Die anschließende Zentrifugation der VM-Zellen erfolgte für 5 min bei 4°C und 15.000 rpm und der Überstand stand für die weiteren Analysen zur Verfügung.

3.2.4.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinmenge der Lysate wurde mit dem Bicinchoninsäure Assay (BCATM, Pierce, Rockford, IL, USA) ermittelt. Zu 10 µl Gesamtzelllysat wurden 200 µl BCA-Reagenz hinzugefügt und bei 37°C 1h inkubiert. Die Methode basiert darauf, dass BCA mit einwertigen Kupferionen eine violette Komplexverbindung eingeht. Die quantitative Proteinbestimmung erfolgt über die Umwandlung von zweiwertigem Kupfer zu einwertigem Kupfer in Anwesenheit von Proteinen. Das nun entstandene einwertige Kupfer kann dann mit BCA reagieren und nachfolgend kann die Absorption bei 570 nm mit dem Photometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland) an Hand eines BSA-Konzentrationsgradienten quantifiziert werden.

3.2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die zu untersuchenden Proben wurden in 5-fachem Probenpuffer verdünnt und 5 Minuten bei 95°C erhitzt, was zur Denaturation der Proteinen führte. Desweiteren sind die Proben durch das Detergenz SDS im Probenpuffer negativ geladen, so dass die Proteine in der folgenden Gelelektrophorese allein nach der Größe aufgetrennt werden.

Dafür wurde eine Elektrophorese-Kammer mit Elektrodenpuffer gefüllt und das vorgefertigte SDS-PAGE-Gel mit 4-15% Tris-HCl (Criterion Precast, Bio-Rad, München, Deutschland) eingesetzt. Anschließend wurden die Probe aufgetragen und eine Spannung von 120V für 120 Minuten angelegt, woraufhin die negativ geladenen Proben zur Kathode wandern und

proportional zu ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Als Referenzbande für das Molekulargewicht diente der Marker peqlab peqGOLD Prestained Protein Marker (PEQLAB, Erlangen Deutschland).

3.2.4.4 Western Blot

Die durch SDS-PAGE getrennten Proben wurden mit einem Semi-Dry Blotting System (Trans-BlotSD, Bio-Rad, Münschen, Deutschland) auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-ECL, Amersham) transferiert. Dafür wurde sowohl Nitrocellulosepapier als auch Whatman Filterpapier (Whatman, Dassel, Deutschland) für 15 min in SDS-Transferpuffer eingeweicht. Anschließend wurde das Whatman Filterpapier, die Nitrocellulose-Membran, dann das Elektrophoresegel und zum Abschluss ein weiteres Whatman Filterpapier auf die Anode geschichtet. Nach dem Anschluss der Kathode wurde für 120 min eine Stromstärke von 0,09A angelegt. Nach Abschluss des Blotting-Verfahrens wurde die Membran mit TBST, das 0,1% Tween und 5% Milchpulver enthielt, für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Danach folgte die Inkubation über Nacht mit dem primären Antikörper (Maus-monoklonal anti-bcl-2 (C2), 1:500, rabbit polyclonal anti-EpoR (M20), 1:1.000, mouse monoclonal anti-GAPDH, 1:2.500, mouse monoclonal anti-Actin (AC-15), 1:10.000, mouse monoclonal anti-HIF-1 α 1:500, alle Santa Cruz) in Blocklösung. Anschließend wurden die Blots dreimal mit TBST (Tris-HCl, pH 7,6, Tween 20) gewaschen und mit Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern (Alexa Fluor 680 goat anti-rabbit IgG 1:10.000, Alexa Fluor 800 goat anti mouse IgG 1:10.000 (alle von Molecular Probes, USA) und IRDye 800CW konjugierten affinity purified goat-anti-mouse und goat anti rabbit IgG (Rockland, BIOMOL, Hamburg, Deutschland), 1:10.000) für 2h bei Raumtemperatur gefärbt und anschließend erneut dreimal gewaschen. Als Molekulargewichtsmarker wurde prestained peqGOLD marker IV (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) benutzt. Visualisierung und Quantifizierung wurde mit dem Odyssey Infrared Imaging System (LICOR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Germany) durchgeführt. Die Immunoblots wurden bei einer Wellenlänge von 700 nm für Alexa Fluor 680-markierte Antikörper und bei 800 nm für Alexa Fluor 800- und IRDye 800CW-markierte Antikörper gescannt, dabei wurde die Odyssey Software Version 1.2 genutzt. Die Expression von β -Aktin und GAPDH wurden zur Normalisierung benutzt. Die Werte wurden auf 1 normalisiert und somit die relativen Expressionslevel der Zielproteine berechnet.

3.2.4.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung des β -Catenin-Gehaltes der Gesamtzelllysate wurde mit dem Human Total β -Catenin ELISA DuoSet IC System (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Am ersten Tag wurde eine ELISA-geeignete Mikrotiterplatte (Nunc, Langenselbold, Deutschland) mit 100 μ l/Kavität Capture-Antikörper beschichtet und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgte nacheinander bei Raumtemperatur und durch Waschschriffe unterbrochen die Applikation von Blocklösung, mit IC-Diluent # 4 aufgefüllten Proben, des Detektionsantikörpers, der Streptavidin-Lösung und Substratlösung, wobei die letzten beiden Schritte im Dunkeln inkubieren mussten. Als letztes wurde die Reaktion mit Stopplösung beendet und die Extinktion bei 450 nm mittels Photometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Eine Korrekturmessung erfolgte bei 570 nm. An Hand eines Standards wurde eine Eichgerade erstellt, und die β -Catenin-Menge ermittelt (Schmöle et al., 2010). Die Messung der Extinktion beruhte darauf, dass die Menge des umgesetzten Substrates direkt proportional zur gebundenen Menge des Detektionsantikörpers und somit auch zum β -Catenin war.

3.2.5 Durchflusszytometrie

3.2.5.1 Zellzyklusanalyse

Für die Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie wurden Zellen durch Trypsin/Benzonase-Lösung aus 6-Kavitäten-Kulturschalen gelöst, in denen sie bei Normoxie oder Hypoxie kultiviert wurden. Die Differenzierung wurde induziert, nachdem die Zellkultur eine Konfluenz von 80% erreicht hat. Zur Analyse wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten abgelöst und mit eiskaltem Ethanol bei -20°C für eine Stunde fixiert. Vor der Durchflusszytometrie wurden die fixierten Zellen für 30 Minuten mit 1 mg/ml RNase A (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) bei 37°C inkubiert. Danach folgte eine Markierung der DNA mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid (PI) für 30 Minuten. Der DNA-Gehalt wurde mittels Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD Bioscience, San Jose, CA, USA) gemessen und mit der Cell Quest Pro Software (BD Bioscience) analysiert. Bei der Durchflusszytometrie fließen die zu untersuchenden Zellen umgeben von Suspensionslösung in einem feinen Strahl durch einen Laserstrahl. Dabei verursacht jede Zelle eine Streuung des Laserstrahls, die als Forward Scatter, proportional zum Zelldurchmesser, und Side Scatter, proportional zur

Material und Methoden

Granularität der Zellen, zu messen sind. Außerdem kann die Fluoreszenz bei diversen Wellenlängen bestimmt werden. Durch diese Parameter lassen sich die zu untersuchenden Zellen bestimmen. Aggregierte Zellen (Doubletten) und Debris wurden durch den Forward Scatter angezeigt und vorher aus dem Data Set ausgeschlossen. Zur Quantifizierung der G₁, S und G₂/M-Phase wurden für jedes Experiment Einstellungen für 2n- und 4n-Gipfel bei 605 nm an Hand der G₁/S-Populationen definiert und auf alle Proben angewendet.

3.2.5.2 Antikörperfärbung von neuronalen Proteinen

Um den Einfluss von Hypoxie und EPO auf die Differenzierung der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in 6-Kavitäten-Kulturschalen bis zu 80% Konfluenz kultiviert und im Anschluss differenziert und die Proben mittels FACS untersucht. Dabei wurden die hNPCs der Hypoxie in mehreren Versuchsansätzen entweder während der Proliferation oder Differenzierung, oder bei beidem ausgesetzt. Die nachfolgende Analyse der neuronalen Differenzierung erfolgte durch die durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl der β III-Tubulin⁺ Zellen.

Für die Detektion von β III-Tubulin⁺ Zellen wurden die Zellen abgelöst, bei 100 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert, mit PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺ gewaschen, und für 15 Minuten mit 1% PFA in PBS fixiert. Dann wurden die Zellen in Waschpuffer (PBS + 0,5% BSA, 0,02% Na-Azid) resuspendiert und bis zur Färbung bei 4°C gelagert. Für die Färbung wurden die Zellen nach einer Zentrifugation in einer Antikörperlösung (Saponinpuffer (PBS + 0,5% BSA, 0,02% Na-Azid, 0,5% Saponin) und β III-Tubulin-Antikörper (Abcam, 1:100) verdünnt) resuspendiert und für 2h im Dunkeln bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Der β III-Tubulin Antikörper ist FITC-konjugiert. Vor der Zugabe von Waschpuffer wurden die Zellen zweimal in Saponinpuffer resuspendiert. Die Messung wurde mit dem FACSCalibur bei 488 nm in Kombination mit der Cell Quest Pro Software (BD, San Jose, USA) durchgeführt.

3.2.5.3 TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL-Assay)

Die apoptotischen Zellen in der Differenzierung wurden mit einem In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) detektiert. Während der Apoptose fragmentieren Endonukleasen die Desoxyribonukleinsäure (DNS) und legen an den Enden der Bruchstücke die 3'-OH-Gruppen frei. Diese werden beim TUNEL-Assay durch

Material und Methoden

fluoreszierende Nukleotide detektiert, die durch das Enzym TdT an diese freien Enden gebunden werden. Der Gehalt der DNS-Bruchstücke lässt somit indirekt einen Rückschluss auf die Apoptose zu. Hier sollten die anti-apoptotischen Eigenschaften von EPO und Hypoxie während der Differenzierung untersucht werden. Dafür wurden die Zellen erneut in 6-well-Kavitäten bis zu 80% Konfluenz kultiviert und die Differenzierung induziert, sowie dabei EPO und Hypoxie appliziert. Über 4 Tage wurden Zellproben gesammelt. Die mit Trypsin/Benzonase-Lösung abgelösten Zellen wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 1% PFA/PBS fixiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert und der Waschpuffer wurde hinzugefügt (0,2% HSA/HBS). Bis zur Messung wurden die Zellen bei 4°C aufbewahrt. Für die Permeabilisierung und die Markierung wurden die Zellen zentrifugiert und mit PBS gewaschen, gefolgt von einer zweiminütigen Inkubation mit Permeabilisierungspuffer (0,1% Triton-X-100 in 0,1% Natriumzitat) auf Eis. Nach einem zusätzlichen Waschschrift mit PBS wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C mit TUNEL Reaktionsmix inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die vorher 10 Minuten mit DNase I behandelt wurden. Als Negativkontrolle diente eine Probe, die nur mit der Label-Lösung behandelt wurde. Anschließend wurden die Zellen zweifach gewaschen und ein Endvolumen von 250 µl PBS wurde hinzugefügt. Die Proben wurden mit dem FACSCalibur und der Cell Quest Pro Software bei 488 nm analysiert (BD, San Jose, USA).

3.2.6 Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Für die Analyse der TCF-Aktivität der VM-Zellen wurden 1×10^6 Zellen mit dem p12xSuperTOPFlash-Vektor, der 12 TCF-Bindungsstellen enthält, dem p8xFOPLash-Vektor, der eine mutierte TCF-Bindungsstelle enthält, sowie dem Renilla-Luciferase-Vektor phRL-TK (freundlicherweise durch Randall T. Moon zur Verfügung gestellt) mit dem Amaxa-Nucleofection System (Lonza, Köln, Deutschland) nach Herstellerangaben transfiziert. Als Positivkontrolle wurde der Vektor pCAGGS-S33Y, der auf Grund eines Austausches der Phosphorylierungsstelle Ser33 mit Tyrosin konstitutiv β -Catenin exprimiert (Kim et al., 2000), benutzt. Nach der Transfektion proliferierten die Zellen auf laminierten 48-Kavitäten-Platten, bis nach 24h EPO appliziert wurde und weitere 24h später wurde der Dual Luciferase Assay (Promega, Madison, USA) ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 20 min bei Raumtemperatur mit einfachem, passivem Lysepuffer auf einem Schüttler inkubiert. Bis zur Messung wurden die Zellen bei -80°C gelagert. Mit einem Luminometer (LB 9508, Berthold, Bad Wildbad, Deutschland)

Material und Methoden

wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase des p12xSuperTOPFlash-Vektors sowie des p8xFOPFlash-Vektor gemessen und auf die Aktivität der konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase normalisiert.

3.2.7 Carbamyliertes Erythropoetin

Die Substanz Lu AA24493, auch bekannt als carbamyliertes Erythropoetin (CEPO) wurde freundlicherweise von der Firma Lundbeck (Valby, Dänemark) für die Versuche zur Verfügung gestellt. Die Versuche zur metabolischen Aktivität, Proliferationsrate und neuronaler Differenzierung wurden analog zu EPO mit CEPO durchgeführt, wobei eine Menge von 1 IE/ml EPO 8 ng/ml CEPO entspricht.

3.2.9 Statistische Analysen

Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) von mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Prism. Inc., USA) und Excel (Microsoft, USA). Es wurde der gepaarte t-Test und der ONE-Way-ANOVA durchgeführt, $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Expression des Hypoxie-induzibaren Faktors-1 α und des Erythropoetin-Rezeptors in hNPZ

4.1.1 Die HIF-1 α -Expression der hNPZ

Um den Einfluss von Hypoxie und EPO auf die Proliferation und Differenzierung der hNPZ zu untersuchen, wurde im ersten Schritt analysiert, ob die Zellen den HIF-1 α exprimieren. Zellen können mittels der Familie der Hypoxie-induziblen Faktoren – allesamt Transkriptionsfaktoren – auf Hypoxie reagieren. Daher wurde die Expression von Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 α (HIF-1 α), dem Schlüsselmolekül der zellulären Antwort auf Hypoxie, in den VM-Zellen mittels Western Blot Analyse untersucht. HIF-1 α wird kontinuierlich synthetisiert und unter normoxischen Bedingungen degradiert. Abbildung 4.1 zeigt die Proteinexpression von HIF-1 α in einer Zeitreihe vom Zeitpunkt Null, welcher den unter Normoxie proliferierenden Zellen entspricht, über die Zeitpunkte 1h, 3h, 1d, 2d, 3d und 4d unter hypoxischen Kulturbedingungen jeweils mit und ohne der Applikation von EPO bei differenzierenden Zellen. Die EPO-Applikation führte zu keiner Veränderung der HIF-1 α -Proteinexpression bei keinem der gemessenen Zeitpunkte. Obwohl eine frühe Hochregulation nicht quantifiziert werden konnte, demonstriert die stabile Expression von HIF-1 α , dass das System in der Lage ist auf Hypoxie zu reagieren.

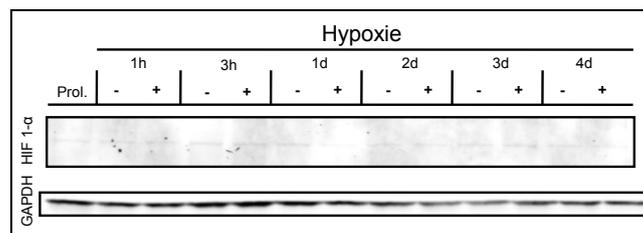


Abb. 4.1: Western Blot des HIF-1 α bei proliferierenden hNPZ unter normoxischen Bedingungen sowie bei differenzierenden Zellen unter hypoxischen Zellkulturbedingungen in einem Zeitverlauf von 1h bis 4d jeweils ohne (Minus) und mit (Plus) EPO-Applikation. Es konnte keine Hochregulation des HIF-1 α detektiert werden.

4.1.2 Die EPO-Rezeptor-Expression der hNPZ

Um den Einfluss von Hypoxie und EPO auf die Proliferation und Differenzierung der hNPZ zu untersuchen, wurde im zweiten Schritt analysiert, ob die Zellen den EPO-Rezeptor exprimieren. Die Gesamtzelllysate sowohl von proliferierenden als auch differenzierenden VM-Zellen wurden durch eine Western Blot-Analyse untersucht. Die differenzierten Zellen wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kultiviert und außerdem mit EPO behandelt. Am dritten Tag der Differenzierung wurden die Zellen zur weiteren Proteinanalyse lysiert.

Ein repräsentativer Scan eines Western Blots des EpoR ist in Abbildung 4.2A dargestellt. Als Positivkontrolle wurde die EPO-Rezeptor-exprimierende Zelllinie HCD-57 und als Negativkontrolle die HEK-Zelllinie verwendet. Die Quantifizierung (Abb. 4.2B) der Banden mittels Analyse der Signalintensitäten und Vergleich mit den Referenzbanden ergab, dass der EpoR während Proliferation und Differenzierung kontinuierlich exprimiert wird und sein Gehalt weder durch Hypoxie noch EPO-Applikation alteriert wurde.

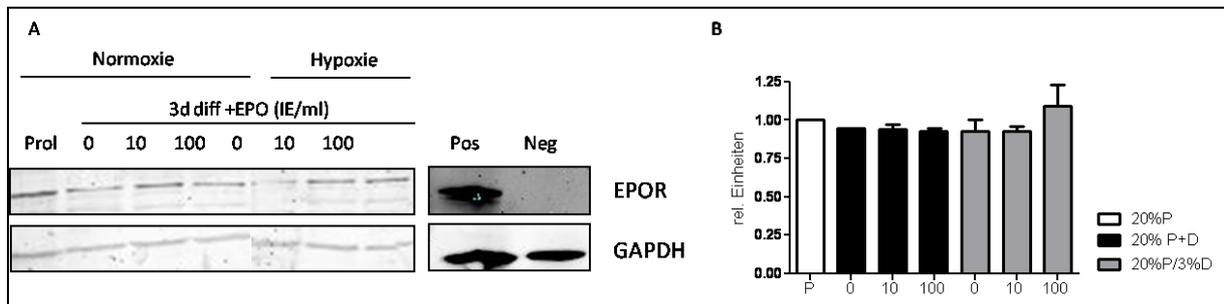


Abb. 4.2: (A) Western Blot des EPO-Rezeptors bei proliferierenden sowie differenzierten hNPZ mit jeweiliger Applikation von EPO und/oder Hypoxie während der Differenzierung als auch die Positiv- und Negativkontrolle. (B) Quantifizierung der EPO-Rezeptor-Expression. Die EPO-Rezeptorexpression wurde nicht durch EPO, Hypoxie oder den Differenzierungsprozess reguliert (Mittelwert \pm SEM, n=3).

4.2 Keine Alteration der Proliferationsrate der hNPZ nach Exposition mit Hypoxie und EPO-Applikation

4.2.1 Konstante Verdopplungszeiten von hNPZ nach Exposition mit Hypoxie und EPO

Um einen Effekt von Hypoxie auf die Proliferation zu bestimmen, wurden die hNPZ entweder unter 20% oder 3% Sauerstoffgehalt kultiviert. Zusätzlich wurden ERYPO, ein in der Klinik angewandtes EPO, sowie hrEPO, ein ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken benutztes EPO, in verschiedenen Konzentrationen appliziert. Alle 24 Stunden wurden Zellproben für eine Zellzahlbestimmung genommen. Bei einem Sauerstoffgehalt von 20% haben weder ERYPO noch hrEPO die Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle verändert (Abb. 4.4). Ebenso konnten ERYPO und hrEPO bei 3% Sauerstoffgehalt die Proliferationsrate nicht verändern. Zusätzlich gab es keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, die mit ERYPO (Abb. 4.4 A und B, Tab. 4.1) behandelt wurden. Dasselbe gilt für die Behandlung der hNPZ mit hrEPO (Abb. 4.4 C und D, Tab. 4.1).



Abb. 4.3: Schema zu dem Versuchsaufbau. Führt die Kultivierung der hNPCs unter Hypoxie zu einer veränderten Proliferationsrate?

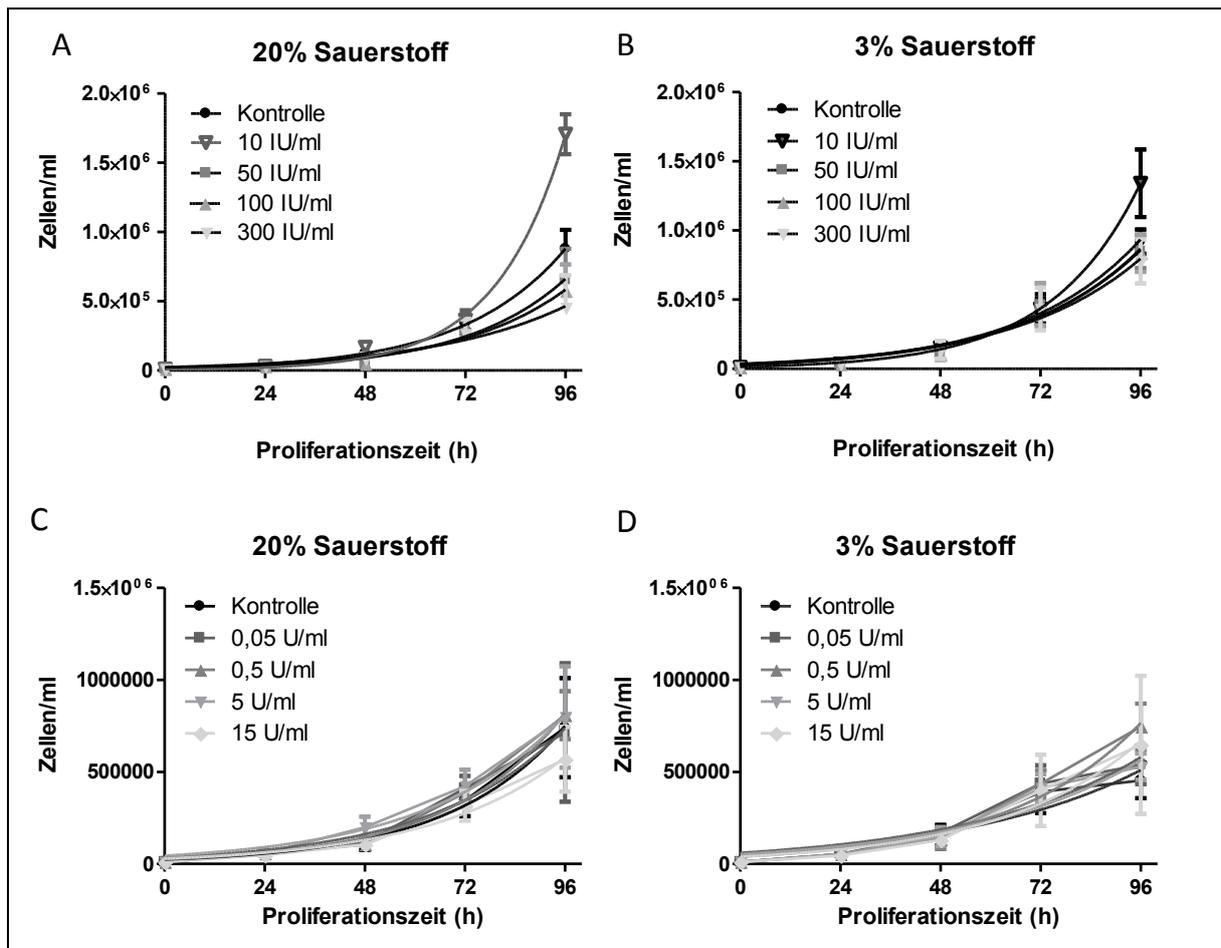


Abb. 4.4: Proliferationsrate der VM-Zellen unter normoxischen Bedingungen mit Applikation von ERYPO (A) und hrEPO (C) sowie unter hypoxischen Bedingungen mit Applikation von ERYPO (B) und hrEPO (D). Es konnte keine signifikante Alteration der Proliferationsrate nachgewiesen werden. Um den Effekt von Hypoxie zu untersuchen wurden unbehandelte Zellen von beiden Bedingungen verglichen und die Zellzahl/ml bestimmt. Die Proliferationskurven zeigten sehr ähnliche Resultate und keinen Unterschied zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Der Vergleich der Verdopplungszeiten von behandelten und unbehandelten Zellen bei Normoxie und Hypoxie zeigte keinerlei signifikanten Unterschiede, obwohl es scheinbar eine verstärkte Proliferation bei 10 IE/ml ERYPO gab (A und B) (Mittelwert \pm SEM, n=3-11).

ERYPO	20% O₂	3% O₂	hrEPO	20% O₂	3% O₂
<i>Kontrolle</i>	19,48 \pm 1,39h	20,45 \pm 1,53h	<i>Kontrolle</i>	19,45 \pm 4,23h	24,55 \pm 2,47h
<i>10 IU/ml</i>	11,76 \pm 2,08h	15,12 \pm 1,94h	<i>0,05 U/ml</i>	17,09 \pm 1,89h	29,39 \pm 1,03h
<i>50 IU/ml</i>	17,46 \pm 1,78h	19,28 \pm 1,99h	<i>0,5 U/ml</i>	18,05 \pm 2,07h	22,43 \pm 1,60h
<i>100 IU/ml</i>	18,77 \pm 1,57h	19,69 \pm 4,15h	<i>5 U/ml</i>	28,17 \pm 6,85h	27,68 \pm 2,34h
<i>300 IU/ml</i>	26,38 \pm 5,86h	20,57 \pm 2,41h	<i>15 U/ml</i>	27,46 \pm 6,06h	26,67 \pm 5,38h

Tab. 4.1: Vergleich der Verdopplungszeiten (h) der hNPZ (Mittelwert \pm SEM, n=3-11). Die Applikation von ERYPO, hrEPO und Hypoxie resultierte in keiner signifikanten Veränderung.

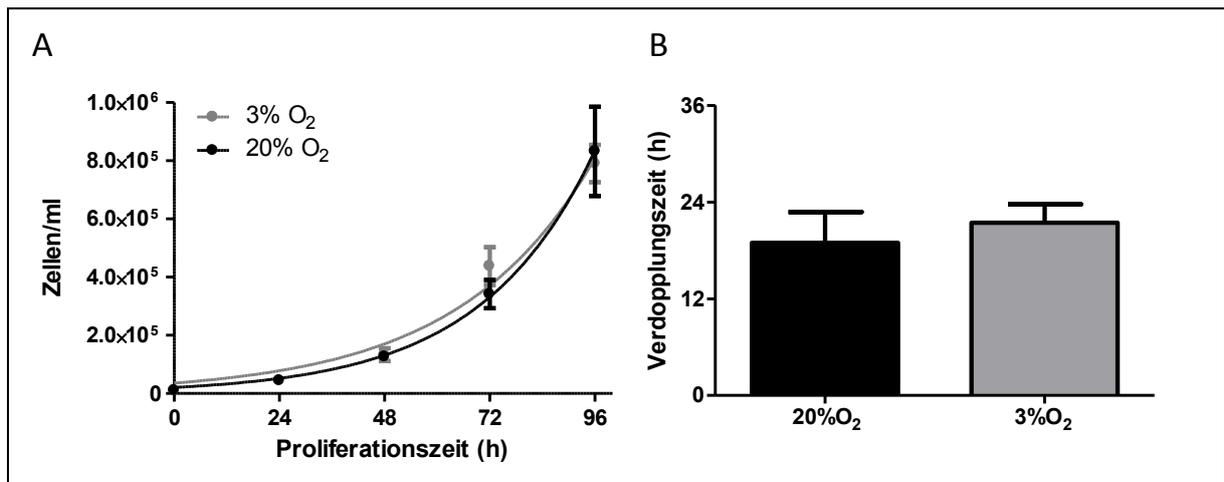


Abb. 4.5: Direkter Vergleich der Proliferation und Verdopplungszeit unter normoxischen und hypoxischen Zellkulturbedingungen. Es gab keinen Unterschied zwischen den beiden Konditionen ($p=0,64$). Unbehandelte Zellen bei 20% O₂ haben eine Verdopplungszeit von $19,48 \pm 1,39\text{h}$ und Zellen, die bei 3% O₂ kultiviert wurden, wiesen eine Verdopplungszeit von $20,45 \pm 1,53\text{h}$ auf (Mittelwert \pm SEM, $n=11$).

4.2.2 Kontrolle des Proliferationsassays: EPO-abhängiges Wachstum der Hcd-57-Zellen

Um die Effektivität von Epo zu verifizieren wurden außerdem HCD-57-Zellen analysiert. Dies ist eine murine Erythroleukämiezelllinie, die EPO-abhängig wächst und ohne EPO die Proliferation einstellt. Die Anwendung von ERYPO (0,1; 0,2 oder 0,3 IE/ml) resultierte in einem kontinuierlichen Wachstum der Zellen, während der Entzug von ERYPO die Proliferation stoppte (Tab. 4.2, Abb.4.6).

<i>ERYPO</i>	<i>20% O₂</i>
<i>Kontrolle</i>	$257,4 \pm 64,43\text{h}$
<i>0,1 IE/ml</i>	$22,87 \pm 3,34\text{h}$
<i>0,2 IE/ml</i>	$24,42 \pm 3,07\text{h}$
<i>0,3 IE/ml</i>	$28,87 \pm 7,70\text{h}$

Tab. 4.2: Vergleich der Verdopplungszeiten (h) der HCD-57-Zellen (Mittelwert \pm SEM, $n=3$). Ohne ERYPO proliferierten die Zellen nicht.

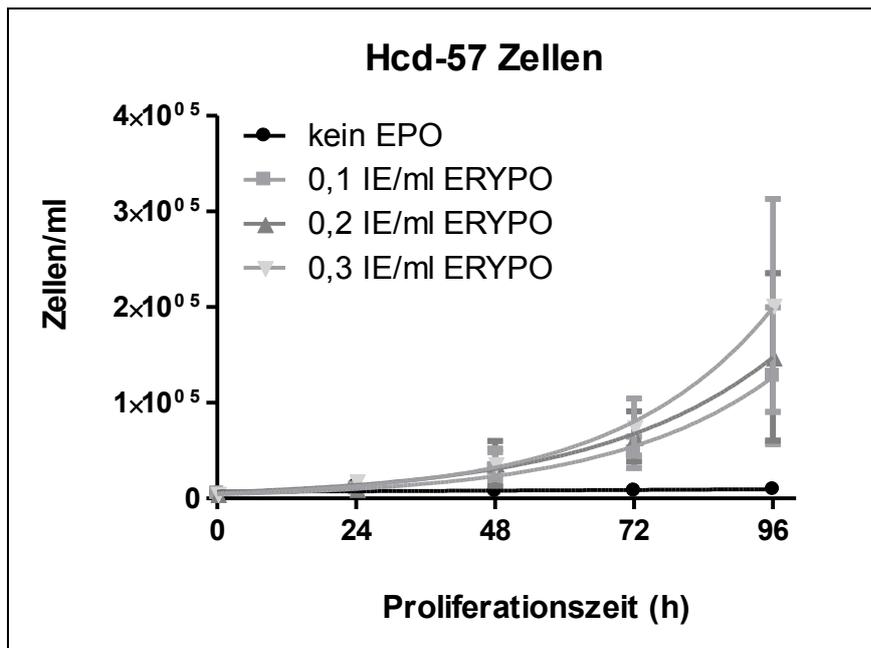


Abb. 4.6: Proliferation der Erythroleukämie Zellelinie Hcd-57. Nach EPO-Entzug stoppte diese Zelllinie die Proliferation. Der Test diente als externe Kontrolle des Proliferationsassays (Mittelwert \pm SEM, n=3).

4.3 Anstieg der metabolischen Aktivität der hNPZ nach Exposition mit Hypoxie und EPO

4.3.1 Erhöhte metabolische Aktivität nach einem Tag Differenzierung mit EPO



Abb. 4.7: Schema zu dem Versuchsaufbau. Welchen Einfluss hat Hypoxie auf die metabolische Aktivität der hNPZ?

Um zu determinieren, ob Hypoxie allein oder in Kombination mit EPO die metabolische Aktivität differenzierender Zellen beeinflusst, wurde die Fähigkeit der mitochondrialen Dehydrogenasen getestet, WST-1 – ein Tetrazoliumderivat – in ein Formazaanprodukt umzuwandeln. Die Zellen wurden während der Differenzierung in Normoxie und Hypoxie kultiviert sowie verschiedene Konzentrationen von hrEPO (0,05 – 0,5 – 2,5 – 5 U/ml) und

Ergebnisse

ERYPO (10 – 25 – 50 – 100 – 300 IE/ml) appliziert. In der Literatur (Studer et al., 2000) werden Mengen zwischen 1 – 10 U/ml für Versuche mit Epo benutzt. Zum Angleichen der Versuchsbedingungen wurden nicht nur diese Konzentrationen verwendet sondern auch solche, die darüber und darunter lagen. Die Applikation von hrEPO unter normoxischen und hypoxischen Zellkulturbedingungen führte zu keiner Erhöhung der metabolischen Aktivität der VM Zellen, während ERYPO nach 24 Stunden unter normoxischen Bedingungen ab einer Konzentration von 25 IE/ml eine signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle verursachte. Ein ähnlicher Anstieg der metabolischen Aktivität ließ sich bei der EPO-Applikation unter Hypoxie ab 100 IE/ml EPO feststellen (Abb.4.8, Tab. 4.3).

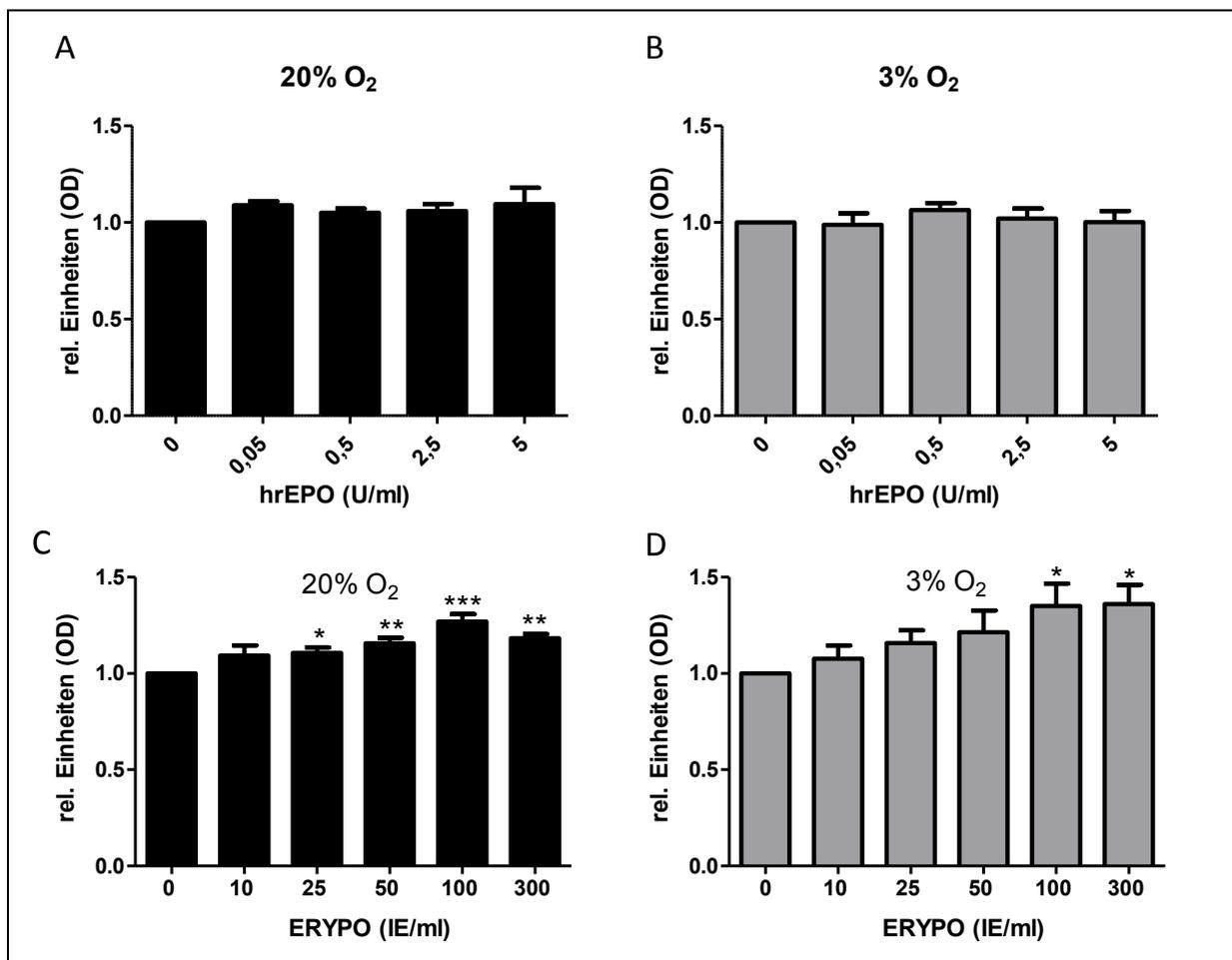


Abb. 4.8: Die metabolische Aktivität der hNPZ nach Differenzierung für 24h unter jeweils normoxischen und hypoxischen Zellkulturbedingungen mit Applikation von hrEPO und ERYPO. Unter Applikation von ERYPO war unter normoxischen Bedingungen ab 25 IE/ml und bei hypoxischen Bedingungen ab 100 IE/ml eine signifikante gesteigerte metabolische Aktivität zu detektieren (Mittelwert \pm SEM, $n=3-6$, $p^*<0,05$, $p^{**}<0,01$, $p^{***}<0,001$).

<i>hrEPO</i>	20% O ₂	3% O ₂	<i>ERYPO</i>	20% O ₂	3% O ₂
<i>Kontrolle</i>	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	<i>Kontrolle</i>	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<i>0,05 U/ml</i>	1,09 ± 0,02	0,99 ± 0,06	<i>10 IE/ml</i>	1,09 ± 0,05	1,08 ± 0,07
<i>0,5 U/ml</i>	1,05 ± 0,02	1,06 ± 0,04	<i>25 IE/ml</i>	1,11 ± 0,03	1,16 ± 0,07
<i>2,5 U/ml</i>	1,06 ± 0,04	1,02 ± 0,05	<i>50 IE/ml</i>	1,16 ± 0,03	1,21 ± 0,11
<i>5 U/ml</i>	1,10 ± 0,08	1,00 ± 0,06	<i>100 IE/ml</i>	1,27 ± 0,034	1,35 ± 0,12
			<i>300 I/ml</i>	1,18 ± 0,02	1,36 ± 0,10

Tab. 4.3: Die metabolische Aktivität der hNPZ nach 24h Differenzierung in relativen Einheiten (Mittelwert ± SEM). ERYPO induziert eine Zunahme der metabolischen Aktivität der hNPZ.

4.3.2 Konstante metabolischen Aktivität nach drei Tagen Differenzierung bei Applikation von EPO

Aufgrund der Ergebnisse des Proliferationsassays, bei dem weder ERYPO noch hrEpo einen Effekt zeigten und des WST1-Assays, bei denen ERYPO einen Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen hatte, wurden alle weiteren Versuche mit ERYPO durchgeführt. Nachdem die metabolische Aktivität während der frühen Differenzierung untersucht wurde, sollte auch die metabolische Aktivität am Maximum der Differenzierung untersucht werden. Dies liegt, wie später noch gezeigt werden wird, bei 72 Stunden (Morgan et al., 2009). Der Versuchsablauf folgte dem Schema wie der Differenzierung nach 24 Stunden, wobei dieselben Konzentrationen von ERYPO verwendet wurden. Nach der Bestimmung der Absorption bei 450 nm konnte kein Unterschied zwischen der Applikation von ERYPO und der Kontrolle weder bei 20% noch bei 3% O₂ festgestellt werden (Tab. 4.4, Abb. 4.9).

<i>3d diff</i>	20% O ₂	3% O ₂
<i>Kontrolle</i>	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<i>10 IE/ml</i>	1,07 ± 0,10	1,22 ± 0,17
<i>25 IE/ml</i>	1,10 ± 0,06	1,14 ± 0,09
<i>50 IE/ml</i>	1,09 ± 0,10	1,16 ± 0,10
<i>100 IE/ml</i>	0,91 ± 0,10	1,09 ± 0,08
<i>300 I/ml</i>	0,94 ± 0,10	1,05 ± 0,06

Tab. 4.4: Die metabolische Aktivität der hNPZ nach 3d Differenzierung in relativen Einheiten (Mittelwert ± SEM, n=3-4). Im Unterschied zu hNPZ, die über 24h differenzierten, veränderte ERYPO die metabolische Aktivität hier nicht.

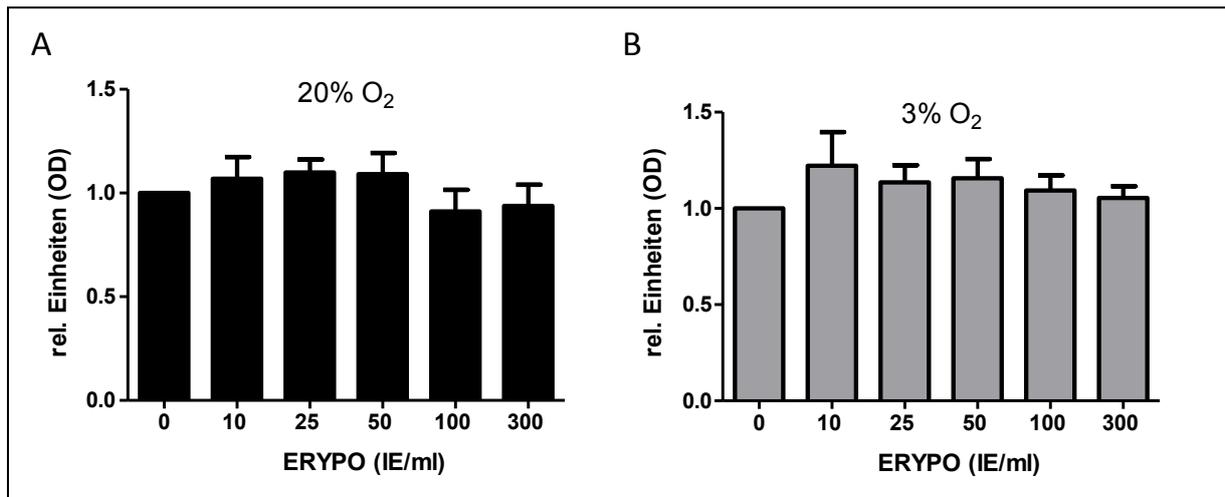


Abb. 4.9: Die metabolische Aktivität der VM-Zellen nach drei Tagen Differenzierung. Im Gegensatz zur Differenzierung nach 24 Stunden führte die Applikation von ERYPO unter diesen Bedingungen zu keiner Steigerung der metabolischen Aktivität (Mittelwert \pm SEM, n=3-4).

4.3.3 Gesteigerte metabolische Aktivität unter hypoxischen Kulturbedingungen

Um einen Vergleich zwischen Normoxie und Hypoxie direkt zu ermöglichen, wurden unbehandelte Zellen, die dem Standard-Differenzierungsmedium ausgesetzt waren, verglichen. Hier ließ sich bei 24 als auch 72 Stunden ein signifikanter Anstieg der metabolischen Aktivität beobachten (Abb. 4.10). Dieser Einfluss blieb im Vergleich zu dem von ERYPO während der Differenzierung stabil. Abbildung 4.10A zeigt die auf Normoxie normierten Werte und Abbildung 4.10B zeigt die unnormierten Rohwerte, es ist ein deutlicher Anstieg der metabolischen Aktivität bei Hypoxie zu beobachten. Vergleicht man die Rohwerte fällt im Vergleich zu den normierten Werten auf, dass die metabolische Aktivität der hNPZ generell verringert ist (Tab. 4.5).

<i>normiert</i>	20% O₂	3% O₂	<i>unnormiert</i>	20% O₂	3% O₂
<i>1d Diff</i>	1,00 \pm 0,00	2,34 \pm 0,37	<i>1d Diff</i>	0,66 \pm 0,05 OD	1,43 \pm 0,22 OD
<i>3d Diff</i>	1,00 \pm 0,00	1,68 \pm 0,16	<i>3d Diff</i>	0,65-0,11 OD	1,13-0,28 OD

Tab. 4.5: Vergleich der metabolischen Aktivität bei Normoxie und Hypoxie, wobei bei einem niedrigen Sauerstoffgehalt die metabolische Aktivität erhöht war. Die normierte Werte sind in relativen Einheiten und unnormierte Werte in Optischer Dichte (OD) angegeben (Mittelwert \pm SEM, n=4-5).

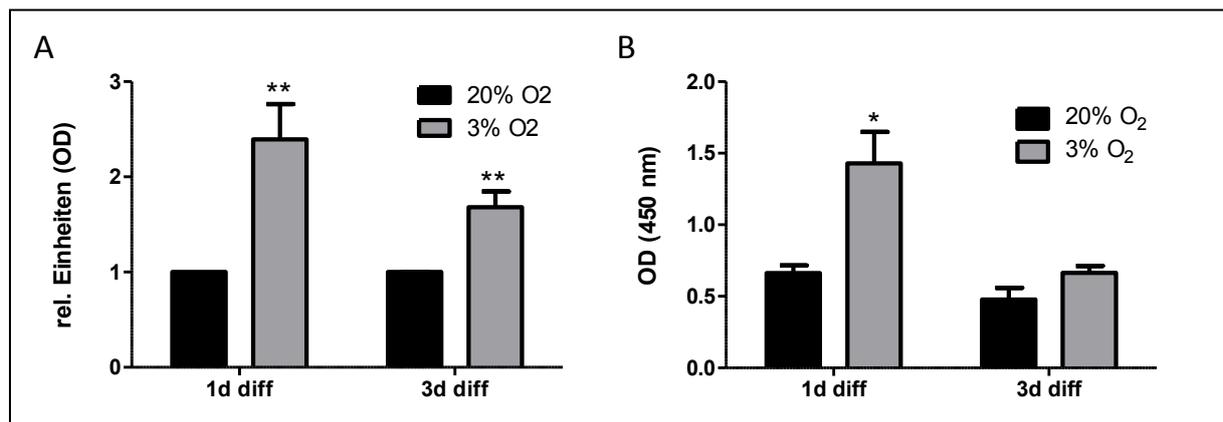


Abb. 4.10: Direkter Vergleich der metabolischen Aktivität unter Normoxie und Hypoxie. Hypoxie steigerte die metabolische Aktivität signifikant zu beiden untersuchten Zeitpunkten (Mittelwert \pm SEM, $n=4-5$, $p^*<0.05$; $p^{**}<0.01$)

4.4 Kein Unterschied im Zellzyklus der hNPZ unter normoxischen und hypoxischen Kulturbedingungen

Nach der Proliferation und der Stoffwechselaktivität wurde die Differenzierung der VM-Zellen untersucht. Hier sollte als erstes die Frage beantwortet werden, wie die Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen ist, um auszuschließen, dass Unterschiede in der Differenzierung an einem verzögerten oder verkürzten Zellzyklus unter Hypoxie verursacht sind (Abb. 4.11). Daher wurde eine Zellzyklusanalyse mit VM-Zellen durchgeführt. Nach der Induktion der Differenzierung wurden die Zellen entweder in Normoxie oder Hypoxie kultiviert und zu definierten Zeitpunkten Proben gesammelt. Zur Färbung der DNA wurde Propidiumiodid verwendet, das mit der DNA interkaliert. Der Anteil an Propidiumiodid innerhalb der Zelle korreliert mit dem DNA-Gehalt, somit konnten die Zellen den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G_0/G_1 , S, G_2 , M) zugeordnet werden. Abbildung 4.12 zeigt den Anteil der Zellen innerhalb der einzelnen Zellzyklusphasen während der ersten 24 Stunden der Differenzierung. Nach 16 Stunden haben 90% und nach 20 Stunden haben 95% der Zellen sowohl in Normoxie als auch Hypoxie die G_1/G_0 -Phase erreicht, somit verändert eine Differenzierung der Zellen unter hypoxischen Bedingungen die Anteile der hNPZ in den einzelnen Zellzyklusphasen nicht.

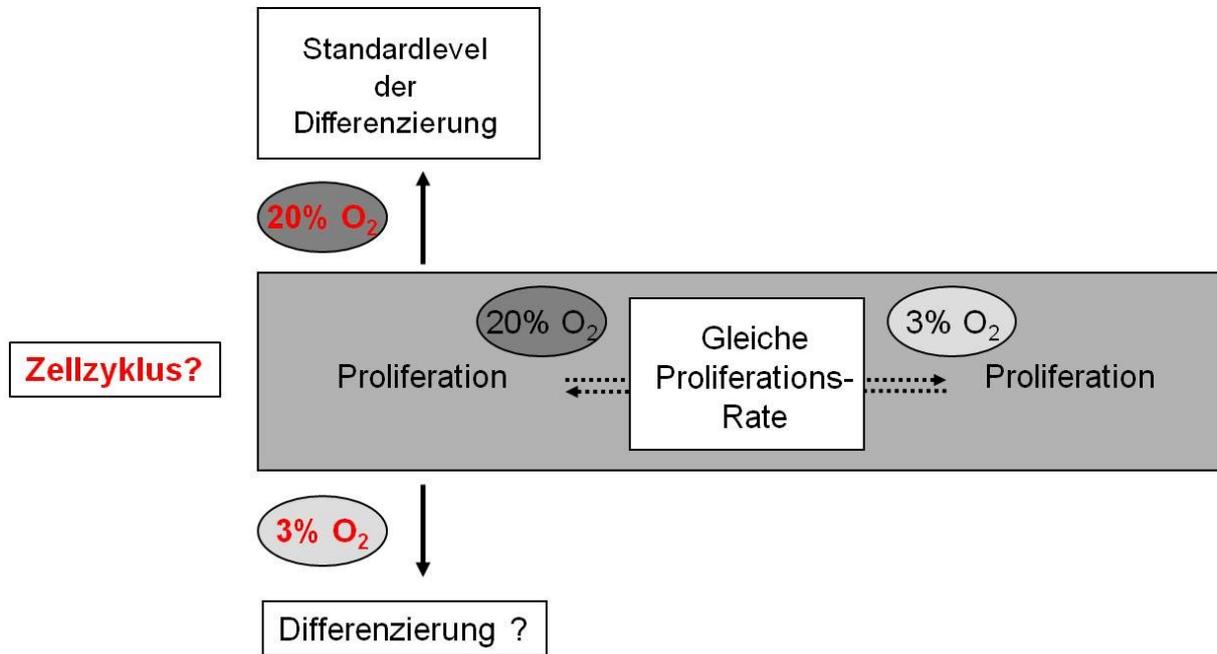
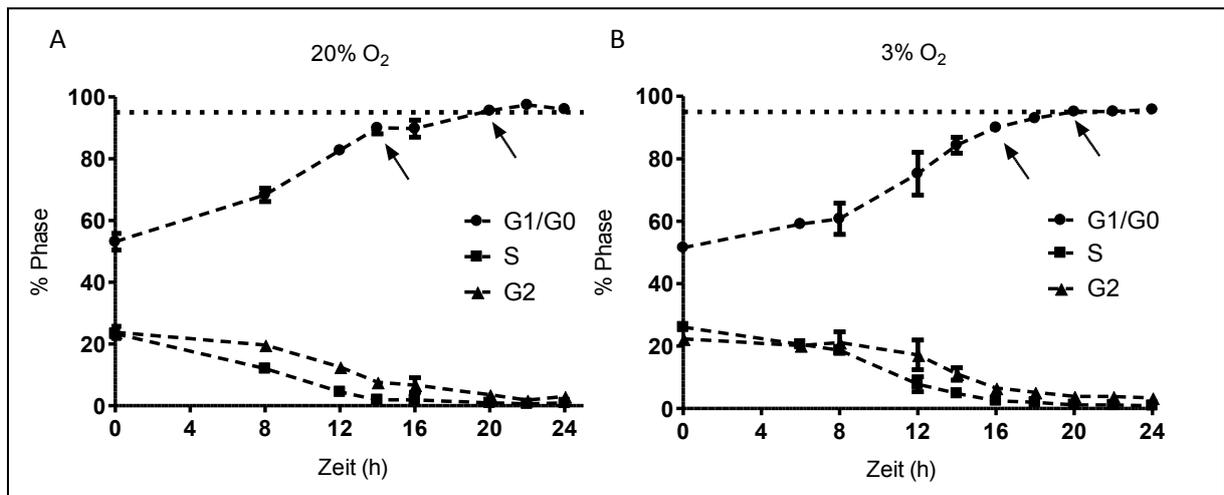


Abb. 4.11: Schema zu dem Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf den Zellzyklus. Wie unter 4.2.1 beschrieben verändert Hypoxie die Proliferationsrate nicht. Die Proliferation und Differenzierung der hNPZ bei Normoxie wurde als Maßstab angesehen, an dem alle anderen Konditionen (zum Beispiel Differenzierung der Zellen bei 3% Sauerstoff) gemessen wurden. Vor der Untersuchung der Differenzierung wurde der Zellzyklus untersucht, um festzustellen, wann die Zellen in die Differenzierung eintreten.



Ergebnisse

Abb. 4.12: Analyse des Zellzyklus unter Normoxie (A) und Hypoxie (B). Unabhängig vom Sauerstoffgehalt erreichten 95% der Zellen nach 20 Stunden die G₁/G₀-Phase. Nach 16h hatten 90%, nach 20h 95% der Zellen die G₁/G₀-Phase erreicht (s. Pfeile) (Mittelwert ± SEM, n=4).

4.5 Die Differenzierung der hNPZ

4.5.1 Versuchsschema zur Untersuchung der Differenzierung

Nachdem sowohl die metabolische Aktivität, die Proliferation und der Zellzyklus der hNPZ untersucht wurden, wurde als nächstes die Differenzierung in Hinblick auf die Neurogenese analysiert (Abb. 4.13). Dabei sollte untersucht werden, ob EPO, Hypoxie oder eine Kombination der beiden die Anzahl der neuronalen Zellen erhöhen kann. Während EPO ausschließlich zum Zeitpunkt des Wechsels von Proliferations- zu Differenzierungsmedium – also zum Zeitpunkt der Induktion der Differenzierung – eingesetzt wurde, wurde die Hypoxie zu verschiedenen Zeitpunkten angewandt. So wurden die Zellen zum einen bei 20% Sauerstoffgehalt proliferiert und erst in Anschluss während der Differenzierung hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Zum anderen wurden Zellen unter 3% Sauerstoffgehalt proliferiert und dann während der Differenzierung weiterhin mit Hypoxie behandelt oder auf 20% Sauerstoff umgestellt. In den folgenden Versuchen werden verschiedene Zellkulturbedingungen mit dem Standardmodell – einer Proliferation und Differenzierung bei 20% Sauerstoff – verglichen.

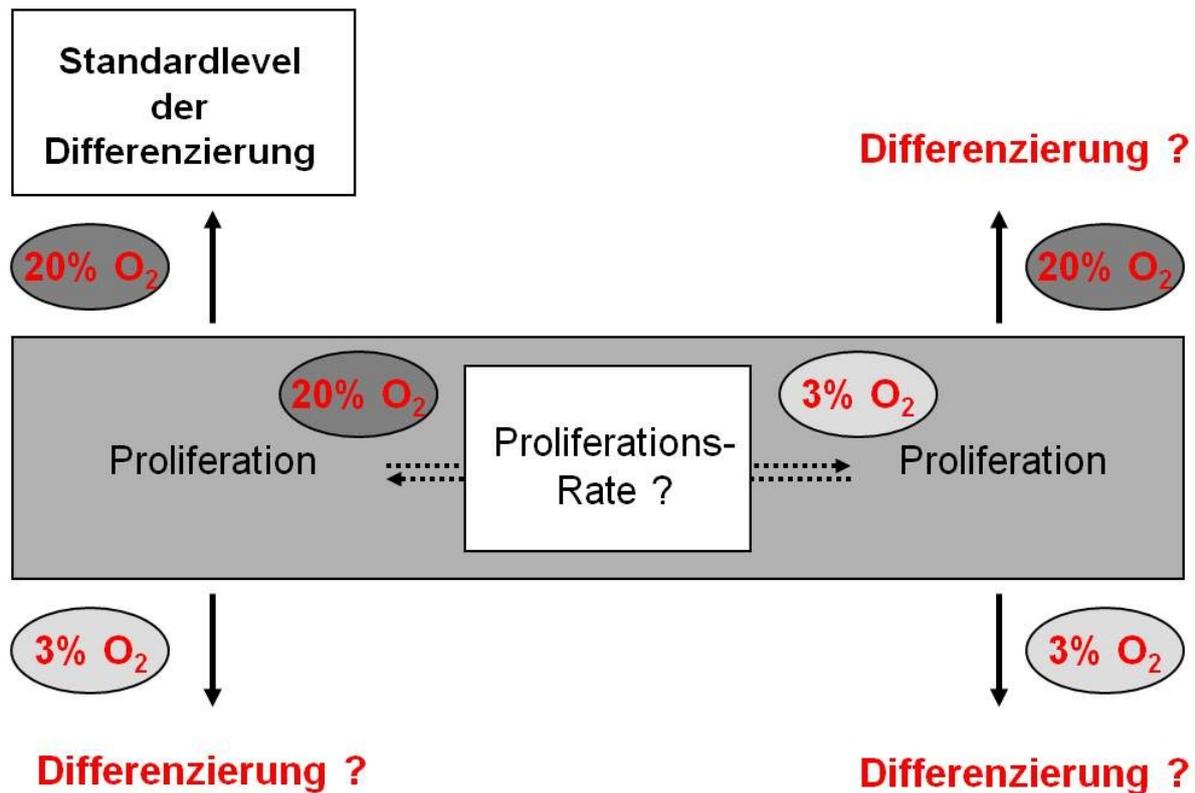


Abb. 4.13: Schema zum Versuchsaufbau. Kann die Proliferation oder Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen die Zahl der Neuronen beeinflussen? Die hNPZ wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Hypoxie ausgesetzt. Ausgehend vom Standardlevel bei Proliferation und Differenzierung unter normoxischen Bedingungen sollte untersucht werden, unter welchen Konditionen Hypoxie die Differenzierung der hNPZ weiter induzieren konnte.

4.5.2 Induktion der neuronalen Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen

Niedrige Sauerstofflevel fördern die neuronale Differenzierung von NPZ

Als nächstes wurde der Effekt von niedrigem Sauerstoffgehalt auf die neuronale Differenzierung mittels durchflusszytometrischer Analyse von betaIII-Tubulin⁺ Zellen untersucht. Nach dem Entzug der Wachstumsfaktoren wurden die hNPZ entweder bei 20% oder 3% Sauerstoff vier Tage lang differenziert und jeden Tag Proben genommen. Da diese Zellen innerhalb kurzer Zeit differenzierten, waren der dritte und vierte Tag der Differenzierung die wichtigsten Zeitpunkte für die Analyse. Für dieses Experiment wurden zusätzliche Kulturbedingungen einbezogen. Zuerst proliferierten die Zellen bei 20% Sauerstoff und differenzierten dann entweder bei 20% oder 3% Sauerstoff. Gleichzeitig wurde bei allen Bedingungen 10 und 100 IE/ml ERYPO ab dem Beginn der Differenzierung

Ergebnisse

appliziert. 100 IE/ml ERYPO wurde gewählt, da die hNPZ bei dieser Konzentration beim WST1-Assay sowohl bei Normoxie als auch Hypoxie auf die Applikation reagierten. 10 IE/ml ERYPO wurde gewählt, da dieser Wert aus der Literatur bekannt war (Studer et al., 2000). Generell sah man einen Anstieg der neuronalen Differenzierung über die Zeit vom ersten bis zum dritten Tagen Differenzierung (Abb. 4.14), diese Zunahme an Neuronen stagniert jedoch am vierten Tag der Differenzierung. Während der ersten zwei Tage differenzierten die Zellen unabhängig von der Bedingung, ob mit oder ohne ERYPO oder Hypoxie, gleich. Erst am dritten Tag der Differenzierung ließ sich erkennen, dass Hypoxie die Expression von β III-Tubulin und somit die Differenzierung signifikant erhöhte. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich die maximale Anzahl der Neurone unter hypoxischen Bedingungen mit einer fast zweifachen Zunahme, mit $4,51 \pm 0,45\%$ im Vergleich zu $2,61 \pm 0,31\%$ bei Normoxie. Die Applikation von ERYPO führte zu keiner Veränderung der Anzahl der Neurone. Am vierten Tag der Differenzierung verringerte sich der Anteil der β III-tubulin-positiven Zellen unter Hypoxie. Zu diesem Zeitpunkt gab es keine Unterschiede in der Neuronenanzahl. Diese Ergebnisse wiesen auf einen neurogenetischen Effekt der Hypoxie hin, der am dritten Tag der Differenzierung seinen maximalen Ausdruck fand.

3d Diff	20% O₂	3% O₂	4d Diff	20% O₂	3% O₂
<i>Kontrolle</i>	$2,95 \pm 0,26\%$	$4,51 \pm 0,45\%$	<i>Kontrolle</i>	$3,24 \pm 0,46\%$	$3,20 \pm 0,69\%$
<i>10 IE/ml</i>	$3,61 \pm 1,17\%$	$5,15 \pm 0,47\%$	<i>10 IE/ml</i>	$4,00 \pm 1,11\%$	$3,10 \pm 0,45\%$
<i>100 IE/ml</i>	$3,03 \pm 0,77\%$	$4,24 \pm 0,75\%$	<i>100 IE/ml</i>	$3,75 \pm 0,70\%$	$3,05 \pm 0,53\%$

Tab. 4.6: Vergleich der β III-Tubulin⁺ hNPZ nach drei und vier Tagen Differenzierung bei Normoxie und Hypoxie während der Differenzierung (Mittelwert \pm SEM, n=3-5). Das Maximum der Anzahl der Neurone war nach drei Tagen Differenzierung erreicht.

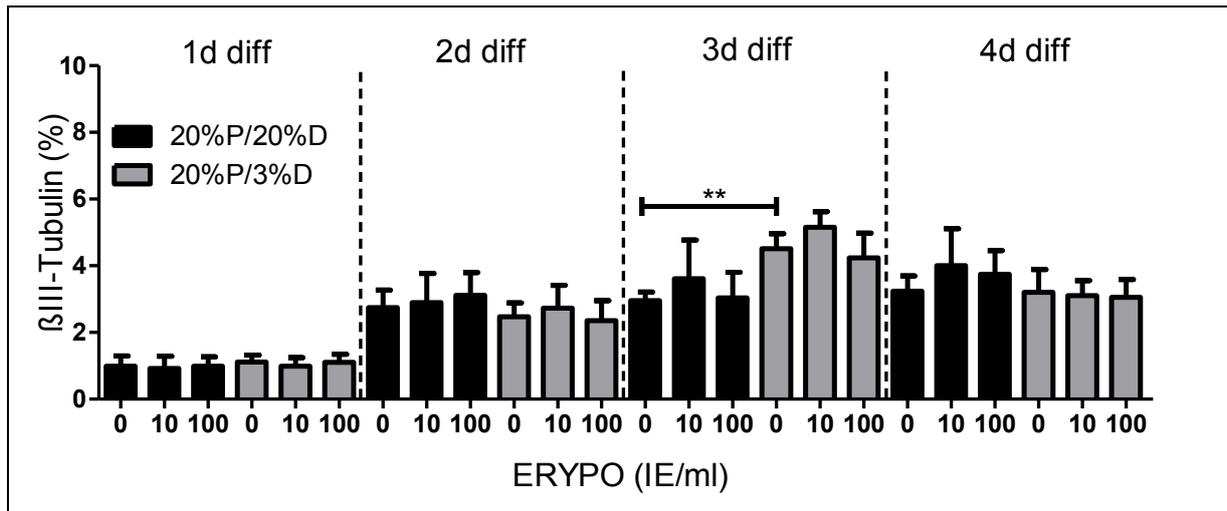


Abb. 4.14: Messung der β III-Tubulin⁺ hNPZ mit Durchflusszytometrie. Die hNPZ proliferierten bei Normoxie, nach Induktion der Differenzierung wurde entweder ERYPO appliziert, Hypoxie induziert oder beide Bedingungen parallel durchgeführt. Am dritten Tag der Differenzierung erhöhte Hypoxie die Anzahl der Neurone signifikant (Mittelwert \pm SEM, n=3-5, $p^{**}<0,01$), ERYPO zeigte keinen Einfluss auf die Anzahl der Neurone.

4.5.3 Induktion der β III-Tubulin⁺-Neurone durch Proliferation in Hypoxie

Alternativ wurden Zellen bei 3% Sauerstoff proliferiert und dann erfolgte ebenfalls ein Wechsel zu 20% und 3% Sauerstoff ab dem Beginn der Differenzierung. Um den Einfluss der Hypoxie näher zu untersuchen, wurden die proliferierenden Zellen bei Hypoxie kultiviert, mit einer anschließenden Differenzierung bei 20% und 3% Sauerstoff. In Abbildung 4.15 zeigen ist ein Anstieg der β III-Tubulin⁺ Zellen an Tag drei und vier der Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle bei 20% O₂ zu sehen (siehe auch Tab. 4.7). Weiterhin wurde der Einfluss von ERYPO in verschiedenen Konzentrationen (10 IE/ml und 100 IE/ml) auf die neuronale Differenzierung untersucht, allerdings konnte bei keiner Bedingung eine Änderung in der Anzahl der Neurone detektiert werden.

<i>3d Diff</i>	3% O ₂	20% O ₂	<i>4d Diff</i>	3% O ₂	20% O ₂
<i>Kontrolle</i>	5,92 ± 1,66%	5,21 ± 1,07%	<i>Kontrolle</i>	4,71 ± 0,80%	5,12 ± 1,44%
<i>10 IE/ml</i>	6,73 ± 1,77%	5,58 ± 1,36%	<i>10 IE/ml</i>	5,23 ± 0,79%	3,90 ± 1,12%
<i>100 IE/ml</i>	6,55 ± 2,38%	5,02 ± 1,18%	<i>100 IE/ml</i>	4,15 ± 0,32%	4,13 ± 0,92%

Tab. 4.7: Vergleich der β III-Tubulin⁺ hNPZ. Die Zellen proliferierten unter hypoxischen Bedingungen, mit Beginn der Differenzierung wurden sie entweder Normoxie oder weiterhin Hypoxie ausgesetzt. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen (Mittelwert ± SEM, N=3-5).

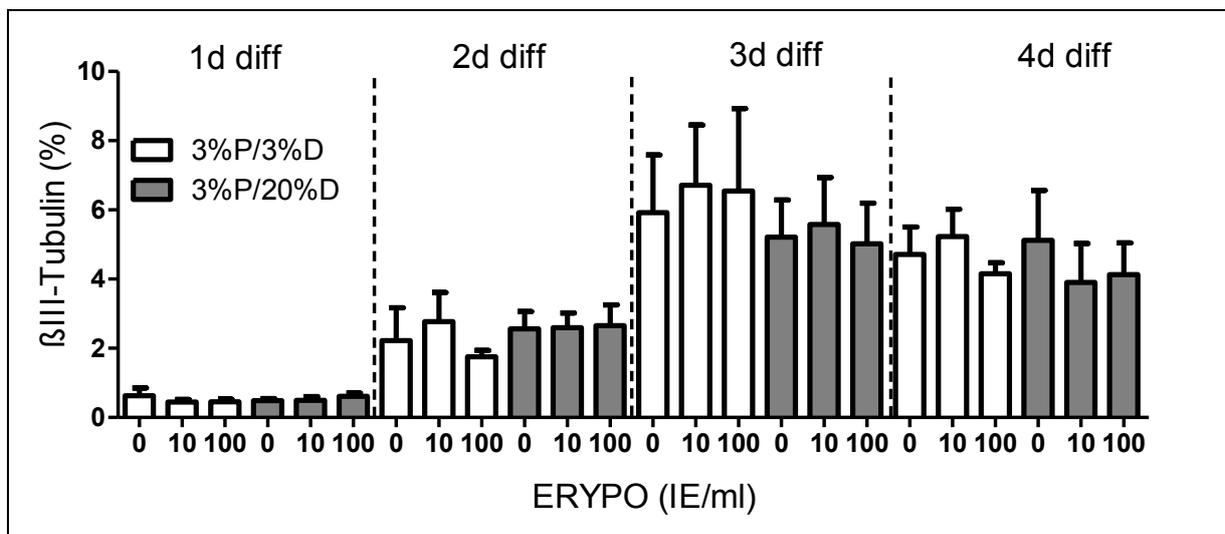


Abb. 4.15: Durchflusszytometrische Bestimmung der β III-Tubulin⁺ hNPZ, die bei Hypoxie proliferierten und bei denen nach Induktion der Differenzierung entweder ERYPO, Hypoxie oder beides induziert wurde. Der Wechsel zur Normoxie nach Induktion der Differenzierung führte zu keiner Veränderung der Neuronenanzahl im Vergleich zur kontinuierlichen Zellkultur bei Hypoxie (Mittelwert ± SEM, n=3-5).

4.5.4 Vergleich der neuronalen Differenzierung unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen

Abbildung 4.16 zeigt eine Zusammenfassung der verschiedenen Sauerstoffbedingungen am dritten und vierten Tag der Differenzierung. Am dritten Tag war die Anzahl der Neurone, die unter hypoxischen Bedingungen differenzierten signifikant auf $4,51 \pm 0,45\%$ erhöht, im Vergleich zu VM-Zellen, die ausschließlich bei Normoxie kultiviert wurden. Diese hatten einen neuronalen Anteil von $2,95 \pm 0,26\%$ β III-Tubulin⁺ Neurone. Ebenso erhöhte die

Ergebnisse

Proliferation unter Hypoxie die Anzahl der Neurone. Wenn die Differenzierung ebenfalls unter Hypoxie erfolgte, waren $5,92 \pm 1,66\%$ dieser Zellen positiv für β III-Tubulin, bei einer Differenzierung unter Normoxie waren $5,20 \pm 0,87\%$ β III-Tubulin⁺ (Tab. 4.8).

Kondition	3d Differenzierung	4d Differenzierung
20%P/20%D	$2,95 \pm 0,26\%$	$3,24 \pm 0,46\%$
20%P/3%D	$4,51 \pm 0,45\%$	$3,20 \pm 0,69\%$
3%P/20%D	$5,20 \pm 0,87\%$	$4,74 \pm 1,24\%$
3%P/3%D	$5,92 \pm 1,66\%$	$4,71 \pm 0,80\%$

Tab. 4.8: Vergleich der β III-Tubulin⁺ hNPZ, die zu verschiedenen Zeitpunkten (während der Proliferation oder Differenzierung oder beiden Bedingungen) der Hypoxie ausgesetzt wurden (Mittelwert \pm SEM, n=3-5). Hypoxie konnte in beiden Bedingungen die Anzahl der Neurone am dritten Tag der Differenzierung erhöhen, eine Kombination von Hypoxie bei der Proliferation und Differenzierung hatte jedoch keinen additiven Effekt. Die Neuronenzahl bei den verschiedenen hypoxischen Kulturbedingungen unterschied sich nicht signifikant voneinander.

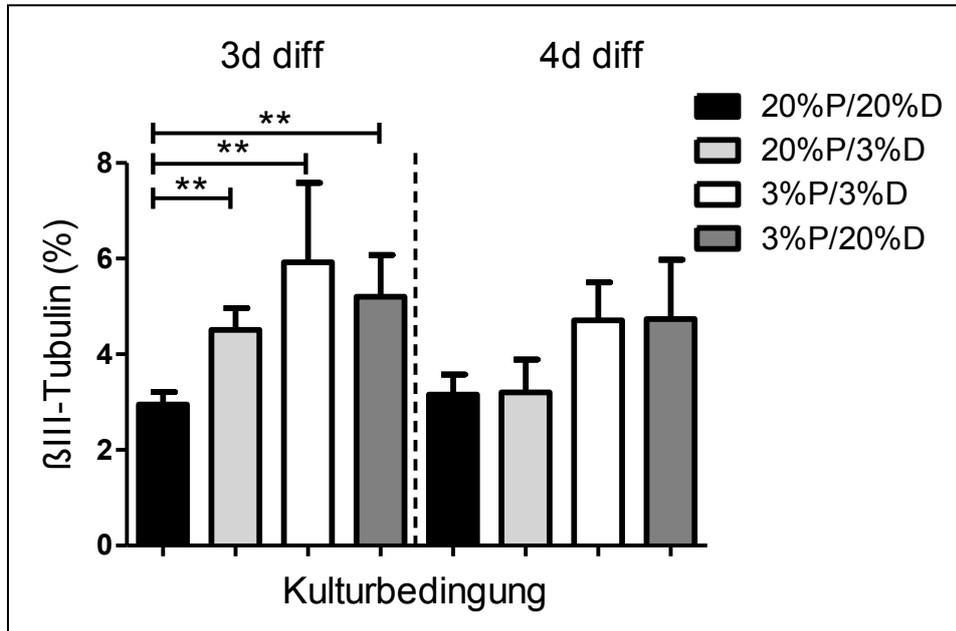


Abb. 4.16: Vergleich aller normoxischen und hypoxischen Zellkulturbedingungen am dritten und vierten Tag der Differenzierung. Unabhängig vom Zeitpunkt der Hypoxie – während der Proliferation oder der Differenzierung – führte dies zu einer signifikanten Erhöhung der Neurone. (Mittelwert \pm SEM, n=3-5, p^{**}<0,01)

<i>3d Diff</i>	20% O ₂	3% O ₂	<i>4d Diff</i>	20% O ₂	3% O ₂
<i>Kontrolle</i>	13,85 ± 2,12%	12,64 ± 3,18%	<i>Kontrolle</i>	32,43 ± 4,26%	15,82 ± 4,65%*
<i>10 IE/ml</i>	17,12 ± 2,09%	18,12 ± 5,26%	<i>10 IE/ml</i>	18,80 ± 2,17%*	18,06 ± 5,38%
<i>100 IE/ml</i>	20,94 ± 8,64%	25,14 ± 11,82%	<i>100 IE/ml</i>	28,25 ± 10,07%	32,03 ± 8,15%

Tab. 4.9: Vergleich der apoptotischen Zellen nach drei und vier Tagen Differenzierung bei Normoxie, Hypoxie und EPO-Applikation (Mittelwert ± SEM, n=3-5). Sowohl EPO als auch Hypoxie reduzierten am vierten Tag die Anzahl der apoptotischen Zellen, EPO wirkte aber während der Hypoxie nicht additiv und führt dann zu keinem weiteren Effekt (s. Abb. 4.18).

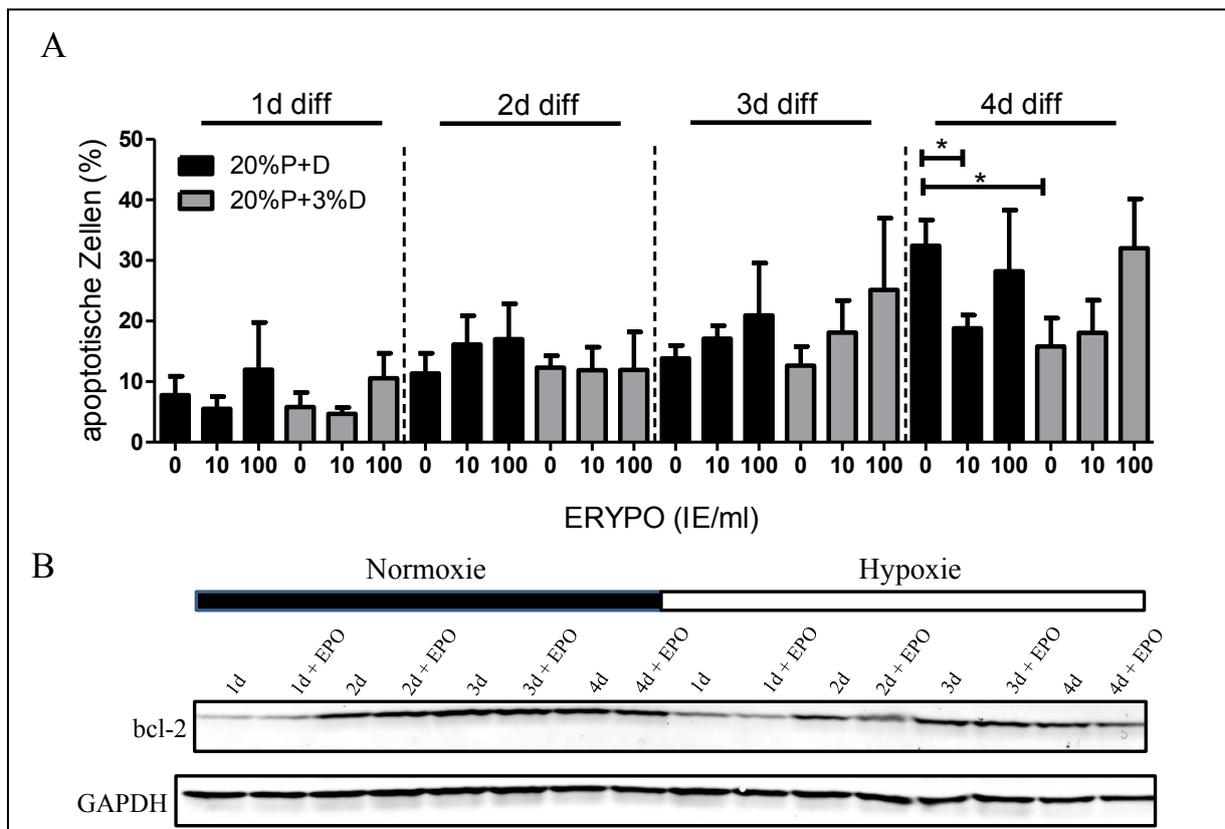


Abb. 4.18 (A) TUNEL-Analyse der hNPZ. Im Verlauf der Differenzierung stieg die Apoptoserate auf $32,43 \pm 4,26\%$ (20% O₂) an, dies kann jedoch durch Applikation von Hypoxie oder EPO am vierten Tag der Differenzierung reduziert werden. **(B)** zeigt die Expression des anti-apoptischen Proteins bcl-2 im Zeitverlauf mit Applikation von EPO und auch Hypoxie (Mittelwert ± SEM, n=3-5, p* < 0,05).

4.7 Die β -Catenin-Akkumulation durch Erythropoetin und Hypoxie bei hNPZ

Da gezeigt wurde, dass sowohl EPO als auch Hypoxie anti-apoptotisch auf hNPZ wirken können, stellt sich nun die Frage, über welchen Signalweg dies passieren könnte. EPO reguliert nicht nur die Erythropoese und agiert als anti-apoptotisches Agens, sondern kann auch als GSK-Inhibitor fungieren (Maiese et al., 2005). Wenn die GSK3 β durch Substanzen – wie zum Beispiel EPO – blockiert wird, akkumuliert daraufhin β -Catenin und kann in den Zellkern translozieren und Zielgene aus dem Wnt-Pathway aktivieren, der wiederum vielfältige Prozesse, wie Proliferation oder Differenzierung, beeinflussen. Daher wurde als nächstes mittels ELISA-Assay die β -Catenin-Akkumulation nach Applikation von EPO und Hypoxie mittels ELISA-Assay bestimmt, um zu determinieren, ob EPO als GSK-Inhibitor in hNPZ fungieren kann oder auch Hypoxie den Wnt-Signalweg beeinflussen kann. Es war kein Unterschied in der β -Catenin-Akkumulation zu beobachten (Tab. 4.10). Zum Vergleich wurden die Konzentrationen auf die β -Cateninmenge in proliferierenden Zellen normiert.

Kondition	20% O₂	3% O₂
<i>Prol. Zellen</i>	1,00 ± 0,02	-
<i>Kontrolle</i>	1,90 ± 0,51	3,21 ± 1,44
<i>10 IE/ml</i>	1,82 ± 0,51	2,64 ± 0,79
<i>100 IE/ml</i>	2,94 ± 0,69	3,12 ± 1,04

Tab. 4.10: Vergleich der β -Catenin-Expression bei Normoxie und Hypoxie in relativen Einheiten (Mittelwert ± SEM, n=3). Der Anstieg der β -Catenin-Expression war nicht signifikant.

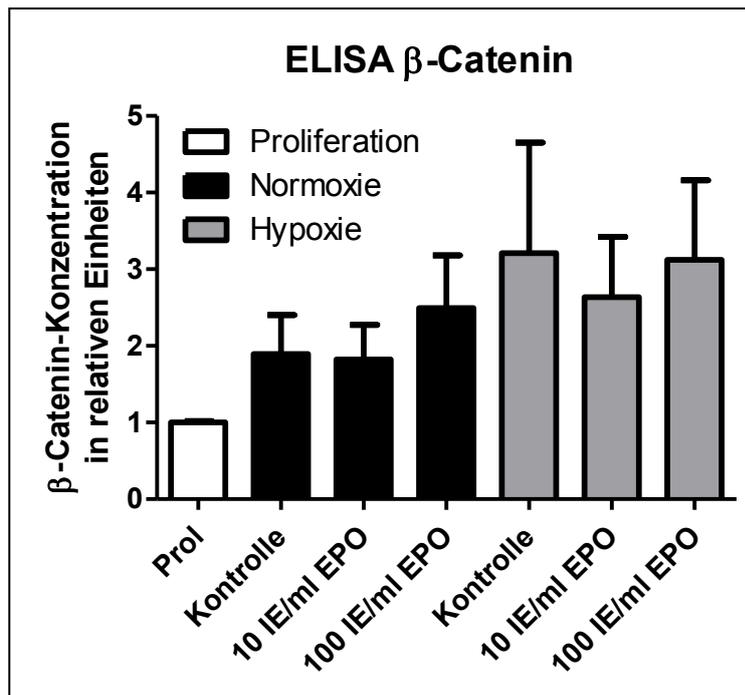


Abb. 4.19: β -Catenin-Konzentration in den Zellen während der Proliferation und nach 2h Differenzierung mit 10 IE/ml EPO, 100 IE/ml EPO sowie Hypoxie. Es gab keine signifikante Veränderung der β -Catenin-Akkumulation bei EPO-Applikation und Hypoxie (Mittelwert \pm SEM, n=3).

4.8 Induktion der TCF-Aktivität durch Erythropoetin

Da EPO ein bekannter GSK-Inhibitor ist, wurde nachfolgend mittels Reporter-Gen-Assay die TCF-Aktivität bestimmt. Durch die Inhibition von GSK-3 β wird die Degradation des konstitutiv exprimierten β -Catenins inhibiert, woraufhin dieses in den Zellkern transloziert wird. Dort erfolgt die Aktivierung von Wnt-Zielgenen über eine Bindung des β -Catenins an die Transkriptionsfaktoren TCF (T-cell factor) und LEF (lymphoid enhancer binding factor). Die Quantifizierung der TCF-Aktivität erfolgte nachdem die hNPZs mit den Vektoren TOPFlash, der 12 TCF-Bindungsstellen enthält, und FOPFlash, der eine mutierte TCF-Bindungsstelle enthält, transfiziert wurden. Nach der Transfektion der Zellen proliferierten diese zunächst 24h. Mit Beginn der Differenzierung erfolgte die Applikation von EPO für weitere 24h. Die Ausgangsaktivität des TCFs wurde mit der TCF-Aktivität nach EPO-Applikation sowie Kotransfektion mit pCAGGS-S33Y, einer mutierten, stabilisierten β -Catenin-Form verglichen. Es konnte jedoch keine signifikante Änderung der TCF-Aktivität registriert werden (Tab. 4.11, Abb. 4.20).

<i>ERYPO</i>	<i>TOP</i>	<i>TOP + S33Y</i>
<i>Kontrolle</i>	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<i>10 IE/ml</i>	0,98 ± 0,20	2,83 ± 1,78
<i>100 IE/ml</i>	0,82 ± 0,28	1,27 ± 0,39

Tab. 4.11: TCF-Aktivität in relativen Einheiten. Der Reporter-Gen-Assay allein zeigte keine gesteigerte TCF-Aktivität, erst bei Ko-Transfektion mit einem stabilisierten β -Catenin konnte eine erhöhte Aktivität gemessen werden, diese war aber nicht signifikant (Mittelwert \pm SEM, n=3).

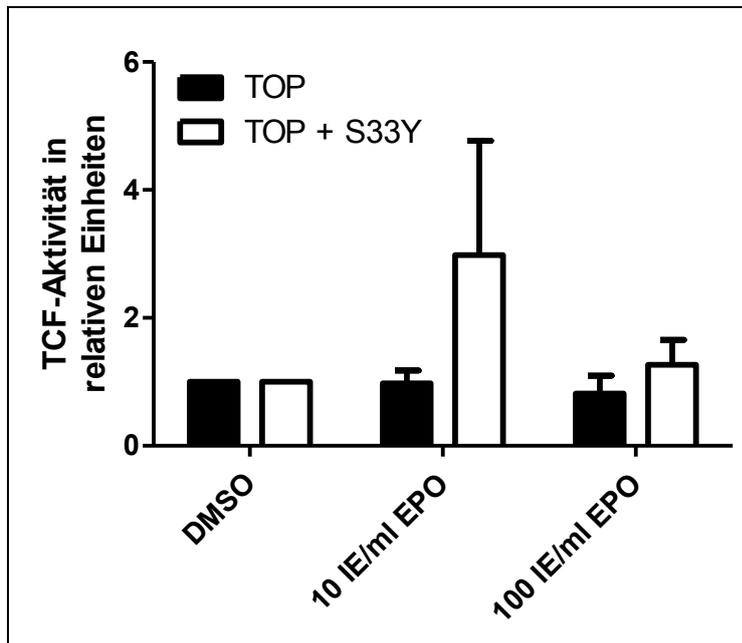


Abb. 4.20: TCF-Aktivität von hNPZ nach Applikation von 10 IE/ml und 100 IE/ml EPO 24h nach Induktion der Differenzierung. Weder EPO allein noch die Ko-Transfektion mit S33Y, einem stabilisierten β -Catenin, führten zu einer Induktion der TCF-Aktivität (Mittelwert \pm SEM, n=3).

4.9 CEPO – ein neuroprotektives Erythropoetin

4.9.1 Konstante Proliferationsrate von hNPZ nach Exposition mit CEPO

Es gibt zahlreiche Ansätze die Aktivität und Spezifität von EPO zu steigern, so gibt es modifizierte EPO-Moleküle wie Darbepoetin- α und CERA (Continuous Erythropoiesis Receptor Activator), aber auch nicht-hämatopoetische EPO-Derivate wie Asialo-EPO und carbamylisiertes EPO. CEPO wird durch die Carbamylierung der Lysinreste des EPO-Moleküls

Ergebnisse

hergestellt. Diese Veränderung des Ausgangsmoleküls bewirkt einen Verlust der hämatopoetischen Eigenschaften, bei erhaltenen zytoprotektiven Eigenschaften. Es wurde insbesondere beschrieben, dass CEPO neuroprotektive Eigenschaften haben soll. Daher wurde CEPO analog zu EPO untersucht.



Abb. 4.21: Schema zum Versuchsaufbau. Kann CEPO die Proliferationsrate der hNPZ bei Normoxie oder Hypoxie beeinflussen?

Als erstes wurde die Proliferation von hNPZ unter normalen Zellkulturbedingungen im Vergleich zur Applikation von EPO, CEPO und Hypoxie untersucht (Abb. 4.21). Weder EPO noch 400 ng/ml oder 800 ng/ml CEPO oder die Exposition der Zellen unter Hypoxie führten zu einer Änderung der Proliferationsrate (Tab. 4.12, Abb. 4.22), wohingegen 2400 ng/ml CEPO die Proliferationsrate signifikant verlangsamte ($p < 0,05$).

Kondition	20% O₂	3% O₂
<i>Kontrolle</i>	20,57 ± 1,42h	24,01 ± 2,83h
<i>EPO</i>	20,31 ± 1,02h	27,97 ± 6,98h
<i>400 ng/ml CEPO</i>	20,84 ± 1,50h	22,88 ± 2,14h
<i>800 ng/ml CEPO</i>	20,95 ± 1,31h	28,75 ± 3,93h
<i>2400 ng/ml CEPO</i>	26,95 ± 1,25h	37,34 ± 8,42h

Tab. 4.12: Verdopplungszeiten von hNPZ nach Anwendung von EPO und CEPO im Vergleich. Die Verdopplungszeit blieb unverändert, bis auf eine Verlangsamung bei Applikation von 2400 g/ml CEPO (Mittelwert ± SEM, n=4) (s. Abb. 4.22).

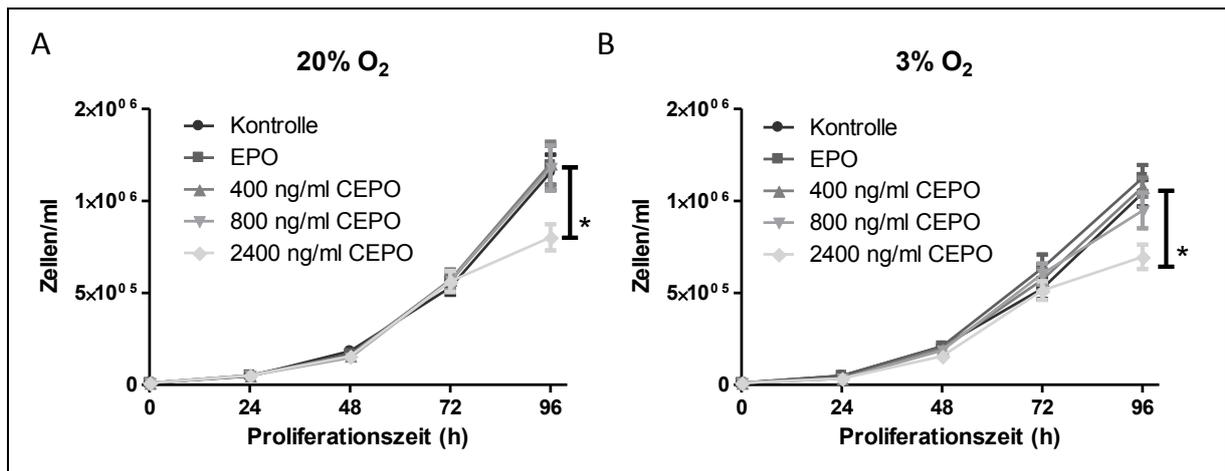


Abb. 4.22: Proliferationsrate der hNPZ nach Applikation von EPO und CEPO bei Normoxie (A) und Hypoxie (B). Unter beiden Bedingungen führten 2400 ng/ml CEPO zu einer signifikanten Inhibition der Proliferationsrate (Mittelwert \pm SEM, n=4, $p^* < 0,05$).

4.9.2 Konstante metabolische Aktivität der hNPZ nach Applikation von CEPO

Wie schon zuvor bei der Analyse der metabolischen Aktivität der hNPCs unter Einfluss von EPO wurde 24h nach der Applikation von CEPO die metabolische Aktivität mittels WST1-Assay bestimmt und auf die Kontrolle normiert (Abb. 4.23). Weder unter Normoxie noch Hypoxie führte die Anwendung von CEPO zu einer Veränderung der metabolischen Aktivität (Tab. 4.13, Abb. 4.24).

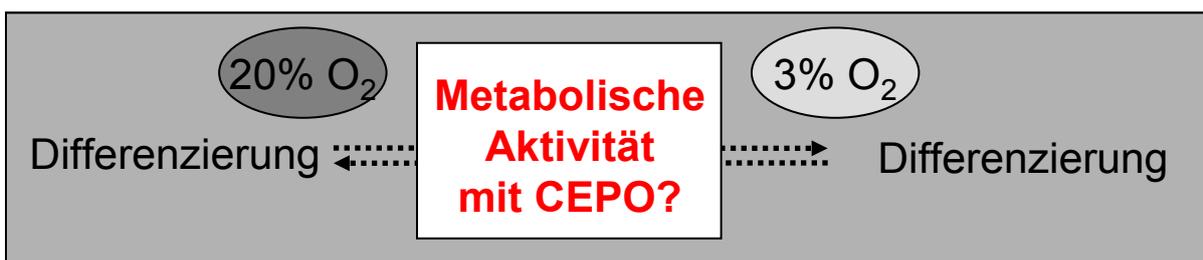


Abb. 4.23: Schema zum Versuchsaufbau. Welchen Einfluss haben CEPO und Hypoxie während der Differenzierung auf die metabolische Aktivität der hNPZ?

Kondition	20% O₂	3% O₂
<i>Kontrolle</i>	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<i>40 ng/ml</i>	1,11 ± 0,11	1,26 ± 0,14
<i>80 ng/ml</i>	1,10 ± 0,13	1,27 ± 0,14
<i>200 ng/ml</i>	1,14 ± 0,14	1,04 ± 0,35
<i>400 ng/ml</i>	1,11 ± 0,10	1,28 ± 0,20
<i>800 ng/ml</i>	1,15 ± 0,09	1,23 ± 0,19
<i>2400 ng/ml</i>	1,10 ± 0,06	1,16 ± 0,18

Tab. 4.13: Vergleich der metabolischen Aktivitäten der hNPZ nach Anwendung verschiedener Konzentrationen CEPO. Es ließ sich keine Veränderung der metabolischen Aktivität feststellen (Mittelwert ± SEM, n=4).

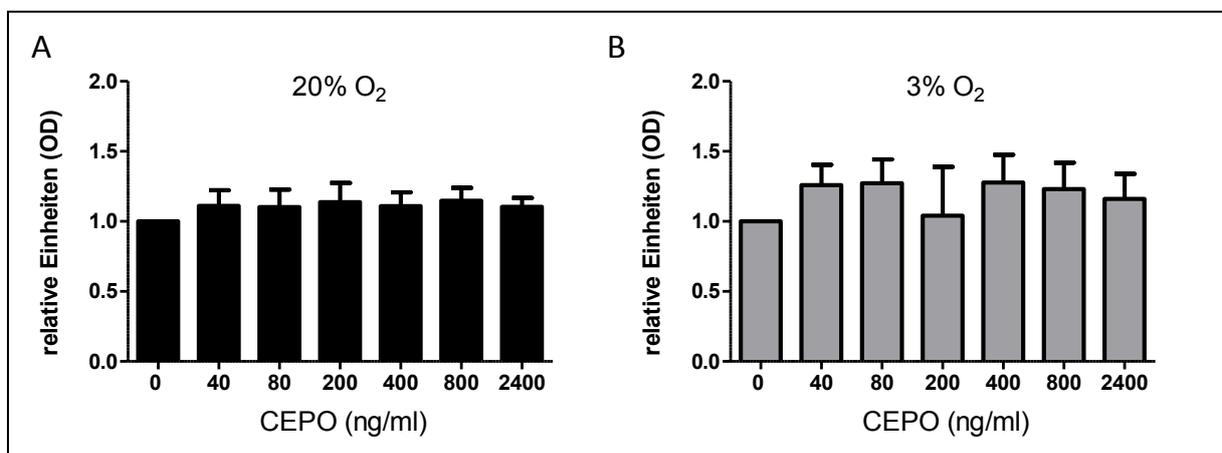


Abb. 4.24: Metabolische Aktivität der hNPZ nach Applikation von CEPO bei Normoxie (A) und Hypoxie (B). Es besteht keine signifikante Änderung der metabolischen Aktivität (Mittelwert ± SEM, n=4).

4.9.3 Kombination von CEPO und Hypoxie erhält die neuronale Differenzierung der hNPZ



Abb. 4.25: Schema zum Versuchsaufbau. Welchen Einfluss haben CEPO und Hypoxie auf die Differenzierung der Neurone?

Ergebnisse

Abschließend wurde die neuronale Differenzierung nach Applikation von CEPO im Vergleich zu EPO und Hypoxie untersucht (Abb. 4.25). Mittels Durchflusszytometrie wurde die β III-Tubulin-Expression während der Differenzierung über einen Zeitraum von 4 Tagen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen beobachtet. Unter Kontrollbedingungen zeigt sich ein Anstieg der Differenzierung mit einem Maximum an Tag 3 der Differenzierung. Am 3. Tag wird unter Hypoxie eine erhöhte Anzahl von Neuronen beobachtet, die jedoch nicht durch die Anwendung von CEPO oder EPO erhöht wurde (Tab. 4.14). Wie zuvor beschrieben, nimmt an Tag 4 der Differenzierung die Zahl der Neuronen ab, was vorher weder durch EPO noch Hypoxie kompensiert werden konnte (Abb. 4.26). Interessanterweise führt hier die Kombination von Hypoxie und CEPO zu einer zur höchsten Anzahl von Neuronen ($p < 0,05$) und zum anderen gibt es keinen signifikanten Unterschied zu der Zellzahl vom Vortag (3d: CEPO: $4,74 \pm 0,66\%$ (3% O₂) versus $4,03 \pm 0,60$ (3% O₂) ($p < 0,57$)).

<i>3d Diff</i>	<i>20% O₂</i>	<i>3% O₂</i>	<i>4d Diff</i>	<i>20% O₂</i>	<i>3% O₂</i>
<i>Kontrolle</i>	$3,36 \pm 0,29\%$	$4,41 \pm 0,25\%$	<i>Kontrolle</i>	$2,56 \pm 0,25\%$	$3,14 \pm 0,25\%$
<i>EPO</i>	$3,01 \pm 0,45\%$	$4,45 \pm 0,29\%$	<i>10 IE/ml</i>	$3,38 \pm 0,31\%$	$3,10 \pm 0,33\%$
<i>CEPO</i>	$3,48 \pm 0,95\%$	$4,74 \pm 0,66\%$	<i>100 IE/ml</i>	$2,82 \pm 0,45\%$	$4,03 \pm 0,60\%$

Tab. 4.14: Vergleich der β III-Tubulin-Expression (%) der hNPZ nach drei und vier Tagen Differenzierung jeweils mit Hypoxie, EPO und CEPO. Die sonst zu beobachtende Verringerung der Anzahl der Neurone am vierten Tag der Differenzierung konnte durch eine Kombination von CEPO und Hypoxie verhindert werden (Mittelwert \pm SEM, n=3).

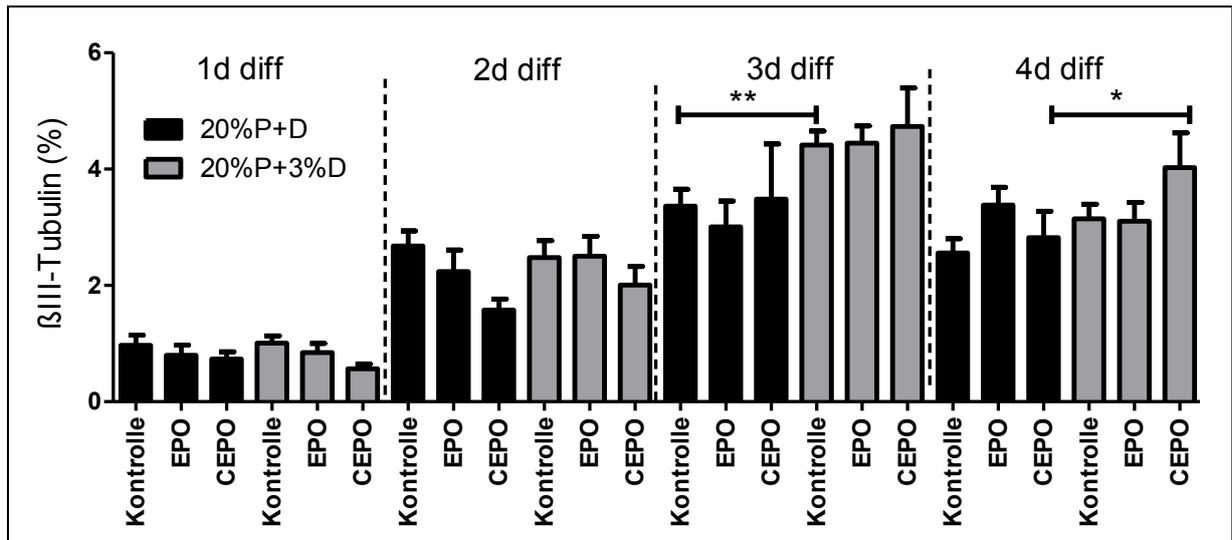


Abb. 4.26: Bestimmung der β III-Tubulin⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie. Während der Differenzierung akkumulierte die Zahl der Neuronen unter Kontrollbedingungen mit einem Maximum am 3. Tag der Differenzierung. Hypoxie steigerte die Zahl der Neurone, jedoch hatten EPO oder CEPO allein keinen Effekt auf die hNPZ. Am 4. Tag der Differenzierung konnte CEPO zusammen mit Hypoxie die Zellzahl auf dem vorherigen Level erhalten ($p < 0,53$), desweiteren war die Zahl der Neuronen im Vergleich zur Kontrolle signifikant höher ($p < 0,05$) (Mittelwert \pm SEM, $n=3$).

5 Diskussion

Die standardisierten Bedingungen einer neuronalen Zellkultur beinhalten neben einer konstanten Temperatur von 37°C, 5% CO₂ sowie Wachstumsfaktoren wie EGF und bFGF auch die Benutzung von 20% Sauerstoff (Donato et al., 2007). Es haben aber eine Reihe von Studien (Morrison et al., 2000, Storch et al., 2001) dargestellt, dass neuronale Zellkulturen von reduziertem Sauerstoffgehalt profitieren, da dies den physiologischen Bedingungen eher entspricht (Zhu et al., 2005).

Die Auswirkungen des reduzierten Sauerstoffgehaltes auf die Proliferation und Differenzierung von Stamm- und Progenitorzellen sind nicht auf das Zentralnervensystem (ZNS) limitiert (Studer et al., 2000, Zhou and Miller, 2006). Auch andere Zelltypen, wie zum Beispiel Knochenmarksstromazellen (Ren et al., 2006) und mesenchymalen Zellen (Xie et al., 2005), zeigen eine verbesserte Proliferation und Differenzierung unter hypoxischen Zellkulturbedingungen.

Ziel dieser Studie war es, die durch Hypoxie und EPO induzierten Veränderungen während Proliferation und Differenzierung zu charakterisieren und ein EPO-Derivat *in vitro* auf seine protektiven Eigenschaften hin zu untersuchen.

5.1 Expression von HIF-1 α und dem EPO-Rezeptor bei Hypoxie und EPO

Zuerst wurde in dieser Studie die Expression von HIF-1 α und des EPO-Rezeptors verifiziert. HIF-1 α ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der bei Normoxie kontinuierlich über den Ubiquitin-Proteasom-Komplex degradiert wird. Dieser Prozess wird bei Hypoxie inhibiert und HIF-1 α wird stabilisiert (Huang et al., 1998). Im Anschluss daran folgt die Heterodimerisierung mit HIF-1 β mit darauffolgender Translokation in den Nukleus und Bindung an das HRE mit Aktivierung von diversen Zielgenen, die eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase als Antwort auf Hypoxie spielen (Semenza et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde die HIF-1 α -Proteinexpression mittels Western Blot-Verfahren bestimmt (Abb. 4.1). Mit Induktion der Differenzierung wurden die Zellen der Hypoxie ausgesetzt und nach 1h, 3h sowie 1 bis 4 Tagen analysiert. Weder zu einem frühen Zeitpunkt

Diskussion

(1h-3h) noch die zusätzliche Applikation von EPO löste eine messbare Zunahme an HIF-1 α aus. Die Expression von HIF-1 α war generell sehr niedrig, so dass eine relative Quantifizierung des Expressionslevels im Vergleich zur Kontrollbande nicht möglich war. Zhao et al. (2008) beobachteten bei primären *mesenzephalen* Rattenzellkulturen eine Induktion von HIF-1 α 3h nach Exposition mit Hypoxie, mit einem Maximum nach 6h und war insgesamt über 3 Tage nachweisbar.

Hier konnte zwar eine Expression von HIF-1 α nachgewiesen werden, jedoch keine Induktion nach Exposition mit Hypoxie. Dies kann allerdings entweder durch die gewählten Zeitpunkte (1h-4d) bedingt sein, so dass eventuell auch eine Messung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α zu einem anderen Zeitpunkt nötig wäre, oder es ist eventuell auch HIF-2 α oder HIF-3 α an der Reaktion auf Hypoxie beteiligt. Pietras et al. (2009) wiesen nach, dass HIF-2 α eine Rolle spielt, humane Neuroblastomzellen-ähnliche Zellen, die aus der Neuralleiste gewonnen wurden, *in vitro* in einem undifferenzierten Zustand zu halten. Jedoch konnten Heidbreder et al. (2003) eine Hypoxie-abhängige transkriptionelle Induktion von HIF-3 α im *zerebralen Kortex* und *Hippocampus* von Ratten beobachten. So könnten auch hier diese beiden Faktoren – HIF-2 α und HIF-3 α – in die Reaktion auf Hypoxie involviert sein. Dennoch wird die Sensibilität der hNPZ für hypoxische Kulturbedingungen in dieser Studie durch die Expression von HIF-1 α indiziert.

Der EPO-Rezeptor wurde ebenfalls mittels Western Blot-Verfahren dargestellt (Abb. 4.2), da die verfügbaren EpoR-Antikörper nicht zu eindeutigen Resultaten mit der Immunzytochemie führen (Elliott et al., 2006, Kirkeby et al., 2007). Für die Quantifizierung wurden Proben nach 3 Tagen Differenzierung jeweils mit und ohne Hypoxie und EPO mit der Expression des EPO-Rezeptors bei der Proliferation unter normoxischen Bedingungen verglichen. Die EpoR-Expressionslevel wurden durch Differenzierung, die Applikation von Epo oder Hypoxie nicht verändert. Das Fehlen einer vermehrten EPO-Rezeptor-Expression ist vereinbar mit einer fehlenden Wirkung von Epo unter hypoxischen Bedingungen, auf die später noch eingegangen wird.

Obwohl die mangelnde Anpassung der EPO-Rezeptorexpression im Gegensatz zu Theus et al. (2008) steht, wo Hypoxie zu einer vermehrten EpoR-Expression führte, haben Milosevic et al. (2005) ebenfalls beobachtet, dass Hypoxie sich nicht auf die Epo-Signalwege und den EpoR auswirkt. Diese Inkonsistenz kann durch verschiedene Kulturbedingungen, wie die

Diskussion

Anwendung verschiedener Wachstumsfaktoren für die Zellkultur oder die Zelltypen selbst bedingt sein.

Zusammenfassend wurde die EPO-Rezeptor-Expression weder durch Epo selbst noch durch Hypoxie während der Proliferation oder Differenzierung verändert. Dies lässt den Schluss zu, dass der Effekt von Epo, und auch Hypoxie, auf die metabolische Aktivität und Apoptose unabhängig vom EpoR-Gehalt ist und nicht auf eine höhere Empfindlichkeit der Zellen auf Epo oder Hypoxie zurückzuführen ist. Insgesamt ist die Proliferation und Differenzierung der hNPZ, die in dieser Studie untersucht wurden Hypoxie-sensitiv und Epo-responsiv.

5.2 Proliferation von hNPZ mit Hypoxie und EPO

Nachdem die Expression von HIF-1 α und des EPO-Rezeptors bestätigt wurde, folgte die Untersuchung der Proliferation der hNPZ (Abb. 4.4 und Abb. 4.5). Dafür wurde die Zellzahl in Abhängigkeit von Normoxie, Hypoxie und EPO über einen Zeitraum von 4 Tagen bestimmt. Es wurden zwei verschiedene Arten von EPO (humanes rekombinantes EPO für den Laborbedarf und ERYPO, ein in der Klinik benutztes Medikament) verwendet. Weder hrEPO noch ERYPO veränderten die Zellzahl oder Verdopplungszeit signifikant. Obwohl 10 IE/ml ERYPO sich bei Normoxie und auch Hypoxie deutlich von der Kontrolle abhob, war dies nicht signifikant. Bei einem direkten Vergleich von in Normoxie und Hypoxie proliferierten Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Dies steht im Kontrast zu vorher veröffentlichten Studien, wie zum Beispiel von Studer et al. (2000). Dort wurde die Proliferation und Differenzierung von embryonalen mesencephalen Rattenzellen untersucht. Die Autoren zeigten, dass Hypoxie förderlich für die Zellkultur sei und Epo diesen Effekt unter normoxischen Bedingungen nachahmen konnte, da sie sowohl für EPO als auch Hypoxie eine vermehrte Zellproliferation, eine geringe Apoptoserate und eine gesteigerte neuronale Differenzierung zeigen konnten. Kürzlich beschrieben Santilli et al. (2010) eine verstärkte Proliferationsrate für hNPZ, obwohl der Zellzyklus selbst unverändert war, nachdem sie die Zellkultur milder Hypoxie ausgesetzt hatten. Im Gegensatz dazu beschrieben Chen et al. (2009) eine Reduktion der Proliferationsrate bei humanen embryonalen Stammzellen mit kurzen Zeiträumen für die Zellpassage. Ebenso registrierten Milosevic et al. (2005) erst nach einer Exposition mit Hypoxie über einen Zeitraum von

Diskussion

einem Monat eine Veränderung der Proliferationsrate von murinen mesenzephalen NPZ, jedoch nicht vor diesem Zeitpunkt.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die untersuchten mit EPO und Hypoxie behandelten hNPZ ihre Proliferationsrate im Gegensatz zu Literatur über murine NPZ nicht veränderten. Dies kann unterschiedlich Ursachen haben. Zum einen kann es sich um einen Spezies-spezifischen Effekt der Hypoxie oder von EPO handeln, zum anderen könnte ein anderer Versuchsaufbau mit veränderten Proliferationszeiten die Ursache dafür sein, dass in dieser Arbeit Hypoxie und EPO nicht das Zellwachstum beschleunigen konnten. Desweiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht dieselbe Nachweismethode wie in der Literatur (Studer et al., 2000) gewählt, daher kann auch darin dieser Unterschied begründet sein. Ein weiterer sehr wichtiger Ansatzpunkt für die Erklärung abweichender Resultate in dieser Arbeit ist einer zelltyp-spezifischen Wirkungsweise von EPO und Hypoxie begründet. So müssen EPO und Hypoxie nicht in jedem Zelltyp – humane Zellen im Vergleich zu murinen Zellen; fetale im Vergleich zu embryonalen Zellen; mesenzephal hNPZ im Vergleich zu hNPZ anderen Ursprungs – dieselbe Reaktion hervorrufen. Dies ist auch von anderen Signalstoffen im Körper bekannt. Ein wichtiges Beispiele hierfür ist der proapoptotische Protein p53, das normalerweise den Zellzyklus reguliert und bei diversen Tumorerkrankungen eine unterschiedlich starke Rolle bei der Pathogenese einnimmt. Bei dem hepatozellulären Karzinom ist bei über der Hälfte der Patienten das p53-Gen intakt (Nishida et al., 2011), während bei dem Adenokarzinom der Lunge sich bei über 60% der Patienten eine Mutation des entsprechenden Gens findet (Cakir et al., 2011).

5.3 Erhöhte Differenzierung durch Hypoxie bei hNPZ

Die Differenzierung der humanen neuronalen Stammzellen wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Zuerst wurde die metabolische Aktivität der differenzierten hNPZ mit und ohne EPO untersucht. Ein EPO-Effekt wurde in früh differenzierten Zellen nach 1 Tag Differenzierung nachgewiesen (Abb. 4.8). Erstaunlicherweise wurde bei 3% Sauerstoff eine höhere Konzentration von Epo benötigt, um eine ähnliche Wirkung zu induzieren. Dies zeigt, dass Hypoxie nur zum Teil über den Epo-Signalweg agiert und das Epo diesen Effekt der Hypoxie unter normoxischen Bedingungen nachahmen kann.

Diskussion

Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass Hypoxie die metabolische Aktivität in hNPZ erhöhen kann, am stärksten kam dies nach einem Tag Differenzierung im Vergleich zu 3 Tagen Differenzierung zu tragen, was die Wichtigkeit der Rolle von Hypoxie und EPO in frühen Differenzierungsprozesse hervorhebt (Abb. 4.9). Zwar wurde unter anderem von Studer et al. (2000) berichtet, dass Epo die Folgen der Hypoxie bei normalen Zellkulturbedingungen mit 20% Sauerstoff in embryonalen Maus-NPZ imitiert, allerdings wurde dies bisher noch nicht für die metabolische Aktivität untersucht.

Zur weiteren Untersuchung der Differenzierung wurde der Zellzyklus unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen analysiert (Abb. 4.12). Diese Analyse zeigte, dass die Zellen etwa 20 Stunden benötigten, um in die G1-Phase einzutreten, wobei dieser Zeitrahmen zwischen normoxisch und hypoxisch kultivierten Zellen ähnlich war. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten über den Zellzyklus aus murinen mesencephalen NPZ überein, die zeigten, dass der Zellzyklus, die Proliferation sowie die Formation von Neurosphären sich nicht innerhalb von 4 Wochen in hypoxischer Zellkultur veränderten (Milosevic et al., 2005). Ähnliche Resultate wurden von Santilli et al. (2010) beobachtet, die ebenso keine Auswirkung der Hypoxie auf den Zellzyklus von hNPZ demonstrieren konnten. Diese Ergebnisse sind wichtig, um die Expression von β III-Tubulin, als Marker für die neuronale Differenzierung weiter interpretieren zu können. Da die Zellen zum selben Zeitpunkt in die Differenzierung eintreten, sind Unterschiede in der neuronalen Differenzierung nicht durch einen anderen Zeitpunkt für den Eintritt in die Differenzierung bedingt.

Für die Untersuchung der neuronalen Differenzierung erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung von β III-Tubulin (Abb. 4.14 und Abb. 4.15). Die differenzierten hNPZ wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen jeweils mit und ohne EPO und Hypoxie beobachtet.

In dieser Studie hat EPO die Differenzierung in hNPZ über einen Zeitraum von 4 Tagen nicht verändert. Dies steht im Kontrast zu Daten über murine mesencephale Progenitorzellen (Studer et al., 2000) bei denen EPO die Anzahl der Neurone bei Normoxie erhöhte. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte der Fakt sein, dass verschiedene Modellsysteme (murin versus human) benutzt wurden. Es wurde aber bereits einmal durch Kanaan et al. (2006) berichtet, dass EPO *in vitro* keinen Effekt auf die dopaminerge Differenzierung hatte, jedoch *in vivo* in einem Parkinson-Ratten-Modell die Anzahl der dopaminergen Neurone erhöhen konnte.

Diskussion

Die Anzahl der Neuron in diesen Experimenten erhöhte sich bei der Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 4.16). Dies ist in Übereinstimmung mit Studer et al. (2000) und Zhang et al. (2006), bei denen hypoxische Kulturbedingungen auch zu einer höheren Ausbeute an Neuronen bei murinen NPZ führte. Santilli et al. (2010) konnten dies ebenfalls für hNPZ zeigen. Da die Zellen, wie zuvor erwähnt, während Normoxie und Hypoxie zum selben Zeitpunkt in die Differenzierung eintreten, ist die gesteigerte Anzahl der Neurone in der vorliegenden Arbeit nicht durch einen beschleunigten Zellzyklus bedingt, was zu der Schlussfolgerung führt, dass Hypoxie die neuronale Differenzierung der Progenitorzellen induziert hat.

Eine Erhöhung der Neurogenese konnte durch zwei verschiedene Mechanismen erreicht werden – zum einen während der Proliferation und zum anderen während der Differenzierung – diese Prozesse konnten zum Teil durch EPO nachgeahmt werden. Zum einen wurden die Zellen bereits während der Proliferation der Hypoxie ausgesetzt, zum anderen erst nach Induktion der Differenzierung – beides führte zu einer verstärkten Neurogenese, wobei eine kontinuierliche Exposition der Zellen mit Hypoxie während der Proliferation und Differenzierung zu keiner Potenzierung dieses Effektes führte. **Dies lässt den Schluss zu, dass EPO zum einen während der Proliferation den Progenitorpool manipuliert und zum anderen bei der Differenzierung selbst eingreift und die Neurogenese verstärkt.** Daher könnten zwei verschiedene Mechanismen involviert sein, über die Hypoxie die Differenzierung beeinflusst. Der eine funktioniert über eine gesteigerte Genese der neuronalen Zellen während der Differenzierung, der andere Mechanismus funktioniert über eine Vermehrung des Progenitorpools in der Proliferation mit Hypoxie, so dass mehr neurale Progenitorzellen zur neuronalen Differenzierung zur Verfügung stehen. Beide Mechanismen enden im selben Effekt, nämlich dem Anstieg der neuronalen Zellen und einer Erhöhung der allgemeinen metabolischen Aktivität der differenzierten Zellen. Der erste Mechanismus impliziert, dass Hypoxie die Differenzierung selbst induziert, und der zweite impliziert, dass Hypoxie den Pool der differenzierenden Zellen erhöht, indem es das Zellschicksal der Progenitorzellen verändert. Diese Annahme wird dadurch untermauert, dass eine Proliferation der Zellen bei 3% Sauerstoff und eine darauf folgende Differenzierung bei 3% im Vergleich zu einer alleinigen Differenzierung bei 3% Sauerstoff zu keiner zusätzlichen Steigerung der Differenzierung führt. Desweiteren wurde beobachtet, dass ein Wechsel zwischen 3% Sauerstoff bei der Proliferation zu 20% Sauerstoff bei der Differenzierung ebenfalls zu einer gesteigerten Neurogenese im Vergleich zu einer Standardzellkultur führt. Daraus resultierte

Diskussion

die Schlussfolgerung, dass Hypoxie über die Beeinflussung des Progenitorpools bei der Proliferation das weitere Zellschicksal – auch während der Differenzierung – beeinflussen kann. Diese Resultate demonstrieren, dass 3% Sauerstoff die Differenzierungskapazität von humanen neuronalen Stammzellen modifizieren kann. Auch Basciano et al. (2011) kamen zu dem Schluss, dass der Zeitpunkt und die Dauer der Hypoxie essentiell für die zelluläre Reaktion auf Hypoxie sind. So beobachteten sie, wie die langfristige Kultur von Zellen in Hypoxie zum Erhalt der Multipotenz und dem undifferenzierten Status von mesenchymalen Stammzellen führt.

Als nächstes wurde die Apoptose der hNPZ nach Applikation von EPO und Hypoxie untersucht (Abb. 4.18), da zum einen eine verringerte Apoptose die vorher registrierte erhöhte Anzahl von Neuronen erklären kann und zum anderen wurde EPO als anti-apoptotischer, Gewebe- und Zell-protektiver Faktor beschrieben (Lombardero et al., 2010). Hinsichtlich der apoptotischen Zellen konnte die Hypoxie die Anzahl eben dieser Zellen am vierten Tag der Differenzierung um 50% reduzieren. Dieser anti-apoptotische Effekt war nicht mit dem neuronalen Zelltod übereinstimmend, da die Anzahl der überlebenden Neurone am vierten Tag nicht beeinflusst wurde. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Anzahl der signifikant erhöhten β III-Tubulin-positiven Zellen am dritten Tag der Differenzierung nach Exposition mit Hypoxie nicht nur auf anti-apoptotischen Effekten der Hypoxie basiert. Auch Clarke et al. (2009) beschrieben eine vermehrte Bildung von NPZ-Kolonien durch die Hemmung des programmierten Zelltodes.

Zudem hat EPO in dieser Studie am vierten Tag der Differenzierung einen anti-apoptotischen Effekt ohne die Anzahl der Neurone signifikant zu verändern, daher liegt bei EPO keinen Neuronen-spezifischer anti-apoptotischen Effekt vor. Außerdem kann man am vierten Tag der Differenzierung eine vermehrte Apoptose der standardmäßig bei 20% Sauerstoff differenzierten Zellen beobachten, allerdings ist der zugrundeliegende Mechanismus unklar. In dieser Studie zeigt EPO in der späten Differenzierung seine protektive Eigenschaft, dies steht im Kontrast zu Wenker et al. (2010), die beobachteten, dass EPO zwar in undifferenzierten humanen Neuroblastomzellen anti-apoptotisch wirkte, nicht aber in differenzierten Zellen. Dies konnte jedoch durch eine Reduktion der Expression des EPO-Rezeptors während der Differenzierung erklärt werden.

In Abhängigkeit von der Stärke der Hypoxie, kann diese unterschiedliche Auswirkungen auf die Apoptose haben. Auf der einen Seite wurde bewiesen, dass Hypoxie bei dem sogenannten

Diskussion

hypoxischen Präkonditionieren (einer Exposition der Zellen mit Hypoxie, um diese dann für eine anschließende Transplantation stressresistent zu machen) anti-apoptotisch wirken kann (Theus et al., 2008), auf der anderen Seite kann sie auch pro-apoptotisch wirken, wenn das Ausmaß der Hypoxie Werte unterhalb derer für milde Hypoxie erreicht (Horie et al., 2008, Santilli et al., 2010).

Bei den hier vorliegenden Experimenten wurde der anti-apoptotische Effekt der Hypoxie auch durch die Expression des anti-apoptotischen Proteins bcl-2 aufgezeigt. Der Western Blot des Proteins bcl-2 zeigte einen Anstieg der Proteinmenge zwischen dem ersten und zweiten Tag der Differenzierung, gefolgt von einer stabilen Proteinexpression während der Differenzierung. Einen ähnlichen Vorgang konnten auch Liao et al. (2008) *in vivo* beobachten – sie registrierten einen Anstieg von bcl-2 während der ersten 24h nach einem traumatischen Hirnschaden in einem Rattenmodell, bei dem die neuroprotektiven Eigenschaften von EPO getestet wurden, mit einer anschließenden stabilen Expression über 3 bis 5 Tage. Im Gegensatz dazu beobachteten Pregi et al. (2006) zwar einen Anstieg von bcl_{XL} bei humanen Neuroblastomzellen, nicht aber von bcl-2. Shingo et al. (2001) zeigten einen durch Hypoxie induzierten Anstieg der Neurone, wobei dieser fördernde Effekt durch EPO imitiert wurde, da dieses ebenso günstig auf die Anzahl der Neurone auswirkte. Dies steht im Gegensatz zu den gezeigten Ergebnissen, da EPO nicht den förderlichen Effekt der Hypoxie auf die Neuronenproduktion nachahmen konnte, allerdings konnte EPO andere Folgen der Hypoxie wie den anti-apoptotischen Effekt unter normoxischen Bedingungen imitieren. Die Anzahl der apoptotischen Zellen nach EPO-Applikation ($18.80 \pm 2.27\%$) war nicht signifikant unterschiedlich zu der Anzahl der apoptotischen Zellen während hypoxischer Kulturbedingungen ($15.82 \pm 4.65\%$), was beweist, dass EPO das Potential hat Teile der Effekte der Hypoxie unter normoxischen Bedingungen ebenfalls zu induzieren. Diaz et al. (2005) zeigten, dass EPO speziell die Resistenz von Astroglia gegenüber Stressoren verbessern konnte. So ist es auch hier möglich, dass EPO zwar keinen Effekt auf Neurone selbst hat, aber auf andere differenzierte Zellen. Da der EPO-Rezeptor mittels Western Blot-Verfahren nachgewiesen wurde, lässt sich nicht bestimmen, welche Zellen den EPO-Rezeptor exprimieren oder ob alle differenzierten Zellen diesen Rezeptor besitzen. Um dies zu klären müsste man zum Beispiel die Zellen durch membranständige gliale oder neuronale Marker mit Hilfe von magnetischen Partikeln auftrennen.

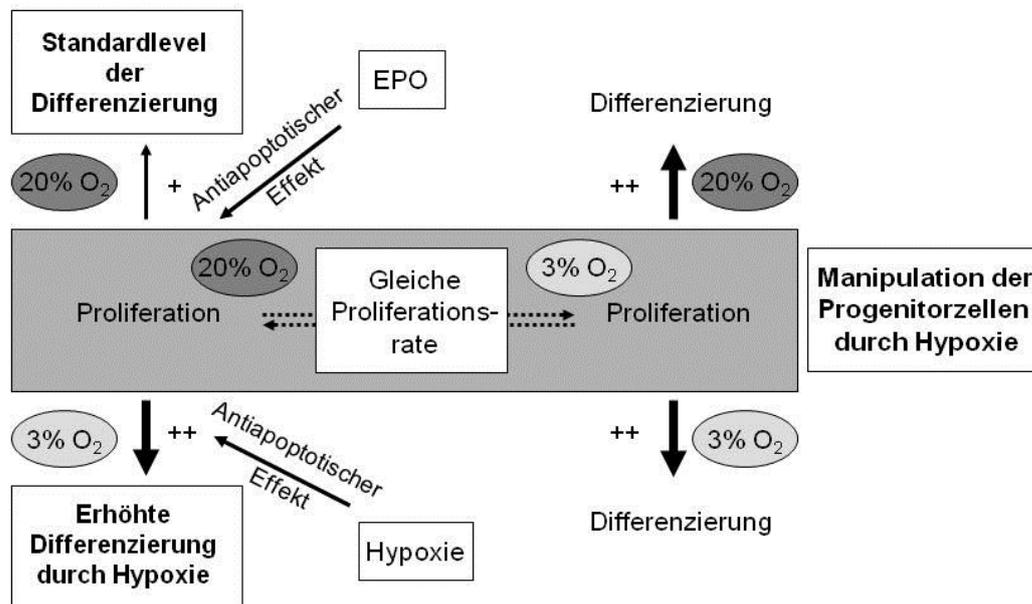


Abb.6.1: Zusammenfassung der Effekte von Hypoxie und EPO. Es werden potentielle Mechanismen für die neuronale Differenzierung von hNPZ unter dem Einfluss von Hypoxie und EPO dargestellt. Proliferierende Zellen haben bei Normoxie und Hypoxie dieselbe Proliferationsrate. Proliferation und Differenzierung der Zellen bei Normoxie führt zu einem moderaten, durchschnittlichen Anstieg der Neurone. Allerdings führt die Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes zu Beginn der Differenzierung zu einem Anstieg der Neuronenzahl. Der gleiche Effekt kann beobachtet werden, wenn die hNPZ zuvor in Hypoxie proliferieren, ein anschließender Wechsel des Sauerstoffgehaltes bei der Differenzierung hat dann keinerlei Auswirkung für die hNPZ. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Hypoxie zum einen direkt während der Differenzierung die Neurogenese beeinflusst und zum anderen auch schon während der Proliferation den Progenitorpool beeinflussen kann. Antiapoptische Effekte spielen eine wichtige Rolle bei den neuroprotektiven Eigenschaften der Hypoxie. Sowohl dieser anti-apoptische Effekt als auch die erhöhte metabolische Aktivität konnte durch EPO partiell imitiert werden.

Es wurde gezeigt, dass Hypoxie über verschiedene Ansatzpunkte in die sowohl in die metabolische Aktivität als auch neuronale Differenzierung eingreifen kann und dabei auch bcl-2 eine Rolle spielt. In der Literatur wurden verschiedenste Signalwege beschrieben, über die Hypoxie die Proliferation und Differenzierung verändern kann. So beschrieben Sims et al.

Diskussion

(2009) eine über den Sonic-Hedgehog-Signalweg induzierte Proliferation von NPZ und propagierten, dass Hypoxie eine entscheidende Rolle bei der Abheilung von Hirnverletzungen durch Umbau und Neugestaltung des Hirngewebes hat. Aber nicht nur bei Verletzungen des Nervensystems kann Hypoxie eine Rolle spielen, sondern es ist auch wichtig für den Regulation der physiologisch vorhandenen NPZ in den Stammzellnischen des ZNS (Panchision et al., 2009).

Sowohl die hier vorliegenden Ergebnisse über die Rolle von Hypoxie bei der Neurogenese und dem Schutz von hNPZ vor Apoptose als auch die Resultate anderer Studien (Studer et al., 2000, Santilli et al., 2010) hinsichtlich der neuroprotektiven Eigenschaften von Hypoxie *in vitro*, stützen die These, dass Hypoxie auch *in vivo* eine wichtige Schlüsselposition sowohl in physiologischen als auch pathologischen Prozessen spielen muss. So kann zum Beispiel Hypoxie eine Rolle bei der Erholung des Gewebes nach einem Schlaganfall durch eine erhöhte endogene Neurogenese spielen (Burns et al., 2009).

5.4 EPO als GSK-Inhibitor in hNPZ

Hypoxie reguliert über HIF-1 α eine Reihe von Zielgenen und -prozesse, wie die Glykolyse, den Zellzyklus, die Angiogenese, aber auch VEGF und am bekanntesten EPO (De Filippis et al., 2011). EPO ist also zum einen induzierbar durch Hypoxie und gleichzeitig ein GSK-Inhibitor (Maiese et al., 2004). Die Inhibition der GSK-3 β mit konsekutiver Stabilisierung des β -Catenins ist zentraler Bestandteil des kanonischen wnt-Signalweges, der die Proliferation und Differenzierung von hNPZ regulieren kann (Schmöle et al., 2010, Hübner et al., 2010).

In dieser Studie wurde β -Catenin quantifiziert, um das Ausmaß der GSK-3 β -Inhibition durch EPO zu messen (Abb. 4.19). Das stabilisierte, in den Nucleus translozierte β -Catenin aktiviert wiederum TCF, dessen Aktivität mittels Reporter-Gen-Assay gemessen werden konnte (Abb. 4.20) und bot somit einen weiteren Ansatzpunkt, die GSK-Inhibition durch EPO in hNPZ zu quantifizieren.

Allerdings konnten weder EPO noch Hypoxie die β -Catenin-Akkumulation in differenzierenden Zellen entscheidend beeinflussen. Auch die Messung der TCF-Aktivität ergab keinen Effekt durch EPO, selbst die Ko-Transfektion mit einem stabilisierten β -Catenin (S33Y), dass in einer anderen Studie notwendig war, um den Effekt der GSK-Inhibitoren

Diskussion

SB216763 und IM-12 nachzuweisen (Schmöle et al., 2010), konnte keine Auswirkung durch EPO detektierbar machen.

Dies lässt die folgenden Schlussfolgerungen zu: Die bisher registrierten Effekte von EPO auf die metabolische Aktivität und Apoptose differenzierender Zellen beruht nicht auf einer GSK-3 β -Inhibition. Das erklärt aber auch, warum in dieser Studie EPO keinen Einfluss auf die Differenzierung der hier untersuchten hNPZ nehmen konnte. Wie sowohl Schmöle et al. (2010) und Hübner et al. (2010) zeigen konnten, spielt der Wnt-Signalweg eine essentielle Rolle in der Differenzierung der ReNcell VM-Zellen. Insbesondere die Inhibition von GSK-3 β führte zu einer gesteigerten Differenzierung dieser Zellen (Schmöle et al. 2010). Da EPO aber hier nicht über die Inhibition von GSK-3 β wirkt, kann es also auch nicht auf die Differenzierung der hNPZ wirken.

Dies steht im Kontrast zu anderen Studien, bei denen EPO durchaus die Differenzierung induzieren konnte (Studer et al., 2000). Daher ist die Wirkung von EPO auf NPZ differenziert zu betrachten. Vor allem die Annahme, dass EPO unter normoxischen Bedingungen die Effekte der Hypoxie völlig nachahmen kann (Studer et al., 2000), muss überdacht werden. Oft wurde die Wirkung von Hypoxie einer intrinsischen Aktivierung von EPO attribuiert – auch dies wird durch die vorliegenden Daten in Frage gestellt. Die durch Hypoxie induzierte Neurogenese, reduzierte Apoptose und die erhöhte metabolische Aktivität von hNPZ ließen sich nämlich ebenso wenig wie die Effekte von EPO dem kanonischen Wnt-Signalweg zuschreiben.

Das lässt allerdings eine Reihe anderer Möglichkeiten für die Wirkungsweise von EPO und Hypoxie auf hNPZ zu. Die am häufigsten in der Literatur diskutierten Möglichkeiten sind neben dem Wnt-Signalweg und der Inhibition von GSK-3 β , JAK2 (Digicaylioglu et al., 2001), NF κ B (Chong et al., 2005), NO (Chen et al., 2010), STAT5 (Liu et al., 2005, Zhang et al., 2007), PI3K, Akt und MAPK (Sättler et al., 2004). Auch über andere Prozesse wie Regulation der Wasserpermeabilität der Astrozyten via dem Aquaporin 4-Kanal (Gunnarson et al., 2009), dem Wiederherstellen von Gap Junctions an der Zellmembran (Martinez-Estrada et al., 2003) und die Anpassung des Kalziumhaushaltes der Zellen (Andoh et al., 2011) sollen EPO erlauben Neuro- beziehungsweise Gewebe- protektiv zu agieren.

5.5 Neuroprotektive Eigenschaften von CEPO *in vitro*

Zuletzt wurde ein neuroprotektives Derivat von EPO hinsichtlich seiner neurotrophen und neuroprotektiven Eigenschaften *in vitro* untersucht. Es gab mehrere *in vivo*-Studien, bei denen CEPO an Krankheitsmodellen wie dem Schlaganfall (Lapchak et al., 2008), dem traumatischen Hirnschaden (Mahmood et al., 2008) und der periventrikulären Leukomalazie (Liu et al., 2011) seine neuroprotektiven Eigenschaften demonstrieren konnte. Im Rahmen dieser Tierstudien konnte CEPO das Ausmaß des Hirnschadens im Vergleich zur Kontrolle reduzieren und zu einem besseren motorischen Verhalten der Versuchstiere führen (Lapchak et al., 2008). Die neurotrophen und neuroprotektiven Eigenschaften von CEPO *in vitro* sind jedoch bisher in der Literatur noch nicht so gut untersucht.

So wie auch zuvor bei EPO wurden die Proliferation (Abb. 4.22), die metabolische Aktivität (Abb. 4.24) und die Differenzierung (Abb. 4.26) untersucht. Es erfolgte jedoch kein gesonderter Rezeptornachweis, da die Existenz eines „neuronalen“ EPO-Rezeptors für CEPO, zusammengesetzt aus dem klassischen EPO-Rezeptor und der Common- β -Subunit von GM-CSF, IL-3 und IL-5 (Brines et al., 2004), umstritten ist (Um et al., 2006) und es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre die Existenz dieses Rezeptors und seine Funktionalität zu beweisen. Weder bei der Proliferation noch der metabolischen Aktivität konnte ein neurotropher Effekt von CEPO detektiert werden, obwohl zu hohe Dosen von CEPO, wie bei der Proliferation zu beobachten war, sich negativ auf das Zellwachstum auswirkte.

Auch bei der Differenzierung hatte CEPO allein keinen Effekt. Jedoch konnte CEPO jedoch die bei 3 Tagen Differenzierung registrierte gesteigerte Neurogenese am 4. Tag der Differenzierung erhalten. Scheinbar benötigt CEPO *in vitro* die Kombination mit Hypoxie, um auf die hNPZ wirken zu können. Auch für EPO wurde eine ähnliche Wirkungsweise beschrieben. So kann EPO in einigen Modellen nur zusammen mit IGF-1 wirken (Digicaylioglu et al., 2004, Kang et al., 2010). Man könnte daher postulieren, dass CEPO, ähnlich wie bei einer Kombination von Wachstumsfaktoren für die Proliferation von hNPZ, auch einen Kofaktor oder eine zusätzliche Kondition benötigt, um zu wirken. Außerdem haben die genannten *in vivo*-Modelle gemeinsam, dass am Ort der Schädigung ein Sauerstoffmangel vorliegt – so kann die Hypoxie eine möglicherweise bisher nicht beachtete Kondition für die Wirkung von CEPO sein.

Diskussion

Bisher wurde durch die *in vivo*-Versuche angenommen, dass EPO und CEPO gleich effektiv sein würden, mit dem Unterschied, dass CEPO keine hämatopoetischen Nebenwirkungen verursacht (Mahmood et al., 2007, Kirkeby et al., 2008). Dies kann diese Studie nicht bestätigen, da für EPO und CEPO verschiedene Ergebnisse vorliegen. Es ist daher wichtig in Zukunft den direkten Austausch von EPO mit CEPO zu hinterfragen und herauszufinden, wie CEPO neuroprotektiv und neurotroph wirken kann und welche anderen Voraussetzungen für die Wirkungen von CEPO noch erfüllt sein müssen. So würde die hier festgestellte Kombination von Hypoxie und CEPO die Indikation für die Anwendung von CEPO *in vivo* auf akute und chronische Schäden mit Sauerstoffmangel beschränken, aber einen Einsatz bei entzündlichen Erkrankungen jedoch nicht sinnvoll erscheinen lassen. So sind weder EPO noch CEPO als universell „neuroprotektiv“ zu sehen.

5.6 Neuroprotektion durch Hypoxie, EPO und CEPO *in vivo*

Die in dieser Studie benutzte Zelllinie zeigte eine maximale Anzahl von rund 6% Neuronen, was als Limitation dieser Studie gewertet werden könnte. Die Vorteile, wie zum Beispiel das schnelle Differenzierungspotenzial und die einfache Standardisierung der Zellkultur, ermöglichen die Veränderungen bei der Proliferation und Differenzierung in einem engen Zeitfenster zu kontrollieren und zu untersuchen. Daher dienen diese Zellen vor allem als Model zur Untersuchung der Differenzierung, um diese Erkenntnisse dann anschließend in andere Systeme zu transferieren, die eine Transplantation in das ZNS bei neurodegenerativen Erkrankungen wie einem Morbus Parkinson oder einem Schlaganfall erlauben.

Für translationale oder klinische Forschung sind diese Ergebnisse besonders interessant, da diese weitere Evidenz für verstärkte Neurogenese in hypoxischen Szenarien liefern. Das Überleben von Zellen und deren ideales Umfeld, unter anderem der ideale Sauerstoffgehalt, nach Transplantation von humanen neuronalen Stammzellen, bleiben noch unklar und diese Daten stützen die These, dass eine milde hypoxische Umgebung, wie man sie in der Penumbra eines Schlaganfallterritoriums oder bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen beobachten kann, durchaus nützlich für die transplantierten Stammzellen sein können. Desweiteren liefern diese Ergebnisse Belege dafür, dass Hypoxie die Neurogenese sowohl während der Proliferation als auch der Differenzierung induzieren kann, woraus sich folgern lässt, dass die zur Transplantation anstehenden Zellen nicht unbedingt zu einem ganz

Diskussion

bestimmten Zeitpunkt während des Zellzyklus benutzt werden müssten, was den Transplantationsprozess vereinfachen kann.

Es wurde versucht von EPO als neuroprotektives Agens bei Patienten mit Schlaganfall zu profitieren (Brines and Cerami, 2005, Ehrenreich et al., 2002), aber es ist weiterhin unklar, wie EPO neuroprotektiv agieren kann. Es ist jedoch eine Tatsache, dass EPO die Blut-Hirn-Schranke überwindet (Brines et al., 2000, Brines et al., 2008). Herrmann et al. (2009) schlugen sogar eine intranasale Applikation von EPO bei Schlaganfallpatienten vor. Die bisherigen Daten von EPO bei neurologischen Erkrankungen, ermunterten auch Spekulationen über eine Anwendung anderer hämatopoetischer Wachstumsfaktoren wie G-CSF und Thrombopoetin in diesem Bereich (Diederich et al., 2010).

Es bestehen drei Haupttheorien, wie EPO im humanen Gehirn funktionieren kann. Die erste nimmt eine verbesserte Oxygenierung des Gehirnes über eine Elevation der Erythrozyten nach EPO-Applikation an. Die zweite Theorie geht davon aus, dass EPO Astrozyten und Blutgefäße und somit indirekt die Neurone beeinflusst kann und die dritte Theorie postuliert einen direkten neuroprotektiven Effekt von EPO (Brines and Cerami, 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die These eines direkten neuroprotektiven Effektes von EPO, was die Rationale für die Verwendung von EPO in hypoxischen Szenarien weiter unterstützt und eher gegen eine Anwendung von EPO bei neuropathischen Schmerzen (Campana et al., 2003) oder peripheren Neuropathien (Toth et al., 2008) spricht. Miskowiak et al. (2007) postulierten eine mögliche Anwendung von EPO bei psychiatrischen Erkrankungen, da sie eine verbesserte hippocampale Antwort beim Erinnerungsprozess von gesunden Patienten beobachteten. Vor allem in anbetracht der hämatologischen Nebenwirkungen, wäre so eine Indikation sehr genau zu stellen. Vor allem die EPO-Schlaganfall-Studie weckte Hoffnungen, EPO als Zusatztherapie für Schlaganfallpatienten zu etablieren, nachdem sich die Anwendung bei einer kleinen Patientengruppe als sicher und vor allem nützlich erwies (Ehrenreich et al., 2002). Eine darauffolgende groß angelegte klinische Studie musste jedoch abgebrochen werden, da die mit EPO behandelten Patienten häufiger (16,4%) als die Kontrollgruppe (9%) verstarben. Im Rahmen dieser Studie erhielten mehr Patienten als erwarten eine thrombolytische Behandlung, was die Interferenz von EPO mit anderen Medikamenten unterstreicht. Dennoch hofft man weiter die neuroprotektiven Eigenschaften von EPO nutzen zu können, in dem man präklinische Versuchsmodelle verbessert und alternative Administrationswege (Digicaylioglu et al., 2010) oder die Bindung von EPO an ein IgG-EPO-

Diskussion

Fusionsprotein für einen besseren Transport über die Blut-Hirn-Schranke (Fu et al., 2010) in Betracht zieht.

EPO aktiviert hauptsächlich die Hämatopoese und führt somit zu einer unerwünscht hohen Konzentration von Erythrozyten und einer folgenden Erhöhung der Viskosität. Dies kann wiederum zu einer Thrombosegefahr werden. Daher ist es notwendig die hämatopoetischen Nebenwirkungen auszuschalten, um neuroprotektive Dosierungen von EPO applizieren zu können. Daher sollten in Zukunft nicht-hämatopoetische neuroprotektive EPO-Derivate wie CEPO, Asialo-EPO (Wang et al., 2004), Antikörperfragmente gegen den EPO-Rezeptor (Lim et al., 2010) oder von EPO abgeleitete Peptide (Dumont et al., 2010) untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkung von Hypoxie und EPO auf die Proliferation und Differenzierung von hNPZ untersucht werden. Durch verschiedene Ansätze wurde versucht die Verdopplungszeiten, die metabolische Aktivität, die neuronale Differenzierung und die Apoptose von hNPZ zu analysieren. Darüber hinaus sollte ermittelt werden, welche Rolle der kanonische Wnt-Signalweg, insbesondere die GSK-3 β -Inhibition durch EPO, bei diesen Prozessen spielt.

Diese Studie liefert Belege für die wichtige Rolle von Hypoxie bei der Differenzierung von hNPZ und die modulierende Rolle von EPO *in vitro*. Die neuronale Differenzierung der hNPZ wurde durch Hypoxie nahezu verdoppelt und die Apoptose verringert, wobei bei diesem Prozess auch bcl-2 ein wichtiger Faktor ist. Hypoxie zeigt zwei verschiedene Aktionsweisen. Erstens führt die Proliferation und Expansion der hNPZ bei hypoxischen Zellkulturbedingungen zu einer erhöhten neuronalen Differenzierung, aber auch die Kultivierung der Zellen unter hypoxischen Bedingungen ab Beginn der Differenzierung führte zu diesem Ergebnis, was illustriert, dass dieser Effekt durch zwei verschiedene Mechanismen induziert wird. Zweitens zeigt Hypoxie anti-apoptotische Eigenschaften, die die ganze Zellpopulation betreffen, was zu einer erhöhten Überlebensrate der hNPZ nach Induktion der Differenzierung führt.

EPO konnte diese hypoxischen Effekte während der Differenzierung partiell imitieren und differenzierte Zellen vor Apoptose schützen. Auch bei der metabolischen Aktivität konnte EPO Hypoxie imitieren und führte zu einer ähnlich gesteigerten metabolischen Aktivität wie bei Hypoxie. Es gab jedoch keinen Hinweis, dass der kanonische Wnt-Signalweg dabei involviert ist.

Zusätzlich wurde das neuronale EPO-Derivat CEPO untersucht. Ähnlich wie EPO zeigte es keine Wirkung auf die Proliferation. Auch während der neuronalen Differenzierung zeigte CEPO allein keinen besonderen Effekt auf die hNPZ. Allerdings konnte CEPO durch die Kombination mit Hypoxie die Zahl der Neurone am vierten Tag der Differenzierung stabil hoch halten, während bei allen anderen Kulturbedingungen die Zahl der Neurone nach dem dritten Tag der Differenzierung abnahm.

Zusammenfassung

Zusammenfassend stützen die präsentierten Daten die Anwendung und weitere Erforschung von EPO als protektiver Faktor bei neurodegenerativen Erkrankungen, da EPO in hNPZ anti-apoptotisch wirkt. Dies bestärkt auch die Bestrebungen EPO oder eines seiner Derivate direkt für die Behandlung von Schlaganfällen oder neurodegenerativen Erkrankungen zu nutzen, da hier gezeigt wurde, dass EPO direkt an neuronalen Zellen wirken kann.

7 Thesen

- 1.) Sauerstoff spielt während der Entwicklung des fetalen Gehirns eine wichtige Rolle, da dieses während der Entwicklung niedrigen O₂-Konzentrationen ausgesetzt ist.
- 2.) Bisherige Standardzellkulturen für neuronale Progenitorzellen benutzen 20% O₂.
- 3.) Für murine neuronale Progenitorzellen ist bekannt, dass Hypoxie die neuronale Differenzierung fördert.
- 4.) Die Anwendung von Hypoxie bei humanen neuronalen Progenitorzellen sollte daher näher untersucht werden.
- 5.) Ziel der Arbeit war, es den Einfluss von Hypoxie auf die Proliferation und Differenzierung humaner mesenzephaler Progenitorzellen zu charakterisieren.
- 6.) Als Modell diente die humane mesenzephalere Progenitorzelllinie ReNcell VM, diese wurde mittels Proliferationsassay, Western Blot, Durchflusszytometrie und Luciferase-Assay untersucht.
- 7.) Zelluläre Reaktionen auf Hypoxie werden über den Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF) vermittelt.
- 8.) Die untersuchten humanen mesenzephalen Progenitorzellen exprimierten HIF-1 α .
- 9.) Hypoxie veränderte die Proliferationsrate und den Zellzyklus der humanen mesenzephalen Progenitorzellen nicht, die neuronale Differenzierung der Zellen wurde erhöht und die Anzahl der apoptotischen Zellen reduziert.
- 10.) *In vitro* wurde die Rolle von Erythropoetin bei der Proliferation und Differenzierung humaner mesenzephaler Progenitorzellen untersucht.
- 11.) Erythropoetin reduzierte wie Hypoxie die Anzahl der apoptotischen Zellen.
- 12.) Bcl-2 spielt als anti-apoptotischer Faktor eine Rolle in der Vermittlung der neuroprotektiven Wirkung von Hypoxie und EPO.

- 13.) Abweichende Resultate zu bekannter Literatur über den Einfluss von Hypoxie und Erythropoetin bei murinen neuralen Progenitorzellen, unterstreichen die Zelltyp-spezifischen Effekte von Hypoxie und Erythropoetin.
- 14.) In erster Linie fördert Erythropoetin die Erythropoese, es sind aber nicht-hämatopoetische Erythropoetin-Derivate, wie Asialo-EPO und CEPO bekannt.
- 15.) CEPO wurde im Rahmen dieser Arbeit auf seine neuroprotektiven Eigenschaften hin untersucht.
- 16.) Bei gleichzeitiger Anwendung von Hypoxie und CEPO wurde die Differenzierung durch CEPO gefördert und resultierte in einer verstärkten Neurogenese.

8 Literaturverzeichnis

Acker T, Acker H. Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. *J Exp Biol.* 2004; 207(Pt 18): 3171-88.

Adembri C, Massagrande A, Tani A, Miranda M, Margheri M, De Gaudio R, Pellegrini-Giampietro DE. Carbamylated erythropoietin is neuroprotective in an experimental model of traumatic brain injury. *Crit Care Med.* 2008; 36(3): 975-8.

Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med.* 2001; 7(4): 393-5.

Andoh T, Echigo N, Kamiya Y, Hayashi M, Kudoh I, Goto T. Effects of erythropoietin on intracellular calcium concentration of rat primary cortical neurons. *Brain Res.* 2011; 1387: 8-18.

Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol.* 2008; 141(1): 14-31.

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O: Neuronal Replacement From Endogenous Precursors in the Adult Brain After Stroke. *Nat Med* 2002, 8: 963-970.

Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, Dalloul A. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol.* 2011; 12: 12.

Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19(6): 643-51.

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell.* 2001; 105(7): 829-41.

Brines M. The therapeutic potential of erythropoiesis-stimulating agents for tissue protection: a tale of two receptors. *Blood Purif.* 2010; 29(2): 86-92.

Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(6): 484-94.

Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(19): 10526-31.

Literaturverzeichnis

Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, Xie QW, Smart J, Su-Rick CJ, Pobre E, Diaz D, Gomez D, Hand C, Coleman T, Cerami A. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(41): 14907-12.

Brines M, Patel NS, Villa P, Brines C, Mennini T, De Paola M, Erbayraktar Z, Erbayraktar S, Sepodes B, Thiemermann C, Ghezzi P, Yamin M, Hand CC, Xie QW, Coleman T, Cerami A. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(31): 10925-30.

Burns TC, Verfaillie CM, Low WC. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review. *J Comp Neurol*. 2009; 515(1): 125-44.

Cakir E, Yilmaz A, Demirag F, Oguztuzun S, Sahin S, Yazici UE, Aydin M. Prognostic significance of micropapillary pattern in lung adenocarcinoma and expression of apoptosis-related markers: caspase-3, bcl-2, and p53. *APMIS*. 2011; 119(9): 574-80.

Campana WM, Myers RR. Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci*. 2003; 18(6): 1497-506.

Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*. 2000; 21 Suppl A: S25-30.

Caspi M, Zilberberg A, Eldar-Finkelman H, Rosin-Arbesfeld R. Nuclear GSK-3beta inhibits the canonical Wnt signalling pathway in a beta-catenin phosphorylation-independent manner. *Oncogene*. 2008; 27(25): 3546-55.

Chen ZY, Asavaritikrai P, Prchal JT, Noguchi CT. Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *J Biol Chem*. 2007; 282(35): 25875-83.

Chen HF, Kuo HC, Chen W, Wu FC, Yang YS, Ho HN. A reduced oxygen tension (5%) is not beneficial for maintaining human embryonic stem cells in the undifferentiated state with short splitting intervals. *Hum Reprod*. 2009; 24(1): 71-80.

Chen ZY, Wang L, Asavaritikrai P, Noguchi CT. Up-regulation of erythropoietin receptor by nitric oxide mediates hypoxia preconditioning. *J Neurosci Res*. 2010; 88(14): 3180-8.

Chen ZY, Warin R, Noguchi CT. Erythropoietin and normal brain development: receptor expression determines multi-tissue response. *Neurodegener Dis*. 2006; 3(1-2): 68-75.

Literaturverzeichnis

Chong ZZ, Li F, Maiese K. Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity. *Curr Neurovasc Res.* 2005; 2(5): 387-99.

Chopp M, Li Y, Zhang J. Plasticity and remodeling of brain. *J Neurol Sci.* 2008; 265(1-2): 97-101.

Clarke L, van der Kooy D. Low oxygen enhances primitive and definitive neural stem cell colony formation by inhibiting distinct cell death pathways. *Stem Cells.* 2009; 27(8): 1879-86.

Coombs GS, Covey TM, Virshup DM. Wnt signaling in development, disease and translational medicine. *Curr Drug Targets.* 2008; 9(7): 513-31.

Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, Hofmann D, Abdul-Nour T, Bartmann P, Fandrey J. Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood.* 1998; 92(9): 3218-25.

De Filippis L, Delia D. Hypoxia in the regulation of neural stem cells. *Cell Mol Life Sci.* 2011. 68(17): 2831-44.

Demers EJ, McPherson RJ, Juul SE. Erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res.* 2005 Aug; 58(2): 297-301.

Diaz Z, Assaraf MI, Miller WH Jr, Schipper HM. Astroglial cytoprotection by erythropoietin pre-conditioning: implications for ischemic and degenerative CNS disorders. *J Neurochem.* 2005; 93(2): 392-402.

Diederich K, Schäbitz WR, Minnerup J. Seeing old friends from a different angle: Novel properties of hematopoietic growth factors in the healthy and diseased brain. *Hippocampus.* 2010 Dec 6. [Epub ahead of print]

Digicaylioglu M, Garden G, Timberlake S, Fletcher L, Lipton SA. Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(26): 9855-60.

Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature.* 2001; 412(6847): 641-7.

Doggrell SA. A neuroprotective derivative of erythropoietin that is not erythropoietic. *Expert Opin Investig Drugs.* 2004; 13(11): 1517-9.

Literaturverzeichnis

Donato R, Miljan EA, Hines SJ, Aouabdi S, Pollock K, Patel S, Edwards FA, Sinden JD. Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC Neurosci.* 2007; 8: 36.

Dumont F, Bischoff P. Non-erythropoietic tissue-protective peptides derived from erythropoietin: WO2009094172. *Expert Opin Ther Pat.*; 20(5): 715-23.

Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Béhé M, Hasselblatt M, Woldt H, Falkai P, Knerlich F, Jacob S, von Ahsen N, Maier W, Brück W, Rüter E, Cerami A, Becker W, Sirén AL. Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2004; 9(1): 42-54.

Ehrenreich H, Fischer B, Norra C, Schellenberger F, Stender N, Stiefel M, Sirén AL, Paulus W, Nave KA, Gold R, Bartels C. Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis. *Brain.* 2007; 130(Pt 10): 2577-88.

Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Rüter E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med.* 2002; 8(8): 495-505.

Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, Schellinger PD, Bohn M, Becker H, Wegrzyn M, Jähnig P, Herrmann M, Knauth M, Bähr M, Heide W, Wagner A, Schwab S, Reichmann H, Schwendemann G, Dengler R, Kastrup A, Bartels C; EPO Stroke Trial Group. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke.* 2009; 40(12): e647-56.

Elliott S, Busse L, Bass MB, Lu H, Sarosi I, Sinclair AM, Spahr C, Um M, Van G, Begley CG. Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood.* 2006; 107(5): 1892-5. Erratum in: *Blood.* 2006; 107(9): 3454.

Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LØ, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(11): 6741-6. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(15): 9102.

Fan X, Heijnen CJ, van der Kooij MA, Groenendaal F, van Bel F. The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res Rev.* 2009; 62(1): 99-108.

Literaturverzeichnis

Fantacci M, Bianciardi P, Caretti A, Coleman TR, Cerami A, Brines M, Samaja M. Carbamylated erythropoietin ameliorates the metabolic stress induced in vivo by severe chronic hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(46): 17531-6.

Flax JD, Aurora S, Yang C, Simonin C, Wills AM, Billingham LL, Jendoubi M, Sidman RL, Wolfe JH, Kim SU, Snyder EY. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol*. 1998; 16(11): 1033-9.

Freese JL, Pino D, Pleasure SJ. Wnt signaling in development and disease. *Neurobiol Dis*. 2010; 38(2): 148-53.

Fu A, Hui EK, Lu JZ, Boado RJ, Pardridge WM. Neuroprotection in experimental stroke in the rat with an IgG-erythropoietin fusion protein. *Brain Res*. 2010; 1360: 193-7.

Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ*. 2004 Jul;11 Suppl 1: S37-44.

Goh EL, Ma D, Ming GL, Song H. Adult neural stem cells and repair of the adult central nervous system. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003; 12(6): 671-9.

Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seeliger M, Samardzija M, Bauer C, Gassmann M, Remé CE. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med*. 2002; 8(7): 718-24.

Grimm C, Wenzel A, Stanescu D, Samardzija M, Hotop S, Groszer M, Naash M, Gassmann M, Remé C. Constitutive overexpression of human erythropoietin protects the mouse retina against induced but not inherited retinal degeneration. *J Neurosci*. 2004; 24(25): 5651-8.

Grasso G, Graziano F, Sfacteria A, Carletti F, Meli F, Maugeri R, Passalacqua M, Certo F, Fazio M, Buemi M, Iacopino DG. Neuroprotective effect of erythropoietin and darbepoetin alfa after experimental intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery*. 2009; 65(4): 763-9; discussion 769-70.

Grasso G, Sfacteria A, Cerami A, Brines M. Erythropoietin as a tissue-protective cytokine in brain injury: what do we know and where do we go? *Neuroscientist*. 2004;10(2): 93-8.

Gunnarson E, Song Y, Kowalewski JM, Brismar H, Brines M, Cerami A, Andersson U, Zelenina M, Aperia A. Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(5): 1602-7.

Guzman R. Cellular stroke therapy: from cell replacement to trophic support. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2009; 7(10): 1187-90.

Literaturverzeichnis

Heidbreder M, Fröhlich F, Jöhren O, Dendorfer A, Qadri F, Dominiak P. Hypoxia rapidly activates HIF-3 α mRNA expression. *FASEB J.* 2003; 17(11): 1541-3.

Hermann DM. Enhancing the delivery of erythropoietin and its variants into the ischemic brain. *ScientificWorldJournal.* 2009; 9: 967-9.

Hoffrogge R, Mikkat S, Scharf C, Beyer S, Christoph H, Pahnke J, Mix E, Berth M, Uhrmacher A, Zubrzycki IZ, Miljan E, Völker U, Rolfs A. 2-DE proteome analysis of a proliferating and differentiating human neuronal stem cell line (ReNcell VM). *Proteomics.* 2006; 6(6): 1833-47.

Horie N, So K, Moriya T, Kitagawa N, Tsutsumi K, Nagata I, Shinohara K. Effects of oxygen concentration on the proliferation and differentiation of mouse neural stem cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol.* 2008; 28(6): 833-45.

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(14): 7987-92.

Hübner R, Schmöle AC, Liedmann A, Frech MJ, Rolfs A, Luo J. Differentiation of human neural progenitor cells regulated by Wnt-3 α . *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 400(3): 358-62.

Im SH, Yu JH, Park ES, Lee JE, Kim HO, Park KI, Kim GW, Park CI, Cho SR. Induction of striatal neurogenesis enhances functional recovery in an adult animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Neuroscience.* 2010; 169(1): 259-68.

Kanaan NM, Collier TJ, Marchionini DM, McGuire SO, Fleming MF, Sortwell CE. Exogenous erythropoietin provides neuroprotection of grafted dopamine neurons in a rodent model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2006 ;1068(1): 221-9.

Kang YJ, Digicaylioglu M, Russo R, Kaul M, Achim CL, Fletcher L, Masliah E, Lipton SA. Erythropoietin plus insulin-like growth factor-I protects against neuronal damage in a murine model of human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders. *Ann Neurol.* 2010; 68(3): 342-52.

Kee NJ, Preston E, Wojtowicz JM: Enhanced Neurogenesis After Transient Global Ischemia in the Dentate Gyrus of the Rat. *Exp Brain Res* 2001; 136: 313-320.

King VR, Averill SA, Hewazy D, Priestley JV, Torup L, Michael-Titus AT. Erythropoietin and carbamylated erythropoietin are neuroprotective following spinal cord hemisection in the rat. *Eur J Neurosci.* 2007; 26(1): 90-100.

Literaturverzeichnis

Kirkeby A, van Beek J, Nielsen J, Leist M, Helboe L. Functional and immunochemical characterisation of different antibodies against the erythropoietin receptor. *J Neurosci Methods*. 2007; 164(1): 50-8.

Kirkeby A, Torup L, Bochsén L, Kjalke M, Abel K, Theilgaard-Monch K, Johansson PI, Bjørn SE, Gerwien J, Leist M. High-dose erythropoietin alters platelet reactivity and bleeding time in rodents in contrast to the neuroprotective variant carbamyl-erythropoietin (CEPO). *Thromb Haemost*. 2008; 99(4): 720-8.

Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol*. 2003; 13(1): 127-32.

Lapchak PA, Kirkeby A, Zivin JA, Sager TN. Therapeutic window for nonerythropoietic carbamylated-erythropoietin to improve motor function following multiple infarct ischemic strokes in New Zealand white rabbits. *Brain Res*. 2008; 1238: 208-14.

Lee HJ, Kim KS, Kim EJ, Choi HB, Lee KH, Park IH, Ko Y, Jeong SW, Kim SU. Brain transplantation of immortalized human neural stem cells promotes functional recovery in mouse intracerebral hemorrhage stroke model. *Stem Cells*. 2007; 25(5): 1204-12.

Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L, Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Cerami-Hand C, Xie QW, Coleman T, Cerami A, Brines M. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*. 2004; 305(5681): 239-42.

Li F, Chong ZZ, Maiese K. Erythropoietin on a tightrope: balancing neuronal and vascular protection between intrinsic and extrinsic pathways. *Neurosignals*. 2004; 13(6): 265-89.

Liao ZB, Zhi XG, Shi QH, He ZH. Recombinant human erythropoietin administration protects cortical neurons from traumatic brain injury in rats. *Eur J Neurol*. 2008; 15(2): 140-9

Lim AC, Ketchum RR, Borges L, Carabeo T, Carter J, Hoover JE, Hu Z, Wittekind M, Zhou H, Mehlin C. A diversity of antibody epitopes can induce signaling through the erythropoietin receptor. *Biochemistry*. 2010; 49(18): 3797-804.

Liu J, Narasimhan P, Yu F, Chan PH. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin. *Stroke*. 2005; 36(6): 1264-9.

Liu W, Shen Y, Plane JM, Pleasure DE, Deng W. Neuroprotective potential of erythropoietin and its derivative carbamylated erythropoietin in periventricular leukomalacia. *Exp Neurol*. 2011; 230(2): 227-39.

Literaturverzeichnis

Liu R, Suzuki A, Guo Z, Mizuno Y, Urabe T. Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion injury in vitro. *J Neurochem.* 2006; 96(4): 1101-10.

Lombardero M, Kovacs K, Scheithauer BW. Erythropoietin: a hormone with multiple functions. *Pathobiology.* 2011; 78(1): 41-53.

Lotharius J, Barg S, Wiekop P, Lundberg C, Raymon HK, Brundin P. Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *J Biol Chem.* 2002; 277: 38884-38894.

Madri JA. Modeling the neurovascular niche: implications for recovery from CNS injury. *J Physiol Pharmacol.* 2009; 60 Suppl 4: 95-104.

Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Zhang ZG, Lu C, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in rats with erythropoietin and carbamylated erythropoietin. *J Neurosurg.* 2007; 107(2): 392-7.

Madri JA. Modeling the neurovascular niche: implications for recovery from CNS injury. *J Physiol Pharmacol.* 2009; 60 Suppl 4: 95-104.

Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25(11): 577-83.

Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA.* 2005; 293(1): 90-5.

Martínez-Estrada OM, Rodríguez-Millán E, González-De Vicente E, Reina M, Vilaró S, Fabre M. Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. *Eur J Neurosci.* 2003; 18(9): 2538-44.

Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F Jr, Tabira T, Sasaki R. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem.* 1993; 268(15): 11208-16.

Mazumdar J, O'Brien WT, Johnson RS, LaManna JC, Chavez JC, Klein PS, Simon MC. O₂ regulates stem cells through Wnt/ β -catenin signalling. *Nat Cell Biol.* 2010; 12(10): 1007-13.

McKay RD. Stem cell biology and neurodegenerative disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004 May 29;359(1445): 851-6.

Millman JR, Tan JH, Colton CK. The effects of low oxygen on self-renewal and differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Organ Transplant.* 2009; 14(6): 694-700.

Literaturverzeichnis

Milosevic J, Maisel M, Wegner F, Leuchtenberger J, Wenger RH, Gerlach M, Storch A, Schwarz J. Lack of hypoxia-inducible factor-1 alpha impairs midbrain neural precursor cells involving vascular endothelial growth factor signaling. *J Neurosci.* 2007; 27(2): 412-21.

Milosevic J, Schwarz SC, Krohn K, Poppe M, Storch A, Schwarz J. Low atmospheric oxygen avoids maturation, senescence and cell death of murine mesencephalic neural precursors. *J Neurochem.* 2005; 92(4): 718-29.

Minnerup J, Heidrich J, Rogalewski A, Schäbitz WR, Wellmann J. The efficacy of erythropoietin and its analogues in animal stroke models: a meta-analysis. *Stroke.* 2009; 40(9): 3113-20.

Miskowiak K, O'Sullivan U, Harmer CJ. Erythropoietin enhances hippocampal response during memory retrieval in humans. *J Neurosci.* 2007; 27(11): 2788-92.

Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2010; 7(2): 150-61.

Morgan PJ, Ortinau S, Frahm J, Krüger N, Rolfs A, Frech MJ. Protection of neurons derived from human neural progenitor cells by veratridine. *Neuroreport.* 2009; 20(13): 1225-9.

Morrison SJ, Csete M, Groves AK, Melega W, Wold B, Anderson DJ. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J Neurosci.* 2000; 20(19): 7370-6.

Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell.* 2002; 110(4): 429-41.

Nishida N, Goel A. Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Curr Genomics.* 2011; 12(2): 130-7.

Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y. Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007; 64(2): 159-71.

Noguchi CT, Bae KS, Chin K, Wada Y, Schechter AN, Hankins WD. Cloning of the human erythropoietin receptor gene. *Blood.* 1991; 78(10): 2548-56.

Novak A, Dedhar S. Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 56(5-6): 523-37.

Osredkar D, Sall JW, Bickler PE, Ferriero DM. Erythropoietin promotes hippocampal neurogenesis in in vitro models of neonatal stroke. *Neurobiol Dis.* 2010; 38(2): 259-65.

Literaturverzeichnis

Pacary E, Legros H, Valable S, Duchatelle P, Lecocq M, Petit E, Nicole O, Bernaudin M. Synergistic effects of CoCl₂ and ROCK inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells. *J Cell Sci.* 2006; 119 (Pt13): 2667-78.

Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature.* 2001; 411(6833): 42-3.

Panchision DM. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J Cell Physiol.* 2009; 220(3): 562-8.

Pendharkar AV, Chua JY, Andres RH, Wang N, Gaeta X, Wang H, De A, Choi R, Chen S, Rutt BK, Gambhir SS, Guzman R. Biodistribution of neural stem cells after intravascular therapy for hypoxic-ischemia. *Stroke.* 2010; 41(9): 2064-70.

Pietras A, Hansford LM, Johnsson AS, Bridges E, Sjölund J, Gisselsson D, Rehn M, Beckman S, Noguera R, Navarro S, Cammenga J, Fredlund E, Kaplan DR, Pålman S. HIF-2alpha maintains an undifferentiated state in neural crest-like human neuroblastoma tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(39): 16805-10.

Placzek MR, Chung IM, Macedo HM, Ismail S, Mortera Blanco T, Lim M, Cha JM, Fauzi I, Kang Y, Yeo DC, Ma CY, Polak JM, Panoskaltsis N, Mantalaris A. Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. *J R Soc Interface.* 2009; 6(32): 209-32.

Pregi N, Vittori D, Pérez G, Leirós CP, Nesse A. Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1763(2): 238-46.

Qiu J, Cai D, Filbin MT. Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. *Glia.* 2000; 29(2): 166-74.

Rabie T, Marti HH. Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology (Bethesda).* 2008; 23: 263-74.

Rakic P. Limits of neurogenesis in primates. *Science.* 1985; 227(4690): 1054-6.

Ren H, Cao Y, Zhao Q, Li J, Zhou C, Liao L, Jia M, Zhao Q, Cai H, Han ZC, Yang R, Chen G, Zhao RC. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 347(1): 12-21.

Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005; 434(7035): 843-50.

Ryder EF, Snyder EY, Cepko CL. Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J Neurobiol.* 1990; 21(2): 356-75.

Literaturverzeichnis

Sakaguchi DS, Van Hoffelen SJ, Grozdanic SD, Kwon YH, Kardon RH, Young MJ. Neural progenitor cell transplants into the developing and mature central nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1049: 118-34.

Salceda S, Beck I, Caro J. Absolute requirement of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein for gene activation by hypoxia. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 334(2): 389-94.

Sättler MB, Merkler D, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bähr M, Diem R. Neuroprotective effects and intracellular signaling pathways of erythropoietin in a rat model of multiple sclerosis. *Cell Death Differ.* 2004; 11 Suppl 2: S181-92.

Santilli G, Lamorte G, Carlessi L, Ferrari D, Rota Nodari L, Binda E, Delia D, Vescovi AL, De Filippis L. Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells. *PLoS One.* 2010; 5(1): e8575.

Savino R, Ciliberto G. A paradigm shift for erythropoietin: no longer a specialized growth factor, but rather an all-purpose tissue-protective agent. *Cell Death Differ.* 2004; 11 Suppl 1: S2-4.

Schmöle AC, Brennfürer A, Karapetyan G, Jaster R, Pews-Davtyan A, Hübner R, Ortinau S, Beller M, Rolfs A, Frech MJ. Novel indolylmaleimide acts as GSK-3 β inhibitor in human neural progenitor cells. *Bioorg Med Chem.* 2010; 18(18): 6785-95.

Schwab ME. Structural plasticity of the adult CNS. Negative control by neurite growth inhibitory signals. *Int J Dev Neurosci.* 1996; 14(4): 379-85.

Semenza GL, Agani F, Feldser D, Iyer N, Kotch L, Laughner E, Yu A. Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiology of common human diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2000; 475: 123-30.

Seyfried DM, Han Y, Yang D, Ding J, Chopp M. Erythropoietin promotes neurological recovery after intracerebral haemorrhage in rats. *Int J Stroke.* 2009; 4(4): 250-6.

Shein NA, Grigoriadis N, Alexandrovich AG, Simeonidou C, Spandou E, Tsenter J, Yatsiv I, Horowitz M, Shohami E. Differential neuroprotective properties of endogenous and exogenous erythropoietin in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2008; 25(2): 112-23.

Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci.* 2001; 21(24): 9733-43.

Literaturverzeichnis

Sims JR, Lee SW, Topalkara K, Qiu J, Xu J, Zhou Z, Moskowitz MA. Sonic hedgehog regulates ischemia/hypoxia-induced neural progenitor proliferation. *Stroke*. 2009; 40(11): 3618-26.

Sirén AL, Fasshauer T, Bartels C, Ehrenreich H. Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics*. 2009; 6(1): 108-27.

Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsch A, Schwarz J. Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol*. 2001; 170(2): 317-25

Storch A, Sabolek M, Milosevic J, Schwarz SC, Schwarz J. Midbrain-derived neural stem cells: from basic science to therapeutic approaches. *Cell Tissue Res*. 2004; 318(1): 15-22.

Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay R. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci*. 2000; 20(19): 7377-83.

Sugimura R, Li L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2010; 90(4): 243-56.

Szablowska-Gadomska I, Zayat V, Buzanska L. Influence of low oxygen tensions on expression of pluripotency genes in stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011; 71(1): 86-93.

Theus MH, Wei L, Cui L, Francis K, Hu X, Keogh C, Yu SP. In vitro hypoxic preconditioning of embryonic stem cells as a strategy of promoting cell survival and functional benefits after transplantation into the ischemic rat brain. *Exp Neurol*. 2008; 210(2): 656-70.

Toth C, Martinez JA, Liu WQ, Diggle J, Guo GF, Ramji N, Mi R, Hoke A, Zochodne DW. Local erythropoietin signaling enhances regeneration in peripheral axons. *Neuroscience*. 2008; 154(2): 767-83.

Um M, Gross AW, Lodish HF. A "classical" homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cell Signal*. 2007; 19(3): 634-45.

van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Bel F. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Res Rev*. 2008; 59(1): 22-33.

Literaturverzeichnis

- Villa P, van Beek J, Larsen AK, Gerwien J, Christensen S, Cerami A, Brines M, Leist M, Ghezzi P, Torup L. Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007; 27(3): 552-63.
- Wang X, Zhu C, Wang X, Gerwien JG, Schrattenholz A, Sandberg M, Leist M, Blomgren K. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J Neurochem.* 2004; 91(4): 900-10.
- Wansleben C, Meijlink F. The planar cell polarity pathway in vertebrate development. *Dev Dyn.* 2011; 240(3): 616-26.
- Wenker SD, Chamorro ME, Vota DM, Callero MA, Vittori DC, Nesse AB. Differential antiapoptotic effect of erythropoietin on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells. *J Cell Biochem.* 2010; 110(1): 151-61.
- Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int.* 1999; 55(3): 808-20.
- Wu XC, Richards NT, Johns EJ. The influence of erythropoietin on the vascular responses of rat resistance arteries. *Exp Physiol.* 1999; 84(5): 917-27.
- Xie L, Johnson RS, Freeman RS. Inhibition of NGF deprivation-induced death by low oxygen involves suppression of BIMEL and activation of HIF-1. *J Cell Biol.* 2005; 168(6): 911-20.
- Xie XJ, Wang JA, Cao J, Zhang X. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by myocardial medium under hypoxic conditions. *Acta Pharmacol Sin.* 2006; 27(9): 1153-8.
- Xiong Y, Mahmood A, Qu C, Kazmi H, Zhang ZG, Noguchi CT, Schallert T, Chopp M. Erythropoietin improves histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice in the absence of the neural erythropoietin receptor. *J Neurotrauma.* 2010; 27(1): 205-15.
- Xue YQ, Zhao LR, Guo WP, Duan WM. Intrastriatal administration of erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcome in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2007; 146(3): 1245-58.
- Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa Ki, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke.* 2001; 32(8): 1890-6.

Literaturverzeichnis

Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F, Noguchi CT. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*. 2002; 129(2): 505-16.

Zádori A, Agoston VA, Demeter K, Hádinger N, Várady L, Köhídi T, Göbl A, Nagy Z, Madarász E. Survival and differentiation of neuroectodermal cells with stem cell properties at different oxygen levels. *Exp Neurol*. 2011; 227(1): 136-48.

Zanjani ED, Poster J, Burlington H, Mann LI, Wasserman LR. Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J Lab Clin Med*. 1977; 89(3): 640-4.

Zhang F, Signore AP, Zhou Z, Wang S, Cao G, Chen J. Erythropoietin protects CA1 neurons against global cerebral ischemia in rat: potential signaling mechanisms. *J Neurosci Res*. 2006; 83(7): 1241-51.

Zhang F, Wang S, Cao G, Gao Y, Chen J. Signal transducers and activators of transcription 5 contributes to erythropoietin-mediated neuroprotection against hippocampal neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*. 2007 ; 25(1): 45-53.

Zhang K, Zhu L, Fan M. Oxygen, a Key Factor Regulating Cell Behavior during Neurogenesis and Cerebral Diseases. *Front Mol Neurosci*. 2011; 4: 5.

Zhao T, Zhang CP, Liu ZH, Wu LY, Huang X, Wu HT, Xiong L, Wang X, Wang XM, Zhu LL, Fan M. Hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells--role of hypoxia-inducible transcription factor-1alpha. *FEBS J*. 2008; 275(8): 1824-34.

Zhou L, Miller CA. Mitogen-activated protein kinase signaling, oxygen sensors and hypoxic induction of neurogenesis. *Neurodegener Dis*. 2006; 3(1-2): 50-5.

Zhu LL, Wu LY, Yew DT, Fan M. Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs. *Mol Neurobiol*. 2005; 31(1-3): 231-42.

Zipori D. The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat Rev Genet*. 2004; 5(11): 873-8.

9 Anhang

Danksagungen

Die Doktorarbeit ist nun zu Ende geschrieben und es gibt viele, bei denen ich mich für ihre Hilfe und Unterstützung bedanken möchte.

Als erstes bedanke ich mich bei Herrn Prof. Rolfs dafür, dass ich die Möglichkeit hatte am AKos an diesem außerordentlich interessanten Thema zu arbeiten, sowie seine Unterstützung bei der Doktorarbeit.

Außerdem gilt ganz großer Dank den Dres. Steffi und Moritz Frech, die mich während der ganzen Dissertation unterstützt und betreut haben. Aber natürlich möchte ich auch allen anderen vorherigen und jetzigen Mitarbeitern des Akos für Ihre Unterstützung danken: Anne, Andrea, Annett, Caro, Christian, Ellen, Jan, Jana, Jiankai, Lea, Michi, Norman, Orianne, Peter, Rayk, Ramona, Venkata und Xin.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und Freunden für viele interessierte Nachfragen, kleine und große Motivationen, und überhaupt: ihr seid die Besten!