

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor Prof. Dr. Guido Posern)

Untersuchungen zur Neuroprotektion von Erythropoietin

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Michaela Rabe
geboren am 05.08.1986 in Burgstädt

Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte

Gutachter: 1. Prof. Dr. R. Horstkorte
2. Prof. Dr. O. Thews
3. PD Dr. K. Danker, Berlin

01.12.2015
22.06.2016

Referat

Erythropoietin (EPO), ein vor allem in den peritubulären Zellen der Niere gebildetes Peptidhormon, nimmt als blutbildungsförderndes Hormon schon seit vielen Jahren einen festen Stellenwert in der Therapie renaler und Tumoranämien ein. Im Laufe der Zeit wurden weitere Funktionen EPOs bekannt. In zahlreichen klinischen Studien und tierexperimentellen Arbeiten konnten unter anderem auch neuroprotektive Eigenschaften nachgewiesen werden, welche nicht nur durch antiapoptotische Wirkung strukturelle Läsionen in Postischämiegebieten eindämmen, sondern auch langzeitlichen Einfluss auf Lernen und kognitive Fähigkeiten ausüben.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der neuronalen Modellzelllinie PC-12 der Einfluss von Erythropoietin auf die neurale Differenzierung und das Wachstum von Neuriten untersucht. Dazu wurden in Zeitreihenexperimenten PC-12-Zellkulturen einem erythropoietinhaltigen Medium exponiert und die Entwicklung der Zellen im Vergleich zu Negativkontrollen photodokumentiert. Eine vorherige Induktion neuronaler Differenzierung durch NGF wurde dabei nicht durchgeführt. Parallel wurde die Aktivierung des EPO-assoziierten JAK2/STAT5-Signaltransduktionsweges im Immunoblotverfahren untersucht.

In Zellkulturen unter EPO-Exposition konnte die Induktion neuronaler Differenzierung sowie das Wachstum von Neuriten beobachtet werden. Im Immunoblot zeigte sich ein deutlicher Anstieg von phosphoryliertem STAT5 auf das bis zu 4 1/2-fache des Ausgangswertes unmittelbar nach Zusatz des erythropoietinhaltigen Mediums zu den Zellkulturen.

Zusammenfassend konnte die neurotrophe Wirkung Erythropoietins anhand der morphologischen Entwicklung der PC-12-Zellen bestätigt werden. Die Ergebnisse stützen die These, dass Erythropoietin einen langzeitlichen positiven Einfluss auf Kognition und Lernvermögen haben kann und somit einen erfolgversprechenden Wirkstoff in der Therapie neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen darstellen könnte.

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	III
II	Abbildungsverzeichnis	IX
III	Tabellenverzeichnis	IX
1	Einleitung	1
1.1	Erythropoietin	1
1.1.1	Physiologie des Erythropoietin-Moleküls	1
1.1.2	Der EPO-Rezeptor	3
1.1.3	EPO in Therapie und Forschung	5
1.2	Wachstum und Differenzierung neuraler Gewebe	8
1.2.1	Regeneration neuraler Gewebe	9
1.2.2	Das parakrine neurale EPO-EpoR-System	11
1.3	PC-12-Zellen	12
2	Zielstellung	13
3	Material und Methoden	14
3.1	Material	14
3.1.1	Chemikalien und Materialien	14
3.1.2	Geräte	20
3.1.3	Behandlung von Lösungen und Geräten	21
3.2	Methoden	22
3.2.1	Zellbiologische Methoden	22
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	24
3.3	Zentrallabor	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Nachweis von Erythropoietin	28
4.2	Nachweis der Expression des EPO-Rezeptors auf PC-12-Zellen	29
4.3	Expression des EPO-Rezeptors unter EPO-Exposition (Proteinebene)	30
4.4	pSTAT5 unter EPO-Exposition	31
4.5	PC-12-Differenzierung unter EPO-Exposition	33
5	Diskussion	37
5.1	Die Expression des EPO-Rezeptors auf PC-12-Zellen	37
5.2	pSTAT5 unter EPO-Exposition	38
5.3	Differenzierung unter EPO-Exposition	39

5.4	Förderung der PC-12-Differenzierung unter EPO im Hinblick auf die Eigenschaften von PC-12-Zellen als Tumorzellen	41
6	Zusammenfassung	43
7	Literaturverzeichnis	44
8	Thesen	58
	Tabellarischer Lebenslauf	
	Selbstständigkeitserklärung	
	Danksagung	

I Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
7q21-7q22	kurzer Arm des Chromosomes 7 Position 21 bis 22
Abb.	Abbildung
Anti-p-stat-a/b-IgG-Antikörper	Anti-phosphoryliertes-STAT-a/b- Immunglobulin G-Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	einfach destilliertes Wasser
Asn24, Asn38, Asn83	Asparagin an Position 24, 38 bzw. 83
ATPase	Adenosintriphosphatase
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (Proteinfamilie)
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BSA	bovine serum antigen
bzw.	beziehungsweise
C-terminal	am Kohlenstoffende befindlich
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CEPO	carbamoylated EPO
CERA	continuous erythropoiesis receptor activator
CFU-E-Zellen	Colony forming unit of erythroid lineage
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary - Zellen

CNTF	ciliary neurotrophic factor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSPG	Chondroitinsulfatproteoglykan
Cu ¹⁺	einfach ionisiertes Kupfer
Cu ²⁺	zweifach ionisiertes Kupfer
INT/mm ²	Intensität pro Quadratmillimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Elisa	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoietin
EpoR	Erythropoietinrezeptor
et al.	et alii , et aliae, et alia
FG-2216	FibroGen 2216
g	Gramm
GATA2	Mitglied der Familie von Transkriptionsfaktoren, welche die DNA-Sequenz „GATA“ binden
GDNF	glial-cell line-derived neurotrophic factor

Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HIF-1	Hypoxie-induzierter-Faktor 1
HIF-Stabilisierer	Hypoxie-induzierter-Faktor-Stabilisierer
HS	Horse Serum
HVA	homovanillic acid
IgG	Immunglobulin G
IMR-32	Human Neuroblastoma cell line
i.v.	Intravenös
IU	internationale Units
JAK	Januskinase
K11706	iron/zinc/copper transport system ATP-binding protein
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
M	molar
mA	Milliampere
MAG	myelinassoziierte Glykoproteine
MAP	mitogen-activated protein
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mykroliter

mM	millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
mV	Millivolt
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
N-glykosyliert	Bindung des Zuckers an den Stickstoff der freien Säureamidgruppe von Asparagin
N-terminal	am Stickstoffende befindlich
Na ⁺	ionisiertes Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Neuro-2A	Murine Neuroblastoma cell line
ng	Nanogramm
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
NGF	nerve growth factor
nm	Nanometer
Nogo	Neurite outgrowth inhibitor, Reticulon-4
Nogo-66	66-residue domain of Nogo
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4	Neurotrophin-4
O-glykosyliert	Bindung des Zuckers an die Hydroxygruppe von Serin, Threonin, Hydroxyprolin oder Hydroxylysin
Omgp	oligodendrocyte myelin glycoprotein
O ₂	Sauerstoff
PBS	phosphate buffered saline

PC-12	Phäochromocytomzellen
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIC	Phenylisocyanat
pSTAT5	phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription 5
RAS	Rat sarcoma, Proto-Onkogen
RhoA	Ras homolog gene family, member A
rpm	rounds per minute
RPMI	Zellkulturmedium für normale und neoplastische Leukozyten sowie andere humane und tierische Zelltypen, Mitte der 1960er Jahre von G. E. Moore und Kollegen am Roswell Park Memorial Institute entwickelt.
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser126	Serin an Position 126
S100 β	neurotrophisches Protein
SH2	SRC homology 2
SH-SY5Y	humane Neuroblastomzelllinie
SOS	Son of Sevenless, Protein des RAS/MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges

STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Buffered Saline
TBS-T	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM6008	HIF-stimulierendes Protein
Sema4D/CD100	transmembrane semaphorin 4D
TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan
Triton X-100	polyethylene glycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl ether
u.a.	unter anderen, unter anderem
U/ μ l	Units pro Mikroliter
USA	United States of America
VEGF	vascular endothelial growth factor
v/v	Volumenkonzentration (volume/volume)
w/v	Massekonzentration (mass/volume)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur und Glykosylierung von EPO	3
Abbildung 2: EPO-Rezeptor und EPO-Signaltransduktion	5
Abbildung 3: Nachweis von EPO im CHO-Zellkulturüberstand	28
Abbildung 4: Nachweis von EpoR auf verschiedenen Zelllinien	30
Abbildung 5: Expression von EpoR in Abhängigkeit von der Anwesenheit von EPO	31
Abbildung 6: Expression von pSTAT5 unter EPO-Exposition	32
Abbildung 7: Differenzierung von PC-12-Zellen nach 96 h ohne NGF und unter Exposition von 10 ng NGF	34
Abbildung 8: Differenzierung von PC-12-Zellen unter Exposition von nicht-EPO-haltigem CHO-Zellkulturüberstand nach 72 h	35
Abbildung 9: PC-12-Zellen nach 96 h Inkubationszeit ohne EPO und unter Exposition von EPO-haltigem CHO-Zellkulturüberstand	35

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erythropoietin-Varianten	7
-------------------------------------	---

1 Einleitung

1.1 Erythropoietin

1.1.1 Physiologie des Erythropoietin-Moleküls

Erythropoietin, ein vor allem in den peritubulären Zellen der Niere gebildetes Peptidhormon, ist ein essentieller Einflussfaktor der Blutbildung [1]–[4]. EPO bewirkt eine vermehrte Entwicklung von Vorläuferzellen der Hämatopoese und deren Differenzierung, vor allem durch seine antiapoptotischen Eigenschaften (Übersichtsarbeit [5]; [6], [7]). Die durchschnittliche EPO-Konzentration im Blut eines erwachsenen Menschen liegt bei etwa 20 mU/ml (entspricht ca. 100 pg/ml). Unter hypoxischen Bedingungen steigt diese an, wobei der größte Effekt, das heißt die höchste Neubildungsrate an Erythrozyten, bei einer Konzentration von 0,5-1 U/ml nachgewiesen werden konnte [8], [9]. Sinkt die EPO-Konzentration, so kommt es zu einer verstärkten Apoptose der hämatopoetischen Progenitorzellen [10]. Doch auch in nicht blutbildenden Geweben hat EPO fördernden bzw. protektiven Einfluss, z.B. auf die Angiogenese [11]–[13] und auf Herzmuskelzellen [14]–[19].

Die Biosynthese von EPO

Die Produktion von EPO wird über den Sauerstoffpartialdruck in Blut und Gewebe gesteuert. Dem Transkriptionsfaktor HIF kommt dabei eine große Bedeutung zu [20]. Dieser befindet sich im Cytosol. Ist der Sauerstoffpartialdruck hoch, so bewirkt die O₂-abhängige Prolinhydroxylase eine Hydroxylierung von HIF, welches dadurch für die Ubiquitylierung zugänglich und im Proteasom abgebaut wird. Ist dagegen der Sauerstoffpartialdruck niedrig, so findet keine Hydroxylierung statt, wodurch HIF stabil bleibt und nach Translokation in den Zellkern die Expression O₂-abhängiger Gene, wie z.B. das EPO-Gen auf Chromosom 7 (Position 7q21-7q22 [21]), aktiviert. HIF existiert in verschiedenen Formen, abhängig von der

Zusammensetzung seiner Untereinheiten, welche auch verschiedene Funktionen besitzen. Aktuell sind HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α bekannt [22]–[25]. Hierbei findet durch HIF-1 α vorwiegend die Aktivierung des vaskulären Wachstumsfaktors VEGF und des Glucosetransporters GLUT-1 statt [26], während HIF-2 α vorwiegend die Expression von EPO induziert [27]–[30].

Endogenes EPO wird hauptsächlich in den peritubulären Zellen der Niere [31], [31], [32] und in den Kupferzellen der Leber sowie Hepatozyten [33]–[35] gebildet. Weiterhin sind Knochenmark, Milz [36], Reproduktionsorgane [37]–[39] sowie Zellen des zentralen Nervensystems [40]–[42] (Neurone, Astrozyten, mikrovaskuläre Endothelzellen) an der Produktion von EPO beteiligt.

Die Struktur von EPO

EPO ist ein Glykoprotein mit einer Größe von ca. 30,4 kDa [43], bestehend aus 165 Aminosäuren [44, S. 354–355], welches durch posttranslationale Modifikation aus dem 193 Aminosäuren fassenden Prä-Pro-Protein entsteht. An Asn24, Asn38, Asn83 sowie Ser126 ist EPO glykosyliert, wobei die Asparaginreste N-glykosyliert sind, der Serinrest O-glykosyliert. Die Glykosylierungen an den Asparaginresten sind verantwortlich für die Stabilisierung des EPO-Moleküls [45], [46], während für diejenige am Serinrest bisher noch keine nähere Funktion bekannt ist [47], [48]. Die Glykosylierung von EPO spielt eine große Rolle für dessen biologische Aktivität [49]. Höher sialylierte EPO-Moleküle haben eine längere Serumhalbwertszeit [50], [51], [52] und höhere Serumaktivität als geringer sialylierte Moleküle. Sie sind stabiler und resistenter gegenüber Denaturierung durch pH- oder Temperaturveränderungen. Im Rahmen der Mikroheterogenität EPOs [44, S. 354], welche sowohl beim nativen als auch beim rekombinanten EPO auftritt, kommt es zu unterschiedlichen biologischen Eigenschaften und Migrationsgeschwindigkeiten in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wodurch sich hier die Banden von humanem EPO bei 34-38 kDa zeigen [54]. Ein hoher Glykosylierungsgrad birgt auch eine geringere Affinität zum EPO-Rezeptor. Dadurch wird das im Blut zirkulierende EPO weniger schnell durch rezeptortragende Gewebe abgereichert. Dieser Effekt wurde bei der Herstellung

von rekombinantem humanen EPO (r-HuEPO) genutzt. CHO-(Chinese Hamster Ovary)-Zellen sind eine der Zelllinien, die durch Transfektion des EPO-Gens dazu befähigt sind, EPO zu produzieren [45], [47]. Neben Epoetin alfa und beta wurden auch CHO-Zelllinien entwickelt, welche das hyperglykosylierte Darbepoetin alfa produzieren, welches eine 3- bis 4-fach höhere Halbwertszeit besitzt als Epoetin mit einer Halbwertszeit von 6-8 Stunden [49].

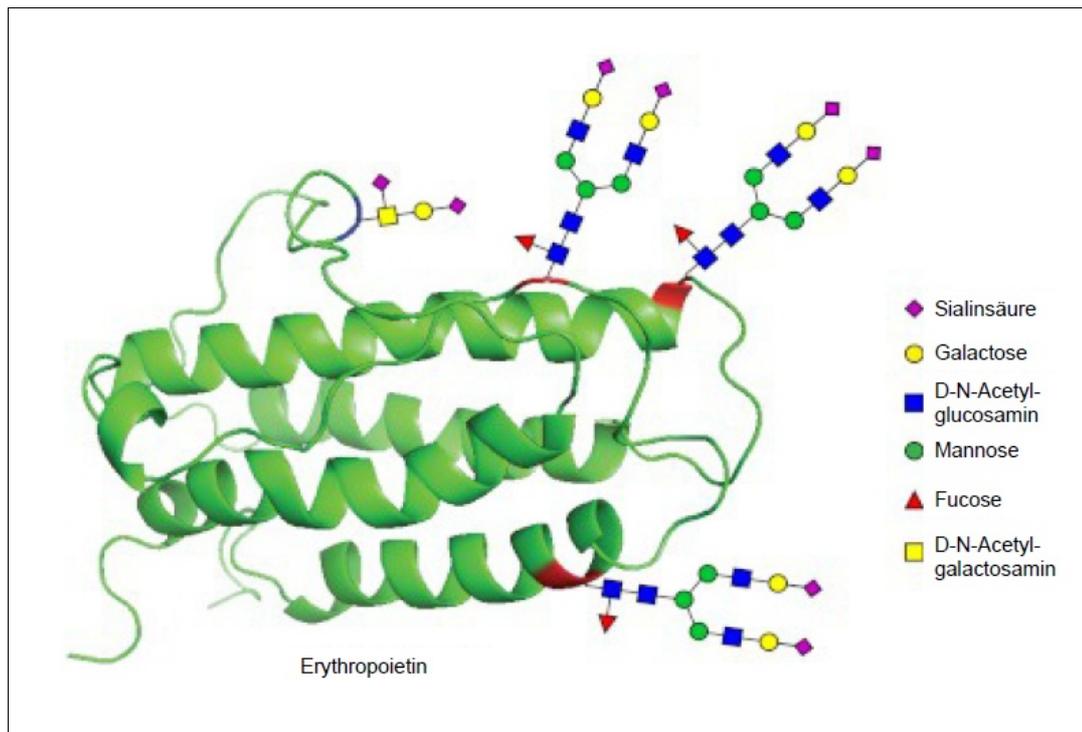


Abb. 1: Struktur und Glykosylierung von EPO, modifiziert nach Brailsford and Danishefsky et al. [53]

1.1.2 Der EPO-Rezeptor

Nicht nur die Produktion von EPO selbst, sondern auch die Expression des EPO-Rezeptors (EpoR) erstreckt sich auf mehrere Gewebearten und Organsysteme. So ist EpoR hauptsächlich auf hämatopoietischen Vorläuferzellen, z.B. CFU-E-Zellen [55], und renalen Mesangium- und Endothelzellen zu finden [56]. Aber auch auf Endothelzellen und glatten

Muskelzellen in Gefäßwänden [11], [12], [57], auf Inselzellen des Pankreas [58], auf den Leydig-Zellen des Hodens [59], in Epi- und Pericard [60], Plazenta [61] sowie auf Astrozyten und Neuronen [40], [41], [62], [63] konnte EpoR nachgewiesen werden.

EpoR ist eine aus 484 Aminosäuren bestehende Tyrosinkinase aus der Cytokin Klasse I-Rezeptor-Superfamilie (Übersichtsarbeit [1]; [64]). Er besteht aus einer transmembranären Proteindomäne sowie einer variablen intrazellulären und einer extrazellulären Domäne, welche ein WSXWS-Motiv beinhaltet (Übersichtsarbeit [1]). Nach Ligandenbindung erfolgt die Homodimerisierung zweier EpoR-Moleküle, woraufhin intrazellulär auf beiden Seiten eine Januskinase 2 aktiviert wird, welche zur Phosphorylierung eines Tyrosinrestes an jeder intrazellulären Domäne des Rezeptorkomplexes führt. Dadurch werden Bindungsstellen für verschiedene Signalmoleküle exprimiert. In Folge kommt es zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, wie z.B. PI-3K/Akt, JAK2/STAT5, der MAP-Kinase-Weg und die Proteinkinase C. Nach ca. 30-60 Minuten kommt es zur Termination der EpoR-Aktivierung durch Dephosphorylierung der Januskinasen 2 durch die hämatopoetische Zellphosphatase, woraufhin EpoR endozytiert wird (Übersichtsarbeit [65]). Insgesamt wird nur eine geringe Menge des Rezeptors exprimiert. Der überwiegende Teil befindet sich intrazellulär [66].

Im hämatopoetischen System sowie auf Skelettmuskelzellen ist der Rezeptor nach fertiger Differenzierung auf der Zelloberfläche nicht mehr nachweisbar, was die Bedeutung EPOs als Wachstumsfaktor in der Embryogenese unterstreicht [67]. Im Gegensatz dazu persistiert die EpoR-Expression auf fertig differenzierten Herzmuskelzellen sowie Neuronen [68]–[70].

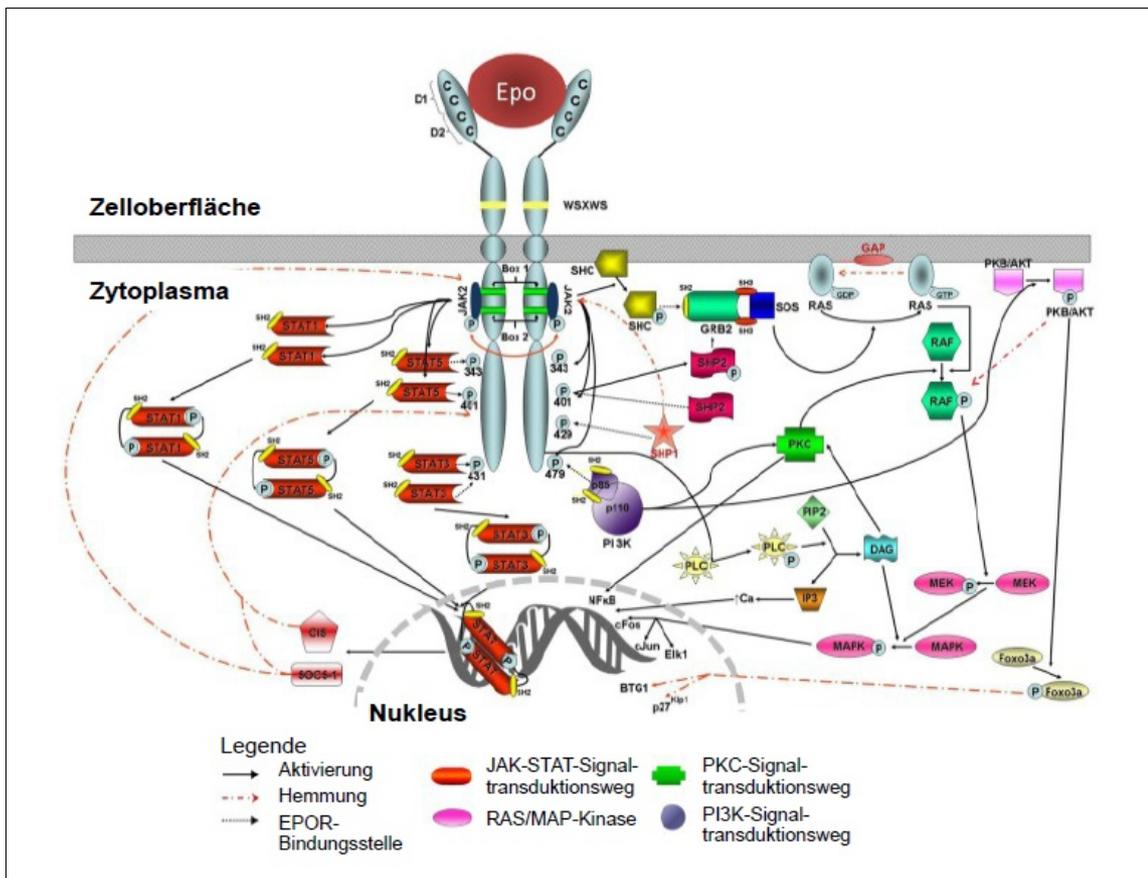


Abb. 2: EPO-Rezeptor und EPO-Signaltransduktion, modifiziert nach N. Debeljak et al. [71]

1.1.3 EPO in Therapie und Forschung

Historischer Hintergrund

EPO ist ein einst aufgrund seiner blutbildungsfördernden Eigenschaften entdecktes und schon seit vielen Jahren bekanntes Hormon, welches bereits vor mehreren Jahrzehnten Einzug in die moderne Medizin gehalten hat. Im Jahre 1906 von P. Carnot und Cl. DeFlandre aufgrund von Tierexperimenten an Kaninchen als eine humorale, die Erythropoiese steigernde Substanz im Blut vermutet [72], wurde das EPO-Molekül 1953 schließlich von Allan Erslev entdeckt [73] und 1977 von Goldwasser et.al, nachdem ihnen 1957 der indirekte Nachweis der Bildung von EPO in der Niere gelang [74], erstmals aus Harn isoliert [75]. Mit der Isolierung des humanen EPO-Gens durch Fue-Kuen Lin 1983 [76] ebnete sich schließlich der Weg, welcher 1985 zur ersten

erfolgreiche Klonierung und Expression eines rekombinanten EPO in Säugetierzellen führte [77]. 1989 schließlich wurde das erste rekombinante EPO aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) namens Epogen® (Epoietin α) auf den Markt gebracht [76].

EPO gilt mittlerweile als relativ sicheres und effektives Therapeutikum im Falle renaler Anämien und wird mit dieser Indikation schon seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich eingesetzt [78].

EPO in der medizinischen Forschung

Innerhalb der Patientenpopulation, welche EPO verabreicht bekam, fiel eine Verbesserung der kognitiven Eigenschaften auf, die zunächst auf das erhöhte Sauerstoffangebot durch verbesserte Transportkapazitäten zurückgeführt wurde (Übersichtsarbeit [79]). Spätestens seit der Entwicklung und Entdeckung bezüglich der Erythropoese unwirksamer aber dennoch bezüglich Kognition und neuraler Funktionalität wirksamer Derivate und Varianten des Hormones (Tabelle 1) wird eine von der Erythropoese unabhängige neuroprotektive Funktion des EPO-Moleküls diskutiert [80].

Die Beeinflussung neuraler Funktionen durch Applikation von EPO konnte bisher in mehreren klinischen Studien gezeigt werden. So untersuchten 2002 Ehrenreich et al. den Effekt von intravenös verabreichtem EPO auf das Outcome von 53 Stroke-Patienten mit akutem Verschluss der Arteria cerebri media, gemessen am 30 Tage postinterventionell erhobenen Barthelindex sowie anhand des Größenausmaßes der in der Magnetresonanztomographie sichtbaren Infarktläsion. Mit EPO behandelte Patienten zeigten eine schnellere Regression neurologischer Defizite sowie eine geringere Ausdehnung des Infarktareals in der MRT. Weiterhin konnte eine schnellere Abnahme des Serummarkers für neuronalen Zellschaden S100 β im Vergleich zur Placebogruppe festgestellt werden, was eine schnellere Wiederherstellung der Funktion der Blut-Hirn-Schranke im Anschluss an das Infarktgeschehen vermuten lässt. Die im Rahmen dieser Studie gezeigte positive Wirkung auf das Outcome von Infarktpatienten wird hauptsächlich auf den antiapoptotischen Effekt EPOs, vor allem im Bereich der Penumbra, aber auch auf die neuroprotektiven

Eigenschaften in hypoxisch-toxischem Milieu zurückgeführt. Ein relevanter Anstieg von Hämatokrit und Erythrozytenzahl blieb aus [81].

Weiterhin berichten Miskowiak et al. (2007) von einer gesteigerten hippocampalen Aktivität bei gesunden Probanden während des Abrufens von Gedächtnisinhalten, sichtbar in der funktionellen Magnetresonanztomographie nach der intravenösen Applikation von EPO, ebenso ohne Blutbildrelevanz [82]. Im selben Jahr veröffentlichen Ehrenreich et al. eine Studie, im Rahmen derer eine langzeitliche Verbesserung der Gehstrecke, der Feinmotorik sowie der Kognition von MS-Patienten nach Behandlung mit EPO gezeigt werden konnte [83].

El-Kordi et al. zeigen 2009 in einer Studie am Tiermodell, dass die intraperitoneale Injektion von Erythropoietin eine signifikante Verbesserung der Lernfähigkeit von Mäusen sowie der Stabilität des Erlernten, objektiviert mittels Five Choice Serial Reaction Time Task, nach sich zieht [84]. Ein solches Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass EPO nicht nur in der Lage ist, eine kurzfristige Wirkung mittels Hemmung der Apoptose geschädigter Zellen bzw. anti-entzündlicher Eigenschaften zu erwirken, sondern auch langfristig eine Verbesserung neuraler Funktionalität zu erreichen. So konnten Ehrenreich et al schon 2004 die Fähigkeit Erythropoietins, langfristig den Progress der neuralen Degeneration bei an Schizophrenie erkrankten Patienten zu verlangsamen, im Rahmen einer klinischen Studie zeigen [85]. Es stellt sich damit die Frage, durch welche Mechanismen EPO dazu in der Lage ist, eine langzeitliche modulierende Wirkung auf die Funktionsfähigkeit neuraler Zellen auszuüben.

Tabelle 1: Erythropoietin-Varianten

Derivate / Analogica	Epoetine alpha, beta, delta und omega, Darbepoetin, CERA (continuous erythropoiesis receptor activator), CEPO (carbamoylated EPO), Asialo-EPO
Mimetics	Hematide, Epopeptid AB, helix B peptide
HIF-Stabilisierer	Prolylhydroxylase-Inhibitoren, z.B. 2-Oxoglutarate-Analogica, FG-2216, TM6008
GATA2-Inhibitoren	z.B. K11706

modifiziert nach Sirén et al. 2009 [80]

1.2 Wachstum und Differenzierung neuraler Gewebe

Die Differenzierung neuraler Zellen aus pluripotenten Vorläuferzellen wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, deren komplexes Zusammenspiel noch nicht endgültig geklärt ist. Die Entwicklung von Neuronen und Gliazellen aus neuralen Stammzellen wird unter anderem gesteuert durch EGF (epidermal growth factor), FGF-2 (fibroblast growth factor 2) und TGF- α (transforming growth factor- α) [86].

Essentiell für die Funktionalität neuraler Gewebe ist die Bildung von Dendriten, Axonen und Synapsen, welche in ihrer Gesamtheit ein Netzwerk entstehen lassen, das die Bildung, Weiterleitung und Integration von Signalen bzw. Informationen in Form von Aktionspotentialen ermöglicht. Das Auswachsen von Dendriten und Axonen wird durch eine Vielzahl von Faktoren gesteuert. Eine wichtige Gruppe bilden dabei die Neurotrophine, welche den neuralen Wachstumsfaktor NGF, BDNF (brain-derived neurotrophic factor) sowie NT-3 und NT-4 (Neurotrophin-3 und -4) einschließen.

NGF induziert die Entstehung des Wachstumskegels, aus welchem das Axon sprosst [87]. BDNF bindet an Thyrosinkinase, wobei durch Binden an TrK B die Aktivierung des Ras/MAPK-, des PI3K/Akt- und des IP3/Ca²⁺-Signaltransduktionsweges erreicht wird. Infolge kommt es zu einem Anstieg der Anzahl proximaler Dendriten. Insbesondere Akt fördert das Auswachsen von Neuriten in frühen Stadien der Neuritogenese [88]. Über eine Anreicherung von nuclearem FOXQ1 wird die Zelle im G1-Stadium gehalten, was zu einer Hemmung weiterer Proliferation des Gewebes und zur Förderung der Zelldifferenzierung mit entsprechendem Neuritenwachstum führt. BDNF fördert durch Bindung an TrkB das Auswachsen von Dendriten über längere Distanzen.

Weitere Faktoren, die die Bildung von Dendriten und Axonen beeinflussen, sind unter anderem die wachstumsfördernden GTPasen Rac und Cdc42 sowie die wachstumshemmende GTPase Rho, weiterhin NF- κ B, welches zu einer Verringerung der absoluten Anzahl, jedoch Verlängerung von Dendriten führt

und Bestandteil der durch NGF ausgelösten Signaltransduktionskaskade ist, sowie APC (Anaphase promoting complex), Notch und viele weitere (Übersichtsarbeit [89]).

Dendriten fungieren als Empfänger von Aktionspotentialen anderer Neurone über Synapsen, deren Gegenstück das Endknöpfchen eines Axones darstellt. Zur gezielten Weitergabe von Informationen ist demnach ein gerichtetes Wachstum von Axonen notwendig. Die "Lenkung" dieses Wachstums wird ebenso durch eine Vielzahl von Molekülen gesteuert. Zu diesen zählen insbesondere Netrine, Semaphorine, Slits und Ephrine. Durch ein komplexes Zusammenspiel dieser Faktoren mit ihren entsprechenden Rezeptoren kommt es über attraktive und repulsive Impulse zur Bildung sogenannter "repulsive corridors", welche eine Art Führungsschiene für aussprossende Axone darstellen [90].

1.2.1 Regeneration neuraler Gewebe

Eine Gruppe von Erkrankungen, welche eine weitreichende Einschränkung der Lebensqualität der betroffenen Patienten bewirken kann, ist die der strukturellen Schädigungen von Hirngewebe im Rahmen ischämischer Insulte oder intrazerebraler Blutungen. Die daraus resultierende neurologische Ausfallsymptomatik, wie z.B. sensomotorische Hemisynndrome, stellt eine Herausforderung sowohl für den Patienten als auch für Therapeuten dar und die entsprechende Körperfunktion, wie sie vor dem Ereignis bestand, kann nicht selten nur unvollständig wiederhergestellt werden, sodass eine beständige Forschung um cerebrale Läsionen entstanden ist (Übersichtsarbeit [91]). Eine Ursache dafür liegt in der nur begrenzten Regenerationsfähigkeit des neuralen Gewebes im zentralen Nervensystem. Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem, dessen Neuronen dazu in der Lage sind, nach einer Läsion unter entsprechenden Voraussetzungen Axone erneut aussprossen zu lassen und somit die Innervierung des entsprechenden Versorgungsgebietes zu erneuern und weiterhin sicher zu stellen [92], [93], besteht eine solche Funktion

im zentralen Nervensystem nicht. Hier erfolgt trotz Überleben der geschädigten Nervenzelle in den meisten Fällen kein erneutes Auswachsen des Axones (Übersichtsarbeit [94]). Verschiedene Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass die Ursache dafür weniger in den Neuronen selbst als viel mehr in dem sie umgebenden Milieu zu suchen ist. Insbesondere Nogo, ein Myelin-assoziiertes Faktor, welches von Oligodendrogliazellen gebildet wird, verhindert ein erneutes Auswachsen des Axons durch Wechselwirkung mit dem Wachstumskegel [95], [96]. Auch die umgebenden Astrozyten bilden wachstumshemmende Substanzen, wie z.B. saures Gliaprotein (GFAP) und sulfatierte Proteoglykane [97]. Entstehende Gewebereste werden nicht suffizient phagozytiert, sodass letztendlich eine Narbe entsteht [98].

Im Gegensatz dazu besitzt das Axon des peripheren Nervensystems, sofern die Basallamina unverletzt bleibt, die Fähigkeit, erneut auszusprossen [99]. Unterstützung erhält es von Makrophagen und Schwannzellen, welche für die Säuberung der Umgebung von Zelltrümmern, aber auch für die Bildung neurotropher Substanzen und Adhäsionsmoleküle sorgen [100]–[104].

Dass die Hauptursache für die unterschiedliche Regenerationsfähigkeit von Nervenzellen im umgebenden Milieu liegt, zeigen auch David und Aguayo. Sie fanden, dass neurale Zellen der Spinalnerven, welche einen Fortsatz im zentralen und einen im peripheren Nervensystem besitzen, nach einer Läsion nur den peripheren Fortsatz zu regenerieren in der Lage sind. Weiterhin konnten sie zeigen, dass auch Neuronen des zentralen Nervensystems zur Axonregeneration fähig sind, sofern sie in einem dem peripheren Nervensystem entsprechenden Milieu kultiviert werden [105].

Diese bei akuten Ereignissen und der nachfolgenden Regeneration des Gewebes sowie der daraus resultierenden Rehabilitationsfähigkeit des Patienten relevanten Prozesse und Faktoren spielen in der klinischen Neurologie eine genauso große Rolle wie die langzeitliche Wiedererlangung körperlicher und kognitiver Funktion sowie sekundärprophylaktische Neuroprotektion. Für beide Bereiche scheint das aus der Endokrinologie und Hämatologie bekannte und bewährte Hormon Erythropoietin eine interessante Perspektive darzustellen.

1.2.2 Das parakrine neurale EPO-EpoR-System

Wie bereits beschrieben, sind sowohl EPO als auch EpoR nicht ausschließlich im blutbildenden System des Körpers zu finden. EpoR konnte ebenso auf Neuronen nachgewiesen werden [106], [107] und Astrozyten als neurale Gliazellen konnten als ZNS-eigene EPO-Produzenten identifiziert werden [42], [108], [109]. Insgesamt kommt dem EPO-EpoR-System wahrscheinlich eine größere Bedeutung zu als die bisher beschriebenen protektiven Effekte im Falle von Ischämien oder Traumata. Studien legen nahe, dass EPO-EpoR eine essentielle Funktion in der Entwicklung neuraler Gewebe einnimmt. So konnte gezeigt werden, dass Mauspopulationen ohne funktionstüchtigen EpoR neben einer letalen Anämie auch eine auffällige Minderentwicklung des embryonalen ZNS sowie eine reduzierte Anzahl neuraler Progenitorzellen aufweisen [110], [111]. Die neurale Fehldifferenzierung ist dabei unabhängig von der resultierenden Hypoxie. Individuen mit funktionstüchtigem EPO-EpoR-System der Hämatopoese, jedoch Deletion des neuralen EpoR weisen ebenso neurale Schäden auf, sodass von einem direkten Einfluss von EPO auf die Neurogenese auszugehen ist [70]. Damit einhergehend exprimieren neurale Progenitorzellen größere Mengen EpoR als differenzierte Neuronen [70]. In adulten Organismen kann EpoR wiederum in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden in Regionen des ZNS, welche für die Neubildung neuraler Zellen verantwortlich sind [42], [63], [111], [112]. Korrelierend kann gemäß der HIF-abhängigen Expression von EPO eine verstärkte Neurogenese unter Hypoxie beobachtet werden [113], [114]. All diese Ergebnisse lassen eine umfassendere Funktion von EPO in der Differenzierung neuraler Gewebe vermuten. Das therapeutische Potential des Hormones ist also groß. Eine Schwierigkeit stellt die möglichst zielgerichtete Applikation dar. Die Blut-Hirn-Schranke stellt für EPO eine nicht unerhebliche Barriere dar, wobei zum Transport sowohl aktive, rezeptorgebundene, als auch extrazelluläre Wege genutzt werden. Ein Anstieg des cerebralen EPO-Spiegels nach peripherer Applikation konnte bereits mehrfach gezeigt werden [115]–[118]. Insbesondere nach Läsionen, wie z.B. Ischämien, ist außerdem die Permeabilität der Blut-

Hirn-Schranke im betroffenen Gebiet insgesamt erhöht, wodurch hierbei mit einem stärkeren Anfluten EPO's im Zielgebiet zu rechnen ist [119]. Zur Vermeidung peripherer Effekte, wie z.B. eine erhöhte Thromboseneigung durch Polycytämie, kommen EPO-Derivate zum Einsatz. Es ist bekannt, dass neben dem homodimeren EpoR auch eine heterodimere Form existiert, welche ebenso EPO bindet und als zweiten Bestandteil den β cR (Beta common Receptor) beinhaltet [120], [121]. Dieser konnte als hauptsächlicher Vermittler der nicht-hämatopoetischen und z.T. neuroprotektiven Effekte EPO's identifiziert werden, was bekräftigt wird durch die Tatsache, dass EPO-Derivate, welche nicht an den homodimeren EpoR binden, dennoch in der Lage sind, eine Wirkung im zentralen Nervensystem zu entfalten [14], [122]–[124].

1.3 PC-12-Zellen

PC-12 sind eine Modell-Zelllinie, die 1976 von Greene und Tischler aus der Nebenniere einer bestrahlten Ratte gewonnen wurde [125]. Es handelt sich also um Tumorzellen. Die Zellen des Nebennierenmarkes stammen von Sympathikoblasten aus der embryonalen Neuralleiste ab und entsprechen somit postganglionären sympathischen Neuronen ohne Fortsätzen. Sie werden durch präganglionäre sympathische Neurone innerviert [126, S. 452–453]. PC-12-Zellen werden häufig genutzt, um die Differenzierung und Proliferation neuraler Zellen nachzustellen. Dazu bedarf es der Adhäsion an eine Matrix sowie einer Stimulation durch Nerve growth factor. In Folge kann die Ausbildung von axon- bzw. neuritenähnlichen Strukturen beobachtet werden [127], [128] sowie die interzelluläre Kontaktaufnahme über synapsenähnliche Strukturen [129].

2 Zielstellung

EPO, ein in der Therapie renaler und tumorassoziierter Anämien lange bewährtes Hormon, übt sehr vielfältige Effekte auf verschiedenste Gewebe aus. In zahlreichen experimentellen Arbeiten sowie klinischen Studien wurde unter anderem auch eine neuroprotektive Funktion des Glykoproteins belegt. Die neuroprotektiven Eigenschaften EPOs gründen in der Apoptosehemmung, aber auch in einer antiinflammatorischen Funktion [130] und Förderung der Angiogenese [13], [57], [131]. Auch in der neuralen Differenzierung scheint Erythropoietin eine Rolle zu spielen.

In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob EPO dazu in der Lage ist, in neuralen Zellen Neuritenwachstum zu induzieren. Dazu wurden PC-12-Zellen kultiviert. Nach Inkubation der Zellen mit einer EPO-haltigen Nährlösung wurden diese bis zu 96 Stunden lichtmikroskopisch nachbeobachtet und ihre Entwicklung und Morphologie photodokumentiert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Materialien

Für die durchgeführten Laborarbeiten wurden u. a. Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Biochrom (Berlin), Gibco (Detroit, UDA) und Sigma (München) in höchster Qualitätsstufe verwendet.

Materialien für die Zellkultur wurden u. a. von den Firmen Falcon (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen), Corning (New York, USA) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Es handelte sich hier um sterile Einmal-Artikel oder um Materialien, die durch Autoklavieren sterilisiert wurden.

Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Hersteller
PC-12	Pheochromocytoma-Tumorzelllinie der Ratte	Leibniz-Institut DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
Neuro-2A	Neuroblastomzelllinie der Maus	
IMR-32	Humane Neuroblastomzelllinie	
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomzelllinie	

EPO

Substanz	Herkunft	Hersteller
Erythropoietin	CHO-Zellkulturüberstand	Institut für physiologische Chemie, Martin-Luther- Universität Halle- Wittenberg

Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
p-stat5a/b rabbit polyclonal IgG	1:500	Santa Cruz
EPO mouse monoclonal IgG	1:200-204800	Santa Cruz
EpoR rabbit polyclonal IgG	1:1000	Santa Cruz

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Goat-anti-rabbit polyclonal IgG (Peroxidase-Konjugat)	1:10000	Dianova, Hamburg
Rabbit-anti-Mouse polyclonal IgG (Peroxidase-Konjugat)	1:10000	Dianova, Hamburg
Goat-anti-Mouse polyclonal IgG (Peroxidase-Konjugat)	1:10000	Dianova, Hamburg

Kits

Kit	Hersteller
BCA™ Protein Assay Kit	PIERCE, Rockford, USA
Roti-Lumin (Chemilumineszenz-Substrat)	Roth, Karlsruhe

Marker

Marker	Hersteller
Protein Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (10-250 kDa)	Fermentas, USA
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas, USA

Medien für die Kultivierung eukaryontischer Zellen

Medium für PC-12-Zellen

- Glutamin 5 ml (200 mM)
- Pferdeserum 10 %
- Penicillin 10 U/μl
- Streptomycin 10 mg/ml
- mit RPMI 1640 (Invitrogen) ad 500 ml

Adhäsionsmatrix für PC-12-Zellen

- Humanes Kollagen IV (Plazenta, 2mg/ml) 1:100
- 1xPBS

Medienzusätze

Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Penicillin	Invitrogen™ Carlsbad, USA
Streptomycin	Invitrogen™ Carlsbad, USA
Kanamycin	Invitrogen™ Carlsbad, USA
Ampicillin	Invitrogen™ Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen™ Carlsbad, USA

Serum

HS (Pferdeserum)	Viralex, PAA Laboratories
------------------	---------------------------

Lösungen und Puffer

Solubilisierungspuffer

TRIS 2,5 M	0,2 ml
NaCl 5 M	1,5 ml
CaCl ₂ 1 M	50 μl

MgCl ₂ 1 M	50µl
Triton X-100	500 µl
mit Aqua bidest. Ad 50 ml	
Vor Gebrauch Zusatz von PIC 1:500	

Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Gellösungen

<u>Lösung 1:</u>	
1,5 M Tris	36,3 g
0,2 % SDS	4 ml
auffüllen auf 200 ml mit Aqua bidest., pH 8,8	
<u>Lösung 2:</u>	
0,5 M Tris	12,1 g
0,2 % SDS	4 ml
auffüllen auf 200 ml mit Aqua bidest., pH 6,8	
<u>10 %-ige Trenngellösung</u>	
Acrylamid	7,5 ml
Lösung 1	5,6 ml
aqua bidest.	9,4 ml
APS (10%)	125 µl
TEMED	12,5 µl
<u>4 %-ige Sammelgellösung</u>	
Acrylamid	1,6 ml
Lösung 2	3 ml
aqua bidest.	7,4 ml
APS (10%)	48 µl

TEMED	12 µl
<u>5x reduzierender Probenpuffer</u>	
SDS (w/v)	12,5 %
Tris/HCl, pH 6,8	0,3 M
Glycerin (v/v)	50 %
DTT	25 %
Bromphenolblau (w/v)	0,015 %
<u>10x Laufpuffer</u>	
Tris / HCl, pH 8,8	0,25 M
Glycin	1,92 M
SDS (w/v)	1 %

Gel-Färbelösungen

<u>Coomassie-Blau-Färbelösung:</u>	<u>Coomassie-Blau-Entfärbelösung:</u>
– 40 % Methanol (v/v)	wie Färbelösung, ohne Serva-Blue G-250
– 10 % Essigsäure (v/v)	
– 1 % Serva Blue G-250 (W/v)	

Lösungen für den Western-Blot

<u>Transfer-Puffer</u>	
Glycin	150 mM
Tris/HCl, pH 8,3	20 mM
Ethanol (v/v)	10 %
<u>Ponceaurot-Färbelösung</u>	
Ponceaurot (w/v)	2%
Trichloressigsäure (v/v)	30%
Sulfosalicylsäure (w/v)	30%

vor Gebrauch 1:10 in Aqua bidest. verdünnen	
<u>Waschpuffer:</u>	
<u>TBS-Puffer</u>	
NaCl	730 mM
KCl	27 mM
TRIS	4 M
In Lösung mit Aqua bidest, pH 7,5	
<u>TBS-Tween</u>	TBS-Puffer + 0,5 % Tween 20 (v/v)
<u>Blockierungslösung</u>	
Milchpulver (ROTH)	5% in 1x TBS-Tween
BSA	3% in 1x TBS-Tween
<u>Peroxidase-Reaktion</u>	
Luminol-Lösung A	
Luminol-Lösung B	

Membranen

Membran	Hersteller
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman®
Whatmanpapier	Whatman®

Sonstige verwendete Chemikalien

Lösung	Hersteller
Isopropanol	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma, München
PBS	PAA, Pasching, Österreich
Saponin	Sigma, München
PFA	Sigma, München
Kristallviolett	Roth, Karlsruhe

3.1.2 Geräte

Brutschrank (Zellkultur)	Heracell, Heraeus
Digitalkamera	Coolpix 4500; Nikon
Digitalkamera	Axio cam ICC1, Zeiss
ELISA-Reader	Multiskan Ex, Thermo Electron Corporation
Feinwaage	Satorius
Gelelektrophoresesystem	C.B.S. SCIENTIFIC CO.
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf Thermomixer, UNIVERSAL Labortechnik
Imager	Chem Doc XRS System, Molecular Imager Model, BIO RAD
Kühlzentrifuge	Biofuge Fresco, Heraeus
Magnetrührer	FB 1500, Fisher Scientific
Mikroskop	Axiovert 100, Zeiss Telaval 31, Zeiss
Pipetten	Transferpette, BRAND
Sterilbank	aura 2000 M.A.C, BIO AIR instruments
Tischzentrifuge	Biofuge Pico, Heraeus
Ultrazentrifuge	ZK 300, HERMLE
Vortex	MS2 Minishaker, IKA®
Waage	Denver Instrument
Wasserbad	GFL

3.1.3 Behandlung von Lösungen und Geräten

Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden durch Autoklavieren (20 min bei 120°C) oder Erhitzen bei 180°C sterilisiert und gleichzeitig von DNase-Aktivität befreit. Verwendete Geräte, die nicht hitzestabil waren sowie Arbeitsflächen wurden mit 70%igem Ethanol gereinigt. Nicht autoklavierbare Lösungen sind mit den entsprechenden Filtern steril filtriert worden.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

Kultivierung von Zellen

PC-12-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-Medium unter Zusatz von 10% Pferdeserum (HS), 1% Penizillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin im Brutschrank kultiviert. Die Erneuerung des Mediums erfolgte alle zwei bis drei Tage.

Auftauen von Zellen

Die in Cryotubes gefrorenen Zellen wurden aus dem Tiefkühlschrank (-80°C) genommen und sofort im Wasserbad bei 37,5°C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in PBS gewaschen, nach erneuter Sedimentation in 2ml RPMI-Medium (37,5°C) resuspendiert, in Zellkulturflaschen umgesetzt und in 25-200ml Medium weiter kultiviert.

Einfrieren von Zellen

Die zu lagernden Zellen wurden bei 1000 rpm 3 min pelletiert und das Medium entfernt. Anschließend erfolgte eine Waschung mit 1x PBS, wonach die Suspension erneut sedimentiert (1000 rpm, 3 min) und der Waschpuffer entfernt wurde. Das Pellet wurde nun in 1ml Mix aus 90% Pferdeserum und 10% DMSO resuspendiert und in ein Cryotube überführt. Dieses wurde in einer speziellen Box, die eine Abkühlung der Tubes um 1°C pro Stunde gewährleistet, im Tiefkühlschrank bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden hierbei nicht in Flüssigstickstoff gelagert. Zur langfristigen Lagerung wäre dies bzw. die Lagerung bei -150°C notwendig.

Solubilisierung von Zellen

Adhärente Zellen wurden mit 1,5 ml PBS/EDTA von den Zellkulturplatten gelöst und pelletiert (3min, 1000 rpm, 4°C). Zellen in Lösung wurden sofort pelletiert, einmal in PBS gewaschen und anschließend erneut abzentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets wurden in geeigneten Mengen (50-100µl) Solubilisierungspuffer (siehe 3.1.1) resuspendiert und für 1h bei 4°C geschwenkt. Das Lysat wurde durch mehrmaliges Pipettieren durchmischt und anschließend sedimentiert (10min, 13000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und eingefroren, das Zellpellet verworfen.

Beschichtung von Zellkulturplatten mit Kollagen IV

Humanes Kollagen IV (Plazenta, 2mg/ml) wurde im Verhältnis 1:100 in PBS verdünnt und eine ausreichende Menge der Verdünnung auf die Zellkulturplatte ausgebracht (500µl pro Vertiefung bei 12er Well, 1ml bei 6er Well, 3ml bei Zellkulturplatten Ø 11cm). Die Platten wurden mindestens 30min bei 37°C inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und zur Ausplattierung von Zellen verwendet. Erfolgte die Ausplattierung der Zellen erst am Folgetag, so wurden die Platten nach der Inkubation inklusive der Kollagen IV-Verdünnung bei 4°C gelagert und die Waschschrirte erst am Folgetag ausgeführt.

Differenzierung von Zellen

Zur neuronalen Differenzierung von PC-12-Zellen wurden diese in einer ausreichenden Menge an Medium (500µl pro Vertiefung bei 12er Well, 2ml bei 6er Well, 3ml bei Zellkulturplatten Ø 11cm) auf mit Kollagen IV beschichtete Zellkulturplatten ausplattiert. Nach mindestens einer Stunde bzw. über Nacht waren diese adhärenr und begannen bereits mit der Differenzierung, welche durch gezielte Zugabe von NGF bzw. EPO beeinflusst werden sollte. EPO-haltiger CHO-Zellkulturüberstand wurde vor Zusatz zum Nährmedium jeweils zweifach steril filrriert.

Fixieren und Färben von Zellen

Adhärenrte Zellen wurden fixiert, indem nach Absaugen des Mediums je nach Größe der Kultur 200µl bis 1ml Fixierlösung, bestehend aus 4% PFA und 0,015% Saponin, zugegeben und die Platten anschließend für 45 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden. Nach Inkubation wurde die Fixierlösung entfernt und die Platten einmal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden

die Kulturen mit 200µl bis 1ml unverdünntem Kristallviolett überschichtet und für weitere 30 min im Brutschrank inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Platten ein- bis zweimal mit Aqua dest. gewaschen und standen zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der in einer Zellkulturflasche enthaltenen Zellmenge wurde die gesamte Zellsuspension der Flasche sedimentiert (3min, 1100 rpm, RT) und in 2ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Kanüle vereinzelt und mit Medium auf 10-20ml aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden 10µl in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die Zellen unter dem Mikroskop (10fache Vergrößerung) ausgezählt. Das Tausendfache der ausgezählten Zellzahl entspricht der Zellmenge pro 1ml.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

Isolierung von Gesamtprotein

Siehe Solubilisierung von Zellen

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Proteingemischen wurde mit Hilfe des BCA™ Protein Assay Kit von PIERCE ermittelt. Dazu wurde zuerst die Arbeitslösung aus entsprechend 50 Teilen Lösung A und einem Teil Lösung B hergestellt. Anschließend wurden in eine 96er Mikrotiterplatte jeweils 10µl der Standardlösungen (Albumin in Aqua dest.) und der Proben aufgetragen, wobei die zu untersuchenden Proteinlösungen im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt wurden. Zu diesen 10µl wurden jeweils 200µl der Arbeitslösung dazugegeben. Danach wurde die Platte abgedeckt und bei 37°C bis zur vollständigen Farbentwicklung, mindestens aber 30 min, inkubiert. Aufgrund der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch das Protein (Biuret-Reaktion) fand ein

Farbumschlag von Grün zu Violett statt. Die unterschiedlichen Extinktionen der Lösungen in den Wells wurden im ELISA-Reader bei 562nm gemessen und ausgewertet.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteingemische (Solubilisate der Zellen bzw. EPO-Lösungen) wurden im Verfahren der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei betrug der Acrylamidgehalt des Sammelgels 4%, der des Trenngels 10%.

Herstellung der Gele

Nach Herrichtung der speziellen Kammer zum Gießen von Polyacrylamidgelen wurde das flüssige Trenngel angemischt und zwischen die Glasplatten gegossen, anschließend mit insgesamt 1ml Isopropanol überschichtet, um eine gerade Grenzlinie zu erhalten. Das Trenngel inkubierte jeweils für mindestens 40min bei RT. Nach Abschluss der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol mit Hilfe eines Filterpapiers wieder entfernt und das bereits vorbereitete flüssige Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Nach Einstecken der Kunststoffkämme zur Ausformung der Geltaschen polymerisierte das Sammelgel entweder bei RT für ca. 1h oder über Nacht bei 4°C aus. Anschließend wurden die Kämme aus den jetzt gebrauchsfertigen Gelen entfernt und diese entweder sofort weiterverwendet oder in luftdichten Folien in Laufpuffer bei 4°C gelagert.

Vorbereitung der Proteinproben

Nach Bestimmung der Proteinmenge der Proben wurden jeweils 50µg Gesamtprotein mit Aqua dest. auf 12 bzw. 16µl Gesamtvolumen aufgefüllt und mit 1/5 (3 bzw. 4µl) Probenpuffer + DTT versetzt. Zur Denaturierung wurden die Proben für 5min im Hitzeblock auf 95°C erhitzt. Nach kurzer Zentrifugation und Durchmischung durch Pipettieren wurden die Proben in die Geltaschen gefüllt.

Gelelektrophorese

Nach Zufügen von 5µl des Molekulargewichtsmarkers (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas) in die jeweils letzte Tasche des Geles erfolgte die

Auftrennung bei 20mA pro Gel unter maximaler Spannung für 45min bis 1,5h in Laufpuffer. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine durch Western Blot-Verfahren auf Nitrocellulosemembranen übertragen.

Western Blot

Zur Übertragung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde das Verfahren des Western Blots genutzt. Dabei wurden folgende Bestandteile im Blotpufferbad in eine Spannvorrichtung eingeschichtet: 1 dünnes Schwämmchen, luftblasenfrei, darauf 1 Whatman-Filterpapier (9cm x 7cm), darauf 1 Nitrocellulosemembran (9cm x 7cm), darauf luftblasenfrei das vom Sammelgel vorher getrennte Trenngel, darauf 1 Whatman-Filterpapier (9cm x 7cm). Die Spannvorrichtung wurde daraufhin in eine Blotkammer eingesetzt, in welche vorher ein Magnetrührer, 1l Blotpuffer sowie zwei Tiefkühlakkus gegeben wurden. Anschließend erfolgte unter Rühren der Blot bei 330mA, maximaler Spannung für 1h 11min. Zur Überprüfung der Übertragung der aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese mit Ponceau-Gebrauchslösung gefärbt und die Färbung durch Auswaschen mit Aqua dest. sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurde die gefärbte Membran anschließend eingescannt.

Immunfärbung von Western Blots

Zur Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran wurde diese mit 2% BSA in TBS-T bei RT für 1,5 bis 2h bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert, anschließend einmal kurz in TBS-T gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBS-T, über Nacht bei 4°C bzw. für 1-2h bei RT auf der Rüttelplatte. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran gewaschen (1x kurz in TBS-T, 2-3x 10min in TBS-T, 2-3x 10min in TBS, jeweils bei RT auf der Rüttelplatte) und der Sekundärantikörper, verdünnt in TBS-T, dazu gegeben. Dieser inkubierte für 1-1,5h bei RT auf der Rüttelplatte. Nach Abschluss der Inkubation erfolgte ein weiterer Waschschritt (1x kurz in TBS-T, 2-3x 10min in TBS-T, 2-3x 10min in TBS, jeweils bei RT auf der Rüttelplatte). Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend in einer Folie mit Substratlösung (1ml pro Membran, bestehend

aus 500µl RotiLumin 1 und 500µl RotiLumin 2) überschichtet und das Blotbild im Imager entwickelt.

3.3 Zentrallabor

Zur Quantifizierung des EPO-Gehaltes des für die Versuche zur Verfügung stehenden CHO-Zellkulturüberstandes wurden insgesamt 9 Proben an das Zentrallabor des Universitätsklinikums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gesandt. Davon wurden jeweils 2 Proben in der Verdünnung 1:10 und 1:1000 sowie 5 Proben in der Verdünnung 1:100 angefertigt.

Die Bestimmung der EPO-Konzentration in mU/ml wurde im Zentrallabor mittels Chemilumineszenzimmunoassay (CLIA) im Analysenautomaten Immulite one der Firma Siemens durchgeführt (Probengefäße 0,3 ml Fa. Sarstedt).

Testverfahren (Ausschnitt aus der Arbeitsanweisung "Erythropoietin" A3 – M-SAA Rev. 1 / 14.01.2010 des Zentrallabors des Universitätsklinikums Halle):

"CLIA = ChemiLumineszenzImmunoAssay

Sequentieller (Zweischritt)- Chemilumineszenz Immunoassay

Der Immulite one verwendet als Festphase eine mit monoklonalem anti- EPO Antikörpern beschichtete Kugel. Die Kugel befindet sich in einem Reaktionsgefäß, welches zur Immunreaktion, zur Inkubation, zum Waschen und zur Signalentwicklung dient. Nach der Inkubation mit alkalischen Phosphatase markiertem Reagenz werden ungebundene Stoffe durch drehen des Reaktionsgefäßes mit hoher Drehzahl von der Kugel getrennt. Es folgt ein Waschschrift mit Wasser. Die Kugel verbleibt ohne restliche ungebundene Substanzen im Gefäß. Die gebundene Substanz wird über lumineszierendes Dioxetansubstrat quantifiziert. Das bei der Reaktion emittierte Licht wird mit einem Photoverstärker (PMT = Photomultiplier Tube) gemessen und das Ergebnis berechnet." [132]

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von Erythropoietin

Zur Durchführung der geplanten Versuche stand ein Zellkulturüberstand zur Verfügung. Dieser stammte von CHO-Zellen, die durch Transfektion EPO exprimieren. Um nachzuweisen, dass EPO in der Lösung enthalten und diese damit als Arbeitslösung für die Versuchsreihe geeignet ist, wurde ein Immunoblot angefertigt. Dazu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der Lösung mit H₂O in den Verhältnissen unverdünnt und 1:2 bis 1:256 hergestellt. Anschließend wurden die einzelnen Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Im Folgenden wurden die aufgetrennten Banden des Gels im Western-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit einem polyklonalen Anti-EPO-Antikörper immunologisch detektiert.

In Abbildung 3 kann man die Anwesenheit von EPO im Zellkulturüberstand erkennen. Die Banden zeigen einen typischen „Schmier“, was die Mikroheterogenität EPOs aufgrund variabler Glykosylierungszustände widerspiegelt. Punktum maximum der Signalstärke der Banden liegt erwartungsgemäß bei ca. 34 kDa. Die Konzentration von EPO im Zellkulturüberstand wurde bestimmt durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (siehe 3.3). Hier wurde eine Konzentration von ca. 700.000 mU/ml ermittelt.

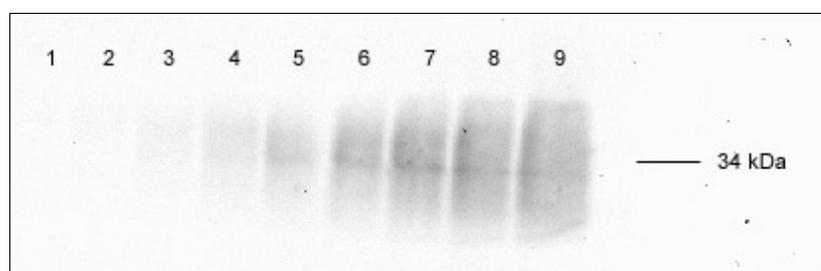


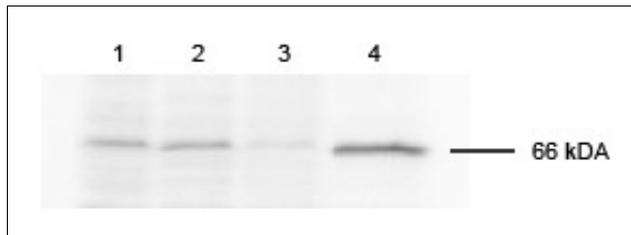
Abb. 3: Nachweis von EPO im CHO-Zellkulturüberstand: Verdünnungsreihe: 1: 1:256; 2: 1:128; 3: 1:64; 4: 1:32; 5: 1:16; 6: 1:8; 7: 1:4; 8: 1:2; 9: unverdünnt; Immunoblot, Färbung mittels polyklonalem Anti-EPO-Antikörper

4.2 Nachweis der Expression des EPO-Rezeptors auf PC-12-Zellen

Die zentrale Problemstellung der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Frage, ob EPO einen Einfluss auf die Morphologie und das Wachstum von neuronalen Zellen hat. Um die Wirkung von EPO im zentralen Nervensystem näherungsweise nachstellen zu können, mussten also Zelllinien Verwendung finden, die dazu fähig sind, sich unter gegebenen Bedingungen zu neuronalen Zellen zu differenzieren, Neuriten auszubilden sowie Kontaktstellen mit einander zu knüpfen. Es wurden vier Zelllinien ausgewählt, die diese Eigenschaft besitzen: die Neuroblastom-Zelllinien Neuro-2A (Maus), IMR-32 (human) und SH-SY5Y (human) sowie PC-12-Zellen. Weiterhin sollte die verwendete Zelllinie EpoR exprimieren.

Um dies zu prüfen, wurden Solubilisate oben genannter Zelllinien hergestellt und nach Bestimmung des Gesamtproteingehaltes jeweils 50µg Gesamtprotein im Verfahren der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Übertragung der Banden auf eine Nitrocellulosemembran im Western-Blot-Verfahren. Das Vorhandensein von EpoR im Solubilisat wurde durch eine immunologische Färbung mit Hilfe eines monoklonalen Anti-EpoR-Antikörpers auf dem fertigen Blot nachgewiesen (Abbildung 4). Auf der Höhe von 66 kDa erschienen Banden, wobei sich herausstellte, dass die Zelllinien Neuro-2A und IMR-32 einen ähnlichen Gehalt an EpoR aufweisen. SH-SY5Y entwickelte nur eine sehr schwache Bande, womit auf eine geringe EpoR-Expression zu schließen ist. Die stärkste Bande erschien bei PC-12-Zellen.

Aufgrund der hohen Signalstärke für EpoR von PC-12-Zellen wurden alle weiteren Versuche mit diesen durchgeführt.



Probe	1	2	3	4
Signalstärke (Density INT/mm ²)	242307	262838	131157	343009
relative Signalstärke in %	185	200	100	262

Abb. 4: Nachweis von EpoR auf verschiedenen Zelllinien: 1: Neuro-2A, 2: IMR-32, 3: SH-SY5Y, 4: PC-12

Neuro-2A sowie IMR-32 zeigen eine ähnliche Signalstärke für den EpoR, während SH-SY5Y eine eher schwache Bande entwickelt hat. PC-12-Zellen zeigen die größte Signalstärke im Immunoblot für EpoR.

Immunoblot, Färbung mittels: 1. Antikörper: Anti-EpoR rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz, 2. Antikörper: Goat anti rabbit, Dianova; aufgetragene Menge Gesamtprotein jeweils 50 µg

4.3 Expression des EPO-Rezeptors unter EPO-Exposition (Proteinebene)

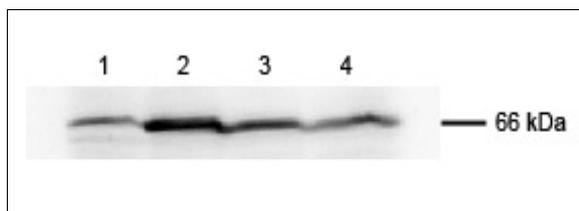
Die Stimulation eines Rezeptors durch Ligandenbindung kann dessen Expression modulieren. Dies kann sowohl zur Vermehrung dieser als auch zum Abbau von Rezeptoren führen. Daher sollte geprüft werden, ob auch in PC-12-Zellen die Expression von EpoR durch EPO reguliert wird.

Im Versuch wurden PC-12-Zellen unterschiedlicher Kultivierungsformen untersucht. Es wurden jeweils zwei Kulturen in Suspension und zwei ausplattierte Kulturen angelegt. Nach Adhäsion der PC-12-Zellen an Kollagen IV auf den Zellkulturplatten wurde jeweils einer Suspensions- und einer Plattenkultur 600µl EPO-haltiger Zellkulturüberstand zum Nährmedium zugesetzt (Menge an Nährmedium jeweils 3ml, Verhältnis Zellkulturüberstand zu Nährmedium 1:6).

Nach 48 Stunden wurden die Zellen der Suspensionen sedimentiert und solubilisiert und die der Platten abgelöst und ebenfalls solubilisiert. Nach Bestimmung des Proteingehaltes der Solubilisate zur Gewährleistung gleicher

Zellmengen in den verschiedenen Proben wurden diese im Verfahren des Immunoblots auf das Vorhandensein von EpoR untersucht.

In Abbildung 5 sieht man auf der Höhe von 66 kDa bei allen Proben Banden. Bezüglich der adhärirten Zellen konnte kein Unterschied zwischen den beiden Bandenstärken gemessen werden. Bei den Kulturen in Suspension ergab sich bei der exponierten Kultur eine stärkere Bande mit dreifacher Signalstärke bei gleicher Probenmenge als ohne Einwirkung von EPO.



Probe	1	2	3	4
Signalstärke (Density INT/mm ²)	51393	150040	99255	96238
relative Signalstärke in %	100	292	100	97

Abb. 5: Expression von EpoR in Abhängigkeit von der Anwesenheit von EPO:

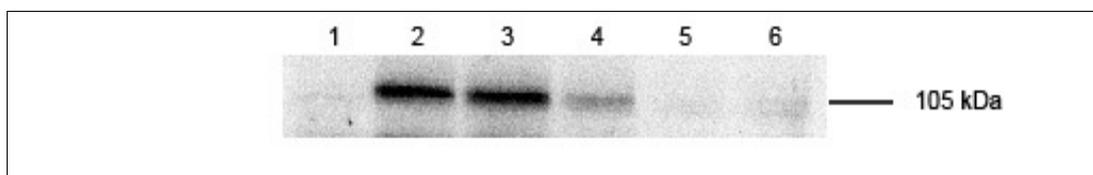
1: Kultur in Suspension ohne EPO, 2: Kultur in Suspension unter EPO-Exposition, 3: Kultur ausplattiert ohne EPO, 4: Kultur ausplattiert unter EPO-Exposition. Die Zellkulturen in Suspension zeigen unter EPO-Exposition einen deutlichen Signalanstieg. Adhärirte Kulturen zeigen keine Veränderung der EpoR-Expression.

Immunoblot, Färbung mittels: 1. Antikörper: Anti-EpoR rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz, 2. Antikörper: Goat anti Rabbit, Dianova; aufgetragene Menge Gesamtprotein je 50 µg

4.4 pSTAT5 unter EPO-Exposition

STAT5 ist ein Protein, das nach Ligandenbindung an EpoR im Rahmen der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade phosphoryliert wird (pSTAT5) und somit ein Maß für die EPO-vermittelte Signaltransduktion (siehe 1.1.2, Übersichtsarbeit [133]). STAT5 stellt hiermit ein geeignetes Molekül dar, um zu prüfen, ob EPO eine Wirkung auf die Zelle hat.

Das Vorhandensein von phosphoryliertem STAT5 wurde mittels Immunoblotverfahren untersucht. Dazu wurden zunächst 20 Zellkulturen der PC-12-Linie auf Platten vorbereitet. Dem Nährmedium von 10 der 20 Kulturen wurde EPO-haltiger Zellkulturüberstand im Verhältnis 1:10 zugesetzt. Bei einer Gesamtmenge von 2 ml Nährmedium entspricht das einer Menge von 200 µl Zellkulturüberstand pro Zellpopulation, also einer Exposition von 140.000 mU EPO pro Population. Die Zellkulturplatten wurden anschließend bei 37°C inkubiert und nach 30, 60, 120 oder 180 min solubilisiert. Anschließend wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein auf Polyacrylamidgele aufgetragen und im Verfahren der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran im Western-Blot-Verfahren wurden diese mit einem polyklonalen Anti-p-stat-a/b-IgG-Antikörper inkubiert. Unter Einfluss von EPO lässt sich ein fast sofortiger Anstieg von pSTAT5 feststellen. Schon nach 15 min Expositionszeit erscheinen Banden auf der Höhe von 105 kDa bei den Läufen exponierter Kulturen. Das Signal nimmt erwartungsgemäß nach kurzer Zeit wieder ab (Abbildung 6).



Probe	1	2	3	4	5	6
Signalstärke (Density INT/mm ²)	12241	56141	57563	25005	9574	11827
relative Signalstärke in %	100	459	470	204	78	97

Abb. 6: Expression von pSTAT5 unter EPO-Exposition:

Expositionszeit: 1: 0 min, 2: 15 min, 3: 30 min, 4: 60 min, 5: 120 min, 6: 180 min. Deutlicher Signalanstieg von pSTAT5 nach 15 min Expositionszeit auf das rund 4 ½ -fache, Reduktion auf Ausgangswert nach ca. 120 – 180 min.

Immunoblot, Färbung mittels monoklonalem Anti-pSTAT5-Antikörper, aufgetragene Menge Gesamtprotein jeweils 50 µg

4.5 PC-12-Differenzierung unter EPO-Exposition

Um die geplanten Versuche durchführen zu können, ist die Fähigkeit von PC-12-Zellen, sich zu neuronalen Zellen mit Neuriten zu differenzieren, essentiell. Um dies zu überprüfen, wurden zunächst Kulturen dieser Zelllinie auf Kollagen IV ausplattiert und dem regulären Nährmedium verschiedene Mengen an NGF zugesetzt (0 ng/ml, 3 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml). Anschließend wurde die Differenzierung der Zellen durchlichtmikroskopisch beobachtet und dokumentiert.

Abbildung 7 stellt das Wachstum und die Differenzierung der Zellpopulationen im Versuch dar. Es ist zu erkennen, dass PC-12-Zellen die Fähigkeit besitzen, Neuriten zu bilden und sich zu neuronalen Zellen zu entwickeln. Man kann auch erkennen, dass diese Entwicklung durch NGF begünstigt wird. Die Populationen ohne NGF im Nährmedium bilden nur kleine Zellausläufer aus. Unter Wirkung von NGF werden sowohl mehr als auch längere Neuriten gebildet. Nach 72 - 96 Stunden sind bereits kleine Netzwerke erkennbar (siehe Abb. 7 b/c). An einigen Stellen kann man Strukturen erkennen, die auf eine Kontaktaufnahme zwischen einzelnen Zellen schließen lassen können.

Um zu untersuchen, ob EPO einen Einfluss auf die Differenzierung neuronaler Zellen hat oder ihre Morphologie verändert, wie z.B. das Wachstum von Neuriten, wurden mehrere Kulturen in ihrem Wachstum beobachtet. Dafür wurden zunächst Populationen von PC-12-Zellen auf Kollagen IV ausplattiert, um eine Adhäsion der Zellen an die Matrix und damit eine Induktion der Differenzierung zu erreichen. Der Hälfte der Kulturen wurde im Verhältnis 1:1 zweifach steril filtrierter EPO-haltiger CHO-Zellkulturüberstand zum regulären Nährmedium zugesetzt. Die Kulturen ohne Zusatz von EPO-haltigem CHO-Zellkulturüberstand fungierten als Leerprobe.

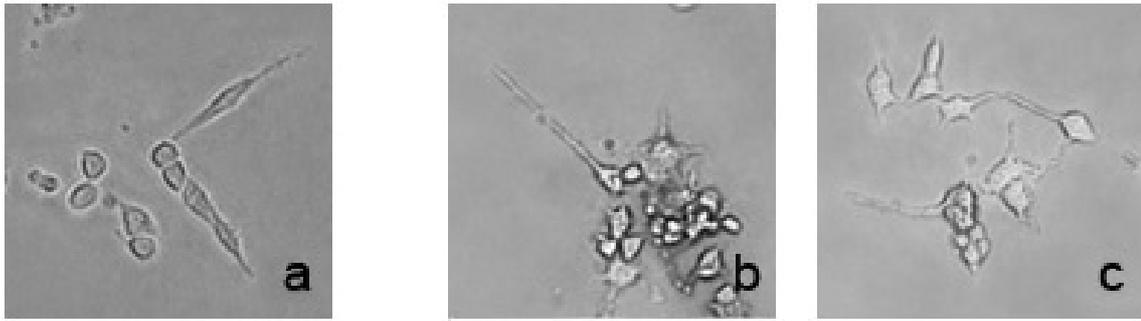


Abb. 7: Differenzierung von PC-12-Zellen nach 96 h: a) ohne NGF, b) / c) unter Exposition von 10 ng NGF

Nach 96 h haben die Zellen ohne NGF kleine Zellausläufer ausgebildet, welche durch die Adhäsion an die Matrix induziert werden und den Zellen ein fibroblastenähnliches Aussehen verleihen. Unter Wirkung von 10 ng NGF bilden die Zellen Neuriten aus und scheinen auch interzelluläre Kontaktstellen herzustellen. Vergrößerung 20fach, ungefärbt

Anschließend wurden die Zellkulturen bei 37°C inkubiert und in regelmäßigen Abständen von jeweils 12 Stunden mittels Durchlichtmikroskopie beobachtet. Da die Zellen im ungefärbten Zustand nur unzulänglich darstellbar waren, entschieden wir uns, die Kulturen zu färben. Dazu wurde die Färbemethode des Kristallviolett genutzt. In diesem Verfahren wurden die Zellen zunächst fixiert und anschließend mit der Kristallviolett-Lösung gefärbt. Durch diese Methode wurde zusätzlich eine dauerhafte Haltbarkeit der Kulturen erreicht. Als Negativkontrolle wurden Kulturen hergestellt, deren Nährmedium im gleichen Verhältnis CHO-Zellkulturüberstand zugesetzt wurde, welcher kein EPO enthielt. Der Wachstums- und Differenzierungsfortschritt der Kulturen wurde photographisch dokumentiert.

Auf den entstandenen Aufnahmen (siehe Abbildungen 8 und 9) sind repräsentative Ausschnitte der Populationen auf den Zellkulturplatten zu sehen. Wurden die Zellen in regulärem Nährmedium ohne besondere Zusätze inkubiert, so begannen sie sich nach ca. einer Stunde an die bestehende Matrix zu adhären und erste kleine Zellausläufer zu bilden. Nach etwa 72-96 Stunden kann man kleinere Neuriten erkennen sowie die Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen. Insgesamt entwickeln sich nur wenige der Zellen zu voll differenzierten neuronalen Zellen mit Neuriten. Die meisten der PC-12-Zellen stagnieren auf einem früheren Entwicklungsstand oder werden im Verlauf apoptotisch (siehe Abbildung 8).

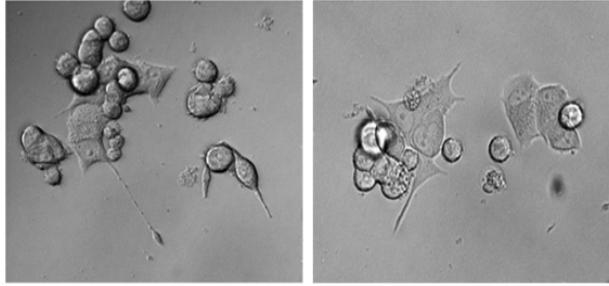


Abb. 8: Differenzierung von PC-12-Zellen unter Exposition von nicht-EPO-haltigem CHO-Zellkulturüberstand nach 72 h

Einige der Zellen beginnen nach Adhäsion an die Matrix kleinere Zellausläufer auszubilden. Wenige Zellen bilden Kontaktstellen zu Nachbarzellen aus (hier nicht dargestellt). Vergrößerung 20fach, ungefärbt

Wurden die Zellen dagegen der Wirkung von EPO ausgesetzt, so vollzog sich die Differenzierung schneller und auch an einer größeren Anzahl an Zellen. Nach 72 Stunden haben sich in diesen Populationen sichtbar mehr Neuriten gebildet, welche auch vermehrt verzweigt sind und größere Distanzen überbrücken, sodass sich zwischen den Zellen Netzwerke ausbilden (siehe Abbildung 9). Solche neuronalen Netzwerke konnten in den Kulturen ohne Zusatz von CHO-Zellkulturüberstand nicht gefunden werden. Auch die Kulturen unter Exposition mit nicht-EPO-haltigem CHO-Zellkulturüberstand zeigen kein vergleichbares Differenzierungsverhalten. Sie bilden nach Adhäsion an die Zellmatrix nur kurze Zellausläufer aus.

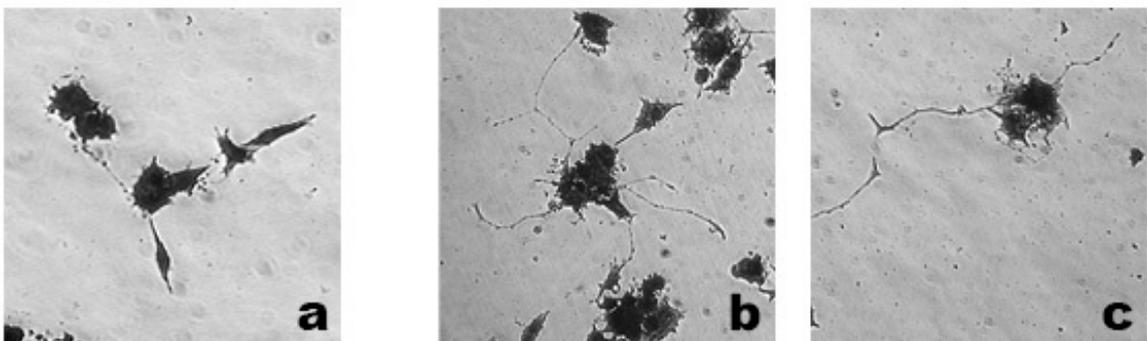


Abb. 9: PC-12-Zellen nach 96 h Inkubationszeit: a) ohne EPO, b/c) unter Exposition von EPO-haltigem CHO-Zellkulturüberstand

Unter EPO-Exposition bilden sich deutlich mehr Dendriten aus, welche weite Distanzen überbrücken und Kontakt zu benachbarten Zellen herstellen. Weiterhin kommt es zur Differenzierung verschiedener Zelltypen. Vergrößerung 20fach, Färbung: Kristallviolett

Zur Quantifizierung des Effektes wurde an repräsentativen Bildern die Anzahl Neuriten pro Zelle gezählt. Als Neurit gewertet wurden Zellausläufer einer Länge von mindestens dem Zweifachen des Durchmessers des zugehörigen Zellsomas und typischer Morphologie. Betrachtet man das Verhältnis Neuriten pro Zelle in den einzelnen Bildern, so ergibt sich in den Kulturen ohne EPO-Exposition im Mittel ein Verhältnis von 0,033, in den Kulturen unter EPO-Exposition im Mittel 0,095. Die Mittelwerte ergeben damit eine Steigerung der Anzahl an Neuriten unter EPO-Exposition um etwa den Faktor 3 im Vergleich zu Kulturen ohne EPO-Exposition.

5 Diskussion

Seit langem nimmt EPO als blutbildungsförderndes Hormon einen festen Stellenwert in der Therapie renaler und Tumoranämien ein. Im Laufe der Zeit wurden weitere Effekte EPOs bekannt, sodass sich eine breite Forschung um das Glykoprotein entwickelte. In klinischen Studien sowie tierexperimentellen Arbeiten konnte ein neuroprotektiver Effekt EPOs nachgewiesen werden. So konnte bei Stroke-Patienten unter EPO-Exposition ein verbessertes Outcome erzielt werden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch eine langzeitliche Wirkung des Hormons auf kognitive Fähigkeiten und Funktionen scheint zu existieren. In zahlreichen mikrobiologischen Arbeiten wurden mit der Apoptose assoziierte intrazelluläre Signaltransduktionswege unter Einfluss von EPO untersucht, womit gezeigt werden konnte, dass EPO apoptosehemmende Eigenschaften besitzt, welche im Allgemeinen auch als Hauptfaktor der neuroprotektiven Wirkung EPOs angesehen wird [134], [135].

In dieser Arbeit wurde die neuroprotektive Wirkung von EPO an Hand der Modellzelllinie PC-12 untersucht, wobei die Beeinflussung der Differenzierung neuraler Zellen sowie deren Morphologie im Zentrum der Betrachtungen liegen. Die Ergebnisse zeigen, dass EPO einen Einfluss auf die Differenzierung von PC-12-Zellen hat und das Wachstum von Neuriten induziert bzw. fördert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass EPO den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg aktiviert und die Menge an phosphoryliertem STAT5 in den Zellen erhöht.

5.1 Die Expression des EPO-Rezeptors auf PC-12-Zellen

Die Existenz von EpoR auf PC-12-Zellen konnte bereits mehrfach gezeigt werden [106], [136], was im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche bestätigt werden kann. Die Expression von EpoR auf der Oberfläche von PC-12-Zellen und den drei Neuroblastomzelllinien Neuro-2A, IMR-32 sowie

SH-SY5Y wurde mittels Immunoblot aus den Solubilisaten der Populationen untersucht. Bei allen vier Zelllinien erschienen Banden auf der entsprechenden Höhe von 66 kDa. Anhand der unterschiedlichen Signalstärken konnte auf unterschiedliche Mengen des Rezeptorbesatzes geschlossen werden, wobei SH-SY5Y am wenigsten, PC-12 am meisten sowie IMR-32 und Neuro-2A intermediäre Mengen an EpoR exprimieren. Die Existenz von EpoR konnte bereits mehrfach auf SH-SY5Y [136]–[138] sowie auch humanen und murinen Neuroblastomzelllinien [139]–[141] nachgewiesen werden.

Nach EPO-Exposition zeigten PC-12-Zellen unterschiedliche Reaktionen bezüglich der Menge an exprimiertem EpoR. Waren die Kulturen in Suspension, so erschien nach EPO-Exposition eine stärkere Bande im Immunoblot als ohne EPO-Exposition. Bei adhärierten Kulturen ergaben sich keine Unterschiede vor und nach Exposition mit EPO. Eine Steigerung der EpoR-Expression durch EPO-Exposition im Sinne einer auto- bzw. parakrinen Wirkung konnten auch Chin et al. in in-vitro-Kulturen neuraler Zellen nachweisen [142]. Auch andere Studien belegen eine EPO-abhängige Expressionssteigerung von EpoR [67], [143], [144]. Ein Zusammenhang mit der beginnenden Differenzierung, welche durch Adhäsion der Zellen an eine Matrix induziert wird, ist zu diskutieren. Chen et al. konnten einen geringeren Besatz differenzierter Zellen mit EpoR nachweisen im Vergleich zu neuralen Progenitorzellen [70]. Ebenso in Skelettmuskelzellen wird EpoR im Zuge der Differenzierung herunter reguliert, nicht jedoch in Herzmuskelzellen [68], [145].

5.2 pSTAT5 unter EPO-Exposition

STAT5 ist ein Bestandteil des JAK2/STAT5-Signaltransduktionsweges, der nach Binden von EPO an EpoR aktiviert wird [146]–[150]. Im Rahmen dessen kommt es zur Phosphorylierung von STAT5. Um zu untersuchen, inwieweit das verwendete EPO Einfluss auf diese Kaskade in PC-12-Zellen hat, wurden die Solubilisate der Populationen nach den entsprechenden Expositionszeiten (siehe 3.5) im Immunoblot-Verfahren auf das Vorhandensein von

phosphoryliertem STAT5 geprüft. Anhand des Blots kann man erkennen, dass die Menge an phosphoryliertem STAT5 kurz nach Zusetzen von EPO zum Nährmedium der Zellen auf das bis zu Viereinhalbfache des Ausgangswertes ansteigt. Nach etwa zwei Stunden Expositionszeit wird der Ausgangswert wieder erreicht.

Anhand dieser Daten kann geschlussfolgert werden, dass in den PC-12-Zellkulturen der JAK2/STAT5-Signaltransduktionsweg durch den Zusatz von EPO zum Nährmedium aktiviert wird.

In bisherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, sowohl an neuronalen Stammzellen als auch an PC-12-Zellen, dass STAT5 sowohl auf die neurale Differenzierung als auch auf das Neuritenwachstum einen fördernden Effekt hat [151]. Dieser wird wahrscheinlich durch SOCS6 bewirkt, welches nach Aktivierung durch pSTAT5 zur Ausbildung einer vermehrten Anzahl Neuriten pro Zelle mit größerer Länge sowie einer höheren Anzahl an Neuritenverzweigungen führt [152], wobei der Effekt am stärksten bei noch in Differenzierung befindlichen Zellen ausgeprägt ist. In Zellen, welche den Differenzierungsvorgang abgeschlossen haben, ist weniger aktivierter STAT5 nachweisbar.

5.3 Differenzierung unter EPO-Exposition

Die zentrale Frage dieser Arbeit beschäftigt sich mit Veränderungen in der Morphologie von PC-12-Zellen nach Exposition mit EPO. PC-12-Zellen werden schon viele Jahre als neurale Modellzelllinie genutzt und können sich abhängig vom umgebenden Milieu sowohl neural als auch chromaffin differenzieren [127], [128], [153], [154]. Das Auswachsen von Neuriten kann in PC-12-Zellen sowohl durch NGF [155], als auch durch andere Moleküle, wie z.B. BDNF [156], FGF [157], HB-EGF [158] oder auch Auraptene [159] oder das Flavonoid Luteolin [160] induziert werden. Im Rahmen der durchgeführten Versuche konnte gezeigt werden, dass die verwendeten PC-12-Zellen bei Anwesenheit von neuralem Wachstumsfaktor NGF im Nährmedium dazu in der Lage sind, sich

neural zu differenzieren sowie Neuriten auszubilden (siehe Abb. 9).

Für die Darstellung der Differenzierung von PC-12-Zellen unter Exposition von EPO wurde den Kulturen kein NGF zugesetzt.

Anhand der Photodokumentation (siehe Abb. 8) kann man erkennen, dass sich die Zellpopulationen unter EPO-Exposition anders differenzieren als die Kontrollpopulationen ohne Zusatz von EPO-haltigem CHO-Zellkulturüberstand bzw. mit Zusatz von nicht-EPO-haltigem CHO-Zellkulturüberstand zum Nährmedium. Die PC-12-Zellen unter Einfluss von EPO bilden mehr und längere Neuriten aus. Als Neurit gewertet wurden Zellausläufer typischer Morphologie, welche eine Länge von mindestens dem doppelten Durchmesser des zugehörigen Zellsomas aufweisen. Anhand der Auszählung kann eine Steigerung der Neuritenzahl um etwa den Faktor 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Weiterhin kommt es zur Differenzierung axonähnlicher Zellausläufer, welche Kontaktstellen zu benachbarten Zellen und deren Ausläufern zu bilden scheinen, auch über weite Distanzen hinweg. In den Kontrollpopulationen kann man nur vereinzelt die Entstehung derartiger kleiner Netzwerke beobachten, welche nur wenige, meist direkt benachbarte Einzelzellen einschließen.

Anhand der vorliegenden Daten kann also ein fördernder Effekt von EPO auf die neurale Differenzierung von PC-12-Zellen gezeigt werden. EPO führt zu einer Steigerung der Aussprossung von Neuriten.

Diese Ergebnisse kongruieren mit den Aussagen anderer Studien. So konnte bereits eine gesteigerte neurale Differenzierung neuraler Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen *in vitro* gezeigt werden [112], [113]. Auch in Postischämiegebieten konnte eine vermehrte Neurogenese beobachtet werden, sowohl im Tiermodell [161]–[171] als auch am Menschen [172]–[174]. Durch Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α kommt es unter hypoxischen Bedingungen zu einer vermehrten Expression von EPO und dessen Rezeptor, auch in neuralem Gewebe ([42], Übersichtsarbeit [175]), wobei Warnecke et al. sowie Chavez et al. in ihren Untersuchungen eine größere Bedeutung des Faktors HIF-2 α darlegen [27], [30]. Dies legt eine Verbindung zwischen der gesteigerten EPO-Expression und der gesteigerten Neurogenese nahe. In

mehreren Studien konnte eine direkte Induktion bzw. Förderung neuraler Differenzierung durch EPO und dessen Derivate gezeigt werden ([114], [176], [177], Übersichtsarbeit [178], [179]).

Neben der generellen Förderung der neuralen Differenzierung konnte in den PC-12-Zellkulturen unter EPO-Exposition außerdem eine vermehrte Bildung von Neuriten, also gesteigerte Neuritogenese, gezeigt werden, was mit dem Ergebnis von Wang et al. kongruiert, welche ein vermehrtes Neuritenwachstum in Kulturen mit neuralen Progenitorzellen von Mäusen unter Exposition mit carbamyltem EPO (CEPO) nachweisen konnten [176]. Der Effekt EPOs kann am stärksten beobachtet werden in der Abwesenheit weiterer fördernder Faktoren, wie z.B. FGF [70], was einen eher geringen Wirkungsgrad des Hormones vermuten lässt.

5.4 Förderung der PC-12-Differenzierung unter EPO im Hinblick auf die Eigenschaften von PC-12-Zellen als Tumorzellen

Die Tatsache, dass PC-12-Zellen in ihrer Entstehungsgeschichte aus einem Nebennierentumor stammen und in ihrem Wachstum durch EPO gefördert werden, weckt die Befürchtung, dass EPO gegebenenfalls einen fördernden Einfluss auf Tumorzellen haben könnte.

Auch im Hinblick auf die angiogenetische Wirkung EPOs [13], [57] wurde bereits ein positiver Einfluss auf das Wachstum von Tumoren vermutet.

Tatsächlich konnte bisher auf mehreren Tumorzelllinien EpoR nachgewiesen werden, wie z.B. auf Zellen von Nierenzellkarzinomen, Melanomen, Leberzelltumoren sowie auch auf Zellen von Neuroblastomen (SH-SY5Y), Glioblastomen und Gliomen [180]. Allerdings bemerken Farrell et al, dass in den meisten der Studien der Western-Blot als Nachweisverfahren für die Existenz von EpoR genutzt wurde. In diesem Immunoblotverfahren kann nicht unterschieden werden zwischen einer intrazellulären Anwesenheit des Rezeptors oder einer Expression auf der Zelloberfläche, wobei nur letztere

sicher zu einer Funktionalität des Rezeptors bei extrazellulärer Anwesenheit von EPO führen würde [180]. Bei fehlender Induktion intrazellulärer Signaltransduktionswege, unter anderem JAK/STAT, scheint EPO also auch auf EpoR-haltige Zelllinien keinen oder zumindest wenig Einfluss zu haben. Jedoch konnte tatsächlich auch in Astrozytomzellen sowie in Zellen von Lungentumoren die Aktivierung des JAK2/STAT5-Signaltransduktionsweges durch EPO nachgewiesen werden [181], [182].

Es existieren Studien, in denen ein negativer Einfluss von EPO auf das Outcome von Tumorpatienten durch eine reduzierte Kontrolle des lokalen Tumorwachstums bzw. eine reduzierte Überlebensrate der Patienten, auch unabhängig von thrombotischen Geschehen, gezeigt wird ([183], [184] Übersichtsarbeit [185]).

Jedoch wurde in mehreren Übersichtsarbeiten ein negativer Effekt EPOs in therapeutischen Dosen angezweifelt [186], [187].

Dem gegenüber existieren ebenso Studien, welche einen positiven Effekt im Sinne einer Förderung der Regression, einer Verlängerung der Überlebenszeit sowie einem verbesserten Ansprechen auf die durchgeführten Therapien nachweisen [188], [189], [190].

Hiervon unabhängig bleibt zu bemerken, dass in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen keine ungerichtete Proliferation gering bzw. undifferenzierter Zellen gezeigt werden kann, wie es in Tumorgewebe der Fall ist, sondern eine vermehrte Differenzierung der Zellen. Damit ist speziell für neurale Tumoren eher ein stabilisierender Effekt zu vermuten.

6 Zusammenfassung

EPO als lange erprobtes und bewährtes Hormon in der Therapie verschiedener Anämieformen scheint Möglichkeiten auch in der Therapie neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen zu bieten. In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von EpoR auf PC-12-Zellen bestätigt und die Induktion des JAK2/STAT5-Signaltransduktionsweges unter EPO-Exposition nachgewiesen werden. Weiterhin konnte eine Steigerung des Neuritenwachstums von PC-12-Zellen unter Einwirkung von EPO gezeigt werden. Die Zellen bildeten eine größere Anzahl von Neuriten aus im Vergleich zur Kontrollpopulation sowie weitreichende Netzwerke mit interzellulären Kontaktstellen. Anhand dieser Daten kann vermutet werden, dass EPO nicht nur einen Einfluss auf die Apoptose neuraler Zellen und damit deren Anzahl und Überleben nach hypoxischem Stress oder Traumata ausübt, sondern darüber hinaus auch die Ausbildung kommunikationsfähiger Neuronennetzwerke fördert, was als Einflussfaktor für eine verbesserte kognitive Funktion neurologischer und psychiatrischer Patienten unter EPO-Applikation und auch in der Langzeitbeobachtung angesehen werden kann.

Eine etwaige Förderung des Tumorwachstums durch Erythropoietin, welche durch die Eigenschaft der PC-12-Zellen als Tumorzellen vermutet werden könnte, kann nach aktueller Studienlage nicht eindeutig belegt werden. Eine genaue langzeitliche Supervision der Patientenpopulationen unter EPO-Exposition erscheint dennoch sinnvoll.

Weiterhin bleibt zu untersuchen, auf welchen konkreten Mechanismen die Förderung der Ausbildung von Neuriten durch EPO beruht. Auf diesem Wege könnten ebenso alternative Behandlungsmethoden gefunden werden, welche auf die Applikation von EPO und EPO-Derivaten verzichten und somit die hiermit verbundenen Schwierigkeiten, wie z.B. periphere Wirkungen des Hormones bzw. die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, vermeiden.

7 Literaturverzeichnis

- [1] H. Youssoufian, G. Longmore, D. Neumann, A. Yoshimura, und H. F. Lodish, „Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor“, *Blood*, Bd. 81, Nr. 9, S. 2223–2236, Mai 1993.
- [2] C. S. Lin, S. K. Lim, V. D'Agati, und F. Costantini, „Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis“, *Genes Dev.*, Bd. 10, Nr. 2, S. 154–164, Jan. 1996.
- [3] S. B. Krantz, „Erythropoietin“, *Blood*, Bd. 77, Nr. 3, S. 419–434, Jan. 1991.
- [4] W. Jelkmann, „Erythropoietin: structure, control of production, and function“, *Physiol. Rev.*, Bd. 72, Nr. 2, S. 449–489, Apr. 1992.
- [5] M. J. Koury und M. C. Bondurant, „The molecular mechanism of erythropoietin action“, *European Journal of Biochemistry*, Bd. 210, Nr. 3, S. 649–663, Dez. 1992.
- [6] B. A. Miller, R. C. Scaduto Jr, D. L. Tillotson, J. J. Botti, und J. Y. Cheung, „Erythropoietin stimulates a rise in intracellular free calcium concentration in single early human erythroid precursors“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 82, Nr. 1, S. 309–315, Juli 1988.
- [7] J. Misiti und J. L. Spivak, „Erythropoiesis in vitro. Role of calcium.“, *J Clin Invest*, Bd. 64, Nr. 6, S. 1573–1579, Dez. 1979.
- [8] A. Wickrema, S. B. Krantz, J. C. Winkelmann, und M. C. Bondurant, „Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells [see comments]“, *Blood*, Bd. 80, Nr. 8, S. 1940–1949, Okt. 1992.
- [9] K. Muta, S. B. Krantz, M. C. Bondurant, und A. Wickrema, „Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells.“, *J Clin Invest*, Bd. 94, Nr. 1, S. 34–43, Juli 1994.
- [10] M. J. Koury und M. C. Bondurant, „Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells“, *Science*, Bd. 248, Nr. 4953, S. 378–381, Apr. 1990.
- [11] A. Anagnostou, Z. Liu, M. Steiner, K. Chin, E. S. Lee, N. Kessimian, und C. T. Noguchi, „Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 91, Nr. 9, S. 3974–3978, Apr. 1994.
- [12] R. Yamaji, T. Okada, M. Moriya, M. Naito, T. Tsuruo, K. Miyatake, und Y. Nakano, „Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA“, *Eur. J. Biochem.*, Bd. 239, Nr. 2, S. 494–500, Juli 1996.
- [13] R. G. Carlini, A. A. Reyes, und M. Rothstein, „Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro“, *Kidney Int.*, Bd. 47, Nr. 3, S. 740–745, März 1995.
- [14] M. Brines, G. Grasso, F. Fiordaliso, A. Sfactoria, P. Ghezzi, M. Fratelli, R. Latini, Q. Xie, J. Smart, C. Su-Rick, E. Pobre, D. Diaz, D. Gomez, C. Hand, T. Coleman, und A. Cerami, „Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common β -subunit heteroreceptor“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 101, Nr. 41, S. 14907–14912, Okt. 2004.
- [15] L. Calvillo, R. Latini, J. Kajstura, A. Leri, P. Anversa, P. Ghezzi, M. Salio, A. Cerami, und M. Brines, „Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial

- remodeling“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 100, Nr. 8, S. 4802–4806, Apr. 2003.
- [16] V. Mastromarino, M. Volpe, M. B. Musumeci, C. Autore, und E. Conti, „Erythropoietin and the heart: facts and perspectives“, *Clin. Sci.*, Bd. 120, Nr. 2, S. 51–63, Jan. 2011.
- [17] C. J. Parsa, A. Matsumoto, J. Kim, R. U. Riel, L. S. Pascal, G. B. Walton, R. B. Thompson, J. A. Petrofski, B. H. Annex, J. S. Stamler, und W. J. Koch, „A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 112, Nr. 7, S. 999–1007, Okt. 2003.
- [18] K. J. Smith, A. J. Bleyer, W. C. Little, und D. C. Sane, „The cardiovascular effects of erythropoietin“, *Cardiovasc. Res.*, Bd. 59, Nr. 3, S. 538–548, Sep. 2003.
- [19] S. Weng, X. Zhu, Y. Jin, T. Wang, und H. Huang, „Protective effect of erythropoietin on myocardial infarction in rats by inhibition of caspase-12 expression“, *Exp Ther Med*, Bd. 2, Nr. 5, S. 833–836, 2011.
- [20] G. L. Semenza und G. L. Wang, „A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation.“, *Mol Cell Biol*, Bd. 12, Nr. 12, S. 5447–5454, Dez. 1992.
- [21] P. C. Watkins, R. Eddy, N. Hoffman, P. Stanislovitis, A. K. Beck, J. Galli, V. Vellucci, J. F. Gusella, und T. B. Shows, „Regional assignment of the erythropoietin gene to human chromosome region 7pter---q22“, *Cytogenet. Cell Genet.*, Bd. 42, Nr. 4, S. 214–218, 1986.
- [22] E. Metzen und P. J. Ratcliffe, „HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing“, *Biol. Chem.*, Bd. 385, Nr. 3–4, S. 223–230, Apr. 2004.
- [23] T. G. Smith, P. A. Robbins, und P. J. Ratcliffe, „The human side of hypoxia-inducible factor“, *Br J Haematol*, Bd. 141, Nr. 3, S. 325–334, Mai 2008.
- [24] H. Tian, S. L. McKnight, und D. W. Russell, „Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells“, *Genes Dev.*, Bd. 11, Nr. 1, S. 72–82, Jan. 1997.
- [25] Y. Z. Gu, S. M. Moran, J. B. Hogenesch, L. Wartman, und C. A. Bradfield, „Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha“, *Gene Expr.*, Bd. 7, Nr. 3, S. 205–213, 1998.
- [26] E. Zelzer, Y. Levy, C. Kahana, B. Z. Shilo, M. Rubinstein, und B. Cohen, „Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT.“, *EMBO J*, Bd. 17, Nr. 17, S. 5085–5094, Sep. 1998.
- [27] J. C. Chavez, O. Baranova, J. Lin, und P. Pichiule, „The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes“, *J. Neurosci.*, Bd. 26, Nr. 37, S. 9471–9481, Sep. 2006.
- [28] M. Gruber, C.-J. Hu, R. S. Johnson, E. J. Brown, B. Keith, und M. C. Simon, „Acute postnatal ablation of Hif-2? results in anemia“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 104, Nr. 7, S. 2301–2306, Feb. 2007.
- [29] E. B. Rankin, M. P. Biju, Q. Liu, T. L. Unger, J. Rha, R. S. Johnson, M. C. Simon, B. Keith, und V. H. Haase, „Hypoxia-inducible factor–2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo“, *J Clin Invest*, Bd. 117, Nr. 4, S. 1068–1077, Apr. 2007.
- [30] C. Warnecke, Z. Zaborowska, J. Kurreck, V. A. Erdmann, U. Frei, M. Wiesener,

- und K.-U. Eckardt, „Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells“, *FASEB J.*, Bd. 18, Nr. 12, S. 1462–1464, Sep. 2004.
- [31] S. Bachmann, M. Le Hir, und K. U. Eckardt, „Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin“, *J. Histochem. Cytochem.*, Bd. 41, Nr. 3, S. 335–341, März 1993.
- [32] P. H. Maxwell, M. K. Osmond, C. W. Pugh, A. Heryet, L. G. Nicholls, C. C. Tan, B. G. Doe, D. J. Ferguson, M. H. Johnson, und P. J. Ratcliffe, „Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice“, *Kidney Int.*, Bd. 44, Nr. 5, S. 1149–1162, Nov. 1993.
- [33] S. J. Schuster, S. T. Koury, M. Bohrer, S. Salceda, und J. Caro, „Cellular sites of extrarenal and renal erythropoietin production in anaemic rats“, *Br. J. Haematol.*, Bd. 81, Nr. 2, S. 153–159, Juni 1992.
- [34] G. L. Semenza, S. T. Koury, M. K. Nejfelt, J. D. Gearhart, und S. E. Antonarakis, „Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 88, Nr. 19, S. 8725–8729, Okt. 1991.
- [35] S. T. Koury, M. C. Bondurant, M. J. Koury, und G. L. Semenza, „Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization“, *Blood*, Bd. 77, Nr. 11, S. 2497–2503, Juni 1991.
- [36] P. De Franciscis, G. De Bella, und S. Cifaldi, „Spleen as a production site for erythropoietin“, *Science*, Bd. 150, Nr. 3705, S. 1831–1833, Dez. 1965.
- [37] J. L. Ascensao, F. Gaylis, D. Bronson, E. E. Fraley, und E. D. Zanjani, „Erythropoietin production by a human testicular germ cell line“, *Blood*, Bd. 62, Nr. 5, S. 1132–1134, Nov. 1983.
- [38] K. P. Conrad, D. F. Benyo, A. Westerhausen-Larsen, und T. M. Miles, „Expression of erythropoietin by the human placenta“, *FASEB J.*, Bd. 10, Nr. 7, S. 760–768, Mai 1996.
- [39] M. Magnanti, O. Gandini, L. Giuliani, P. Gazzaniga, H. H. Marti, A. Gradilone, L. Frati, A. M. Aglianò, und M. Gassmann, „Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells“, *Blood*, Bd. 98, Nr. 9, S. 2872–2874, Nov. 2001.
- [40] S. E. Juul, D. K. Anderson, Y. Li, und R. D. Christensen, „Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system“, *Pediatr. Res.*, Bd. 43, Nr. 1, S. 40–49, Jan. 1998.
- [41] S. E. Juul, A. T. Yachnis, A. M. Rojiani, und R. D. Christensen, „Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain“, *Pediatr. Dev. Pathol.*, Bd. 2, Nr. 2, S. 148–158, Apr. 1999.
- [42] H. H. Marti, R. H. Wenger, L. A. Rivas, U. Straumann, M. Digicaylioglu, V. Henn, Y. Yonekawa, C. Bauer, und M. Gassmann, „Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain“, *Eur. J. Neurosci.*, Bd. 8, Nr. 4, S. 666–676, Apr. 1996.
- [43] J. M. Davis, T. Arakawa, T. W. Strickland, und D. A. Yphantis, „Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells“, *Biochemistry*, Bd. 26, Nr. 9, S. 2633–2638, Mai 1987.

- [44] N. Imai, A. Kawamura, M. Higuchi, M. Oh-eda, T. Orita, T. Kawaguchi, und N. Ochi, „Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin“, *J. Biochem.*, Bd. 107, Nr. 3, S. 352–359, März 1990.
- [45] M. Takeuchi, N. Inoue, T. W. Strickland, M. Kubota, M. Wada, R. Shimizu, S. Hoshi, H. Kozutsumi, S. Takasaki, und A. Kobata, „Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 86, Nr. 20, S. 7819–7822, Okt. 1989.
- [46] T. Misaizu, S. Matsuki, T. W. Strickland, M. Takeuchi, A. Kobata, und S. Takasaki, „Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin“, *Blood*, Bd. 86, Nr. 11, S. 4097–4104, Jan. 1995.
- [47] M. Takeuchi, S. Takasaki, M. Shimada, und A. Kobata, „Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese hamster ovary cells“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 265, Nr. 21, S. 12127–12130, Juli 1990.
- [48] L. C. Wasley, G. Timony, P. Murtha, J. Stoudemire, A. J. Dorner, J. Caro, M. Krieger, und R. J. Kaufman, „The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin“, *Blood*, Bd. 77, Nr. 12, S. 2624–2632, Juni 1991.
- [49] J. C. Egrie und J. K. Browne, „Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP)“, *Br. J. Cancer*, Bd. 84 Suppl 1, S. 3–10, Apr. 2001.
- [50] M. S. Dordal, F. F. Wang, und E. Goldwasser, „The role of carbohydrate in erythropoietin action“, *Endocrinology*, Bd. 116, Nr. 6, S. 2293–2299, Juni 1985.
- [51] S. Weikert, D. Papac, J. Briggs, D. Cowfer, S. Tom, M. Gawlitzek, J. Lofgren, S. Mehta, V. Chisholm, N. Modi, S. Eppler, K. Carroll, S. Chamow, D. Peers, P. Berman, und L. Krummen, „Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins“, *Nat. Biotechnol.*, Bd. 17, Nr. 11, S. 1116–1121, Nov. 1999.
- [52] M. N. Fukuda, H. Sasaki, L. Lopez, und M. Fukuda, „Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates“, *Blood*, Bd. 73, Nr. 1, S. 84–89, Jan. 1989.
- [53] J. A. Brailsford und S. J. Danishefsky, „Probing the stability of nonglycosylated wild-type erythropoietin protein via reiterative alanine ligations“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 109, Nr. 19, S. 7196–7201, Mai 2012.
- [54] M. A. Recny, H. A. Scoble, und Y. Kim, „Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 262, Nr. 35, S. 17156–17163, Dez. 1987.
- [55] H. Fukamachi, T. Saito, A. Tojo, T. Kitamura, A. Urabe, und F. Takaku, „Binding of erythropoietin to CFU-E derived from fetal mouse liver cells“, *Exp. Hematol.*, Bd. 15, Nr. 8, S. 833–837, Sep. 1987.
- [56] C. Westenfelder, D. L. Biddle, und R. L. Baranowski, „Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors“, *Kidney Int.*, Bd. 55, Nr. 3, S. 808–820, März 1999.
- [57] A. Anagnostou, E. S. Lee, N. Kessimian, R. Levinson, und M. Steiner,

- „Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 87, Nr. 15, S. 5978–5982, Aug. 1990.
- [58] E. S. Fenjves, M. S. Ochoa, O. Cabrera, A. J. Mendez, N. S. Kenyon, L. Inverardi, und C. Ricordi, „Human, nonhuman primate, and rat pancreatic islets express erythropoietin receptors“, *Transplantation*, Bd. 75, Nr. 8, S. 1356–1360, Apr. 2003.
- [59] T. Yamazaki, M. Kanzaki, S. Kamidono, und M. Fujisawa, „Effect of erythropoietin on Leydig cell is associated with the activation of Stat5 pathway“, *Mol. Cell. Endocrinol.*, Bd. 213, Nr. 2, S. 193–198, Jan. 2004.
- [60] H. Wu, S. H. Lee, J. Gao, X. Liu, und M. L. Iruela-Arispe, „Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis“, *Development*, Bd. 126, Nr. 16, S. 3597–3605, Aug. 1999.
- [61] S. T. Sawyer, S. B. Krantz, und K. Sawada, „Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta“, *Blood*, Bd. 74, Nr. 1, S. 103–109, Juli 1989.
- [62] Y. Li, S. E. Juul, J. A. Morris-Wiman, D. A. Calhoun, und R. D. Christensen, „Erythropoietin receptors are expressed in the central nervous system of mid-trimester human fetuses“, *Pediatr. Res.*, Bd. 40, Nr. 3, S. 376–380, Sep. 1996.
- [63] M. Digicaylioglu, S. Bichet, H. H. Marti, R. H. Wenger, L. A. Rivas, C. Bauer, und M. Gassmann, „Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 92, Nr. 9, S. 3717–3720, Apr. 1995.
- [64] A. D. D'Andrea und L. I. Zon, „Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 86, Nr. 3, S. 681–687, Sep. 1990.
- [65] W. Jelkmann, „Molecular biology of erythropoietin“, *Intern. Med.*, Bd. 43, Nr. 8, S. 649–659, Aug. 2004.
- [66] D. J. Hilton, S. S. Watowich, P. J. Murray, und H. F. Lodish, „Increased cell surface expression and enhanced folding in the endoplasmic reticulum of a mutant erythropoietin receptor.“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 92, Nr. 1, S. 190–194, Jan. 1995.
- [67] H. M. Rogers, X. Yu, J. Wen, R. Smith, E. Fibach, und C. T. Noguchi, „Hypoxia alters progression of the erythroid program“, *Exp. Hematol.*, Bd. 36, Nr. 1, S. 17–27, Jan. 2008.
- [68] L. Calvillo, R. Latini, J. Kajstura, A. Leri, P. Anversa, P. Ghezzi, M. Salio, A. Cerami, und M. Brines, „Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 100, Nr. 8, S. 4802–4806, Apr. 2003.
- [69] G. L. Wright, P. Hanlon, K. Amin, C. Steenbergen, E. Murphy, und M. O. Arcasoy, „Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury“, *FASEB J*, Apr. 2004.
- [70] Z.-Y. Chen, P. Asavaritikrai, J. T. Prchal, und C. T. Noguchi, „Endogenous Erythropoietin Signaling Is Required for Normal Neural Progenitor Cell Proliferation“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 282, Nr. 35, S. 25875–25883, Aug. 2007.
- [71] N. Debeljak, P. Solár, und A. J. Sytkowski, „Erythropoietin and Cancer: The Unintended Consequences of Anemia Correction“, *Front Immunol*, Bd. 5, Nov. 2014.

- [72] M. Tubiana, „[Mechanisms of increasing the proliferation of hematopoietic cells. Growth factors and inhibitors. Historical perspectives]“, *Bull. Acad. Natl. Med.*, Bd. 178, Nr. 5, S. 739–748; discussion 748–749, Mai 1994.
- [73] J. Caro und L. I. Zon, „Allan J. Erslev, M.D.: Truly a Great Dane (1919–2003)“, *STEM CELLS*, Bd. 22, Nr. 1, S. 121–122, 2004.
- [74] L. O. JACOBSON, E. GOLDWASSER, W. FRIED, und L. F. PLZAK, „Studies on erythropoiesis. VII. The role of the kidney in the production of erythropoietin“, *Trans. Assoc. Am. Physicians*, Bd. 70, S. 305–317, 1957.
- [75] T. Miyake, C. K. Kung, und E. Goldwasser, „Purification of human erythropoietin.“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 252, Nr. 15, S. 5558–5564, Okt. 1977.
- [76] F.-K. Lin, „DNA sequences encoding erythropoietin“, US4703008 (A), 27-Okt-1987.
- [77] F. K. Lin, S. Suggs, C. H. Lin, J. K. Browne, R. Smalling, J. C. Egrie, K. K. Chen, G. M. Fox, F. Martin, und Z. Stabinsky, „Cloning and expression of the human erythropoietin gene“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 82, Nr. 22, S. 7580–7584, Nov. 1985.
- [78] J. W. Adamson und J. W. Eschbach, „Treatment of the anemia of chronic renal failure with recombinant human erythropoietin“, *Annu. Rev. Med.*, Bd. 41, S. 349–360, 1990.
- [79] W. Jelkmann, „Effects of erythropoietin on brain function“, *Curr Pharm Biotechnol*, Bd. 6, Nr. 1, S. 65–79, Feb. 2005.
- [80] A.-L. Sirén, T. Fasshauer, C. Bartels, und H. Ehrenreich, „Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system“, *Neurotherapeutics*, Bd. 6, Nr. 1, S. 108–127, Jan. 2009.
- [81] H. Ehrenreich, M. Hasselblatt, C. Dembowski, L. Cepek, P. Lewczuk, M. Stiefel, H.-H. Rustenbeck, N. Breiter, S. Jacob, F. Knerlich, M. Bohn, W. Poser, E. Rüter, M. Kochen, O. Gefeller, C. Gleiter, T. C. Wessel, M. De Ryck, L. Itri, H. Prange, A. Cerami, M. Brines, und A.-L. Sirén, „Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial“, *Mol. Med.*, Bd. 8, Nr. 8, S. 495–505, Aug. 2002.
- [82] K. Miskowiak, U. O’Sullivan, und C. J. Harmer, „Erythropoietin enhances hippocampal response during memory retrieval in humans“, *J. Neurosci.*, Bd. 27, Nr. 11, S. 2788–2792, März 2007.
- [83] H. Ehrenreich, B. Fischer, C. Norra, F. Schellenberger, N. Stender, M. Stiefel, A.-L. Sirén, W. Paulus, K.-A. Nave, R. Gold, und C. Bartels, „Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis“, *Brain*, Bd. 130, Nr. Pt 10, S. 2577–2588, Okt. 2007.
- [84] A. El-Kordi, K. Radyushkin, und H. Ehrenreich, „Erythropoietin improves operant conditioning and stability of cognitive performance in mice“, *BMC Biol.*, Bd. 7, S. 37, 2009.
- [85] H. Ehrenreich, D. Degner, J. Meller, M. Brines, M. Béhé, M. Hasselblatt, H. Woldt, P. Falkai, F. Knerlich, S. Jacob, N. von Ahsen, W. Maier, W. Brück, E. Rüter, A. Cerami, W. Becker, und A.-L. Sirén, „Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia“, *Mol. Psychiatry*, Bd. 9, Nr. 1, S. 42–54, Jan. 2004.
- [86] J. Santa-Olalla und L. Covarrubias, „Epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor-alpha (TGF-alpha), and basic fibroblast growth factor (bFGF) differentially influence neural precursor cells of mouse embryonic mesencephalon“, *J. Neurosci. Res.*, Bd. 42, Nr. 2, S. 172–183, Okt. 1995.

- [87] R. W. Gundersen und J. N. Barrett, „Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor“, *Science*, Bd. 206, Nr. 4422, S. 1079–1080, Nov. 1979.
- [88] J. H. Park, S. B. Lee, K.-H. Lee, und J.-Y. Ahn, „Nuclear Akt promotes neurite outgrowth in the early stage of neuritogenesis“, *BMB Rep*, Bd. 45, Nr. 9, S. 521–525, Sep. 2012.
- [89] J. Arikath, „Molecular mechanisms of dendrite morphogenesis“, *Front Cell Neurosci*, Bd. 6, S. 61, 2012.
- [90] B. J. Dickson, „Molecular mechanisms of axon guidance“, *Science*, Bd. 298, Nr. 5600, S. 1959–1964, Dez. 2002.
- [91] R. L. Zhang, Z. G. Zhang, und M. Chopp, „Ischemic stroke and Neurogenesis in the Subventricular Zone“, *Neuropharmacology*, Bd. 55, Nr. 3, S. 345–352, Sep. 2008.
- [92] J. H. Skene und I. Virág, „Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43“, *J. Cell Biol.*, Bd. 108, Nr. 2, S. 613–624, Feb. 1989.
- [93] J. H. Skene, „Growth-associated proteins and the curious dichotomies of nerve regeneration“, *Cell*, Bd. 37, Nr. 3, S. 697–700, Juli 1984.
- [94] A. J. Aguayo, S. David, und G. M. Bray, „Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents“, *J Exp Biol*, Bd. 95, Nr. 1, S. 231–240, Jan. 1981.
- [95] M. E. Schwab, „Nogo and axon regeneration“, *Curr. Opin. Neurobiol.*, Bd. 14, Nr. 1, S. 118–124, Feb. 2004.
- [96] M. S. Chen, A. B. Huber, M. E. van der Haar, M. Frank, L. Schnell, A. A. Spillmann, F. Christ, und M. E. Schwab, „Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1“, *Nature*, Bd. 403, Nr. 6768, S. 434–439, Jan. 2000.
- [97] J. Silver und J. H. Miller, „Regeneration beyond the glial scar“, *Nat. Rev. Neurosci.*, Bd. 5, Nr. 2, S. 146–156, Feb. 2004.
- [98] J. K. Lee und B. Zheng, „Axon regeneration after spinal cord injury: Insight from genetically modified mouse models“, *Restor Neurol Neurosci*, Bd. 26, Nr. 2–3, S. 175–182, 2008.
- [99] G. Stoll und H. W. Müller, „Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights“, *Brain Pathol.*, Bd. 9, Nr. 2, S. 313–325, Apr. 1999.
- [100] G. Stoll, J. W. Griffin, C. Y. Li, und B. D. Trapp, „Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation“, *J. Neurocytol.*, Bd. 18, Nr. 5, S. 671–683, Okt. 1989.
- [101] S. Y. Fu und T. Gordon, „The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration“, *Mol. Neurobiol.*, Bd. 14, Nr. 1–2, S. 67–116, Apr. 1997.
- [102] R. Heumann, D. Lindholm, C. Bandtlow, M. Meyer, M. J. Radeke, T. P. Misko, E. Shooter, und H. Thoenen, „Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 84, Nr. 23, S. 8735–8739, Dez. 1987.
- [103] M. Meyer, I. Matsuoka, C. Wetmore, L. Olson, und H. Thoenen, „Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA“, *J. Cell Biol.*, Bd. 119, Nr. 1, S. 45–54, Okt. 1992.

- [104] A. Gorio, L. Vergani, L. Ferro, G. Prino, und A. M. Di Giulio, „Glycosaminoglycans in nerve injury: II. Effects on transganglionic degeneration and on the expression of neurotrophic factors“, *J. Neurosci. Res.*, Bd. 46, Nr. 5, S. 572–580, Dez. 1996.
- [105] S. David und A. J. Aguayo, „Axonal elongation into peripheral nervous system ‘bridges’ after central nervous system injury in adult rats“, *Science*, Bd. 214, Nr. 4523, S. 931–933, Nov. 1981.
- [106] S. Masuda, M. Nagao, K. Takahata, Y. Konishi, F. Gallyas Jr, T. Tabira, und R. Sasaki, „Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 268, Nr. 15, S. 11208–11216, Mai 1993.
- [107] E. Morishita, S. Masuda, M. Nagao, Y. Yasuda, und R. Sasaki, „Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death“, *Neuroscience*, Bd. 76, Nr. 1, S. 105–116, Jan. 1997.
- [108] S. Masuda, M. Chikuma, und R. Sasaki, „Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes“, *Brain Res.*, Bd. 746, Nr. 1–2, S. 63–70, Jan. 1997.
- [109] S. Masuda, M. Okano, K. Yamagishi, M. Nagao, M. Ueda, und R. Sasaki, „A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 269, Nr. 30, S. 19488–19493, Juli 1994.
- [110] P. T. Tsai, J. J. Ohab, N. Kertesz, M. Groszer, C. Matter, J. Gao, X. Liu, H. Wu, und S. T. Carmichael, „A Critical Role of Erythropoietin Receptor in Neurogenesis and Post-Stroke Recovery“, *J. Neurosci.*, Bd. 26, Nr. 4, S. 1269–1274, Jan. 2006.
- [111] X. Yu, J. J. Shacka, J. B. Eells, C. Suarez-Quian, R. M. Przygodzki, B. Beleslin-Cokic, C.-S. Lin, V. M. Nikodem, B. Hempstead, K. C. Flanders, F. Costantini, und C. T. Noguchi, „Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain“, *Development*, Bd. 129, Nr. 2, S. 505–516, Jan. 2002.
- [112] T. Shingo, S. T. Sorokan, T. Shimazaki, und S. Weiss, „Erythropoietin Regulates the In Vitro and In Vivo Production of Neuronal Progenitors by Mammalian Forebrain Neural Stem Cells“, *J. Neurosci.*, Bd. 21, Nr. 24, S. 9733–9743, Dez. 2001.
- [113] S. J. Morrison, M. Csete, A. K. Groves, W. Melega, B. Wold, und D. J. Anderson, „Culture in Reduced Levels of Oxygen Promotes Clonogenic Sympathoadrenal Differentiation by Isolated Neural Crest Stem Cells“, *J. Neurosci.*, Bd. 20, Nr. 19, S. 7370–7376, Jan. 2000.
- [114] L. Studer, M. Csete, S.-H. Lee, N. Kabbani, J. Walikonis, B. Wold, und R. McKay, „Enhanced Proliferation, Survival, and Dopaminergic Differentiation of CNS Precursors in Lowered Oxygen“, *J. Neurosci.*, Bd. 20, Nr. 19, S. 7377–7383, Jan. 2000.
- [115] W. A. Banks, N. L. Jumbe, C. L. Farrell, M. L. Niehoff, und A. C. Heatherington, „Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa“, *Eur. J. Pharmacol.*, Bd. 505, Nr. 1–3, S. 93–101, Nov. 2004.
- [116] M. L. Brines, P. Ghezzi, S. Keenan, D. Agnello, N. C. de Lanerolle, C. Cerami, L. M. Itri, und A. Cerami, „Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 97, Nr. 19, S. 10526–10531, Sep. 2000.

- [117] S. E. Juul, R. J. McPherson, F. X. Farrell, L. Jolliffe, D. J. Ness, und C. A. Gleason, „Erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin“, *Biol. Neonate*, Bd. 85, Nr. 2, S. 138–144, 2004.
- [118] A. Xenocostas, W. K. Cheung, F. Farrell, C. Zakszewski, M. Kelley, A. Lutynski, M. Crump, J. H. Lipton, T. L. Kiss, C. Y. Lau, und H. A. Messner, „The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin“, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Bd. 61, Nr. 3, S. 189–195, Mai 2005.
- [119] Y. Yang und G. A. Rosenberg, „Blood–Brain Barrier Breakdown in Acute and Chronic Cerebrovascular Disease“, *Stroke*, Bd. 42, Nr. 11, S. 3323–3328, Jan. 2011.
- [120] Y. Hanazono, K. Sasaki, H. Nitta, Y. Yazaki, und H. Hirai, „Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of the beta chain of the GM-CSF receptor“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 208, Nr. 3, S. 1060–1066, März 1995.
- [121] P. T. Jubinsky, O. I. Krijanovski, D. G. Nathan, J. Tavernier, und C. A. Sieff, „The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor“, *Blood*, Bd. 90, Nr. 5, S. 1867–1873, Sep. 1997.
- [122] M. Leist, P. Ghezzi, G. Grasso, R. Bianchi, P. Villa, M. Fratelli, C. Savino, M. Bianchi, J. Nielsen, J. Gerwien, P. Kallunki, A. K. Larsen, L. Helboe, S. Christensen, L. O. Pedersen, M. Nielsen, L. Torup, T. Sager, A. Sfacteria, S. Erbayraktar, Z. Erbayraktar, N. Gokmen, O. Yilmaz, C. Cerami-Hand, Q.-W. Xie, T. Coleman, A. Cerami, und M. Brines, „Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic“, *Science*, Bd. 305, Nr. 5681, S. 239–242, Juli 2004.
- [123] C. Savino, R. Pedotti, F. Baggi, F. Ubiali, B. Gallo, S. Nava, P. Bigini, S. Barbera, E. Fumagalli, T. Mennini, A. Vezzani, M. Rizzi, T. Coleman, A. Cerami, M. Brines, P. Ghezzi, und R. Bianchi, „Delayed administration of erythropoietin and its non-erythropoietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis“, *J. Neuroimmunol.*, Bd. 172, Nr. 1–2, S. 27–37, März 2006.
- [124] P. Villa, J. van Beek, A. K. Larsen, J. Gerwien, S. Christensen, A. Cerami, M. Brines, M. Leist, P. Ghezzi, und L. Torup, „Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives“, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, Bd. 27, Nr. 3, S. 552–563, März 2007.
- [125] L. A. Greene und A. S. Tischler, „Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 73, Nr. 7, S. 2424–2428, Juli 1976.
- [126] F. Paulsen und R. Lüllmann-Rauch, *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, 2012.
- [127] L. A. Greene und A. S. Tischler, „Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 73, Nr. 7, S. 2424–2428, Juli 1976.
- [128] A. S. Tischler und L. A. Greene, „Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor“, *Lab. Invest.*, Bd. 39, Nr. 2, S. 77–89, Aug. 1978.
- [129] C.-Y. Jeon, J.-K. Jin, Y.-H. Koh, W. Chun, I.-G. Choi, H.-J. Kown, Y.-S. Kim, und J.-B. Park, „Neurites from PC12 cells are connected to each other by synapse-like structures“, *Synapse*, Bd. 64, Nr. 10, S. 765–772, Okt. 2010.

- [130] M. Milano und R. Collomp, „Erythropoietin and neuroprotection: a therapeutic perspective“, *J Oncol Pharm Pract*, Bd. 11, Nr. 4, S. 145–149, Dez. 2005.
- [131] M. Sakanaka, T.-C. Wen, S. Matsuda, S. Masuda, E. Morishita, M. Nagao, und R. Sasaki, „In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 95, Nr. 8, S. 4635–4640, Apr. 1998.
- [132] „SAA-EPO.doc“ . .
- [133] P. J. Murray, „The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration“, *J. Immunol.*, Bd. 178, Nr. 5, S. 2623–2629, März 2007.
- [134] M. Um und H. F. Lodish, „Antiapoptotic effects of erythropoietin in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells require activation of both the STAT5 and AKT signaling pathways“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 281, Nr. 9, S. 5648–5656, März 2006.
- [135] F. Zhang, S. Wang, G. Cao, Y. Gao, und J. Chen, „Signal transducers and activators of transcription 5 contributes to erythropoietin-mediated neuroprotection against hippocampal neuronal death after transient global cerebral ischemia“, *Neurobiol. Dis.*, Bd. 25, Nr. 1, S. 45–53, Jan. 2007.
- [136] M. Um, A. W. Gross, und H. F. Lodish, „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.*, Bd. 19, Nr. 3, S. 634–645, März 2007.
- [137] I. Wallach, J. Zhang, A. Hartmann, F. K. H. van Landeghem, A. Ivanova, M. Klar, und C. Dame, „Erythropoietin-receptor gene regulation in neuronal cells“, *Pediatr. Res.*, Bd. 65, Nr. 6, S. 619–624, Juni 2009.
- [138] N. Pregi, D. Vittori, G. Pérez, C. P. Leirós, und A. Nesse, „Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells“, *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 1763, Nr. 2, S. 238–246, Feb. 2006.
- [139] R. Assandri, M. Egger, M. Gassmann, E. Niggli, C. Bauer, I. Forster, und A. Gorlach, „Erythropoietin modulates intracellular calcium in a human neuroblastoma cell line“, *J. Physiol. (Lond.)*, Bd. 516 (Pt 2), S. 343–352, Apr. 1999.
- [140] W. M. Campana, R. Misasi, und J. S. O’Brien, „Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin“, *Int. J. Mol. Med.*, Bd. 1, Nr. 1, S. 235–241, Jan. 1998.
- [141] Y. Wollman, G. Westphal, M. Blum, R. Simantov, S. Blumberg, G. Peer, T. Chernihovsky, E. Friedrich, und A. Iaina, „The effect of human recombinant erythropoietin on the growth of a human neuroblastoma cell line“, *Life Sci.*, Bd. 59, Nr. 4, S. 315–322, 1996.
- [142] K. Chin, X. Yu, B. Beleslin-Cokic, C. Liu, K. Shen, H. W. Mohrenweiser, und C. T. Noguchi, „Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain“, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, Bd. 81, Nr. 1–2, S. 29–42, Sep. 2000.
- [143] B. B. Beleslin-Cokic, V. P. Cokic, X. Yu, B. B. Weksler, A. N. Schechter, und C. T. Noguchi, „Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells“, *Blood*, Bd. 104, Nr. 7, S. 2073–2080, Okt. 2004.
- [144] T. Chiba, Y. Ikawa, und K. Todokoro, „GATA-1 transactivates erythropoietin receptor gene, and erythropoietin receptor-mediated signals enhance GATA-1 gene expression“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 19, Nr. 14, S. 3843–3848, Juli 1991.
- [145] M. Ogilvie, X. Yu, V. Nicolas-Metral, S. M. Pulido, C. Liu, U. T. Ruegg, und C. T. Noguchi, „Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with

- differentiation of myoblasts“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 275, Nr. 50, S. 39754–39761, Dez. 2000.
- [146] S. Gobert, S. Chretien, F. Gouilleux, O. Muller, C. Pallard, I. Dusanter-Fourt, B. Groner, C. Lacombe, S. Gisselbrecht, und P. Mayeux, „Identification of tyrosine residues within the intracellular domain of the erythropoietin receptor crucial for STAT5 activation“, *EMBO J.*, Bd. 15, Nr. 10, S. 2434–2441, Mai 1996.
- [147] S. Chrétien, P. Varlet, F. Verdier, S. Gobert, J. P. Cartron, S. Gisselbrecht, P. Mayeux, und C. Lacombe, „Erythropoietin-induced erythroid differentiation of the human erythroleukemia cell line TF-1 correlates with impaired STAT5 activation“, *EMBO J.*, Bd. 15, Nr. 16, S. 4174–4181, Aug. 1996.
- [148] J. E. Damen, H. Wakao, A. Miyajima, J. Krosi, R. K. Humphries, R. L. Cutler, und G. Krystal, „Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation“, *EMBO J.*, Bd. 14, Nr. 22, S. 5557–5568, Nov. 1995.
- [149] E. Parganas, D. Wang, D. Stravopodis, D. J. Topham, J. C. Marine, S. Teglund, E. F. Vanin, S. Bodner, O. R. Colamonici, J. M. van Deursen, G. Grosveld, und J. N. Ihle, „Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors“, *Cell*, Bd. 93, Nr. 3, S. 385–395, Mai 1998.
- [150] A. Sola, M. Rogido, B. H. Lee, T. Genetta, und T.-C. Wen, „Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats“, *Pediatr. Res.*, Bd. 57, Nr. 4, S. 481–487, Apr. 2005.
- [151] A. Bonni, Y. Sun, M. Nadal-Vicens, A. Bhatt, D. A. Frank, I. Rozovsky, N. Stahl, G. D. Yancopoulos, und M. E. Greenberg, „Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway“, *Science*, Bd. 278, Nr. 5337, S. 477–483, Okt. 1997.
- [152] S. Gupta, K. Mishra, A. Surolia, und K. Banerjee, „Suppressor of cytokine signalling-6 promotes neurite outgrowth via JAK2/STAT5-mediated signalling pathway, involving negative feedback inhibition“, *PLoS ONE*, Bd. 6, Nr. 11, S. e26674, 2011.
- [153] A. S. Tischler, L. A. Greene, P. W. Kwan, und V. W. Slayton, „Ultrastructural effects of nerve growth factor on PC 12 pheochromocytoma cells in spinner culture“, *Cell Tissue Res.*, Bd. 228, Nr. 3, S. 641–648, 1983.
- [154] H. J. Federoff, E. Grabczyk, und M. C. Fishman, „Dual regulation of GAP-43 gene expression by nerve growth factor and glucocorticoids“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 263, Nr. 36, S. 19290–19295, Dez. 1988.
- [155] L. A. Greene, „Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium“, *J. Cell Biol.*, Bd. 78, Nr. 3, S. 747–755, Sep. 1978.
- [156] Y. Iwasaki, M. Ishikawa, N. Okada, und S. Koizumi, „Induction of a distinct morphology and signal transduction in TrkB/PC12 cells by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor“, *J. Neurochem.*, Bd. 68, Nr. 3, S. 927–934, März 1997.
- [157] A. Togari, D. Baker, G. Dickens, und G. Guroff, „The neurite-promoting effect of fibroblast growth factor on PC12 cells“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 114, Nr. 3, S. 1189–1193, Aug. 1983.
- [158] Y. Zhou und G. E. Besner, „Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is a potent neurotrophic factor for PC12 cells“, *Neurosignals*, Bd. 18,

- Nr. 3, S. 141–151, 2010.
- [159] Y. Furukawa, S. Watanabe, S. Okuyama, and M. Nakajima, „Neurotrophic effect of citrus auraptene: neuritogenic activity in PC12 cells“, *Int J Mol Sci*, Bd. 13, Nr. 5, S. 5338–5347, 2012.
- [160] L.-F. Lin, S.-P. Chiu, M.-J. Wu, P.-Y. Chen, and J.-H. Yen, „Luteolin induces microRNA-132 expression and modulates neurite outgrowth in PC12 cells“, *PLoS ONE*, Bd. 7, Nr. 8, S. e43304, 2012.
- [161] K. Jin, M. Minami, J. Q. Lan, X. O. Mao, S. Batteur, R. P. Simon, and D. A. Greenberg, „Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 98, Nr. 8, S. 4710–4715, Apr. 2001.
- [162] N. J. Kee, E. Preston, and J. M. Wojtowicz, „Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat“, *Exp Brain Res*, Bd. 136, Nr. 3, S. 313–320, Feb. 2001.
- [163] J. Liu, K. Solway, R. O. Messing, and F. R. Sharp, „Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils“, *J. Neurosci.*, Bd. 18, Nr. 19, S. 7768–7778, Okt. 1998.
- [164] J. M. Parent, Z. S. Vexler, C. Gong, N. Derugin, and D. M. Ferriero, „Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke“, *Ann. Neurol.*, Bd. 52, Nr. 6, S. 802–813, Dez. 2002.
- [165] W. Schmidt und K. G. Reymann, „Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia“, *Neurosci. Lett.*, Bd. 334, Nr. 3, S. 153–156, Dez. 2002.
- [166] A. B. Tonchev, T. Yamashima, L. Zhao, H. J. Okano, und H. Okano, „Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys“, *Mol. Cell. Neurosci.*, Bd. 23, Nr. 2, S. 292–301, Juni 2003.
- [167] K. Türeyen, R. Vemuganti, K. A. Sailor, K. K. Bowen, und R. J. Dempsey, „Transient focal cerebral ischemia-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the adult mouse“, *J. Neurosurg.*, Bd. 101, Nr. 5, S. 799–805, Nov. 2004.
- [168] Y. Yagita, K. Kitagawa, T. Ohtsuki, null Takasawa Ki, T. Miyata, H. Okano, M. Hori, und M. Matsumoto, „Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus“, *Stroke*, Bd. 32, Nr. 8, S. 1890–1896, Aug. 2001.
- [169] T. Yamashita, M. Ninomiya, P. Hernández Acosta, J. M. García-Verdugo, T. Sunabori, M. Sakaguchi, K. Adachi, T. Kojima, Y. Hirota, T. Kawase, N. Araki, K. Abe, H. Okano, und K. Sawamoto, „Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum“, *J. Neurosci.*, Bd. 26, Nr. 24, S. 6627–6636, Juni 2006.
- [170] R. Zhang, Z. Zhang, L. Wang, Y. Wang, A. Goussev, L. Zhang, K.-L. Ho, C. Morshead, und M. Chopp, „Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats“, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, Bd. 24, Nr. 4, S. 441–448, Apr. 2004.
- [171] R. L. Zhang, Z. G. Zhang, L. Zhang, und M. Chopp, „Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia“, *Neuroscience*, Bd. 105, Nr. 1, S. 33–41, 2001.
- [172] K. Jin, X. Wang, L. Xie, X. O. Mao, W. Zhu, Y. Wang, J. Shen, Y. Mao, S. Banwait, und D. A. Greenberg, „Evidence for stroke-induced neurogenesis in the

- human brain“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 103, Nr. 35, S. 13198–13202, Aug. 2006.
- [173] J. Macas, C. Nern, K. H. Plate, und S. Momma, „Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain“, *J. Neurosci.*, Bd. 26, Nr. 50, S. 13114–13119, Dez. 2006.
- [174] S. L. Minger, A. Ekonomou, E. M. Carta, A. Chinoy, R. H. Perry, und C. G. Ballard, „Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction“, *Regen Med*, Bd. 2, Nr. 1, S. 69–74, Jan. 2007.
- [175] H. F. Bunn, J. Gu, L. E. Huang, J. W. Park, und H. Zhu, „Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation“, *J. Exp. Biol.*, Bd. 201, Nr. Pt 8, S. 1197–1201, Apr. 1998.
- [176] L. Wang, Z. G. Zhang, S. R. Gregg, R. L. Zhang, Z. Jiao, Y. LeTourneau, X. Liu, Y. Feng, J. Gerwien, L. Torup, M. Leist, C. T. Noguchi, Z.-Y. Chen, und M. Chopp, „The Sonic Hedgehog Pathway Mediates Carbamylated Erythropoietin-enhanced Proliferation and Differentiation of Adult Neural Progenitor Cells“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 282, Nr. 44, S. 32462–32470, Feb. 2007.
- [177] D. H. Oh, I. Y. Lee, M. Choi, S. H. Kim, und H. Son, „Comparison of Neurite Outgrowth Induced by Erythropoietin (EPO) and Carbamylated Erythropoietin (CEPO) in Hippocampal Neural Progenitor Cells“, *Korean J Physiol Pharmacol*, Bd. 16, Nr. 4, S. 281–285, Aug. 2012.
- [178] N. Kaneko, E. Kako, und K. Sawamoto, „Enhancement of ventricular-subventricular zone-derived neurogenesis and oligodendrogenesis by erythropoietin and its derivatives“, *Front Cell Neurosci*, Bd. 7, Nov. 2013.
- [179] C. T. Noguchi, P. Asavaritikrai, R. Teng, und Y. Jia, „Role of erythropoietin in the brain“, *Crit Rev Oncol Hematol*, Bd. 64, Nr. 2, S. 159–171, Nov. 2007.
- [180] F. Farrell und A. Lee, „The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues“, *Oncologist*, Bd. 9 Suppl 5, S. 18–30, 2004.
- [181] A. Mohyeldin, C. L. Dalgard, H. Lu, T. Mcfate, A. S. Tait, V. C. Patel, K. Wong, E. Rushing, S. Roy, G. Acs, und A. Verma, „Survival and invasiveness of astrocytomas promoted by erythropoietin“, *J. Neurosurg.*, Bd. 106, Nr. 2, S. 338–350, Feb. 2007.
- [182] S. Y. Lai und F. M. Johnson, „Defining the role of the JAK-STAT pathway in head and neck and thoracic malignancies: implications for future therapeutic approaches“, *Drug Resist. Updat.*, Bd. 13, Nr. 3, S. 67–78, Juni 2010.
- [183] M. Henke, R. Laszig, C. Rube, U. Schäfer, K.-D. Haase, B. Schilcher, S. Mose, K. T. Beer, U. Burger, C. Dougherty, und H. Frommhold, „Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial“, *Lancet*, Bd. 362, Nr. 9392, S. 1255–1260, Okt. 2003.
- [184] M. Henke, D. Mattern, M. Pepe, C. Bézay, C. Weissenberger, M. Werner, und F. Pajonk, „Do erythropoietin receptors on cancer cells explain unexpected clinical findings?“, *J. Clin. Oncol.*, Bd. 24, Nr. 29, S. 4708–4713, Okt. 2006.
- [185] J. Szenajch, G. Wcislo, J.-Y. Jeong, C. Szczylik, und L. Feldman, „The role of erythropoietin and its receptor in growth, survival and therapeutic response of human tumor cells From clinic to bench - a critical review“, *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 1806, Nr. 1, S. 82–95, Aug. 2010.
- [186] A. M. Sinclair, M. D. Todd, K. Forsythe, S. J. Knox, S. Elliott, und C. G. Begley, „Expression and function of erythropoietin receptors in tumors“, *Cancer*,

- Bd. 110, Nr. 3, S. 477–488, Aug. 2007.
- [187] M. R. Nowrouzian, J. Dunst, und P. Vaupel, „Erythropoiesis-stimulating agents: favorable safety profile when used as indicated“, *Strahlenther Onkol*, Bd. 184, Nr. 3, S. 121–136, März 2008.
- [188] O. Katz, E. Barzilay, A. Skaat, A. Herman, M. Mittelman, und D. Neumann, „Erythropoietin induced tumour mass reduction in murine lymphoproliferative models“, *Acta Haematol.*, Bd. 114, Nr. 3, S. 177–179, 2005.
- [189] M. Mittelman, D. Neumann, A. Peled, P. Kanter, und N. Haran-Ghera, „Erythropoietin induces tumor regression and antitumor immune responses in murine myeloma models“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 98, Nr. 9, S. 5181–5186, Apr. 2001.
- [190] O. Thews, R. Koenig, D. K. Kelleher, J. Kutzner, und P. Vaupel, „Enhanced radiosensitivity in experimental tumours following erythropoietin treatment of chemotherapy-induced anaemia“, *Br. J. Cancer*, Bd. 78, Nr. 6, S. 752–756, Sep. 1998.

8 Thesen

- 1)** EPO besitzt Wirkung nicht nur im Bereich der Hämatopoiese, sondern übt auch Einfluss auf andere Gewebe aus, z. B. auf neurale Gewebe.
- 2)** PC-12-Zellen exprimieren den EPO-Rezeptor.
- 3)** EPO aktiviert den JAK/STAT5-Signaltransduktionsweg in PC-12-Zellen.
- 4)** PC-12-Zellen können sich neural differenzieren.
- 5)** Die neurale Differenzierung von PC-12-Zellen wird durch den neuronalen Wachstumsfaktor NGF induziert.
- 6)** EPO induziert die neurale Differenzierung von PC-12-Zellen.
- 7)** EPO fördert das Neuritenwachstum von PC-12-Zellen.
- 8)** Der EPO-Rezeptor unterliegt einer autokrinen Regulierung.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michaela Rabe, geb. Herz
Geburtsdatum: 05.08.1986
Geburtsort: Burgstädt
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

08/1993 - 07/1997 Grundschole Wittgensdorf
08/1997 - 06/2005 Georgius-Agricola-Gymnasium Glauchau, Abitur

Freiwilligendienst

09/2005 - 08/2006 Freiwilliges Ökologisches Jahr, Forstverwaltung Prinz von Schönburg-Hartenstein, Hartenstein

Medizinische Ausbildung

10/2006 – 11/2012 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
11/2012 Abschluss des Medizinstudiums mit dem 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

08/2011 - 07/2012 Klinik für Innere Medizin, Städtisches Klinikum Dessau, Chefarzt Prof. M. Plauth
Klinik für Neurologie, Martha-Maria Krankenhaus Halle-Dölau, Chefarzt Dr. med. F. Hoffmann
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara, Halle (Saale), Chefarzt Dr. med. W. Asperger

Beruflicher Werdegang

seit 02/2013 Assistenzärztin am DRK-Krankenhaus Lichtenstein, Klinik für Innere Medizin, Chefarzt Dr. med. R. Schaub

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß §16 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Publikationen

Auszüge aus der Arbeit wurden nicht veröffentlicht.

Frühere Promotionsversuche

Ich bestätige, dass ich bisher keine Promotionsversuche durchgeführt habe, keine Promotionsgesuche an anderen Universitäten abgelehnt wurden sowie an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Lobsdorf, den

gez. Michaela Rabe

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Horstkorte für die Überlassung des Themas, die kritische Diskussion dieser Arbeit sowie die stets angenehme Zusammenarbeit und kollegiale Atmosphäre.

Ich danke

- Herrn Dr. K. Bork für seine sachkundige Beratung und Betreuung,
- Frau N. Glaubitz sowie Frau J. Pollscheid für die geduldige Einführung in die Laborarbeit sowie die tatkräftige Unterstützung bei den Versuchen,
- meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Großeltern sowie meinen Freunden, für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt während der Entstehung dieser Arbeit,
- den Gutachtern.