

*Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg*

*Direktor: Professor Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus*



**Der Einfluss von Erythropoetin auf die  
neuronale Differenzierung von  
murinen, induzierten pan neuronalen Progenitorzellen**

***Inaugural - Dissertation***

*zur Erlangung der Doktorwürde der*

*Medizinischen Fakultät*

*der*

***Julius-Maximilians-Universität Würzburg***

***vorgelegt von***

*Johannes Flemming*

***aus Berlin***

***Würzburg, August 2016***

**Referent: Prof. Dr. Anna-Leena Sirén**

**Koreferent: Prof. Dr. Michael Sendtner**

**Dekan: Prof Dr. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 2017**

**Der Promovend ist Arzt.**

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>I) Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1. Erzeugung der induzierten pluripotenten Stammzellen .....	1
2. Erzeugung der 4-Faktor induzierten pluripotenten Stammzellen.....	1
3. Schwachstellen der ipS-Zellen .....	4
4. NSC, NPC, pNPC und ipNPC .....	5
5. Erythropoetin .....	5
6. Wirkungsmechanismus von EPO in neuronalen Zellen .....	7
7. Zielsetzung und experimentelle Strategien.....	9
<b>II) Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
1. Zellherkunft .....	11
2. Ausplattierung der Zellen .....	11
3. Zelldifferenzierung .....	12
4. Passagierung und Trituierung der Zellen.....	12
5. Mediumwechsel .....	13
6. Neurosphärenkultur .....	13
7. Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	14
8. Labormaterialien .....	15
9. Einfluss von EPO auf die Zellviabilität .....	20
10. Einfluss von EPO auf die Neurosphären .....	21
11. Einfluss von EPO auf das Neuritenwachstum.....	23
12. Einfluss von EPO auf die Zellproliferation .....	26
13. Expression des funktionellen EPO-Rezeptors.....	28
14. Statistische Analysen .....	34
<b>III) Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
1. Einfluss von EPO auf die Zellviabilität .....	35
2. Einfluss von EPO auf die Neurosphären .....	36
3. Einfluss von EPO auf das Neuritenwachstum.....	40
4. Einfluss von EPO auf die Zellproliferation .....	47
5. Expression des funktionellen EPO-Rezeptors.....	52

<b>IV)</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
1.	Einfluss von EPO auf die Zellviabilität .....	54
2.	Einfluss von EPO auf die Neurosphären .....	55
3.	Einfluss von EPO auf das Neuritenwachstum.....	56
4.	Einfluss von EPO auf die Zellproliferation .....	57
5.	Expression des funktionellen EPO-Rezeptors.....	58
6.	Reverse Transkriptase-PCR.....	59
<b>V)</b>	<b>Zusammenfassung und Aussicht .....</b>	<b>61</b>
<b>VI)</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>64</b>
<b>VII)</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

µM.....	<i>Mikromolar</i>
24h .....	<i>24 Stunden</i>
4F ipNPC.....	<i>4-Faktor pan neurale Progenitorzellen</i>
4F ipS-Zellen.....	<i>4-Faktor induziert pluripotente Stammzellen</i>
AIDS.....	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
ALS .....	<i>Amyotrophe Lateralsklerose</i>
AUC .....	<i>area under the curve</i>
BAD .....	<i>Bcl2-Antagonist of Cell Death</i>
Bcl-XL .....	<i>Bcl2 Related Protein Long Isoform</i>
bFGF .....	<i>basic fibroblast growth factor</i>
c-Myc .....	<i>Transkriptionsfaktor</i>
d1 .....	<i>day 1; 1. Tag</i>
DAPI .....	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol, kurz DAPI</i>
dlx5 .....	<i>distal-less homeobox 5 gene, Transkriptionsfaktor</i>
DMEM.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO.....	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA.....	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
ECL .....	<i>erhöhte Chemilumineszenz</i>
EDTA .....	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EPO .....	<i>Erythropoetin</i>
ERK.....	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESC .....	<i>embryonale Stammzellen</i>
FACS.....	<i>fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie</i>
FAK1.....	<i>Focal Adhesion Kinase-1</i>
FCS .....	<i>fetales Kälberserum</i>
fgf4.....	<i>Fibroblast growth factor 4, Wachstumsfaktor</i>
FITC .....	<i>Fluoresceinisothiocyanat</i>
FSC-A.....	<i>forward scatter - area</i>

---

GMEM.....	<i>Glasgow Minimum Essential Medium</i>
GSK3.....	<i>Glykogen Synthase Kinase-3</i>
hEGF.....	<i>human epidermal growth factor</i>
hoxa2 .....	<i>Homeobox protein Hox-A2, Transkriptionsfaktor</i>
HRP .....	<i>horseradish peroxidase</i>
IκB .....	<i>Inhibitor von NFκB</i>
iNSC.....	<i>induzierte neurale Stammzellen</i>
ipNPC/ipNP-Zellen .....	<i>induzierte pan neurale Progenitorzellen</i>
ipS-Zellen .....	<i>induzierte pluripotente Stammzellen</i>
JAK2 .....	<i>Janus Kinase 2</i>
kDa .....	<i>Kilodalton</i>
Klf4 .....	<i>krüppel-like factor 4, Transkriptionsfaktor</i>
MAPK .....	<i>mitogenaktivierte Protein-Kinase</i>
MEF .....	<i>murine embryonale Fibroblasten</i>
MEK.....	<i>Kinase der mitogenaktivierenden Protein-Kinase</i>
mM.....	<i>Millimolar</i>
mNSC .....	<i>murine neurale Stammzellen</i>
MTT.....	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid</i>
NADH .....	<i>reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid</i>
NADPH .....	<i>reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat</i>
nanog.....	<i>ist ein Transkriptionsfaktor für embryonale Stammzellen</i>
NB-Medium .....	<i>Neurobasal-Medium</i>
NFκB.....	<i>Nuklearfaktor-kappa-B</i>
NHS .....	<i>normales Pferde-Serum</i>
nm.....	<i>Nanometer</i>
NPC .....	<i>neurale Progenitorzellen</i>
NSC.....	<i>neurale Stammzellen</i>
Oct4 .....	<i>octamer binding transcription factor 4, Transkriptionsfaktor</i>
Otx1 .....	<i>Orthodenticle Homeobox 1, Transkriptionsfaktor</i>
PBS .....	<i>phosphatgepufferte Salzlösung</i>

---

pERK.....	<i>phosphorylated extracellular signal-regulated kinase</i>
PFA.....	<i>Paraformaldehyd</i>
PI3k.....	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>
PIP3.....	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat</i>
PKB.....	<i>Protein Kinase-B</i>
pMAPK.....	<i>phosphorylierte mitogenaktivierte Protein-Kinase</i>
pNPC.....	<i>pan neurale Progenitorzellen</i>
pSTAT5.....	<i>phosphorlated Signal Transducers and Activators of Transkription factor 5</i>
Raf1.....	<i>v-Raf1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog-1</i>
Ras.....	<i>Ras Oncogene Homolog</i>
rcf.....	<i>relative centrifugal force</i>
rex1.....	<i>(Zfp-42) ist ein Marker für die Pluripotenz</i>
RNA.....	<i>Ribonukleinsäure</i>
rpm.....	<i>revolutions per minute</i>
RT.....	<i>Raumtemperatur</i>
RT-PCR.....	<i>reverse Transkriptase - Polykettenreaktion</i>
SHC.....	<i>Src Homology-2 Domain Containing Transforming Protein</i>
Sox2.....	<i>sex determining region Y (SRY)- box , Transkriptionsfaktor</i>
Src.....	<i>v-Src Avian-Sarcoma Viral Oncogene</i>
β-actin.....	<i>ACTB/ACTB, beta-Aktin</i>
SSC-A.....	<i>side scatter - area</i>
STAT5.....	<i>Signal Transducers and Activators of Transkription factor 5</i>
TBS.....	<i>Tris gepufferte Salzlösung</i>
TBST.....	<i>Tris gepufferte Salzlösung und Tween 20</i>
TEMED.....	<i>Tetramethylethylenediamin</i>
ZNS.....	<i>zentrales Nervensystem</i>

# I) Einleitung

---

## 1. Erzeugung der induzierten pluripotenten Stammzellen

In den letzten Jahren ist die Bedeutung von embryonalen Stammzellen in der Stammzellforschung stetig gestiegen (Solter 2006) und damit auch das Interesse an *induzierten pluripotenten Stammzellen* (ipS-Zellen) (Zaehres, Kim et al. 2010). 2012 erhielten Sir John B. Gurdon und Shinya Yamanaka den Nobelpreis in Physiologie für ihr Verfahren zur Erzeugung von pluripotenten Stammzellen aus ausgereiften Zellen.

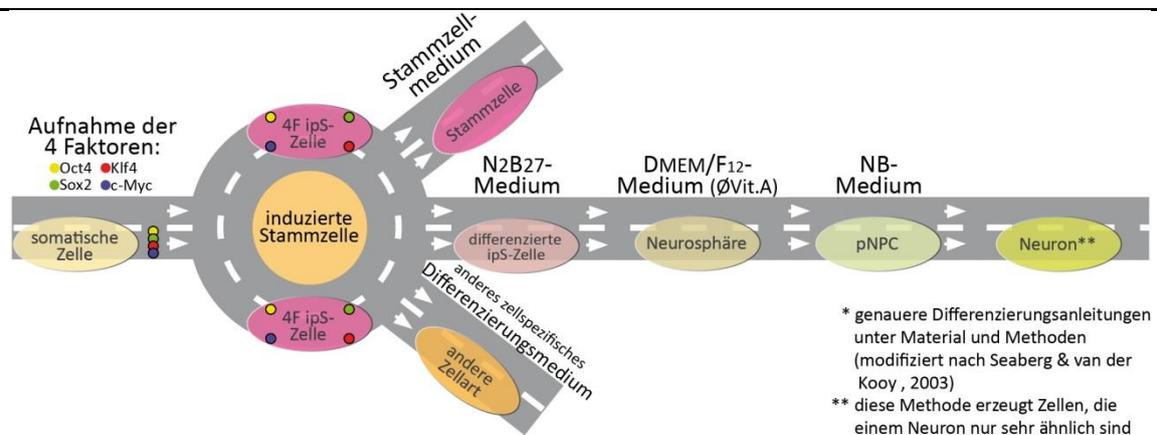
IpS-Zellen besitzen ebenso wie *embryonale Stammzellen* (ESC) die Fähigkeit, sich in Zelltypen aller drei Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm zu differenzieren. Dazu werden somatische Zellen epigenetisch durch die künstliche Expression bestimmter Gene reprogrammiert. Thier, Wörsdörfer et al. (2012) zeigten, dass *induzierte neurale Stammzellen* (iNSC), die sie aus murinen Fibroblasten erzeugten, morphologisch und genetisch eine sehr hohe Ähnlichkeit zu natürlichen *neuralem Stammzellen* (NSC) aufweisen. Ein großes Ziel der Stammzellforschung mit ipS-Zellen ist den Prozess der Induktion von pluripotenten Stammzellen besser verstehen und kontrollieren zu können. Ein noch ungelöstes Problem ist, dass die Zellen nach der Transplantation *in vivo* unerwünscht proliferieren. Dieser Effekt ist so stark, dass eine Teratogenität von den implantierten Zellen ausgehen kann (Yu, Vodyanik et al. 2007). Zusätzlich gelingt das Anwachsen und die Integration im *zentralen Nervensystem* (ZNS) bisher nur unzureichend (Hu, Weick et al. 2010). Weitere Probleme werden im Verlauf dieser Arbeit beschrieben.

## 2. Erzeugung der 4-Faktor induzierten pluripotenten Stammzellen

Seit der Etablierung des Zellreprogrammierungsverfahrens, welches von Takahashi und Yamanaka (2006) entwickelt wurde, konnte das Verfahren zur Erzeugung induzierter pluripotenter Stammzellen ständig erweitert werden. Zu Beginn des experimentellen Teils dieser Arbeit im Jahr 2010 galt das Verfahren von Kim, Zaehres et al. (2009) für

murine Zellkulturen als etabliert. Die Arbeitsgruppe um Kim erzeugte durch die artifizielle Transkription der vier Gene *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, und *c-Myc* eine Reprogrammierung der Zellen und damit die *4-Faktor induzierten pluripotenten Stammzellen* (4F ipS-Zellen oder nur ipS-Zellen). Die Funktionen und das Vorkommen der vier Gene lassen sich aus Tabelle 1 entnehmen. Durch das Verfahren der Reprogrammierung können beispielsweise adulte Fibroblasten oder auch neuronale Stammzellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen verändert werden. Diese Zellen können anschließend durch die Zugabe von Nährmedien und Wachstumsfaktoren zu jeder Zellart weiter differenziert werden. In Abbildung 1 ist die Entwicklung einer somatischen Zelle zum Neuron schematisch dargestellt. Auf die Funktionen der einzelnen Medien, die für die Differenzierung und das Wachstum der Zellen von höchster Bedeutung sind, wird im Verlauf der Arbeit eingegangen. Wie diese Zellen in den Phasen der Differenzierung phänotypisch aussehen, zeigt Abbildung 3.

Abbildung 1: Differenzierungsschema der 4F ipS-Zellen\*



IpS-Zellen konnten bereits in pseudoschwangere Mäuse implantiert und in Folge genetisch identische Mäuse erzeugt werden (Kang, Wang et al. 2009). Diese Experimente verdeutlichen, wie sehr ipS-Zellen an das Potential der ESC herankommen. Eine Schwangerschaft aus humanen ipS-Zellen ist derzeit jedoch weder technisch möglich noch ethisch vertretbar (Feng, Lu et al. 2010).

Kim, Schöler et al. (2009) berichten, dass ipS-Zellen schneller heranreifen und insgesamt auch höhere Zellzahlen gewonnen werden können, wenn anstelle von *murinen embryonalen Fibroblasten* (MEF) NSC verwendet werden (3,5% bei NSC zu 0,5% bei MEF). Aus diesem Grund wurden für die Versuche im Rahmen dieser Dissertation murine NSC verwendet.

Als die experimentelle Phase begann, waren folgende vier Möglichkeiten bekannt, induzierte Stammzellen zu erzeugen: Die Erzeugung mittels Viren, *Desoxyribonukleinsäure* (DNA), *Ribonukleinsäure* (RNA) und Proteinen. Zu letzterer gehört die Methode der Erzeugung von induzierten Stammzellen durch Sendaiviren (Fusaki, Ban et al. 2009) und den Plasmiden (Okita, Hong et al. 2010). Für die RNA-Methoden haben sich Adenoviren (Stadtfeld, Nagaya et al. 2008) und synthetische RNA (Warren, Manos et al. 2010) bewährt. Die Zellreprogrammierung konnte ebenso durch die Nutzung von Proteinen (Kim, Kim et al. 2009) und sogenannten *small-molecules* (Huangfu, Maehr et al. 2008) erreicht werden. Auch eine direkte Reprogrammierung von murinen Fibroblasten zu neuronalen Zellen ist, ohne die Zwischenstufe einer stammzellartigen Vorstufe, nach Vierbuchen, Ostermeier et al. (2010) möglich. Im Jahre 2015 ist die Methode der vier Faktoren noch immer ein etabliertes Verfahren, welches weiterhin verwendet und modifiziert wird (Vidal, Stadtfeld et al. 2015).

Tabelle 1: Effekte der Gene der 4F ipS-Zellen; Tabelle modifiziert nach (Yamanaka 2007)

Gen	Onkogen	Funktion/Vorkommen	Knockout Embryos
<b>Oct4</b>	ja (Monk und Holding 2001)	Pluripotenzität (Abate-Shen 2003) Zellselbsterneuerung (Niwa, Miyazaki et al. 2000)	kein Epiblast (Nichols, Zevnik et al. 1998)
<b>Sox2</b>	ja (Bass, Watanabe et al. 2009)	Entwicklung von Auge und Gehirn (Pevny und Nicolis 2010)	kein Epiblast (Avilion, Nicolis et al. 2003)
<b>Klf4</b>	abhängig von p53 und p21 (Rowland, Bernards et al. 2005)	Haut, Darm, Auge, Lymphe (Pearson, Fleetwood et al. 2008)	normales Epiblast (Katz, Perreault et al. 2002)
<b>c-Myc</b>	ja (Adams, Harris et al. 1984)	verstärkt andere aktivierte Gene (Nie, Hu et al. 2012)	normales Epiblast (Davis, Wims et al. 1993)

### 3. Schwachstellen der ipS-Zellen

Die ipS-Zellen sind ESC sehr ähnlich und haben dasselbe Hauptproblem. Sie neigen zur undifferenzierten Proliferationen und damit zur Teratombildung (Li, Christophersen et al. 2008). Je nach Art der Erzeugung der ipS-Zellen ergeben sich im Verlauf weitere Probleme, wie beispielsweise ein erhöhtes Tumorrisiko. Dies ist der Fall bei der Induktion von Zellen, die mittels viraler Vektoren erzeugt werden. Diese Art ist mit Abstand die effektivste Art der Induktion. Allerdings behalten die somit gewonnen Zellen die virale DNA für lange Zeit, wodurch das Tumorrisiko zusätzlich erhöht wird (Okita und Yamanaka 2011). Verschiedene künstlich exprimierte Gene, die zur Herstellung der induzierten Stammzellen verwendet werden, wie beispielsweise das Onkogen *c-Myc*, können ebenfalls an einer Tumorentstehung beteiligt sein (Okita, Ichisaka et al. 2007). Das Tumorrisiko ist auch abhängig davon, aus welcher Zellart die ipS-Zellen erzeugt werden und wie hoch die Anzahl der undifferenzierten ipS-Zellen am Ende ist (Miura, Okada et al. 2009).

Andere Induktionsmethoden, beispielsweise via Plasmiden, sind meistens ineffektiv (<0,0002% Reprogrammierungserfolg; im Vergleich dazu 3,5% bei 4F ipS-Zellen aus NSC) und erzeugen somit nur eine sehr geringe Anzahl reprogrammierter Zellen (Okita und Yamanaka 2011).

#### 4. NSC, NPC, pNPC und ipNPC

NSC besitzen im Gegensatz zu ESC nicht mehr die Eigenschaft, sich in alle Zelltypen der drei Keimblätter differenzieren zu können, sondern nur noch in Zelltypen des Ektoderms. Sie können also nur noch weitere NSC-Tochterzellen, Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten bilden (Seaberg und van der Kooy 2003).

Der Unterschied zwischen den NSC und den *neuralen Progenitorzellen* (NPC) ist, dass die Teilungsrate der NPC im Gegensatz zur Teilungsrate der NSC limitiert ist. Die NPC können zwar verschiedene Zelltypen des Ektoderms bilden, allerdings entwickeln sich die NPC im Verlauf entweder zu neuronalen oder glialen Progenitorzellen (Gage 2000).

Die *pan neuralen Progenitorzellen* (pNPC) sind den NPC sehr ähnlich, allerdings werden die pNPC artifiziell aus ipS-Zellen oder anderen pluripotenten Zellen erzeugt (Choi, Kim et al. 2014). Diese pNPC haben prinzipiell die gleichen Eigenschaften wie die NPC und können dementsprechend wie die NPC durch *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) und *human Epidermal Growth Factor* (hEGF) zu neuronalen Zellen differenziert werden (Lee, Lam et al. 2011). In dieser Arbeit wurden die pNPC ausschließlich aus ipS-Zellen gewonnen und werden daher auch als *induzierte pan neurale Progenitorzellen* (ipNPC) bezeichnet. Durch die Passagierung dieser Zellen ist es möglich, diese weiter zu spezialisieren und sie so von ihrer epigenetischen Herkunft zu entfernen (Polo, Liu et al. 2010). Dadurch lässt sich auch die Proliferation weiter einschränken. Die pNPC werden auch als sekundäre pNPC bezeichnet und daher mit P2 pNPC abgekürzt.

#### 5. Erythropoetin

Das Wort Erythropoetin setzt sich aus den griechischen Begriffen *έρυθρός* (erythros – rot) und *ποιεῖν* (poiein – machen) zusammen. Es handelt sich hierbei um ein Glykoprotein, welches im Organismus zum größten Teil in den Nieren erzeugt wird und das ein sehr wichtiges Hormon für die Erythropese darstellt (Jelkmann 2004).

Die Bedeutung von *Erythropoetin* (EPO) hat in den letzten Jahrzehnten zugenommen, da nachgewiesen werden konnte, dass EPO nicht nur für die Erythropese ein essentieller Faktor ist, sondern auch in diversen anderen Organen eine zentrale Rolle

spielt (Jelkmann 2004). Ein Meilenstein dabei war die Beobachtung der Wirkung, die EPO auf das Gehirn hat. Grimm, Stockenhuber et al. (1990) entdeckten den Zusammenhang, dass nierenkranke Patienten unter ständiger EPO-Zufuhr, welches sie zur Therapie der Anämie erhielten, eine verbesserte kognitive Funktion entwickelten. Aber auch auf andere Zellen hat EPO eine nachweisbare Funktion. So werden durch EPO beispielsweise Myoblasten vermehrt stimuliert (Ogilvie, Yu et al. 2000) und die Funktion des Immunsystems gesteigert (Katz, Gil et al. 2007). Mitte der 90er Jahre konnte erstmals belegt werden, dass EPO im murinen ZNS eine zytoprotektive Funktion hat (Digicaylioglu, Bichet et al. 1995) und dass die Expression von EPO im Hirngewebe während der Entwicklung des menschlichen ZNS (Li, Juul et al. 1996) hochreguliert wird. Masuda, Okano et al. (1994) zeigten, dass das murine Gehirn in Astrozyten eigenständig EPO produziert. Dabei ist die Passage von EPO durch die Bluthirnschranke von sekundärer Bedeutung, da sie nur langsam erfolgt (Banks, Jumbe et al. 2004). Die Konzentration von EPO im embryonalen Gehirn nimmt während der Gehirnentwicklung im murinen (Yu, Shacka et al. 2002), als auch im humanen Gehirn (Dame, Bartmann et al. 2000) zu. Gleichzeitig nimmt die Dichte der EPO-Rezeptoren mit zunehmender Entwicklung ab (Liu, Chin et al. 1994). Auch nach Abschluss der Gehirnentwicklung des ZNS ist EPO ein neurotropher Faktor (Chikuma, Masuda et al. 2000), der ein ähnliches Potential wie bFGF auf NPC hat (Chen, Asavaritikrai et al. 2007). Ebenso beeinflusst EPO die Produktion von NPC aus NSC *in vitro* als auch *in vivo* als intrinsischer Hypoxie-induzierter Faktor (Shingo, Sorokan et al. 2001). Yazihan, Uzuner et al. (2008) wiesen später die immunhistochemische Existenz von EPO-Rezeptoren auf NSC nach.

*In vivo* hat EPO dabei eine dreifach neuroprotektive Wirkweise und schützt neuronal durch anti-apoptotische Wirkung (Sirén, Fratelli et al. 2001), endothelial mit Steigerung der Durchblutung durch Gefäßrelaxation und Angiogenese sowie immunologisch durch eine anti-inflammatorische Komponente (Alnaeeli, Wang et al. 2012). Der anti-apoptotische Effekt wirkt dabei auch auf gliale Zellen (Yamada, Burke et al. 2011).

Diese neuroprotektive Wirkung zeigt sich bei Schäden, die durch Ischämien verursacht wurden. Denn die neuronalen Schäden waren milder, wenn das Versuchstier mit EPO

behandelt wurde. Dabei konnte vor allem eine Verbesserung der auditiven Verarbeitung (Spandou, Papadopoulou et al. 2005) sowie der Sensomotorik (McClure, Threlkeld et al. 2007) unter EPO im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. EPO hat trotz der beschriebenen positiven Wirkungen jedoch ebenso dosisabhängige Nebenwirkungen. Bei *in vitro* Versuchen beobachteten Ehrenreich, Hasselblatt et al. (2005) bei zu hoher Dosierung ein erhöhtes Zellsterben. *In vivo* Experimente zeigten zusätzlich, dass EPO venöse Thrombembolien (Henke, Laszig et al. 2003) und das Wachstum bestimmter Tumoren (Bennett, Silver et al. 2008) fördern kann.

Die Forschungsfrage, ob die Effekte von EPO auch bei Verwendung von induzierten Stammzellen auftreten, wurde bisher in der Fachliteratur nur unzureichend beantwortet. Um die Wirkung von EPO auf ipS-Zellen zu untersuchen, wurden in der Zeit von April 2010 bis Februar 2012 im Institut der experimentellen Neurochirurgie der Universität Würzburg Zellversuche durchgeführt. Diese Versuche sowie deren Ergebnisse sind Inhalt dieser Arbeit.

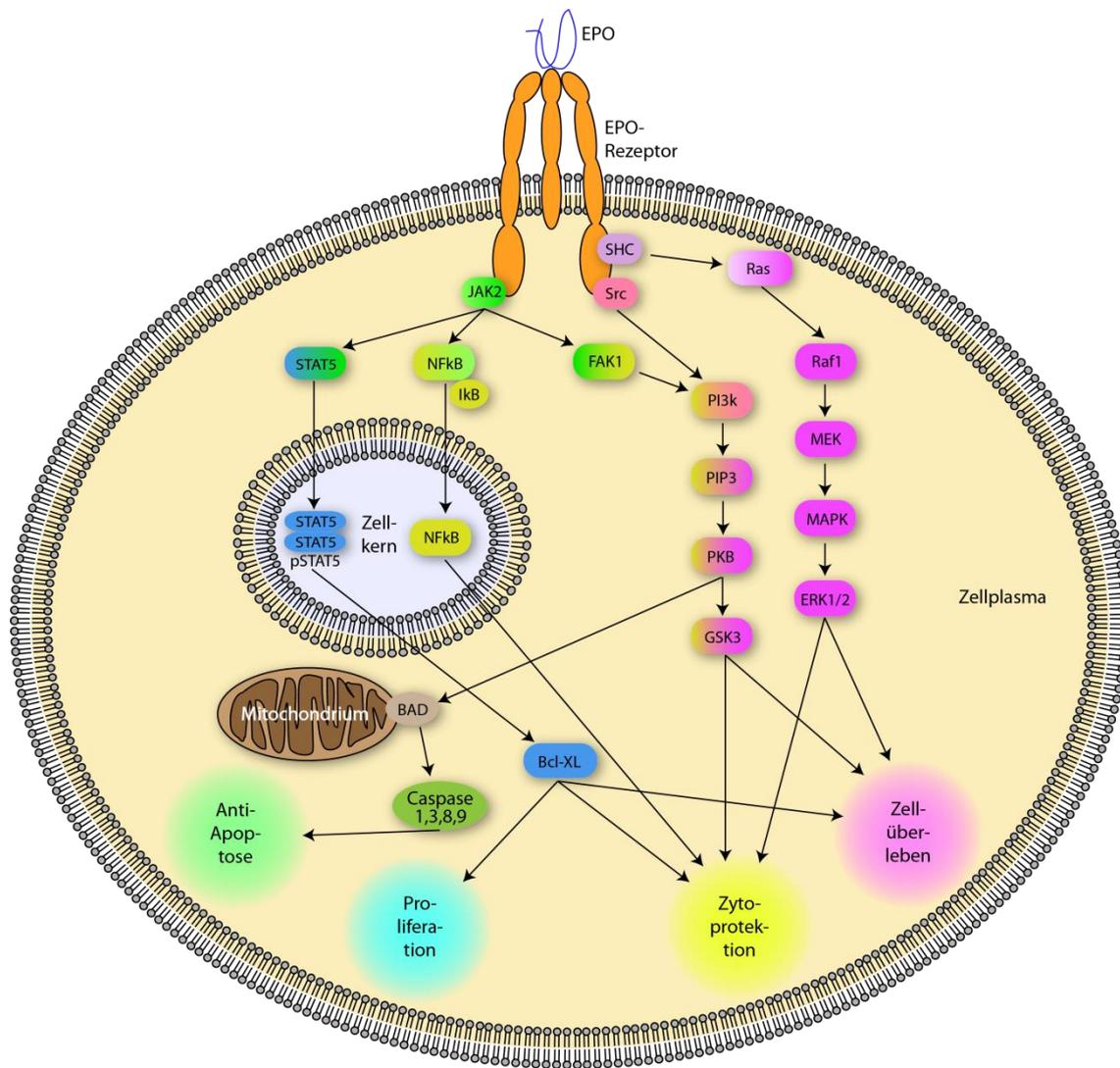
## **6. Wirkungsmechanismus von EPO in neuronalen Zellen**

EPO hat auf NSC, wie bereits Robert und Christensena (2001) sowie Sirén und Ehrenreich (2001) aufzeigten, neben der Förderung der neuronalen Differenzierung auch einen neuroprotektiven und neurotrophen Einfluss.

Wie EPO auf zellulärer Ebene wirkt, zeigt in vereinfachter Darstellung Abbildung 2. Zur besseren Übersicht werden dabei für aktivierende und hemmende Prozesse gleiche Pfeile verwendet. Gezeigt werden vier verschiedene miteinander interagierende Signalwege, die die Anti-Apoptose, Proliferation, Zytoprotektion und das Zellüberleben fördern.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wirkung von EPO auf eine neurale Zelle

modifiziert nach (Brines und Cerami 2005) und (QIAGEN)



Nachdem ein EPO-Protein an den Rezeptor angedockt hat, wird die *Janus Kinase 2* (JAK2), das *Src Homology-2 Domain Containing Transforming Protein* (SHC) und das *v-Src Avian-Sarcoma Viral Oncogene* (Src) aktiviert.

Die JAK2 phosphoryliert den *Signal Transducers and Activators of Transkription factor 5* (STAT5), der sich mit zwei *phosphorylated Signal Transducers and Activators of Transkription factor 5* (pSTAT5) homodimerisiert, im Kern transloziert und dann EPO abhängige Gene aktiviert. Diese *Bcl2 Related Protein Long Isoform* (Bcl-XL) fördern die Proliferation, die Zytoprotektion und das Zellüberleben.

Ebenso aktiviert JAK2 über die *Focal Adhesion Kinase-1* (FAK1) die *Phosphoinositid-3-Kinase* (PI3k), woraus durch Phosphorylierung die *Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat* (PIP3) entsteht, welche dann wiederum die *Protein Kinase-B* (PKB) phosphoryliert. Das inhibiert zum einen *Bcl2-Antagonist of Cell Death* (BAD) und die Caspasen 1,3,8,9, wodurch pro-apoptotische Gene inhibiert werden. Zum anderen aktiviert PKB die *Glykogen Synthase Kinase-3* (GSK3), welche das Zellüberleben und die Zytoprotektion unterstützt.

Das SHC aktiviert das *Ras Oncogene Homolog* (Ras), welches wiederum das *v-Raf1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog-1* (Raf1) aktiviert. Das phosphoryliert dann die *Kinase der mitogenaktivierenden Protein-Kinase* (MEK), wodurch die *mitogenaktivierte Protein-Kinase* (MAPK) und anschließend die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1/2 aktiviert werden. Dies führt dann ebenfalls zu einem zur verbesserten Zytoprotektion und zum anderen zum erhöhten Zellüberleben.

Die Zytoprotektion wird ebenso durch die Reaktion zwischen der JAK2 und dem *Nuklearfaktor-kappa-B* (NFkB) hervorgerufen, wodurch der *Inhibitor von NFkB* (Ikb) von NFkB abgespalten und dadurch im Zellkern transloziert werden kann.

## 7. Zielsetzung und experimentelle Strategien

Induzierte pluripotente Stammzellen ermöglichen durch die Reprogrammierung einen grundsätzlich neuen Ansatz in der Herstellung patientenspezifischer Zellen. Da sich ipS-Zellen effizient aus diversen Zelltypen erzeugen lassen, liegen bisher nur wenige Daten zur Funktion von ipS-Zellen aus abgeleiteten neuronalen Progenitorzellen vor. Das Ziel dieser Arbeit war die Wirkung von EPO auf Zellüberleben, Proliferation und neuronale Differenzierung in *induzierten pan neuronalen Progenitorzellen* (ipNPC), die aus ipS-Zellen differenziert wurden, zu charakterisieren. Hierbei wurden murine 4-Faktor ipS-Zellen expandiert und in einem mehrschrittigen Protokoll über *induzierte pan neurale Progenitorzellen* (4F ipNPC) zu Neuronen differenziert. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung der *in vitro*-Effekte. Denn erst wenn diese beherrschbar sind, kann in weiteren Experimenten und mit verbessertem Grundlagenwissen *in vivo* geforscht

werden. In den *in vitro*-Experimenten wurden dazu die beiden Kulturformen, Neurosphärenkultur und ausplattierte Monolayer-Zellkultur, untersucht. Als Sphären wurden dabei all die Zellen bezeichnet, die sich in einem kugelförmigen Zellhaufen befanden. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu maximieren wurden alle Experimente mit zwei unterschiedlichen 4F ipNP-Zellklonen durchgeführt, die nachfolgend als Klon A und Klon B bezeichnet werden.

Als erstes wurde analysiert, ob durch EPO die *Zellviabilität* der ausplattierten ipNP-Zellen *in vitro* verbessern kann. Dazu wurde die Zellviabilität nach der Behandlung mit steigenden EPO-Konzentrationen mittels eines MTT-Versuchs über einen definierten Zeitraum von 24 und 48 Stunden ermittelt.

Der Einfluss von EPO auf die Proliferation der Zellen wurde mittels Neurosphären aus differenzierten ipNP-Zellen untersucht. Dabei wuchsen die Neurosphären in Zellkulturflaschen, die nach sechs Tagen fotografisch dokumentiert und in einer abschließenden Auswertung nach Größe und Aussehen sortiert wurden. Dazu wurden ebenfalls verschiedene EPO-Konzentrationen sowie eine Kontrollgruppe zum Vergleich eingesetzt.

Die weitere neuronale Differenzierung in der Monolayer-Kultur wurde durch den *Zellfortsatz-Versuch* beobachtet. Dabei wurden die Länge, die Position und die Anzahl der einzelnen Fortsätze nach Behandlung mit EPO erfasst.

Damit nachgewiesen werden konnte, dass EPO die Proliferation der Zellen verringerte, wurde eine *Durchflusszytometrie (FACS)* durchgeführt. Damit ließ sich ein quantitativer Wert ermitteln, der nach dem Markieren der DNA zeigt, um welchen Faktor die Zellteilung unter dem Einfluss von EPO reduziert werden konnte.

Der Nachweis, dass die Zellen direkt auf EPO reagieren, wurde durch einen *Western Blot* erbracht. Dieser zeigte, dass die 4F ipNP-Zellen einen funktionellen EPO-Rezeptor besitzen.

## II) Material und Methoden

---

Im folgenden Kapitel werden die Versuche und Methoden sowie die dazugehörigen Materialien näher erläutert.

### 1. Zellherkunft

Für die Arbeit wurden zwei 4-Faktor ipS-Zellklone von Prof. Hans Schöler und Dr. Holm Zaehres, Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin (Münster), verwendet. Die Zellen wurden aus murinen NSC mittels der Faktoren *Oct4*, *Klf4*, *C-Myc* und *Sox2* reprogrammiert. Diese ipS-Zellen wurden auf inaktivierten MEF kultiviert und alle zwei bis drei Tage passagiert. An jedem zweiten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Die Reaktion des Trypsin-EDTA zum Lösen von Zellverbindungen wurde dabei mit einem *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) abgestoppt, welches einen 10-prozentigen Anteil an *Fetal Calb Serum* (FCS) beinhaltete. DMEM ist ein standardisiertes Kulturmedium für humane und murine Zellen. Anschließend wurden die Zellen erneut mit *phosphatgepufferter Salzlösung* (PBS) gewaschen und ausgesät.

### 2. Ausplattierung der Zellen

Für die Ausplattierung wurden die 60mm-Zellkulturschalen zuerst mit 2,5ml 0,1-prozentiger Gelatinelösung zur adäquaten Zelladhäsion für mindestens 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die überbleibende Gelatinelösung abgenommen und die MEF-Feeder-freien ipS-Zellen mit einer Dichte von  $3-4 \times 10^5$  Zellen pro Schale direkt ausplattiert. Zum Anwachsen wurden die Platten mit dem *Glasgow Minimum Essential Medium* (GMEM)-ESC-Medium für 24 Stunden in den Inkubator gestellt. Dieses Medium begünstigt die Anzucht der ipS-Zellen.

### 3. Zelldifferenzierung

Zur Differenzierung wurden die ipS-Zellen nach 24 Stunden aus dem Inkubator genommen, das verbrauchte GMEM-ESC-Medium abgenommen und durch N2B27-Medium ersetzt. Dieses serumfreie Medium ermöglichte den ipS-Zellen eine optimale Differenzierung. Je nach Nährmedienverbrauch wurde es am nächsten Tag, spätestens aber nach zwei Tagen ersetzt. Der gleiche Schritt wurde am 3. Tag, beziehungsweise 4. Tag sowie am 5. und 6. Tag durchgeführt. Mit dem 6. Tag war die Zelldifferenzierung abgeschlossen. Diese Methode ist ein modifiziertes Verfahren nach Ying, Stavridis et al. (2003). Die Tage wurden in den folgenden Grafiken mit d1 für Englisch day 1 (1. Tag) abgekürzt.

### 4. Passagierung und Trituierung der Zellen

Die Passagierung erfolgte als wichtiger Schritt zur neuronalen Differenzierung der ipNP-Zellen. Die Trituierung ist der Vorgang, bei dem die Zellverbände gelöst und die Sphären in einzelne Zellen verkleinert werden. Dabei wurde bei der erstmaligen Passagierung die Zelllösung wieder in das ursprüngliche DMEM/F12-Medium ohne Vitamin A suspendiert. Dieses Medium enthielt im Gegensatz zum normalen DMEM-Medium einen geringeren Anteil an Serum und ermöglichte den Zellen ein Wachstum ohne hormonellen Einfluss oder anderen Wachstumsfaktoren. Dabei ist wichtig, dass das Medium kein Vitamin A enthält, da dies zu einer ungewollten Differenzierung führt. Bei der zweiten Passagierung wurden die Zellen, wie es Abbildung 3 zeigt, in das entsprechende Medium für den jeweiligen Versuch überführt.

Für die Trituierung wurden zunächst zwei Glaspipetten erhitzt und deren Lumen auf zwei unterschiedlich große Durchmesser verkleinert. Die Zellverbindungen wurden mit 500µl Accumax für fünf Minuten im Inkubator gelöst. Der Inkubator im Labor wies durchgehend folgende Parameter auf: 95% Luft gemischt mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C und eine Luftfeuchtigkeit von 90%. Danach wurde die Reaktion mit 1ml DMEM/F12-Nährmedium ohne Vitamin A abgestoppt. Anschließend wurde das Zellsuspensat erst in der Glaspipette mit dem größeren Durchmesser einige Male aufgenommen und

abgegeben; dieser Vorgang wurde daraufhin mit der kleineren Pipette wiederholt. Die kleinere der beiden Glaspipetten löste dabei durch die Aspiration weitere Zellverbände auf und vereinzelt so die Zellen. Die Zellsuspension wird abschließend in ein 15ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert.

## 5. Mediumwechsel

Der Mediumwechsel der Zellkulturschalen erfolgte, indem das verbrauchte Medium entfernt und das neue Medium auf die angewachsenen Zellen verteilt wurde. Der Verbrauch der Nährstoffe ist dann erkennbar, wenn der beinhaltete Indikator das Medium rötlich färbt. Zum Mediumwechsel wurden alle Puffer, Nährmedien sowie Trypsin und Accumax auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt.

In der 25cm<sup>2</sup>-Zellsuspensionsflasche wurden die Zellen in ein 15ml-Röhrchen überführt und bei 500 rpm zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde sodann abgenommen und das Zellpellet in eine neue Zellsuspensionsflasche gefüllt.

## 6. Neurosphärenkultur

Für die Neurosphärenkultur wurde das Medium von den Zellkulturplatten entfernt. Die Zellen wurden vorsichtig mit 5ml PBS gewaschen und mit 2ml Accumax von der Plattenoberfläche gelöst. Damit die Enzymlösung besser reagieren konnte, wurden die Platten abermals fünf Minuten inkubiert und anschließend zum Abstoppen der Reaktion 2ml DMEM/F12-Medium ohne Vitamin A zugeführt. Dann wurden die Zellen trituiert und das Zellpellet nach der Zentrifugation wieder in 1ml DMEM/F12-Medium ohne Vitamin A aufgenommen. Die Zentrifugation der Zellkultur erfolgte stets bei 90 rcf (Rotor Eppendorf A-4-44) für fünf Minuten bei Raumtemperatur.

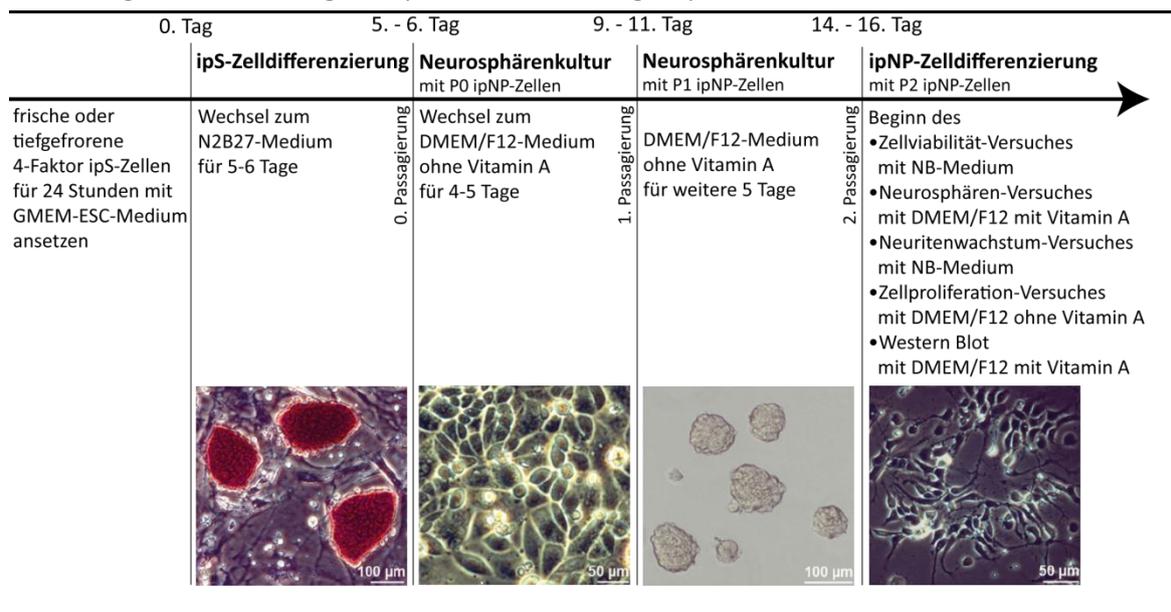
Nach der Trituierung erfolgte die Zellzahlbestimmung. Für die Zellzählungen diente das *Zeiss Axiovert 40 CFL* Mikroskop. Die Zellzahl wurde mithilfe der *3x3 Neubauer-Zählkammer* ermittelt. Dazu wurden 10µl Zelllösung mit einem Medium verdünnt und

10µl Trypan-Blue zugegeben. Davon wurden 10µl auf die *Neubauer-Zählkammer* gegeben und im Anschluss mit einem 24x24mm-Deckgläschen abgedeckt.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von je  $1-1,5 \times 10^6$  Zellen in eine 25cm<sup>2</sup>-Zellsuspensionskulturflasche überführt und inkubiert. Ein Mediumwechsel wurde nach 3 bis 4 Tagen durchgeführt. Die Passagierung erfolgte nach 4 bis 5 Tagen, wenn die Neurosphären groß genug und im Idealfall makroskopisch ersichtlich waren. Abschließend wurden erneut  $1,5 \times 10^6$  Neurosphären pro Zellkultursuspensionsflasche ausplattiert. Die Zellen erhielten, wie zuvor auch, jeden 3. bis 4. Tag neues Medium und wurden nach jedem 5. bis 6. Tag ein zweites Mal passagiert.

In Abbildung 3 ist die Differenzierung der ipS-Zellen zu ipNPC schematisch dargestellt. Die dort verwendeten Bilder stammen aus der Publikation (Offen, Flemming et al. 2013).

Abbildung 3: Zeitliche Abfolge der ipS-Zelldifferenzierung zu ipNPC



## 7. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Beim Einfrieren wurden die Neurosphären mit dem Nährmedium in ein 15ml-Röhrchen überführt, für fünf Minuten bei 500 rpm zentrifugiert und das Nährmedium entfernt. Anschließend wurde das Zellpellet in 1,325ml DMEM/F12-Medium ohne Vitamin A und

150µl FCS aufgenommen. Diese Lösung wurde auf drei Cryotubes mit jeweils 500µl pro Röhrchen aufgeteilt. Abschließend wurden in jedes Röhrchen noch 500µl DMEM/F12-Medium, 66µl FCS und 100µl *Dimethylsulfoxid* (DMSO) gefüllt. Die Röhrchen wurden in einer mit Isopropanol gefüllten Box bei -80°C eingefroren.

Zum Auftauen wurden die Röhrchen für eine Minute in das 37°C warme Wasserbad gestellt und die Zellsuspension in ein 15ml-Röhrchen mit 5ml DMEM/F12-Medium ohne Vitamin A überführt. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 500 rpm und die Abnahme des überstehenden Mediums. Danach wurden die Röhrchen mit 10ml DMEM/F12-Medium ohne Vitamin A gefüllt. Zusätzlich wurden die Wachstumsfaktoren hEGF und bFGF jeweils mit einer Endkonzentration von 20ng/ml zugefügt, der Inhalt in eine Zellkulturflasche umgefüllt und im Inkubator gelagert. Nach 3 bis 4 Tagen erfolgte ein erneuter Mediumwechsel und nach 5 bis 6 Tagen die Passagierung.

## 8. Labormaterialien

Im folgenden Abschnitt sind tabellarisch die verwendeten Geräte, Materialien und Medien aufgelistet. Tabelle 2 gibt dabei Aufschluss über die verwendeten Geräte, Tabelle 3 über den Zellkulturbedarf, Tabelle 4 über Reagenzien und Chemikalien für die Zellkultur und Tabelle 5 über Puffer und Lösungen. In Tabelle 6 ist die Zusammensetzung des murinen ESC-Medien und in Tabelle 7 die des GMEM ESC-Medien aufgelistet. Tabelle 8 gibt Aufschluss über das DMEM/F12-Medium für die ipS-Zelldifferenzierung, Tabelle 9 über die des DMEM/F12-Mediums ohne Vitamin A für pNPC, Tabelle 10 über die des Neurobasal-Mediums und Tabelle 11 über die des N2-Mediums. Tabelle 12 beschreibt die Zusammensetzung des N2B27-Mediums und Tabelle 13 listet verwendetes EPO sowie die verwendete Kontrollsubstanz auf.

Tabelle 2: Geräte

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss
Mikroskop	Axioplan 2	Zeiss
Inkubator	HERA cell 150	Thermo
Zentrifuge	5408 R	Eppendorf
Rotor	F45-30-11	Eppendorf
Rotor	A-4-44	Eppendorf

Tabelle 3: Zellkulturbedarf

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
Röhrchen, 15ml, PP, konisch	188261	Greiner Bio-One GmbH
Röhrchen, 50ml, PP, konisch	210261	Greiner Bio-One GmbH
4-Well-Zellkulturplatte	176740	Nunc
6-Well-Zellkulturplatte	140675	Nunc
24-Well-Zellkulturplatte	662160	Greiner Bio-One GmbH
96-Well-Zellkulturplatte	655185	Cellstar
60mm-Zellkulturschale	20060	SPL Lifesciences Inc.
60mm-Zellkulturschale	REF 353004	BD Falcon
25cm <sup>2</sup> -Zellsuspensionsflasche	690195	Cellstar
CryoTube	368632	Nunc
3x3 Neubauer-Zählkammer		Marienfeld
PP-Reaktionsgefäß 1,5ml mit Deckel	SAR72706	Sarstedt
PP-Reaktionsgefäß 2,0ml mit Deckel	SAR72695	Sarstedt

Tabelle 4: Reagenzien und Chemikalien für die Zellkultur

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
Accumax	A7089	Sigma-Aldrich
Trypan-Blue	T0887	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	L11-004	PAA Lab. GmbH
FCS	A11-208	PAA Lab. GmbH
PhosphoSafe Extraction Reagent	71296	Merck
Dimethylsulfoxid - DMSO	D4540	Sigma-Aldrich

Tabelle 5: Puffer und Lösungen, steril gefiltert oder autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert

Produkt	Volumen	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
<b>PBS</b>	1l	1 Beutel	P3813-10PAK	Sigma-Aldrich
<b>Poly-D-Lysine</b>	1l	1 Beutel	P6407	Sigma-Aldrich
<b>Gelatinelösung (0,1%)</b>	in 500ml PBS	500mg Gelatine	G9382	Sigma-Aldrich

Tabelle 6: Murines ESC-Medium (638ml)

Produkt	Volumen	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
<b>DMEM High Glucose (4,5g/l)</b>	500ml	1,7g/l	E15-843	PAA Lab. GmbH
<b>Foetal Bovine Serum, ES cell tested</b>	94ml	15%	A11-208	PAA Lab. GmbH
<b>LIF-conditioned Medium</b>	0,625ml	-	-	AG Müller
<b>nicht essentielle Aminosäuren</b>	6,25ml	1x	M11-003	PAA Lab. GmbH
<b>Penicillin (10.000U/ml)</b>	1ml	1x	P11-010	PAA Lab. GmbH
<b>Streptomycin (10mg/ml)</b>	1ml	1x		
<b>Natriumpyruvat (100mM)</b>	1ml	1mM	S11-003	PAA Lab. GmbH
<b>L-Glutamine (200mM)</b>	1ml	2mM	M11-004	PAA Lab. GmbH
<b>Beta-Mercaptoethanol (14,3M)</b>	6,25ml	0,1mM		
<b>(7µL β-Merc. in 10ml Hapes)</b>	(gefiltert)	10mM	M7522	Sigma-Aldrich

Tabelle 7: GMEM ESC-Medium (500ml)

Produkt	Volumen	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
<b>Glasgow MEM (G-MEM; BHK-21)</b>	435ml		21710-025	Invitrogen
<b>Foetal Bovine Serum, ES cell tested</b>	50ml	10%	A11-208	PAA Lab. GmbH
<b>LIF-conditioned Medium</b>	0,5ml	-	-	AG Müller
<b>L-Glutamine (200mM)</b>	1ml	2mM	M11-004	PAA Lab. GmbH
<b>Penicillin (10.000U/ml)</b>	1ml	1x	P11-010	PAA Lab. GmbH
<b>Streptomycin (10mg/ml)</b>				
<b>Beta-Mercaptoethanol (14,3M)</b>	5ml	0,1mM	M7522	Sigma-Aldrich
<b>(7µL β-Merc. in 10ml Hapes)</b>	(gefiltert)	10mM		

Tabelle 8: DMEM/F12-Medium für die ipS-Zelldifferenzierung (100ml)

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
<b>DMEM/F12</b>	6,2ml	-	21331-020	Invitrogen
<b>Insulin (5mg/ml)</b>	0,5ml	25µg/ml	16634	Sigma-Aldrich
<b>Progesteron (20µM)</b>	95µl	6ng/ml	P8783	Sigma-Aldrich
<b>Putrescine (0,1M)</b>	0,1ml	16µg/ml	P5780	Sigma-Aldrich
<b>Natriumselenit</b>	6µl	30nM	S5261	Sigma-Aldrich
<b>Der obere Teil wurde steril gefiltert und in einer separaten Flasche gekühlt aufbewahrt.</b>				
<b>DMEM/F12</b>	90ml	-	21331-020	Invitrogen
<b>humanes Transferrin</b>	1ml	100µg/ml	T8158	Sigma-Aldrich
<b>BSA (50mg/ml)</b>	0,1ml	50µg/ml	A4503-100G	Sigma-Aldrich
<b>Penicillin (10.000U/ml)</b>	1ml	10ml/l	P11-010	PAA Lab. GmbH
<b>Streptomycin (10mg/ml)</b>				
<b>L-Glutamine (200mM)</b>	1ml	2mM	M11-004	PAA Lab. GmbH

Tabelle 9: DMEM/F12-Medium ohne Vitamin A für pNPC (100ml)

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
<b>D-MEM/F12 (+2,5mM L-Glutamine, +15mM HEPES)</b>	94,06ml	-	31330-038	Invitrogen
<b>Natriumbikarbonat (7,5%)</b>	2,94ml	0,22%	25080-060	Invitrogen
<b>Glucose</b>	0,6g	0,6%	G-6152	Sigma-Aldrich
<b>Penicillin (10.000U/ml)</b>	1ml	10ml/l	P11-010	PAA Lab. GmbH
<b>Streptomycin (10mg/ml)</b>				
<b>B27 (50x) ohne Vitamin A</b>	2ml	2%	12587-010	Invitrogen
<b>bFGF</b>	100µg/ml	20ng/ml	100-18B	PeptoTech
<b>hEGF</b>	100µg/ml	20ng/ml	AF-100-15	PeptoTech

Tabelle 10: Neurobasal-Medium (100ml)

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
<b>Neurobasal-Medium</b>	96ml	-	21103-049	Invitrogen
<b>L-Glutamin (200mM)</b>	1ml	2mM	M11-004	PAA Lab. GmbH
<b>Penicillin (10.000U/ml)</b>	1ml	10ml/l	P11-010	PAA Lab. GmbH
<b>Streptomycin (10mg/ml)</b>				
<b>B27 (50x)</b>	2ml	2%	17504-044	Invitrogen

Tabelle 11: N2-Medium (100ml)

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
<b>DMEM /F12-Medium</b>	96,6ml	-	21331-020	Invitrogen
<b>N2-Supplement</b>	1ml	-	17502-048	Invitrogen
<b>Insulin (5mg/ml)</b>	0,4ml	20µg/ml	I6634	Sigma-Aldrich
<b>BSA (300mg/ml)</b>	16,7µl	50µg/ml	A4503-100G	Sigma-Aldrich
<b>L-Glutamine (200mM)</b>	1ml	2mM	M11-004	PAA Lab. GmbH
<b>Penicillin (10.000U/ml)</b>	1ml	10ml/l	P11-010	PAA Lab. GmbH
<b>Streptomycin (10mg/ml)</b>				

Tabelle 12: N2B27-Medium (100ml)

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
Neurobasal-Medium	50ml	-	-	s. Tabelle 10
N2-Medium	50ml	-	-	s. Tabelle 11

Tabelle 13: EPO und Kontrollsubstanz

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
Epoetin beta - NeoRecormon Multidose® 50.000 I.U. in 10ml	PZN: 07429120	Roche Pharma
Kontrollsubstanz (Lösungsmittel von EPO)		Apotheke des Uniklinikums Göttingen

## 9. Einfluss von EPO auf die Zellviabilität

Die Zellviabilität der ipNP-Zellen wurde mittels des MTT-Versuchs untersucht. Um einen Überblick über die Wirkung von EPO zu gewinnen, wurde die angewendete EPO-Dosis jeweils im dekadischen Logarithmus erhöht. So ergaben sich EPO-Konzentrationen von 0,1 U/ml, 1 U/ml und 10 U/ml für die Versuchsreihen neben der Placebogruppe.

Vorbereitend zum MTT-Versuch wurden die Deckgläser der 24-Well-Platte mit je 400µl *Poly-D-Lysine* (PDL) unter der Sterilbank bedeckt und für eine Stunde in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde das PDL abgenommen und die Deckgläser einmalig mit 500µl autoklaviertem destillierten Wasser gespült sowie zum Trocknen für eine weitere Stunde unter der Sterilbank belassen. Auf die Deckgläser wurden je 50.000 in 50µl Medium gelöste Zellen pro Kammer (Well) aufgetragen. Zum Anwachsen wurden die Platten für 20 Minuten in den Inkubator gestellt. Anschließend wird auf jedes Deckgläschen 350µl normales Neurobasal-Medium (siehe Tabelle 10) gegeben, sowie 400µl Neurobasal-Medium mit der entsprechenden Kontroll- oder EPO-Konzentration (siehe Abbildung 4). Nach 24 und nach 48 Stunden wurden die Stoffwechselaktivitäten für beide Klone jeweils via MTT-Versuch bestimmt.

Ausgewertet wurden die vom MTT-Versuch gefärbten Platten im *Titertek Multiskan Plus MKII* und mithilfe eines einem 570nm Fotolichtfilter.

Abbildung 4: Aufbau des MTT-Versuchs

	Kontroll- und EPO-Konzentrationen						
Kontrolle							Kontrolle: 40µl PBS --> davon 40µl / 10ml
EPO 0,1 U/ml							EPO 0,1 U/ml: 10µl Epoetin beta + 990µl PBS --> davon 40µl / 10ml
EPO 1 U/ml							EPO 1 U/ml: 10µl Epoetin beta + 90µl PBS --> davon 40µl / 10ml
EPO 10 U/ml							EPO 10 U/ml: 40µl Epoetin beta --> davon 40µl / 10ml

## 10. Einfluss von EPO auf die Neurosphären

Um die Auswirkung von EPO auf das Neurosphärenwachstum der ipNP-Zellen zu analysieren, wurde der folgende Neurosphären-Versuch durchgeführt. Zu Beginn wurden 75µl DMEM/F12-Medium mit Vitamin A auf jedes für den Versuch verwendete Well der 96-Well-Platte gegeben. Danach wurden die Zellen auf 100.000 Zellen/ml verdünnt und die Kammer mit 25µl Zellsuspensionslösung befüllt. Die vier Stocklösungen wurden nach Abbildung 5 angefertigt. Um den Versuch verblindet durchzuführen, wurden von einer zweiten Person die Stocklösungen mit den Variablen A, B, C und D in randomisierter Reihenfolge gekennzeichnet. Die Gruppenvariablen wurden bis zum Abschluss der Versuchsauswertung beibehalten. Anschließend wurden die Lösungen A, B, C und D jeweils auf sechs Kammern verteilt und abschließend in den Inkubator gestellt. Nach sechs Tagen wurden die Sphären der einzelnen Ansätze unter dem Durchlichtmikroskop *Olympus IX70* betrachtet und mit der *ColorView 12* Kamera digitalisiert.

Danach wurde der *Versuch zur Zellüberlebensquote* durchgeführt, in welchem das Verhältnis von lebendigen zu toten Zellen ermittelt wird. Dazu wurden die Ansätze der sechs Kammern mit der gleichen Kontroll- oder EPO-Konzentration zusammengeführt, zentrifugiert, trituiert und mithilfe der Neubauer-Zählkammer lebendige als auch tote

Zellen gezählt. Im Falle einer zu hohen Zelldichte wurden die Zelllösungen vor dem Zählen in der Neubauer-Zählkammer für ein genaueres Ergebnis verdünnt.

Zur Klassifikation der Wachstumseigenschaften wurden die Anzahl und Größe der Sphären auf den Fotos mit Hilfe des Computers bestimmt. Dabei wurde jede Sphäre gezählt, die folgende Charakteristika erfüllte: Ein runder Zellhaufen, der nicht angewachsen ist und eine homogene Musterung hat sowie eine Mindestgröße von 50µm aufweist. Innerhalb der Sphäre hatten die Zellen eine ähnliche Größe. Beispiele für Sphären, die dieser Definition entsprachen beziehungsweise nicht entsprachen, sind in Abbildung 6 abgebildet. Nach dieser Auswertung erhielten die Gruppen A, B, C und D ihre ursprüngliche Bezeichnung.

Abbildung 5: Aufbau des Neurosphären-Versuchs

Lösung für:	Stockzusammensetzung	Mediumzugabe
Kontrolle	20µl PBS	davon 8µl
0,1 U/ml EPO	5µl Epoetin beta + 495µl PBS	davon 8µl
1 U/ml EPO	5µl Epoetin beta + 45µl PBS	davon 8µl
10 U/ml EPO	10µl Epoetin beta	davon 8µl

**Erstellen der randomisierten Stocklösung**

- 8ml DMEM/F12-Medium mit je 3,2µl EGF und bFGF versetzen
- in vier PP-Reaktionsgefäße mit je 2ml Medium aufteilen
- in jeden Ansatz 8µl eine der vier möglichen Stocklösungen dazugeben (verblindet durchgeführt)

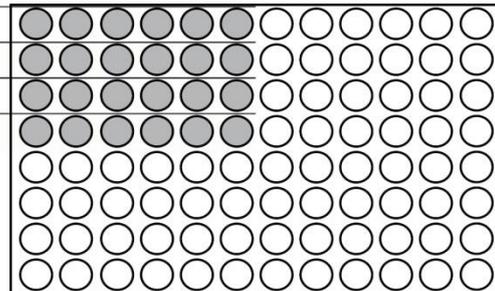
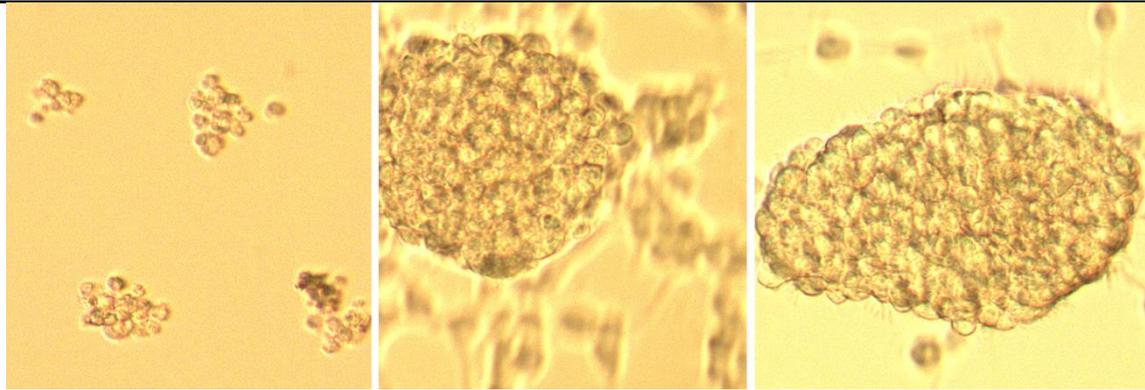


Abbildung 6: Sphärenbeispiele der Definition entsprechend (oben) und nicht entsprechend (unten)





## 11. Einfluss von EPO auf das Neuritenwachstum

Um die Differenzierungseigenschaften und das damit verbundene Neuritenwachstum der ipNP-Zellen durch EPO weiter zu erforschen, wurde der folgende *Neuritenwachstums-Versuch* durchgeführt. Die Deckgläser der 24-Well-Platten wurden mit 400µl PDL eine Stunde lang inkubiert, mit autoklaviertem Wasser abgewaschen und unter der Sterilbank getrocknet. Es wurden fünf 24-Well-Platten (siehe Tabelle 3) verwendet; je eine für die Tage 2 bis 6. Die Aufteilung der Platten erfolgt wie in Abbildung 7 abgebildet. Nach dem Trituieren der Neurosphären, wurden 12.500 Zellen pro Kammer in 50µl Neurobasal-Medium ausplattiert. Dieses Medium ermöglicht den heranwachsenden neuronalen Zellen ein optimales Wachstum. Anschließend wurden die Zellen ausgesät und für 20 Minuten zum Anwachsen inkubiert. Danach wurden 350µl Neurobasal-Medium mit der entsprechenden Kontroll- oder EPO-Konzentration verblindet zugeführt, sodass sich die Zellen letztlich in 400µl Neurobasal-Medium befanden. Am jeweiligen Tag wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch nach dem Protokoll in Tabelle 14 gefärbt. Alle dazu verwendeten Antikörperlösungen wurden in PBS mit 1-prozentigem *normal horse serum* (siehe Tabelle 15 und Tabelle 16) aufgetragen.

Abbildung 7: Versuchsaufbau des Zellfortsatzversuchs

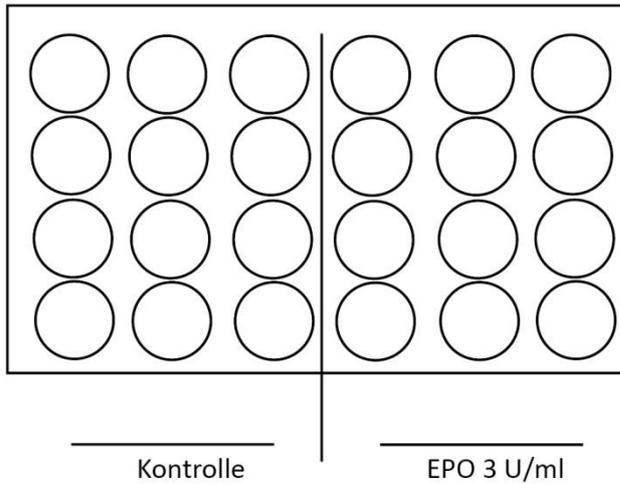
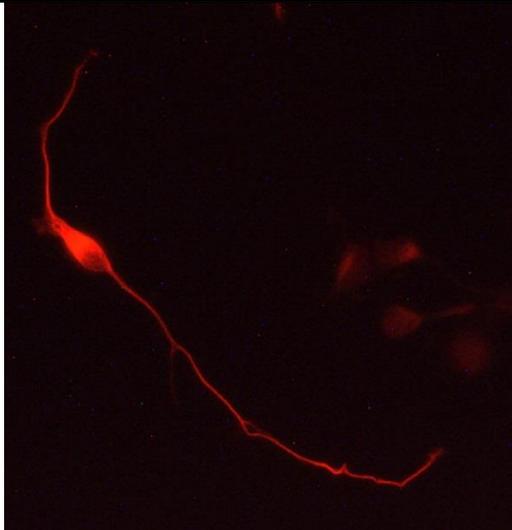
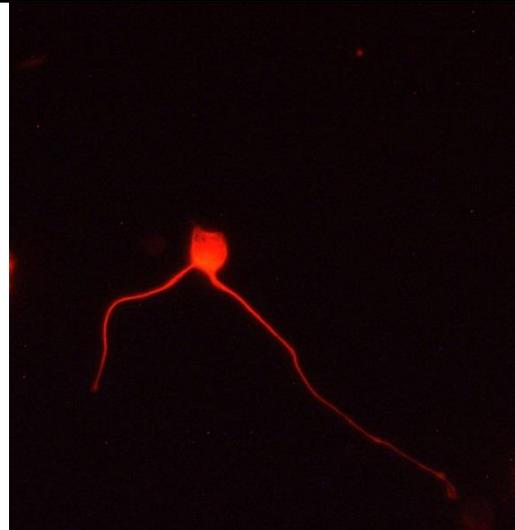
Kontroll- und EPO-KonzentrationKontrolle: 40,5 $\mu$ l PBS in 30ml NB-MediumEPO 3 U/ml: 40,5 $\mu$ l Epoetin beta in  
30ml NB-Medium

Abbildung 8: Beispiel des Zellfortsatzversuchs (3. Tag)



bipolar  
Axon und Dendrit liegen ca. 180° auseinander



unipolar  
Axon und Dendrit liegen nicht gegenüber

Tabelle 14: Ablauf der Zellfixierung auf dem Objektträger

1.	Fixierung erfolgt für 20 Minuten mit 500µl 4-prozentiger PFA-Lösung
2.	Einmaliges Waschen mit PBS
3.	Permeabilisierung der Zellen für zehn Minuten mit 500µl 0,2-prozentigem Triton X in PBS
4.	Blocken mit 300µl 10-prozentigem NHS in PBS für 30-60 Minuten
5.	250µl Primärantikörper wurden entweder für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler oder über Nacht bei 4°C im Kühlschrank auf den Zellen belassen
6.	Dreimaliges Waschen mit PBS für mindestens fünf Minuten auf dem Schüttler
7.	Die Zellen wurden mit 250µl Sekundärantikörper für 60 Minuten auf den Schüttler gestellt
8.	Dreimaliges Waschen mit PBS für mindestens fünf Minuten auf dem Schüttler
9.	Fixierung mit 20µl DAPI-Moviol pro Deckglas auf dem Objektträger

Tabelle 15: Primäre Antikörperlösungen

Bezeichnung	Verdünnung	Immunogen	Artikelnummer	Hersteller
<b>TuJ1</b>	1:500	mouse monoclonal	T8660-2ml	Sigma-Aldrich
<b>Normal Horse Serum</b>			008-000-121	Jacksonimmuno

Tabelle 16: Sekundäre Antikörperlösungen

Bezeichnung	Verdünnung	Antigen	Artikelnummer	Hersteller
<b>Cy3</b>	1:1000	goat anti-mouse	115-165-146	Jacksonimmuno
<b>DAPI</b>	1:1000	/	D9542-5mg	Sigma

Die Zellen mit den fluoreszierenden Sekundär-Antikörpern wurden mit dem *Zeiss Axiophot 2* Mikroskop betrachtet und mittels der *Spot insight camera 2MP* von *Visitron Systems* digitalisiert. Es wurden acht repräsentative Bereiche ausgesucht, die folgende Kriterien erfüllen: Die Areale waren weder zu dicht, noch zu dünn besiedelt und die Zellfortsatzausläufer der abgebildeten Zellen auf dem Foto gut ersichtlich. Mit acht Bildern wurden nahezu alle Zellen ohne Überschneidungen erfasst. In jeder Versuchsdurchführung wurden die Zellen auf zwei Deckgläsern ausplattiert. Von jedem Deckglas wurden mit dem Fluoreszenzfilter für Cy3 und DAPI je acht Fotos erstellt. Die Länge und Anzahl der Zellfortsätze pro Zelle wurden mit dem *PlugIn NeuronJ* für *ImageJ* am Computer ausgewertet. Bis dahin wurden die Versuchsreihen mit Variablen gekennzeichnet, um eine verblindete Durchführung zu gewährleisten. Die Quote der

TuJ1-positiv gefärbten Zellen im Vergleich zu den DAPI-positiv gefärbten Zellen wurde ebenfalls am Computer ermittelt. Dazu wurde das Bild der TuJ1-Färbung mit einer Deckkraft von 70% über das der DAPI-Färbung gelegt, sodass beide Bilder sichtbar waren. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde der Versuch zweimal durchgeführt.

Die Auswertung dieses Versuchs erfolgte in zwei Teilen, wobei unterschiedliche Schwerpunkte untersucht wurden. Dazu gehörte die Länge des Fortsatzes, den die aus ipNP-Zellen differenzierten Neurone innerhalb der beobachteten sechs Tage gebildet hatten. Bei diesem Teil wurden nur die Zellen mit einem einzelnen Fortsatz vermessen und der Länge nach entweder der Gruppe mit 50-100µm oder der Gruppe >100µm zugeordnet. Als nächstes wurde die Bipolarität untersucht. Hier wurden nur die Zellen ausgewertet, die zwei Fortsätze hatten. Es folgte eine Zuordnung zur bipolaren Gruppe, wenn sich die Fortsätze gegenüber lagen. Alle restlichen Zellen wurden der unipolaren Gruppe zugeordnet.

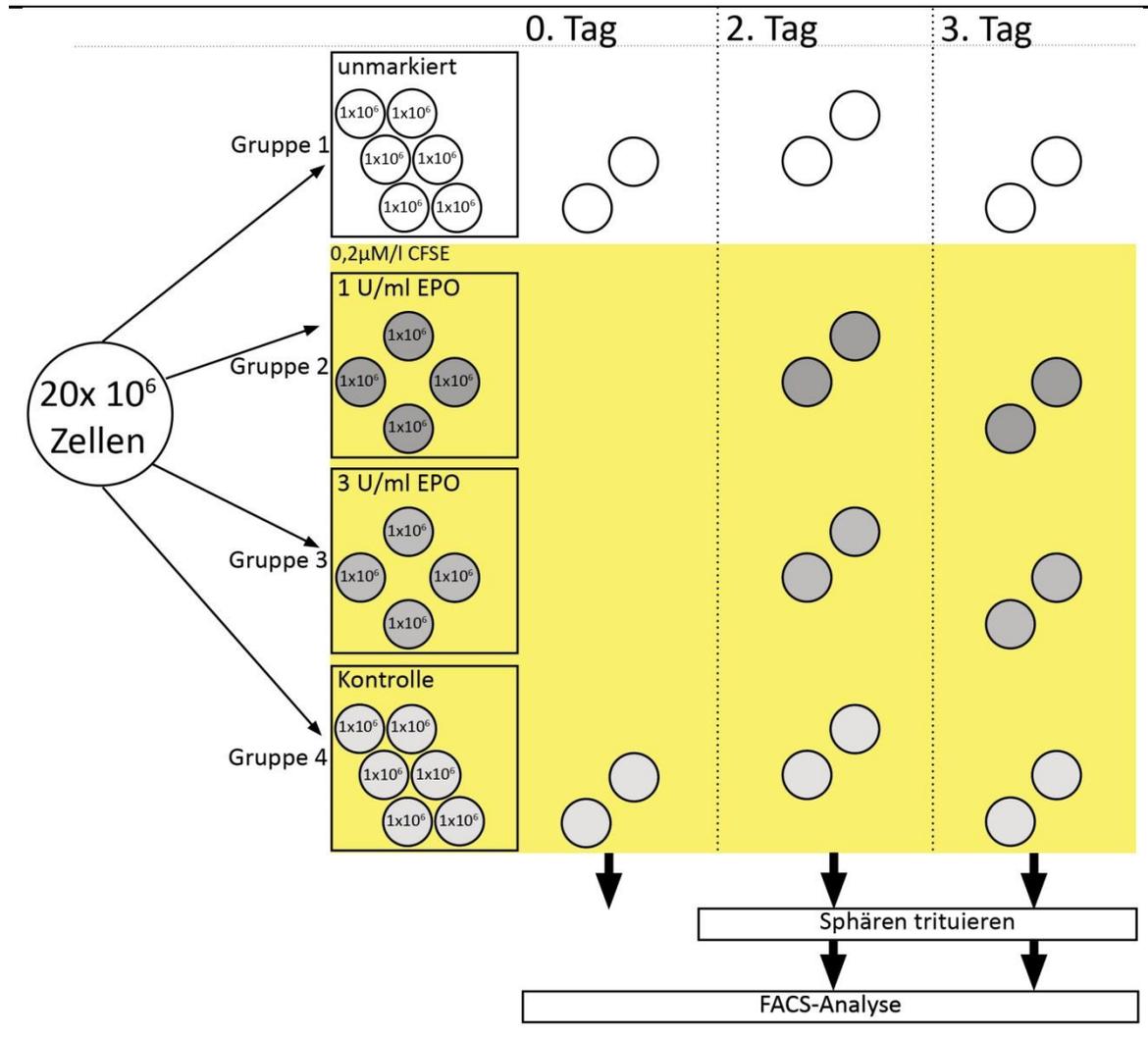
## 12. Einfluss von EPO auf die Zellproliferation

Zur Analyse, welche Auswirkung EPO auf die Zellproliferation der ipNP-Zellen im Neurosphärenstadium hat, wurde der folgende FACS-Versuch durchgeführt. Bei diesem Versuch wurde als zweite EPO-Gruppe nach 1 U/ml die Konzentration von 3 U/ml gewählt, weil sich bei den Vorversuchen bereits herausstellte, dass bei 10 U/ml EPO kein messbares Sphärenwachstum erfolgt.

Der Versuch benötigte pro Klon  $20 \times 10^6$  Zellen, die in vier Gruppen aufgeteilt wurden (siehe Abbildung 9). Davon wurden  $14 \times 10^6$  Zellen mit 0,2µM/l CFSE markiert und auf die drei Versuchsbedingungen, 1 U/ml EPO, 3 U/ml EPO und die *markierte* Kontrollgruppe, aufgeteilt. Die anderen  $6 \times 10^6$  Zellen bildeten die *unmarkierte* Kontrollgruppe. CFSE ist ein Farbstoff, der sich an die DNA anlagert. Seine Intensität halbiert sich bei jeder Zellteilung. Begründet wird dies durch die DNA-Teilung und der damit verbundenen Entstehung von Mutter- und Tochterzelle. Auch, wenn die Herstellerangaben eine Konzentration von 1-10µM/l CFSE empfehlen, wurde zuerst

eine Konzentration von  $0,5\mu\text{M/l}$  genutzt und diese später auf  $0,2\mu\text{M/l}$  reduziert, da die Zellen sehr empfindlich auf das CFSE reagieren und nur über den Zeitraum von 72 Stunden beobachtet wurden. Mit Absenkung der Konzentration wurde ein guter Kompromiss zwischen Toxizität und Funktionalität erreicht.

Abbildung 9: CFSE-Markierung und Durchführung der FACS-Analyse



Die Zellen wurden für fünf Minuten bei 90 rcf zentrifugiert und anschließend mit einer PBS-Lösung gewaschen. Danach wurde das überstehende PBS-Medium abgenommen. Die Gruppen zwei bis vier wurden mit einer PBS-Lösung, die zusätzlich  $0,2\mu\text{M/l}$  CFSE enthält, zehnteilig inkubiert und somit *markiert*. Bei  $37^\circ\text{C}$  bauen die Zellen das CFSE am besten in die DNA ein. Kontrollgruppe 1 wurde stattdessen in reinem PBS für zehn Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgte die sofortige Zugabe von 20ml eiskühlem DMEM/F12-Medium ohne Vitamin A (siehe Tabelle 9). Zum Abstoppen

der Reaktion erfolgte eine fünfminütige Aufbewahrung in Eiswasser. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und jedem Ansatz 3ml DMEM/F12-Nährmedium ohne Vitamin A zugegeben. Für die Zellkultivierung des 2. und 3. Tages wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in je eine 25cm<sup>2</sup>-Zellsuspensionsflasche gegeben und 7ml DMEM/F12-Medium ohne Vitamin A (inklusive Wachstumsfaktoren) hinzugefügt. Danach wurden die Ansätze entweder mit 1 U/ml EPO, 3 U/ml EPO (siehe Tabelle 13) oder nur mit PBS (Kontrolle) versetzt und inkubiert. Die verbleibenden Zellen wurden im 15ml-Röhrchen für den 0. Tag mit PBS gewaschen, auf Eis gelagert und schnellstmöglich im *BD FACSCanto* ausgewertet. Das Gerät zählt die ersten 10.000 Zellen und kategorisiert diese nach Zellgröße und CFSE-Konzentration. Die Signale der Zellen wurden mittels der *BD FACSDiva Software* ausgewertet. Am 2. und 3. Tag wurden die Zellen pro Kondition aus zwei Zellsuspensionsflaschen wie gewohnt trituiert, dreimal mit PBS gewaschen, auf Eis gelagert und schnellstmöglich im FACS-Gerät analysiert.

### **13. Expression des funktionellen EPO-Rezeptors**

Mithilfe des Western Blot sollte gezeigt werden, dass die ipNP-Zellen EPO-Rezeptoren exprimieren und somit auf EPO reagieren können. Die ursprüngliche Planung sah die Durchführung zweier Versuchsreihen zur Proteingewinnung vor. Damit sollten die unterschiedlichen Reaktionen der ipNP-Zellen auf EPO, einerseits in Kammern und andererseits in Zellsuspensionsflaschen, untersucht werden. Bei der Proteingewinnung in den Kammern entstand trotz  $6 \times 170.000$  Zellen oft nicht genug Protein zur Durchführung eines Western Blot, weswegen der Fokus auf die Versuchsreihe der Neurosphären in Zellsuspensionsflaschen gelegt wurde.

Zur Proteingewinnung von sekundären ipNPC wurden die primären ipNPC zuerst trituiert. Danach wurden zwei Ansätze pro Klon mit jeweils  $1,5 \times 10^6$  Zellen vorbereitet und in je eine 25cm<sup>2</sup>-Zellsuspensionsflasche gefüllt. Diesen wurde 10ml DMEM/F12-Medium mit Vitamin A zugeführt, welches eine Konzentration von 20ng/ml von hEGF und bFGF enthielt. Nach 24 Stunden wurde dem Medium in den

Zellsuspensionsflaschen für fünf Minuten entweder EPO oder eine Kontrollsubstanz (siehe Tabelle 13) zugesetzt, sodass die Konzentration im Medium 1 U/ml betrug. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 25ml-Röhrchen überführt, für fünf Minuten bei 90 rcf zentrifugiert und sodann das überstehende Medium abgenommen. Danach wurden die Zellen in einem 2ml PP-Reaktionsgefäß mit *PhosphoSafe* (siehe Tabelle 4) nach Herstellerangaben behandelt. Die Zentrifugation der Probe erfolgt für 15 Minuten mit 20.817 rcf (Rotor Eppendorf F45-30-11) bei 4°C. Zur Errechnung der Proteinkonzentration wurde eine BSA-Verdünnungsreihe (Albumin Standard; Tabelle 17) erstellt. Von den BCA-Reaktionslösungen wurden für die Standards 18x 200µl sowie für jede zu bestimmende Zellprobe 600µl verwendet. Folglich wurden für jede Standardmessung von A bis I je zwei Ansätze und für jede Zellprobe drei Ansätze erstellt. Die Lösungen A und B des *Pierce™ BCA Protein Assay Kits* (ThermoFisher, Katalognummer 23225) wurden nach Herstellerangaben im Mischverhältnis von 50:1 angesetzt. Anschließend wurden die Proben bei -80°C eingelagert.

Tabelle 17: BSA-Verdünnungsreihe

Standard	BSA-Verdünnung	ddH <sub>2</sub> O	Standard [µg/ml]
A	300µl 2mg/ml BSA stock	0µl	2000
B	375µl 2mg/ml BSA stock	125µl	1500
C	325µl 2mg/ml BSA stock	325µl	1000
D	175µl Standard B	175µl	750
E	325µl Standard C	325µl	500
F	325µl Standard E	325µl	250
G	325µl Standard F	325µl	125
H	300µl Standard G	450µl	50
I	400µl Standard H	400µl	25

Tabelle 18: Zusammensetzung der Trenngelle und des Sammelgels für die Gelelektrophorese

Chemikalien	Trenngel 15%	Sammelgel 4%	Artikelnummer	Hersteller
<b>30% Acrylamide-Solution</b>	5ml	0,67ml	A3574	Sigma
<b>Tris-HCl (1.5M) + SDS (0.4%) → pH 8.8</b>	2,5ml	1,25ml	T5941 L4509	Sigma
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	2,44ml	3,02ml		
<b>Ammoniumpersulfat (10%)</b>	50µl	50µl	A3678	Sigma
<b>TEMED</b>	10µl	10µl	T9281	Sigma
<b>Σ Volumen</b>	<b>10ml</b>	<b>5ml</b>		

Tabelle 19: fünffach konzentrierter Laemmli Puffer

Zusammensetzung	Menge	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
<b>Tris-HCl (pH 8.3)</b>	1,25ml	1M	T5941	Sigma
<b>SDS</b>	500mg		L4509	Sigma
<b>Glycerol</b>	2,5ml	92,09g/mol	G8773	Sigma
<b>Pyronin Y</b>	2,5mg	302,8g/mol	83200	Sigma
<b>β-Mercaptoethanol</b>	1ml	78,13g/mol	M6250	Sigma
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	auf 5ml auffüllen			

Tabelle 20: Standardbande des Western Blot

Chemikalien	Volumen	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
<b>SeeBlue® Pre-Stained Standard</b>	500µl	1x	LC5625	Invitrogen

Tabelle 21: fünffach konzentrierter SDS-PAGE Laufpuffer

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
<b>Trizma Base (oder Tris-HCl pH 8,3)</b>	15,1g (125ml)		T1503 T5941	Sigma
<b>Glycine</b>	72g	75,06g/mol	1042010100	Merck
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	900ml			
<b>mittels HCl</b>		pH auf 8,3		
<b>SDS</b>	5g		L4509	Sigma
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	auf 1l auffüllen			

Tabelle 22: Vorratslösungen und TBST

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
<b>TBS</b>				
- Trizma Base	1,21g	121,14g/mol	T1503	Sigma
- NaCl	8,76g		3957	Roth
- ddH <sub>2</sub> O	900ml			
- mittels HCl		pH auf 7,6		
- ddH <sub>2</sub> O	auf 1l auffüllen			
<b>20% Tween 20</b>				
- Tween 20	20ml	100%	P7949	Sigma
- ddH <sub>2</sub> O	80ml			
<b>TBST</b>				
- TBS	995ml	121,14g/mol		s.o.
- NaCl		150mM	3957	Roth
- 20% Tween 20	5ml	20%		s.o.

Tabelle 23: TBST-Blocklösung

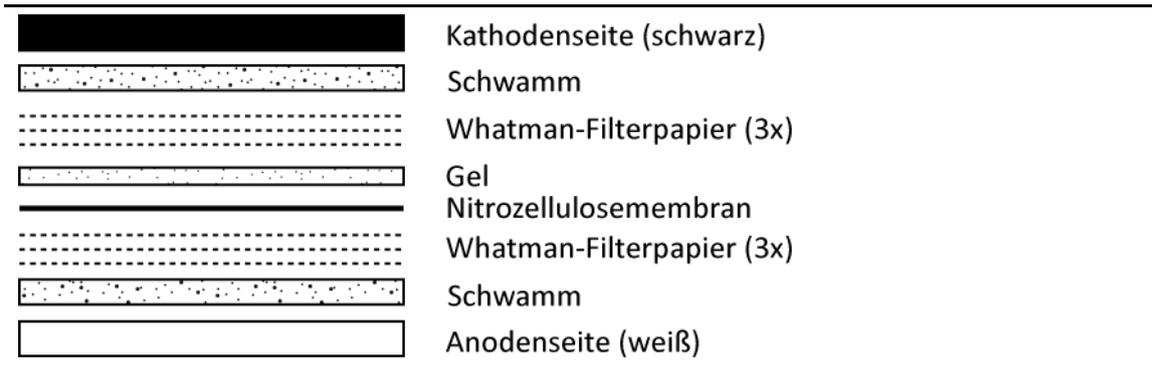
Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
<b>TBST-Blocklösung mit NaAzid</b>				
- TBST	20ml			s.o.
- Milchpulver	1g	5%	T145	Roth
- NaAzid	0,2g	0,1%	8223350100	Merck
<b>TBST-Blocklösung ohne NaAzid</b>				
- TBST	20ml			s.o.
- Milchpulver	1g	5%	T145	Roth

Das Zellprotein wurde im Verhältnis von 5:1 mit Laemmli-Puffer (siehe Tabelle 19) gemischt und fünf Minuten lang auf 95°C erhitzt. Derweil wurde die Apparatur mit einem auf einfach verdünnten SDS-PAGE-Laufpuffer (siehe Tabelle 21) befüllt und der Kamm aus dem Gel (siehe Tabelle 18) gezogen. Die Proben wurden vor der Durchführung des Western Blot auf die Konzentration verdünnt, die die geringste Proteinmenge enthielt. In jede Geltasche wurden dann 10-15µg Protein pipettiert. Die Standardbande wurde durch 7µl SeeBlue® (siehe Tabelle 20) erzeugt. Die Gelelektrophorese (Stromquelle: *Bio-Rad PowerPac HC*, Kammer: *miniVE Vertical*

*Electrophoresis System*) wurde mit 80V gestartet und später auf 150V erhöht. Das Gel wurde so lange laufen gelassen, bis der blaue Farbstoff etwa 1cm vor der unteren Kante stand (circa 2 Stunden).

Der Proteintransfer vom Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei 400mA für eine Stunde in derselben Kammer. Der Kammeraufbau ist in Abbildung 10 ersichtlich.

Abbildung 10: Kammeraufbau für den Western Blot-Transfer



Für die Antigenblockung wurde die TBST-Blocklösung ohne NaAzid (siehe Tabelle 22, Tabelle 23) für eine Stunde auf der Membran belassen. Anschließend wurde die TBST-Blocklösung mit NaAzid und dem Primärantikörper (siehe Tabelle 24) aufgetragen und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler gelagert. Es wurden zwei verschiedene Primärantikörper verwendet. Der eine Primärantikörper ist auf die aktivierte und die inaktivierte Form des MAPK/ERK sensibel. Der andere reagiert nur auf die Aktivierte, also den phosphorylierten Zustand des MAPK/ERK (pMAPK/pERK).

Am folgenden Tag wurde die Membran dreifach für je zehn Minuten mit TBST gewaschen, der *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper (siehe Tabelle 25) in TBST-Blocklösung ohne NaAzid für zwei Stunden zugeführt und die Membran bei Raumtemperatur auf dem Schüttler belassen. Abschließend wurde sie abermals für je zehn Minuten dreifach mit TBST gewaschen.

Tabelle 24: Primäre Antikörperlösungen für den Western Blot

Bezeichnung	Verdünnung	Immunogen	Artikelnummer	Hersteller
<b>anti-pMAPK</b>	1:2000	anti-mouse monoclonal	M8159	Sigma
<b>anti-MAPK</b>	1:5000	anti-rabbit polyclonal	M5670	Sigma

Tabelle 25: Sekundäre Antikörperlösungen für den Western Blot

Bezeichnung	Verdünnung	Typ	Artikelnummer	Hersteller
<b>anti-mouse IgG</b>	1:5000	horseradish peroxidase	A3682	Sigma
<b>anti-rabbit IgG</b>	1:15000	horseradish peroxidase	A0545	Sigma

Tabelle 26: Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Mischverhältnis)

Zusammensetzung	Volumen	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
<b>Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent</b>			RPN2232	GE Health
- Lösung A	2ml	97,5%		
- Lösung B	50µl	2,5%		

Die *erhöhte Chemilumineszenz* (ECL)-Lösung, wurde im Mischverhältnis entsprechend Tabelle 26 erstellt und diente der Visualisierung des Western Blot. Wichtig war dabei, dass die ECL-Lösung die Membran während eines Zeitraums von fünf Minuten komplett bedeckte und diese dabei durch den Schüttler bewegt wurde. Nur so konnte sich die ECL-Lösung optimal an alle Sekundärantikörper binden. Anschließend wurde die Membran in einer Frischhaltefolie faltenfrei verpackt. Danach wurden vier Röntgenfilme für je 2, 5, 15 und 30 Sekunden in der Dunkelkammer belichtet und fixiert. Da die Signalintensität der Membran von den unterschiedlichen Versuchen schwankte, konnte so mindestens eine optimale Belichtung gewährleistet werden. Eine abermalige Verwendung der Membran war nach dem Strippen und mehrmaligem Waschen mit TBST möglich.

Für die Auswertung wurde nur das bestbelichtete Röntgenbild herangezogen, woraus sich beim digitalisierten Bild eine Signalvarianz ergab. Diese spiegelte sich auch in den Endflächen bei der Auswertung der Proteinbanden im Computerprogramm *ImageJ* wider.

Damit letztlich ein Quotient zwischen den pMAPK/pERK und der gesamten MAPK/ERK Menge bestimmt werden konnte, musste die Membran mindestens zweimal verwendet werden. Daher erfolgte zuerst eine Reaktion mit dem anti-pMAPK-Antikörper (Tabelle 24) und dem dazugehörigen Sekundärantikörper mit nachfolgender Belichtung. Anschließend erfolgte nach dem Strippen eine weitere Reaktion mit dem anti-MAPK-Antikörper sowie dem passenden Sekundärantikörper mit abschließender Belichtung.

Die Filme wurden digitalisiert und mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Die daraus gewonnenen Werte der Fläche *area under the curve* (AUC) wurden im Computer berechnet und daraus der Quotient gebildet.

#### **14. Statistische Analysen**

Die Daten aller Versuche wurden in Microsoft Excel 2010 gesammelt und analysiert. In den folgenden Diagrammen wird der Mittelwert mit der dazugehörigen  $\pm$  Standardabweichung abgebildet. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der zweiseitige gepaarte oder ungepaarte Student's t-test verwendet (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

### III) Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der durchgeführten Versuche vorgestellt.

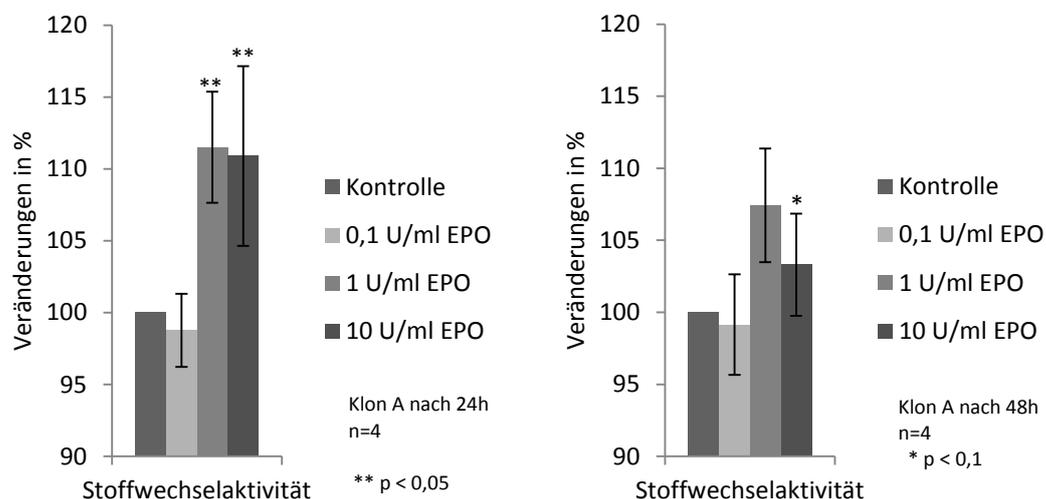
#### 1. Einfluss von EPO auf die Zellviabilität

Der MTT-Versuch zeigte die EPO-Wirkung auf das Überleben der ipNP-Zellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 und Abbildung 12 zusammengefasst.

Eine geringe EPO-Konzentration von 0,1 U/ml hatte keine signifikante Auswirkung auf das Überleben der Zellen (24h=98,8% [p=0,143]; 48h=99,2% [p=0,34]). Erst eine höhere Konzentrationen von 1 U/ml (24h=111,5% [p=0,027]; 48h=107,4% [p=0,126]) oder 10 U/ml (24h=110,9 [p=0,03]; 48h=103,3% [p=0,062]) EPO verbesserte die Zellviabilität geringfügig. Der Effekt nach 48 Stunden war dabei weniger stark ausgeprägt als der nach 24 Stunden.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Zellviabilität bei Klon A nach 24 als auch nach 48 Stunden unter 1 U/ml EPO am höchsten ausgefallen ist.

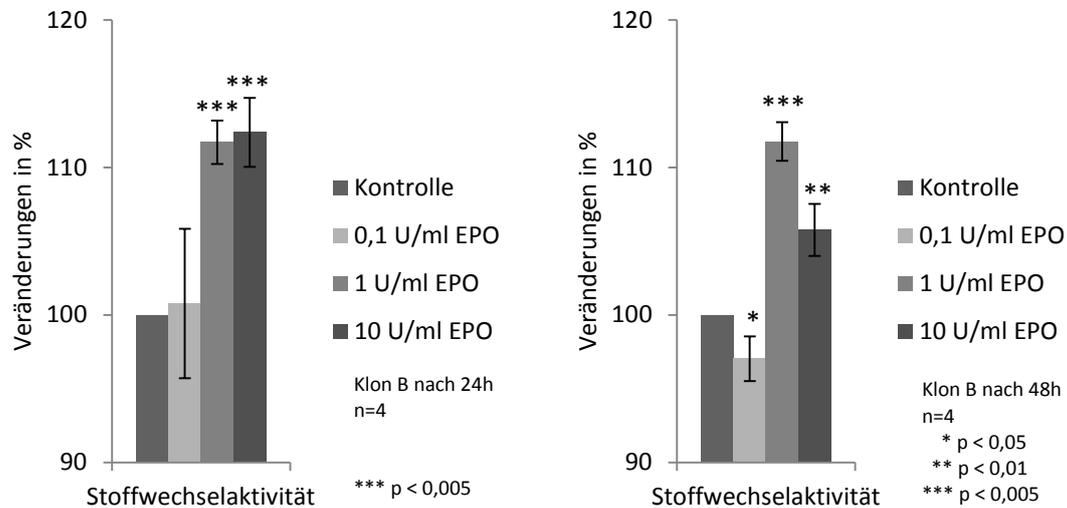
Abbildung 11: Zellviabilität der ipNPC von Klon A nach 24/ 48 Stunden in Bezug auf die Kontrollgruppe



Bei Klon B war die Zellviabilität innerhalb der ersten 24 Stunden bei 1 U/ml EPO (24h=111,7% [p=0,0004]; 48h=111,8% [p=0,0003]) und 10 U/ml EPO (24h=112,4% [p=0,001]; 48h=105,8% [p=0,005]) erhöht. Bei 0,1 U/ml EPO war sie innerhalb der

ersten 24 Stunden minimal erhöht und nach 48 Stunden sogar erniedrigt (24h=100,8% [p=0,41]; 48h=97,0% [p=0,02]).

Abbildung 12: Zellviabilität der ipNPC von Klon B nach 24 / 48 Stunden in Bezug auf die Kontrollgruppe



Beim Vergleich der Ergebnisse von Klon A aus Abbildung 11 und Klon B aus Abbildung 12 wird ersichtlich, dass das Zellüberleben nach 24 und 48 Stunden bei einer EPO-Konzentration von 1 U/ml sowie bei 10 U/ml zunahm. Diese Aktivität reduzierte sich nach 48 Stunden bei den Gruppen von 10 U/ml EPO. Während bei Klon A bei einer Konzentration von 1 U/ml EPO schon nach 24 Stunden der Maximalwert von 111,5% erreicht wurde, konnte ein Wert von 111,8% bei Klon B erst nach 48 Stunden gemessen werden. Der Versuch zeigt, dass EPO das Zellüberleben beider Klone stimuliert und in diesem Versuch die EPO-Konzentration von 1 U/ml optimal ist.

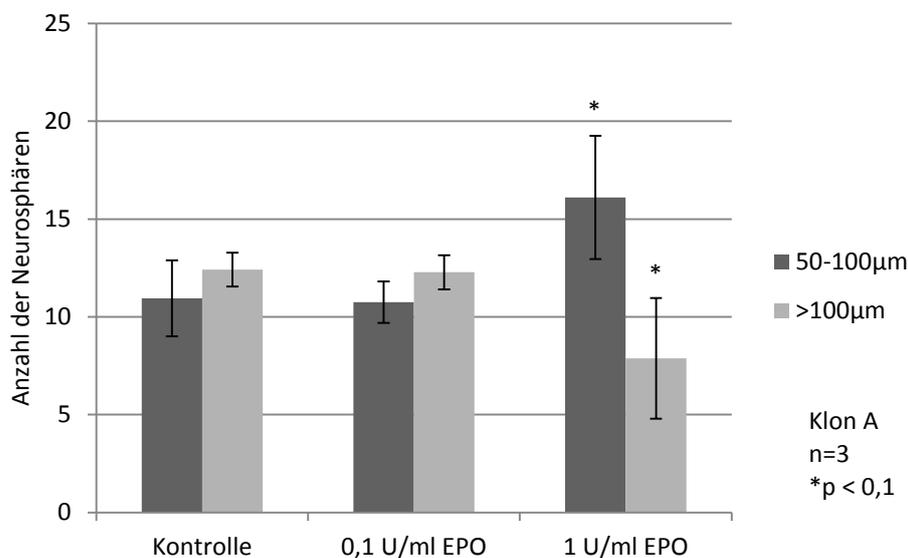
## 2. Einfluss von EPO auf die Neurosphären

Die in Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15 und Abbildung 16 abgebildeten Ergebnisse des Neurosphären-Versuchs stammen von drei Versuchsdurchführungen pro Klon. Nach Vorversuchen mit den EPO-Konzentrationen 0,1 U/ml, 0,3 U/ml, 1 U/ml, 3 U/ml und 10 U/ml werden für die Haupterhebung übersichtshalber die EPO-Konzentrationen ebenfalls im Abstand des dekadischen Logarithmus gewählt. Bei der höheren Konzentration von 10 U/ml EPO konnte keine der Definition entsprechende Sphäre mehr gezählt werden. Daher werden diese Werte in den folgenden Grafiken

nicht berücksichtigt. Die Sphären wurden nach ihrem Durchmesser in die zwei Gruppen 50-100 $\mu$ m und >100 $\mu$ m aufgeteilt.

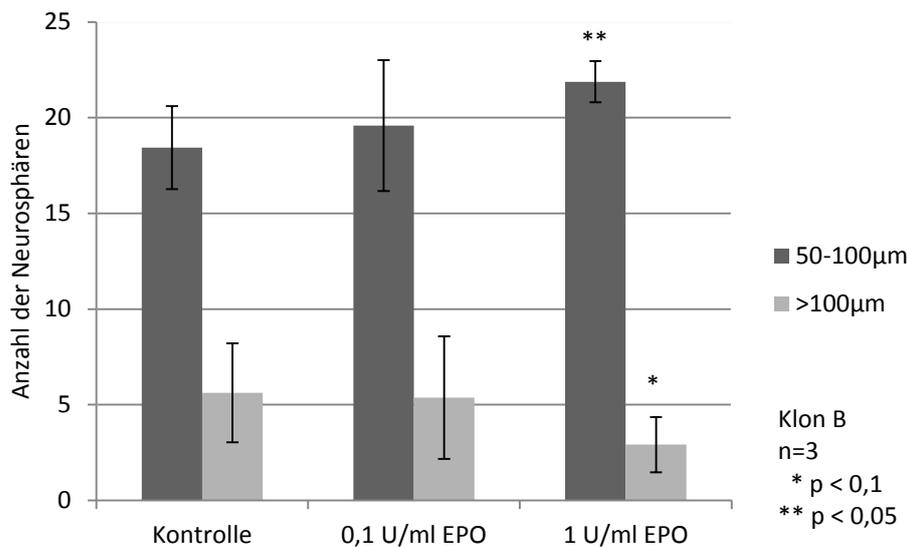
Bei 1 U/ml EPO zeigte Klon A (Abbildung 13) eine tendenzielle Reduzierung der Sphärenanzahl mit einem Durchmesser von >100 $\mu$ m (Kontrolle=12,4; 0,1 U/ml EPO=12,3 [p=0,46]; 1 U/ml EPO=7,8 [p=0,08]). Entgegengesetzt dazu stieg die Anzahl der Sphären mit einem Durchmesser von 50-100 $\mu$ m (Kontrolle=11,0; 0,1 U/ml EPO=10,8 [p=0,43]; 1 U/ml EPO=16,1 [p=0,06]).

Abbildung 13: Durchschnittliche Sphärenzahl bei variablen EPO-Konzentrationen (Klon A)



Bei Klon B (Abbildung 14) nahm die Anzahl der Sphären in der Gruppe von 50-100 $\mu$ m (Kontrolle 18,4; 0,1 U/ml EPO 19,6 [p=0,16]; 1 U/ml EPO 21,9 [p=0,04]) signifikant zu, wohingegen die Anzahl der Sphären von >100 $\mu$ m tendenziell abnahm (Kontrolle=5,6; 0,1 U/ml EPO=5,4 [p=0,31]; 1 U/ml EPO=2,9 [p=0,09]).

Abbildung 14: Durchschnittliche Sphärenzahl bei variablen EPO-Konzentrationen (Klon B)



Aus Abbildung 15 ist ersichtlich, dass EPO bei Klon A kaum einen Einfluss auf den spontanen Zelltod der ipNP-Zellen hatte, denn die prozentualen Mittelwerte der toten Zellen lagen bei allen drei Messungen zwischen 12 und 13%. Die Ergebnisse der lebendigen Zellen lagen bei der Kontrolle bei 87,7%, bei 0,1 U/ml EPO bei 87,7% [p=0,13] und bei 1 U/ml EPO bei 87,4% [p=0,35]. Die prozentualen Ergebnisse der toten Zellen lagen bei der Kontrolle bei 12,3%, bei 0,1 U/ml EPO bei 12,3% [p=0,14] und bei 1 U/ml EPO bei 12,6% [p=0,28].

Abbildung 15: Prozentuale Auswertung der Zellüberlebensquote (Klon A)

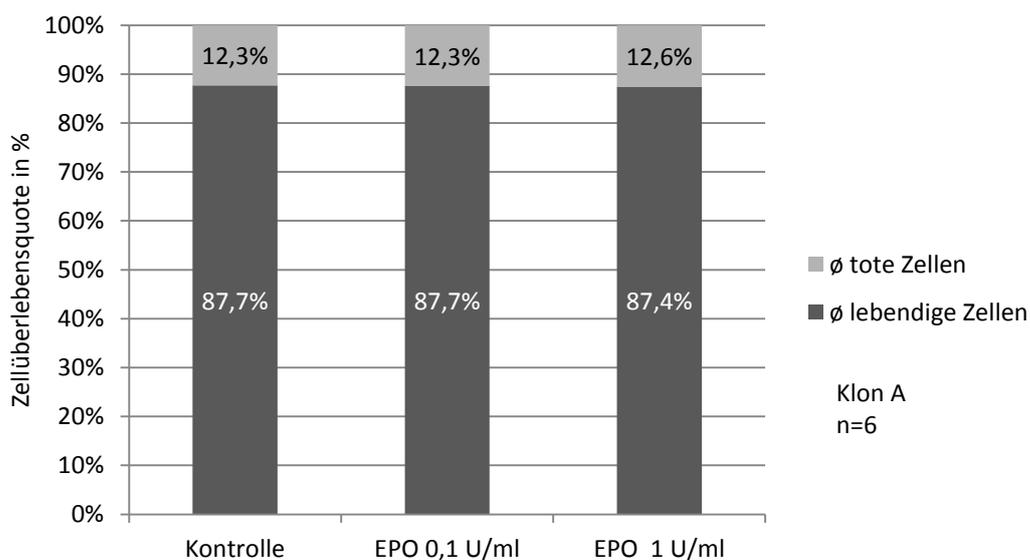
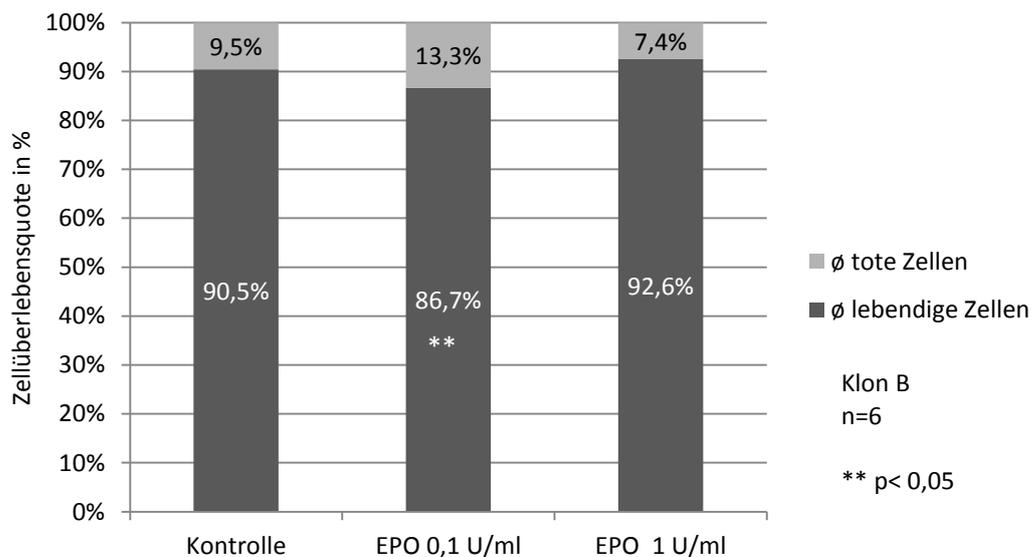


Abbildung 16 zeigt die Auswertung der Daten von Klon B mit ähnlicher Tendenz. Die prozentualen Anteile der toten Zellen schwankten hier aufgrund des unterschiedlichen Zellwachstums zwischen 7 und 13%. Die Ergebnisse der lebendigen Zellen lagen bei der Kontrolle bei 90,5%, bei 0,1 U/ml EPO bei 86,7% [ $p=0,03$ ] und bei 1 U/ml EPO bei 92,6% [ $p=0,37$ ]. Die prozentualen Ergebnisse der toten Zellen lagen bei der Kontrolle bei 9,5%, bei 0,1 U/ml EPO bei 13,3% [ $p=0,34$ ] und bei 1 U/ml EPO bei 7,4% [ $p=0,27$ ].

Abbildung 16: Prozentuale Auswertung der Zellüberlebensquote (Klon B)



### 3. Einfluss von EPO auf das Neuritenwachstum

Die folgenden Bilder zeigen ipNP-Zellen mit ihren Fortsätzen. Dabei wurden die Fluoreszenzbilder der Antikörperfärbungen mit TuJ1 (rot) und DAPI (blau) übereinander gelegt.

Abbildung 17: ipNP-Zellen am 2. Tag von Klon A: links die Kontrollgruppe, rechts mit 3 U/ml EPO

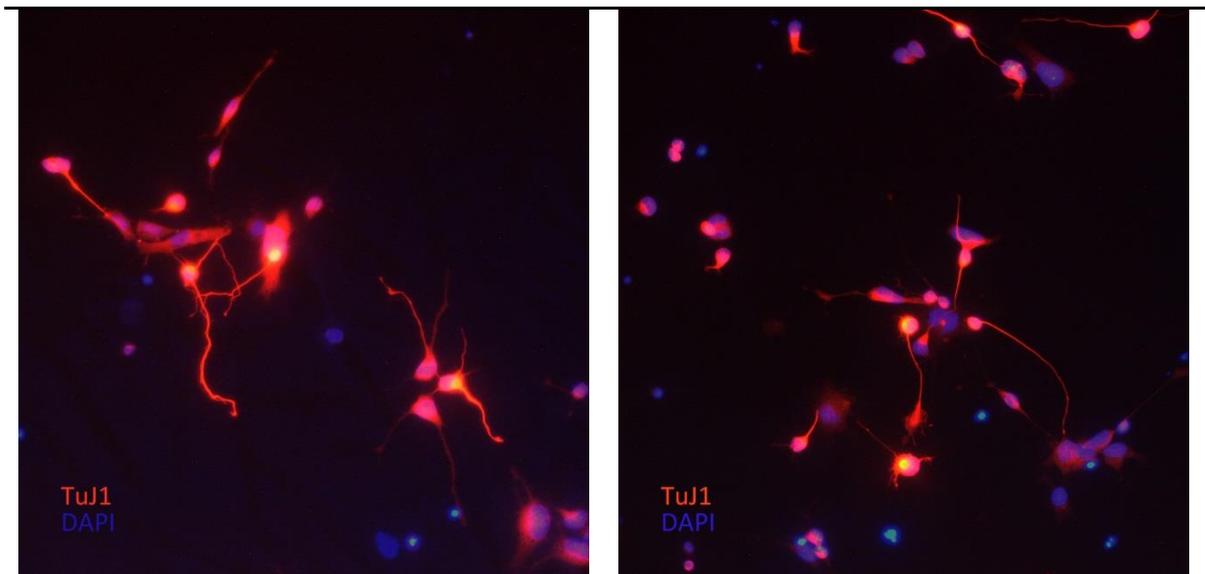


Abbildung 18: ipNP-Zellen am 6. Tag von Klon A: links die Kontrollgruppe, rechts mit 3 U/ml EPO

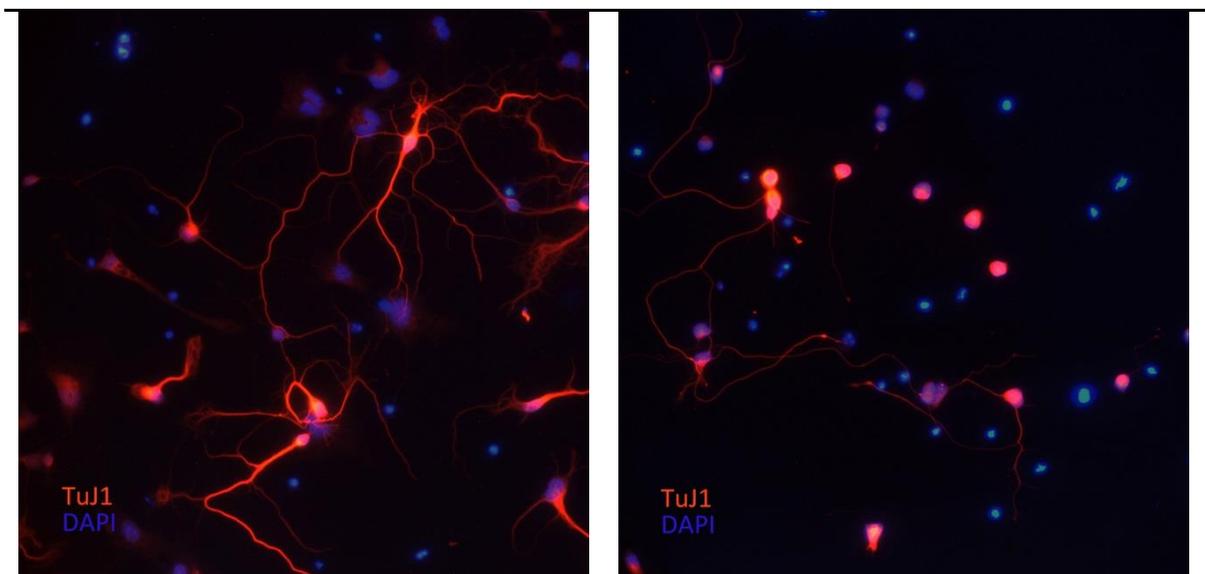


Abbildung 19: ipNP-Zellen am 2. Tag von Klon B: links die Kontrollgruppe, rechts mit 3 U/ml EPO

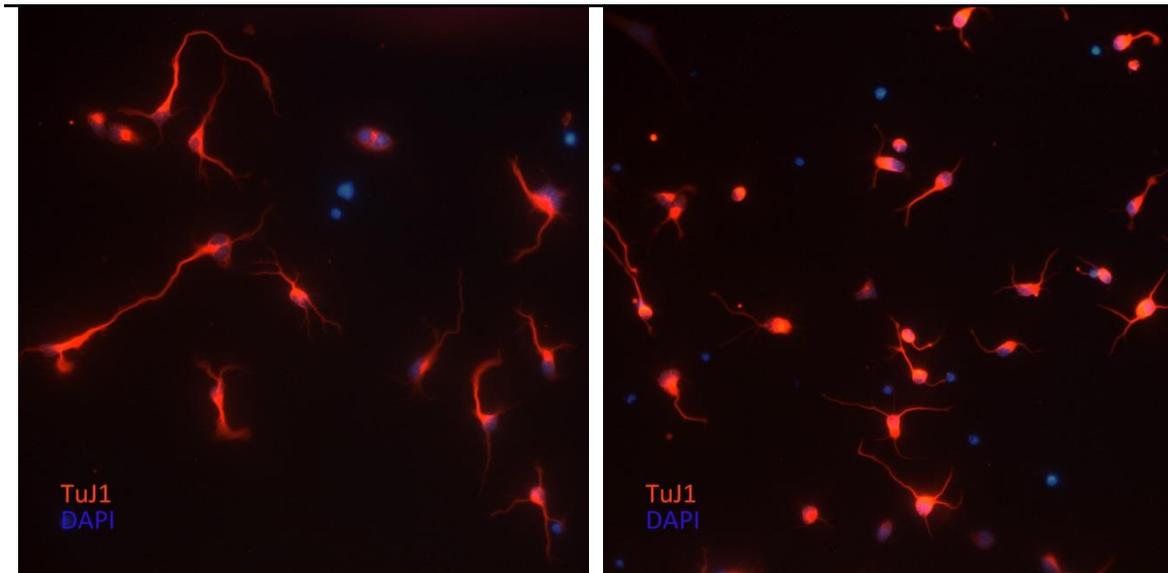
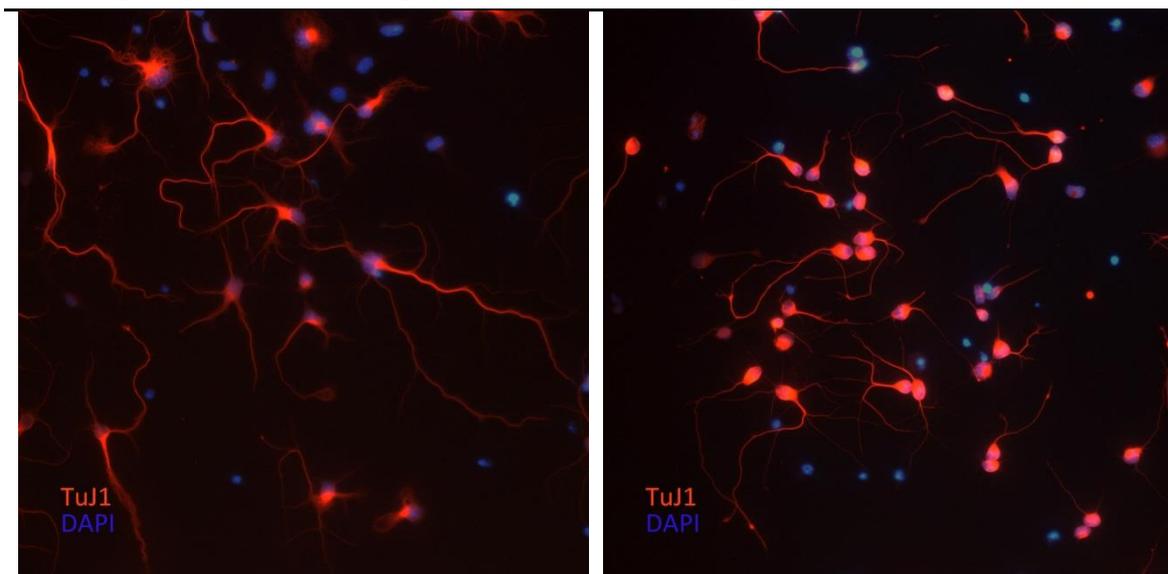


Abbildung 20: ipNP-Zellen am 6. Tag von Klon B: links die Kontrollgruppe, rechts mit 3 U/ml EPO



In Abbildung 21 ist eine Zunahme von Zellen mit einer Fortsatzlänge von 50-100 $\mu$ m und >100 $\mu$ m bis zum dritten Tag zu erkennen. Danach nahm die Anzahl der Zellen in der Gruppe mit kürzeren Fortsätzen bis zum 6. Tag ab und fiel dabei sogar unter den Ausgangswert des 2. Tages. Die Anzahl der Zellen mit längeren Fortsätzen war am Tag 3 und am Tag 6 steigend, wobei der zweite Anstieg deutlich größer ist.

Abbildung 21: Anzahl der Zellen mit einer der beiden Fortsatzlängen ohne EPO (Klon A)

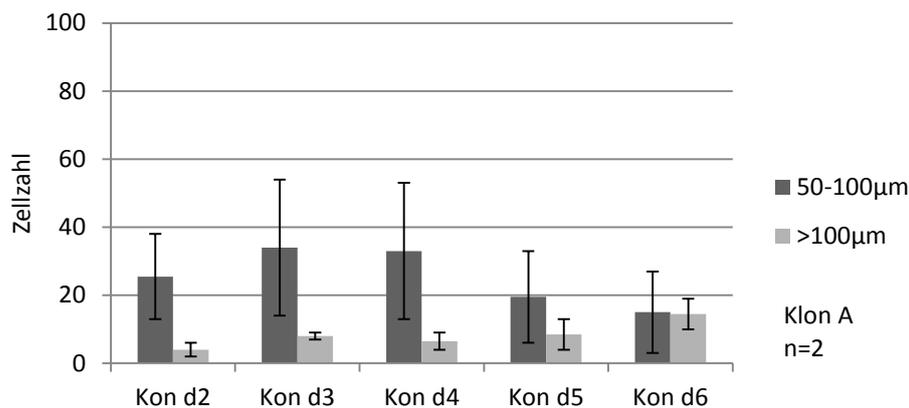
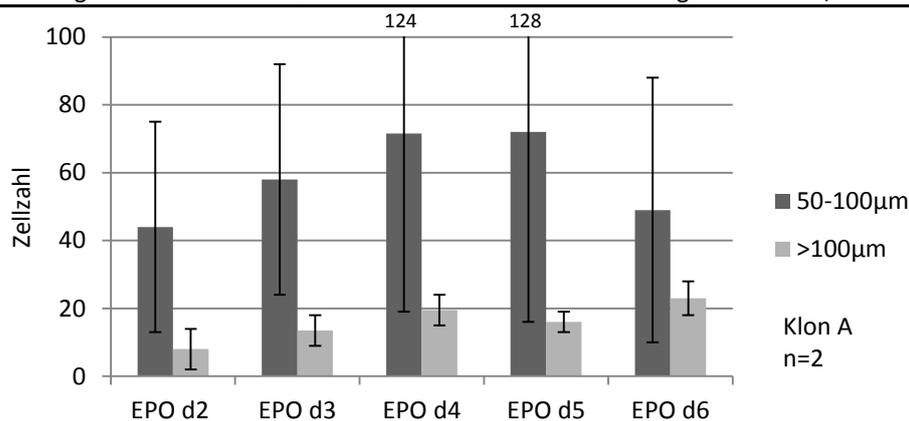


Abbildung 22 zeigt eine Wachstumszunahme der Zellfortsätze bei der Gruppe 50-100µm, welche bis zum 5. Tag stattfand und dann abnahm. Die >100µm-Gruppe erreichte ihren ersten Höchstwert am 4. Tag, den Zweiten am 6. Tag.

Abbildung 22: Anzahl der Zellen mit einer der beiden Fortsatzlängen unter 3 U/ml EPO (Klon A)



Beim Vergleich der Ergebnisse aus Abbildung 21 und Abbildung 22 zeigt sich, dass die Anzahl an Zellen mit kleineren Zellfortsätzen in der EPO-Gruppe höher war als in der Kontrollgruppe. Auffällig ist dabei, dass das Maximum ohne EPO bereits am 3. Tag, unter EPO jedoch erst am 5. Tag erreicht wurde. Zudem war in der EPO-Gruppe die Zellzahl mit längeren Fortsätzen an allen Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Am letzten Tag wiesen sowohl die Kontroll-, als auch die EPO-Gruppe die höchste Anzahl an Zellen mit langen Fortsätzen auf.

Abbildung 23 zeigt bei den bipolaren Zellen das Maximum am 4. Tag sowie das Minimum am 3. Tag. Nach dem 4. Tag war eine leichte, aber konstante Abnahme der Zellen mit bipolaren Fortsätzen bis zum 6. Tag zu verzeichnen. Bei den unipolaren Zellen lag die höchste Zellanzahl am 3. Tag, wobei der Wert am darauffolgenden Tag wieder abnahm. Zum 5. Tag war eine erneute Zunahme der Zellanzahl erkennbar, die dann wieder zum letzten Tag abnahm.

Abbildung 23: Anzahl der uni- und bipolaren Zellen ohne EPO (Klon A)

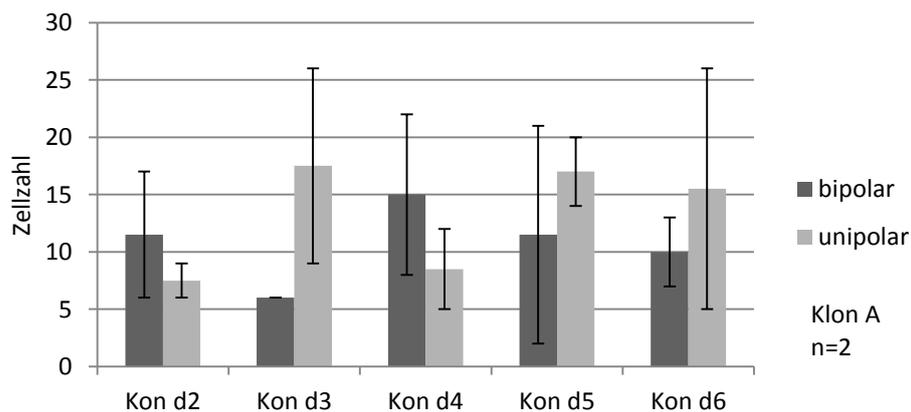
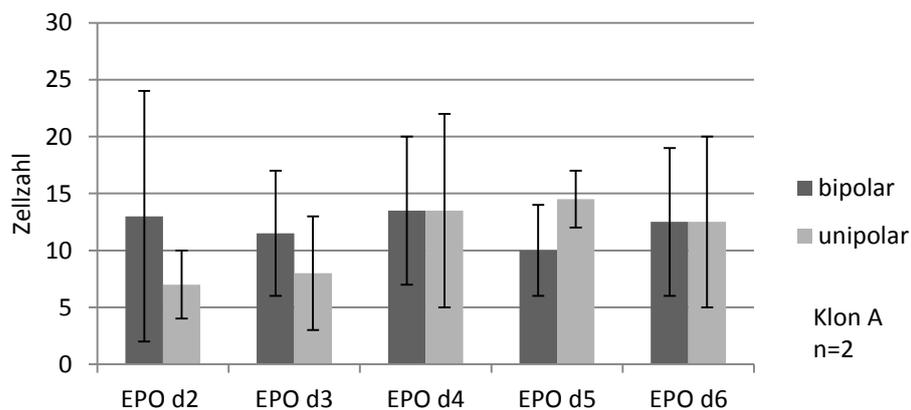


Abbildung 24 zeigt, dass die Anzahl der bipolaren Zellen für den beobachteten Zeitraum weitestgehend konstant blieb. Die höchste Zahl bipolarer Zellen wurde an Tag 4 verzeichnet und die niedrigste Anzahl am 5. Tag. Bei den unipolaren Zellen war ein Anstieg bis zum 5. Tag zu verzeichnen. Danach folgte ein leichter Rückgang.

Abbildung 24: Anzahl der uni- und bipolaren Zellen unter 3 U/ml EPO (Klon A)



Aus den Abbildung 23 und Abbildung 24 lässt sich bis zum 2. Tag eine ähnliche Entwicklung in beiden Gruppen (ohne und mit EPO) erkennen. Ab dann zeigten sich

Unterschiede. Die bipolaren Zellen erreichten ihr Wachstumsoptimum während des 4. Tages in der Kontrollgruppe, wohingegen die Zahl der unipolaren Zellen schwankte. Bei der EPO-Gruppe blieb die Anzahl von bipolaren Zellen relativ konstant und die Anzahl der unipolaren Zellen erreichte ihren Höchstwert am 5. Tag.

Abbildung 25 zeigt, dass das beste Zellwachstum mit der kurzen Fortsatzlänge bei Klon B am 2. Tag erfolgte. Ein zweiter, geringer Anstieg wurde am 4. Tag erreicht. Die Anzahl der Zellen mit Fortsätzen  $>100\mu\text{m}$  nahm bis zum 5. Tag konstant zu und fiel am darauffolgenden Tag wieder leicht ab. Sowohl am 5. Tag als auch am 6. Tag lag die gleiche Anzahl an Zellen bei beiden Fortsatzlängen vor.

Abbildung 25: Anzahl der Zellen mit einer der beiden Fortsatzlängen ohne EPO (Klon B)

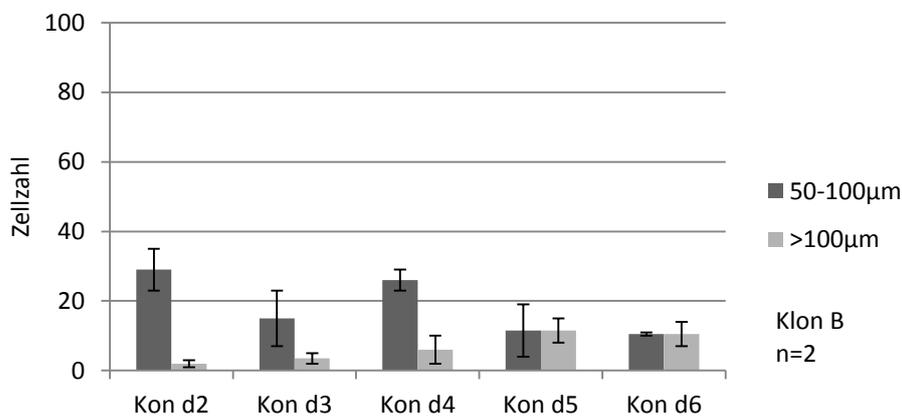
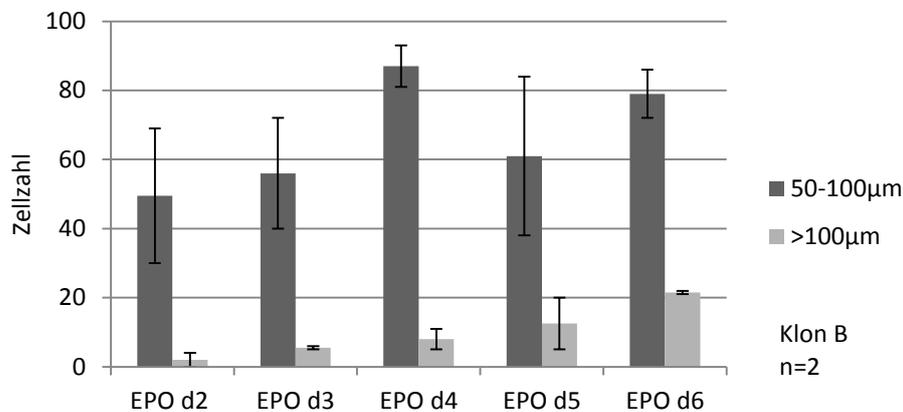


Abbildung 26 zeigt das Maximum des Zellwachstums der Fortsatzlänge 50-100 $\mu$ m unter EPO-Einfluss am 4. Tag. Die Anzahl der Zellen mit >100 $\mu$ m Fortsätzen nahm bis zum 6. Tag konstant zu.

Abbildung 26: Anzahl der Zellen mit einer der beiden Fortsatzlängen unter 3 U/ml EPO (Klon B)



Beim Vergleich der Ergebnisse der Gruppen mit 50-100 $\mu$ m langen Fortsätzen anhand Abbildung 25 und Abbildung 26 lässt sich kein gemeinsames Maximum finden. Ohne EPO-Einfluss lag dies zunächst am 2. Tag, obgleich auch am 4. Tag ein zweiter Anstieg zu verzeichnen war. Bei den Zellen, die unter EPO-Einfluss standen, lag der Maximalwert am 4. Tag. In der Zellgruppe mit Fortsätzen >100 $\mu$ m, ist das eindeutiger zu erkennen, da beide Gruppen einen Anstieg bis zum 6. Tag vorwiesen und zu diesem Zeitpunkt ein gemeinsames Maximum haben. Die Anzahl der Zellen mit den kleinen Fortsätzen nahm bei beiden Abbildungen diskontinuierlich bis zum letzten Tag ab. Im Gegensatz dazu nahm die Zellanzahl der Gruppen mit großen Fortsätzen kontinuierlich zu, wie Abbildung 25 zeigt.

Abbildung 27 zeigt die höchste Zellanzahl der Gruppe mit bipolaren Zellen am 3. Tag. Die Gruppe der unipolaren Zellen erreichte das Maximum am 4. Tag; danach konnte ein Rückgang der Zellanzahl zu beobachtet werden.

Abbildung 27: Anzahl der uni- und bipolaren Zellen ohne EPO (Klon B)

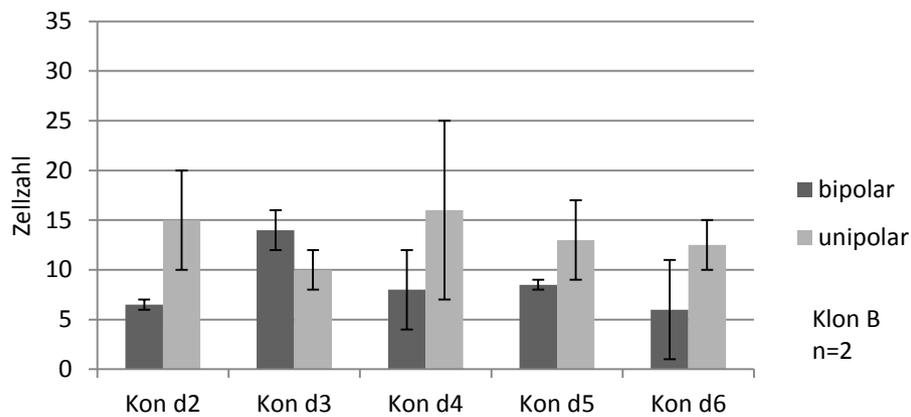
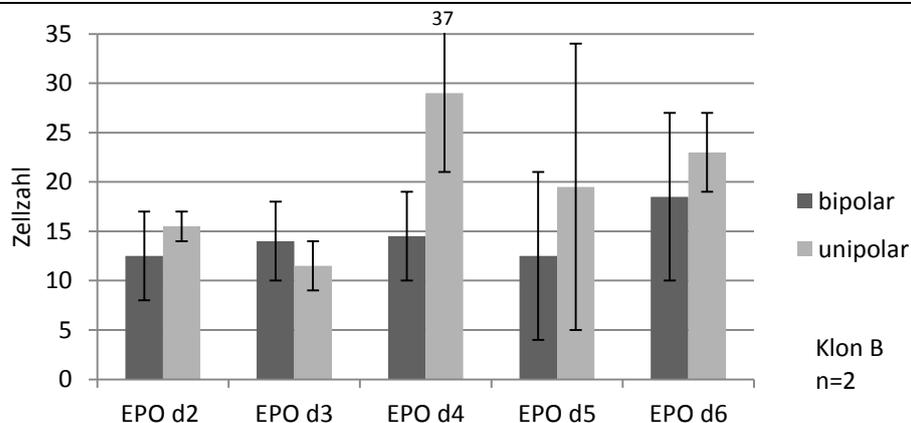


Abbildung 28 zeigt eine unregelmäßige, leichte Zunahme der Zellanzahl bei der bipolaren Zellgruppe bis zum 6. Tag. Bei den unipolaren Zellen lag das Maximum am 4. Tag, gefolgt von einem starken Abfall und erneuter Steigerung am 6. Tag.

Abbildung 28: Anzahl der uni- und bipolaren Zellen unter 3 U/ml EPO (Klon B)



Vergleicht man die Ergebnisse, die in Abbildung 27 und Abbildung 28 dargestellt sind, so sind keine großen Unterschiede zu erkennen. Jeder der fünf Tage wurde von der gleichen bipolaren beziehungsweise unipolaren Gruppe dominiert, unabhängig davon, ob die Versuche mit oder ohne EPO-Einfluss durchgeführt wurden. Allerdings konnte beobachtet werden, dass meist mehr Zellen in den Gruppen unter EPO-Einfluss wuchsen als in der Gruppe ohne EPO-Einfluss. Die Zellen der bipolaren Gruppen hatten

keinen gemeinsamen Tag, wo eine gemeinsame maximale Zellanzahl erkennbar war. Ohne EPO-Einfluss wuchsen die meisten Zellen am 3. Tag und mit EPO-Einfluss am 6. Tag. Bei den unipolaren Zellen lag die maximale Zellanzahl hingegen am 4. Tag.

#### 4. Einfluss von EPO auf die Zellproliferation

Um die Wirkung von EPO auf die Zellproliferation der Neurosphären mittels des FACS zu bestimmen, wurden die Neurosphären mit *6-Carboxyfluorescein* (CFSE) markiert. Es wurden drei Untersuchungsgruppen gebildet: Eine Placebo-Gruppe, eine Gruppe mit einer EPO-Konzentration von 1 U/ml und eine Gruppe mit einer EPO-Konzentration von 3 U/ml. Die Zellen wurden nach 48 Stunden und 72 Stunden analysiert. Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mittels der *BD-Software*. Der Fokus bei den folgenden Diagrammen wurde auf den umgrenzten, rot gefärbten Bereich P1 aus dem ersten Teil von Abbildung 29 gerichtet. Bei den folgenden Abbildungen mit den X-Achsen Bezeichnungen FITC-A (*Fluoresceinisothiocyanat*) werden die Zellen durch Punkte repräsentiert. Im Versuch wurden daher nur die rot dargestellten Punkte gezählt, die sich innerhalb des Areals befanden. Die Skala *forward scatter area* (FSC-A) zeigt die Zellgröße, während *side scatter area* (SSC-A) die Dichte der durchleuchteten Zellen darstellt.

Abbildung 29: links: Definitionsbereich P1 (umgrenzt, rot); rechts: das daraus resultierende Ergebnis

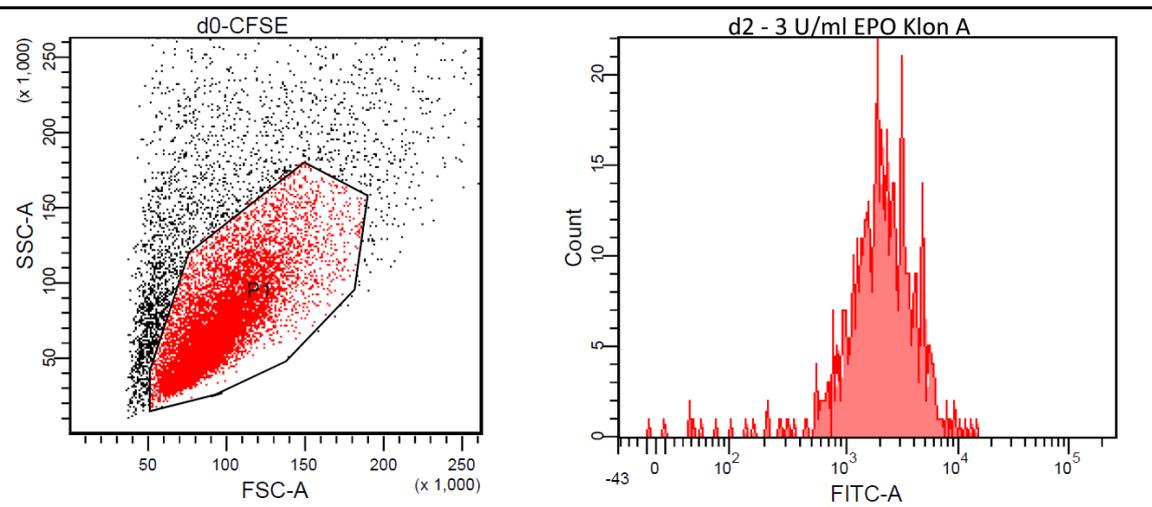
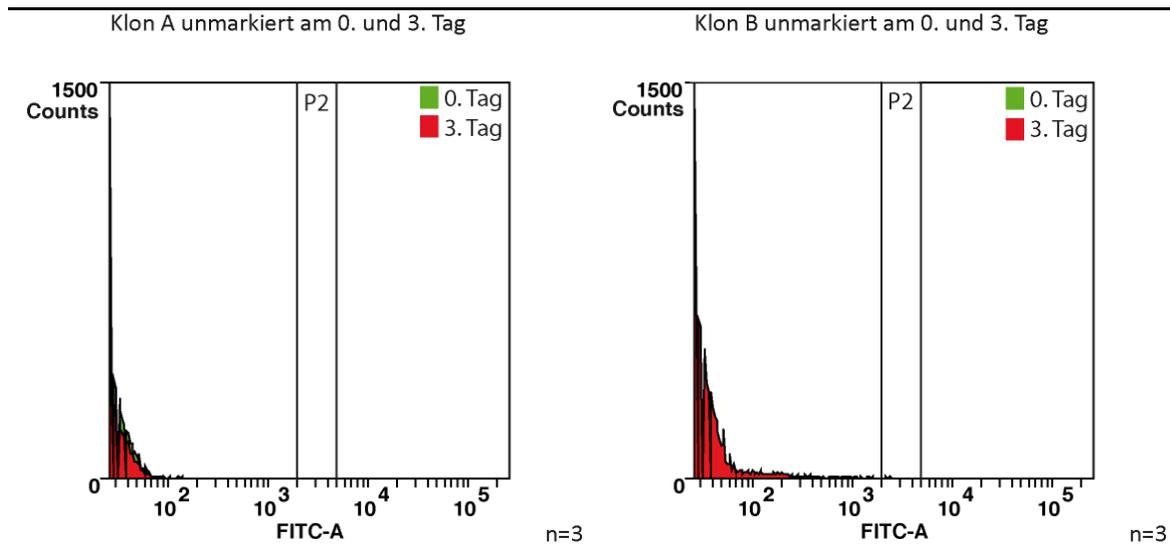


Abbildung 30: FACS-Auswertung der ipNP-Zellen von Klon A sowie B am 0. und 3. Tag ohne CFSE



Beim Vergleich der Kontrollgruppen ohne CFSE (in den Grafiken beschriftet mit *unmarkiert*) wurde in Abbildung 30 eine sehr ähnliche Fluoreszenz an allen drei Tagen erkennbar. Dort werden zur besseren Übersicht nur der 0. und 3. Tag dargestellt.

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der FACS-Auswertung von CFSE-markierten ipNP-Zellen mit und ohne EPO, welche in Abbildung 31 bis Abbildung 33 dargestellt sind, lässt sich die proliferationshemmende Wirkung von EPO auf die Neurosphären erfassen. Kurze Zeit nach der Markierung mit CFSE und ohne EPO-Einfluss waren die Auswirkungen nahezu identisch. Die Zellen wiesen je nach Größe und Zellzyklus eine anfängliche divergente Fluoreszenz auf, die im Verlauf der Tage zumindest unter EPO-Einfluss abnahm. In der Kontrollgruppe ohne EPO-Einfluss verläuft die Kurve divergenter, da sich die Zellen ab dem Startzeitpunkt (0. Tag) in verschiedenen Zellteilungszyklen befanden und dadurch unterschiedliche CFSE-Konzentrationen enthielten. Dieser Effekt ist im Verlauf des 2. auf den 3. Tag zunehmend. Am 3. Tag zeigte die Abbildung 31 bei Klon B eine Streuung der Zellanzahlen. Die höchste Zellzahl zeigt sich bei 10<sup>2</sup> hat. Diese Zellen befanden sich ebenfalls in verschiedenen Zellteilungszyklen und reagierten weniger einheitlich als die Zellen unter EPO-Einfluss. Bei Klon A spiegelt die Kurve dies ansatzweise wider, wobei das Resultat der Signalstreuung nicht so stark divergent ist. Mit Verwendung von 3 U/ml EPO nahm die

Anzahl der Abweichungen vom Kurvenverlauf ab. Zusätzlich konnte am 3. Tag ebenfalls eine Reduktion der Zellanzahl bei Klon B beobachtet werden.

Abbildung 31: FACS-Auswertung von CFSE-markierten ipNP-Zellen am 0., 2. und 3. Tag ohne EPO

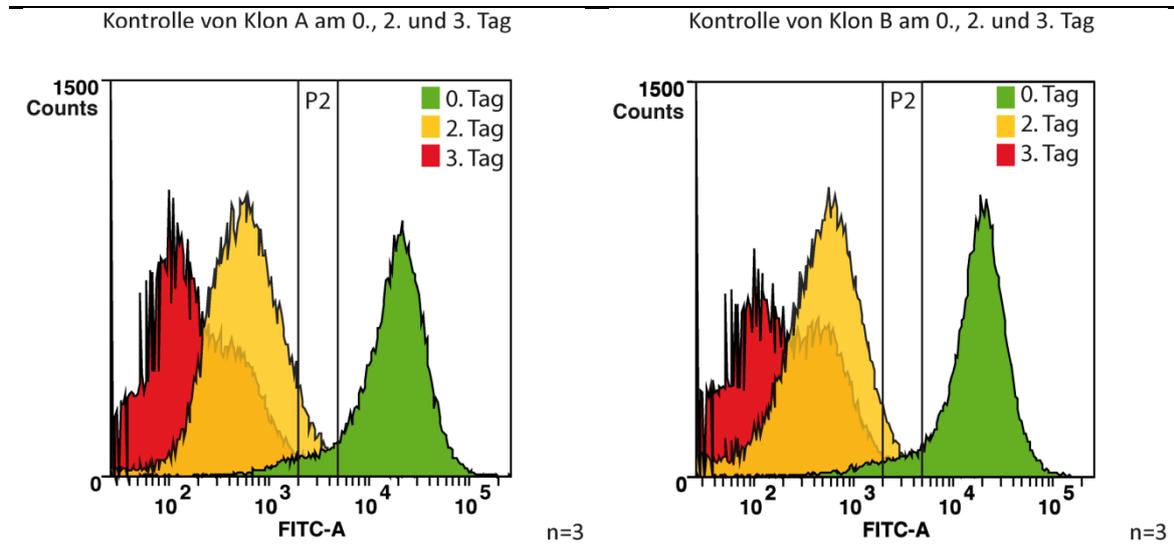


Abbildung 32: FACS-Auswertung von CFSE-markierten ipNP-Zellen am 0., 2. und 3. Tag mit 1 U/ml EPO

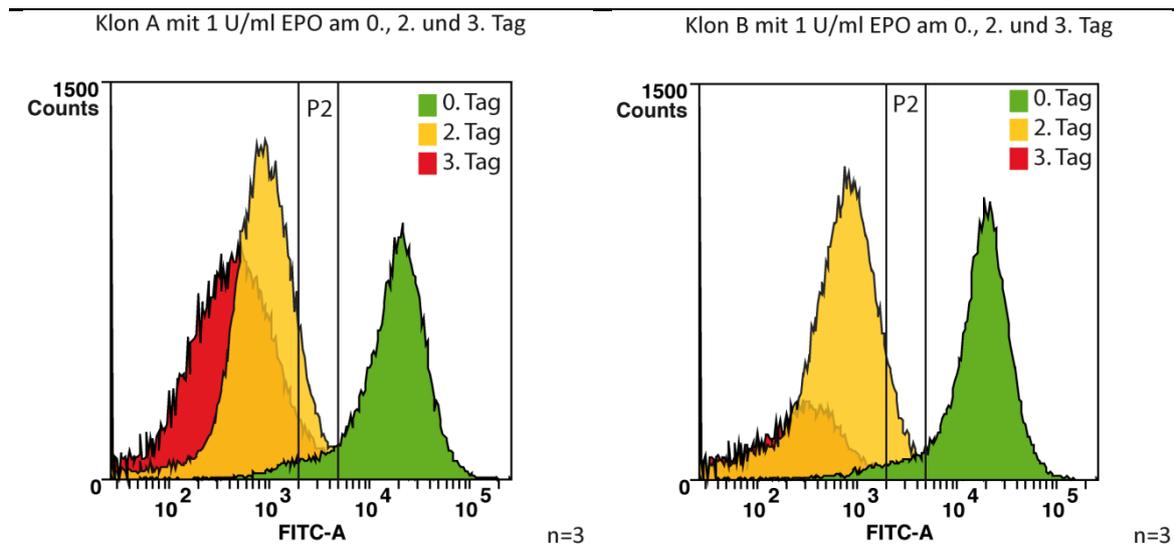
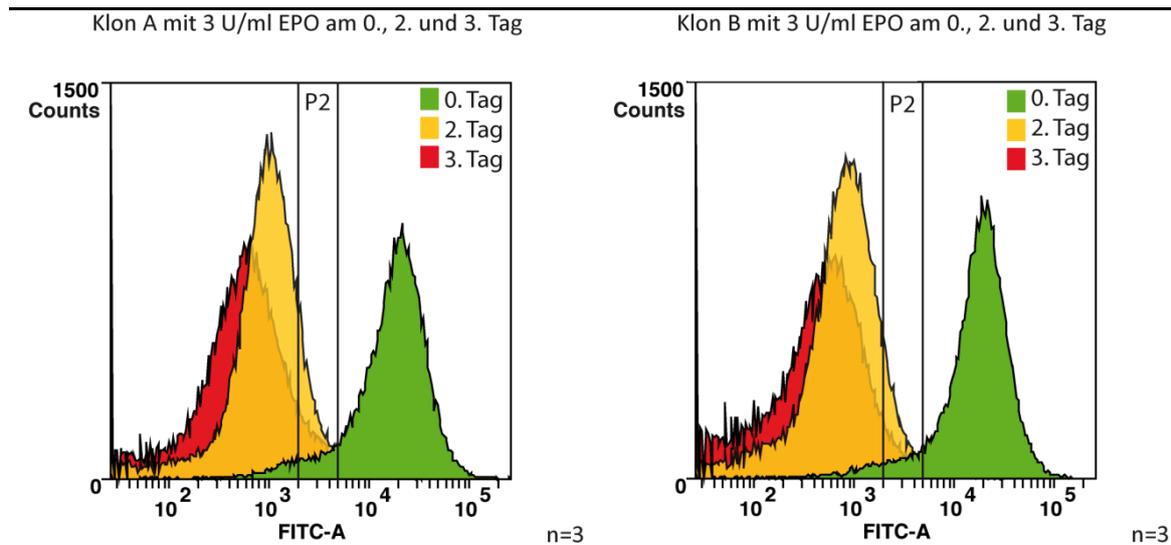


Abbildung 33: FACS-Auswertung von CFSE-markierten ipNP-Zellen am 0., 2. und 3. Tag mit 3 U/ml EPO



Die Linksverschiebung der Zellanzahl, die im Verlauf der FACS-Diagramme ersichtlich ist, lässt sich unter genauerer Beobachtung des P2-Areals und der darin enthaltenen Zellzahlen gut quantifizieren. Die prozentuale Verteilung dieser Werte lässt sich für den 2. und 3. Tag in Abbildung 34 und Abbildung 35 vergleichen. Dabei fällt auf, dass mit steigender EPO-Konzentration die Anzahl der Zellen im P2-Areal zunahm. Dies kann damit begründet werden, dass die Zellen eine höhere CFSE-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe des entsprechenden Tages aufweisen. Dieser Effekt ist bei beiden Klonen gleich und zeigt gut die proliferationshemmende Wirkung, die EPO auf die ipNP-Zellen hat.

Abbildung 34: Prozentuale Verteilung der ipNP-Zellen von Klon A im Areal P2 am 2. und 3. Tag

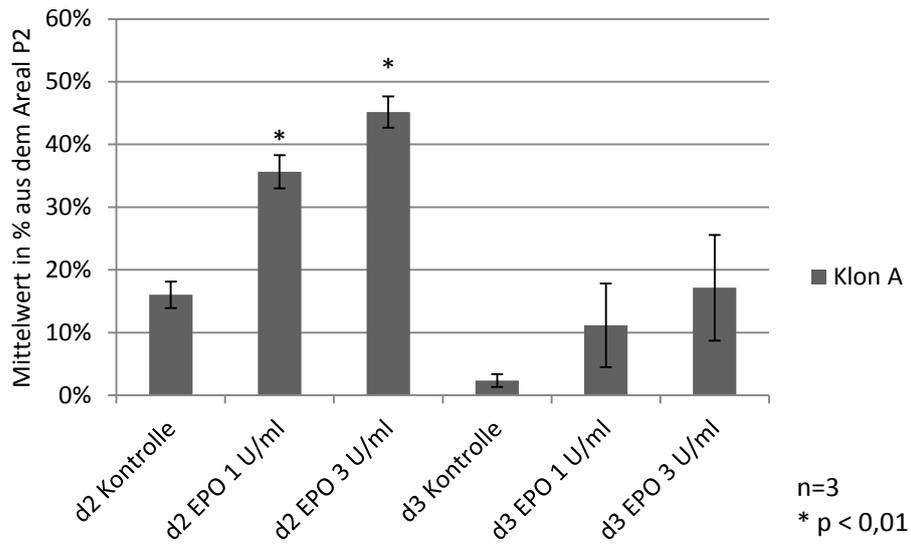
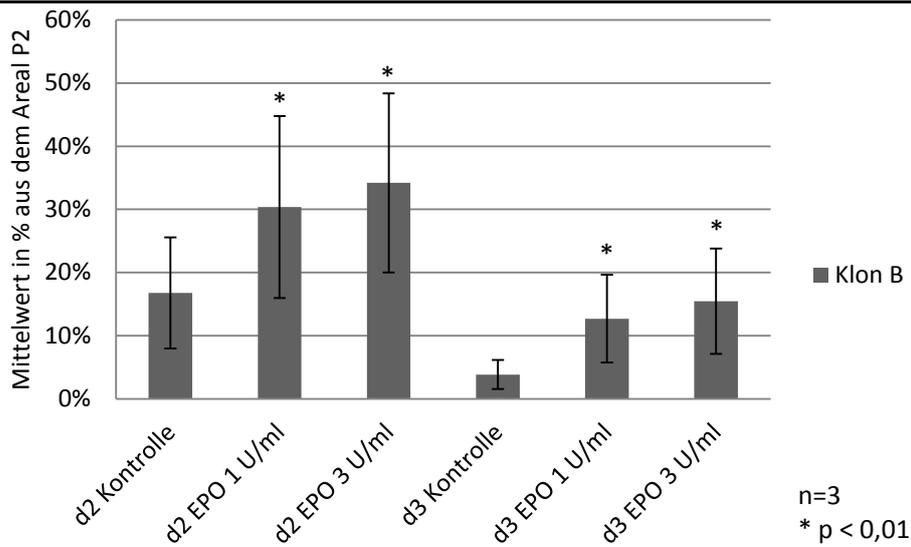


Abbildung 35: Prozentuale Verteilung der ipNP-Zellen von Klon B im Areal P2 am 2. und 3. Tag



## 5. Expression des funktionellen EPO-Rezeptors

Da eine Spezifität der verfügbaren Antikörper gegen den EPO-Rezeptor nicht sicher belegt ist (Elliott, Busse et al. 2006), wurde der Nachweis des EPO-Rezeptors durch die Aktivierung des EPO-rezeptorabhängigen intrazellulären Signalweges, MAPK (ERK1/2), überprüft.

Der Western Blot konnte das Vorhandensein eines EPO-Rezeptors und die Zellsensibilität der ipNP-Zellen auf EPO beweisen. Die Zellen wurden im ersten Versuch für zehn Minuten, beziehungsweise im zweiten Versuch für fünf Minuten mit EPO oder der Kontrollsubstanz behandelt (Tabelle 13). Da die besseren Röntgenfilmbelichtungs-Ergebnisse mit der kürzeren Expositionszeit von fünf Minuten erzielt wurden, wurde auch nur dieser Datensatz ausgewertet und analysiert. Bei jedem Western Blot entstanden zwei Banden. Das Molekül ERK-2 bildete mit einem Gewicht von 42kDa den unteren Bandenanteil, während das Molekül ERK-1, das 44kDa misst, den oberen Bandenanteil bildete. Insgesamt wurden 15 Western Blots erstellt. Da einige Blots keine verwendbaren Ergebnisse lieferten, konnten jedoch nur sechs Western Blots für Klon A und vier Western Blots für Klon B ausgewertet werden. Mögliche Ursachen hierfür werden in der Diskussion dargelegt.

In Abbildung 36 ist ein Western Blot mit beiden Klonen und beiden Antikörpern abgebildet. Der anti-MAPK-Antikörper färbte die phosphorylierte und die unphosphorylierte Form des ERK1/2, der anti-pMAPK-Antikörper dagegen nur die aktivierte, phosphorylierte ERK1/2 Form.

Abbildung 36: Beispiel eines Western Blots

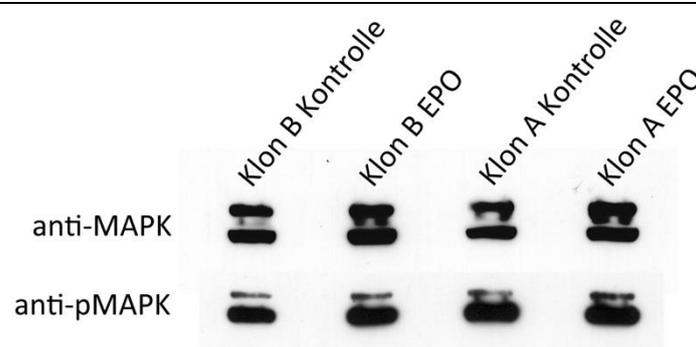
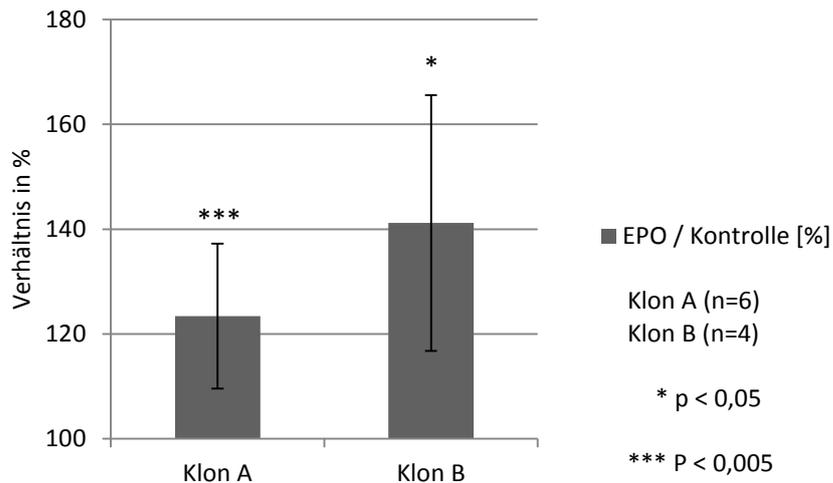


Abbildung 37 zeigt das Endergebnis des Western Blots. Hier ist die unterschiedliche Wirkung von EPO auf die ipNP-Zellen der beiden Klone ersichtlich. Das Verhältnis der phosphorylierten ERK1/2-Form zur gesamten ERK1/2-Form liegt unter EPO im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Klon A bei 123,4% [ $p=0,004$ ] und bei Klon B bei 141,2% [ $p=0,04$ ].

Abbildung 37: Auswertung des Western Blots



## IV) Diskussion

---

Mit Hilfe der Zellkulturversuche konnte gezeigt werden, dass EPO einen Effekt auf die 4-Faktor ipNP-Zellen hat. Alle Ergebnisse werden zunächst in Bezug auf die entsprechenden Versuche diskutiert. Abschließend werden sie hinsichtlich der Fragestellungen dieser Arbeit analysiert und interpretiert.

### 1. Einfluss von EPO auf die Zellviabilität

Die MTT-Substanz wurde zur Bestimmung der gesamten Zellaktivität genutzt, obwohl diese nur auf die Reduktion von *Nicotinamidadenindinukleotidphosphat* (NADPH) und *Nicotinamidadenindinukleotid* (NADH) reagiert, die bei der Glykolyse entsteht. Dennoch zählt der MTT-Versuch nach Mosmann (1983) zu den etablierten Messinstrumenten für die Zellaktivität. Auch Lee, Kim et al. (2011), die ebenso mit induzierten Stammzellen arbeiteten, benutzten dieses Verfahren.

Die Zugabe von EPO in steigender Dosis zeigte eine konzentrationsabhängige Verbesserung des Zellüberlebens der beiden ipNP-Zellklone mit der besten Überlebensrate bei der Konzentration von 1,0 U/ml EPO. Dieser Effekt auf die Zellviabilität nahm jedoch mit zunehmender Expositionsdauer von EPO und mit Zunahme der EPO-Konzentration ab. Die zytoprotektive Wirkung von EPO ist erwartungsgemäß und wurde in früheren Arbeiten in neuronalen Stammzellen und Neuronen nachgewiesen (Shingo, Sorokan et al. 2001, Brines und Cerami 2005, Byts, Samoylenko et al. 2008).

Um noch genauere Ergebnisse zu erzielen, hätte sich eine 12 Stunden Einteilung empfohlen, da bei beiden Klonen, vor allem aber in den Gruppen mit 10 U/ml EPO, eine sprunghafte Abnahme der Zellaktivität von 24 auf 48 Stunden erkennbar ist. Empfehlenswert wären weiterführende Experimente für diesen Zeitraum sowie eine höhere Anzahl an Repetitionen.

## 2. Einfluss von EPO auf die Neurosphären

Der Neurosphären-Versuch sollte die Wirkung von EPO auf die Proliferationsrate der ipNP-Zellen untersuchen. Die Interpretation der Daten ist aufgrund der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Klone auf EPO erschwert. Basierend auf die bereits publizierten Arbeiten an neuronalen Stammzellen (Shingo, Sorokan et al. 2001) hätte man bei diesem Versuch erwartet, dass mit der Zunahme der EPO-Konzentration proportional eine Abnahme der Sphärengröße erfolgen würde. Dies hätte gezeigt, dass die Proliferation durch eine zunehmende EPO-Dosis gehemmt wird. Die Daten von Klon A sind diesbezüglich wenig eindeutig. Primär fällt auf, dass Klon A im Vergleich zu Klon B bereits ohne EPO-Einfluss eine höhere Affinität zur Bildung von größeren Sphären zeigt. Das könnte eine Erklärung sein, weshalb Klon A höhere Mengen an EPO zur Proliferationshemmung benötigte als Klon B. Erst bei einer Konzentration von 1 U/ml EPO überstieg die Anzahl der kleineren Sphären zahlenmäßig die Anzahl der größeren Neurosphären. Bei Klon B kann der erwartete Effekt eindeutig nachgewiesen werden. Mit steigender EPO-Konzentration reduziert sich der Anteil der Sphären, die einen Durchmesser  $>100\mu\text{m}$  haben.

Eine mögliche Ursache für die hohen Standardabweichungen der Daten, ersichtlich in Abbildung 13 und Abbildung 14, kann neben der geringen Anzahl von drei Versuchswiederholungen die ungenaue Auswertung der Sphären sein. Denn größere oder ovale Sphären besitzen keinen eindeutigen Durchmesser und wurden stets am kleinstmöglichen Durchmesser vermessen.

Durch den Versuch zur Zellüberlebensquote sollte geprüft werden, ob durch eine zunehmende Konzentration von EPO die Anzahl an toten Zellen sinkt und äquivalent die Anzahl an lebendigen Zellen zunimmt. Dieser Effekt ließ sich so weder mit den Daten der Zellanzahlen aus Abbildung 15, noch mit denen aus Abbildung 16 belegen. Bei Klon A liegen die prozentualen Verhältnisse zwischen toten und lebendigen Zellen zwar in allen Gruppen bei circa 12%, daraus lässt sich aber weder eine Zunahme an Überlebenden, noch eine Abnahme von toten Zellen quantifizieren. Eine mögliche Erklärung könnten die insgesamt geringen Zellzahlen und die daraus resultierenden Ungenauigkeiten bei der Neubauer-Zählkammer sein. Bei Klon B wurde kein

konstanter Prozentwert gefunden. Die Schwankungen zwischen 7 und 13% machen es schwierig, eindeutige Schlussfolgerungen zu ziehen. Insgesamt sind die Zellen von Klon B im Vergleich zu Klon A in diesem Versuch deutlich besser gewachsen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass EPO zwar einen hemmenden Effekt auf das Wachstum der Neurosphären hat, dieser aber nicht proportional zur EPO-Konzentration ausfällt (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14). Die Differenz der Sphärenzahl ist im Vergleich zwischen den Gruppen von 0,1 U/ml und 1 U/ml EPO deutlich größer als die Differenz zwischen der Kontroll- und der 0,1 U/ml EPO-Gruppe. Da die Standardabweichungen bei beiden Gruppen teilweise recht hoch sind und aussagekräftige Zwischenwerte fehlen, ist es schwierig, das Abhängigkeitsverhältnis zwischen Proliferation und EPO zu bestimmen. Auch die unterschiedlichen Reaktionen der beiden Klone auf EPO erschweren die Interpretation des Gesamtergebnisses.

Zur Untersuchung und Interpretation von Trendverläufen wären Zwischengruppen mit beispielsweise 0,5 U/ml EPO sowie eine Zwischenbilanzierung nach 3 Tagen hilfreich gewesen.

### 3. Einfluss von EPO auf das Neuritenwachstum

Mittels des Zellfortsatz-Versuchs sollte die Differenzierung in der Monolayer-Kultur geprüft werden, wobei die Länge und die Anzahl der Fortsätze als Kriterien für den Grad der Differenzierung und der Proliferation verwendet wurden. Dazu wurden die Zellen nach Fortsatzlänge, Bipolarität und Anzahl der Fortsätze untersucht. Dass die dazu verwendete Methode anhand des Computerprogramm *ImageJ* und dem *Plug-In NeuroJ* für diesen Versuch geeignet ist, hatten bereits Popko, Fernandes et al. (2009) gezeigt.

Die Daten der Versuche zur Bestimmung der Bipolarität von Klon A und Klon B sind schwer interpretierbar, da sich keine eindeutige Richtung erkennen lässt und die Daten hohe Standardabweichungen aufweisen. Die Schwankungen in den Daten können zum einen durch die Messmethode verursacht sein, denn als *bipolare* Zellen wurden nur diejenigen gewertet, bei denen sich Axon und Dendrit genau 180° gegenüber lagen. Alle anderen Zellen würden zur Kategorie *unipolar* gezählt. Eine höhere Anzahl an

Versuchswiederholungen hätte zudem eine deutlichere Tendenz zeigen können. Die hohe Variabilität des Neuritenwachstums könnte aber auch auf ein relativ unreifes Stadium der neuronalen Differenzierung der ipNP-Zellen hinweisen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei nur zweimaliger Durchführung und den teilweisen hohen Standardabweichungen die Aussagekraft dieses Zellfortsatz-Versuchs begrenzt ist.

Zusätzlich verhielten sich die Klone bei diesen Versuchen im Wachstum unterschiedlich. Für genauere Erkenntnisse, welche zusätzlichen Wirkungen EPO auf das Neuritenwachstum hat, wären weitere Experimente hilfreich. Diese müssten dann in mehreren Versuchen mit unterschiedlichen EPO-Gruppen wie 1 und 2 U/ml sowie in mindestens vierfacher Ausführung durchgeführt werden.

#### **4. Einfluss von EPO auf die Zellproliferation**

Mit den FACS-Versuchen sollte untersucht werden, ob sich die Proliferationsrate der ipNP-Zellen unter dem Einfluss von EPO ändert. Dies konnte durch diesen Versuch bewiesen werden, da bei beiden Klonen eine höhere CFSE-Konzentration in den Zellen der EPO-Gruppe nach drei Tagen gemessen werden konnte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass im Vergleich zur Gruppe ohne EPO-Einfluss eine geringere Anzahl an Zellteilungen stattgefunden hat.

Auffällig ist die geringe Zellanzahl von Klon B am 3. Tag (Abbildung 32). Die Erklärung für diesen Rückgang könnte daran liegen, dass nur 1.643 der angesetzten 10.000 Zellen gezählt wurden. Da die Ergebnisse von verschiedenen Replikationen gemittelt wurden, spiegelt sich diese Differenz im Gesamtergebnis wider.

In Abbildung 33 ist die geringere Proliferation unter 3 U/ml EPO durch einen ähnlichen Kurvenverlauf am 2. und 3. Tag erkennbar.

Bessere Ergebnisse hätten mit einem kleineren Zeitraster von beispielsweise 12 Stunden erzielt werden können, beziehungsweise auch mit einem gegebenenfalls anders definierten P1-Auswahlbereich im FSC-A Diagramm (siehe Abbildung 29). Der

für diese Versuche verwendete Auswahlbereich wurde von Versuchen mit ähnlichen Zellen abgewandelt.

Auch in diesen Experimenten wurde die EPO-Konzentration von 3 U/ml verwendet, weil sich bereits bei der Etablierung des Experiments zeigte, dass die ipNP-Zellen unter der Wirkung von 10 U/ml EPO kaum wachsen. Stattdessen hätte eine weitere Gruppe mit 0,1 U/ml EPO verwendet werden können.

Bei Betrachtung aller Ergebnisse der FACS-Versuche, lässt sich eine proliferationshemmende Wirkung von EPO auf die ipNP-Zellen beobachten. Eine exakte Quantifizierung, um welchen Faktor die Zellteilungen bei der Proliferation gehemmt wird, ist mit der verwendeten Methode jedoch nicht möglich.

## **5. Expression des funktionellen EPO-Rezeptors**

Der Western Blot zeigt eine vermehrte Phosphorylierung der ERK-1- und ERK-2-Kinasen durch die Stimulation mit EPO. Daraus lässt sich ableiten, dass ipNP-Zellen mit einer bei Neuronen bekannten EPO-Rezeptor assoziierten Signalkaskade (Sirén und Ehrenreich 2001, Brines und Cerami 2005, Byts, Samoylenko et al. 2008) auf EPO reagieren und deshalb höchstwahrscheinlich funktionelle EPO-Rezeptoren aufweisen.

Die Ergebnisse dieses Versuchs unterscheiden sich trotz präziser und protokollbasierter Ausführung. Das kann zum einen durch unterschiedlich starkes Zellwachstum und der damit einhergehenden schwankenden Rezeptoranzahl bei ähnlichen Proteinmengen von 10-15µg verursacht sein. Eine andere Fehlerursache kann die Verwendung unterschiedlich lang belichteter Röntgenfilme sein.

Zusätzlich reagierten die beiden Klone unterschiedlich auf EPO. Die ipNP-Zellen von Klon B zeigten durch die Stimulation von EPO eine deutliche Zunahme der aktivierten Rezeptordichte auf 141,2%, wohingegen Klon A nur 123,4% aufwies.

Das könnte bedeuten, dass Klon B sensitiver als Klon A auf EPO reagiert. Auf die Gesamtergebnisse übertragen könnte dies eine mögliche Erklärung für die Varianz der Empfindlichkeit der Klone A und B in den anderen Versuchen sein.



Tabelle 27: Spezifität der RT-PCR Marker

Marker	Vorkommen
<b>nanog</b>	Marker in ESC dessen Expression mit zunehmender Differenzierung abnimmt
<b>rex1</b>	Marker in ESC, der zeigt, welche Zellen noch nicht differenziert sind
<b>fgf4</b>	markiert im Ektoderm die apikale ektodermale Randleiste von Gliedmaßen
<b>nestin</b>	markiert neuroepitheliale Stammzellen in der frühen Embryogenese
<b>musashi</b>	markiert neurale Vorläuferzellen
<b>otx1</b>	murine ESC und pyramidale Neurone im zerebralen Cortex
<b>dlx5</b>	markiert Zellen im Differenzierungsstadium und kontrolliert die Differenzierung von GABA-Neuronen
<b>hoxa2</b>	ist in Zellen aktiv deren Zellposition auf der ventral-posterioren Achse liegt

Insgesamt sind die in den Experimenten verwendeten ipNPC den aus murinen embryonal differenzierten Stammzellen entstandenen pNPC sowie den murinen neuronalen Stammzellen im entsprechenden Zellstadium sehr ähnlich und unterscheiden sich nur in der Aktivität einzelner Gene.

## V) Zusammenfassung und Aussicht

---

Das Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der Wirkung von EPO auf die neuronale Differenzierung, das Zellüberleben und -Wachstum von ipNP-Zellen. Die erste Frage war, ob EPO auch einen Einfluss auf die neuronale Differenzierung der ipNP-Zellen hat. Die verstärkte Differenzierung der ipS-Zellen durch EPO konnte durch die Neuritenwachstums-Versuche erfasst werden. Die Fortsatzanzahl der Zellen ist in den EPO-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen erhöht. EPO fördert in diesen Versuchen die Ausbildung des ersten Fortsatzes sowie dessen Längenwachstum und hemmt folglich die Ausbildung weiterer Fortsätze. Bei den uni- und bipolaren Experimenten zeigten sich bezüglich der Proliferation keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen der EPO-Konzentration und dem Neuritenwachstum.

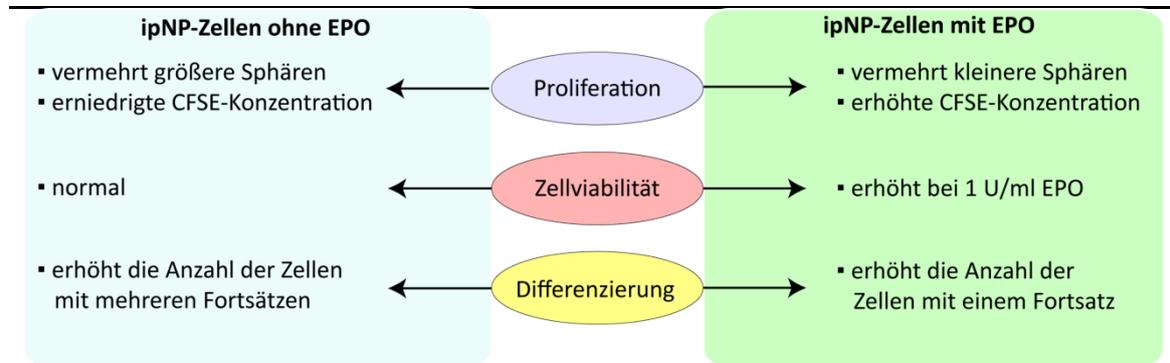
Die zweite Frage war, ob EPO das Zellüberleben der ipNP-Zellen beeinflusst. Die Zellviabilität konnte durch den Einsatz von 1 U/ml EPO im 24 Stunden MTT-Versuch am meisten gesteigert werden.

Die dritte Frage war, welche Wirkung EPO auf die Proliferation der ipNP-Zellen hat. Die Proliferation konnte im FACS-Versuch am intensivsten mit der EPO-Konzentration von 3 U/ml gehemmt werden. Ebenso zeigt der Neurosphären-Versuch, dass EPO die Bildung kleiner Neurosphären fördert und die Bildung größerer Sphären über 100µm hemmt.

Insgesamt profitierten bei diesen Versuchsdurchführungen die Gruppen am meisten, die mit einer EPO-Dosis zwischen 1 und 10 U/ml behandelt wurden. Eine genauere Aussage zur EPO-Dosierung konnte aufgrund des dekadischen Abstandes nicht ermittelt werden. Dass dieses Optimum unter 10 U/ml liegt, zeigt die abnehmende Zellviabilität bei den MTT-Versuchen nach einer zweitägigen Therapie mit 10 U/ml EPO. Eine Erklärung für die unterschiedliche Reaktion der beiden Klone wäre, dass jeder Klon und jede Passagierungsstufe der ipS-Zellen ein eigenes EPO-Optimum hat. Durch weiterführende Experimente mit unterschiedlichen EPO-Dosen wäre es möglich, tieferreichende Erkenntnisse über die Effekte der jeweiligen EPO-Konzentration zu gewinnen.

Die Abbildung 39 zeigt zusammenfassend die Wirkung von EPO auf ipNP-Zellen.

Abbildung 39: Schematische Zusammenfassung der Wirkung von EPO auf ipNP-Zellen



Zukünftig werden sowohl induzierte pluripotente Stammzellen, als auch EPO einen wichtiger Teil der neuronalen Forschung sein.

IpS-Zellen könnten zukünftig vielleicht zur Behandlung oder Heilung von Krankheiten verwendet werden, wie beispielsweise der *amyotrophen Lateralsklerose (ALS)* oder anderen Motoneuronenerkrankungen (Toma, Shettar et al. 2015) sowie zur Schadensreduktion, nach Bestrahlung von Hirntumoren (Piao, Major et al. 2015). Die entscheidende Frage allerdings bleibt, ob die viral induzierten pluripotenten Stammzellen für *in vivo*- Experimente ausreichend geeignet sind und dabei die Vorteile der leichten, effektiven Erzeugung den Nachteil der erhöhten Tumorbildung aufwiegen.

Bei EPO überwiegen zum jetzigen Zeitpunkt die positiven Ergebnisse mit der richtigen Dosierung und der entsprechenden Strategie eindeutig die Negativen. Allerdings zeigen widersprüchliche Angaben in der Fachliteratur, dass es bis jetzt noch keinen Konsens zu einer konkreten Dosis oder einem bestimmten Zeitpunkt gibt. Dies wäre für eine zukünftig standardisierte Behandlung eines Insultes oder Infarktes notwendig. EPO könnte bald ein neuer Therapieansatz von Alzheimer, neurodegenerativen Krankheiten, neonatalen Gehirnhypoxien, wie auch Neuro-AIDS bei Kindern sein (Merelli, Czornyj et al. 2015). Dies wird durch die anti-apoptotische, anti-inflammatorische, anti-oxidative und proliferationshemmende Wirkung von EPO ermöglicht.

Das Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der Wirkung von EPO auf ipS-Zellen. Einige Erkenntnisse konnten durch diese Arbeit erzielt werden, wenngleich aber noch Vieles auf diesem Gebiet zu erforschen bleibt.

## VI) Danksagung

---

Mein herzlicher Dank gilt all jenen, die mir diese Arbeit ermöglicht haben und mich dabei mit Rat und Tat unterstützten.

Ganz besonders Frau Professorin Sirén für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie für die wertvolle Unterstützung bei der Konzeption und Durchführung dieser Arbeit. Herzlichen Dank für die vielen guten Ratschläge und die hilfsbereite Betreuung.

Herrn Doktor Offen, der mich während der Forschungsphase zuverlässig begleitete. Vielen Dank für die Überlassung der PCR-Daten und die gemeinsame Entwicklung der Versuchsaufbauten.

Herrn Professor Müller und seiner Arbeitsgemeinschaft für die Möglichkeit der Gerätenutzung und für die umfassende Expertise beim Etablieren der Versuche.

Frau Gado, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und aufmunternde Worte fand, wenn Versuche anders als geplant abliefen.

Meinen Eltern, die mir das Studium und diese Dissertation ermöglicht haben und mich stets unterstützten.

Meiner Freundin Ronja danke ich für Ihre Geduld und die vielen hilfreichen Anregungen und Tipps.

Meiner Schwester Juliane sowie meinen Freunden Sabrina und Stephan, die mich bei fachlichen Herausforderungen anspornten und mir oft die richtige Richtung wiesen.

## VII) Literaturverzeichnis

---

Abate-Shen, C. (2003). "Homeobox genes and cancer: new OCTaves for an old tune." Cancer Cell **4**(5): 329-330.

Adams, J., et al. (1984). "The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice." Nature **318**(6046): 533-538.

Alnaeeli, M., et al. (2012). "Erythropoietin in brain development and beyond." Anatomy research international **2012**.

Avilion, A. A., et al. (2003). "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." Genes & development **17**(1): 126-140.

Banks, W. A., et al. (2004). "Passage of erythropoietic agents across the blood–brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa." European journal of pharmacology **505**(1): 93-101.

Bass, A. J., et al. (2009). "SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas." Nature genetics **41**(11): 1238-1242.

Bennett, C. L., et al. (2008). "Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia." Jama **299**(8): 914-924.

Brines, M. und A. Cerami (2005). "Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system." Nature Reviews Neuroscience **6**(6): 484-494.

Byts, N., et al. (2008). "Essential role for Stat5 in the neurotrophic but not in the neuroprotective effect of erythropoietin." Cell Death & Differentiation **15**(4): 783-792.

Chen, Z.-Y., et al. (2007). "Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation." Journal of Biological Chemistry **282**(35): 25875-25883.

Chikuma, M., et al. (2000). "Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus." American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism **279**(6): E1242-E1248.

Choi, H. W., et al. (2014). "Neural stem cells differentiated from iPS cells spontaneously regain pluripotency." Stem Cells **32**(10): 2596-2604.

Dame, C., et al. (2000). "Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system." Developmental Brain Research **125**(1): 69-74.

Davis, A. C., et al. (1993). "A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice." Genes & development **7**(4): 671-682.

Digicaylioglu, M., et al. (1995). "Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain." Proceedings of the National Academy of Sciences **92**(9): 3717-3720.

Ehrenreich, H., et al. (2005). "A hematopoietic growth factor, thrombopoietin, has a proapoptotic role in the brain." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(3): 862-867.

Elliott, S., et al. (2006). "Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression." Blood **107**(5): 1892-1895.

Feng, Q., et al. (2010). "Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence." Stem Cells **28**(4): 704-712.

Fusaki, N., et al. (2009). "Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome." Proceedings of the Japan Academy, Series B **85**(8): 348-362.

Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." Science **287**(5457): 1433-1438.

Grimm, G., et al. (1990). "Improvement of brain function in hemodialysis patients treated with erythropoietin." Kidney Int **38**(3): 480-486.

Henke, M., et al. (2003). "Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial." The Lancet **362**(9392): 1255-1260.

Hu, B.-Y., et al. (2010). "Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(9): 4335-4340.

Huangfu, D., et al. (2008). "Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds." Nature biotechnology **26**(7): 795-797.

Jelkmann, W. (2004). "Molecular biology of erythropoietin." Internal medicine **43**(8): 649-659.

Kang, L., et al. (2009). "iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos." Cell stem cell **5**(2): 135-138.

Katz, J. P., et al. (2002). "The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon." Development **129**(11): 2619-2628.

Katz, O., et al. (2007). "Erythropoietin enhances immune responses in mice." European journal of immunology **37**(6): 1584-1593.

Kim, D., et al. (2009). "Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins." Cell stem cell **4**(6): 472.

Kim, J. B., et al. (2009). "Generation of induced pluripotent stem cells from neural stem cells." Nature protocols **4**(10): 1464-1470.

Kim, J. B., et al. (2009). "Generation of induced pluripotent stem cells from neural stem cells." Nature protocols **4**(10): 1464-1470.

Lee, C. H., et al. (2011). "The generation of iPS cells using non-viral magnetic nanoparticlebased transfection." Biomaterials **32**(28): 6683-6691.

Lee, E. X., et al. (2011). "Glioma gene therapy using induced pluripotent stem cell derived neural stem cells." Molecular Pharmaceutics **8**(5): 1515-1524.

Li, J.-Y., et al. (2008). "Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair." Trends in neurosciences **31**(3): 146-153.

Li, Y., et al. (1996). "Erythropoietin receptors are expressed in the central nervous system of mid-trimester human fetuses." Pediatric research **40**(3): 376-380.

Liu, Z.-Y., et al. (1994). "Tissue specific expression of human erythropoietin receptor in transgenic mice." Developmental biology **166**(1): 159-169.

Masuda, S., et al. (1994). "A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes." Journal of Biological Chemistry **269**(30): 19488-19493.

McClure, M. M., et al. (2007). "Auditory processing and learning/memory following erythropoietin administration in neonatally hypoxic-ischemic injured rats." Brain research **1132**: 203-209.

Merelli, A., et al. (2015). "Erythropoietin as a new therapeutic opportunity in brain inflammation and neurodegenerative diseases." International Journal of Neuroscience.

Miura, K., et al. (2009). "Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines." Nature biotechnology **27**(8): 743-745.

Monk, M. und C. Holding (2001). "Human embryonic genes re-expressed in cancer cells." Oncogene **20**(56): 8085-8091.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of immunological methods **65**(1): 55-63.

Nichols, J., et al. (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell **95**(3): 379-391.

Nie, Z., et al. (2012). "c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells." Cell **151**(1): 68-79.

Niwa, H., et al. (2000). "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells." Nature genetics **24**(4): 372-376.

Offen, N., et al. (2013). "Effects of Erythropoietin in Murine-Induced Pluripotent Cell-Derived Panneural Progenitor Cells." Molecular Medicine **19**(1): 399.

Ogilvie, M., et al. (2000). "Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts." Journal of Biological Chemistry **275**(50): 39754-39761.

Okita, K., et al. (2010). "Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors." Nature protocols **5**(3): 418-428.

Okita, K., et al. (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." Nature **448**(7151): 313-317.

Okita, K. und S. Yamanaka (2011). "Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **366**(1575): 2198-2207.

Pearson, R., et al. (2008). "Krüppel-like transcription factors: a functional family." The international journal of biochemistry & cell biology **40**(10): 1996-2001.

Pevny, L. H. und S. K. Nicolis (2010). "Sox2 roles in neural stem cells." The international journal of biochemistry & cell biology **42**(3): 421-424.

Piao, J., et al. (2015). "Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors remyelinate the brain and rescue behavioral deficits following radiation." Cell stem cell **16**(2): 198-210.

Polo, J. M., et al. (2010). "Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells." Nature biotechnology **28**(8): 848-855.

Popko, J., et al. (2009). "Automated analysis of NeuronJ tracing data." Cytometry Part A **75**(4): 371-376.

QIAGEN. "Sample & Assay Technologies." <https://www.qiagen.com/geneglobe/static/images/Pathways/Erythropoietin%20Pathway.jpg>. 2016, from <https://www.qiagen.com/de/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=165>.

Robert, C. D. S. E. J. und D. Christensena (2001). "The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential." Biol Neonate **79**: 228-235.

Rowland, B. D., et al. (2005). "The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene." Nature cell biology **7**(11): 1074-1082.

Seaberg, R. M. und D. van der Kooy (2003). "Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions." Trends in neurosciences **26**(3): 125-131.

Shingo, T., et al. (2001). "Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells." The journal of Neuroscience **21**(24): 9733-9743.

Sirén, A.-L. und H. Ehrenreich (2001). "Erythropoietin—a novel concept for neuroprotection." European archives of psychiatry and clinical neuroscience **251**(4): 179-184.

Sirén, A.-L., et al. (2001). "Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(7): 4044-4049.

Solter, D. (2006). "From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research." Nature Reviews Genetics **7**(4): 319-327.

Spandou, E., et al. (2005). "Erythropoietin prevents long-term sensorimotor deficits and brain injury following neonatal hypoxia–ischemia in rats." Brain research **1045**(1): 22-30.

Stadtfield, M., et al. (2008). "Induced pluripotent stem cells generated without viral integration." Science **322**(5903): 945-949.

Takahashi, K. und S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.

Thier, M., et al. (2012). "Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells." Cell stem cell **10**(4): 473-479.

Toma, J. S., et al. (2015). "Motoneurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Develop Mature Phenotypes Typical of Endogenous Spinal Motoneurons." The journal of Neuroscience **35**(3): 1291-1306.

Vidal, S. E., et al. (2015). "F-Class Cells: New Routes and Destinations for Induced Pluripotency." Cell stem cell **16**(1): 9-10.

Vierbuchen, T., et al. (2010). "Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors." Nature **463**(7284): 1035-1041.

Warren, L., et al. (2010). "Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA." Cell stem cell **7**(5): 618-630.

Yamada, M., et al. (2011). "Erythropoietin protects against apoptosis and increases expression of non-neuronal cell markers in the hypoxia-injured developing brain." The Journal of pathology **224**(1): 101-109.

Yamanaka, S. (2007). "Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells." Cell stem cell **1**(1): 39-49.

Yazihan, N., et al. (2008). "Erythropoietin improves oxidative stress following spinal cord trauma in rats." Injury **39**(12): 1408-1413.

Ying, Q.-L., et al. (2003). "Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture." Nature biotechnology **21**(2): 183-186.

Yu, J., et al. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science **318**(5858): 1917-1920.

Yu, X., et al. (2002). "Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development." Development **129**(2): 505-516.

Zaehres, H., et al. (2010). "Induced pluripotent stem cells." Methods in enzymology **476**: 309-325.