

Einfluss von Erythropoietin und Erythropoietin-Isoformen auf die murine Neurogenese

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors
der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Simone Rolfes

aus Ankum

2015

Diese Arbeit wurde von Dezember 2011 bis April 2015 unter der Leitung von Prof. Dr. med. Josef Priller im Labor für Molekulare Psychiatrie der Charité-Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Josef Priller
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Stephan Sigrist

Disputation am 18.01.2016

Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Josef Priller für die Überlassung des spannenden Themas sowie für die kontinuierliche Unterstützung und kritische Diskussion dieses Projekts.

Bei Prof. Dr. Stephan Sigrist möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme der Gutachtertätigkeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Chotima Böttcher für die hervorragende fachliche Betreuung dieser Doktorarbeit, die vielen Ratschläge und Diskussionen, welche mir immer wieder neue Perspektiven aufzeigten.

Bei allen Mitarbeitern sowie Ehemaligen der AG Priller möchte ich mich für die schöne Zeit und das gute Arbeitsklima bedanken. Ich habe immer sehr gerne mit Euch zusammengearbeitet! Mein spezieller Dank geht an Jasmin Jamal-EI-Din, Christian Böttcher, Ekaterini-Maria Lyras, Dr. Francisco Fernández-Klett, Martina Wasser und Eduardo Matute für die großartige Hilfe bei der technischen Umsetzung dieser Arbeit.

Zudem möchte ich mich bei Dr. Gisela Lättig-Tünnemann für die vielen hilfreichen Tipps hinsichtlich der Präparation lentiviraler Vektoren bedanken. Susanne Müller danke ich für die umfangreiche Einarbeitung und Hilfestellung am MRT. Des Weiteren möchte ich mich bei Ingo Przesdzing für die geduldige Beantwortung aller theoretischen und praktischen Fragen bei der Umsetzung der stereologischen Auswertung dieses Projekts bedanken.

Für die 2½-jährige finanzielle Unterstützung dieser Arbeit durch das Elsa-Neumann-Stipendium des Landes Berlin bedanke ich mich bei allen Verantwortlichen. Ebenso möchte ich mich bei der Kommission für Nachwuchsförderung der Charité Berlin bedanken, die mir aufgrund der Gewährung eines Abschlussstipendiums ermöglichte, meine Doktorarbeit erfolgreich zu beenden.

Marcus, danke für Deinen Optimismus und dass Du immer die richtigen Worte zur richtigen Zeit findest.

Mein letztes Dankeschön gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich immer in meinen Plänen unterstützt haben und mir dadurch erst diesen Weg ermöglichten. Diese Arbeit ist für Euch!

Inhaltsverzeichnis

1.EINLEITUNG	1
1.1 Die adulte Neurogenese	1
1.1.1 Neuronale Stammzellen	1
1.1.2 Die adulte Neurogenese der subventrikulären Zone (SVZ)	2
1.1.3 Die adulte Neurogenese der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus dentatus.....	5
1.1.4 Die adulte Neurogenese bei Chorea Huntington	7
1.2 Einfluss von Erythropoietin (EPO) auf die Neurogenese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen	9
1.3 EPO-Derivate und EPO-Isoformen	12
1.4 EPO – Ein gentherapeutischer Ansatz für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen	17
1.4.1 Lentivirale Vektoren	17
1.5 Fragestellung	22
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.2 Anästhesie und Analgesie	26
2.1.3 Antikörper	26
2.1.4 Kits	28
2.1.5 Primer	28
2.1.6 Medien, Puffer und Lösungen	29
2.1.7 Verbrauchsmaterial und Geräte	32
2.1.8 Software.....	34
2.2 Methoden	35
2.2.1 Neuronale Stamm- und Vorläuferzellen (NSCs/NPCs).....	35
2.2.2 Nachweis der Expression von endogenem murinem vEPO in NSCs/NPCs auf RNA-Ebene .	35
2.2.2.1 RNA-Isolierung	35
2.2.2.2 DNase-Verdau und cDNA-Synthese	36
2.2.2.3 <i>Semi-nested</i> Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
2.2.2.4 Analytischer Verdau	37
2.2.3 Nachweis von endogenem murinem vEPO auf Protein-Ebene	38
2.2.3.1 Proteinisolierung	38
2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western-Blot	38

Inhaltsverzeichnis

2.2.4 Produktion von rekombinatem EPO/vEPO.....	39
2.2.5 Analyse des Einflusses von rekombinatem EPO/vEPO auf NSCs/NPCs <i>in vitro</i>	41
2.2.5.1 Überlebens-Assay.....	41
2.2.5.2 Proliferations-Assay.....	41
2.2.5.3 Differenzierungs-Assay und Quantifizierung von Zellfortsätzen DCX-positiver Zellen.....	41
2.2.6 Klonierung hEPO/vEPO-kodierender lentiviraler Konstrukte.....	42
2.2.6.1 Plasmidpräparation.....	43
2.2.6.2 Restriktionsverdau.....	43
2.2.6.3 Dephosphorylierung.....	44
2.2.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
2.2.6.5 Ligation.....	45
2.2.6.6 Transformation.....	45
2.2.7 Produktion, Titration und Testung hEPO/vEPO-kodierender lentiviraler Partikel.....	45
2.2.7.1 Produktion lentiviraler Partikel in HEK293-Zellen.....	45
2.2.7.2 Bestimmung des Virustiters.....	46
2.2.7.3 Lentivirale Transduktion von NSCs/NPCs.....	48
2.2.8 Analyse des Einflusses hEPO/vEPO-kodierender lentiviraler Partikel auf die Neurogenese <i>in vivo</i>	49
2.2.8.1 Tiere.....	49
2.2.8.2 Genotypisierung und CAG-Repeat-Bestimmung.....	49
2.2.8.3 Intraventrikuläre Injektion (ICV) hEPO/vEPO-kodierender lentiviraler Partikel.....	49
2.2.8.4 BrdU-Markierung proliferierender Zellen.....	50
2.2.8.5 Körpergewicht – Verlaufsmessung.....	50
2.2.8.6 Magnetresonanztomographie (MRT) – Volumenbestimmung.....	51
2.2.8.7 Verhaltenstests.....	51
2.2.8.8 Bestimmung des Hämatokrits.....	53
2.2.8.9 Transkardiale Perfusion.....	54
2.2.8.10 <i>Real-time</i> PCR.....	54
2.2.8.11 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	56
2.2.8.12 Immunhistochemie.....	57
2.2.8.13 Quantifizierung immunhistochemisch markierter Zellen im Gyrus dentatus (DG) und der subventrikulären Zone (SVZ).....	58
2.2.8.14 Quantifizierung der Zellfortsätze und der Migrationsfähigkeit DCX-exprimierender Zellen innerhalb des hippocampalen DG.....	60
2.2.8.15 Durchflusszytometrie (FACS; Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung).....	60
2.2.9 Statistik.....	62
3. ERGEBNISSE.....	63
3.1 Expressionsanalyse von murinem EPO und vEPO.....	63
3.1.1 Nachweis von mS-Transkripten in <i>ex vivo</i> kultivierten neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen (NSCs/NPCs).....	63

Inhaltsverzeichnis

3.1.2 Charakterisierung der basalen Proteinexpression von murinem EPO und vEPO	65
3.2 Einfluss von EPO und vEPO auf die Neurogenese ex vivo	67
3.2.1 Rekombinantes humanes EPO und murines vEPO fördern das Überleben ex vivo kultivierter NSCs/NPCs	67
3.2.2 Rekombinantes hEPO und vEPO fördern die Differenzierung von Neuroblasten in vitro	68
3.3 Einfluss von lentiviral exprimiertem hEPO und vEPO auf die murine Neurogenese in vivo 72	72
3.3.1 Lentiviral induzierte Expression von hEPO und vEPO in NSCs/NPCs.....	72
3.3.2 Stabile Transgenexpression 3 Tage und 30 Tage nach intraventrikulärer Injektion (ICV) hEPO/vEPO-kodierender lentiviraler Partikel	74
3.3.3 Die lentiviral vermittelte Expression von hEPO und vEPO führt zu keiner Erhöhung der Hämatokritwerte in Wildtyp-Mäusen	76
3.3.4 Kurzzeit-Effekt von hEPO und vEPO auf zelluläre Prozesse der SVZ 3 Tage nach ICV	77
3.3.5 Langzeit-Effekt von hEPO und vEPO auf zelluläre Prozesse der SVZ 30 Tage nach ICV	82
3.4 Evaluierung des therapeutischen Potenzials von hEPO im R6/2 Mausmodell der Huntington-Krankheit	88
3.4.1 Experimentelles Design.....	88
3.4.2 Nachweis einer stabilen Langzeitexpression von hEPO in verschiedenen Hirnarealen des ZNS von LV-hEPO behandelten R6/2 Mäusen	89
3.4.3 Die lentiviral induzierte Expression von hEPO nimmt keinen Einfluss auf den Gewichtsverlust und motorische Defizite des R6/2 Mausmodells	92
3.4.4 Verbesserung der räumlichen Arbeitsgedächtnisleistung von R6/2 Mäuse nach LV-hEPO Behandlung.....	94
3.4.5 Im ZNS exprimiertes hEPO verlangsamt die progressive Atrophie des Hippocampus von R6/2 Mäusen	96
3.4.6 Die Langzeitexpression von hEPO fördert die Reifung von Neuroblasten im Gyrus dentatus von R6/2 Mäusen.....	99
3.4.7 Die Langzeitexpression von hEPO nimmt keinen Einfluss auf die Neurogenese der SVZ im R6/2 Mausmodell.....	103
3.4.8 Lentiviral exprimiertes hEPO fungiert nicht als Regulator hippocampaler neuroinflammatorischer Prozesse im R6/2 Mausmodell	105
4. DISKUSSION	110
4.1 Charakterisierung der endogenen Expression von murinem EPO und vEPO.....	110
4.2 Einfluss von rekombinantem EPO und vEPO auf ex vivo kultivierte NSCs/NPCs	113
4.3 Stabile Transgenexpression nach ICV von hEPO/vEPO-kodierenden lentiviralen Partikeln im ZNS von Wildtyp-Mäusen	115
4.4 Einfluss von lentiviral exprimiertem EPO und vEPO auf Zellen der SVZ in vivo.....	117

4.5 Der Gentransfer von LV-hEPO in das ZNS von R6/2 Mäusen führt zu einer weitreichenden Transgenexpression	124
4.6 Beurteilung des therapeutischen Effekts einer lentiviral vermittelten Expression von hEPO im ZNS von R6/2 Mäusen.....	126
4.7 Die lentiviral induzierte Expression von hEPO trägt zu keiner Regulation hippocampaler neuroinflammatorischer Prozesse im R6/2 Mausmodell bei	132
4.8 Ausblick.....	133
5. ZUSAMMENFASSUNG	135
6. ABSTRACT	136
7. LITERATURVERZEICHNIS	137
8. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	155
9. LEBENSLAUF	156
10. ANHANG	157
10.1 Abkürzungsverzeichnis	157
10.2 Abbildungsverzeichnis	160
10.3 Tabellenverzeichnis	162
10.4 Eidesstattliche Erklärung	163

1. Einleitung

1.1 Die adulte Neurogenese

Lange wurde angenommen, dass sich das adulte Gehirn hinsichtlich der Regenerationsfähigkeit neuronaler Zellen ganz elementar von Zellen klassisch regenerativer Organe wie der Haut oder dem Blut unterscheidet. Bis in die 1990er Jahre galt das neurowissenschaftliche Dogma, dass der Prozess der Neurogenese, also die Bildung neuronaler Zellen, bei Säugetieren in der embryonalen Phase stattfindet und beim Eintritt in die Pubertät endet (Ramón y Cajal, 1913; Rakic, 1985). Obwohl bereits in den 1960er bis 1980er Jahren mit Hilfe von H^3 -Thymidin-Inkorporationsexperimenten neu gebildete Neuronen im zentralen Nervensystem (ZNS) adulter Ratten nachgewiesen werden konnten, wurde erst mit der Entwicklung von Zelltyp-spezifischen Markern für immunhistochemische Färbungen und insbesondere durch den Einsatz des synthetischen Thymidin-Analogons 5-Bromo-3'-desoxyuridin (BrdU) weitläufig akzeptiert, dass eine Neurogenese im adulten Säugetiergehirn existiert (Altman und Das, 1965, 1966; Altman, 1969; Kaplan und Hinds, 1977; Kaplan, 1981, 1985). Durch den Einsatz von systemisch verabreichten BrdU ist es gelungen, Zellproliferationsprozesse innerhalb des adulten Gehirns zu quantifizieren. BrdU baut sich in der S-Phase des Zellzyklus in neu synthetisierte DNA anstelle des Nukleotids Thymidin ein und kann mit speziellen Antikörpern nachgewiesen werden (Gratzner, 1982). So ist der endgültige Nachweis der Existenz einer adulten Neurogenese im hippocampalen Gyrus dentatus von Menschen, Affen und Nagetieren gelungen (Seki und Arai, 1993; Kuhn *et al.*, 1996; Eriksson *et al.*, 1998; Kornack und Rakic, 1999). Nach heutigem Wissensstand ist die Neurogenese im adulten Gehirn auf zwei spezialisierte Regionen beschränkt: auf die subgranuläre Zone (SGZ) des hippocampalen Gyrus dentatus sowie auf die subventrikuläre Zone (SVZ) der lateralen Seitenventrikel (Fuentealba *et al.*, 2012).

1.1.1 Neuronale Stammzellen

In den neurogenen Nischen der SVZ und SGZ des adulten Gehirns finden sich neuronale Stammzellen. Bei neuronalen Stammzellen handelt es sich um die Ausgangszellpopulation für eine funktionelle Neurogenese (Doetsch, 2003). Generell lassen sich Stammzellen durch zwei Merkmale beschreiben: Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbstregeneration und lassen sich weiterhin durch ihre Multipotenz, also die Fähigkeit, in mehrere Zelltypen zu differenzieren, charakterisieren (Morrison *et al.*, 1997). Die Fähigkeit zur Selbstregeneration beschreibt dabei den Vorgang, bei welchem die Stammzelle durch asymmetrische Teilung eine Stammzelle und eine Vorläuferzelle oder durch symmetrische Teilung zwei identische Stammzellen bildet (Molofsky *et al.*, 2004). Neuronale Stammzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie über liniendeterminierte Vorläuferzellen in alle drei Hauptzelltypen des

zentralen Nervensystems also zu Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen ausdifferenzieren können (Gage, 2000). Der Prozess der Neurogenese aus multipotenten neuronalen Stammzellen umschreibt dabei einen komplexen Vorgang der asymmetrischen Teilung, Zellspezifizierung, Differenzierung neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen sowie das Wachstum und die funktionelle Integration neu gebildeter Neurone in bestehende neuronale Netzwerke (Faigle, 2013). Von entscheidender Bedeutung ist dabei die Lokalisation neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen in den neurogenen Nischen der SVZ und der SGZ des adulten Gehirns, da erst diese spezielle Mikroumgebung eine funktionelle Neurogenese ermöglicht (Alvarez-Buylla und Lim, 2004; Ma *et al.*, 2005). So zeigte sich, dass, wenn Stamm- und Vorläuferzellen aus neurogenen Nischen in nicht-neurogene Zonen transplantiert werden, diese nur eine sehr eingeschränkte Bildung zu Neuronen aufweisen und vornehmlich zu glialen Zellen ausdifferenzieren (Herrera *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu können Stamm- und Vorläuferzellen aus nicht-neurogenen Zonen nach Transplantation in neurogene Nischen zu Neuronen ausdifferenzieren (Suhonen *et al.*, 1996; Shihabuddin *et al.*, 2000).

1.1.2 Die adulte Neurogenese der subventrikulären Zone (SVZ)

Anfang der 1990er Jahre wurde durch zwei *in vitro* Versuche beschrieben, dass in den Zellwänden der lateralen Seitenventrikel des adulten Gehirns neuronale Stamm- und Vorläuferzellen vorliegen, welche sich in Gegenwart der Wachstumsfaktoren *epidermal growth factor* (EGF) und *fibroblast growth factor* (FGF) zu sogenannten Neurosphären kultivieren lassen (Reynolds und Weiss, 1992; Morshead *et al.*, 1994). Die Multipotenz dieser Zellen liegt in ihrer Fähigkeit begründet, in Kultur zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten auszudifferenzieren (Reynolds und Weiss, 1992; Morshead *et al.*, 1994). In Nagetieren generieren neuronale Stammzellen der SVZ eine große Anzahl an neuronal determinierten Vorläuferzellen (Neuroblasten), welche entlang des rostralen migratorischen Stroms (RMS) zum Bulbus olfactorius migrieren, wo sie zu granulären oder periglomerulären Interneuronen differenzieren (Luskin, 1993; Lois und Alvarez-Buylla, 1994; Winner *et al.*, 2002). Die Zellwände der Seitenventrikel, insbesondere die laterale Zellwand, enthalten vier verschiedene Zelllinien, welche anhand ihrer Morphologie, Ultrastruktur sowie der Expression von Oberflächenmarkern unterschieden werden können (Doetsch *et al.*, 1997). Die äußere Zellwand (Ependym) der Seitenventrikel ist im adulten Gehirn mit Ependymzellen (E-Zellen) ausgekleidet, welche mit multiplen ziliären Zellfortsätzen ausgestattet sind, die bis in die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) reichen. E-Zellen der SVZ besitzen keine Stammzeleigenschaften (Spassky *et al.*, 2005). Unterhalb des Ependyms befindet sich die subependymale Schicht oder SVZ, welche sich aus drei verschiedenen Zelltypen (Typ-A, -B und -C) an neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen zusammensetzt (siehe Abbildung 1)

(Doetsch *et al.*, 1997). Bei Typ-A-Zellen handelt es sich um liniendeterminierte migrierende Neuroblasten, welche sich durch die Expression der neuronalen Oberflächenmarker *neuron-specific class III beta-tubulin* (Tuj1), *doublecortin* (DCX) und *polysialyated-neural cell adhesion molecule* (PSA-NCAM) charakterisieren lassen (Doetsch *et al.*, 1997). Neuroblasten schließen sich zu Ketten zusammen, kleiden die laterale Zellwand der Seitenventrikel aus und teilen sich während der Migration zum Bulbus olfactorius ein- bis zweimal (Lim und Alvarez-Buylla, 2014). Neuroblastenketten werden von einem Netzwerk aus astrozytären Zellfortsätzen umgeben, welche auch Typ-B-Zellen der SVZ zugeordnet werden können (Doetsch und Alvarez-Buylla, 1996; Lois *et al.*, 1996; Peretto *et al.*, 1997). Multipotente Typ-B-Stammzellen der SVZ lassen sich durch ihren astrozytären Phänotyp beschreiben und sich weiterhin aufgrund ihrer Lokalisation im Parenchym der SVZ, ihrer Größe sowie ihrer Chromatinkondensation in B1-Zellen und B2-Zellen unterscheiden. B1-Zellen separieren Neuroblastenketten vom Ependym, wohingegen die B2-Zellen Neuroblastenketten vom striatalen Parenchym abgrenzen (Doetsch *et al.*, 1997; Doetsch *et al.*, 1999). Mittels asymmetrischer Teilung generieren aktivierte Typ-B-Zellen sich häufig teilende Typ-C-Vorläuferzellen. Typ-C-Vorläuferzellen teilen sich zunächst dreimal symmetrisch bevor eine neuronale Liniendeterminierung zu Neuroblasten (Typ-A-Zellen) erfolgt (Lim und Alvarez-Buylla, 2014). Typ-C-Vorläuferzellen weisen eine weniger komplexe Morphologie als Typ-B-Zellen auf und lassen sich von diesen durch die Expression der Oberflächenmarker *mammalian achaete-scute homologue* (Mash1) und des Homöobox-Proteins Dlx2 unterscheiden (Doetsch *et al.*, 2002; Parras *et al.*, 2004). Obwohl der auslösende Mechanismus der Liniendeterminierung von Typ-C-Zellen zu Neuroblasten noch nicht ausreichend geklärt ist, mehren sich die Hinweise, dass eine Kombination von extrazellulären Faktoren (Wachstumsfaktor vermittelte Signaltransduktion, Freisetzung von Neurotransmittern), intrazellulären Faktoren (epigenetische Genmodifikationen, transkriptionelle Regulation) sowie Zell-Zell-Interaktionen involviert ist (Fuentealba *et al.*, 2012; Lim und Alvarez-Buylla, 2014).

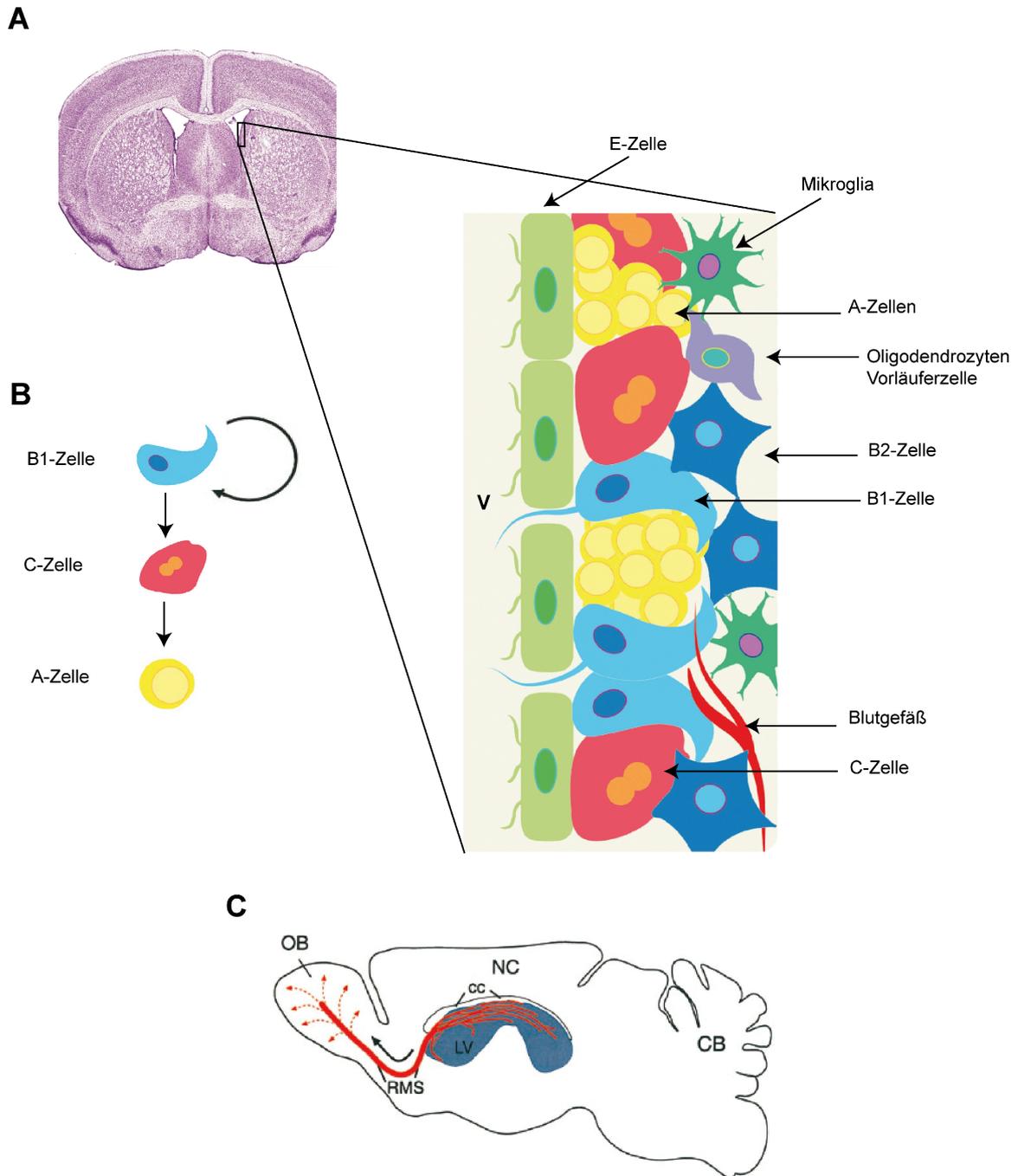


Abbildung 1: Die adulte Neurogenese der subventrikulären Zone (SVZ)

A) Graphische Darstellung der zellulären Zusammensetzung des Ependyms und Subependyms der lateralen Ventrikel (V). In der SVZ befinden sich die drei Hauptzelltypen A, B und C, welche für die Aufrechterhaltung der Neurogenese verantwortlich sind. Weiterhin finden sich E-Zellen im Ependym sowie Mikrogliazellen und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen an der striatalen Seite des Subependyms. **B)** Bei Typ-B-Zellen handelt es sich um multipotente neuronale Stammzellen, welche durch asymmetrische Teilung Typ-C-Zellen generieren. Typ-C-Zellen teilen sich zwei- bis dreimal und bringen Typ-A-Zellen (Neuroblasten) hervor. **C)** Neuroblasten migrieren entlang des rostralen migratorischen Stroms (RMS) zum Bulbus olfactorius (OB), wo sie zu granulären und periglomerulären Interneuronen ausdifferenzieren. Abbildung modifiziert nach Alvarez-Bullya, Garcai-Verdugo, 2002 und Mamber *et al.*, 2013.

1.1.3 Die adulte Neurogenese der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus dentatus

Neben der SVZ ist die SGZ des Gyrus dentatus Hauptort der adulten Neurogenese. Hierbei handelt es sich um eine schmale Region zwischen der Körnerzellschicht (GCL) und dem Hilus des Gyrus dentatus (siehe Abbildung 2). Neu gebildete Neuronen der SGZ migrieren eine kurze Distanz in die Körnerzellschicht (GCL), wo sie stark verästelte Zellfortsätze ausbilden, welche bis in die Molekularzellschicht (MCL) des Gyrus dentatus reichen (Zhao *et al.*, 2006). Die funktionelle Integration neu gebildeter Neuronen in bestehende hippocampale neuronale Netzwerke ist eng mit kognitiven Funktionen, wie beispielsweise dem Lernen und der Gedächtnisleistung verbunden (Shors *et al.*, 2001; Dupret *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Die zelluläre Zusammensetzung der SGZ besteht aus mitotisch aktiven oder ruhend neuronalen Stammzellen, sich häufig teilenden Vorläuferzellen und Neuroblasten. Die adulte hippocampale Neurogenese der SGZ lässt sich in sechs Stadien unterteilen (siehe Abbildung 2) (Kempermann *et al.*, 2004). Astrozytäre, sich selten teilende neuronale Stammzellen der SGZ werden als Typ-1-Zelle bezeichnet (Stadium 1). Aktivierte multipotente Typ-1-Zellen generieren durch asymmetrische Teilung sich häufig teilende multipotente Vorläuferzellen, welche als Typ-2a-Zellen und Typ-2b-Zellen der SGZ klassifiziert werden (Stadium 2 und 3). Typ-2b-Zellen generieren durch asymmetrische Teilung Typ-3-Zellen, die sogenannten neuronal liniendeterminierten Neuroblasten (Stadium 4). Aus liniendeterminierten Neuroblasten des 4. Stadiums reifen post-mitotische Neuronen (Stadium 5), welche vollständig ausgereift als glutamaterge granuläre Neuronen in das neuronale Netzwerk der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus integrieren (Stadium 6) (Kempermann *et al.*, 2004; Hsieh, 2012). Die Regulation der hippocampalen Neurogenese ist von der Mikroumgebung der neurogenen Nische abhängig. Dazu zählt eine Kombination aus Zellinteraktionen neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen mit glialen Zellen, vaskulären Zellen und granulären Neuronen sowie die Regulation über extrazelluläre Faktoren (Wachstumsfaktor vermittelte Signaltransduktion, Freisetzung von Neurotransmittern) und intrazelluläre Faktoren (epigenetische Genmodifikationen, transkriptionelle Regulation (Zhao *et al.*, 2008; Hsieh, 2012; Morrens *et al.*, 2012). Im Nagetiermodell konnte nachgewiesen werden, dass ebenfalls verschiedene Umweltreize (angereicherte Umgebung) und physische Aktivität die hippocampale Neurogenese stimulieren (Olson *et al.*, 2006).

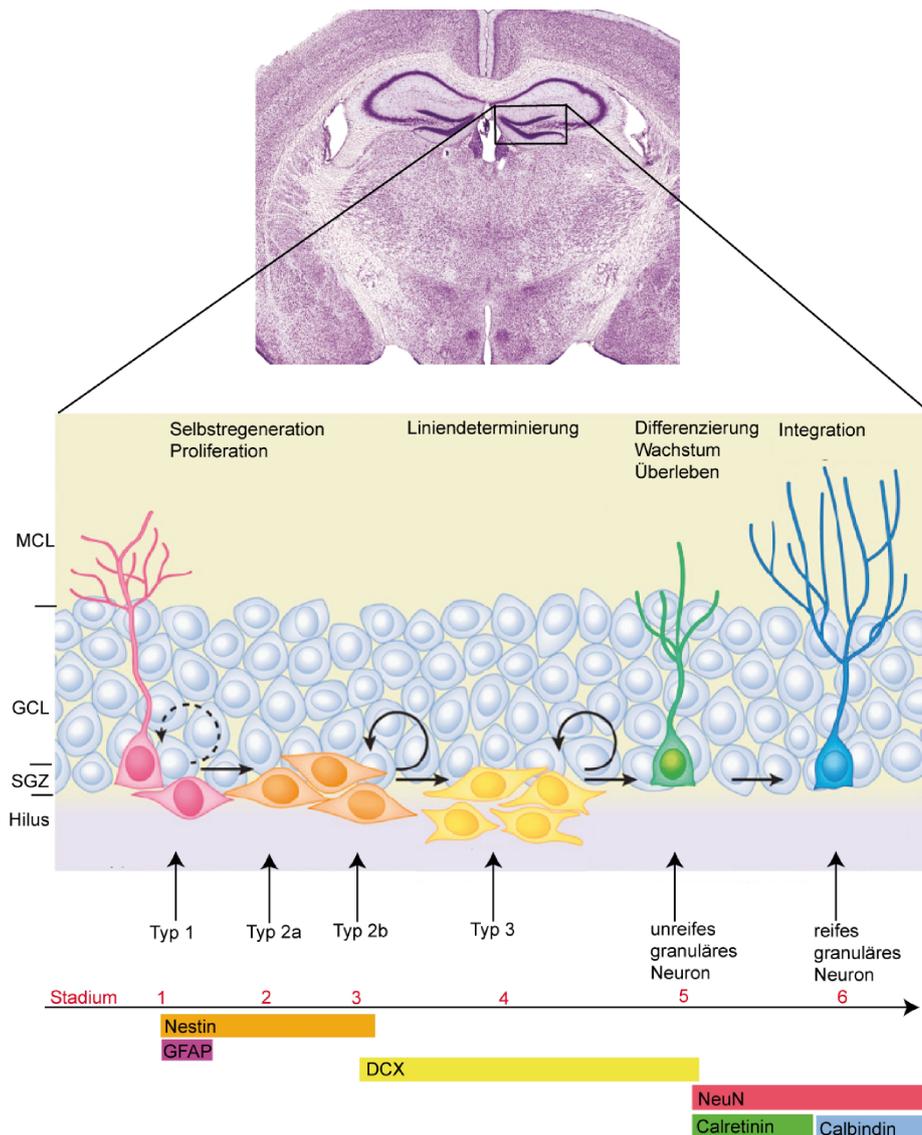


Abbildung 2: Die adulte Neurogenese der subgranulären Zone (SGZ)

Die SGZ des hippocampalen Gyrus dentatus (DG) ist der Ort der adulten Neurogenese in Säugetieren. Über sechs verschiedene Stadien reifen neuronale Stammzellen (Typ-1) zu sich häufig teilenden neuronalen Vorläuferzellen (Typ-2a, -2b), welche wiederum liniendeterminierte Neuroblasten generieren (Typ-3). Typ-1-Zellen lassen sich morphologisch durch ihre langen radialen Zellfortsätze beschreiben, welche bis in die Molekularschicht (MCL) des DG reichen. Weiterhin existiert eine Untergruppe an Typ-1-Stammzellen, welche sich morphologisch von radialen Typ-1-Zellen darin unterscheiden, dass sie kurze horizontale Zellfortsätze ausbilden (Lugert *et al.*, 2010). Typ-2-Zellen exprimieren im Gegensatz zu Typ-1-Zellen kein GFAP und lassen sich morphologisch von diesen durch ihre kurzen horizontalen Zellfortsätze differenzieren. Es existieren zwei Unterformen an Typ-2-Vorläuferzellen, welche anhand der Expression von Oberflächenmarkern unterschieden werden können. Typ-2b-Zellen exprimieren DCX, dessen Expression in Typ-2a-Zellen nicht nachweisbar ist. Typ-3-Zellen exprimieren im Gegensatz zu Typ-2-Zellen ausschließlich DCX und kein Nestin (Dhaliwal und Lagace, 2011). Post-mitotische unreife granuläre Neuronen des 5. Stadiums exprimieren den neuronalen Marker NeuN sowie Calretinin und bilden Zellfortsätze aus, welche bis an den Zellrand zur Molekularzellschicht (MCL) reichen. Vollständig ausgereift integrieren sie als glutamaterge granuläre Neuronen in das neuronale Netzwerk der Körnerzellschicht (GCL) und exprimieren den neuronalen Marker NeuN sowie Calbindin. Ausgereifte glutamaterge Neuronen des Gyrus dentatus bilden stark ramifizierte Zellfortsätze aus, welche bis in die Molekularzellschicht (MCL) reichen. Abbildung modifiziert nach Hsieh J, 2012; Kempermann *et al.*, 2004 und Alvarez-Buylla A, Lim DA 2004.

1.1.4 Die adulte Neurogenese bei Chorea Huntington

Die Modulation der adulten Neurogenese ist ein Charakteristikum neurodegenerativer Erkrankungen, welches auch im Zusammenhang mit Chorea Huntington beschrieben worden ist (Curtis *et al.*, 2003; Winner *et al.*, 2011). Chorea Huntington ist eine unheilbar verlaufende, autosomal-dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung, welche sich klinisch durch den fortschreitenden Verlust von motorischen und kognitiven Fähigkeiten sowie psychiatrischen Störungen beschreiben lässt (Martin und Gusella, 1986; Adam und Jankovic, 2008). Die Krankheit tritt in der Regel zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr auf und verläuft innerhalb von 15-20 Jahren tödlich (Roos, 2010). Hervorgerufen wird die Krankheit durch eine abnormale Verlängerung der Trinukleotidsequenz CAG in Exon 1 des *Huntingtin*-Gens (*HTT*). Der kodierende Abschnitt des *HTT*-Gens liegt am terminalen Ende auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 in der Subregion 4p16.3 und besteht aus 67 Exons (HD Collaborative Group, 1993). Das *HTT*-Gen kodiert für das 350 kDa große Huntingtin-Protein, welches ubiquitär im Körper exprimiert wird und bei Mutationsträgern zu einem abnormalen Polyglutaminstrang am N-terminalen Ende des Proteins führt (HD Collaborative Group, 1993; Strong *et al.*, 1993). In der Normalbevölkerung enthält das *HTT*-Gen in der Regel weniger als 35 CAG-Wiederholungen. Bei einer Anzahl von 36-39 CAG-Wiederholungen wird von einer inkompletten Penetranz gesprochen. Ab einer Anzahl von 40 CAG-Wiederholungen existiert eine komplette Penetranz. Dabei besteht eine Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem Manifestationsalter, denn je höher die Anzahl an CAG-Wiederholungen, desto eher tritt das klinische Erscheinungsbild der Krankheit auf (Langbehn *et al.*, 2004; Losekoot *et al.*, 2013). Obwohl das Huntingtin-Protein ubiquitär im Körper exprimiert wird, kann der Großteil der klinischen Symptomatik auf Degenerationsprozesse innerhalb des zentralen Nervensystems zurückgeführt werden. So führt die intrazelluläre Aggregation von mutiertem Huntingtin zunächst zum Zelltod von striatalen GABAergen Projektionsneuronen (engl. *medium spiny neurons* (MSN)) und damit verbundener Atrophie des Striatums. Je weiter die Krankheit fortschreitet, desto mehr Regionen des ZNS (u.a. Cortex, Hypothalamus, Hippocampus) sind von dem neuronalen Zelltod und damit einhergehender Atrophie betroffen (Rosas *et al.*, 2003; Li und Li, 2004; Ross und Tabrizi, 2011). Zahlreiche die Neuropathologie auslösende Mechanismen wie Exzitotoxizität, oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion, Apoptose und Autophagie werden diskutiert (Browne *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 1999; Kegel *et al.*, 2000; Zeron *et al.*, 2001; Weydt *et al.*, 2006). Mit der Entwicklung einer Vielzahl von Tiermodellen (R6/1, R6/2, YAC-128, BACHD) konnte gezeigt werden, dass eine gestörte hippocampale Neurogenese ein Teil des Pathomechanismus von Chorea Huntington ist (Gil-Mohapel *et al.*, 2011). Zu den am besten charakterisierten Mausmodellen der Huntington-Krankheit gehört das transgene R6/2 Mausmodell. Unter dem humanem

IT15-Promotor exprimieren R6/2 Mäuse ubiquitär Exon 1 des humanen *HTT*-Gens mit 150 CAG-Wiederholungen (Mangiarini *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2005). R6/2 Mäuse zeigen einen ausgeprägten, schnell fortschreitenden neurologischen Phänotyp mit motorischen und kognitiven Defiziten sowie eine deutliche mit dem Krankheitsverlauf fortschreitende zerebrale Atrophie und Neuropathologie (Mangiarini *et al.*, 1996; Lione *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2002; Stack *et al.*, 2005). R6/2 Mäuse haben eine Lebenserwartung von 13-16 Wochen (Li *et al.*, 2005). Sowohl die hippocampale Neurogenese im Gyrus dentatus (DG), als auch die Neurogenese in der SVZ von R6/2 Mäusen wurde untersucht. So zeigte sich, dass die Zellproliferation im DG von R6/2 Mäusen fortschreitend abnimmt und in einem Alter von 12 Wochen (Endstadium) bis zu 70 % reduziert ist (Gil *et al.*, 2004). Die Abnahme der Zellproliferation im DG von R6/2 Mäusen korreliert mit einer Abnahme der Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen, was schlussendlich zu einer eingeschränkten adulten Neurogenese führt (Gil *et al.*, 2005). Allerdings konnte eine nachfolgende Studie nicht bestätigen, dass die Zellproliferation im DG von 8-13 Wochen alten R6/2 Mäusen beeinträchtigt ist (Phillips *et al.*, 2005). Die Gründe für diese Diskrepanz sind bisher unbekannt. Es wird diskutiert, ob Unterschiede in den Mauskolonien, unterschiedliche Zellmarkierungsprotokolle mit BrdU sowie unterschiedliche Quantifizierungsstrategien für die Diskrepanzen verantwortlich sind (Gil-Mohapel *et al.*, 2011). In der Studie von Phillips *et al.* 2005 konnte gezeigt werden, dass die Morphologie von DCX-exprimierenden unreifen Neuronen des 5. Stadiums im DG von R6/2 Tieren aufgrund kürzerer Zellfortsätze und des Verzweigungsgrades beeinträchtigt ist und dass unreife Neuronen eine eingeschränkte Migration zur Körnerzellschicht aufweisen (Phillips *et al.*, 2005). So scheint der pathologische Prozess der hippocampalen Neurogenese in R6/2 Mäusen hauptsächlich auf die eingeschränkte Zellreifung und Migrationskapazität von neuronalen Vorläuferzellen hinzudeuten. Der Prozess der Differenzierung zu NeuN-exprimierenden Neuronen sowie deren Überleben scheint in den Pathomechanismus der gestörten hippocampalen Neurogenese im R6/2 Mausmodell nicht involviert zu sein (Gil *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2005). Ebenfalls wurde untersucht, ob die Neurogenese der SVZ im R6/2 Mausmodell beeinträchtigt ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellproliferation und das Differenzierungsverhalten neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen in der SVZ von R6/2 Mäusen nicht verändert ist (Gil *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2005). Erwähnung finden sollte, dass R6/2 Mäuse eine reduzierte Anzahl an neu gebildeten granulären oder periglomerulären Interneuronen des Bulbus olfactorius aufweisen (Kohl *et al.*, 2010). Der Nachweis von Aggregaten des Huntingtin-Proteins konnte in neu gebildeten granulären oder periglomerulären Interneuronen des Bulbus olfactorius erbracht werden. Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass Aggregate des Huntingtin-Proteins in neuronalen Stammzellen (Typ-B-Zellen) oder in sich häufig teilenden Vorläuferzellen (Typ-C-Zellen) der SVZ

nachweisbar wären, was wiederum darauf schließen lässt, dass ein zellunabhängiger Mechanismus der Huntingtin-Aggregation im Zusammenhang mit Prozessen der adulten Neurogenese zu sehen ist (Kohl *et al.*, 2010). Insbesondere die fortschreitende Beeinträchtigung der hippocampalen Neurogenese von R6/2 Mäusen wird im Zusammenhang mit dem ausgeprägten Phänotyp der kognitiven Leistungsminderung diskutiert (Gil-Mohapel *et al.*, 2011). Strategien für die Behandlung von Chorea Huntington, welche einen modulierenden Effekt auf die eingeschränkte Neurogenese vermitteln, sind daher als potentielle therapeutische Ansätze zu sehen, um das kognitive Leistungsvermögen zu verbessern.

1.2 Einfluss von Erythropoietin (EPO) auf die Neurogenese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen

Beim Klasse-1-Zytokin Erythropoietin (EPO) handelt es sich um ein 34 kDa großes Glykoprotein, dessen ursprünglich beschriebene Funktion in der Aufrechterhaltung der Erythropoese begründet liegt (Wen *et al.*, 1993). Jedoch ist bekannt, dass EPO weitaus mehr ist als ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor. EPO wirkt kardioprotektiv, anti-inflammatorisch, angiogenetisch, neuroprotektiv, anti-apoptotisch und fungiert weiterhin als potenter Modulator der Neurogenese (Sakanaka *et al.*, 1998; Yasuda *et al.*, 1998; Brines *et al.*, 2000; Shingo *et al.*, 2001; Calvillo *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2004; Rui *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2012). Der kodierende Genabschnitt des humanen *EPO*-Gens findet sich auf dem langen Arm von Chromosom 7 in der Subregion q11-q22 und umfasst eine 5,4 kb große Region an genomischer DNA, welche aus fünf Exons und vier Introns besteht (Lin *et al.*, 1985; Law *et al.*, 1986). Das *EPO*-Gen wurde im Verlauf der Evolution hochkonserviert vererbt. So beträgt die Homologie zwischen Mensch und Maus 80 % (Wen *et al.*, 1993). Das humane *EPO*-Gen kodiert für ein 193 Aminosäure umfassendes Prohormon. Zirkulierendes ausgereiftes EPO besteht aus 165 Aminosäuren, da bei der Sekretion am NH₂-Ende des Prohormons eine 27 Aminosäuren umfassende Leadersequenz abgespalten und am C-terminalen Ende durch posttranslationale Modifikationen ein Argininrest entfernt wird (Recny *et al.*, 1987; Bahlmann *et al.*, 2004). Die biologische Aktivität von zirkulierendem EPO wird in erheblichem Maße durch das ausgeprägte Glykosylierungsmuster sowie durch seine molekulare Struktur bestimmt (Lombardero *et al.*, 2011). Der zugehörige Rezeptor, über den EPO seine Wirkung vermittelt, ist der gleichnamige Klasse-1-Zytokin-Rezeptor, welcher aus einer hydrophoben Transmembrandomäne, einer variablen zytoplasmatischen und einer extrazellulären Domäne besteht. Die Bindung von EPO an seinen Rezeptor führt zu dessen Konformationsänderung und bringt die mit der zytoplasmatischen Domäne assoziierten Janus-Kinasen ausreichend dicht zusammen, sodass sie sich gegenseitig phosphorylieren. Auf die Aktivierung der Janus-Kinasen folgt eine Phosphorylierung von Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Domäne. Letztere dient als Bindeglied für zahlreiche Signalproteine,

welche eine SH2 (*Src homology 2*) Proteinbindedomäne aufweisen. So kann beispielsweise das Signaltransduktionsprotein STAT 5 (*signal transducers and activators of transcription*) an den aktivierten EPO-Rezeptor binden. STAT 5 wird phosphoryliert, dimerisiert und transloziert in den Zellkern, wo es zur Aktivierung von Zielgenen kommt. Ebenso aktiviert die Bindung von EPO an seinen Rezeptor die MAP-Kinase und PI3-Kinase vermittelte Signaltransduktion (Constantinescu *et al.*, 1999; Rossert und Eckardt, 2005). Die höchste Anzahl an EPO-Rezeptoren weisen erythrozytäre Vorläuferzellen CFU-E (*colony forming unit erythroblasts*) und Proerythroblasten auf (Broudy *et al.*, 1991). EPO stimuliert die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen, wirkt anti-apoptotisch und sorgt somit im Rahmen der Blutbildung für die Aufrechterhaltung der Erythropoese. Während der fetalen Blutbildung ist der Ort der EPO-Produktion die Leber, jedoch stellen nach der Geburt die peritubulären interstitiellen Zellen der Niere den Hauptbildungsort für zirkulierendes EPO dar (Zanjani *et al.*, 1981; Lacombe *et al.*, 1988). 90 % an zirkulierendem EPO werden im adulten Organismus von der Niere gebildet (Weidemann und Johnson, 2009). Abseits der Niere konnte nachgewiesen werden, dass sowohl EPO als auch der EPO-Rezeptor im adulten Organismus unter anderem in den Fortpflanzungsorganen (Uterus, Placenta, Ovarien, Testes), der Milz, der glatten Muskulatur, der Lunge sowie dem Gehirn exprimiert werden (Tan *et al.*, 1991; Tan *et al.*, 1992; Fandrey und Bunn, 1993; Digicaylioglu *et al.*, 1995; Marti *et al.*, 1996; Nagai *et al.*, 2001; Chong *et al.*, 2002; Weidemann und Johnson, 2009). Die Produktion und Sekretion von EPO wird über einen zellulären, von der Sauerstoffkonzentration abhängigen Mechanismus reguliert (Jelkmann, 2011). In die transkriptionelle Regulation der Produktion von EPO ist der Transkriptionsfaktor *hypoxia inducible factor 1* (HIF-1) involviert, welcher bei hypoxischen Zuständen aktiviert wird. HIF-1 bindet an das *hypoxia response element* (HRE), welches sich 3' flankierend am Promotor des *EPO*-Gens befindet und die Expression von EPO induziert (Blanchard *et al.*, 1992; Jelkmann, 2011). Im adulten Gehirn ist neben einer Hypoxie induzierten Regulation der EPO-Expression ebenso beschrieben, dass verschiedene Stimuli wie Ischämie, Hypoglykämie, Insulinfreisetzung sowie reaktive Sauerstoffradikale den Transkriptionsfaktor HIF-1 aktivieren und somit die EPO-Produktion induzieren (Masuda *et al.*, 1997; Chandel *et al.*, 1998; Byts und Siren, 2009). Der Nachweis einer Expression von EPO und des EPO-Rezeptors ist im adulten und embryonalen ZNS von Nagetieren, Primaten sowie Menschen gelungen (Marti *et al.*, 1996; Juul *et al.*, 1998; Knabe *et al.*, 2004). Im murinen Gehirn wird EPO im Hippocampus, der Capsula interna und im Cortex exprimiert (Digicaylioglu *et al.*, 1995). Auf zellulärer Ebene konnten Neuronen und Astrozyten als EPO-exprimierende Zellen identifiziert werden (Bernaudin *et al.*, 2000). Die Expression des murinen EPO-Rezeptors konnte auf Astrozyten, Neuronen sowie auf zerebralen Endothelzellen erbracht werden (Bernaudin *et al.*, 1999). Die Expression des

EPO-Rezeptors im sich entwickelnden Gehirn ist eng mit Regionen der Neurogenese assoziiert. So exprimieren Nestin-positive Zellen der ganglionären Eminenz, welche Gebiete der späteren adulten SVZ enthält, den EPO-Rezeptor (Shingo *et al.*, 2001). Die vollständige Ausschaltung des EPO/EPOR-Systems im sich entwickelnden murinen Organismus verläuft aufgrund einer schweren Anämie letal (Wu *et al.*, 1999a). Jedoch konnte in embryonalem Gewebe von EPO- und EPOR-*knockout* Mäusen gezeigt werden, dass zwar alle Anlagen für eine normale Gehirnentwicklung vorhanden sind, diese sich allerdings deutlich kleiner im Vergleich zu normalen Wildtyp-Mäusen darstellen (Tsai *et al.*, 2006). Der ZNS-spezifische *knockout* des EPO-Rezeptors führte weiterhin zu einer verminderten Zellproliferation innerhalb der SVZ und verhinderte unter ischämischen Bedingungen die Migration von Neuroblasten zur Läsionsstelle (Tsai *et al.*, 2006). Im adulten murinen Gehirn konnte nachgewiesen werden, dass ein ZNS-spezifischer *knockout* des EPO-Rezeptors zu einer verminderten Zellproliferation in der SVZ sowie dem hippocampalen Gyrus dentatus führt. Weiterhin vermittelt das spezifische Ausschalten des EPO-Rezeptors eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer Glutamat induzierten Toxizität (Chen *et al.*, 2007). Diese Nachweise legen nahe, dass das endogene EPO/EPOR-System des ZNS in regulatorische Prozesse der Neurogenese unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen involviert ist. Der Einfluss von rekombinantem EPO (rEPO) auf die murine Neurogenese wurde in mehreren *in vitro* und *in vivo* Studien näher beleuchtet (Shingo *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006a; Wang *et al.*, 2006b; Chen *et al.*, 2007; Leconte *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2012). So zeigte sich, dass mehrmalige Injektionen an rEPO (25 IU/d) in den lateralen Ventrikel von adulten Mäusen zu einer erhöhten Anzahl an neu gebildeten Zellen im RMS sowie im Bulbus olfactorius führten. Allerdings führte die erhöhte Zellzahl im RMS sowie im Bulbus olfactorius zu einer erniedrigten Anzahl an proliferierenden Zellen in der SVZ (Shingo *et al.*, 2001). Diese Entdeckung lieferte einen ersten Hinweis, dass eine EPO-vermittelte Signaltransduktion die Differenzierung neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen stimuliert sowie das Wachstum und die funktionelle Integration neu gebildeter Neurone in neuronale Netzwerke fördert. Im Schlaganfallmodell zeigte sich, dass eine tägliche systemische Gabe von rEPO (5000 Units/kg) nach einem induzierten Schlaganfall die Anzahl an proliferierenden und DCX-exprimierenden Zellen in der SVZ erhöht (Wang *et al.*, 2004). *In vitro* Studien, welche mit Kulturen von Neurosphären durchgeführt wurden, bestätigten, dass rEPO in einer konzentrationsabhängigen Weise die Proliferation sowie die Differenzierung zum neuronalen Phänotyp stimuliert und insbesondere das Neuritenwachstum neuronaler Zellen unterstützt (Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006b). Interessanterweise stellte sich heraus, dass rEPO in ähnlicher Weise wie der Wachstumsfaktor FGF die Proliferation von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen in Kultur stimuliert, dass jedoch die Kombination beider Wachstumsfaktoren nicht zu einer

Verdoppelung der Proliferationsraten führte (Chen *et al.*, 2007). Ebenfalls konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass die systemische Gabe von rEPO (40 µg/kg, zweimal wöchentlich) die Anzahl neu gebildeter Neuronen im hippocampalen Gyrus dentatus erhöht. Insbesondere ist hier die damit verbundene Verbesserung der kognitiven Leistung (räumliches Arbeitsgedächtnis) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe hervorzuheben (Leconte *et al.*, 2011). Insgesamt zeigte sich ebenso für die hippocampale Neurogenese, dass rEPO die Proliferation und Differenzierung neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen stimuliert (Oh *et al.*, 2012). Die vaskuläre Zusammensetzung der neurogenen Nischen steht im direkten Zusammenhang mit einer funktionellen Neurogenese. So konnte nachgewiesen werden, dass die Induktion eines Schlaganfalls im Nagetiermodell gleichzeitig die Angiogenese und die Neurogenese induziert (Wang *et al.*, 2004). Die funktionellen Abläufe der Angiogenese und Neurogenese sind über ein interaktives Netzwerk bestehend aus Endothelzellen und neuronalen Zellen miteinander verbunden, welches dazu führt, dass Neuroblasten unter ischämischen Bedingungen zur Läsionsstelle migrieren (Palmer *et al.*, 2000; Ohab *et al.*, 2006). So wurde beschrieben, dass die systemische Gabe von rEPO die Expression der Metalloproteinasen (MMP) 2 und 9 auf zerebralen Endothelzellen induziert, was wiederum die Migration von Neuroblasten zur Läsionsstelle fördert (Wang *et al.*, 2006a).

1.3 EPO-Derivate und EPO-Isoformen

Die in einer Vielzahl von tierexperimentellen Studien beschriebenen neuroprotektiven/neuroregenerativen Eigenschaften des endogen exprimierten EPO/EPOR-Systems sowie von exogen verabreichtem rEPO unter pathologischen Bedingungen (Schlaganfallmodell, EAE-Modell, Epilepsie-Modell, Parkinson-Modell) lieferten den Ausschlag, klinische Neuroprotektionsstudien beim Menschen durchzuführen (Brines *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004; Signore *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2006). Insbesondere klinische Studien mit Schlaganfall-Patienten zeigten, dass eine Hochdosistherapie mit rekombinantem humanem EPO (rhEPO) (33.000 IE i.v. 3 x innerhalb von 48 h, oder 40.000 IE i.v. 3 x innerhalb von 48 h) zu einer Verkleinerung der Infarktgröße führte (Ehrenreich *et al.*, 2002; Ehrenreich *et al.*, 2009). Ebenso hervorzuheben ist ein weiteres Indikationsfeld einer EPO-Therapie, und zwar Krankheiten, welche mit einer verminderten kognitiven Leistungsfähigkeit einhergehen. So führte eine Hochdosistherapie mit rhEPO (40.000 IE i.v. wöchentlich) über einen Zeitraum von 12 Wochen zu einer Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit bei Schizophrenie-Patienten. Weiterhin konnte durch die rhEPO-Therapie eine Verlangsamung des mit der Krankheit assoziierten fortschreitenden Verlustes an kortikaler grauer Substanz erzielt werden (Ehrenreich *et al.*, 2007; Sargin *et al.*, 2010). Jedoch sind diese überaus positiven therapeutischen Effekte in der Behandlung von akuten und chronischen Krankheitszuständen des zentralen Nervensystems mit Vorsicht zu

betrachten. Die durch eine Hochdosistherapie mit EPO induzierte verstärkte Erythropoese kann zu erhöhten Hämatokritwerten, einer Erhöhung der Anzahl der im Blut zirkulierenden Thrombozyten und zu einer Erhöhung an vaskulären Muskelkontraktionen führen. Folglich steigt aufgrund der erhöhten Viskosität des Blutes unter anderem das Risiko für Thrombosen, Embolien und Schlaganfälle (Patel *et al.*, 2012). Daher wurde verstärkt an der Entwicklung von EPO-Derivaten gearbeitet, welche einen zytoprotektiven bzw. regenerativen therapeutischen Effekt vermitteln, jedoch keine hämatopoetischen Eigenschaften besitzen. So entwickelten Leist und Kollegen CEPO, wobei es sich um ein synthetisch hergestelltes carbamyliertes Derivat von EPO handelt, bei dem an alle Lysinmoleküle ein Carbamylrest gekoppelt wurde (Leist *et al.*, 2004). In verschiedenen Tierstudien konnte nachgewiesen werden, dass CEPO nicht die Erythropoese stimuliert, jedoch neuroprotektive Eigenschaften besitzt (Brines *et al.*, 2004; Leist *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007b). Die Beschreibung, dass die systemische Gabe von CEPO zytoprotektive Effekte vermittelt, jedoch gleichzeitig nicht die Erythropoese stimuliert, legte zudem die Vermutung nahe, dass neben CEPO auch EPO seine zytoprotektiven Eigenschaften über einen alternativen Rezeptor vermittelt. Dies wird jedoch aktuell noch kontrovers diskutiert. So beschrieben Brines und Kollegen in einer Studie aus dem Jahr 2004, dass sowohl EPO als auch CEPO ihre gewebeschützenden Effekte über einen heterodimeren Rezeptor vermitteln, welcher sich aus einer Untereinheit des klassischen EPO-Rezeptors und einer Untereinheit der β -Kette (β cR) der IL-3 Rezeptorenfamilie zusammensetzt. CEPO ist darüber hinaus nicht in der Lage, an den klassischen EPO-Rezeptor zu binden (Brines *et al.*, 2004). Interessanterweise zeigte sich in einer *ex vivo* Kultivierungsstudie mit Neurosphären von adulten Mäusen, dass CEPO die Proliferation dieser Zellen sowie die Differenzierung zum neuronalen Phänotyp in einer konzentrationsabhängigen Weise stimuliert (Wang *et al.*, 2007a). Jedoch ist in der klinischen Anwendung von CEPO Vorsicht geboten, da es sich um ein synthetisch hergestelltes EPO-Derivat handelt und es daher zu unerwarteten Nebenwirkungen, wie beispielsweise einer induzierten Immunantwort führen kann. In einer kürzlich publizierten Studie, welche die klinische Wirksamkeit von CEPO bei Patienten mit Friedreich-Ataxie testete, erwies sich CEPO jedoch als gut verträglich (Boesch *et al.*, 2014). Weiterhin wurde beschrieben, dass mittels enzymatischer Entfernung von Sialinsäurereste generiertes asialoEPO im Tiermodell keine hämatopoetischen Eigenschaften besitzt, jedoch neuroprotektiv unter pathologischen Bedingungen wirkt (Erbayraktar *et al.*, 2003). Die klinische Anwendung von asialoEPO ist jedoch aufgrund der Entfernung von Sialinsäureresten und der daraus resultierenden extrem kurzen Halbwertszeit nicht effektiv umsetzbar (Imai *et al.*, 1990). Bei einem der neuesten nicht-hämatopoetisch, jedoch zytoprotektiv wirkenden EPO-Derivate handelt es sich um das sogenannte ARA-290 (pHBSP). Die Entwicklung basierte auf Oberflächenstrukturanalysen und Bindungsstudien von EPO an seinen Rezeptor. So zeigte sich, dass eine spezielle

Aminosäureabfolge auf der B-Schleife des EPO-Moleküls für die pharmakologische Wirksamkeit von EPO verantwortlich ist, jedoch ohne dabei die Erythropoese zu stimulieren (Brines *et al.*, 2008; Ahmet *et al.*, 2011). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind keine endogen exprimierten EPO-Isoformen in Geweben von Säugetieren beschrieben worden, welche sich als neuroprotektiv/neurotroph beschreiben lassen und gleichzeitig nicht hämatopoetisch wirken. Im Labor für Molekulare Psychiatrie konnten jedoch erstmals murine und humane Spleißvarianten von EPO (vEPO) identifiziert werden, welche sich in verschiedenen experimentellen Ansätzen als nicht-hämatopoetisch, jedoch zytoprotektiv beschrieben ließen (Bonnas, 2009). Mit Hilfe von *nested* PCR-Ansätzen konnten unter Verwendung von spezifischen Primern für das offene Leseraster (OLR) von EPO aus muriner und humaner Gehirn- bzw. Nieren-cDNA ein 600 bp großes EPO-Hauptprodukt sowie weitere kleine Produkte amplifiziert werden. Die Sequenzierung dieser schmalen Fragmente zeigt, dass es sich um unvollständige EPO-Transkripte handelte, welche verschiedene interne Deletionen enthielten. Unter diesen unvollständigen EPO-Transkripten konnten eine murine Spleißvariante und zwei humane Spleißvarianten mit typischen Spleißmustern identifiziert werden, die entsprechend des Spleißsignals (5'GU-Pyrimdin-AG'3) durch das Spleißosom modifiziert wurden. Die EPO-Spleißvariante mS, welche sowohl in muriner Nieren- und Gehirn-cDNA nachgewiesen werden konnte, ist charakterisiert durch das Fehlen des 4. Exons. Die Existenz der murinen EPO-Spleißvariante mS konnte auf Proteinebene in Nierenlysaten von CoCl_2 -behandelten Mäusen mittels Immunpräzipitationsexperimenten erbracht werden. Die humane EPO-Spleißvariante hS3 konnte in Gehirn- und Nieren-cDNA identifiziert werden und ist charakterisiert durch das Fehlen des 3. Exons. Der Nachweis der humanen EPO-Spleißvariante hS4 konnte in Nieren-cDNA erbracht werden, wobei hS4 sich durch das Fehlen der ersten 30 Nukleotide des 4. Exons charakterisieren lässt. Das Fehlen von Exonabschnitten führt dazu, dass die strukturelle Zusammensetzung translatierter EPO-Spleißvarianten (vEPOs) sich deutlich vom Wildtyp-EPO unterscheiden (siehe Abbildung 3). So besteht die tertiäre Struktur vom humanen Wildtyp-EPO aus vier antiparallelen α -Helices (A-D), welche über zwei lange Schleifen (AB und CD) sowie eine kurze Schleife verbunden sind (BC). Zudem befindet sich am carboxyterminalen Ende der AB-Schleife ein kurzes α -helicales Element (B'), welches großen Einfluss auf die Rezeptorbindung hat (Cheetham *et al.*, 1998). Das hS3-Protein verfügt beispielsweise nicht über das sich am carboxyterminalen Ende der AB-Schleife befindliche α -helicale Element B'. Dieses Element stellt mit den Helices A, B und D eine hochaffine Bindungsstelle zum EPO-Rezeptor dar. Aufgrund dessen verfügt das hS3-Molekül nur über eine einzige Rezeptor-Bindungsstelle (A- und C-Helices), welche allerdings eine geringere Affinität zum EPO-Rezeptor aufweist (Cheetham *et al.*, 1998). Die Vermutung liegt nahe, dass alle beschriebenen endogen exprimierten EPO-Isoformen ihre Wirkung über ein alternatives

Rezeptorsystem vermitteln. Die genaue Identifizierung des involvierten Rezeptorsystems ist dabei ein entscheidender Schritt, um den genauen Wirkmechanismus der endogen exprimierten EPO-Isoformen aufzuklären. Für die funktionelle Testung der endogen exprimierten EPO-Isoformen wurden cDNA-Sequenzen von hS3, hS4 und mS in Expressionsvektoren kloniert und in Säugetierzellenlinien als rekombinante Proteine exprimiert. In einem Zellkulturexperiment mit hämatopoetischen Vorläuferzellen konnte gezeigt werden, dass keine der rekombinanten EPO-Isoformen die Erythropoese stimulierte. Die neuroprotektiven Eigenschaften von rekombinantem hS3 und hS4 konnten in einem *in vitro* Zellkulturmodell des kombinierten Sauerstoff-Glukose-Entzugs (OGD) an kortikalen Rattenneuronen nachgewiesen werden (Bonnas, 2009). Im Gegensatz zu den beschriebenen EPO-Derivaten handelt es sich bei hS3, hS4 und mS um endogen exprimierte zytoprotektiv wirkende Varianten des Wildtyp-EPOs. Aus diesem Grund würde sich insbesondere die im ZNS exprimierte humane EPO-Isoform hS3 als pharmakologisch wirksames Agens für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen eignen, da hS3 eine ausreichend hohe Serumhalbwertszeit aufweist und ein geringes Risiko an Nebenwirkungen erwarten lässt.

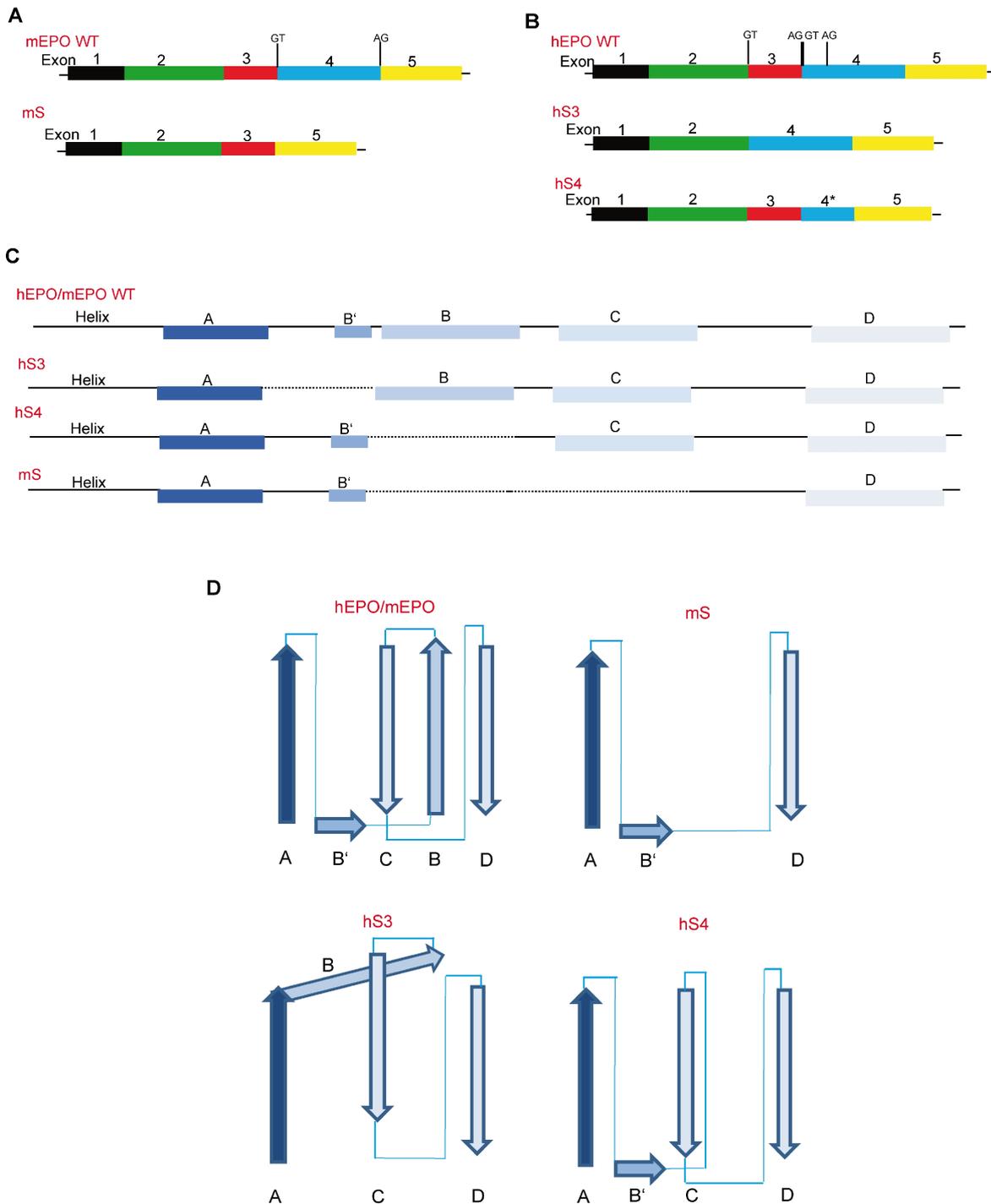


Abbildung 3: Strukturelle Organisation von EPO und vEPO

A) cDNA-Struktur von murinem Wildtyp-EPO (mEPO) und seiner Spleißvariante mS. Die Entfernung des 4. Exons erfolgt an den Konsenssequenzen GT und AG. **B)** cDNA-Struktur vom humanen Wildtyp-EPO (hEPO) und seiner beiden Spleißvarianten hS3 und hS4. Die Spleißvariante hS3 ist charakterisiert durch das Fehlen des 3. Exons. Die Spleißvariante hS4 ist durch das Fehlen der ersten 30 Nukleotide des 4. Exons charakterisiert. Exon 4 der humanen Wildtyp-EPOs enthält eine interne Konsenssequenz (AG), welche zur teilweisen Entfernung des 4. Exons durch das Spleißosom führt. **C)** Protein Primärstruktur von hEPO und mEPO, welche aus fünf verschiedenen Helices (A,B,B',C,D) besteht. Die humane Spleißvariante hS3 lässt sich durch das Fehlen des kurzen α -helicalen B'-Elements beschreiben. Der Spleißvariante hS4 fehlt die B-Helix und die murine Spleißvariante mS ist durch das Fehlen der B- und C-Helix charakterisiert. **D)** Die Sekundärstruktur von murinem und humanem EPO besteht aus vier α -Helices mit benachbarten Schleifen. Dargestellt sind mögliche Sekundärstrukturen der beschriebenen EPO-Isoformen (vEPO). Abbildung modifiziert nach Bonnass, 2009.

1.4 EPO – Ein gentherapeutischer Ansatz für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen

Aufgrund der anti-apoptischen, anti-inflammatorischen, anti-oxidativen Wirkung von EPO und der damit verbundenen neuroprotektiven, die Neurogenese stimulierenden Eigenschaften eignet sich EPO für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Chorea Huntington, Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson (Byts und Siren, 2009). Die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen mit systemisch verabreichten EPO gestaltet sich jedoch aus zwei Gründen problematisch. Zum einen ist die Blut-Hirn-Schranke für EPO nicht ausreichend durchlässig, zum anderen erfordert die Behandlung von chronischen Erkrankungen eine Langzeittherapie mit einer Hochdosis an EPO, was wiederum in schweren Hämatokrit-assoziierten Nebenwirkungen münden kann (Patel *et al.*, 2012). Die Fähigkeit von Molekülen, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, hängt im entscheidenden Maße von der Größe, der elektrischen Ladung, der Lipophilie, der Affinität zum Plasmabindesystem und letztlich von der Affinität zum Transportsystem der Blut-Hirn-Schranke ab (Nau *et al.*, 2010). Aus diesem Grund ist das mit einer Molekulargröße von ca. 34 kDa stark glykosylierte EPO-Protein nur in einem sehr geringen Maße in der Lage, die intakte Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Dies konnte in einer Studie mit Schizophrenie-Patienten demonstriert werden, welche eine Hochdosistherapie mit intravenös verabreichtem Iodium¹¹¹-markiertem rekombinantem humanem EPO erhielten (4 Injektionen von 40.000 IE mit 120-185 MBq Iodium¹¹¹-markiertem EPO über einen Zeitraum von 45 h). Hervorzuheben ist, dass nur ca. 0,1 – 1 % des peripher verabreichten EPO ins Gehirn gelangen konnte (Ehrenreich *et al.*, 2004; Ehrenreich, 2008). Es bedarf daher alternativer Applikationsstrategien, um eine effiziente therapeutische Wirksamkeit von EPO im ZNS über einen langen Zeitraum zu erzielen und gleichzeitig die Gefahr von Nebenwirkungen zu minimieren. Ein Weg zur Umgehung der Blut-Hirn-Schranke ist die direkte Applikation von viralen Vektoren in betroffene Areale des ZNS, welche für das *EPO*-Gen oder seine Isoformen (vEPO) kodieren. Gegenüber der konventionellen Behandlung mit systemisch verabreichtem EPO bietet diese Methode den Vorteil, dass dauerhaft therapeutische Level an EPO und vEPO im ZNS erzielt werden können. In dieser Arbeit wurden lentivirale Vektoren genutzt, um einen effizienten Gentransfer ins ZNS zu erhalten.

1.4.1 Lentivirale Vektoren

Insbesondere lentivirale Vektoren eignen sich für den Gentransfer in das ZNS, da sie stabil in das Wirtsgenom integrieren und nur eine minimale inflammatorische Antwort auslösen, was schlussendlich in einer stabilen Langzeit-Genexpression mündet. Darüber hinaus sind lentivirale Vektoren in der Lage, mitotische ruhende und sich sehr langsam teilende Zellen zu transduzieren (Kordower *et al.*, 2000; Consiglio *et al.*, 2004; Kantor *et al.*, 2014). Mehrere *in*

in vivo Studien konnten nachweisen, dass lentivirale Vektoren verschiedene Zelltypen (Neuronen, gliale Zellen, Astrozyten, Oligodendrozyten) des ZNS erfolgreich transduzieren können (Blomer *et al.*, 1997; Jakobsson *et al.*, 2003; McIver *et al.*, 2005; Fassler *et al.*, 2013). Lentiviren gehören zur Familie der Retroviren, welche sich durch ein einzelsträngiges RNA-Genom mit viral kodierter interner reverser Transkriptase und Integrase beschreiben lassen. Der zuerst generierte und am häufigsten verwendete lentivirale Vektor leitet sich vom humanen Immundefizienz-Virus (HIV) Typ 1 ab (Naldini *et al.*, 1996a; Naldini *et al.*, 1996b). Die genomische Organisation, zugehörige virale Proteine sowie der Replikationszyklus von Lentiviren lassen sich daher sehr gut anhand von HIV-1 exemplarisch beschreiben. Das HI-Virus besitzt ein ca. 9 kb großes einzelsträngiges RNA-Genom, welches für neun verschiedene virale Proteine kodiert. Die drei größten offenen Leseraster des HIV-Genoms kodieren für die drei Hauptklassen an Strukturproteinen: Gag, Pol und Env. Das *gag*-Gen kodiert für das virale Kapsid. Das *pol*-Gen liefert alle Information für die enzymatische Ausstattung des Virus, wie die reverse Transkriptase, Integrase und Protease. Das *env*-Gen kodiert für das virale Oberflächen-Glykoprotein gp160. Zusätzlich zu diesen drei Hauptproteinen kodiert das virale HIV-Genom für die regulatorischen Proteine Tat und Rev, welche die Abläufe der reversen Transkription, das Spleißen sowie den Transport viraler Transkripte in den Zellkern kontrollieren. Die vier anderen viralen Gene *vif*, *vpr*, *vpu* und *nef* kodieren für Proteine, welche bei der Bildung, der Reifung viraler Partikel sowie bei der negativen Regulation der Transkription eine funktionelle Rolle übernehmen. Sie werden als akzessorische Proteine bezeichnet. Das virale Genom ist flankiert von LTR's (*long terminal repeats*) (Sakuma *et al.*, 2012). Der Replikationszyklus von HIV beginnt mit der Anheftung des Glykoproteins gp120 an CD4-Rezeptoren bzw. Co-Rezeptoren (u.a. CXCR4, CCR5) der Zielzelle. Das gp41-Glykoprotein ist für die Fusionierung der viralen mit der zellulären Zellmembran verantwortlich (Fanales-Belasio *et al.*, 2010). Nach Zelleintritt erfolgt die Auflösung des Kapsids und das Virus setzt das Virusgenom sowie virale Proteine frei. Die virale RNA wird mittels viraler reverser Transkriptase in eine doppelsträngige DNA umgeschrieben und mittels Integrase an eine beliebige Stelle im Wirtsgenom integriert. Die Gene des Provirus werden durch die im Wirtsgenom vorhandene RNA-Polymerase-II abgelesen, wobei sich in der 5'Region der LTR's ein kombiniertes Enhancer-Promotor-Element befindet, welches die Transkription verstärkt. In der 3'Region der LTR's befindet sich ein Polyadenylierungssignal. Die Transkription viraler DNA durch die Wirts-RNA-Polymerase wird durch die Expression regulatorischer viraler Proteine beeinflusst. So ist beispielsweise die basale Promotoraktivität des 5'LTRs minimal in der Abwesenheit des regulatorischen Proteins Tat. Das im ersten Transkriptionszyklus neu gebildete Protein Tat bindet an das TAR-Element (*transactivation response element*) am 5'Ende des HIV-Genoms und stimuliert auf diese Weise die Transkription des viralen

Genoms. Ausschließlich vollständig gespleißte virale mRNA (i.d.R. *tat*, *nef*, und *rev*) werden vom Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Nach der Translation des Rev-Proteins vermittelt dieses auch den Transport ungespleißter RNA (*gag*, *pol*, vollständiges virales RNA Genom) oder einfach gespleißter viraler RNA (i.d.R. *vif*, *vpr*, *vpu*, *env*) aus dem Zellkern durch die Interaktion mit dem viralen RRE-Element (*rev responsive element*). Die Translation viraler RNA erfolgt an Ribosomen im Zytosol, wohingegen das Env-Protein an der Membran des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert wird. Eine weitere Besonderheit ist, dass virale *gag*-Gene und *pol*-Gene ausgehend von ungespleißter RNA translatiert werden. An der Zellmembran assemblieren virale Proteine und zwei ungespleißte virale mRNA-Moleküle, welche das Verpackungssignal Ψ enthalten, um an Gag-Kapsidproteine zu binden. Es bildet sich ein viraler Partikel, welcher die Zellmembran durch Knospung verlässt. Nach der Knospung spaltet die Protease aus ungespleißter mRNA hervorgegangen Vorläuferproteine Gag und Pol sowie das Glykoprotein gp160 in funktionelle Proteine. Es entsteht ein infektiöser viraler Partikel, welcher in einen neuen Replikationszyklus eintreten kann (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Engelman und Cherepanov, 2012; Sakuma *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu Lentiviren handelt es sich bei lentiviralen Vektoren um replikationsunfähige Konstrukte, welche in der Lage sind, Zellen zu transduzieren, jedoch keine neuen Virione bilden (Naldini *et al.*, 1996a). Eine Vielzahl von viralen Vektorstrukturen wurde bis zum heutigen Zeitpunkt mit dem Ziel entwickelt, die biologische Sicherheit sowie die Produktionseffizienz zu erhöhen (Kantor *et al.*, 2014). In dieser Arbeit wurden lentivirale Vektoren der dritten Generation verwendet. Lentivirale Vektoren können in Produktionszelllinien (i.d.R. HEK Zellen) hergestellt werden. Dabei enthält das Vektorgenom nur noch *cis*-aktive Sequenzen, welche für die Replikation, Verpackung und Integration notwendig sind. Dazu wird das Vektorplasmid mit weiteren Plasmiden ko-transfiziert, auf denen Gene in *trans* zur Verfügung gestellt werden, welche für das virale Oberflächenprotein (Env), die enzymatische Ausstattung (Pol), das virale Kapsid (Gag) sowie für das regulatorische Element Rev kodieren. Aufgrund dieser Trennung reduziert sich drastisch die Wahrscheinlichkeit, dass während der Zellproliferation durch homologe Rekombination infektiöse replikationsfähige virale Partikel entstehen. Weiterhin enthalten die Helferplasmide keine retroviralen *cis*-aktiven Verpackungssequenzen, weshalb sich im viralen Partikel nur das Genom des Vektorplasmids wiederfindet. Durch die Deletion viraler Gene im Vektorplasmid wird zusätzlich Platz geschaffen, um die Kodierungssequenz des Transgens einzufügen (Dull *et al.*, 1998). Weiterhin kann das Wirtsspektrum lentiviraler Vektoren durch Pseudotypisierung mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) erheblich erweitert werden (Akkina *et al.*, 1996). Eine weitere die biologische Sicherheit erhöhende Modifikation ist das Einbringen einer Deletion in die U3-Region des 3'LTRs des Vektorplasmids. Durch diese Maßnahme werden selbstinaktivierende virale Partikel

generiert. Ein virales Vektorgenom wird flankiert von den LTR's, welche aus einer U3-, R- und U5-Region bestehen. Die U3-Region fungiert als virales Promotor/Enhancer-Element, wohingegen das R-Element im 3'LTR als Polyadenylierungssignal dient. Die 5'U3-Region sowie die 3'U5-Region liegen in einzelsträngiger viraler mRNA des Provirus nicht vor, stattdessen flankiert das R-Element beide LTR's. Während der Duplikation der mRNA in doppelsträngige DNA durch die virale reverse Transkriptase wird die U3-Region im 3'LTR dupliziert und in den 5'LTR übertragen. Aus diesem Grund führt eine Deletion der U3-Region des 3'LTR's zu einer drastischen Reduzierung der Vermehrungsfähigkeit, da keine Initiation der Transkription und somit Replikation erfolgen kann (Zufferey *et al.*, 1998). Die sogenannte dritte Generation an lentiviralen Vektoren zeichnet sich dadurch aus, dass der HIV-Promotor in der U3-Region des 5'LTR's durch einen konstitutiv exprimierten CMV-Promotor ersetzt wurde. Weiterhin wurde die Sequenz, welche für das regulatorische Protein Rev kodiert vom Vektorplasmid entfernt und auf einem separaten Plasmid zur Verfügung gestellt (Hanawa *et al.*, 2002; Hanawa *et al.*, 2004). Zur Bildung funktioneller lentiviraler Vektoren der dritten Generation werden somit insgesamt vier Plasmide benötigt (siehe Abbildung 4). Durch Ko-Transfektion von HEK293-Zellen mit allen vier Plasmiden können funktionsfähige lentivirale Partikel generiert werden. Diese Zellen exprimieren das „SV 40 large T-Antigen“, welches an den SV40ori der Expressionsplasmide bindet und die DNA-Replikation fördert (Oka *et al.*, 2010). An der Zellmembran assemblieren virale RNA-Transkripte des Vektorgenoms mit Strukturproteinen und regulatorischen Proteinen, welche von den Helferplasmiden exprimiert werden. Virale Partikel, welche ausschließlich das Genom des Vektorplasmids enthalten, verlassen die Zelle durch Knospung und können aus dem Zellüberstand geerntet werden (Hanawa *et al.*, 2002; Hanawa *et al.*, 2004).

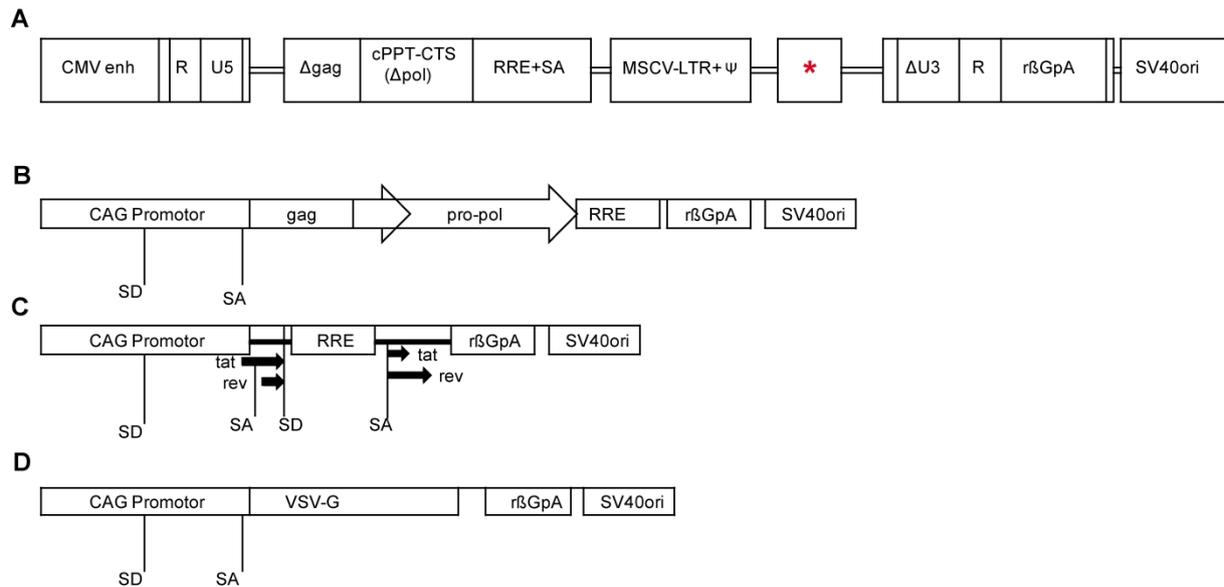


Abbildung 4: Lentivirales System der dritten Generation

A) Das in dieser Arbeit verwendete Vektorplasmid besteht aus einem chimären 5'LTR mit einem konstitutiv exprimierten CMV-Enhancer und der R-Region. Auf den 5'LTR folgt die HIV-1 Leadersequenz sowie ein kurzer Abschnitt, welcher für das Gag-Protein kodiert. Zur Vermeidung möglicher homologer Rekombination ist ein kurzes Stück von gag entfernt und die Sequenz des cPPT-Elements mit nachfolgender Terminationssequenz CTS in die Kodierungssequenz des Strukturproteins Pol eingebaut. Diese Modifizierungen führen zu einer Leserasterverschiebung sowie Generierung eines Stoppcodons und erhöhen die Effizienz der Vektorproduktion. Nachfolgend befindet sich auf dem Vektorplasmid das RRE-Element. Die Expression des Transgens (* GFP, EPO oder vEPO) steht unter Kontrolle eines *murine stem cell virus* (MSCV)-LTR's mit integrierter Verpackungssequenz Ψ. Die 3'LTR-Region besteht aus einem HIV-1-Wildtyp-LTR mit einer Deletion in der U3-Region. Teile der R-Region und der U5-Region des 3'LTRs wurden gegen ein Polyadenylierungssignal rβGPA ausgetauscht. Zusätzlich befindet sich auf dem Vektorplasmid ein SV40ori. **B-D)** Die zur Bildung viraler Partikel notwendigen Strukturproteine sowie regulatorische Elemente werden auf pCAGGS-Plasmiden exprimiert. Diese Plasmide enthalten einen starken chimären CMV-Enhancer/β-Aktin-Promotor (CAG), ein rβGpA Polyadenylierungssignal, ein langes Intron des β-Globins sowie ein SV40ori. **B)** pCAGkP1 kodiert für die Strukturproteine gag und pol (SD= *Splice donor*, SA= *Splice acceptor*). **C)** pCAG4-RTR stellt die regulatorischen Proteine Rev und Tat zur Verfügung. Das Tat-Protein interagiert mit dem 5'Ende des Vektorplasmids und führt zu besonders hohen Titern bei der Virusproduktion. **D)** pCAG-VSVG trägt die Kodierungssequenz des Glykoproteins des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G). Abbildung modifiziert nach Hanawa *et al.*; 2002; Hanawa *et al.*, 2004.

1.5 Fragestellung

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von EPO und der EPO-Isoformen mS und hS3 (vEPO) auf die murine Neurogenese untersucht werden. In mehreren *in vitro* und *in vivo* Studien konnte nachgewiesen werden, dass EPO eine funktionelle Rolle bei Prozessen der embryonalen und adulten murinen Neurogenese übernimmt. Diese Eigenschaft macht EPO interessant für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, welche mit einer beeinträchtigten Neurogenese einhergehen. Da der klinische Einsatz von systemisch verabreichtem rekombinantem EPO in der Langzeitbehandlung von chronischen Erkrankungen aufgrund einer hochregulierten Erythropoese problematisch ist, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob nicht-hämatopoetisch wirkendes vEPO ebenso als potenter Modulator der murinen Neurogenese fungiert und ob weiterhin ein gentherapeutischer Ansatz einer lentiviral induzierten Expression von EPO und vEPO im ZNS als alternative Behandlungsstrategie anzusehen ist. Ausgehend von dieser Hypothese sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Kann die Expression von murinem EPO und vEPO auf spezielle Regionen und Zellen des murinen Gehirns lokalisiert werden, welche mit Prozessen der Neurogenese assoziiert sind?
2. Welchen Einfluss nimmt rekombinantes EPO und vEPO auf *ex vivo* kultivierte neuronale Stamm- und Vorläuferzellen?
3. Eignen sich lentivirale Vektoren, welche für EPO bzw. vEPO kodieren, für die Transduktion von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen und führen sie zu einer stabilen Transgenexpression *in vivo*?
4. Nimmt lentiviral überexprimiertes EPO bzw. vEPO im ZNS von Wildtyp-Mäusen Einfluss auf die Neurogenese der SVZ sowie die Erythropoese?
5. Vermittelt eine lentiviral induzierte EPO-Expression einen therapeutischen Effekt auf den schnell fortschreitenden Krankheitsverlauf und Pathomechanismus im R6/2 Mausmodell, welcher mit einer eingeschränkten hippocampalen Neurogenese einhergeht?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
2-log DNA ladder	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
50 bp DNA ladder	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
6 x DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Agar, Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose NEEO ultra	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agel-HF	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ampicillin	Roche, Mannheim, Deutschland
AmpliTaq DNA Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
B27 Supplement w/o Retinsäure	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
B27 Supplement	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
BSA (100x)	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
Brefeldin A	BD, Heidelberg, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Collagen G	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Clal	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
Complete protease inhibitors, EDTA-free	Roche, Mannheim, Deutschland
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Decosept	Dr. Schumacher, Melsungen, Deutschland
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Diethyldicarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTP-Mix	Promega, Mannheim, Deutschland

Produkt	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco Karlsruhe, Deutschland
Epidermal growth factor (EGF)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Hpy188I	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
Ethanol absolute	J.T. Barker, Deventer, Niederlande
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fibroblast growth factor, basic, 25 µg	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FluorSave Reagent®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FKS) GOLD	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Free Style™ CHO Expression Medium	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Free Style™ MAX Reagenz	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
GelRed®	GeneOn, Ludwigshafen, Deutschland
Glutamat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol, > 99 % Reinheit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HF-Buffer (5x)	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaleidoscope-Marker	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
L-Glutamin, 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ligation Buffer 10x	Roche, Mannheim, Deutschland
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol 99,9 %, p.a., ACS, ISO	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂ (25 mM)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Modified Eagle Medium (MEM)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Produkt	Hersteller
Natriumtetraborat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NEBuffer 4	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
Neurobasal A Medium	Gibco Karlsruhe, Deutschland
Neurobasal Medium	Gibco Karlsruhe, Deutschland
Normal donkey serum (NDS)	Biozol, Eching, Deutschland
Normal goat serum (NGS)	Biozol, Eching, Deutschland
OPTI PROTm SFM	Invitrogen Gibco Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd, reinst	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Puffer (10x)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
rekombinantes humanes EPO	Roche, Mannheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pepton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phusion DNA Polymerase	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Phusion Hot Start DNA Polymerase	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Poly-L-Lysin (PLL)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Primer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Random Primer	Promega, Mannheim, Deutschland
RIPA Buffer 10x	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
RNase Inhibitor	Promega, Mannheim, Deutschland
Roti Quant Bradford Reagenz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histokitt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RQ1 DNase stop solution	Promega, Mannheim, Deutschland
RQ1 DNase, RNase free	Promega, Mannheim, Deutschland
Salzsäure 37 %, reinst	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SAP 10x Reaction Buffer	Affimetrix, High Wycombe, England
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Affimetrix, High Wycombe, England
Sucrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
SuperScript II RT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim, Deutschland
Talon Metal Affinity Resin	Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Produkt	Hersteller
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TRIzol®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau 0,5%	Euroclone, Mailand, Italien
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid Lösung (30 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Restore PLUS	
Western Lightning® Plus ECL	Perkin Elmer Inc., Rodgau, Deutschland
Enhanced Chemiluminescence Substrate	
Whatman Blotpapier	NeoLab Migge, Heidelberg, Deutschland

2.1.2 Anästhesie und Analgesie

Produkt	Hersteller
Buprenorphinhydrochlorid	RB Pharmaceuticals Limited, Berkshire, UK
Isoflurane Forene	Abbott, Baar, Schweiz
Ketaminhydrochlorid	Pfizer, Pharmacia GmbH, Berlin, Deutschland
Lidocain (1%)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Xylazinhydrochlorid	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

2.1.3 Antikörper

Durchflusszytometrie (FACS; Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)

Antikörper	Hersteller
α-mouse CD 11b (M1/70), PerCP/Cy5.5	BD, Heidelberg, Deutschland
α-mouse CD 16/32 (93)	BioLegend, Fell, Deutschland
α-mouse CD 45 (30-F11), FITC	BioLegend, Fell, Deutschland
α-mouse MHCII (IM5/114,15.2) PE/Cy7	BioLegend, Fell, Deutschland
α-mouse TNFα (TN 3-19/12), PE	BD, Heidelberg, Deutschland

Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller
α -BrdU, rat	Abd Serotec, Puchheim, Deutschland
α -DCX, goat	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
α -GFP, rat	Nacalai, Kyoto, Japan
α -goat Alexa Fluor 594, donkey	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
α -goat-IgG, biotinylated, horse	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
α -goat-IgG, biotinylated, horse	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
α -hEPO (H-162), rabbit	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
α -Iba1, rabbit	Wako Chemicals, Neuss, Deutschland
α -mouse Alexa Fluor 647, donkey	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
α -NeuN, mouse	Merck, Darmstadt, Deutschland
α -rabbit Alexa Fluor 488, donkey	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
α -rabbit IgG, biotinylated, horse	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
α -rat Alexa Fluor 488, donkey	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
α -rat IgG, biotinylated, goat	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Immunzytochemie

Antikörper	Hersteller
α -DCX, goat	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
α -GFAP, rabbit	Dako, Hamburg, Deutschland
α -rabbit Alexa Fluor 488, donkey	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
α -goat Fluor 594, donkey	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Western-Blot

Antikörper	Hersteller
α -Actin, goat	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
α -V5, mouse	Abd Serotec, Puchheim, Deutschland
α -rabbit-IgG,HRP-linked, donkey	GE Healthcare, München, Deutschland
α -hEPO (H-162), rabbit	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
α -goat-IgG,HRP-linked, donkey	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
α -mouse IgG,HRP-linked, donkey	GE Healthcare, München, Deutschland

2.1.4 Kits

Kit	Hersteller
BCA-Kit	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
CalPhos™ Mammalian Transfection Kit	Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Fixation/Permeabilization Kit	BD, Heidelberg, Deutschland
FreeStyle™ MAX CHO Expression Kit	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
LightCycler® FastStart Universal	Roche, Mannheim, Deutschland
SYBR Green DNA Master Kit	
LightCycler® FastStar Essential DNA Master Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
NeuroClut® Enzymatic Dissociation Kit	STEMCELL Technologies, Köln, Deutschland
NeuroCult® Chemical Dissociation Kit for Adult CNS Tissue	STEMCELL Technologies, Köln, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quantikine IVD ELISA Human Erythropoietin Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
REExtract-N-AmpTMTissue PCR Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Vectastain ABC Elite Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2.1.5 Primer

Genotypisierung

Primer	Sequenz
Huntingtin fwd	5'-CCGCTCAGGTTCTGCTTTTA-3'
Huntingtin rev	5'-GAGTCCCTCAAGTCCTTCCA-3'

Konventionelle PCR

Primer	Sequenz
ms fwd	5'-AAAACCGGTGGAGATGGGGGTGCCCGAACGTC-3'
ms rev	5'-TTTATCGATGTCACCTGTCCCCTCTCCTGCA-3'

Semi-nested PCR

Primer	Sequenz
mEPO_ms_short_Fw	5'-CTATGCTTGGAAAAGAATGGAGAA-3'
GAPDH fwd	5'-AGATTGTCAGCAATGCATCCTGC-3'
GAPDH rev	5'-CCTTCTTGATGTCATCAT ACTTGG-3'
mEPO_rev1	5'-CTGCAGACCTCTC CCG TGT-3'
mEPO_rev2	5'-AGGGTTGGCATGACACAGT-3'
ms_for	5'-CCCACCCTGCTGCTTTTACTC-3'

Real-time PCR

Primer	Sequenz
CCL2 fwd	5'-AGCCAACCTCTCACTGAAGCC-3',
CCL2 rev	5'-ATCCTCTTGTAGCTCTCCAGCC-3'
GAPDH fwd	5'-AGATTGTCAGCAATGCATCCTGC-3'
GAPDH rev	5'-CCTTCTTGATGTCATCATACTTGG-3'
GFP fwd	5'-CCTGAAGTTCATCTGCACCA-3'
GFP rev	5'-ACGACGGCAACTACAAGACC-3'
hEPO fwd	5'-GGAGGCCGAGAATATCACGAC-3'
hEPO rev	5'-CCGTAGAAGTCTGGCAGGG-3'
MSCV fwd	5'-GGACGTCTCCCAGGGTTGCG-3'
MSCV rev	5'-GCCCAGCGGTTCGTTTTTCGTG-3'
TNF α fwd	5'-GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG-3'
TNF α rev	5'-CCATAGAAGTGGTGGAGAGGGA-3'

2.1.6 Medien, Puffer und Lösungen**Bakterienmedien**

Medium	Zusammensetzung
LB-Agar	1 % Pepton (w/v) 0,05 % Hefeextrakt (w/v) 1 % NaCl (w/v) 2 % Agar 100 μ g/ml Ampicillin

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1% Pepton (w/v) 0,05 % Hefeextrakt (w/v) 1 % NaCl (w/v) 100 µg/ml Ampicillin
SOB-Medium	2 % Pepton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 10 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄
SOC-Medium	SOB-Medium 20 % Glukose (w/v)

Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
Collagen-Medium	Modified Eagle's Medium 10 % FKS 1 % Pen/Strep 10 mM HEPES 10 mM Collagen G
Kultivierungsmedium CHO-S-Zellen	CHO-Expression Medium 8 mM L-Glutamin
Kultivierungsmedium HEK293-T-Zellen	Dulbecco's Modified Eagle's High Glucose Medium (DMEM) 10 % FKS 1 % Natriumpyruvat 1 % Pen/Strep
Kultivierungsmedium NSCs/NPCs	Neurobasal A Medium 2 % B27 Supplement w/o Retinsäure 1 % L-Glutamin
N-Medium	Neurobasal Medium 2 % B 27 Supplement 1% Pen/Strep 0,5 mM L-Glutamin 25 µM Glutamat
Starter-Medium	Neurobasal Medium 2 % B27 Supplement 1 % Pen/Strep 0,5 mM L-Glutamin 25 µM Glutamat
Wachstumsmedium Neurosphären	Neurobasal A Medium 2 % B27 Supplement w/o Retinsäure 1 % L-Glutamin 10 ng/ml FGF-2 20 ng/ml EGF

Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
5x Lämmli-Puffer	1,86 M Glycin 0,25 M Tris-Base 17,6 mM SDS
4 % PFA/PBS pH 7,4	1 x PBS 40 g/l PFA 2 Pellets NaOH
2x Probenpuffer pH 6,8	125 mM Tris HCL 1 % SDS 20 % Glycerol 10 % β -Mercaptoethanol 0,008 % Bromphenolblau
5 % Sammelgel (0,75 mM)	0,33 ml Rotiphorese Gel 0,4 ml 0,5 % SDS 0,4 ml 0,625 M Tris HCL (pH 6,8) 0,87 ml H ₂ O 2 μ l TEMED 10 μ l Ammoniumpersulfat
12 % Trenngel (0,75 mM)	2,4 ml Rotiphorese Gel 1,2 ml 0,5 % SDS 1,2 ml 1,88 M Tris HCL (pH 8,8) 0,87 ml H ₂ O 5 μ l TEMED 30 μ l Ammoniumpersulfat
DEPC-H ₂ O	1 ml/l DEPC in H ₂ O
Elutionspuffer (IMAC) pH 7,4	42 mM Na ₂ HPO ₄ 8 mM NaH ₂ PO ₄ 268 mM NaCl 25 mM Imidazol
FACS-Puffer	1 x PBS 2 % FKS 2 mM EDTA
TAE-Puffer 50 x pH 7,8	121,1 g Tris-Base 10,25 g Natriumacetat 50 ml 0,5 mM EDTA in ddH ₂ O
TBS pH 7,4	42 mM Tris HCL 8 mM Tris Base 154 mM NaCl
TBST (SDS-PAGE) pH 8,0	10 mM Tris Base 150 mM NaCl 0,05 % Tween
Waschpuffer (IMAC) pH 7,6	42 mM Na ₂ HPO ₄ 8 mM NaH ₂ PO ₄ 268 mM NaCl

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Western Blot Transferpuffer	160 ml Lämmli Puffer 1x 40 ml Methanol

2.1.7 Verbrauchsmaterial und Geräte

Produkt	Hersteller
0.2 µm Filter	GE Healthcare, München, Deutschland
0.5-, 1.5-ml Safe-Lock tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
1-, 5-, 20 ml Spritzen	BD, Heidelberg, Deutschland
125 ml Polycarbonate Erlenmeyer/Shaker Culture	VWR, Darmstadt, Deutschland
70 µm Cell Strainer	BD, Heidelberg, Deutschland
Amicon Ultra centrifugal Filter (50 kDa)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aufkonzentrationsfilter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Bakterieninkubator Minitron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Blotsystem Trans-Blot®	Bio-Rad Laboratories, München,
Burker 7 T PharmaScan® 70/16	Bruker BioSpin, Ettlingen, Deutschland
CASY® Cell Counter	OLS OMNI Life Science, Bremen, Deutschland
CCD Kamera	Vilber, Eberhardzell, Deutschland
CO ₂ -Inkubatoren Model: MCO-18AUC	Sanyo Electric Co; Leicestershire, England
Deckgläschen (24 x 50 mM)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläschen 12 mm	Marienfeld, Lauda Königshofen Deutschland
Dialyseschläuche VISKINK	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmal-Injektionskanülen, 24 G	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Electronic Scale JJ3000 A Waage	G&G GmbH, Neuss, Deutschland
Elektrophorese-System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Elisa Reader MRX ^{TC}	Dynex Technologies GmbH, Denkendor, Deutschland
Erlenmeyerkolben 500 ml	Schott Duran, Wertheim/Main, Deutschland
Extended Fine Tip NS	Alpha Laboratories, Hampshire, England

Produkt	Hersteller
FACS Canto II	BD, Heidelberg, Deutschland
FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg, Deutschland
Falcon Tubes (14, 15, 50 ml)	BD, Heidelberg, Deutschland
Flask with New Duo Cap	BD, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop DMRA	Leica, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop DM-RA2	Leica, Wetzlar, Deutschland
Fuchs-Rosenthal-Kammer	Lo Laboroptik, Friedrichsdorf,
Geldokumentationskamera	Intas GDS, Göttingen, Deutschland
Hämatokritkapillaren	KABE Labortechnik, Nümbrecht Eisenroth, Deutschland
Hamilton-Spritze (5 µl) 30 G Nadel	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Heizkäfig MediHeat™	Peco Services Ltd., Brough, England
IKA Homogenizer	IKA Werke GmbH&Co. KG, Staufen, Deutschland
Invers Mikroskop CKX 41	Olympus, Hamburg, Deutschland
Invers Mikroskop Zoom 2000	Leica, Wetzlar, Deutschland
Konfokales Mikroskop TSC, SP5	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kyro-Einfriergerät	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Kyroröhrchen	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Light Cycler 96	Roche, Mannheim, Deutschland
Light Cycler 1.5	Roche, Mannheim, Deutschland
Master Cycler® Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	Clatronic, Kempen, Deutschland
MultiGuard barrier tips	Sorenson BioScience, Utah, USA
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nanodrop 2000	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Optima™Max-XP-Ultracentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
PCR softtubes 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
pH meter pH100	VWR Internatonal, Darmstadt,
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Process Control RotaRod 3375 series,	TSE systems, Bad Homburg, Deutschland
Protein LowBind Tube 0,5/1,5/2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Roti® - PVDF Membran	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Semi-Dry-Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Produkt	Hersteller
Serologische Pipetten 5/10/25 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Slide-A-Lyszer Dialyse Kassetten	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Small Animal Monitoring & Gating	SA Instruments, NY, USA
Stereotaktischer Rahmen	Stoelting, Dublin, Irland
Sterilbank Biowizard Typ KR-130	Kojair Tech Oy, AD Vught, Niederlande
SuperFrost Ultra plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen Deutschland
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Viapore Concentrators 10/20	Satorious AG, Göttingen, Deutschland
Videokamera CCTV	Panasonic, Wiesbaden, Deutschland
Zellkulturflaschen (<i>low binding</i>) 25 cm ²	Corning, Amsterdam, Niederlande
Zellkulturflaschen 175 cm ²	BD, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturplatten (<i>low binding</i>), 6/12/24 well	Corning, Amsterdam, Niederlande
Zellkulturplatten 6, 12, 24, 48, 96 well	BD, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Universal 32 R Type 1610	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 320 R Typ 1460	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 30 F	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

2.1.8 Software

Software	Hersteller
Analyze 10.0	AnalyzeDirect, Inc.; Lenexa USA
FlowJo	TreeStar Inc., Oregon, USA
GraphPad Prism 5 und 6	GraphPad Software, Inc., CA, USA
IBM SPSS Statistics 22	IBM, Ehningen, Deutschland
ImageJ	National Institutes of Health, Maryland, USA
Paravision 5.1	Bruker BioSpin, Ettlingen, Deutschland
Stereo Investigator	MicroBrightField, Magdeburg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Neuronale Stamm- und Vorläuferzellen (NSCs/NPCs)

NSCs/NPCs wurden aus der subventrikulären Zone (SVZ) der Seitenventrikel von 5-6 Wochen alten C57BL/6N Mäusen isoliert. Mittels Isofluran-Narkose wurden die Tiere narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die Tiere dekapitiert, das Gehirn herauspräpariert und dieses zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Für die Präparation der SVZ wurde zunächst der Bulbus olfactorius abgetrennt und ein ca. 2 mm dickes Gehirnstück präpariert, welches die Seitenventrikel beinhaltet. Mit Hilfe eines Präparationsmikroskops (Invers Mikroskop Leica Zoom 2000) wurde nachfolgend ein dünner Gewebeschnitt freipräpariert, welcher die Seitenventrikel umgibt. Im Anschluss an eine mechanische Zerkleinerung des Gewebestückes erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Hilfe des NeuroCult[®] Enzymatic Dissociation Kit for Adult CNS Tissue (STEMCELLTechnologies) nach Angaben des Herstellers. Die gewonnenen NSCs/NPCs wurden in 2 ml serumfreiem Wachstumsmedium Neurobasal A mit 2 % B27 ohne Retinol, 1 % L-Glutamin, 10 ng/ml FGF-2 und 20 ng/ml EGF resuspendiert und in „*low-binding*“ 6-well-Platten in einer Dichte von 35.000 Zellen/cm² pro well bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt zu Neurosphären kultiviert. Nach 4 Tagen Inkubation wurde 750 µl frisches Wachstumsmedium hinzugefügt und die Zellen für drei weitere Tage inkubiert. Nach insgesamt 7 Tagen in Kultur erfolgte die Dissoziation von Neurosphären mittels des NeuroCult[®] Chemical Dissociation Kit (STEMCELLTechnologies) nach Angaben des Herstellers. Mit Hilfe dieses Kits konnte eine starke mechanische und enzymatische Dissoziation von Neurosphären umgangen werden. Vollständig dissoziierte Neurosphären wurden in einer Dichte von 40.000 Zellen/cm² in „*low binding*“ 25 cm² Zellkulturflaschen in 5 ml Wachstumsmedium ausgesät und für 7 Tage bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. 750 µl Wachstumsmedium wurde 4 Tage nach Inkubationsbeginn hinzugefügt. Nach der siebentägigen Inkubationszeit wurden die Neurosphären für verschiedene experimentelle Ansätze verwendet.

2.2.2 Nachweis der Expression von endogenem murinem vEPO in NSCs/NPCs auf RNA-Ebene

2.2.2.1 RNA-Isolierung

Für den spezifischen Nachweis der murinen EPO-Isoform mS wurde RNA von kultivierten Neurosphären mit Hilfe des RNeasy Micro Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die isolierte RNA wurde in 10 µl DEPC-H₂O gelöst und die Konzentration am Spektrophotometer Nanodrop 2000 bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen.

2.2.2.2 DNase-Verdau und cDNA-Synthese

Isolierte Neurosphären-RNA wurde im anschließenden Schritt zur vollständigen Entfernung genomischer DNA mit RQ1-DNase verdaut. Dazu wurden 6 µl der isolierten Neurosphären-RNA mit 2 µl H₂O (RNase-frei), 2 µl RQ1 DNase-Buffer und 5 µl RQ1-DNase (1 U/µl) zusammengefügt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende Inaktivierung der Enzymaktivität erfolgte durch Zugabe 2 µl RQ1-DNase Stop Solution und Inkubation für 10 min bei 65°C. Aufgrund der geringen RNA-Mengen wurde auf eine Aufreinigung des DNase-Ansatzes verzichtet. 2 µl DNase-verdauter RNA wurden bei -80°C gelagert, um sie für eine spätere Kontaminationskontrolle mit genomischer DNA zu verwenden. 83,8 ng an DNase-verdauter RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Für die cDNA-Synthese wurde ein Reaktionsgemisch aus 7 µl RNA, 4 µl Random Primern (198 ng), 1 µl dNTP Mix (10 mM each) für 5 min bei 65°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde 7 µl eines Reaktionsgemisches bestehend aus 4 µl First-Strand Buffer (5x), 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl RNasin (40 U/µl) hinzugefügt und für 2 min bei 25°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl SuperScript II RT (200 U) wurde die cDNA-Synthese gestartet und die Reaktion durchlief drei Inkubationsschritte von 10 min bei 25°C, 50 min bei 42°C und 15 min bei 70°C und abschließender Kühlung bei 4°C. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Zugabe von SuperScript II RT (-RT-Kontrolle) mitgeführt, um Kontaminationen mit genomischer DNA während der cDNA-Synthese auszuschließen. Transkribierte cDNA, eine -RT-Kontrolle sowie DNase verdaute RNA wurden nachfolgend mittels konventioneller PCR des Referenzgens *glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)* auf erfolgreiche Transkription oder Kontamination mit genomischer DNA überprüft. Für die Amplifikation des *GAPDH*-Gens wurde ein Reaktionsgemisch aus 2 µl cDNA oder RNA, 36,3 µl ddH₂O, 5 µl PCR-Puffer (10 x), 3 µl dNTPs (10 mM), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 1,25 µl *GAPDH* fwd Primer (20 µM), 1,25 µl *GAPDH* rev Primer (20 µM), 1 µl AmpliTaq DNA Polymerase unter nachfolgenden beschriebenen Bedingungen im Master Cycler[®] Gradient (Eppendorf) inkubiert: 2 min 95°C, 35 Zyklen: 30 sec 95°C, 30 sec 64,8°C, 45 sec 72°C; 6 min 72°C, Kühlung bei 4 ° C. Das amplifizierte DNA-Produkt wurde anschließend in einem 2 %-igen Agarosegel in 1 x TAE Puffer bei 90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung des elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkts erfolgte durch Färbung des Gels mit GelRed[®] und anschließender Geldokumentation durch das Gerät Intas GDS[®]. Eine erfolgreiche cDNA-Synthese führte zu einer Amplifikation des 348 bp großen *GAPDH* PCR-Produkts, wohingegen nicht-transkribierte RNA, welche frei von genomischer DNA ist, nicht von der DNA-abhängigen AmpliTaq Polymerase amplifiziert werden konnte.

2.2.2.3 Semi-nested Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum Nachweis der murinen EPO-Isoform mS wurde ein *semi-nested* PCR-Ansatz durchgeführt, um die Spezifität und Quantität an amplifizierter DNA zu erhöhen. Dazu wurden Primerkombinationen gewählt, welche ausschließlich die Sequenz der EPO-Isoform mS erfassen. Zunächst wurde ein externer PCR-Ansatz mit dem Primerpaar ms_for und mEPO_rev2 durchgeführt. Dazu wurde ein Reaktionsgemisch bestehend aus 2 µl Neurosphären-cDNA, 12 µl ddH₂O, 4 µl HF-Puffer (10 mM), 0,4 µl dNTPS (20 µM), 0,5 µl ms-for Primer (20 µM), 0,5 µl mEPO_rev2 Primer (20 µl) und 0,2 µl Phusion Hot Start Polymerase (2 U/µl) zusammengefügt. Die DNA-Amplifikation erfolgte im Master Cycler Gradient[®] unter folgenden Bedingungen: 30 sec 98°C, 35 Zyklen: 10 sec 98°C, 20 sec 62°C, 30 sec 72°C; 10 min 72°C und Kühlung bei 6°C. Das Amplifikat wurde auf ein 2 %-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Bei der erwarteten Produktgröße von 444 bp wurde mit Hilfe eines Skalpell das Agarosestück unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 5 µl ddH₂O eluiert. Die aufgereinigte DNA der 444 bp Bande wurde als Template für eine interne PCR verwendet, welche mit dem Primerpaar mEPO_ms_short_fw und mEPO_rev1 durchgeführt wurde. Der Reaktionsansatz glich dem Reaktionsansatz der externen PCR, jedoch mit den zugehörigen Primern für die interne PCR und dem 444 bp DNA-Produkt als Template. Die Amplifikationsbedingungen sind den Bedingungen der externen PCR zu entnehmen. Das erhaltene Amplifikat wurde ebenfalls in einem 2 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die erwartete Bande bei 161 bp extrahiert, die enthaltene DNA aufgereinigt und in 12 µl ddH₂O eluiert. Die aufgereinigte DNA der 161 bp Bande wurde anschließend sequenziert. Die Sequenzierung wurde durch die Firma SMB Services in Molecular Biology (Sequenzierservice ABI BigDye-Terminator Chemie) durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Software Chromas 1.4 und BLAST (NCBI) analysiert.

2.2.2.4 Analytischer Verdau

Zusätzlich wurde DNA des 161 bp PCR-Produkts mit Hilfe des Restriktionsenzym *Hyp188I* verdaut, da bekanntermaßen eine Schnittstelle für dieses Enzym in der Sequenz der murinen EPO-Isoform mS existiert. Dazu wurden 10 µl eluiert DNA, 2 µl NEBuffer 4 (10 x), 0,5 µl *Hyp 188I* (10 U/µL) für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde auf ein 3,5 %-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Enzym *Hyp188I* spaltet die mS-Sequenz in ein 68 bp und 93 bp großes Fragment.

2.2.3 Nachweis von endogenem murinem vEPO auf Protein-Ebene

2.2.3.1 Proteinisolierung

Für den Nachweis von endogenem murinem vEPO wurden Proteine aus SVZ/Hippocampus-Gewebe, den Augen, dem Dottersack sowie der Leber von C57BL/6 Embryonen (E16) isoliert. Weiterhin wurden von 8 Wochen alten C57BL/6 Mäusen Proteine aus der SVZ, dem Hippocampus, der Retina sowie der Niere isoliert. Zusätzlich erfolgte eine Proteinisolation von *ex vivo* kultivierten Neurosphären und Astrozyten/Mikroglia-Kulturen. Die auf Eis präparierten Gewebestücke wurden zur Proteinisolation in 500 µl 1 x RIPA-Puffer mit Zusatz von 1 x Protease-Inhibitor-Cocktail aufgenommen und mit Hilfe des IKA Homogenizer (Disperser T10 basic) homogenisiert. Neurosphären sowie Astrozyten/Mikroglia wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und 5 min bei 300 x g und RT zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS erfolgte die Lyse der Zellen in 50 µl 1 x RIPA Puffer mit Zusatz von 1 x Protease-Inhibitor-Cocktail. Die in 1 x RIPA Puffer aufgenommenen Gewebelysate und Zellen wurden zunächst für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 min bei 21.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Protein enthaltenden Überstände wurden vorsichtig abpipettiert, aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch nach der Bradford Methode. Für den Bradford-Test wurden 5 µl Probe in 795 µl ddH₂O verdünnt und mit 200 µl Roti[®] Quant Reagenz auf ein Volumen von 1 ml eingestellt. Nach einer 10-minütigen Inkubation wurde die Absorption gegen einen Leerwert am Bio-Photometer bei 595 nm bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Standardkurve mit bovinem Serumalbumin (BSA), welches in den Konzentrationen 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml und 25 mg/ml vermessen wurde.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western-Blot

Für eine diskontinuierliche SDS-PAGE wurden 50 µg Protein mit 2 x SDS Probenpuffer zu gleichen Teilen verdünnt und für 5 min bei 95°C auf einem Thermoblock erhitzt. Die Proteinlysate wurde im anschließenden Schritt auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, welches aus einem 12 %-igen Trenngel und einem 5 %-igen Sammelgel bestand. Für die spätere Zuordnung der Proteingrößen wurde weiterhin ein Größenstandard (Percision Plus Protein TM Kaleidoscope[™]) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Lämmli Puffer zunächst für 20 min bei 70 V (Aufkonzentration der Proteine) und anschließend für ca. 100 min bei 120 V (Größenseparation der Proteine). Der Transfer aufgetrennter Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran erfolgte im *semidry*-Verfahren für 1 h bei 18 V in Western-Blot-Transferpuffer mittels des Trans-Blot[®] SD Cell semi-dry Blotters. Im Anschluss wurde die PVDF-Membran zur Absättigung von unspezifischen Proteinbindungsstellen in TBST mit 5 % Milchpulver für 1 h bei RT geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper

rabbit-anti-EPO (1:1000) erfolgte in TBST mit 3 % Milchpulver über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 min TBST gewaschen und mit einem *horseradish peroxidase* (HRP)-konjugierten *anti-rabbit* Antikörper (1:1000) in TBST mit 1 % Milchpulver für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde eine Inkubation der Membran für 1 min in Western Lightning Plus-ECL Reagenz angeschlossen. Die Entwicklung der Membran wurde mit Hilfe einer CCD Kamera und einer Belichtungszeit von 10 min durchgeführt. Die Verifizierung der Spezifität der detektierten Banden erfolgte mittels Präadsorption des verwendeten EPO-Antikörpers. Dazu wurden zunächst der Primär- und Sekundärantikörper durch eine 15-minütige Inkubation in Restore™ Western Blot Stripping Buffer von der Membran entfernt. 1,6 µg des verwendeten Primärantikörpers *anti-rabbit-EPO* (H162) wurden mit 40 µg rekombinanten humanen EPO (Roche) in TBST mit Zusatz von 3 % Milchpulver für 2 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Die „gestrippte“ Membran wurde erneut zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen geblockt und mit der Präadsorptionslösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper sowie die Entwicklung der Membran erfolgten wie bereits beschrieben. Die Genauigkeit der aufgetragenen Proteinmenge wurde mittels Aktin-Visualisierung (*anti-goat-Actin* 1:1000) bestimmt.

2.2.4 Produktion von rekombinatem EPO/vEPO

Die Produktion von rekombinatem EPO/vEPO Proteinen erfolgte durch Gibco® FreeStyle™ CHO-S-Zellen (engl. *chinese hamster ovary*). Für die Kultivierung wurden 1×10^7 CHO-S-Zellen in 30 ml serumfreiem Kultivierungsmedium mit Zusatz von 8 mM L-Glutamin in 125 ml Polykarbonat Erlenmeyer Zellkulturflaschen zunächst für 24 h bei 37°C und 8 % CO₂-Gehalt auf einem Kreisschüttler bei 120 – 135 rpm inkubiert. Im Anschluss an die 24-stündige Inkubation wurde die Total- und Lebendzellzahl mit Hilfe des Vitalfarbstoffes Trypanblau in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Subkultivierung erfolgte bei einer Lebendzellzahl von mindestens 60 % und einer Zelldichte von ca. $1-1,5 \times 10^6$ Zellen/ml. Die Zellen wurden in einer Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen in 30 ml frischem Kultivierungsmedium passagiert. Mindestens fünf Passagen wurden durchgeführt, bevor die CHO-S-Zellen für Transfektionsexperimente verwendet wurden. Die Transfektion von CHO-S-Zellen mit pCDNA3.1-V5/His(hEPO), pVITRO-V5/His(hS3), pVITRO-V5/His(mEPO) oder pCDNA3.1-V5/His(mS) Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des FreeStyle™MAX CHO Expression System Kits. Dazu wurden am Tag der Transfektion CHO-S-Zellen in einer Dichte von $5 - 6 \times 10^5$ Zellen/ml in 30 ml Kultivierungsmedium ausgesät und für 24 h inkubiert. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit jeweils 37,5 µg Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers für das FreeStyle™MAX CHO Expression System Kits (Life Technologies). Transfizierte CHO-S-Zellen wurden für 5 Tage bei 37°C, 8 % CO₂-Gehalt auf einem

Kreisschüttler bei 120-135 rpm inkubiert. Mit Plasmid-DNA transfizierte CHO-S-Zellen wurden im Anschluss an die 5 Tage andauernde Inkubation in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt und für 5 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und der Überstand für die Reinigung von rekombinanten V5/His-gekoppelten hEPO, hS3, mEPO und mS verwendet. Mittels Metallaffinitätschromatographie unter Verwendung des Talon Metal Affinity Resin Reagenz (Clontech Laboratories) erfolgte die Aufreinigung der rekombinanten Proteine. Dabei interagieren die Histidin-Reste (His) der rekombinanten Proteine über ihren Imidazolring mit den Kobalt-Ionen des Talon Metal Affinity Resin Reagenz und bleiben auf diese Weise an der Matrix haften. Über mehrere Waschschriffe erfolgte die Entfernung von ungebundenen Proteinen und einer abschließenden Elution von His-gekoppelten rekombinanten Proteinen über einen Imidazolpuffer, wobei das Imidazol an Kobalt-Ionen gebundene Histidine der rekombinanten Proteine kompetitiv aus der Bindung verdrängt. Für die Reinigung wurde der gewonnene Zellüberstand mit enthaltenen rekombinanten Proteinen zunächst zum Austausch des Kultivierungsmediums für 3,5 h bei 4°C gegen 1 x PBS in einem Dialyseschlauch mit einem *cutoff* von 1400 Da unter ständigem Rühren dialysiert. Das Dialysat wurde anschließend mit Hilfe der Filter Vivapore Concentrators 10/20 (Satorious AG) über Nacht bei 4°C auf ein Endvolumen von 2 ml aufkonzentriert. Am darauffolgenden Tag wurde zunächst die Talon Matrix vorbereitet, indem 150 µl Talon Metal Affinity Resin in 2 ml „*low binding*“ Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt wurde und anschließend für 2 min bei 700 x g und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und die Matrix zweimal mit 1 ml sterilem Waschpuffer gewaschen. Zur gewaschenen Talon Matrix wurde das jeweilige Dialysat hinzugefügt und für 1 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Proteine wurde der Ansatz im nächsten Schritt jeweils dreimal mit 1 ml Waschpuffer bei 700 x g für 2 min und 4°C zentrifugiert. Das übliche Säulenverfahren zur Elution gebundener Proteine von der Talon-Matrix wurde umgangen, indem die gewaschene Talon-Matrix in 200 µl Waschpuffer aufgenommen wurde und auf eine mit Watte gestopfte Pasteurpipette geladen wurde. Nach Absinken der Talon-Matrix auf das Wattebett wurden 200 µl Waschpuffer auf die gestopfte Pasteurpipette pipettiert und anschließend die His-gekoppelten rekombinanten EPO/VEPO Proteine in 200 µl Elutionspuffer eluiert. Abschließend erfolgte eine Dialyse, um überschüssiges Imidazol aus dem Eluat zu entfernen. Dazu wurde das Eluat in Slide-A-Lyszer Dialyse-Kassetten (Thermo Scientific) überführt und zweimal gegen das 100-fache Volumen an 1 x PBS über Nacht bei 4°C dialysiert. Die aufgereinigten rekombinanten Proteine wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte durch eine Western-Blot-Analyse mit Hilfe eines V5-getaggen Antikörpers (*mouse-α-V5* 1:1000). Über die Bestimmung der Bandenintensität

mittels der Software ImageJ konnte die Konzentration der aufgereinigten Proteine ermittelt werden.

2.2.5 Analyse des Einflusses von rekombinantem EPO/vEPO auf NSCs/NPCs *in vitro*

2.2.5.1 Überlebens-Assay

Für die Evaluation des Effekts von rekombinantem EPO (hEPO, mEPO) und vEPO (hS3, mS) auf *ex vivo* kultivierte NSCs/NPCs wurden Neurosphären dissoziiert (siehe Punkt 2.2.1). Anschließend wurden 3500 Zellen in Gegenwart von 20 ng/ml rekombinantem hEPO, hS3, mEPO, mS oder einem entsprechenden Volumen an 1 x PBS in 700 µl Wachstumsmedium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren in „*low binding*“ 24-well-Platten für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Die Bestimmung der Vitalzellzahl erfolgte am nächsten Tag mit Hilfe des CASY[®] Cell Counters. Es wurden insgesamt 4 Zyklen zu je 400 µl vermessen und der Mittelwert der Vitalzellzahl erfasst.

2.2.5.2 Proliferations-Assay

Für die Analyse möglicher Effekte von rekombinantem EPO/vEPO auf *ex vivo* kultivierte NSCs/NPCs wurden dissoziierte Neurosphären in einer Zellzahl von 800 Zellen in einer „*low binding*“ 96-well-Platte in 200 µl Wachstumsmedium mit Zusatz von 10 ng/ml FGF-2, 20 ng/ml EGF und 20 ng/ml rekombinantem hEPO, hS3, mEPO oder mS für 7 Tage bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Nach 4 Tagen in Kulturen wurden jeweils 10 µl Wachstumsmedium sowie 10 ng/ml FGF-2 und 20 ng/ml EGF hinzugefügt. Die Quantifizierung der Anzahl an Neurosphären erfolgte nach 7-tägiger Inkubation am Invers Mikroskop CKX 41 (Olympus).

2.2.5.3 Differenzierungs-Assay und Quantifizierung von Zellfortsätzen DCX-positiver Zellen

Die Analyse der Auswirkung von rekombinantem EPO/vEPO auf das Differenzierungsverhalten *ex vivo* kultivierter NSC/NPC's erfolgte unter adhärierenden Bedingungen. Dazu wurden sterile Deckgläschen (12 mm) in 24-well-Platten überführt und für 2 h bei RT mit je 500 µl einer 5 %-igen Poly-L-Lysin-Lösung (PLL) inkubiert. Anschließend wurden die beschichteten Deckgläschen zweimal vorsichtig mit 1 x PBS gewaschen und 70.000 dissoziierte NSCs/NPCs pro well in 700 µl Kultivierungsmedium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren ausplattiert. Die Zellen wurden für 7 Tage in Gegenwart von 20 ng/ml rekombinantem hEPO, hS3, mEPO oder mS bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Nach 4 Tagen in Kultur wurde 200 µl Medium entnommen und 300 µl frisches Kultivierungsmedium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren hinzugefügt. Im

Anschluss an die siebentägige Inkubation wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (in 1 x PBS) fixiert und immunzytochemisch gegen *doublecortin* (DCX) und *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) gefärbt. Dazu wurden die auf den Deckgläschen fixierten Zellen zunächst für 30 min in TBST gewaschen und für 1 h bei RT in TBST mit Zusatz von 10 % *normal donkey serum* (NDS) geblockt und permeabilisiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern *goat-anti-DCX* (1:500) und *rabbit-anti-GFAP* (1:500) erfolgte in TBST mit Zusatz von 1 % NDS bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrte in TBS für jeweils 10 min und anschließender Inkubation der Zellen mit den sekundären Antikörpern *donkey-anti-goat Alexa 594* (1:500) und *donkey-anti-rabbit Alexa 488* (1:500) in 1 % NDS in TBST für 4 h bei RT. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit TBS für je 10 min gewaschen und eine Kernfärbung für 1 min mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1:10000) angeschlossen. Nach sich anschließendem dreimaligem Waschen mit TBS wurden die Deckgläschen auf mit FluorSave™ Reagenz beschichtete Objektträger gebracht und konnten bei 4°C gelagert werden. Die Auswertung und Quantifizierung der Differenzierungsraten erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Leica DM RA2. Dazu wurden für jede Kondition fünf zufällig gewählte Ausschnitte durch das 10 x Objektiv über eine QImaging (ExiAqua) Kamera fotografiert. Die Zellfluoreszenzintensität des DCX- bzw. GFAP-Signals wurde mit Hilfe der Software ImageJ quantifiziert. Für die Quantifizierung der Anzahl an Zellfortsätzen von DCX-exprimierenden Zellen wurden insgesamt 15 zufällig ausgewählte Zellen pro Kondition und Tier analysiert.

2.2.6 Klonierung hEPO/vEPO-kodierender lentiviraler Konstrukte

Das verwendete lentivirale Ausgangskonstrukt pCL20-MSCV-GFP (siehe Abbildung 5) stammt aus dem Labor von Prof. Dr. med. Derek A. Person (*Department of Hematology/Oncology, Division Experimental Hematology, St. Jude Children's Hospital, Memphis, Tennessee, USA*). Für die Klonierung von EPO/vEPO wurde die Kodierungssequenz von GFP gegen die Kodierungssequenz von humanem EPO (hEPO), hS3 oder mS (vEPO) ausgetauscht. Die Generierung von pCL20c-MSCV-hEPO und pCL20c-MSCV-hS3 erfolgte im Labor von Prof. Dr. med. Derek A. Person. Im Folgenden wird beispielhaft für alle klonierten EPO/vEPO-Konstrukte die Generierung von pCL20c-MSCV-mS im Detail beschrieben, welche im Labor für Molekulare Psychiatrie durchgeführt wurde.

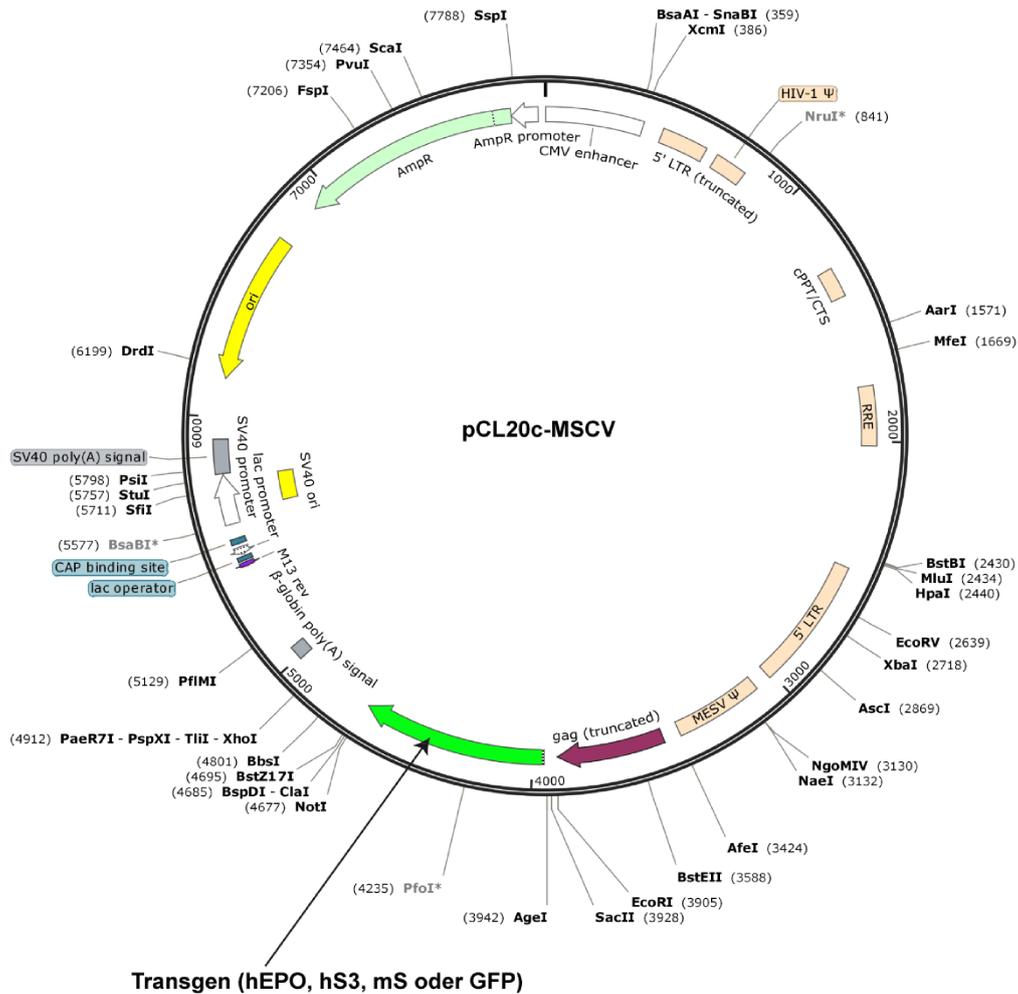


Abbildung 5: pCL20c-MSCV-Vektorplasmid

Die Kodierungssequenz von GFP wurde mittels Restriktionsverdau entfernt und die Kodierungssequenz für hEPO, hS3 oder mS in das Plasmidrückgrat kloniert.

2.2.6.1 Plasmidpräparation

Um große Mengen an pCL20c-MSCV-GFP Plasmid-DNA zu generieren wurde das EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit pCL20c-MSCV-GFP transformierten *E.coli* Übernachtskulturen. Das gewonnene DNA-Pellet wurde je nach Größe in 100-500 µl ddH₂O eluiert und die Konzentration photometrisch bei 260 nm am Nanodrop 2000 bestimmt.

2.2.6.2 Restriktionsverdau

Die für eine Insertion von Transgen-DNA erforderliche Linearisierung von pCL20c-MSCV-GFP erfolgte durch einen Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen *AgeI*-HF und *ClaI*. Der Restriktionsverdau setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: ddH₂O 68,6 µl, 10 µl BSA (100 x), 10 µl NEBuffer 4 (10 x), 2 µl *AgeI*-HF

(20 U/ μ l), 4 μ l *Clal* (10 U/ μ L), 5,4 μ l pCL20c-MSCV-GFP DNA (~10 μ g). Dieser Ansatz wurde für 8 h bei 37°C inkubiert und anschließend verbleibende Restriktionsenzymaktivität für 20 min bei 65°C inaktiviert. Die Separation des pCL20c-MSCV-Rückgrats von der GFP-Transgenkassette erfolgte in einem 1 %-igen präparativen Agarosegel. Das vollständige Volumen des Doppelverdaus wurde mit 1/6 des Volumens an 6 x Loading Dye versetzt, auf ein Agrosegel aufgetragen und bei 90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde das bei einer Größe von 7159 bp erwartete pCL20c-MSCV-DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA nach Herstellerangaben durch das DNA QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert. Extrahierte pCL20c-MSCV-DNA wurde in 20 μ l ddH₂O eluiert und die Konzentration am Nanodrop 2000 vermessen.

2.2.6.3 Dephosphorylierung

Zur Vermeidung einer Selbstligation des linearisierten pCL20c-MSCV-Vektorrückgrats wurden dessen 5'-Phosphatgruppen entfernt. Für die Dephosphorylierung wurde ein Reaktionsgemisch bestehend aus 5 μ l ddH₂O, 4 μ l SAP Buffer (10 x), 2 μ l Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/ μ L), 29 μ l pCL20c-MSCV DNA (870 ng) für 1 h Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung der Phosphatase für 15 min bei 65°C. Im Anschluss an die Dephosphorylierung wurde der Ansatz mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und die DNA-Konzentration am Nanodrop 2000 bestimmt.

2.2.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Generierung der mS-Transgen-Sequenz erfolgte aus pCDNA3.1-V5/His(mS) Template-DNA mittels einer konventionellen PCR. Dazu wurde ein mS-spezifisches Primerpaar gewählt, welches die komplette kodierende Sequenz von mS umspannte. Weiterhin wurden den Primern Restriktionsschnittstellen für *AgeI* und *Clal* angefügt sowie repetitive Nukleotide, um eine stabile Anheftung für Restriktionsendonukleasen zu schaffen. Für die Amplifikation der mS-Sequenz wurde ein Reaktionsgemisch bestehend aus 12,4 μ l ddH₂O, 0,4 μ l dNTPs (10 mM), 4 μ l HF-Buffer (5 x), 0,5 μ l mS fwd Primer (20 μ M), 0,5 μ l mS rev Primer (20 μ M), 0,2 μ l Phusion Polymerase (2 U/ μ l) und 2 μ l pCDNA3.1-V5/His(mS) hergestellt. Die PCR wurde im Master Cycler[®] Gradient unter nachfolgend beschriebenen Bedingungen durchgeführt: 60 sec 98°C, 25 Zyklen: 5 sec 98°C, 20 sec 72°C; 10 min 72°C, Kühlung bei 4°C. Das PCR-Produkt wurde anschließend auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde das mS-Amplifikat ausgeschnitten, mit dem DNA QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert und die Konzentration am Nanodrop 2000 vermessen. Für die sich anschließende *sticky end* Ligation wurde extrahierte mS-DNA mit den Restriktionsendonukleasen *AgeI-HF* und *Clal* verdaut und mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

2.2.6.5 Ligation

Das aufgereinigte mS-Insert wurde durch eine T4-DNA-Ligase in das aufgereinigte pCL20c-MSCV DNA Rückgrat ligiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C in einem Vektor-Insert Verhältnis von 1:3 oder 1:5 in 2,5 µl T4-DNA-Ligase, 3 µl T4 Ligation Buffer in einem Totalvolumen von 30 µl.

2.2.6.6 Transformation

Für die Transformation ligierter pCL20c-MSCV-mS Plasmid-DNA wurden kompetente Zellen des *E.coli* Stammes XL-1 blue (Stratagene) nach Angaben des Herstellerprotokolls mit je 5 µl des Ligationsansatz durch Hitzeschock transformiert. 150 µl transformierte *E.coli* Kulturen wurden anschließend auf vorgewärmten LB-Ampicillin Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden am folgenden Tag gepickt und in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde mittels QIAprep Spin miniprep Kit (Qiagen) präpariert, anschließend mit *AgeI-HF* und *ClaI* verdaut und auf Vorhandensein des mS-Inserts in einem 1 %-igen Agarosegel überprüft. Nach Identifizierung eines Klons erfolgte eine Sequenzierung der pCL20c-MSCV-mS Plasmid-DNA hinsichtlich der korrekten Insertion der mS-Sequenz. Die Sequenzierung wurde durch die Firma SMB Services in Molecular Biology (Sequenzierservice ABI BigDye-Terminator Chemie) durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Software Chromas 1.4 und BLAST (NCBI) analysiert.

2.2.7 Produktion, Titration und Testung hEPO/vEPO-kodierender lentiviraler Partikel

Arbeiten zur Produktion und Titration lentiviraler Partikel wurden im S2 Labor der Experimentellen Neurologie, Charité Berlin in steriler Umgebung und mit sterilen Verbrauchsmaterialien durchgeführt.

2.2.7.1 Produktion lentiviraler Partikel in HEK293-Zellen

Für die Produktion lentiviraler Partikel wurden humane embryonale Nierenzellen HEK293 TN mit einem Mix aus Vektorplasmid-DNA (pCL20c-MSCV) und Helferplasmid-DNA (pCAGkP1, pCAGA4-RTR, pcAG-VSVG) durch das CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Clontech) ko-transfiziert. HEK293-Zellen wurden in Dubellcco's Modified Eagle's High Glucose Medium (DMEM) mit Zusatz 10 % FKS, 1 % Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. 24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 25 x 10⁶ Zellen in 175 cm² Zellkulturflaschen in einem Volumen von 30 ml Kultivierungsmedium ausgesät. Der Transfektionsansatz setzte sich aus 30 µg pCAGkPG1, 10 µg pCAGA4-RTR, 10 µg pCAG-VSVG und 50 µg entsprechender pCL20c-MSCV Plasmid-DNA zusammen, welche in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml in

ddH₂O in einer 50 ml Falcon-Tube zusammengefügt wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 250 µl 2 M steriler Ca²⁺-Lösung. Unter vorsichtigem Vortexen wurden tropfenweise 2,5 ml 2 x HBS-Puffer hinzugefügt und die Lösung für 20 min bei RT inkubiert. Das Kultivierungsmedium der HEK293-Zellen wurde in der Zwischenzeit durch 30 ml frisches Kultivierungsmedium ausgetauscht und tropfenweise DNA-CaPO₄-2xHBS-Lösung hinzugefügt. 18 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit warmem 1 x PBS gewaschen und für weitere 18 Stunden in 30 ml Kultivierungsmedium inkubiert. 36 Stunden sowie 54 Stunden nach der Transfektion wurde das Kultivierungsmedium entnommen und bei 500 x g für 5 min und 4°C zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde durch einen 0,45 µm Filropur S Filter filtriert und mittels Amicon Ultra centrifugal Filter (*cutoff* 50 kDA) bei 1500 x g für ~ 60 min und 4°C aufkonzentriert. Der aufkonzentrierte Virusüberstand wurde dem Filterreservoir entnommen und bei 90.000 x g für 90 min und 4°C mittels OptimaTMMax-XP-Ultracentrifuge (Beckmann Coulter GmbH) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Viruspellet in 300 µl 1 x PBS resuspendiert und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Abschließend wurden die viralen Partikel bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.7.2 Bestimmung des Virustiters

Um bei der späteren intraventrikulären Injektion (ICV) lentiviraler Partikel (siehe Punkt 2.2.8.3) stets vergleichbare Virusmengen einzusetzen, wurde die Anzahl an infektiösen Einheiten pro µl Virussuspension (IE/µl) bestimmt. Die Bestimmung des Virustiters basiert auf der Quantifizierung der Sequenzen des *murine stem cell virus long terminal repeat* (MSCV-LTR) des Vektorplasmids transduzierter corticaler Neuronen-Kulturen mittels quantitativer *real-time PCR* (qRT-PCR). Dazu wurden primäre neuronale Zellkulturen aus der Großhirnrinde (Cortex) von Embryonen (E17) trächtiger Wistarratten gewonnen (FEM Charité-Universitätsmedizin Berlin, Tötungsanzeige TO322/96). Mittels Isofluran-Narkose wurden die Tiere narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Embryonen wurden aus dem Uterus unter sterilen Bedingungen entnommen und die Gehirne unter einem Präparationsmikroskop frei präpariert. Zunächst wurden die Meningen entfernt, um anschließend die Cortices zu präparieren. Diese wurden zweimal mit 1 x PBS gewaschen und mit einer 0,5 % / 0,2 % (w/v) Trypsin/EDTA Lösung für 15 min bei 37°C enzymatisch verdaut. Das Gewebe wurde danach zweimal mit N-Medium (Modified Eagle's Medium (MEM), 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 44 mM Glukose, 100 IE Insulin/I) gewaschen, mit einer Glaspasteurpipette dissoziiert und bei 210 x g für 2 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden anschließend in Starter-Medium (Neurobasal Medium (NBM), 2 % B 27 Supplement, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,5 mM L-Glutamin und 25 µM Glutamat) resuspendiert. Die Total- und Lebendzellzahl wurde mit Hilfe des Vitalfarbstoffes Trypanblau

in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt. Vor Aussaat der Zellen wurden zunächst 24-well-Platten mit einer Poly-L-Lysin Lösung (PLL) und Collagen beschichtet. Dazu wurden 300 µl einer 0,5 %-igen PLL-Lösung pro well hinzugefügt und die Zellkulturplatte bei RT für 75 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 x PBS erfolgte die Beschichtung der Zellkulturplatte mit 250 µl Collagen-Medium (MEM, 10 % FKS; 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES, 0,03 % Collagen G) für 1 h bei 37°C. Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach der Methode von Brewer (1995). Abschließend wurde die Zellkulturplatte zweimal mit 1 x PBS gewaschen und 325.000 Zellen pro well in 1000 µl Starter Medium ausplattiert. Diese wurden mit 1 µl aufkonzentrierter Virussuspension transduziert und für 7 Tage bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Im Anschluss an die siebentägige Inkubation erfolgte eine Isolation der Zellen durch das DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Eine qRT-PCR wurde nach Angaben des Herstellers für das Fast Start Universal SYBR Green Master Kit (Roche) mit Primerkombinationen zur Amplifikation des viralen MSCV-LTR's durchgeführt (Primer: MSCV fwd und MSCV rev). Unter nachfolgend beschriebenen Bedingungen erfolgte eine Quantifizierung der MSCV-LTR-DNA im LightCycler 1.5 (Roche): 10 min 95°C, Amplifikation 45 Zyklen: 15 sec 95°C, 10 sec 55,4°C, 15 sec 72°C; Fluoreszenzmessung bei 87°C. Zur Verifizierung der PCR-Produktspezifität wurde eine Schmelzkurvenanalyse bei 95°C durchgeführt. Die absolute Quantifizierung erfolgte anschließend mit Hilfe von Standardkurven. Die Standardkurve für das MSCV-LTR-Signal beruht auf einer seriellen Verdünnung von pCL20c-MSCV-GFP Plasmid-DNA mit bekannter Konzentration und anschließender Umrechnung mittels qRT-PCR erhaltener CP-Werte (engl. *crossing points*) in Moleküle/µl nach folgender Formel:

(1)

$$\text{Moleküle}/\mu\text{l} = \frac{\text{GFP - Vektorplasmid ng}/\mu\text{l} \times 6.022 \times 10^{14}}{\text{bp} \times 660}$$

Um im anschließenden Schritt den Virustiter (Infektiöse Einheiten (IE) pro Zelle/µl) berechnen zu können, wurden die erhaltenen Werte (Moleküle/µl) auf die Zellzahl an ausgesäten corticalen Neuronen bezogen. Die Quantifizierung der Zellzahl erfolgte anhand einer GAPDH qRT-PCR. Die Expression von GAPDH konnte in dieser Versuchsdurchführung mit der Zellzahl gleich gesetzt werden. Für die GAPDH-Standardkurve wurden 325.000 primäre corticale Neuronen seriell verdünnt und für 7 Tage bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Anschließend wurde genomische DNA isoliert und eine GAPDH qRT-PCR (Primer: GAPDH fwd und GAPDH rev) unter folgenden Bedingungen im LightCycler 1.5 durchgeführt: 10 min 95°C, Amplifikation 45 Zyklen: 15 sec 95°C, 5 sec 63°C, 15 sec 72°C; Fluoreszenzmessung bei 87°C. Die Schmelzkurven-Analyse wurde bei 95°C durchgeführt.

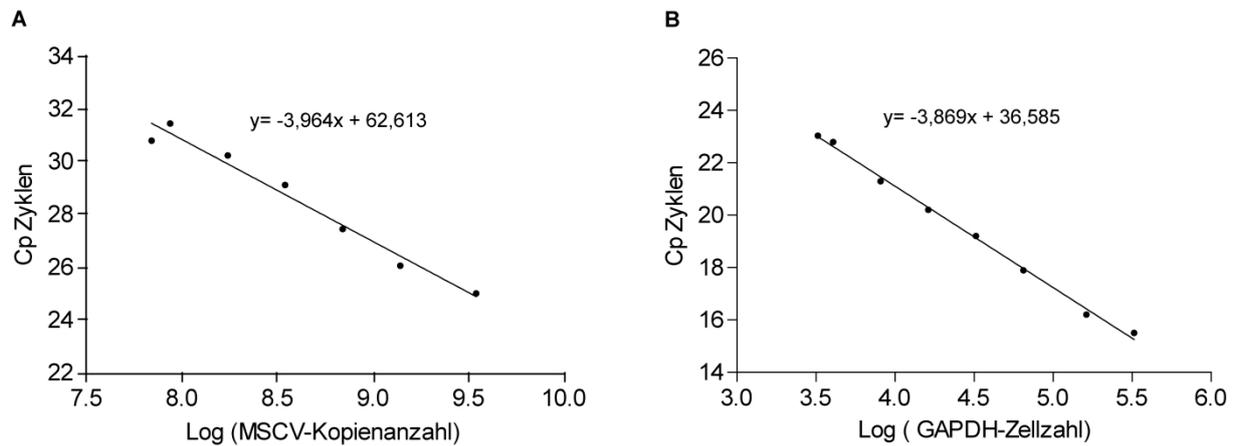


Abbildung 6: Standardkurven zur Bestimmung des Virustiters (IE/μl)

Die Bestimmung der Anzahl viraler Moleküle/μl erfolgte anhand der MSCV-Standardkurve (**A**). Die genaue Quantifizierung der Zellzahl an transduzierten primären Neuronen erfolgte anhand einer GAPDH Standardkurve (**B**).

Die abschließende Berechnung der Virustiter erfolgte nach folgender Formel:

(2)

$$\text{IE}/\mu\text{l} = \frac{\text{Log MSCV Kopienanzahl (Moleküle}/\mu\text{l})}{\text{Log GAPDH Zellzahl}}$$

2.2.7.3 Lentivirale Transduktion von NSCs/NPCs

Die Überprüfung einer erfolgreichen Transgenexpression nach Transduktion von *ex vivo* expandierten NSCs/NPCs erfolgt mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse. Dazu wurden Neurosphären dissoziiert und in „*low binding*“ 6-well-Platten in 2 ml serumfreiem Wachstumsmedium in einer Dichte von 100.000 Zellen pro well ausgesät. Anschließend erfolgte die Transduktion der Zellen mit pCL20c-MSCV-hEPO, pCL20c-MSCV-hS3, pCL20c-MSCV-mS oder pCL20c-MSCV-GFP in einer Konzentration von $4,8 \times 10^9$ IE/μl und sich anschließender Inkubation für 7 Tage bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt. 4 Tage nach Inkubationsbeginn wurde 750 μl frisches Wachstumsmedium hinzugefügt. Nach der siebentägigen Inkubation wurden die Kulturen für 5 h mit 2,5 μl Brefeldin A (BD Golgi Plus™) inkubiert und die Zellen anschließend geerntet, Proteine isoliert und die Transgenexpression mittels Western-Blot analysiert (siehe Punkt 2.2.3.2).

2.2.8 Analyse des Einflusses hEPO/vEPO-kodierender lentiviraler Partikel auf die Neurogenese *in vivo*

2.2.8.1 Tiere

Alle durchgeführten Experimente sowie Haltung der Tiere entsprachen dem Tierschutzgesetz (GV-SOLAS- und FELASA-Richtlinien) und wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin genehmigt (LAGeSo: Tierversuchsantrag G0143/12). Weiterhin wurden alle Experimente so angelegt, dass die Anzahl an verwendeten Tieren und deren Belastung so gering wie möglich gehalten wurde. Diese Studie wurde entweder mit C57BL/6N Mäusen (Charles River) oder mit weiblichen R6/2 Mäusen (Versuchstierzucht: Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM), Charité-Universitätsmedizin Berlin) durchgeführt. Die Tiere wurden in der Versuchstieranlage der Experimentellen Neurologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin unter Standardbedingungen (FEM Charité-Universitätsmedizin Berlin) gehalten (Licht/Dunkel Zyklus 12h:12h mit Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*). Die R6/2 Zucht wurde durch Rückkreuzung von R6/2 Männchen mit B6CBA F1-Weibchen aufrechterhalten.

2.2.8.2 Genotypisierung und CAG-Repeat-Bestimmung

Die Genotypisierung von R6/2 Mäusen erfolgte in einem Alter von 5 Wochen mittels PCR-Reaktion aus Ohrstanzen DNA. Dazu wurde DNA mittels des REDEExtract-N-AMP™ Tissue PCR Kits (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Amplifikation des 172 bp großen Produkts erfolgte mit einem Primerpaar, welches innerhalb der Sequenz von Exon 1 des humanen *Huntingtin*-Gens bindet (Primer: Huntingtin fwd und Huntingtin rev). Die PCR wurde am Master Cycler® Gradient unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C 5 min, 35 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 58°C, 40 sec 72°C; 7 min 72°C und Kühlung bei 4°C. Das amplifizierte Produkt wurde anschließend in einem 2 %-igen Agarosegel in 1 x TAE Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Weiterhin wurde die Länge der CAG-Wiederholungen mittels Sequenzierung bestimmt. Die CAG-Repeat-Bestimmung wurde durch die Firma SMB Services in Molecular Biology (Sequenzierservice ABI BigDye-Terminator Chemie) durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Software Chromas 1.4 analysiert. In dieser Studie verwendete R6/2 Tiere wiesen eine durchschnittliche Anzahl von 146 ± 10 CAG-Wiederholungen auf.

2.2.8.3 Intraventrikuläre Injektion (ICV) hEPO/vEPO-kodierender lentiviraler Partikel

Für die intraventrikuläre Injektion lentiviraler Partikel (Tierversuchsantrag G0143/12) wurde eine Narkose über Inhalation von 2 % Isofluran in einem Gasgemisch aus 70 % N₂O und 30 % O₂ eingeleitet und während der Operation bei 1 % Isofluran in 70 % N₂O, 30 % O₂ mittels Vaporizer (Vapor 19.3) konstant gehalten. Bei ausbleibender Reaktion der Maus auf

Schmerzreize wurde diese am Oberkiefer sowie an beiden Gehörgängen in einem stereotaktischen Rahmen (Stoelting) fixiert. Die Körpertemperatur der Tiere wurde über eine Wärmematte mit Temperaturregler bei $36,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ konstant gehalten und die Augen vor Austrocknung durch Verwendung von Augensalbe (Bepanthen, Roche) geschützt. Nach Desinfektion des Schädelfelds mit 70 % Ethanol wurde ein 3 cm sagittaler Schnitt zur Öffnung des Schädels durchgeführt. Zur erneuten Desinfektion und Hervorhebung von Bregma und Lambda wurde die Schädeloberfläche mit 3 % H_2O_2 behandelt und diese in eine Ebene gebracht. Die Injektionsstelle (Bregma: + 0,4 mm AP, +/- 1mm ML, - 1,5 mm DV) wurde mit einem dünnen wasserfesten Stift markiert und mittels Präzisionsbohrer unter topischer Analgesie (Lidocain 1 %) wurden vorsichtig kleine Löcher in die Schädeldecke gebohrt. R6/2 Tiere erhielten eine bilaterale intraventrikuläre Injektion von jeweils 1 μl lentiviraler Partikel in einer Konzentration $1,3 \times 10^9$ IE/ μl . C57BL/6N Tiere erhielten eine unilaterale intraventrikuläre Injektion von 5 μl lentiviraler Partikeln in einer Konzentration von $7,5 \times 10^8$ IE/ μl . Die Injektion in die lateralen Ventrikel erfolgte mit einer Flussrate von 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ unter Verwendung einer 5 μl Hamilton-Spritze mit 30-gauge-Nadel nach folgenden stereotaktischen Koordinaten: Bregma + 0,4 mm AP, +/- 1 mm ML und -1,5 mm DV, entsprechend der Angaben des stereotaktischen Atlas nach Paxinos und Franklin (3. Auflage, 2007). Nach vollständiger Injektion verblieb die Nadel für weitere 5 Minuten am Injektionsort und wurde anschließend langsam entfernt. Die Schädelhaut wurde im Anschluss an die Injektion vernäht und die Tiere wurden zur Schmerzstillung mit Buprenorphin 0,05 mg/kg intraperitoneal (i.p.) behandelt (zweimal alle 12 h). Zusätzlich wurden sham-Kontrollgruppen mitgeführt, welche die komplette OP-Prozedur durchliefen, jedoch keine intraventrikuläre Injektion erhielten.

2.2.8.4 BrdU-Markierung proliferierender Zellen

Mit Hilfe des Thymidinanalogons 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) ist es möglich, DNA in der S-Phase des Zellzyklus zu markieren (Gratzner, 1982). Den Tieren wurde 1 h nach intraventrikulärer Applikation hEPO/vEPO-kodierender lentiviraler Partikel 50 mg/kg BrdU in 0,9 % NaCl intraperitoneal (i.p.) injiziert. Sowohl C57BL/6N als auch R6/2 Mäuse erhielten insgesamt sechs Injektionen im Abstand von 12 h an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Die Tiere wurden 3 Tage bzw. 30 Tage nach intraventrikulärer Injektion getötet.

2.2.8.5 Körpergewicht – Verlaufsmessung

Das Gewicht von R6/2 Tiere wurde über den kompletten Zeitraum des Experiments im Fünf-Tages-Rhythmus mit Hilfe einer Electronic Scale JJ3000 A Waage bestimmt. Bei Verlust von mehr als 20 % ihres Ausgangsgewichts wurde das Experiment beendet und die Tiere wurden euthanasiert.

2.2.8.6 Magnetresonanztomographie (MRT) – Volumenbestimmung

Zerebrale MRT-Aufnahmen von R6/2 Mäusen wurden einen Tag vor der intraventrikulären Injektion lentiviraler Partikel (d-1) sowie 15 Tage (d15) bzw. 30 Tage (d30) danach aufgenommen. Dazu wurde eine Narkose über Inhalation mit 2 % Isofluran in einem Gasgemisch aus 70 % N₂O/ 30 % O₂ eingeleitet. Vollständig narkotisierte Tiere wurden anschließend in einem Plastikrahmen fixiert und mittels einer Inhalationsmaske wurde die Narkose bei 1,2 % Isofluran in 70 % N₂O/ 30 % O₂ während der Messung konstant gehalten. Die Körpertemperatur der Tiere wurde über eine Wärmematte reguliert und die Respirationsrate mittels Monitor (Small Animal Instruments, SA Instruments) kontinuierlich überwacht. Zerebrale Aufnahmen wurden an einem mit ¹H-RF-20 mm Quadratur-Volumenresonator (RAPID Biomedical) ausgestattetem Burker 7 T PharmaScan[®] 70/16 Gerät aufgenommen. Die Datenakquisition und Bildverarbeitung erfolgte mittels Paravision 5.1 Software (Burker). Die korrekte Ausrichtung des Schädels wurde zunächst durch Aufnahme einer Tripilot-Sequenz (Aufnahmeparameter: Sichtfeld: 2,80 x 2,80 cm, Schichtdicke: 1,0 mm, Schichtorientierung: axial, TE: 3,0 ms, TR: 200 ms, 5 Schichten) und einer FISP-Sequenz (Aufnahmeparameter: Sichtfeld: 2,56 x 2,56 cm, Schichtdicke: 1,0 mm, Schichtorientierung: sagittal, TE: 2,2 ms, TR: 4,5 ms, 1 Schicht) überprüft und angepasst. Im Anschluss folgte die Messung von T2-gewichteten TurboRARE Sequenzen (Aufnahmeparameter: Sichtfeld: 2,56 x 2,56 cm, Schichtdicke: 0,5 mm, Schichtorientierung: axial, TE: 36,0 ms, TR: 4200 ms, 32 Schichten). Die bei der Messung gewonnenen Rohdaten wurden mit Hilfe der Software ImageJ in das Dateiformat der Bildbearbeitungssoftware Analyze 10 (AnalyzeDirect, Inc., Lenexa USA) konvertiert. Mittels der Software Analyze 10 wurden für die sich anschließende volumetrische Analyse alle Aufnahmen auf 20 Schichten systematisch reduziert, wobei der Bereich zwischen Bulbus olfactorius und Kleinhirn abgedeckt wurde. Nach Angaben des stereotaktischen Mausgehirnatlas nach Paxinos und Franklin erfolgte die manuelle Markierung spezifischer Hirnstrukturen (Hippocampus, Striatum, Cortex, Corpus callosum) mittels Analyze 10 Software. Das Volumen der ausgewählten Hirnstrukturen wurde aus den T2-gewichteten Bildern automatisch mittels Analyze 10 Software berechnet.

2.2.8.7 Verhaltenstests

RotaRod

Die motorische Koordination und Ausdauer von R6/2 Mäusen wurde einen Tag vor intraventrikulärer Applikation lentiviraler Partikel (d-1) sowie 11 Tage (d11) und 28 Tage (d28) danach mittels RotaRod-Test ermittelt. Bei einem RotaRod handelt es sich um eine rotierende Walze, wobei die Fähigkeit der Tiere sich auf dieser zu halten gemessen wird. Die Tiere wurden auf die Testapparatur (Process Control RotaRod 3375 series, TSE systems

GmbH) gesetzt, welche innerhalb von 300 Sekunden von 4 rpm auf 40 rpm beschleunigte. Gemessen wurde die Zeit, wie lange sich die Maus auf dem RotaRod halten konnte. Jedes Tier hatte 3 Versuche, welche in einem Test-Intervall von jeweils 15 Minuten erfolgten. Für die statistische Analyse wurde der Mittelwert aus drei Versuchen herangezogen.

Open-Field-Test

In diesem Versuchsvorhaben wurde die Gesamtaktivität von R6/2 Mäusen einen Tag vor (d-1) sowie 15 Tage (d15) und 30 Tage (d30) nach intraventrikulärer Applikation lentiviraler Partikel bestimmt. Dazu wurden die Tiere in einen für sie unbekanntem offenen weißen Kunststoffbehälter (Open-Field-Box) gesetzt und die Wegstrecke gemessen, welche sie in einem Beobachtungszeitraum von 5 min zurücklegten. Die Open-Field-Box hatte einen Durchmesser von 50 x 50 cm mit 39 cm hohen Wänden und wurde in einem Testraum mit konstanten Belichtungsverhältnissen von 35 lx platziert. Die Gesamtaktivität der Tiere wurde mit Hilfe des VideoMot2 Systems (Version 5.68, TSE systems GmbH) über eine Videokamera (Panasonic, CCTV) erfasst. Die Testapparatur wurde zwischen jedem Durchgang gründlich mit Decosept AF (Dr. Schumacher GmbH) gereinigt.

Y-Maze-Test

Der Effekt einer lentiviral vermittelten Überexpression auf das räumliche Arbeitsgedächtnis von R6/2 Mäusen wurde 15 Tage und 30 Tage nach intraventrikulärer Injektion im Y-Maze-Test bestimmt. Die Y-Maze Testapparatur bestand aus grau lackiertem Plastik mit drei identischen Armen (Länge: 40 cm, Höhe: 10,5 cm und Breite: 3 cm), welche in einem Winkel von 120°C zueinander angeordnet waren. Unter konstanten Belichtungsverhältnissen (35 lx) wurde jeweils ein Tier in Testarm Nr. 1 platziert und die Anzahl an Armeintritten über die Versuchsdauer von 8 Minuten dokumentiert. Ein Armeintritt galt als vollständig, wenn die Hinterläufe der Maus sich vollständig innerhalb des Arms befanden. Die Anzahl der Armeintritte wurde mit Hilfe des VideoMot2 Systems (Version 5.68, TSE systems GmbH) über eine Videokamera (Panasonic, CCTV) erfasst. Als spontan alternierendes Verhalten wurde der aufeinanderfolgende Armeintritt in überlappenden Triplets gewertet (siehe Abbildung 7). Zwischen jedem Durchlauf wurde die Testapparatur gründlich mit Decosept gereinigt.

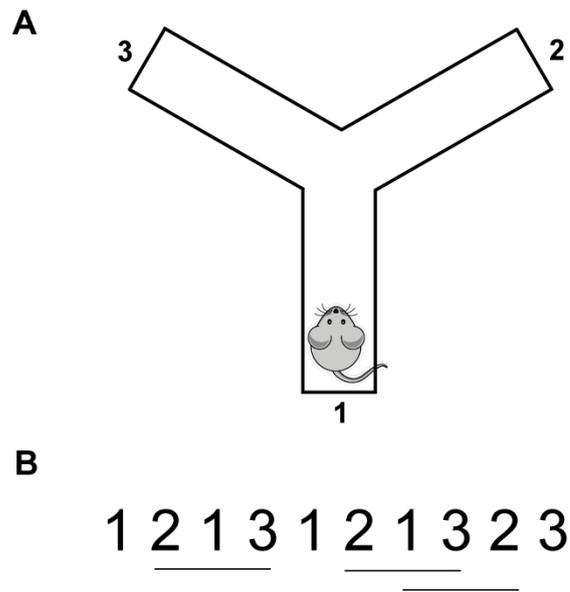


Abbildung 7: Y-Maze-Testapparatur zur Bestimmung der Arbeitsgedächtnisleistung

A) Y-Maze Testapparatur. Zu Beginn des Experiments wurde die Maus in Testarm Nr.1 platziert und die Anzahl an Armeintritten dokumentiert. **B)** Darstellt ist ein exemplarisches Beispiel an Armeintritten. Als Triplet wurde der aufeinanderfolgende Armeintritt in alle drei möglichen Testarmen gewertet (schwarz unterlegte Zahlenkombinationen).

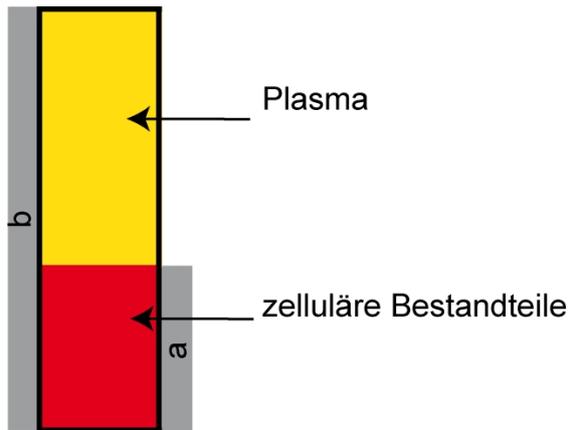
Der Effekt der lentiviralen Überexpression auf das räumliche Arbeitsgedächtnis wurde schließlich als prozentuale Alternation angegeben, welche anhand folgender Formel berechnet wurde:

(3)

$$\text{Alternationen \%} = \frac{\text{Anzahl an überlappenden Triplets}}{\text{Anzahl an maximal möglichen Armeintritten (Gesamtanzahl-1)}} * 100$$

2.2.8.8 Bestimmung des Hämatokrits

3 Tage bzw. 30 Tage nach intraventrikulärer Injektion wurden die Tiere durch subkutane Injektion mit Ketaminhydrochlorid (66,7 mg/kg) und Xylazinhydrochlorid (11,7 mg/kg) anästhesiert und mittels Punktion des retrobulbären Venenplexus Blut in heparinisierte Hämatokritkapillaren entnommen. Diese wurden anschließend bei 1500 x g für 10 min bei RT zentrifugiert und der Hämatokritwert als Verhältnis an zellulären Bestandteilen zum Gesamtvolumen angegeben (siehe Abbildung 8).



$$(4) \quad \text{Hämatokrit \%} = \frac{a}{b} * 100$$

Abbildung 8: Bestimmung des Hämatokritwerts

Der Hämatokritwert wurde als Verhältnis von zellulären Bestandteilen (a) zum Gesamtvolumen (b) in Prozent angegeben.

2.2.8.9 Transkardiale Perfusion

Die Tiere wurden 3 Tage bzw. 30 Tage nach der intraventrikulären Injektion durch subkutane Injektion mit Ketaminhydrochlorid (66,7 mg/kg) und Xylazinhydrochlorid (11,7 mg/kg) anästhesiert. Nach Eintreten tiefer Anästhesie und vollständiger Analgesie wurden die Tiere thorakotomiert. Nach Punktion der rechten Herzkammer mit einer Perfusionskanüle wurde der linke Herzvorhof eröffnet und die Tiere mit 30 ml eiskaltem 1 x PBS perfundiert. Anschließend wurden die Tiere dekapitiert und das Gehirn entnommen. Für proteinbiochemische (Western-Blot, ELISA) und molekularbiologische (qRT-PCR) Untersuchungen wurde jeweils eine Hemisphäre pro Gehirn in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für immunhistochemische Zwecke wurde eine Hemisphäre für 72 h in 4 % Paraformaldehyd (PFA) bei 4°C nachfixiert. Die dauerhafte Lagerung des Gewebes erfolgte bei 4°C in 1 x PBS mit Zusatz von 0,01 % Natriumazid. Für durchflusszytometrische Untersuchungen wurden die entnommenen Gehirne direkt im Anschluss an die Perfusion weiterverarbeitet (siehe Punkt 2.2.8.15)

2.2.8.10 Real-time PCR

Die Quantifizierung der Transgenexpression sowie Bestimmung der Expressionsraten pro-inflammatorischer Zytokine (TNF α und CCL2) von R6/2 Tieren wurde mittels quantitativer *real-time* PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Auf einer Kühlplatte (Para Cooler A) mit Durchlichtmikroskop (Leica Mz6) erfolgte die Präparation des Hippocampus, des Cortex und der SVZ+Striatum der bei -80°C gelagerten Gehirnhälften. Die Isolation von RNA aus diesen Geweberegionen erfolgte über eine TRIzol Extraktion. Dazu wurde das Gewebe in 2 cm³ „Douncer“ in 1 ml Trizol homogenisiert und für 5 min bei RT inkubiert. Das zerkleinerte Gewebe wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 12.000 x g bei 4°C

zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 200 µl Chloroform hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde gemischt, für 3 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Im Anschluss an diesen Zentrifugationsschritt wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abpipettiert, mit 500 µl kaltem Isopropanol vermischt, für 10 min bei RT inkubiert und für 15 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml 75 % Ethanol aufgenommen und für 5 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das gereinigte RNA Pellet wurde in 20 µl DEPC-H₂O gelöst. Der anschließende DNase-Verdau erfolgte mit RQ1-DNase (siehe Punkt 2.2.2.2). Die mittels DNase behandelte RNA wurde im nachfolgenden Schritt mittels Phenol-Chloroform aufgereinigt. Dazu wurde das Volumen des DNase-Verdau mit 165 µl DEPC-H₂O auf ein Volumen von 200 µl eingestellt und 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) zugefügt und gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 12.000 x g und 4°C wurde die obere Phase vorsichtig abpipettiert, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform/Isopropanol (24/1) vermischt. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4°C und 12.000 x g. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, mit 20 µl 8 M Lithiumchlorid und 550 µl absolutem Ethanol vermischt und die RNA über Nacht bei -80°C ausgefällt. Am nächsten Tag wurden die Proben für 30 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 600 µl 75 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde erneut bei 12.000 x g für 30 min und 4°C zentrifugiert und abschließend das RNA Pellet in 20 µl DEPC-H₂O gelöst. Die cDNA-Synthese von 218 ng DNase-verdauter sowie aufgereinigter RNA erfolgte mittels Superscript II reverser Transkriptase (siehe Punkt 2.2.2.2). Die Vermessung von qRT-PCRs erfolgte in Duplikaten am LightCycler 96 (Roche) mit Hilfe des LightCycler FastStar Essential DNA Master Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers. Zur Quantifizierung der Transgenexpression kamen Primerpaare zur Amplifikation der GFP-Sequenz (Primer: GFP fwd und GFP rev) und der hEPO-Sequenz (Primer: hEPO fwd und hEPO rev) zum Einsatz. Für die Analyse der Expression pro-inflammatorischer Zytokine wurden Primerpaare zur Amplifikation der TNFα-Sequenz (Primer: TNFα fwd und TNFα rev) und der CCL2-Sequenz (Primer CCL2 fwd und CCL2 rev) gewählt. Alle gemessenen Werte wurden auf die vermessenen Werte der qRT-PCR des Haushaltsgens GAPDH normiert (Primer: GAPDH fwd und GAPDH rev). Alle PCR-Produkte wurden unter Standardbedingungen amplifiziert (95°C 10 min, 45 Zyklen: 95°C 10 sec, 66°C 10 sec, 72°C 15 sec) und eine Schmelzkurven-Analyse (95°C 10 sec, 65°C 60 sec, 97°C 1 sec) zur Verifizierung der Produkt-Spezifität durchgeführt. Die relative Quantifizierung der x-fachen Expression von CCL2 und TNFα erfolgte anhand eines Primereffizienz korrigierten Quantifizierungsmodells. Dazu wurde zunächst mit Hilfe einer cDNA-Verdünnungsreihe die Primereffizienz eines jeden verwendeten Primerpaars bestimmt, indem die eingesetzte

cDNA-Menge in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl (CP) dargestellt wurde. Die Effizienz (E) der Primer berechnete sich nach der Formel:

(5)

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{Steigung}}\right)}$$

Die sich anschließende relative effizienzkorrigierte Quantifizierung der Genexpression durch Normierung auf das Haushaltsgen GAPDH wurde anhand einer modifizierten $\Delta\Delta\text{CP}$ Methode bestimmt (Pfaffl, 2001).

(6)

$$\text{x - fache Expression über Wildtyp} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}}(\text{Wildtyp}-R6/2)}}{(E_{\text{GAPDH}})^{\Delta\text{CP}_{\text{GAPDH}}(\text{Wildtyp}-R6/2)}}$$

Die relative Quantifizierung der Transgenexpression von hEPO und GFP erfolgte durch eine Normierung auf das Haushaltsgen GAPDH durch eine vereinfachte effizienzkorrigierte Quantifizierung.

(7)

$$\text{Relative mRNA - Expression} = \frac{(E_{\text{Tansgen}})^{-\text{CP}}}{(E_{\text{GAPDH}})^{-\text{CP}}}$$

2.2.8.11 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Quantifizierung der lentiviral vermittelten Expression von hEPO im Hippocampus, Cortex und SVZ+Striatum auf Proteinebene wurde mittels ELISA erbracht. Auf einer Kühlplatte (Para Cooler A) mit Durchlichtmikroskop (Leica Mz6) erfolgte die Präparation der jeweiligen Gehirnregionen der zuvor bei -80°C gelagerten Hemisphären. Die präparierten Gewebestücke wurden in $500\ \mu\text{l}$ $1 \times$ PBS mit Zusatz von $1 \times$ Protease-Inhibitor-Cocktail aufgenommen, mit Hilfe des IKA Homogenizer homogenisiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Homogenisat für 20 min bei $21.000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand entnommen und mittels BCA^{TM} Protein Assay Kit (Pierce) die Proteinkonzentration bei $550\ \text{nm}$ bestimmt. Die Bestimmung der hEPO-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Quantikine IVD ELISA Human Erythropoietin Kits (R&D). Der ELISA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Absorption am Plattenlesegerät Dynex MRX TC bei $450\ \text{nm}$ verlesen. Die Angaben der hEPO-Konzentration erfolgte in $\text{mIU}/\mu\text{g}$ (IU= *international unit*).

2.2.8.12 Immunhistochemie

PFA-fixierte Hemisphären wurden zur Kyroprotektion für 48 h in eine 30 %-ige Sucrose-Lösung (in 1 x PBS) bei 4°C eingelegt. Zunächst wurden von allen Hemisphären der Bulbus olfactorius sowie das Kleinhirn abgetrennt. Anschließend wurden am Kyrotom 40 µm dicke koronale Schnitte durch die vollständige Ebene der Hemisphäre angefertigt. Entsprechend des stereotaktischen Mausgehirnatlas nach Paxinos und Franklin erfolgte die immunhistochemische Färbung von Zellen in der subventrikulären Zone (SVZ) in den Schnittebenen 0,14 bis 1,54 mm (ausgehend vom Bregma). Die immunhistochemische Färbung von Zellen innerhalb des hippocampalen Gyrus dentatus (DG) erfolgte in den Schnittebenen -1,8 bis -3,3 mm (ausgehend vom Bregma). Jeder 6. Schnitt (240 µm Intervall) in den Schnittebenen der SVZ oder SGZ wurde gefärbt (1:6 Serie). Insgesamt wurden 6 Schnitte pro 1:6 Serie immunhistochemisch angefärbt.

Zunächst wurden „free-floating“ koronale Schnitte für eine immunhistochemische BrdU-Färbung vorbereitet. Dazu wurden die Schnitte zunächst für 30 min bei 37°C in einer 2 N HCL-Lösung inkubiert und anschließend mit Borat-Puffer (0,1 M Na₂B₄O₇, pH 8,5) für 10 min bei RT gewaschen. Nach Waschen der Schnitte in TBS erfolgte eine Inaktivierung der endogenen Peroxidaseaktivität durch Inkubation in einer 0,03 %-igen H₂O₂-Lösung in TBS für 30 min bei RT. Die Schnitte wurden anschließend zweimal in TBS für je 10 min gewaschen und anschließend mit 10 % *normal goat serum* (NGS) und 0,3 % Triton-X-100 in TBS (TBST) geblockt und permeabilisiert. Die Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper *rat-anti-BrdU* (Bio-Rad AbD Serotec) erfolgte über Nacht in TBST in einer Verdünnung von 1:300. Nach erneutem Waschen der Schnitte in TBS für jeweils 10 min wurden diese für 2 h mit dem biotinylierten Sekundärantikörper *goat-anti-rat IgG* (Vector Laboratories) in einer Verdünnung von 1:200 in TBST inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend dreimal für je 10 min mit TBS gewaschen und für 90 min in einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain ABC Elite Kit) inkubiert. Die abschließende Visualisierung der Bindung des Antikörpers an BrdU erfolgte mittels Inkubation in 0,5 mg/ml DAB (3,3' Diaminobenzidin) und 0,02 % H₂O₂ (v/v) in TBS. Nach Entfernung überschüssigen DABs durch Waschen in TBS wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei RT getrocknet. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, Rotihistol) entwässert und in Roti[®]-Histokitt (Roth) eingebettet.

Weiter koronale Schnitte wurden separat mittels DAB-Färbung gegen *doublecortin (DCX)* und *ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1)* immunhistochemisch angefärbt. Das Protokoll entsprach dem oben beschriebenen BrdU-Färbeprotokoll mit Umgehung der Inkubationsschritte in 2 N HCL und Borat-Puffer. Die Schnitte wurden in 10 % *normal donkey*

serum (NDS) geblockt und mit dem Primärantikörper *goat-anti-doublecortin* (Santa Cruz) in einer Verdünnung von 1:400 oder dem Primärantikörper *rabbit-anti-Iba1* (Wako Chemical) in einer Verdünnung von 1:500 inkubiert. Die Schnitte wurden weiterhin mit dem biotinylierten Sekundärantikörper *horse-anti-goat* (Vector Laboratories) oder *horse-anti-rabbit* (Vector Laboratories) in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert.

Die Visualisierung an doppelgefärbten DCX/BrdU-positiven Zellen basiert auf einer fluoreszenzbasierten Darstellung. Dazu wurden die koronalen Schnitte zunächst in 10% NDS geblockt und mit dem Primärantikörper *goat-anti-DCX* in einer Verdünnung von 1:400 über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurde dreimal mit TBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper *donkey-anti-goat Alexa 594* (Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:300 bei RT für 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für die BrdU-Färbung vorbereitet, indem sie für 15 min bei RT in 4 % PFA fixiert wurden. Die Denaturierung der DNA erfolgte in einer 2 N HCL-Lösung für 30 min 37°C und Fixierung in 4 % PFA für 10 min bei RT. Im Anschluss an eine Inkubation mit Proteinase K (0,5 µg/ml) für 4 min bei 37°C wurden die Schnitte erneut in 4 % PFA für 15 min bei RT fixiert und anschließend dreimal für je 10 min in TBS gewaschen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper *rat-anti-BrdU* in einer Verdünnung von 1:300 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper *donkey-anti-rat Alexa 488* (Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:200 für 4 h bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal mit TBS für je 10 min gewaschen und eine Kernfärbung für 1 min mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1:10000) angeschlossen. Nach abschließendem dreimaligem Waschen mit TBS wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und mit FluorSave™ Reagenz (Calbiochem) eingebettet.

Einzelne koronale Schnitte (5 Schnitte pro Tier) wurden für weitere immunhistochemische Färbungen mit folgenden Primärantikörpern inkubiert: *rabbit-anti-EPO* (H-162, 1:200, Santa Cruz), *mouse-anti-NeuN* (1:200, Chemicon) und *rat-anti-GFP* (1:200, Nacalai). Die Visualisierung der hEPO-Expression erfolgte entsprechend dem beschriebenen DAB-Färbeprotokoll. Für Doppelfärbung von hEPO und NeuN wurden die Schnitte für 3 h mit folgenden Sekundärantikörpern inkubiert: *donkey-anti-rabbit Alexa 488* (1:300) und *donkey-anti-mouse Alexa 647* (1: 300).

2.2.8.13 Quantifizierung immunhistochemisch markierter Zellen im *Gryus dentatus* (DG) und der subventrikulären Zone (SVZ)

Die Quantifizierung immunhistochemisch markierter Zellen erfolgte unter verblindeten Bedingungen. Jeder 6. Schnitt einer koronalen Schnittserie (240 µm Intervall) wurde analysiert. Entsprechend des stereotaktischen Mausgehirnatlas nach Paxinos und Franklin erfolgte die Quantifizierung immunmarkierter Zellen in der subventrikulären Zone (SVZ) in

den Schnittebenen 0,14 bis 1,54 mm (ausgehend vom Bregma). Die Quantifizierung immunmarkierter Zellen innerhalb des hippocampalen Gyrus dentatus (DG) erfolgte in den Schnittebenen -1,8 bis -3,3 mm (ausgehend vom Bregma). Zur Analyse von Zellproliferationsprozessen, der Neurogenese sowie der Dichte an Mikroglia Zellen in den neurogenen Nischen wurden BrdU-, DCX- bzw. Iba1-immunmarkierte Zellen an einem konventionellen Lichtmikroskop (Leica Microscope DMRA) mit Hilfe eines 40 x Objektivs (Ölimmersion) quantifiziert. Um die Gesamtzellzahl an immunmarkierten Zellen in der SVZ oder des hippocampalen DG pro Hemisphäre zu erhalten, wurden die Zellzahlen mit 6 multipliziert (Kohl *et al.*, 2010). Für den Fall, dass ein Schnitt in der 1:6 Serie nicht auswertbar war, wurde die Zellzahl mit einem Korrekturfaktor multipliziert, welcher sich aus dem Verhältnis an möglichen zu zählenden Schnitten (6) zu tatsächlich gezählten Schnitten zusammensetzte (Phillips *et al.*, 2005).

Für die Quantifizierung an immunpositiven Zellen in der SVZ wurden alle Zellen gezählt, welche sich an der lateralen Zellwand der lateralen Ventrikel befanden. Die Quantifizierung immunpositiver Zellen im hippocampalen DG erfolgte in der neurogenen subgranulären Zone (SGZ) sowie in der Körnerzellschicht (GCL) und der Molekularschicht (MCL). Weiterhin wurde die Totalzellzahl an immunpositiven Zellen pro hippocampalen DG mit einem Flächenquotienten multipliziert, welcher sich aus dem Verhältnis vom Referenzvolumen zum Volumen der Struktur ergab. Die Volumina wurden durch manuelle Umrandung des DG mit Hilfe des halbautomatischen Stereologiesystem Stereoinvestigator (Version 10, MicroBrightField) bestimmt. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind als Gesamtanzahl an BrdU-, DCX- oder Iba1-positiven Zellen pro SVZ bzw. DG und Hemisphäre angegeben.

Für die Quantifizierung an DCX/BrdU-doppelpositiven Zellen in der SVZ bzw. des DG wurden alle BrdU-positiven Zellen in einer 1:6 koronalen Schnittserie gezählt und die Anzahl an BrdU-positiven Zellen bestimmt, welche eine Ko-Lokalisation mit dem Marker DCX aufwiesen. Die Auswertung und Quantifizierung an DCX/BrdU-doppelpositiven Zellen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Leica DM RA2. Dazu wurden pro Hemisphäre und Region sechs Schnitte durch ein 20 x Objektiv über eine QImaging (ExAqua) Kamera für das BrdU- und das DCX-Fluoreszenzsignal fotografiert. Die Quantifizierung von BrdU-positiven Zellen sowie die Bestimmung der Ko-Lokalisation von DCX/BrdU erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ. Die Ko-Lokalisation einzelner DCX/BrdU-doppelpositiver Zellen wurde mit einem konfokalen Mikroskop (Leica TSC, SP5) durch Bildserien entlang der z-Achse (*z-stacks*) bestätigt (insgesamt fünf zufällig gewählte Schnitte pro Gruppe). Die Ergebnisse der Quantifizierung sind dargestellt als prozentuale Angabe an DCX/BrdU-doppelpositiven Zellen pro SVZ oder DG und Hemisphäre.

2.2.8.14 Quantifizierung der Zellfortsätze und der Migrationsfähigkeit DCX-exprimierender Zellen innerhalb des hippocampalen DG

Die Analyse der Morphologie sowie der Migrationskapazität von DCX-exprimierenden Zellen innerhalb des hippocampalen DG wurde an einem konventionellen Lichtmikroskop mit einem 40 x Objektiv (Ölimmersion) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte unter verblindeten Bedingungen. Die 1:6 Schnittserie (siehe Punkt 2.2.8.13) zur Quantifizierung DCX-positiver Zellen im hippocampalen DG wurde für die Quantifizierung der Zellfortsätze und der Migrationskapazität verwendet. Dazu wurde die Zellzahl an DCX-positiven Zellen mit Zellfortsätzen und die Anzahl an DCX-positiven Zellen bestimmt, welche von der subgranulären Zone in die Körnerzellschicht migrieren. Es erfolgte eine manuelle Abgrenzung der subgranulären Zone (SGZ) von der Körnerzellschicht (GCL) und von der Molekularschicht (MCL) mit Hilfe des halbautomatischen Stereologiesystem Stereoinvestigator. Ausschließlich DCX-positive Zellen, deren Zellfortsätze bis in die Molekularschicht hineinreichten, wurden in die Quantifizierung miteinbezogen. Für die Analyse der Migrationskapazität wurden ausschließlich DCX-positive Zellen gezählt, die sich außerhalb der subgranulären Zone befanden. Die Gesamtanzahl an migrierenden DCX-positiven Zellen sowie mit verästelten Zellfortsätzen ausgestatteten DCX-positiven Zellen wurde in gleicher Weise berechnet wie unter Punkt 2.2.8.13 beschrieben. Die Ergebnisse sind dargestellt als Gesamtanzahl an verästelten DCX-positiven Zellen oder migrierenden DCX-positiven Zellen pro DG und Hemisphäre.

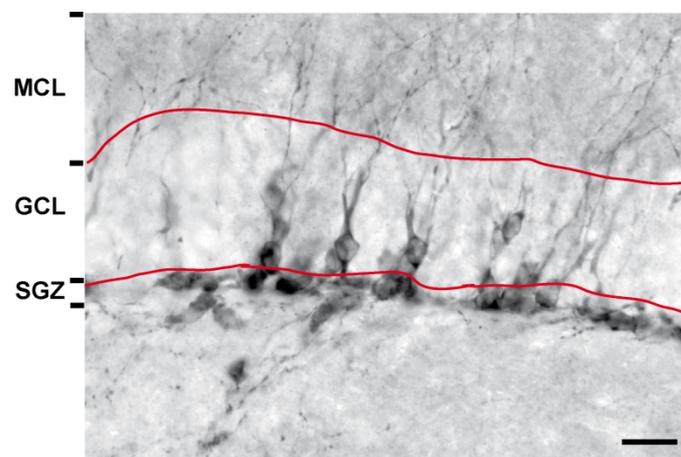


Abbildung 9: Morphologische Charakterisierung DCX-exprimierender Zellen im DG

Durch Abgrenzung (rote Linie) der Körnerzellschicht (GCL) von der Molekularschicht (MCL) wurden ausschließlich DCX-positive Zellen in die Quantifizierung miteinbezogen, deren Zellfortsätze bis in die Molekularschicht (MCL) reichten. Weiterhin wurden migrierende DCX-positive Zellen außerhalb der subgranulären Zone (SGZ) erfasst. 40-fache Vergrößerung, Messbalken 20 µm.

2.2.8.15 Durchflusszytometrie (FACS; Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)

Für die Analyse hippocampaler Mikroglia-Populationen wurden R6/2 Tiere 30 Tage nach intraventrikulärer Applikation lentiviraler Partikel mit kaltem 1 x PBS mit Zusatz von 20 mM

EDTA transkardial perfundiert. Nach Entnahme der Gehirne wurde aus einer Hemisphäre mit Hilfe eines Präparationsmikroskops (Invers Mikroskop Leica Zoom 2000) der Hippocampus freipräpariert und für 30 min bei 37°C in 1,2 ml Dissoziierungspuffer (Dubellico's Modified Eagle's High Glucose Medium (DMEM) mit Zusatz von 5 % FKS und 1 mg/ml Collagenase (Roche)) inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde das Gewebe zur weiteren Vereinzelung zweimal nach 10 min mechanisch trituriert. Im Anschluss an die Dissoziation des Gewebes erfolgte die Zugabe von 24 µl 500 mM EDTA. Das zerkleinerte Gewebe wurde durch einen 70 µm Nylonfilter filtriert, 28 ml DMEM hinzugefügt und die vereinzelteten Zellen wurden bei 300 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden einmal in 1 ml FACS-Puffer gewaschen und erneut bei 300 x g für 10 min und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend für 10 min bei 4°C in 50 µl FC-Block (*α*-mouse CD 16/32) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen im weiteren 50 µl Antikörper enthaltenden FACS-Puffer resuspendiert und für 15 min bei 4°C gegen CD 45 (FITC, Klon 30-F11), CD11b (PerCP-Cy5.5, Klon M1/70) und MHC-II (PE-Cy7, Klon IM5/114-15.2) gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift schloss sich die intrazelluläre Färbung mit einem Antikörper gegen TNFα (PE; Klon TN-3-19/12) mit Hilfe des Fixation/Permeabilization Kit (BD Bioscience) an. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden mittels 1 % PFA (in 1 x PBS) für 10 min bei 4°C fixiert, mit FACS-Puffer gewaschen und am darauffolgenden Tag am FACS Canto II vermessen. Die Daten wurden mittels FlowJo Software (TreeStar) ausgewertet.

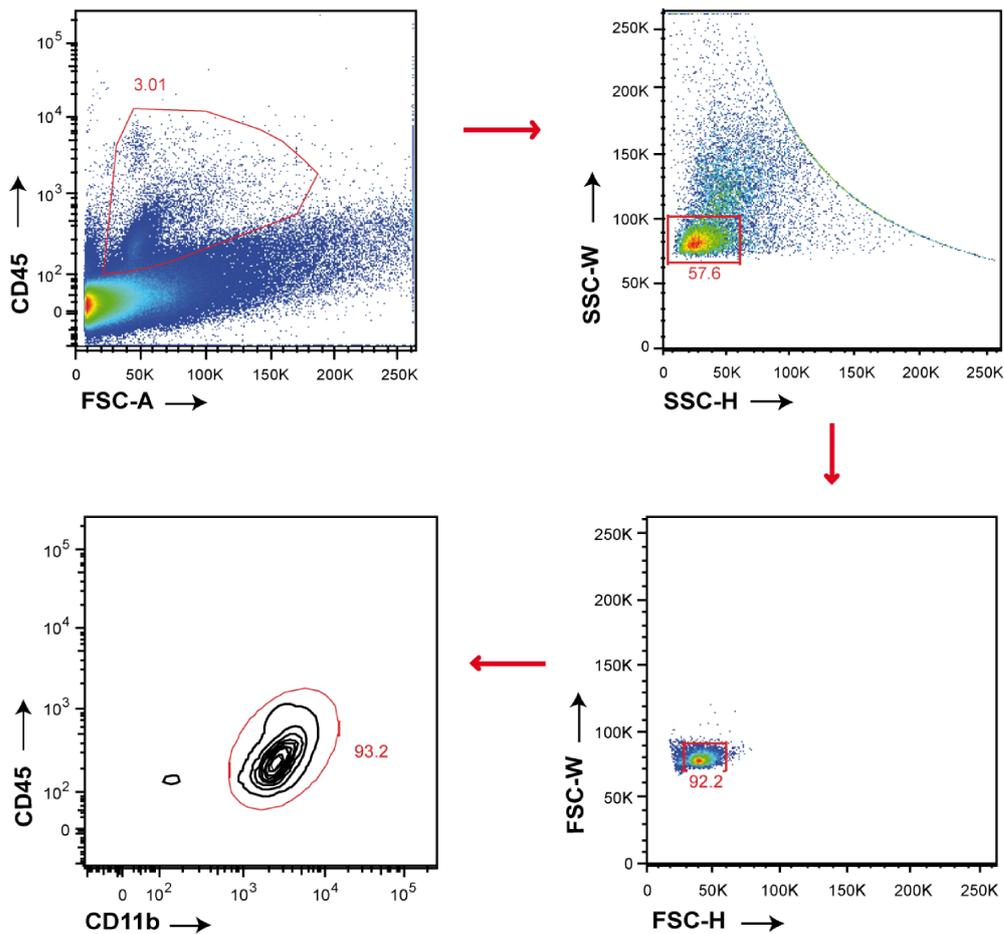


Abbildung 10: Gating-Schema zur Erfassung hippocampaler Mikroglia-Populationen

Im Durchflusszytometer vermessene hippocampale Zellen wurden zunächst im Dot-Blot hinsichtlich lebender CD45+ Zellen im Vorwärtsstreulicht (FSC-A, *Forward Scatter*) eingegrenzt. Diese wurden im nächsten Schritt hinsichtlich ihrer Granularität und ihres Volumens im Seitwärtsstreulicht (SSC, *Side Scatter*) als auch im Vorwärtsstreulicht eingegrenzt. Abschließend wurden CD45+, CD11b+ Mikroglia-Populationen erfasst.

2.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 5.0, GraphPad Prism 6.0 sowie IBM SPSS Statistics 22. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit $p \leq 0,05$ bezeichnet. Alle ermittelten Daten wurden zunächst mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft. In Abhängigkeit von den im Experiment zugrunde liegenden Faktoren (Behandlung, Zeitpunkt) wurde bei normalverteilten Daten eine One-Way-ANOVA (einfractionell) oder eine Two-Way-ANOVA (zweifractionell) mit Dunnett's Korrektur durchgeführt. Lag keine Normalverteilung der Daten vor, wurde ein nichtparametrischer Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Korrektur durchgeführt. Der statistische Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen erfolgte mittels Student's t-Test.

3. Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse von murinem EPO und vEPO

3.1.1 Nachweis von mS-Transkripten in *ex vivo* kultivierten neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen (NSCs/NPCs)

Die funktionelle Beteiligung von murinem Wildtyp-EPO bei Prozessen der embryonalen und adulten Neurogenese warf die Frage auf, ob die murine EPO-Isoform mS ebenso Einfluss auf die Neurogenese nimmt und von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird. Bisher ist der Nachweis von mS in murinen Transkripten der Niere und des Gehirns gelungen (Bonnas, 2009). Dabei ist jedoch eine genaue Spezifikation der zellulären Genexpression noch nicht erfolgt. In diesem Versuchsvorhaben wurden neuronale Stamm- und Vorläuferzellen (NSCs/NPCs) aus der SVZ adulter Wildtyp-Mäuse isoliert und in Gegenwart der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 zu Neurosphären kultiviert (Abbildung 11A). Da bereits bei der Identifizierung der murinen Isoform mS deutlich wurde, dass diese im Vergleich zum Wildtyp-EPO in deutlich geringeren Mengen exprimiert wird (Bonnas, 2009), wurde ein *semi-nested* PCR-Ansatz mit zwei Primerpaarkombinationen gewählt. Durch die Wahl mS-spezifischer Primer und dem sich anschließenden analytischen Restriktionsverdau sowie durch die Sequenzierung von PCR-Produkten war es möglich, den Nachweis von mS-Transkripten in murinen Neurosphären-Kulturen zu erbringen (Abbildung 11).

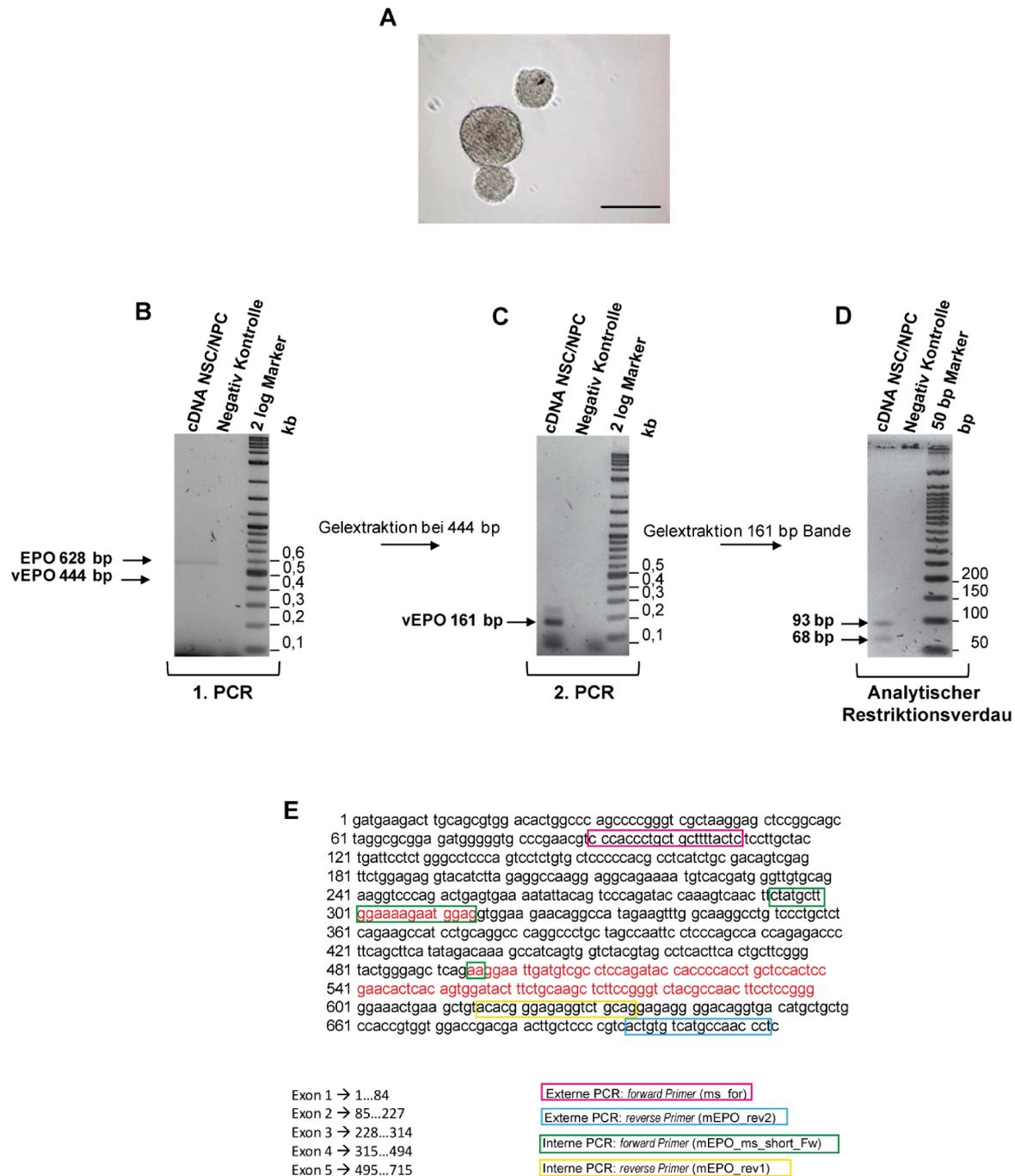


Abbildung 11: Nachweis von mS-Transkripten in Neurosphären

A) Lichtmikroskopische Aufnahme von *ex vivo* kultivierten Neurosphären. 20-fache Vergrößerung, Messbalken 150 µm. **B)** cDNA von Neurosphären wurde in einem ersten PCR-Ansatz mit dem Primerpaar ms_for und mEPO_rev2 amplifiziert und gelelektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Dabei konnte ein 628 bp großes Produkt detektiert werden, welches der Größe von murinem Wildtyp-EPO entsprach. Bei der für die murine EPO-Isoform mS erwarteten Produktgröße von 444 bp wurde ein Gelstück herauspräpariert und mittels Gelextraktion DNA isoliert. **C)** Die aufgereinigte DNA wurde als Template für einen zweiten PCR-Ansatz mit dem Primerpaar mEPO_ms_short_FW und mEPO_rev1 verwendet. Das Amplifikat wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und ein 161 bp großes Produkt detektiert. **D)** Mittels Gelextraktion wurde DNA der 161 bp Bande aufgereinigt und mit *Hyp188I* verdaut. Der Restriktionsverdau führte dazu, dass das 161 bp große DNA-Produkt in die zuvor für die mS-Sequenz errechneten 68 bp und 93 bp große Fragmente gespalten wurde. **E)** Darstellung der mRNA-Sequenz von murinem Wildtyp-EPO. Rot unterlegt dargestellt ist das Sequenzierergebnis extrahierter DNA der 161 bp Bande. Zusätzlich sind die jeweiligen verwendeten Primer farblich in der mRNA-Sequenz von murinem Wildtyp-EPO dargestellt, ebenso die zugehörigen Exongrenzen.

Zunächst wurde ein erster PCR-Ansatz mit Primern durchgeführt, welche im Exon 1 und Exon 5 der murinen Wildtyp-EPO Sequenz binden. Hierbei konnte ein Produkt von 628 bp amplifiziert werden, welches der zuvor berechneten Größe von murinem Wildtyp-EPO entsprach (Abbildung 11B). Weitere kleinere Produkte konnten mit der verwendeten Primerpaarkombination im Agarosegel nicht dargestellt werden. Jedoch wurde davon ausgegangen, dass weitere Amplifikate vorliegen, welche aufgrund der geringen Sensitivität der Detektionsmethode nicht detektiert werden konnten. Aus diesem Grund wurde im Bereich der berechneten Größe von 444 bp für das mS-Amplifikat eine Gelextraktion vorgenommen, die enthaltene DNA aufgereinigt und in einem zweiten PCR-Ansatz amplifiziert (Abbildung 11B). Die Primerpaarkombination wurde dabei so gewählt, dass ausschließlich cDNA der murinen Variante mS amplifiziert werden konnte, da die Sequenz des verwendeten *forward* Primer Exon-übergreifend zwischen Exon 3 und Exon 5 lag (Abbildung 11E). Auf diese Weise wurden ausschließlich Transkripte amplifiziert, welche wie murines mS durch das Fehlen des 4. Exons charakterisiert sind. Die elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate des zweiten PCR-Ansatzes lieferte schließlich ein 161 bp großes cDNA-Produkt, welches der errechneten Größe von mS entsprach (Abbildung 11C). Die 161 bp große Bande wurde aus dem Gel extrahiert und die enthaltene DNA aufgereinigt. Die Bestätigung, dass es sich um mS-Transkripte handelt, wurde mittels analytischem Verdau und Sequenzierung erbracht. Die Identifizierung von Restriktionsschnittstellen innerhalb der mS-Sequenz zeigte, dass das Restriktionsenzym *Hyp 188I* die amplifizierte DNA in ein 68 bp und 93 bp schneidet. Isolierte DNA der 161 bp Bande wurde mit *Hyp 188I* verdaut und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass das verwendete Restriktionsenzym *Hyp 188I* das 161 bp große DNA-Produkt in die zuvor errechneten 68 bp und 93 bp großen Fragmente spaltete (Abbildung 11D). Zusätzlich wurde die Sequenz der 161 bp Bande bestimmt und so sicher nachgewiesen, dass mS-Transkripte in Kulturen von Neurosphären exprimiert werden (Abbildung 11E).

3.1.2 Charakterisierung der basalen Proteinexpression von murinem EPO und vEPO

Der Nachweis einer basalen Proteinexpression muriner EPO-Isoformen (vEPO) im adulten und embryonalen ZNS konnte noch nicht erbracht werden. Für die Erstellung eines Expressionsprofils von EPO und vEPO wurde Gewebe von adulten und embryonalen (E16) Wildtyp-Mäusen präpariert und Proteine extrahiert. Zusätzlich wurden Proteine von *ex vivo* kultivierten Neurosphären und Mikroglia/Astrozyten-Kulturen isoliert, um ein Proteinexpressionsprofil auf zellulärer Ebene erstellen zu können. Im Anschluss an eine SDS-PAGE basierte Separation der Proteine nach Molekulargröße wurde eine Western-Blot-Analyse mit Hilfe des Antikörpers H-162-EPO durchgeführt, welcher sich gegen die Aminosäuren 28-189 des ausgereiften humanen EPO richtet. Da das *EPO*-Gen im

Verlauf der Evolution hochkonserviert vererbt wurde, weist die Aminosäuresequenz von humanem und murinem EPO eine Homologie von 80 % auf (Wen *et al.*, 1993). Durch Präadsorption des verwendeten Antikörpers mit rekombinantem humanem EPO wurde dennoch die Spezifität der detektierten Banden überprüft, um auszuschließen, dass der verwendete EPO-Antikörper unspezifisch an murine Proteinepitope bindet (Abbildung 12).

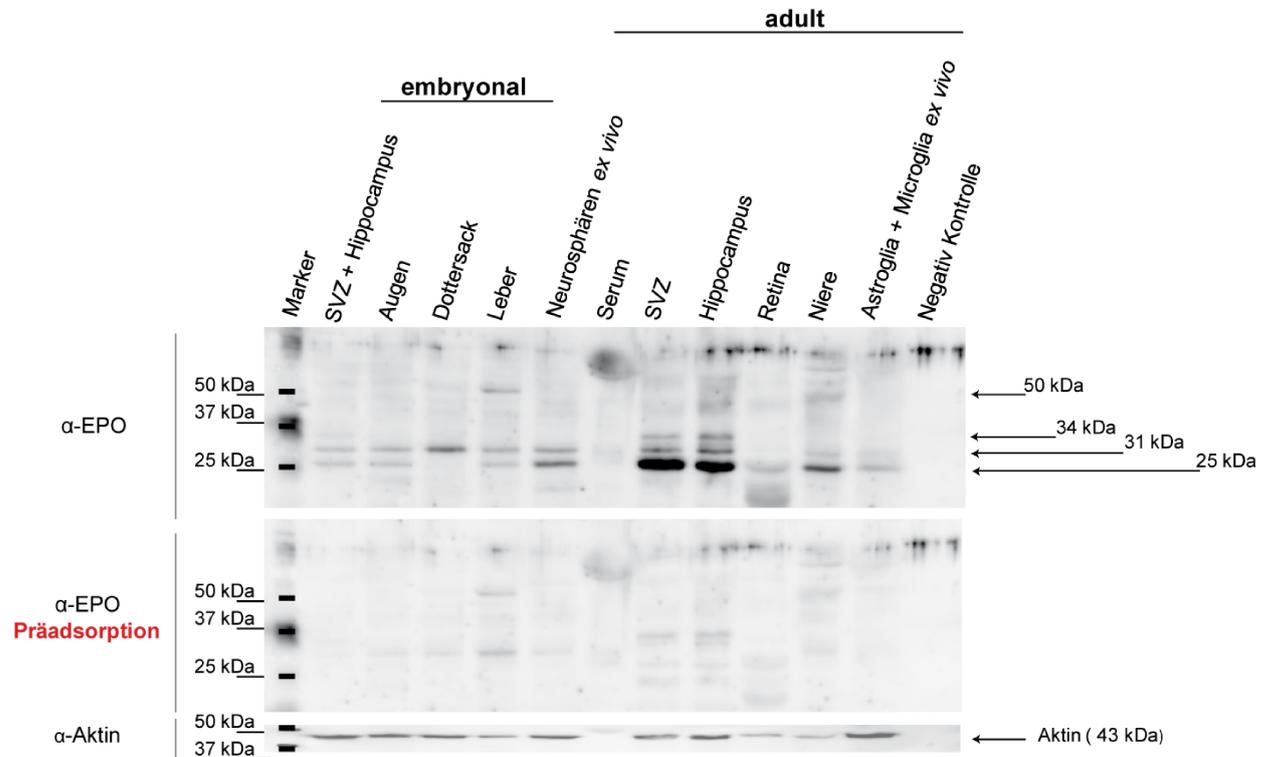


Abbildung 12: Western-Blot-Analyse der basalen Proteinexpression von EPO und vEPO

Proteine wurden von embryonalem und adultem murinem Gewebe sowie von *ex vivo* kultivierten Neurosphären und Astrozyten/Mikroglia-Kulturen isoliert. Als Kontrollen wurden eine Serum-Probe sowie eine negative Kontrolle (RIPA-Puffer) mitgeführt. 50 µg an denaturiertem Protein wurden pro Geltasche geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe eines humanen EPO-Antikörpers konnten mehrere Banden unterschiedlicher molekularer Größe zwischen 25 kDa und 50 kDa detektiert werden. Im Anschluss wurde der gebundene Antikörper mittels „Strippen“ von der Membran entfernt und der Blot nach erneutem „Blocken“ mit einer Lösung an zuvor präadsorbiertem EPO-Antikörper inkubiert. Die Entwicklung des Blots im Anschluss an die Inkubation mit den präadsorbierten Antikörpern zeigte, dass die zuvor detektierten Banden in einem ausreichenden Maße geblockt wurden und somit die Spezifität des verwendeten Antikörpers für murines EPO bestätigt werden konnte. Die Aktin-Bande bei 43 kDa zeigt, dass einheitliche Proteinmengen geladen wurden.

Die Auswertung des Western-Blots zeigt, dass sowohl für adultes als auch für embryonales Gewebe unterschiedlich große Proteinprodukte mit Hilfe des H-162-EPO-Antikörpers detektiert werden konnten (Abbildung 12). In allen Gewebe- und Zellysaten, mit Ausnahme des adulten Retinalysats sowie der Serum- und Negativkontrolle, konnte ein ca. 31 kDa großes Produkt nachgewiesen werden. In Proteinlysaten embryonaler Anlagen der SVZ und des Hippocampus, der embryonalen Augen, der embryonalen Leber, der adulten SVZ, des adulten Hippocampus, der adulten Niere, der adulten Retina und in Proteinlysaten von *ex vivo* kultivierten Neurosphären und Mikroglia/Astrozyten-Kulturen konnte ein ca. 25 kDa

großes Produkt nachgewiesen werden. Auffällig ist hierbei, dass die Proteinexpression des 25 kDa großen Proteinprodukts besonders stark in der adulten SVZ und dem adulten Hippocampus ausgeprägt war, aber auch für *ex vivo* kultivierte Neurosphären als auch adultes Nierengewebe war eine deutliche Expression des 25 kDa Proteinprodukts nachweisbar. Interessanterweise konnte ausschließlich in Gewebelysaten der adulten SVZ und Hippocampus ein 34 kDa großes Produkt nachgewiesen werden. Für die embryonale Leber und die adulte Niere, den beiden Hauptproduktionsstätten der EPO-Bildung, konnte zusätzlich ein größeres Produkt im Bereich von 50 kDa detektiert werden. Durch Präadsorption des verwendeten Antikörpers mit humanem rekombinatem EPO konnten die zuvor detektierten Banden in einem ausreichenden Maße geblockt und somit die Spezifität des verwendeten Antikörpers für murine EPO-Proteinepitope bestätigt werden.

3.2 Einfluss von EPO und vEPO auf die Neurogenese *ex vivo*

3.2.1 Rekombinantes humanes EPO und murines vEPO fördern das Überleben *ex vivo* kultivierter NSCs/NPCs

Bereits in mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass rekombinantes EPO die Proliferation, Differenzierung und das Wachstum von *ex vivo* kultivierten murinen neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen beeinflusst (Shingo *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006b). In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit rekombinantes vEPO (rhS3 und rmS) im Vergleich zu rekombinatem humanem (rhEPO) und murinem (rmEPO) Wildtyp-EPO das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und das Wachstum von NSCs/NPCs in Kultur beeinflussen. Dazu wurden rekombinante V5-getaggte Proteine in CHO-S-Zellen hergestellt und mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt. Aus der SVZ isolierte NSCs/NPCs wurden zunächst in Gegenwart der Wachstumsfaktoren FGF-2 und EGF zu Neurosphären kultiviert. Diese beiden Wachstumsfaktoren stimulieren die Proliferation und das Überleben von NSCs/NPCs in Kultur und sorgen somit dafür, dass die Zellen ihr Selbsterneuerungspotenzial sowie ihre Multipotenz beibehalten (Reynolds und Rietze, 2005). Mit Hilfe eines Überlebens-Assays wurde in einem ersten Versuch untersucht, ob dissoziierte Neurosphären in Abwesenheit von FGF-2 und EGF, jedoch in Gegenwart von rhEPO, rhS3, rmEPO und rmS eine höhere Überlebensrate in Kultur zeigen. Dazu wurden dissoziierte Neurosphären für 24 h in Gegenwart von jeweils 20 ng/ml an rekombinatem Protein inkubiert und im Anschluss die Vitalzellzahl bestimmt (Abbildung 13A). Weiterhin wurde untersucht, ob das Proliferationsverhalten von NSCs/NPCs durch Inkubation mit rhEPO, rhS3, rmEPO und rmS beeinflusst wird. Dazu wurden dissoziierte Neurosphären in Gegenwart von EGF und FGF-2 sowie jeweils 20 ng/ml an rekombinatem Protein erneut zu Neurosphären kultiviert und nach 7-tägiger Inkubation die Anzahl mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestimmt (Abbildung 13B).

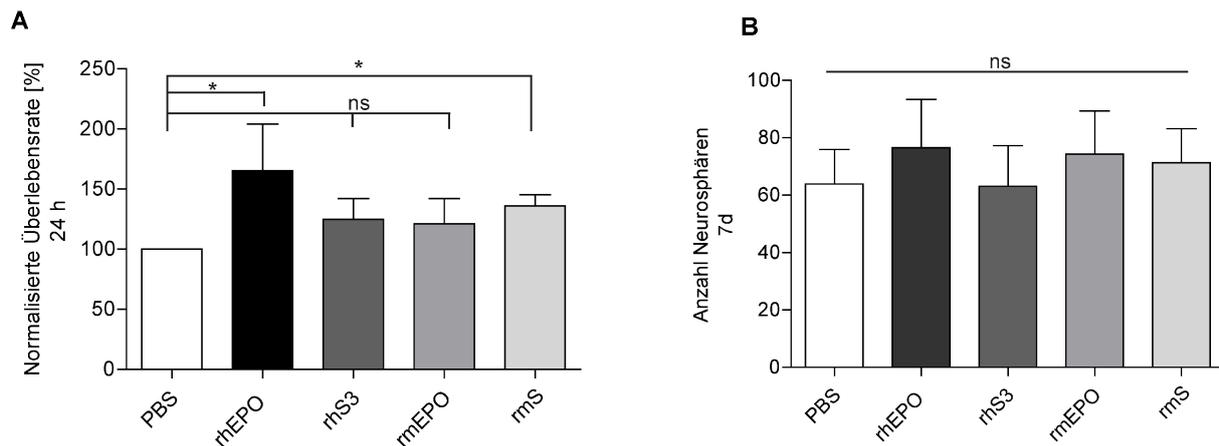


Abbildung 13: Einfluss von rekombinantem EPO und vEPO auf das Überleben und die Proliferation von ex vivo kultivierten NSCs/NPCs

A) Bestimmung der Überlebensrate von dissoziierten NSCs/NPCs nach 24-stündiger Inkubation in Gegenwart von 20 ng/ml rekombinantem EPO bzw. vEPO. Die Daten sind als normalisierte prozentuale Überlebensrate im Vergleich zur PBS-Kontrolle dargestellt. Rekombinantes humanes EPO (rhEPO) und rekombinantes murines mS (rmS) erhöhten die Überlebensrate von NSCs/NPCs signifikant im Vergleich zur PBS-Kontrolle. Die Überlebensraten wurden mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Korrektur analysiert und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=8 Tiere pro Gruppe). * $p \leq 0,05$, ns= nicht signifikant vs. PBS. **B)** Bestimmung der Anzahl an Neurosphären nach siebentägiger Inkubation in Gegenwart von Wachstumsfaktoren (EGF+FGF-2) sowie jeweils 20 ng/ml rekombinantem Protein. Keines der rekombinanten Proteine führte zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an gebildeten Neurosphären ($F_{4,34}=0,1851$ $p=0,99443$). Die Anzahl an Neurosphären wurde mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur analysiert, die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=8 Tiere pro Gruppe). * $p \leq 0,05$, ns= nicht signifikant vs. PBS.

Es konnte nachgewiesen werden, dass rhEPO sowie rmS das Überleben von NSCs/NPCs gegenüber der PBS-Kontrolle signifikant erhöhen. Für rekombinantes hS3 sowie rekombinantes murines EPO konnte lediglich eine Tendenz einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zur PBS-Kontrolle gezeigt werden (Abbildung 13A). Um festzustellen, ob rekombinante Proteine zu einer verstärkten Proliferation von NSCs/NPCs führen, wurde nach siebentägiger Inkubation die Anzahl an Neurosphären bestimmt. Es konnte für keine der verwendeten rekombinanten Proteine eine erhöhte Anzahl an Neurosphären gegenüber der unbehandelten PBS-Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 13B).

3.2.2 Rekombinantes hEPO und vEPO fördern die Differenzierung von Neuroblasten *in vitro*

Unter adhärenzbedingungen können *ex vivo* kultivierte NSCs/NPCs zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten ausdifferenzieren. Um zu testen, ob rekombinantes EPO bzw. vEPO das Differenzierungsverhalten von kultivierten NSCs/NPCs zu einem bestimmten Phänotyp stimuliert, wurden dissoziierte Neurosphären für 7 Tage auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen in Gegenwart von 20 ng/ml rekombinantem Protein ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren inkubiert. Nach der siebentägigen Inkubation wurden die Zellen fixiert und immunhistochemische Färbungen gegen GFAP (Astrozyten) und DCX

(Neuroblasten) angeschlossen. Für die Fragestellung, in welchen Zelltyp NSCs/NPCs in Gegenwart von rekombinantem hEPO, hS3, mEPO oder mS bevorzugt differenzieren, wurde die Intensität der Zellfluoreszenz für jede Kondition und beide Marker bestimmt (Abbildung 14A+B). Weiterhin wurde getestet, inwieweit rekombinantes EPO bzw. vEPO den Reifungsprozess von Neuroblasten beeinflussen, indem die Anzahl an Zellfortsätzen von DCX-exprimierenden Zellen pro Kondition gezählt wurde (Abbildung 15A+B).

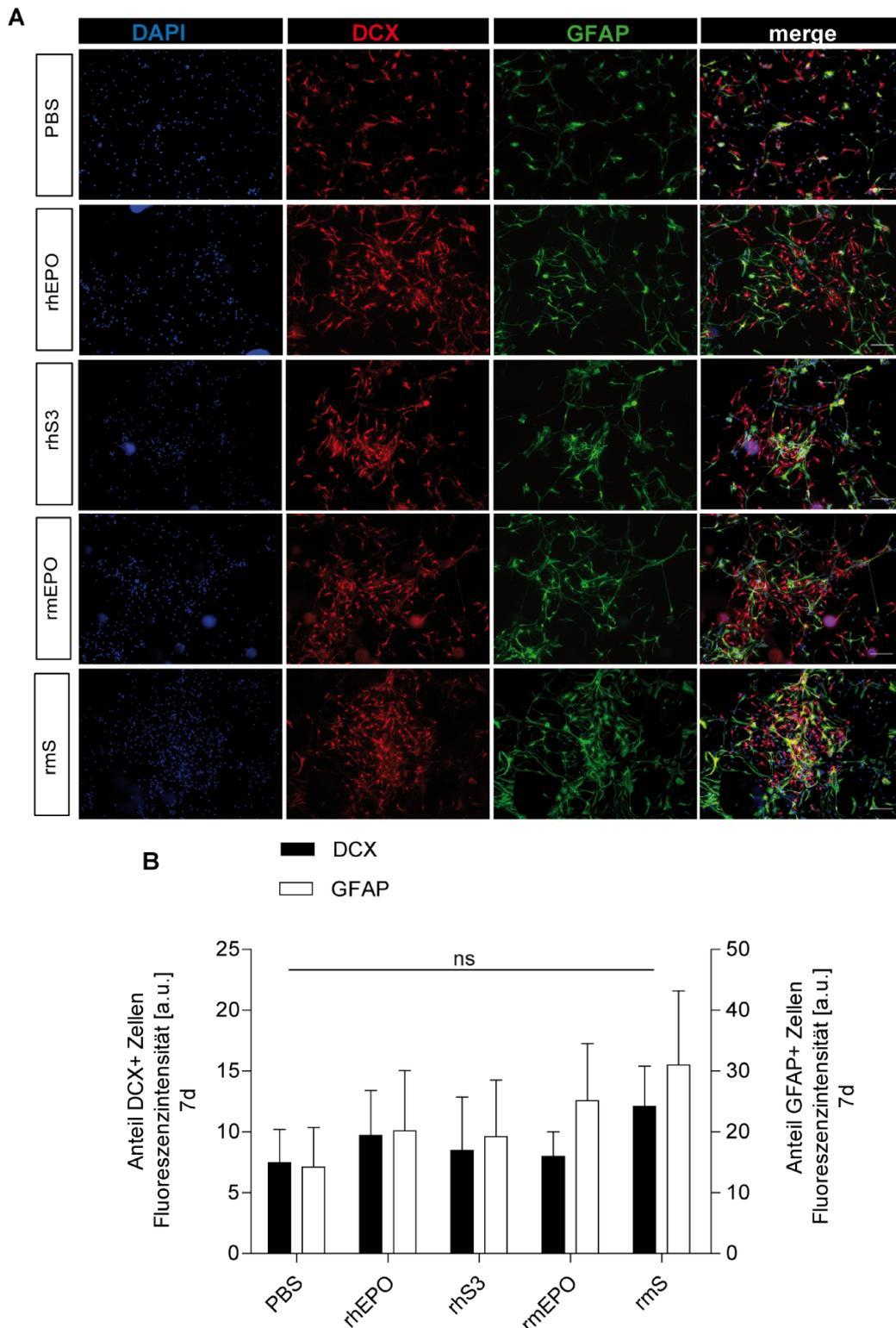


Abbildung 14: Differenzierung von NSCs/NPCs in Gegenwart von rekombinantem EPO und vEPO

A) Repräsentative Aufnahmen von fixierten immunhistochemisch gefärbten NCSs/NPCs, welche für 7 Tage in Gegenwart von 20 ng/ml rhEPO, rhS3, rmEPO, rmS oder PBS inkubiert wurden. 10-fache Vergrößerung, Messbalken 100 μ m. **B)** Statistische Auswertung der fluoreszenzbasierten Quantifizierung von DCX- bzw. GFAP-exprimierenden Zellen, angegeben in *arbitrary units* (a.u.). Der linken Y-Achse kann die Fluoreszenzintensität DCX-exprimierender Zellen zugeordnet werden. Der rechten Y-Achse kann die Fluoreszenzintensität GFAP-exprimierender Zellen zugeordnet werden. Die statistische Auswertung der Differenzierungsdaten erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Korrektur, die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=4 Tiere pro Gruppe), ns= nicht signifikant vs. PBS.

So kann Abbildung 14B entnommen werden, dass kein signifikanter Unterschied innerhalb der verschiedenen Gruppen hinsichtlich einer bevorzugten Differenzierung zu DCX-exprimierenden Neuroblasten ($p=0,41$) oder GFAP-exprimierenden Astrozyten ($p=0,78$) im Vergleich zur PBS-Kontrolle festgestellt werden konnte. Allerdings wiesen mit rekombinantem EPO bzw. vEPO-behandelte NCSs/NPCs im Vergleich zur PBS-Kontrolle eine Tendenz zu einem verstärkten Differenzierungsverhalten und somit erhöhten Überleben in Kultur auf. Insbesondere Kulturen von NSCs/NPSCs, welche in Gegenwart von rekombinantem mS inkubiert wurden, zeigten diesen Effekt. Dies kann Abbildung 14A entnommen werden, wo eine erhöhte Anzahl an DCX-exprimierenden und GFAP-exprimierenden Zellen im Vergleich zur PBS-Kontrolle zu erkennen ist. Zusammenfassend lässt sich jedoch kein signifikanter Effekt hinsichtlich eines bevorzugten Differenzierungsverhaltens zu einem bestimmten Phänotyp von *ex vivo* kultivierten NSCs/NPCs nach Behandlung mit rekombinantem hEPO, hS3, mEPO oder mS feststellen.

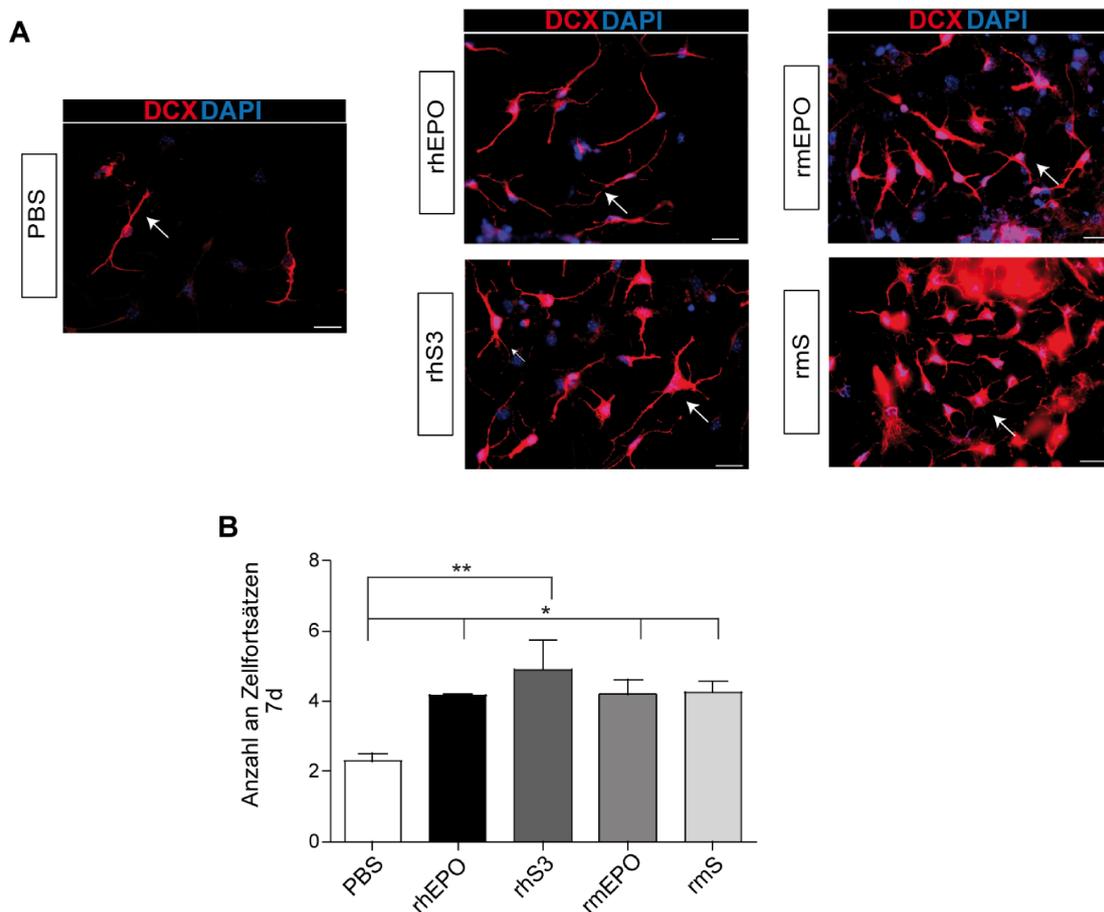


Abbildung 15: Rekombinantes EPO und vEPO fördern das Wachstum von Neuroblasten

A) Repräsentative Aufnahmen von DCX-exprimierenden Neuroblasten, welche für 7 Tage in Gegenwart von rhEPO, rhS3, rmEPO oder rmS unter differenzierenden Bedingungen kultiviert wurden. 40-fache Vergrößerung, Messbalken 20 μm . **B)** Quantifizierung der Zellfortsätze von DCX-exprimierenden Neuroblasten. Die Behandlung mit rekombinanten hEPO, hS3, mEPO sowie mS führte zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an Zellfortsätzen ($F_{4,14}=4,612$, $p=0,0228$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way-ANOVA und Dunnett's Korrektur. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=3$ Tiere pro Gruppe). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ vs.PBS.

Hinsichtlich des Einflusses der verschiedenen rekombinanten Proteine auf den Reifungsprozess von Neuroblasten konnte deutlich nachgewiesen werden, dass rekombinantes hEPO, hS3, mEPO und mS die Differenzierung von DCX-exprimierenden Neuroblasten im Vergleich zur PBS-Kontrolle fördern. So ist Abbildung 15 zu entnehmen, dass DCX-exprimierende Neuroblasten nach Inkubation mit rhEPO, rhS3, rmEPO und rmS ein signifikant verstärktes Zellfortsatzwachstum gegenüber der PBS-Kontrolle aufwiesen.

3.3 Einfluss von lentiviral exprimiertem hEPO und vEPO auf die murine Neurogenese *in vivo*

3.3.1 Lentiviral induzierte Expression von hEPO und vEPO in NSCs/NPCs

Da die intraperitoneale Gabe von rekombinatem EPO aufgrund der geringen Durchlässigkeit für die Blut-Hirn-Schranke als wenig geeignete Methode zu sehen ist, um eine ausreichend hohe und lang anhaltende Konzentration an zirkulierendem EPO im ZNS zu erhalten, wurden in diesem Versuchsvorhaben lentivirale Partikel für den Gentransfer von humanem EPO (hEPO) bzw. vEPO in das murine ZNS verwendet. Bevor die generierten lentiviralen Partikel für eine *in vivo* Applikation verwendet werden konnten, wurde getestet, ob diese neuronale Stamm- und Vorläuferzellen transduzieren und das Transgen stabil exprimieren. Dazu wurden zunächst NSCs/NPCs aus der SVZ von adulten C57BL/6N Mäusen isoliert und zu Neurosphären kultiviert. Die Neurosphären wurden dissoziiert und anschließend mit lentiviralen Partikeln versetzt, welche für hEPO, hS3, mS oder GFP kodierten ($4,8 \times 10^9$ IE/ μ l). Da hEPO-, hS3- und mS-kodierende lentivirale Partikel keine GFP-Kodierungssequenz enthalten, wurde die Expression von hEPO, hS3 und mS in transduzierten Neurosphären mittels Western-Blot analysiert. So wurde im Anschluss an die siebentägige Inkubation zelluläres Protein von den transduzierten Neurosphären isoliert und die Transgenexpression im Western-Blot untersucht.

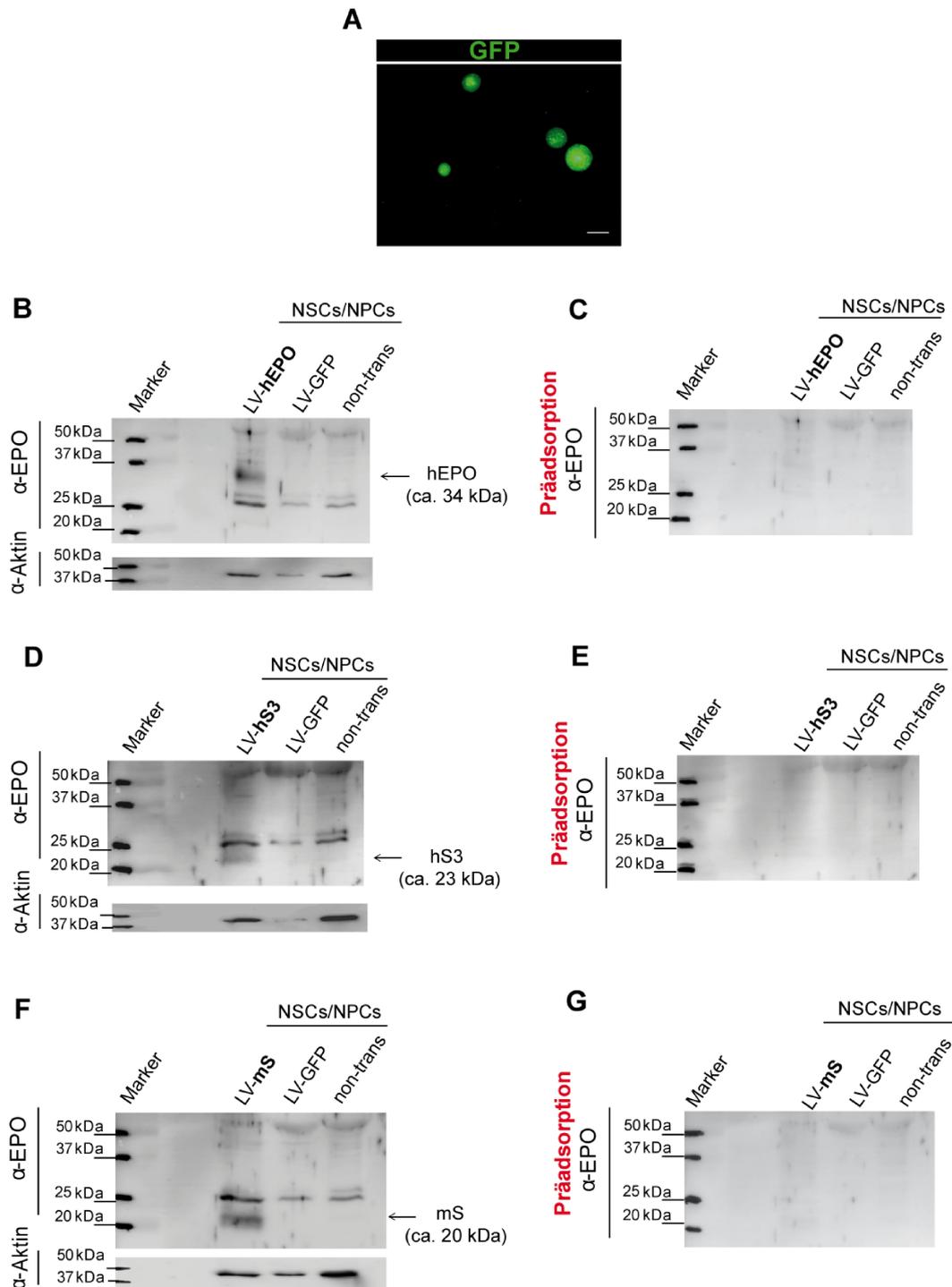


Abbildung 16: Nachweis einer Transgenexpression in mit lentiviralen Partikeln (pCL20c-MSCV) transduzierten NSCs/NPCs

A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Neurosphären, welche mit pCL20c-MSCV-GFP transduziert wurden. Neurosphären zeigten nach siebentägiger Inkubation mit GFP-kodierenden lentiviralen Partikeln ein deutliches GFP-Signal. 10-fache Vergrößerung, Messbalken 150 µm. **B)** Western-Blot-Analyse von pCL20c-MSCV-hEPO transduzierten NSCs/NPCs. Nachweis einer 34 kDa spezifischen hEPO-Bande. **C)** Western-Blot-Analyse von pCL20c-MSCV-hEPO transduzierten NSCs/NPCs nach Präadsorption von α-EPO. **D)** Analyse der Transgenexpression von pCL20c-MSCV-hS3 transduzierten NSCs/NPCs. Nachweis einer 23 kDa spezifischen hS3-Bande. **E)** Western Blot Analyse von pCL20c-MSCV-hS3 transduzierten NSCs/NPCs nach Präadsorption von α-EPO. **F)** Western Blot Analyse von pCL20c-MSCV-mS transduzierten NSCs/NPCs. Nachweis einer 20 kDa spezifischen mS-Bande. **G)** Western-Blot-Analyse von pCL20c-MSCV-mS transduzierten NSCs/NPCs nach Präadsorption von α-EPO.

Kultivierte NSCs/NPCs, welche mit pCL20c-MSCV-GFP Partikeln transduziert wurden, zeigten nach siebentägiger Inkubation eine deutliche GFP-Expression (Abbildung 16A). NSCs/NPCs, welche mit pCL20c-MSCV-hEPO Partikeln transduziert wurden, wiesen in der Western-Blot-Analyse eine spezifische hEPO-Bande (34 kDa) auf (Abbildung 16B). Mit pCL20c-MSCV-hS3 transduzierte NSCs/NPCs wiesen in der Western-Blot-Analyse ein 23 kDa großes Produkt auf (Abbildung 16D). Auch NSCs/NPC's, welche mit pCL20c-MSCV-mS Partikeln transduziert wurden, wiesen nach der siebentägigen Inkubation ein mS-spezifisches Produkt bei 20 kDa in der Western-Blot-Analyse auf. Die Spezifität der einzelnen Banden konnte für jedes einzelne Transgen mittels Präadsorption des verwendeten humanen EPO-Antikörpers erbracht werden. Alle Signale im Western-Blot konnten nach Entfernung des gebundenen Antikörpers („strippen“) und nach erneuter Inkubation der Membran mit präadsorbierten α -EPO vollständig geblockt werden (Abbildung 16C+E+G). Somit ist es möglich, NSCs/NPCs mit VSV-G pseudotypisierten pCL20-MSCV-Partikeln erfolgreich zu transduzieren.

3.3.2 Stabile Transgenexpression 3 Tage und 30 Tage nach intraventrikulärer Injektion (ICV) hEPO/vEPO-kodierender lentiviraler Partikel

Eine intraventrikuläre Injektion (ICV) von lentiviralen Partikeln hat neben der Umgehung der Blut-Hirn-Schranke zusätzlich den Vorteil, dass eine stabile Langzeit-Genexpression direkt am Ort der adulten Neurogenese der subventrikulären Zone (SVZ) erreicht werden kann. In diesem Versuchsvorhaben wurden pCL20c-MSCV Partikel, welche für hEPO, hS3, mS oder GFP kodierten, in den lateralen Ventrikel von 5 Wochen alten C57BL/6N Mäusen injiziert. Um die Anzahl an proliferierenden Zellen nach ICV bestimmen zu können, erhielten die Mäuse sechs intraperitoneale Injektionen an BrdU (50 mg/kg) im 12-Stunden-Rhythmus. Die Mäuse wurden nach 3 Tagen getötet, um den Einfluss von hEPO, hS3 und mS auf sich häufig teilende Vorläuferzellen (Typ-C-Zellen) und Neuroblasten (Typ-A-Zellen) der SVZ zu ermitteln. Eine zweite Gruppe mit pCL20c-MSCV Partikeln behandelten Mäusen wurde nach 30 Tagen getötet, um den Einfluss einer stabilen Transgenexpression von hEPO, hS3 und mS auf sich selten teilende neuronale Stammzellen (Typ-B-Zellen) der SVZ zu ermitteln (Abbildung 17A). Zunächst wurde jedoch untersucht, ob eine intraventrikuläre Applikation von hEPO-, hS3-, mS-, oder GFP-kodierenden lentiviralen Partikeln zu einer Transgenexpression 3 Tage bzw. 30 Tage nach ICV führt (Abbildung 17B-D).

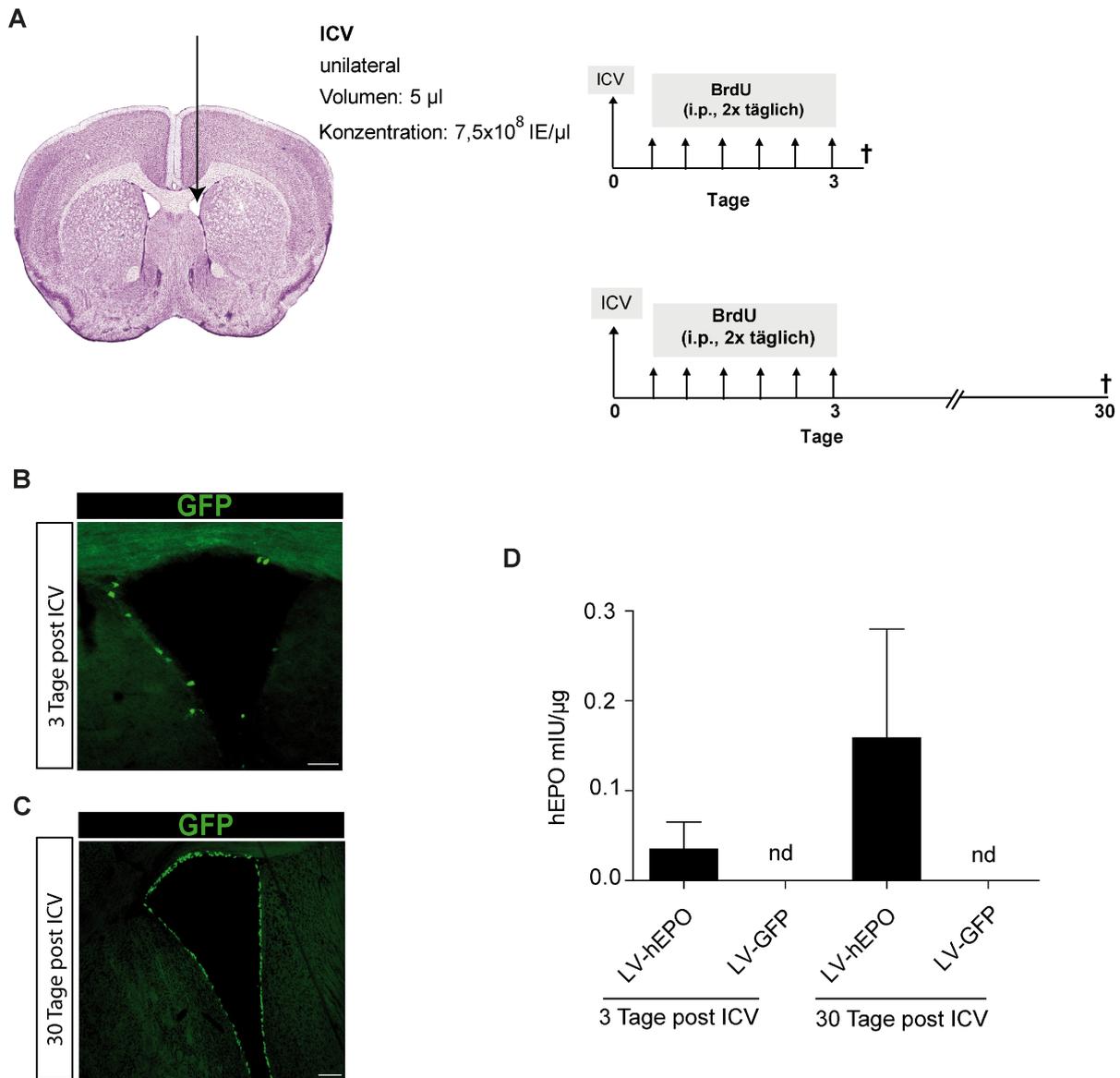


Abbildung 17: Experimentelles Design und Nachweis der Transgenexpression 3 Tage und 30 Tage nach ICV

A) Injektion von lentiviralen Partikeln (pCL20c-MSCV-GFP,-hEPO,-hS3 oder -mS) in die lateralen Ventrikel von 5 Wochen alten Wildtyp-Mäusen. Beginnend eine Stunde nach ICV erhielten die Mäuse sechs intraperitoneale Injektionen (i.p.) an BrdU (50 mg/kg) im 12-Stunden-Rhythmus. 3 Tage bzw. 30 Tage nach ICV wurde den Tieren Blut für eine Hämatokritbestimmung entnommen, die Tiere anschließend transkardial perfundiert und das Gehirn für weitere immunhistochemische Analysen entnommen. **B)** Nachweis der GFP-Expression 3 Tage nach ICV von pCL20-MSCV-GFP in ependymalen Zellen des lateralen Ventrikels. 10-fache Vergrößerung, Messbalken 75 μ m. **C)** Nachweis der GFP-Expression 30 Tage nach ICV von pCL20c-MSCV-GFP in ependymalen Zellen des lateralen Ventrikels. 5-fache Vergrößerung, Messbalken 150 μ m. **D)** Bestimmung der Expressionslevel von hEPO in den lateralen Ventrikel umgebenden striatalen Gewebe mittels ELISA, 3 Tage und 30 Tage nach ICV von pCL20c-MSCV-hEPO (LV-hEPO). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=3 Tiere pro Gruppe), nd= nicht detektierbar.

3 Tage nach intraventrikulärer Gabe von pCL20c-MSCV-GFP konnten in ependymalen Zellen des lateralen Ventrikels vereinzelt GFP-exprimierende Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 17B). Eine deutlich verstärkte Expression des GFP-Signals konnte 30 Tage nach ICV in ependymalen Zellen der lateralen Ventrikel von pCL20c-MSCV-GFP behandelten

Mäusen gezeigt werden (Abbildung 17C). Der Nachweis einer stabilen Transgenexpression von hEPO erfolgte mittels ELISA. Dazu wurden die Gehirne der Tiere 3 Tage bzw. 30 Tage nach ICV entnommen und die laterale Seite des injizierten Ventrikels mit einer dünnen Schicht an umgebendem striatalem Gewebe präpariert und Proteine isoliert. Die Expressionslevel von hEPO des isolierten Gewebes wurden anschließend mittels ELISA quantifiziert. Dabei konnte ein Nachweis einer hEPO-Expression sowohl 3 Tage als auch 30 Tage nach ICV von hEPO-kodierenden lentiviralen Partikeln erbracht werden. So zeigte sich weiterhin, dass 30 Tage nach ICV hEPO-kodierender lentiviraler Partikel eine erhöhte Expression des hEPO-Proteins nachgewiesen werden konnte. Für Gewebelysate von pCL20c-MSCV-GFP behandelten Tieren, welche als Negativ-Kontrolle im ELISA mitgeführt wurden, konnte keine hEPO-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 17D). Somit sind die verwendeten lentiviralen Partikel nach intraventrikulärer Applikation in der Lage, Zellen der lateralen Ventrikel zu transduzieren und eine stabile Langzeit-Transgenexpression hervorzurufen.

3.3.3 Die lentiviral vermittelte Expression von hEPO und vEPO führt zu keiner Erhöhung der Hämatokritwerte in Wildtyp-Mäusen

Die Verabreichung von rekombinantem EPO abseits seines eigentlichen Indikationsgebiets der Behandlung einer Anämie ist immer mit potenziellen Risiken verbunden. Die mit der Behandlung assoziierte Hochregulation der Erythropoese führt zu erhöhten Hämatokritwerten. Folglich steigt aufgrund der erhöhten Viskosität des Blutes unter anderem das Risiko für Thrombosen, Embolien und Schlaganfälle (Patel *et al.*, 2012). Durch die intraventrikuläre Verabreichung von lentiviralen Partikeln, welche für hEPO, hS3 und mS kodierten, konnte gezeigt werden, dass es zu einer stabilen Transgenexpression innerhalb des ZNS kommt (Abbildung 17). Da jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte, dass exprimiertes hEPO, hS3 oder mS die Blut-Hirn-Schranke passieren und somit auf die Erythropoese wirken, wurde der Hämatokritwert 3 Tage und 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel bestimmt.

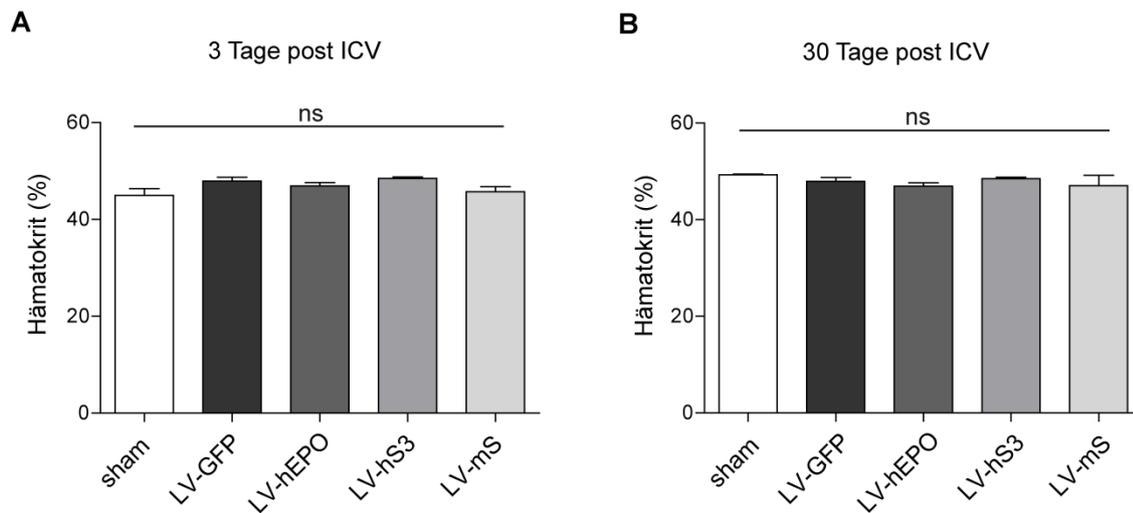


Abbildung 18: Bestimmung der Hämatokritwerte 3 Tage und 30 Tage post ICV lentiviraler Partikel

A) Darstellung der Hämatokritwerte 3 Tage nach ICV von GFP-, hEPO-, hS3- bzw. mS-kodierender lentiviraler Partikel (LV). Die Expression von hEPO, hS3, mS als auch GFP im ZNS resultierte nicht in einer Erhöhung der Hämatokritwerte 3 Tage nach ICV ($F_{4,17}=1,802$, $p=0,1886$). **B)** Hämatokritwerte 30 Tage nach ICV. Auch hier führte die stabile Expression von hEPO, hS3, mS und GFP im ZNS nicht zu erhöhten Hämatokritwerten ($F_{4,17}=0,3050$, $p=0,8695$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. sham und LV-GFP. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=3-6$ Tiere pro Gruppe), ns= nicht signifikant.

Abbildung 18 ist zu entnehmen, dass weder 3 Tage (Abbildung 18A) noch 30 Tage (Abbildung 18B) nach ICV von pCL20c-MSCV-GFP-, -hEPO, -hS3 oder -mS erhöhte Hämatokritwerte nachgewiesen werden konnten. Die Hämatokritwerte aller mit lentiviralen Partikeln behandelten Tiere lagen im Bereich der unbehandelten sham-Gruppe.

3.3.4 Kurzzeit-Effekt von hEPO und vEPO auf zelluläre Prozesse der SVZ 3 Tage nach ICV

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde der Kurzzeit-Effekt von hEPO, hS3 und mS 3 Tage nach ICV auf Typ-B-, Typ-C- und Typ-A-Zellen der SVZ untersucht. In diesem Zusammenhang ist es nützlich, Zellteilungsrate von Zellen der SVZ zu kennen. So ist bekannt, dass Typ-B-Zellen (Stammzellen) der SVZ innerhalb von 17-18 h nach Aktivierung durch asymmetrische Teilung eine Typ-C-Zelle (Vorläuferzellen) und eine mitotisch ruhende Typ-B-Zelle generieren. Typ-C-Zellen durchlaufen drei symmetrische Teilungen mit einer Zellzykluszeit von 18-25 h, bevor sie zu Typ-A-Zellen (Neuroblasten) differenzieren. Somit benötigt die Bildung neu gebildeter Typ-A-Zellen aus einer aktivierten B-Zelle ungefähr 3-4 Tage. Neu gebildete Typ-A-Zellen der SVZ teilen sich noch ein- bis zweimal mit einer Zellzyklusrate von 17-40 h, bevor sie entlang des RMS zum Bulbus olfactorius migrieren (Ponti *et al.*, 2013; Lim und Alvarez-Buylla, 2014). Die Gabe von BrdU zu Beginn des Experiments ermöglichte es, den Effekt von hEPO und vEPO auf Zellteilungsrate, insbesondere auf sich häufig teilende Typ-C-Zellen näher zu untersuchen. Weiterhin wurde die Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen der SVZ bestimmt, um zu prüfen, ob unter

Einfluss von hEPO und vEPO verstärkt Neuroblasten (Typ-A-Zellen) gebildet werden. Eine Quantifizierung von DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen innerhalb der SVZ wurde abschließend durchgeführt, um näher zu charakterisieren, ob eine lentiviral vermittelte Expression von hEPO, hS3 und mS Einfluss auf eine verstärkte Liniendeterminierung von BrdU-positiven proliferierenden Zellen zu Neuroblasten nimmt und um weiterhin den Einfluss auf den Zellzyklus von Neuroblasten zu bestimmen. Die Quantifizierung von DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen diente weiterhin dazu, Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten von nicht liniendeterminierten Typ-C-Zellen und Typ-B-Zellen der SVZ zu ziehen.

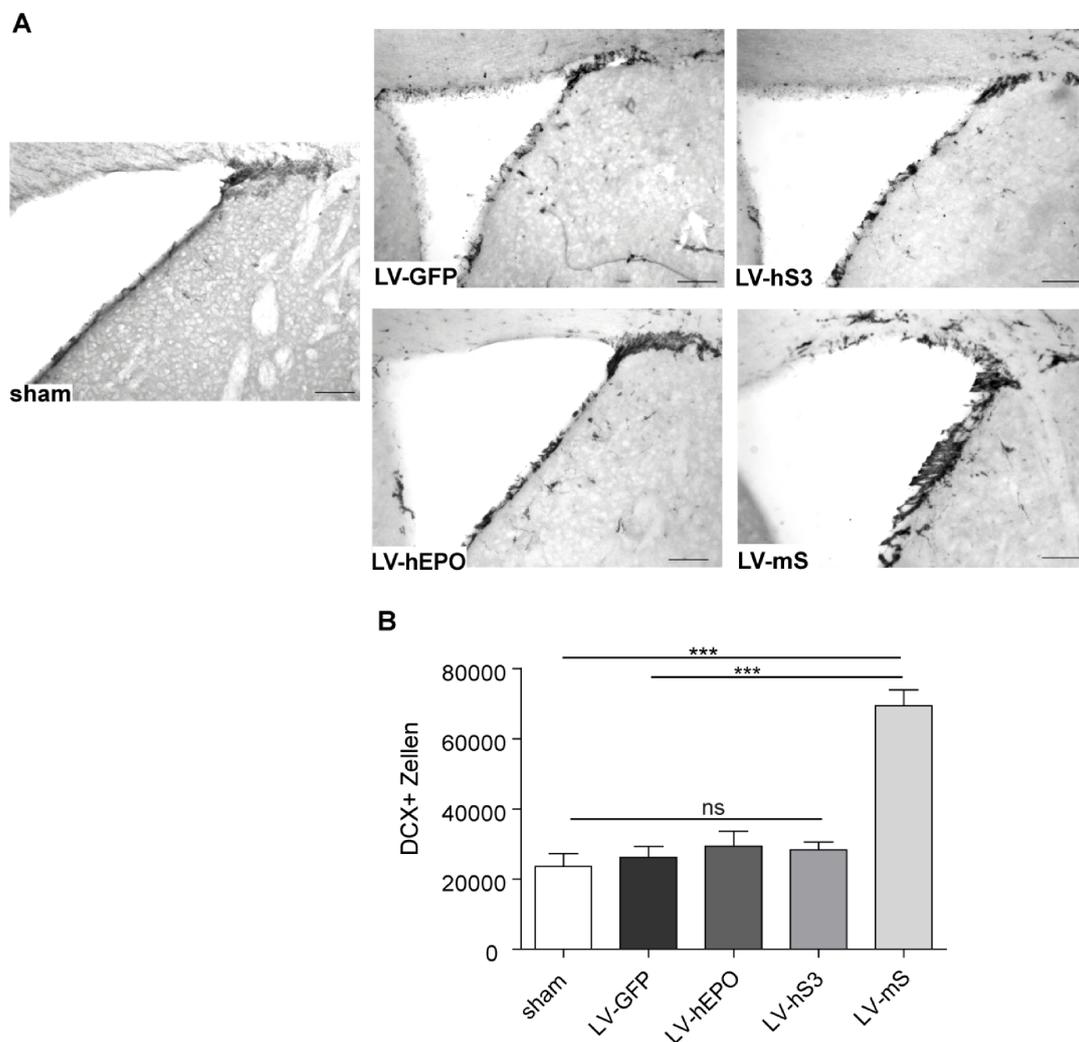


Abbildung 19: Einfluss von hEPO, hS3 und mS auf die Anzahl an Neuroblasten 3 Tage nach ICV lentiviraler Partikel

A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von DAB-gefärbten DCX-exprimierenden Zellen in der SVZ 3 Tage nach ICV lentiviraler Partikel. 10-fache Vergrößerung, Messbalken 100 µm. **B)** Stereologische Quantifizierung von DCX-exprimierenden Zellen in der SVZ 3 Tage nach ICV. Ausschließlich die lentiviral vermittelte Expression von mS (LV-mS) führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen im Vergleich zur sham-Gruppe und zur GFP-Kontrollgruppe (LV-GFP) ($F_{4,29}=25,38$, $p \leq 0,0001$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. sham und LV-GFP. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=4-7$ Tiere pro Gruppe), *** $p \leq 0,001$, ns=nicht signifikant.

3 Tage nach ICV lentiviraler Partikel wurden die Tiere transkardial perfundiert und die Gehirne für immunhistochemische Färbungen entnommen. Die Analyse der Wirkung einer lentiviral vermittelten Expression von hEPO, hS3 und mS auf zelluläre Prozesse der Neurogenese erfolgte nach stereologischen Prinzipien durch Quantifizierung von immunopositiven Zellen der lateralen Wand der SVZ. Dabei wurden alle Ergebnisse im Bezug zu zwei Kontrollgruppen durchgeführt. Zum einen einer sham-Gruppe, wobei es sich um Tiere handelt, welche keine Injektion an lentiviralen Partikeln erhielten, ansonsten aber die vollständige OP-Prozedur durchliefen. Und zum anderen einer GFP-Kontrollgruppe, wobei diese Tiere eine intraventrikuläre Injektion an lentiviralen Partikeln erhielten, welche für GFP kodierten. Mit Hilfe dieser beiden Kontrollgruppen konnte zum einen der Vergleich zu basalen Zellprozessen der SVZ (sham-Gruppe) hergestellt werden und außerdem untersucht werden, ob die Prozedur der intraventrikulären Injektion und die Transduktion von Zellen mit lentiviralen Partikeln Einfluss auf zelluläre Prozesse der SVZ nimmt. Abbildung 19 zeigt, dass die Expression von hEPO und hS3 in Zellen der SVZ 3 Tage nach ICV keinen Einfluss auf die Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen in der SVZ im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen nahm (LV-**sham**: 23565 ± 4011 , LV-**GFP**: 26160 ± 3152 , LV-**hEPO**: 29338 ± 5062 , LV-**hS3**: 28290 ± 2506 (Mittelwert \pm SEM)). Jedoch führte die lentiviral vermittelte Expression von mS zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen in der lateralen Wand der SVZ im Vergleich zu beiden Kontrollen (**sham**: 23565 ± 4011 , LV-**GFP**: 26160 ± 3152 , LV-**mS**: 69405 ± 5028 (Mittelwert \pm SEM)).

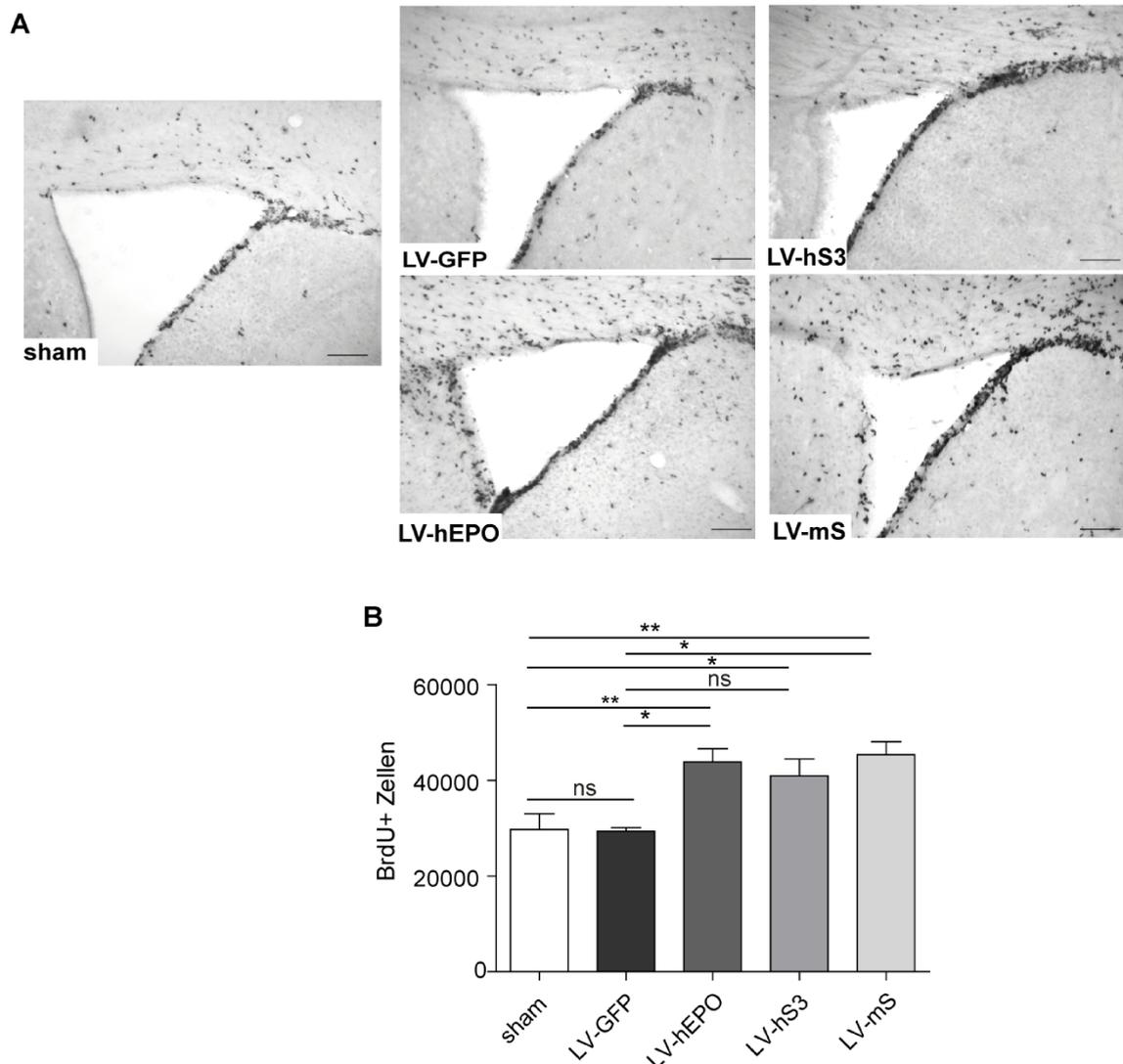


Abbildung 20: Einfluss von hEPO, hS3 und mS auf proliferierende Zellen der SVZ 3 Tage nach ICV lentiviraler Partikel

A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von DAB-gefärbten BrdU-positiven Zellen in der SVZ 3 Tage nach ICV lentiviraler Partikel. 10-fache Vergrößerung, Messbalken 100 μm . **B)** Stereologische Quantifizierung von BrdU-positiven Zellen in der SVZ 3 Tage nach ICV. Die Expression von hEPO, hS3 und mS führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Anzahl an BrdU-positiven Zellen im Vergleich zur sham-Gruppe. Ausschließlich hEPO und mS erhöhten signifikant den Anteil an BrdU-positiven Zellen gegenüber der GFP-Kontrollgruppe ($F_{4,29}=5,814$, $p=0,0019$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. sham und LV-GFP. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=4-7$ Tiere pro Gruppe), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, ns= nicht signifikant.

Hinsichtlich der Zellproliferationsraten kann Abbildung 20 entnommen werden, dass die Anzahl an BrdU-markierten Zellen der SVZ 3 Tage nach ICV für alle Untersuchungsgruppen im Vergleich zur sham-Gruppe signifikant erhöht war (**sham**: 29748 ± 4039 , **LV-hEPO**: 43824 ± 3725 , **LV-hS3**: 40903 ± 4647 , **LV-mS**: 45346 ± 3353 (Mittelwert \pm SEM)). Die Expression von hEPO und mS in Zellen der SVZ führte ebenso zu einer signifikanten Erhöhung gegenüber der GFP-Kontrolle, wohingegen mit hS3 behandelte Tiere keine signifikant erhöhte Anzahl an BrdU-markierten Zellen im Vergleich zur GFP-Kontrolle aufzeigten (**LV-hS3**: 40903 ± 4647 , **LV-GFP**: 29389 ± 728 (Mittelwert \pm SEM)).

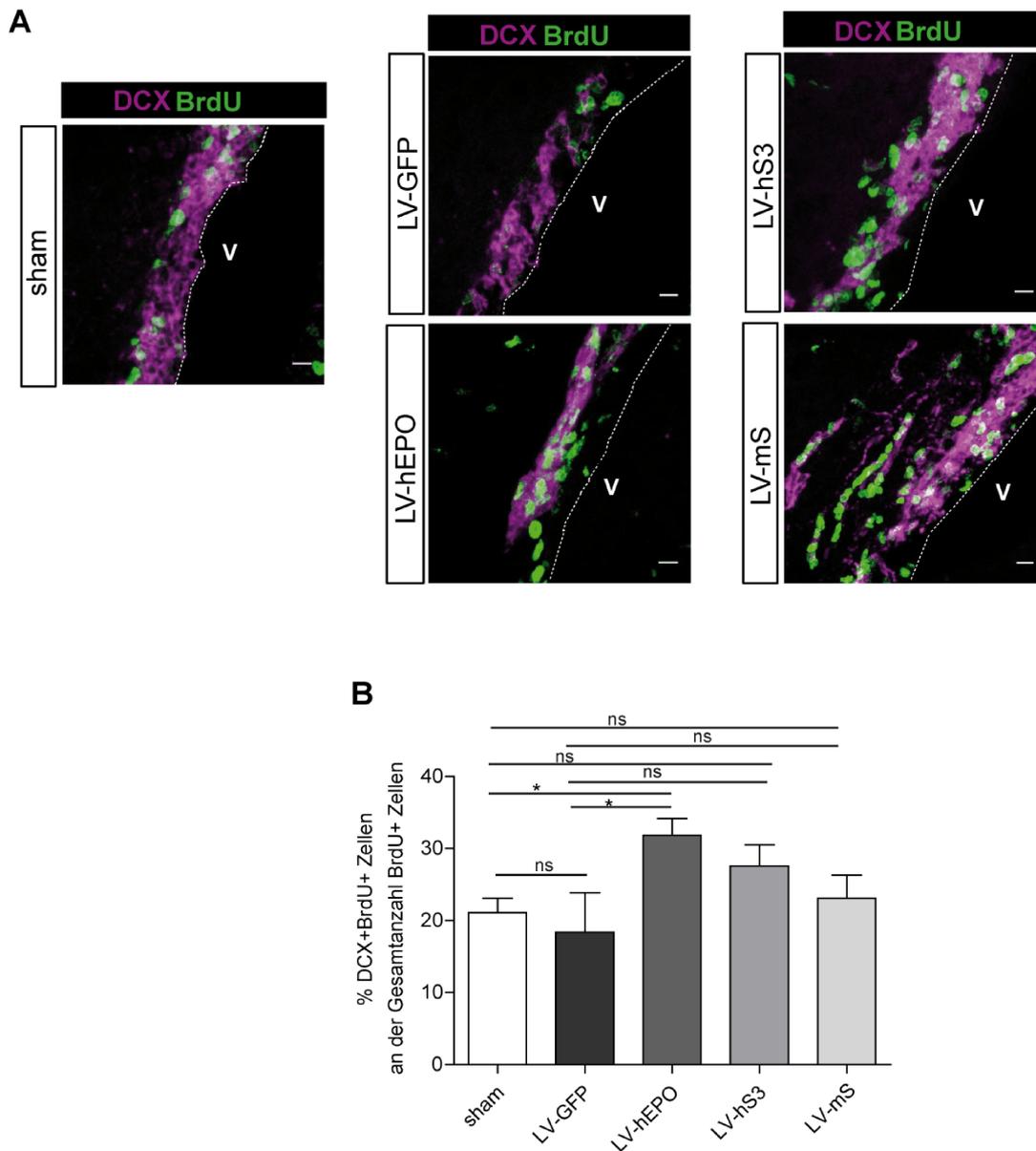


Abbildung 21: Bestimmung des prozentualen Anteils an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen der SVZ 3 Tage nach ICV lentiviraler Partikel

A) Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen der SVZ 3 Tage nach ICV lentiviraler Partikel. Messbalken 10 μ m, V=Ventrikel. **B)** Bestimmung des prozentualen Anteils an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen an der Gesamtanzahl BrdU-positiver Zellen der SVZ. Zellen der SVZ, welche 3 Tage nach ICV hEPO exprimierten, erhöhten signifikant den prozentualen Anteil an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen gegenüber beiden Kontrollen ($F_{4,28}=3,043$, $p=0,0367$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. sham und LV-GFP. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=4-7$ Tiere pro Gruppe), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, ns= nicht signifikant.

Der prozentuale Anteil an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen an der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen der SVZ ist in Abbildung 21 dargestellt. So zeigte sich, dass unter Einfluss von hEPO Neuroblasten der SVZ gegenüber beiden Kontrollen signifikant mehr BrdU-Inkorporationen aufwiesen. Für Tiere, welche mit hS3- oder mS-kodierenden lentiviralen Partikeln behandelt wurden, konnte kein erhöhter prozentualer Anteil an BrdU-Inkorporation für Neuroblasten festgestellt werden. So konnte für alle Gruppen ein

prozentualer Anteil an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen von $24,4 \pm 2,2$ % (Mittelwert \pm SEM) ausgemacht werden. Somit kann der verbleibende Anteil von ~ 75 % BrdU-positiver Zellen der SVZ 3 Tage nach ICV auf Typ-B-Zellen oder nicht liniendeterminierte Typ-C-Zellen zurückgeführt werden.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Wirkung einer lentiviral vermittelten Expression von hEPO, hS3 und mS auf Zellen der SVZ 3 Tage nach ICV lentiviraler Partikel

Behandlung	DCX+ Zellen	BrdU+ Zellen	% DCX+BrdU+Zellen
pCL20c-MSCV-hEPO	konstant	erhöht	erhöht
pCL20-MSCV-hS3	konstant	erhöht vs. sham	konstant
pCL20c-MSCV-mS	erhöht	erhöht	konstant

In Tabelle 1 sind alle erhobenen Daten der Wirkung einer lentiviral vermittelten Expression von hEPO, hS3 und mS auf Zellen der SVZ 3 Tage nach ICV lentiviraler Partikel zusammengefasst. So kann die Aussage getroffen werden, dass sowohl hEPO als auch beide EPO-Isoformen hS3 und mS die Proliferationsraten von Zellen der SVZ erhöhten. Dabei führte ausschließlich die murine Isoform mS zu einer verstärkten Bildung von Neuroblasten, wohingegen sich die Anzahl an Neuroblasten nach Behandlung mit hEPO und hS3 auf basalem Niveau bewegte. Hervorzuheben ist, dass ausschließlich die lentivirale Expression von hEPO dazu führte, dass ein erhöhter prozentualer Anteil an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen der SVZ nachgewiesen werden konnte. Weiterhin zeigte sich, dass 3 Tage nach ICV mit lentiviralen GFP-kodierenden Partikeln weder die Prozedur der intraventrikulären Injektion, noch die Transduktion von Zellen mit lentiviralen Partikeln einen Einfluss auf zelluläre Prozesse der SVZ im Vergleich zur sham-Kontrolle nahm.

3.3.5 Langzeit-Effekt von hEPO und vEPO auf zelluläre Prozesse der SVZ 30 Tage nach ICV

Um den Einfluss einer lentiviral vermittelten Langzeitexpression von hEPO, hS3 und mS auf Zellen der SVZ zu analysieren, wurden die Tiere 30 Tage nach ICV transkardial perfundiert und die Gehirne für immunhistochemische Untersuchungen entnommen. Die Tiere erhielten zu Beginn des Experiments sechs intraperitoneale Injektionen an BrdU, um den Effekt von hEPO, hS3 und mS auf sich selten teilende B-Zellen der SVZ zu analysieren. Teilt sich eine neuronale Stammzelle während des BrdU-Pulses durch asymmetrische Teilung, baut sich BrdU während der S-Phase ein. Es kann somit nachvollzogen werden, ob vermehrt BrdU-markierte Stammzellen in einem mitotisch ruhenden Zustand verbleiben oder in einen mitotisch aktiven Zustand übergehen. Weiterhin sollte über die Quantifizierung an Neuroblasten nachgewiesen werden, ob eine Langzeitexpression von hEPO, hS3 und mS zu einer verstärkten Neurogenese führt. Die Quantifizierung an DCX-BrdU-doppelpositiven

Zellen erfolgte zu Zwecken der Zellspezifizierung proliferierender Zellen und wird im Folgenden nochmals näher erläutert.

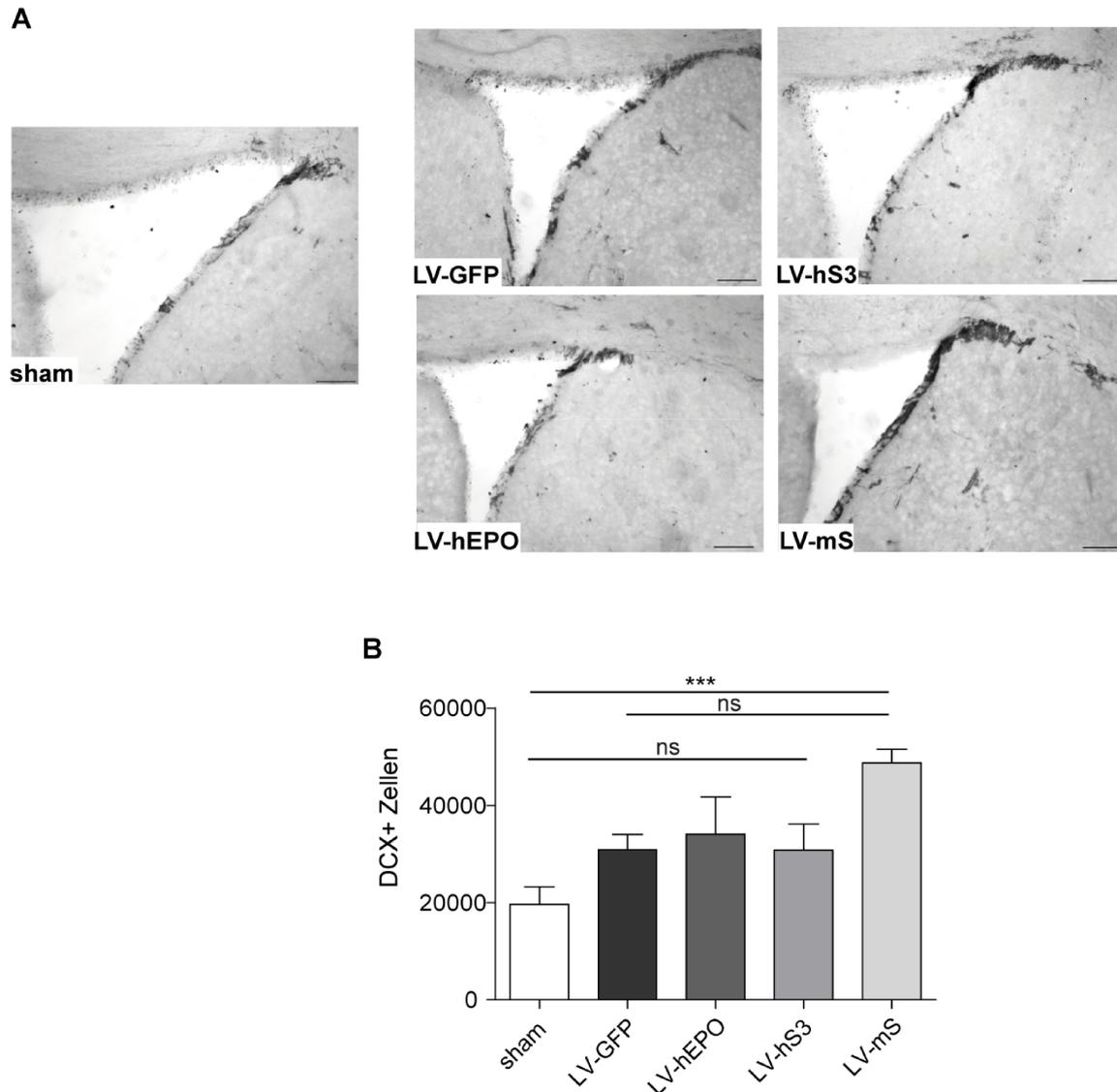


Abbildung 22: Einfluss von hEPO, hS3 und mS auf die Anzahl an Neuroblasten der SVZ 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel

A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von DAB-gefärbten DCX-exprimierenden Zellen in der SVZ 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel. 10-fache Vergrößerung, Messbalken 100 μm . **B)** Stereologische Quantifizierung von DCX-exprimierenden Zellen in der SVZ 30 Tage nach ICV. Ausschließlich die lentiviral vermittelte Expression von mS führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen im Vergleich zur sham-Gruppe ($F_{4,25}=5,444$, $p=0,0036$). Kein signifikanter Unterschied konnte für alle Behandlungsgruppen im Vergleich zur GFP-Kontrolle festgestellt werden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. sham und LV-GFP. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=4-6$ Tiere pro Gruppe), *** $p \leq 0,001$, ns= nicht signifikant.

30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel führte die Expression von mS zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an Neuroblasten im Vergleich zur sham-Gruppe (sham: 19628 ± 4432 , LV-mS: 48708 ± 3433 (Mittelwert \pm SEM)) (Abbildung 22B). Gegenüber der GFP-Kontrollgruppe konnte für keine der Behandlungsgruppen ein signifikanter Unterschied

in der Anzahl an Neuroblasten der SVZ festgestellt werden (LV-GFP: 30896 ± 3087 , LV-hEPO: 34040 ± 8596 , LV-hS3: 30792 ± 6037 (Mittelwert \pm SEM)). Somit führte möglicherweise die mit der intraventrikulären Injektion assoziierte Läsion innerhalb des kortikalen Gewebes zu einer Induktion der Neuroblastenbildung. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kontrollgruppen in der Anzahl an Neuroblasten festgestellt werden.

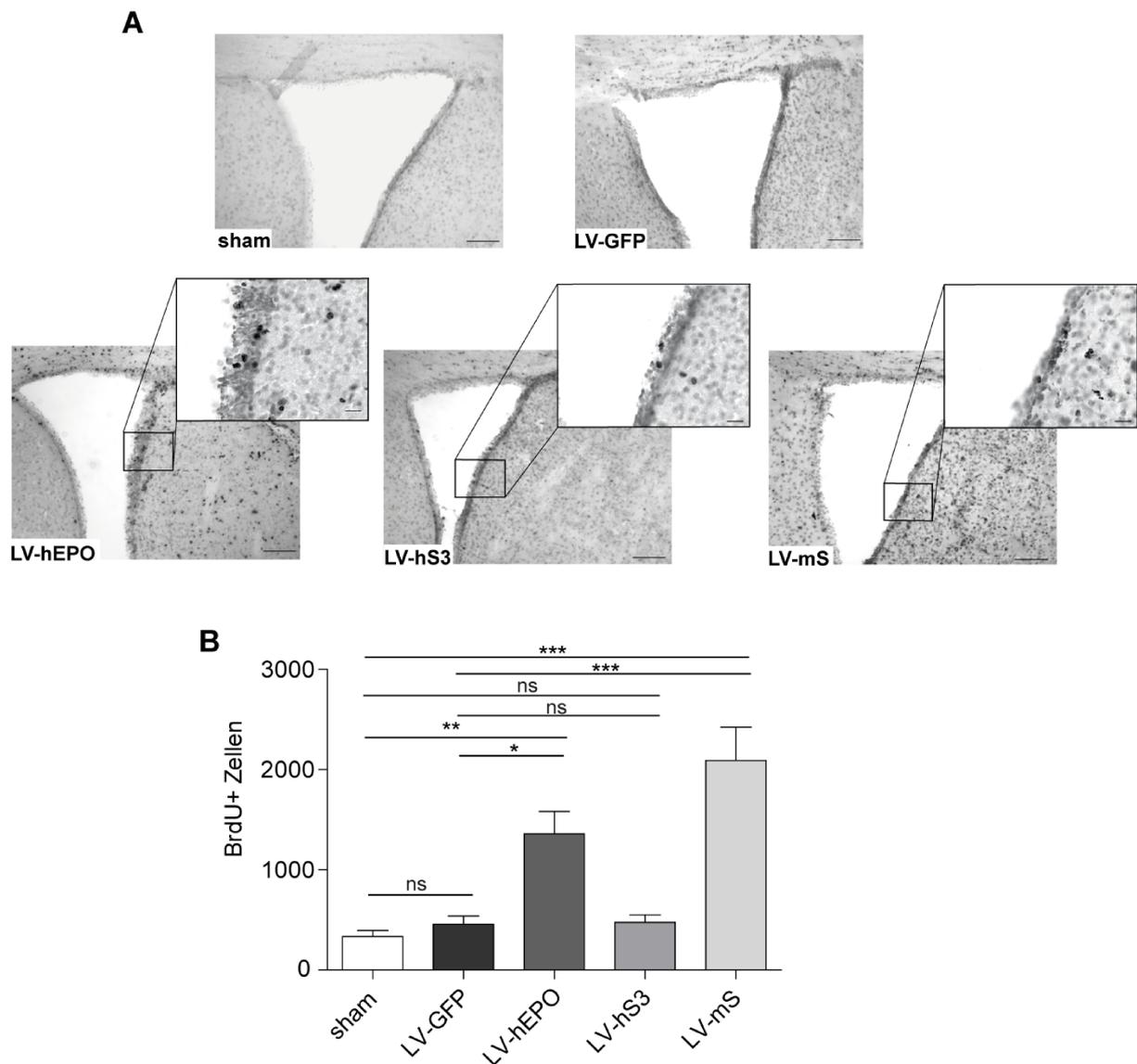


Abbildung 23: Einfluss von hEPO, hS3 und mS auf proliferierende Zellen der SVZ 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel

A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von DAB-gefärbten BrdU-positiven Zellen in der SVZ 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel. 10-fache Vergrößerung, Messbalken 100 μ m. 40-fache Vergrößerung, Messbalken 20 μ m. **B)** Stereologische Quantifizierung von BrdU-positiven Zellen in der SVZ 30 Tage nach ICV. Die Expression von hEPO und mS führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Anzahl an BrdU-positiven Zellen im Vergleich zur sham-Gruppe und GFP-Kontrollgruppe ($F_{4,25}=14,68$, $p < 0,0001$). Die humane EPO-Isoform hS3 führte nicht zu einer Erhöhung der Anzahl an BrdU-positiven Zellen der SVZ gegenüber beiden Kontrollgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. sham und LV-GFP. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=4-7$ Tiere pro Gruppe), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, ns= nicht signifikant.

Für die Quantifizierung BrdU-positiver Zellen 30 Tage nach ICV wurden ausschließlich Zellen in die Quantifizierung mit eingeschlossen, welche ein deutliches BrdU-Signal aufwiesen. Aufgrund dieser Maßnahme konnte sichergestellt werden, dass ausschließlich Typ-B-Zellen der SVZ in die Quantifizierung miteinbezogen wurden, welche sich während des BrdU-Pulses in einem mitotisch aktiven Zustand befanden. Durch die asymmetrische Zellteilung bringt eine aktivierte Typ-B-Zelle eine Typ-C-Vorläuferzelle und eine mitotisch ruhende Schwesterstammzelle hervor. Letztere wurde in diesem Versuchsvorhaben quantifiziert. Durch die Wahl einer mehrmaligen BrdU-Injektionsstrategie zu Beginn des Experiments konnte auf diese Weise evaluiert werden, ob die Expression von hEPO, hS3 und mS in Zellen der SVZ Einfluss auf das Zellteilungsverhalten neuronaler Stammzellen der SVZ nimmt. So kann Abbildung 23 entnommen werden, dass die lentiviral vermittelte Expression von hEPO und mS zu einer statistisch signifikant erhöhten Anzahl an BrdU-positiven Zellen 30 Tage nach ICV gegenüber beiden Kontrollen führte (sham: 334 ± 71 , LV-**GFP**: 456 ± 84 , LV-**hEPO**: 1358 ± 250 , LV-**mS**: 2091 ± 409 (Mittelwert \pm SEM)). Die humane Isoform hS3 führte nicht zu einem veränderten Proliferationsverhalten von sich langsam teilenden Stammzellen der SVZ 30 Tage nach ICV, da sich die Anzahl an BrdU-positiven Zellen auf dem basalen Niveau beider Kontrollgruppen bewegte (sham: 334 ± 71 , LV-**GFP**: 456 ± 84 , LV-**hS3**: 477 ± 84 (Mittelwert \pm SEM)) (Abbildung 23). Ebenso hatte die OP-Prozedur keinen Einfluss auf die Teilungsraten von Typ-B-Zellen, da kein signifikanter Unterschied zwischen sham-Tieren und LV-GFP behandelten Tieren ausgemacht werden konnte.

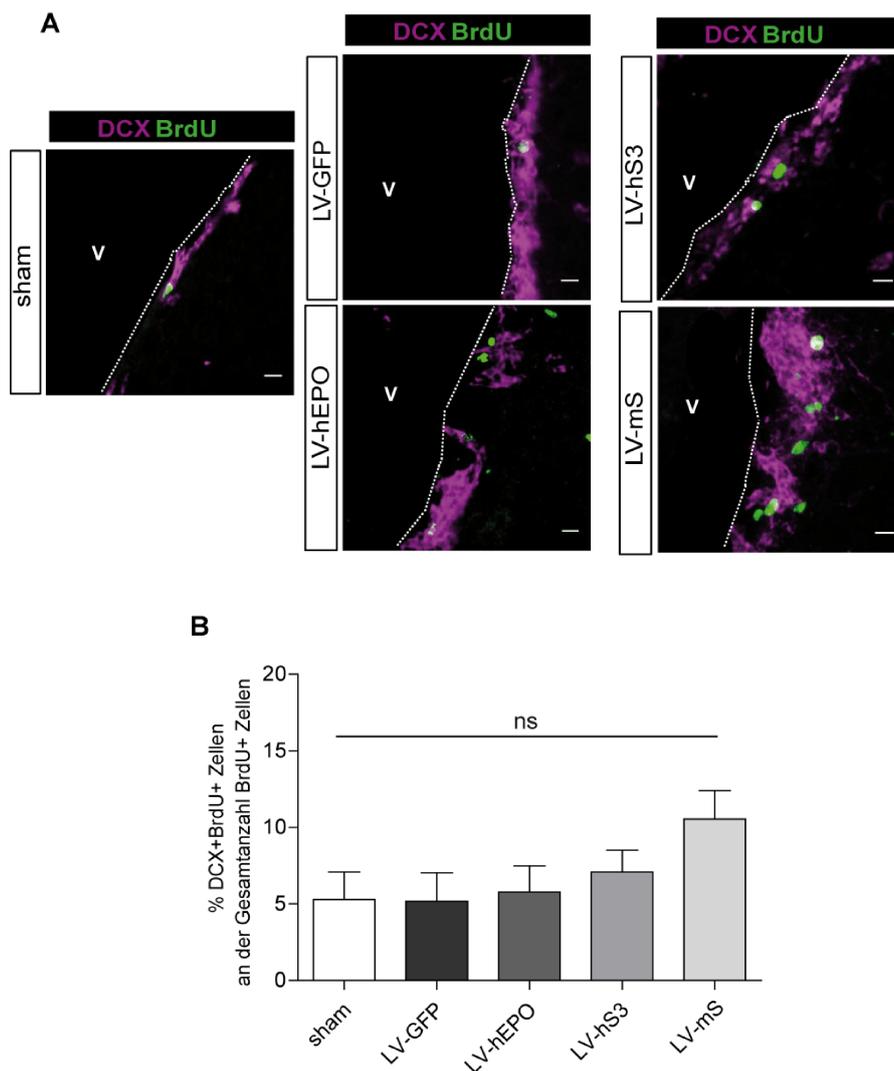


Abbildung 24: Bestimmung des prozentualen Anteils an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen der SVZ 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel

A) Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von BrdU-DCX-doppelpositiven Zellen der SVZ 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel. Messbalken 10 μ m, V=Ventrikel. **B)** Bestimmung des prozentualen Anteils an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen an der Gesamtanzahl BrdU-positiver Zellen der SVZ. Keine der Behandlungsgruppen wies eine statistisch signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen auf ($F_{4,24}=1,708$, $p=0,1877$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. sham und LV-GFP. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n= 3-7$ Tiere pro Gruppe), ns= nicht signifikant.

Durch die Quantifizierung an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen 30 Tage nach Injektion sollte die Aussage überprüft werden, dass in der SVZ gezählte BrdU-positive Zellen tatsächlich auf Stammzellen zurückzuführen sind und nicht auf BrdU-markierte Neuroblasten, welche sich möglicherweise während des BrdU-Pulses in ihrem letzten Zellzyklusschritt befanden und noch nicht aus der SVZ zum Bulbus olfactorius ausgewandert sind. Tatsächlich konnte kein signifikanter Unterschied zwischen allen Behandlungsgruppen im Vergleich zu beiden Kontrollen in der Anzahl an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 24). Der prozentuale Anteil an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen an der

Gesamtanzahl BrdU-positiver Zellen ergab folgende Werte für die einzelnen Gruppen: sham: $5,3 \pm 2,0 \%$, LV-**GFP**: $5,2 \pm 1,8 \%$, LV-**hEPO**: $5,8 \pm 1,9\%$, LV-**hS3**: $7,1 \pm 1,6 \%$ und LV-**mS**: $10,5 \pm 4,5 \%$ (Mittelwert \pm SEM). Somit konnten im Mittel $\sim 89-95 \%$ BrdU-positive Zellen der SVZ 30 Tage nach ICV als mitotisch ruhende B-Zellen identifiziert werden.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Wirkung einer lentiviral vermittelten Expression von hEPO, hS3 und mS auf Zellen der SVZ 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel

Behandlung	DCX + Zellen	BrdU+ Zellen	% DCX+BrdU+Zellen
pCL20c-MSCV-hEPO	konstant	erhöht	konstant
pCL20-MSCV-hS3	konstant	konstant	konstant
pCL20c-MSCV-mS	erhöht vs. sham	erhöht	konstant

In Tabelle 2 sind alle erhobenen Daten der Wirkung einer lentiviral vermittelten Expression von hEPO, hS3 und mS auf Zellen der SVZ 30 Tage nach ICV zusammengefasst. Im Zusammenhang mit der Datenlage 3 Tage nach ICV kann die Aussage getroffen werden, dass eine stabile Expression von mS zu einer verstärkten Liniendeterminierung von Typ-C-Zellen der SVZ zu Neuroblasten führte. Hinsichtlich des Einflusses von hEPO und mS kann in Kombination mit der Datenlage 3 Tage nach ICV die Aussage getroffen werden, dass sowohl stabil exprimiertes hEPO als auch die murine Spleißvariante mS zu einer verstärkten Proliferation von Typ-B-Zellen und Typ-C-Zellen in der SVZ beitrugen. Unter Einfluss von hS3 kommt es zu einer verstärkten Proliferation von Typ-C-Zellen, da 3 Tage nach ICV von pCL20c-MSCV-hS3 die Anzahl an BrdU-positiven Zellen gegenüber der sham-Kontrolle erhöht war, jedoch 30 Tage nach ICV keine erhöhte Anzahl an Typ-B-Zellen nachgewiesen werden konnte. Die zusammengefassten Daten der Wirkung von hEPO, hS3 und mS auf die drei Zelltypen der SVZ können nachfolgend Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Wirkung der lentiviral vermittelten Expression von hEPO, hS3 und mS auf Zellen der SVZ

Behandlung	Typ B	Typ C	Typ A
pCL20c-MSCV-hEPO	↑	↑	—
pCL20-MSCV-hS3	—	↑	—
pCL20c-MSCV-mS	↑	↑	↑

3.4 Evaluierung des therapeutischen Potenzials von hEPO im R6/2 Mausmodell der Huntington-Krankheit

3.4.1 Experimentelles Design

Für die Evaluierung des therapeutischen Potenzials von hEPO auf den schnell fortschreitenden neurologischen Phänotyp im R6/2 Mausmodell, erhielten die Mäuse in einem Alter von 8 Wochen eine bilaterale intraventrikuläre Injektion an hEPO-kodierenden lentiviralen Partikeln. Drei Kontrollgruppen wurden mitgeführt. Zum einen erhielt eine Kontrollgruppe eine bilaterale intraventrikuläre Injektion an GFP-kodierenden lentiviralen Partikeln, um den Einfluss der stereotaktischen Injektion sowie der lentiviral vermittelten Expression eines Transgens im ZNS von R6/2 Mäusen näher zu charakterisieren. Weiterhin wurde eine Kontrolle von unbehandelten R6/2 Tieren mitgeführt, um den therapeutischen Effekt von hEPO im Vergleich zu naiven R6/2 Mäusen zu beurteilen. Zudem wurden Wildtyp-Tiere desselben Wurfs als Kontrolle mitgeführt, um das therapeutische Potenzial von hEPO im R6/2 Mausmodell im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe zu untersuchen. Der genaue Versuchsaufbau kann Abbildung 25 entnommen werden.

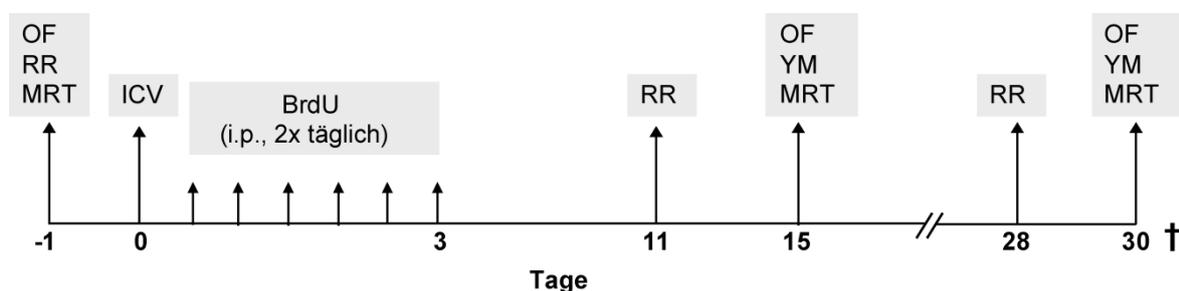


Abbildung 25: Experimentelles Design

Schematische Darstellung des experimentellen Protokolls zur Evaluierung des therapeutischen Potenzials von hEPO auf fortschreitende motorische und kognitive Defizite mit begleitender Hirnatrophie in R6/2 Mäusen. 8 Wochen alte R6/2 Mäuse erhielten eine bilaterale intraventrikuläre Injektion (ICV) an lentiviralen Partikeln, welche für hEPO kodierten (je $1,3 \times 10^9$ IE/ μ l pro Hemisphäre). Die Kontrollgruppe erhielt eine bilaterale intraventrikuläre Injektion von lentiviralen Partikeln, welche für GFP kodierten oder wurde alternativ als unbehandelte Kontrollgruppe mitgeführt. Für eine spätere Charakterisierung der Wirkung von hEPO auf Prozesse der Neurogenese erhielten die Tiere beginnend 1 h nach ICV sechs intraperitoneale Injektionen (i.p.) an BrdU (50 mg/kg) im 12-StundenRhythmus. Die Koordinations- und Ausdauerfähigkeit auf dem RotaRod (RR) sowie die Gesamtaktivität im Open-Field-Test (OF) wurden als Basismessung einen Tag vor ICV (-1), an Tag 11 (RR), Tag 15 (OF), Tag 28 (RR) und Tag 30 (OF) nach ICV bestimmt. Das kognitive Leistungsvermögen von R6/2 Mäusen wurde an Tag 15 und Tag 30 nach ICV mittels Y-Maze-Test (YM) bestimmt. Die Volumina verschiedener Hirnareale von R6/2 Mäusen wurden mittels zerebraler MRT-Aufnahmen als Basismessung einen Tag vor ICV (-1) sowie an Tag 15 und Tag 30 nach ICV vermessen. Im Anschluss an den finalen MRT-Scan wurden die Tiere transkardial perfundiert und die Gehirne für immunhistochemische Untersuchungen, qRT-PCR- oder FACS-Analysen entnommen.

3.4.2 Nachweis einer stabilen Langzeitexpression von hEPO in verschiedenen Hirnarealen des ZNS von LV-hEPO behandelten R6/2 Mäusen

Es ist bekannt, dass mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) pseudotypisierte virale Konstrukte nach Injektion in verschiedene Hirnareale des murinen Gehirns zu einer weitreichenden Langzeitexpression des Transgens führen (Blomer *et al.*, 1997). So wurde in diesem Versuchsvorhaben evaluiert, ob 30 Tage nach ICV von VSV-G pseudotypisierten hEPO- bzw. GFP-kodierenden lentiviralen Partikeln Gentranskripte in verschiedenen Hirnarealen nachgewiesen werden konnten. Weiterhin wurde untersucht, welcher Zelltyp bevorzugt lentivirales hEPO exprimiert.

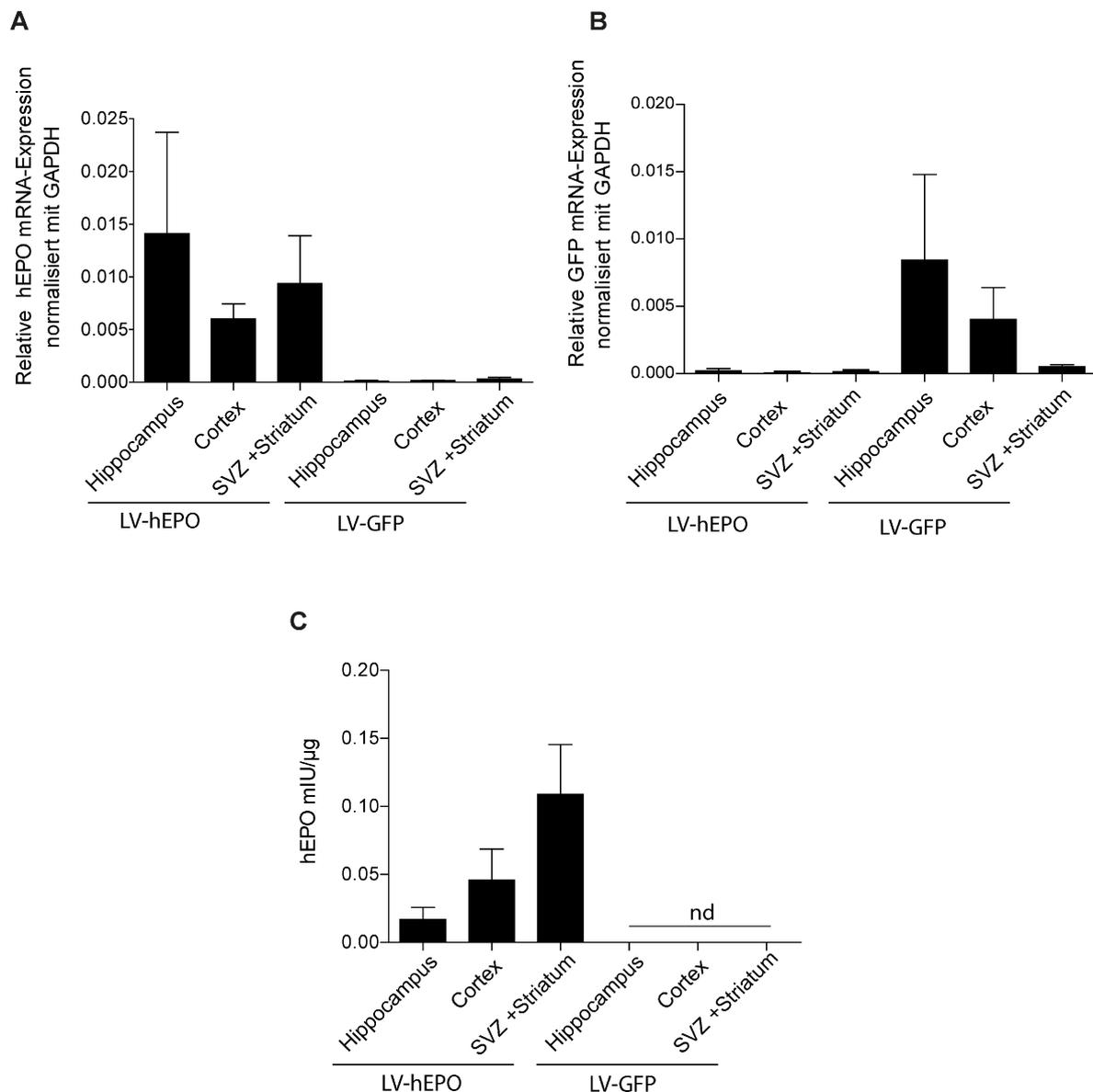


Abbildung 26: Analyse der Genexpression von hEPO und GFP 30 Tage nach ICV

A+B) Quantifizierung von hEPO- (**A**) und GFP-Transkripten (**B**) mittels qRT-PCR im Hippocampus, Cortex und SVZ+Striatum 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel. **C)** Quantifizierung der hEPO-Expressionslevel im Hippocampus, Cortex und SVZ+Striatum von LV-hEPO und LV-GFP behandelten R6/2 Tieren mittels ELISA. Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=3 Tiere pro Gruppe), nd= nicht detektierbar.

Für die Beantwortung der Fragestellung, ob eine bilaterale Injektion von hEPO- und GFP-kodierenden lentiviralen Partikeln in 8 Wochen alten R6/2 Mäusen zu einer Langzeitexpression der Transgene auf mRNA-Ebene und für hEPO ebenso auf Proteinebene führt, wurden die Tiere 30 Tage nach ICV getötet und die Gehirne entnommen. So wurden von einer Hemisphäre der Hippocampus, der Cortex sowie die SVZ+Striatum frei präpariert, mRNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Mittels qRT-PCR-Analyse konnte der relative Anteil an hEPO- und GFP-Transkripten in den verschiedenen Hirnarealen der ICV behandelten R6/2 Mäuse ermittelt werden (Abbildung 26A+B). So konnte hEPO-mRNA im Hippocampus, Cortex und SVZ+Striatum von LV-hEPO behandelten Mäusen nachgewiesen werden. Wie erwartet waren keine hEPO-Transkripte im Hippocampus, Cortex und SVZ+Striatum von LV-GFP behandelten Tieren nachweisbar (Abbildung 26A). Die Quantifizierung an GFP-Transkripten im Hippocampus, Cortex und SVZ+Striatum von LV-GFP behandelten R6/2 Mäusen zeigte ein ähnliches Expressionsbild mit der Ausnahme, dass im SVZ+Striatum deutlich geringere Mengen an GFP-Transkripten nachgewiesen werden konnten. Keine GFP-Transkripte waren im Hippocampus, Cortex oder SVZ+Striatum von LV-hEPO behandelten R6/2 Mäusen nachweisbar (Abbildung 26B). Wie erwartet und konsistent mit den nachgewiesenen Expressionsleveln von hEPO-Transkripten, konnte eine Expression des hEPO-Proteins im Hippocampus, Cortex und SVZ+Striatum von LV-hEPO behandelten R6/2 Mäusen mittels ELISA erbracht werden (Abbildung 26C).

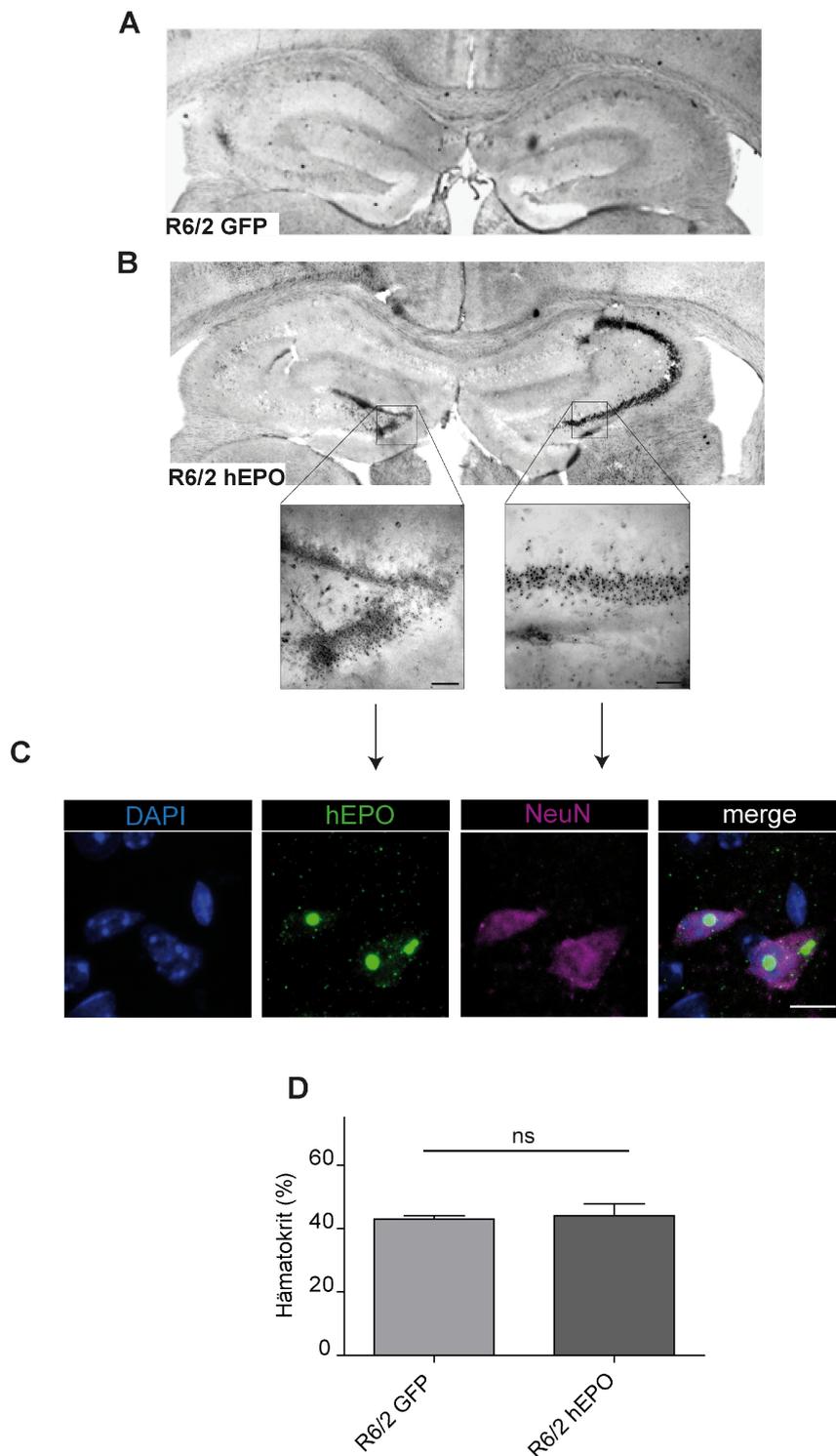


Abbildung 27: Immunhistochemischer Nachweis einer spezifischen hEPO-Expression in hippocampalen Neuronen und Bestimmung der Hämatokritwerte 30 Tage nach ICV

A+B) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von DAB-gefärbten hEPO-exprimierenden Zellen im Hippocampus 30 Tage nach ICV von LV-GFP (**A**) und LV-hEPO (**B**). Hervorgehobene Regionen des Hippocampus von LV-hEPO behandelten Tieren illustrieren den Nachweis einer verstärkten hEPO-Expression in Zellen des Gyrus dentatus und der Pyramidenzellschicht des Hippocampus. 20-fache Vergrößerung, Messbalken: 50 μm . **C)** Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen eine Ko-Lokalisation des hEPO-Fluoreszenzsignals (grün) und des NeuN-Fluoreszenzsignals (magenta). Messbalken 10 μm . **D)** Hämatokritwerte 30 Tage nach ICV. Die stabile Expression von hEPO im ZNS von R6/2 Tieren führte nicht zu erhöhten Hämatokritwerten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten Student's t-Test. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=7-8 Tiere pro Gruppe), ns= nicht signifikant.

Mittels einer immunhistochemischen DAB-Färbung konnte eine hEPO Proteinexpression im Hippocampus von LV-hEPO behandelten R6/2 Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 27B). Dabei war insbesondere eine starke Expression des hEPO-Proteins in Zellen des Gyrus dentatus und der Pyramidenzellschicht des Hippocampus nachweisbar. Die Spezifität der hEPO Proteinexpression konnte durch den fehlenden Nachweis von DAB-hEPO-positiven Zellen im Hippocampus von LV-GFP behandelten Tieren erbracht werden (Abbildung 27A). hEPO-exprimierende Zellen des Gyrus dentatus und der Pyramidenzellschicht des Hippocampus konnten mit Hilfe einer Doppelfärbung für NeuN und hEPO als Neuronen identifiziert werden (Abbildung 27C). Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass eine einmalige bilaterale Injektion von pCL20c-MSCV-hEPO zu einer weitreichenden stabilen Langzeitexpression von hEPO im ZNS von R6/2 Tieren führte, ohne dabei Einfluss auf den Hämatokritwert zu nehmen (Abbildung 27D).

3.4.3 Die lentiviral induzierte Expression von hEPO nimmt keinen Einfluss auf den Gewichtsverlust und motorische Defizite des R6/2 Mausmodells

Eine der Hauptcharakteristika des R6/2 Mausmodells ist der mit fortschreitendem Krankheitsverlauf assoziierte starke Gewichtsverlust (Gil *et al.*, 2004; El-Akabawy *et al.*, 2012). Weiterhin weisen R6/2 Mäuse eine Reihe an motorischen Defiziten auf, wie beispielsweise dyskinetische Bewegungen, Ruhetremor, stress-induzierte Krämpfe und eine veränderte lokomotorische Aktivität (Mangiarini *et al.*, 1996; Carter *et al.*, 1999). In diesem Versuchsvorhaben wurde evaluiert, ob eine stabile Expression von hEPO im ZNS von R6/2 Tieren den mit fortlaufender Krankheit auftretenden Gewichtsverlust, die motorische Koordinations- und Ausdauerfähigkeit auf dem RotaRod sowie das explorative Verhalten (Gesamtaktivität) im Open-Field-Test beeinflusst.

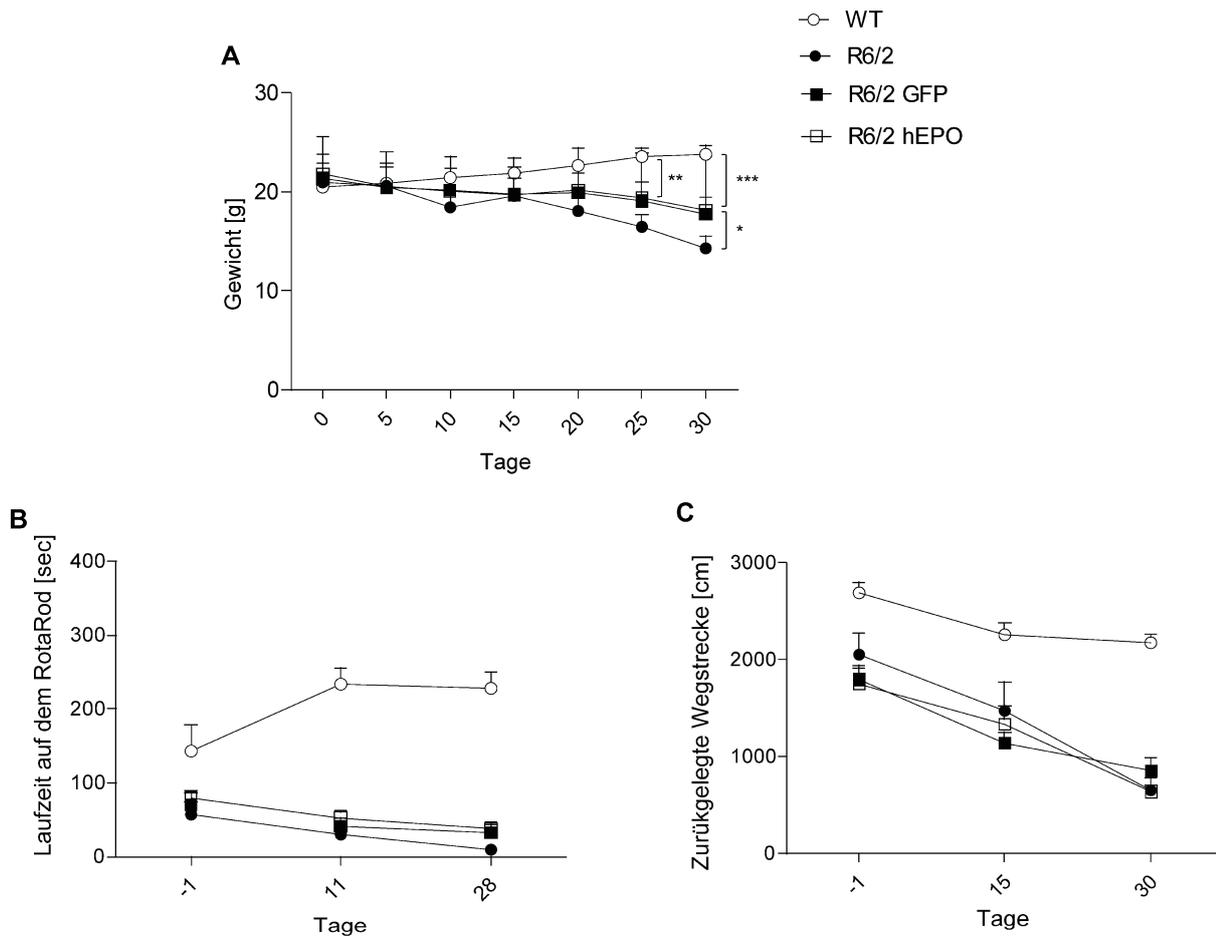


Abbildung 28: Einfluss von hEPO auf das Körpergewicht, die Koordinations- und Ausdauerfähigkeit auf dem RotaRod sowie auf die Gesamtaktivität im Open-Field-Test

A) Das Körpergewicht aller Versuchsgruppen wurde zu Beginn des Experiments in einem fünftägigen zeitlichen Abstand bis zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere analysiert. Die statistische Auswertung lieferte den Nachweis eines signifikanten Unterschieds zwischen den Gruppen ($F_{3,186}=13,66$, $p < 0,0001$) und einen signifikanten Effekt hinsichtlich der Beobachtungszeitpunkte ($F_{2,186}=2,42$, $p=0,0283$). So wiesen mit LV-hEPO behandelte R6/2 Tiere 25 Tage und 30 Tage post ICV ein signifikant geringeres Körpergewicht im Vergleich zu WT-Tieren auf. Wohingegen 30 Tage post ICV LV-hEPO behandelte R6/2 Tiere gegenüber unbehandelten R6/2 Tieren ein signifikant höheres Gewicht aufwiesen ($n=5-10$ Tiere pro Gruppe). **B)** Bestimmung der motorischen Koordinations- und Ausdauerfähigkeit auf dem RotaRod. Der Test wurde als Basismessung einen Tag vor ICV (Tag -1) sowie 11 Tage und 28 Tage post ICV durchgeführt. Es konnte ein signifikanter Effekt zwischen den Gruppen nachgewiesen werden, da alle drei R6/2 Gruppen starke Defizite in der Performance auf dem RotaRod im Vergleich zu WT-Tieren zeigten ($F_{3,91}=63,50$, $p < 0,0001$). Zwischen den drei Messpunkten konnte kein signifikanter Effekt ermittelt werden ($F_{2,91}=0,69$, $p=0,5057$). Kein signifikanter Unterschied war zwischen LV-hEPO, LV-GFP behandelten und unbehandelten R6/2 Tieren auszumachen ($n=6-13$ Tiere pro Gruppe). **C)** Bestimmung des explorativen Verhaltens (Gesamtaktivität) im Open-Field-Test zu Beginn des Experiments (Tag -1) sowie an Tag 15 und Tag 30 post ICV. Es konnte ein signifikanter Effekt zwischen den Gruppen aufgrund des deutlich hypoaktiven Verhaltens aller drei R6/2 Gruppen im Vergleich zu WT-Tieren festgestellt werden ($F_{3,114}=27,09$, $p < 0,0001$). Ebenso konnte ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der drei Beobachtungszeitpunkte aufgrund der starken Abnahme des explorativen Verhaltens von R6/2 Mäusen festgestellt werden ($F_{2,114}=33,26$, $p < 0,0001$). Keine Interaktion zwischen Behandlung und Zeit konnte zwischen den drei R6/2 Gruppen ausgemacht werden ($n=7-15$ Tiere pro Gruppe). Die Daten wurden mittels Two-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. R6/2 hEPO analysiert und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Wie erwartet wiesen alle R6/2 Gruppen des Experiments im Gegensatz zu WT-Tieren einen Gewichtsverlust über den Beobachtungszeitraum von 30 Tagen auf. Es konnte ein minimaler

aber signifikanter Effekt eines verminderten Gewichtsverlusts zum Ende des Experiments (Tag 30) von LV-hEPO behandelten R6/2 Tieren im Vergleich zur unbehandelten R6/2 Kontrollgruppe ausgemacht werden. Jedoch wird aus Abbildung 28A ersichtlich, dass mit LV-hEPO behandelte Tiere im Vergleich zu WT-Tieren ab Beobachtungstag 25 signifikant an Gewicht verlieren und auch keine signifikante Verbesserung gegenüber LV-GFP behandelten R6/2 Tieren zu beobachten war. Für die Evaluierung der therapeutischen Wirksamkeit von hEPO im R6/2 Mausmodell hinsichtlich einer Verbesserung der motorischen Koordinations- und Ausdauerfähigkeit auf dem RotaRod konnte ebenso keine signifikante Verbesserung im Vergleich zu LV-GFP behandelten und unbehandelten R6/2 Tieren ausgemacht werden (Abbildung 28B). Der RotaRod-Test wurde als Basismessung einen Tag vor Verabreichung der lentiviralen Partikel durchgeführt sowie an Tag 11 und Tag 28 nach ICV. So zeigt Abbildung 28B deutlich, dass im Vergleich zu WT-Tieren alle R6/2 Gruppen des Experiments schon zu Beginn des Versuches in einem Alter von 8 Wochen starke motorische Koordinations- und Ausdauerdefizite aufwiesen, welche sich im Verlauf des Experiments kontinuierlich verschlechterten. Die Behandlung mit LV-hEPO konnte diese progressive Abnahme der Koordinations- und Ausdauerfähigkeit im Vergleich zu LV-GFP behandelten und unbehandelten R6/2 Mäusen nicht abmildern. Hinsichtlich des explorativen Verhaltens von R6/2 Mäusen im Open-Field-Test ist bekannt, dass die Tiere ab einem Alter von 8 Wochen ein hypoaktives Verhalten zeigen (Li *et al.*, 2005). Auch in diesem Versuchsvorhaben zeigten alle drei R6/2 Gruppen des Experiments ein eingeschränktes exploratives Verhalten (Gesamtaktivität) im Vergleich zu WT-Tieren. Die stabile Expression von hEPO im ZNS von R6/2 Mäusen hatte keinen Einfluss auf das explorative Verhalten im Vergleich zu allen drei Kontrollen (Abbildung 28C). Zusammenfassend konnte lentiviral exprimiertes hEPO somit nicht den fortschreitenden Verlust an Gewicht und motorisch-kordinatorischen Fähigkeiten im R6/2 Mausmodell positiv beeinflussen.

3.4.4 Verbesserung der räumlichen Arbeitsgedächtnisleistung von R6/2 Mäuse nach LV-hEPO Behandlung

Schon vor Beginn des Auftretens motorischer Defizite zeigen R6/2 Mäuse in einem Alter von 3-4 Wochen eine ausgeprägte kognitive Leistungsminderung (Lione *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2000). Um zu testen, ob die stabile Expression von hEPO im ZNS von R6/2 Mäusen Einfluss auf die eingeschränkte kognitive Leistungsfähigkeit nimmt, wurde das räumliche Arbeitsgedächtnis der Tiere im Y-Maze-Test getestet. Für die Evaluierung des Effekts von hEPO auf das räumliche Arbeitsgedächtnis wurde das spontan alternierende Verhalten der Tiere in der Y-Maze Testapparatur erfasst.

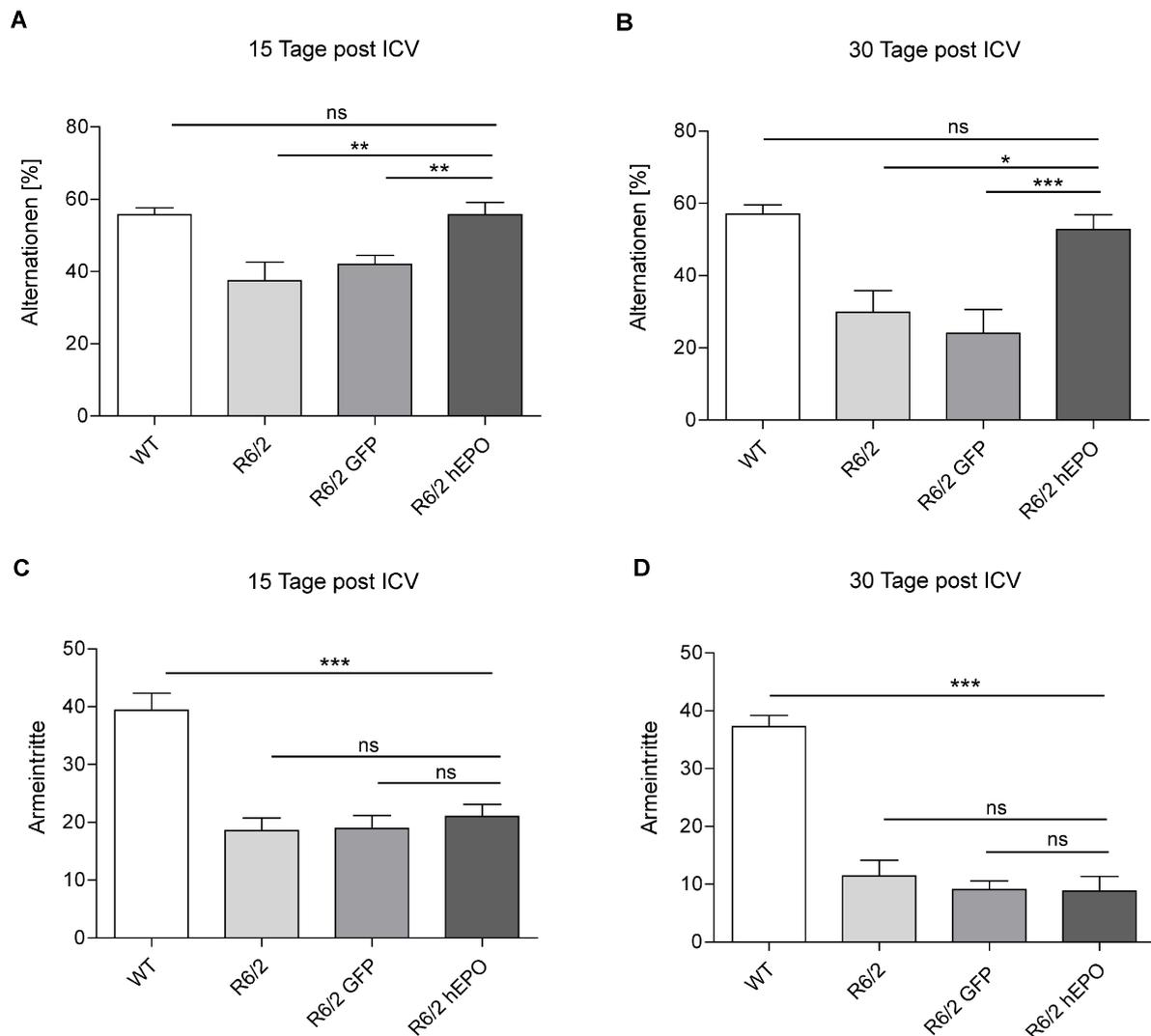


Abbildung 29: Die Expression von hEPO führt zu einer Verbesserung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses von R6/2 Mäusen

A+B) Die Wirkung von hEPO auf das räumliche Arbeitsgedächtnis wurde mittels Y-Maze-Test bestimmt. **A)** Das spontan alternierende Verhalten von LV-hEPO behandelten R6/2 Mäusen war 15 Tage nach ICV gegenüber LV-GFP behandelten und unbehandelten R6/2 Tieren signifikant erhöht ($F_{3,40}=7,032$, $p=0,0007$). **B)** 30 Tage nach ICV war der prozentuale Anteil an Alternationen für LV-hEPO behandelte Tiere gegenüber beiden R6/2 Gruppen ebenfalls signifikant erhöht ($F_{3,37}=9,589$, $p<0,0001$). **C+D)** Die Anzahl an Armeintritten war 15 Tage ($F_{3,40}=13,39$, $p<0,0001$) als auch 30 Tage ($F_{3,37}=34,34$, $p<0,0001$) nach ICV für LV-hEPO behandelte Tiere im Vergleich zu WT-Tieren signifikant erniedrigt. Kein Unterschied konnte an beiden Untersuchungstagen für alle drei R6/2 Gruppen ausgemacht werden. Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. R6/2 hEPO analysiert und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=7-15$ Tiere pro Gruppe). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, ns= nicht signifikant.

Der prozentuale Anteil an Alternationen als Maß für das räumliche Arbeitsgedächtnis wurde 15 Tage und 30 Tage nach ICV bestimmt (Abbildung 29A+B). Weiterhin wurde die Anzahl an Armeintritten während der achtminütigen Testphase bestimmt (Abbildung 29C+D). So kann Abbildung 29 A und 29 B entnommen werden, dass sowohl 15 Tage als auch 30 Tage nach ICV der prozentuale Anteil an Alternationen für LV-hEPO behandelte R6/2 Mäuse im Vergleich zu LV-GFP behandelten und unbehandelten R6/2 Mäusen signifikant erhöht war. Hinsichtlich der Anzahl an Armeintritten zeigten alle drei R6/2 Gruppen an beiden

Messzeitpunkten ein hypoaktives Verhalten im Vergleich zu WT-Tieren (Abbildung 29C+D). Somit führte die LV-hEPO Behandlung zu einer Verbesserung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses der Tiere und bestätigte die bereits im Open-Field-Test nachgewiesene fehlende therapeutische Wirksamkeit von hEPO auf die eingeschränkte Gesamtaktivität von R6/2 Mäusen.

3.4.5 Im ZNS exprimiertes hEPO verlangsamt die progressive Atrophie des Hippocampus von R6/2 Mäusen

Die Verbesserung des kognitiven Leistungsvermögens von R6/2 Mäusen nach Behandlung mit hEPO-kodierenden lentiviralen Partikeln führte zu der Fragestellung, an welchem Punkt des Pathomechanismus hEPO seine therapeutischen Effekte vermittelt. So wurde zunächst mittels T2-gewichteter zerebraler MRT-Aufnahmen bestimmt, ob hEPO Einfluss auf die mit fortschreitendem Krankheitsverlauf zunehmende Atrophie des Cortex, Striatums, Hippocampus und Corpus callosums nimmt. So wurden zerebrale MRT-Aufnahmen als Basismessung einen Tag vor ICV (-1) und nachfolgend an Tag 15 und Tag 30 post ICV angefertigt.

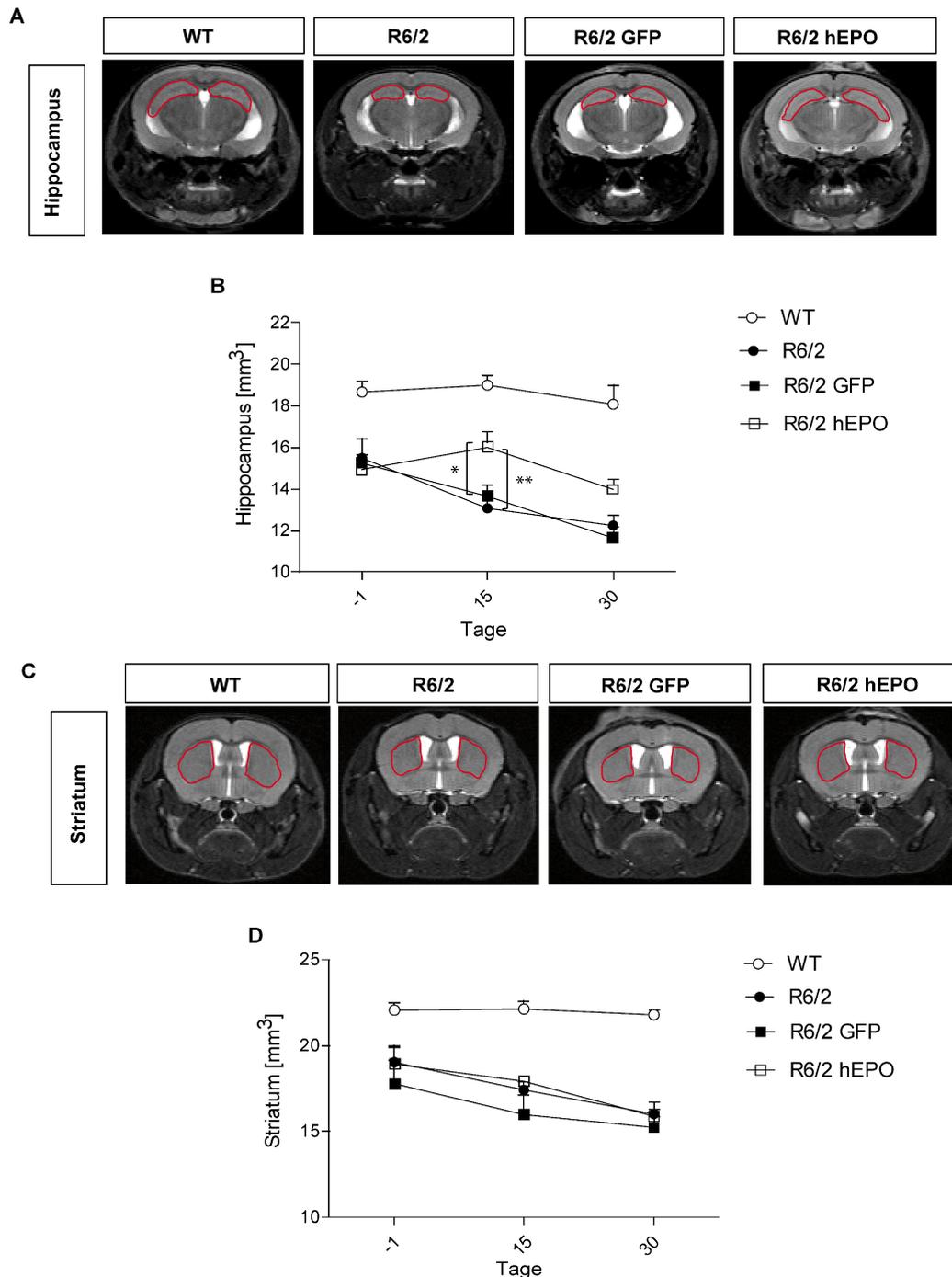


Abbildung 30: Volumetrie des Hippocampus und Striatums

Die Größe des Hippocampus und des Striatums wurden mittels zerebraler MRT-Aufnahmen einen Tag vor ICV als Basismessung (-1) sowie 15 Tage und 30 Tage nach ICV ermittelt (n=5-6 Tiere pro Gruppe). **A)** Repräsentative koronale T2-gewichtete zerebrale MRT-Aufnahmen 15 Tage post ICV mit rot umrandeter Hervorhebung des Hippocampus (Schnittebene -2,18 mm ausgehend vom Bregma). **B)** Volumetrie des Hippocampus. Die stabile Expression von hEPO führte zu einer signifikanten Abmilderung der fortschreitenden hippocampalen Atrophie im Vergleich zu LV-GFP behandelten und unbehandelten R6/2 Tieren 15 Tage post ICV. Die statistische Analyse mittels Two-Way-ANOVA ergab einen signifikanten Effekt zwischen den Gruppen ($F_{3,49}=45,03$, $p < 0,0001$) sowie einen signifikanten Effekt hinsichtlich der Beobachtungszeitpunkte ($F_{2,49}=10,06$, $p=0,0001$). **C)** Repräsentative koronale T2-gewichtete zerebrale MRT-Aufnahmen 15 Tage post ICV mit rot umrandeter Hervorhebung des Striatums (Schnittebene -0,10 mm ausgehend vom Bregma). **D)** Eine Behandlung mit hEPO führte zu keiner statistisch signifikanten Verbesserung der striatalen Atrophie im Vergleich zu LV-GFP und unbehandelten R6/2 Mäusen. Die Daten wurden mittels Two-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. R6/2 hEPO analysiert und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

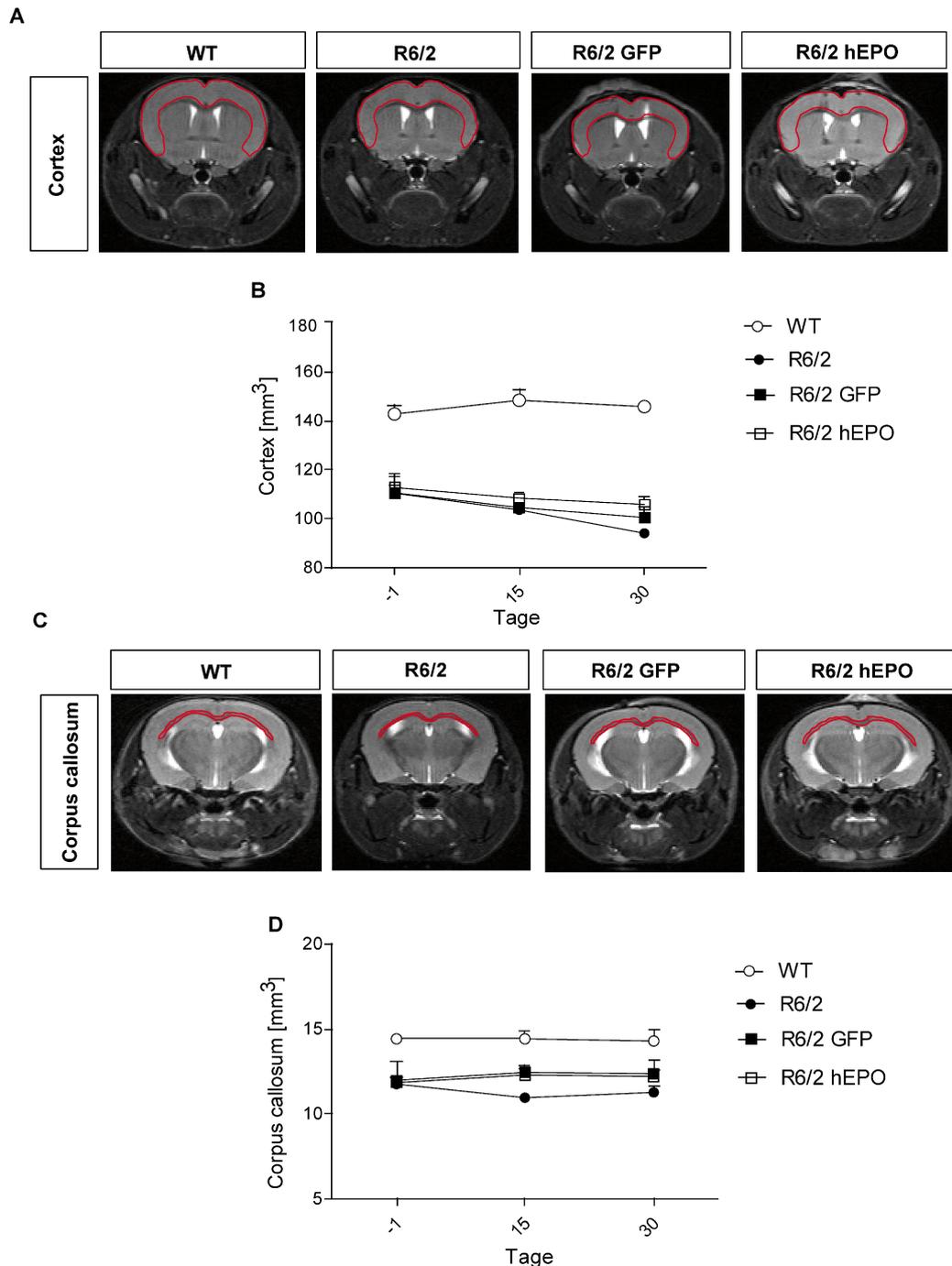


Abbildung 31: Volumetrie des Cortex und Corpus callosum

Die Größe des Cortex und des Corpus callosum wurde mittels zerebraler MRT-Aufnahmen einen Tag vor ICV als Basismessung (-1) sowie 15 Tage und 30 Tage nach ICV ermittelt (n= 5-6 Tiere pro Gruppe). **A+C**) Repräsentative koronale T2-gewichtete zerebrale MRT-Aufnahmen 15 Tage post ICV mit rot umrandeter Hervorhebung des Cortex (Schnittebene 0,4 mm ausgehend vom Bregma) (**A**) und des Corpus callosum (Schnittebene -1,68 mm ausgehend vom Bregma) (**C**). **B+D**) Volumetrische Auswertung des Cortex und des Corpus callosus. Die stabile Expression von hEPO nahm keinen Einfluss auf die fortschreitende Atrophie des Cortex (**B**). Volumina des Corpus callosum blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum nahezu stabil (**D**). Die Daten wurden mittels Two-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. R6/2 hEPO analysiert und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

Die volumetrische Analyse des Hippocampus, Striatums, Cortex und Corpus callosums zeigte, dass eine Atrophie aller untersuchten Regionen in R6/2 Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen bereits zu Beginn des Experiments nachgewiesen werden konnte (Abbildung 30 + 31). Insbesondere das Striatum aber auch der Cortex von R6/2 Mäusen wiesen mit zunehmenden Alter der Tiere eine fortschreitende Atrophie auf, welche nicht durch die Expression von hEPO abgemildert werden konnte (Abbildung 30D + 31B). Volumina des Corpus callosum aller R6/2 Gruppen blieben weitgehend konstant in Bezug zur Ausgangsmessung (Abbildung 31D). Interessanterweise konnte für LV-hEPO behandelte R6/2 Tiere eine signifikante Abmilderung der progressiven Atrophie des Hippocampus 15 Tage nach ICV im Vergleich zu LV-GFP behandelten und unbehandelten R6/2 Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 30A+B). 30 Tage nach ICV konnte dieser Effekt einer hEPO vermittelten Abmilderung der hippocampalen Atrophie weiterhin gezeigt werden, jedoch erreichten die Werte kein signifikantes Niveau gegenüber beiden R6/2 Kontrollen.

3.4.6 Die Langzeitexpression von hEPO fördert die Reifung von Neuroblasten im Gyrus dentatus von R6/2 Mäusen

Die gewonnene Datenlage einer verbesserten kognitiven Leistungsfähigkeit mit begleitender abgemilderter Atrophie des Hippocampus nach Behandlung mit LV-hEPO warf die Frage auf, ob die beobachteten Effekte möglicherweise auf eine Verbesserung der beeinträchtigten hippocampalen Neurogenese von R6/2 Mäusen zurückzuführen sind. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden die Tiere 30 Tage nach ICV transkardial perfundiert, die Gehirne entnommen und immunhistochemische Untersuchungen angeschlossen. So wurde zunächst die Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen im hippocampalen Gyrus dentatus (DG) der Tiere quantifiziert. Weiterhin wurden Quantifizierungsstudien angeschlossen, welche sich mit dem Wachstum von Neuroblasten sowie ihrer funktionellen Integration in neuronale Netzwerke des DG beschäftigten. Zudem wurde untersucht, ob die bereits im Vorversuch in WT-Tieren nachgewiesenen Effekte einer LV-hEPO-vermittelten Wirkung auf neuronale Stammzellen der SVZ ebenso im DG von R6/2 Tieren nachweisbar sind.

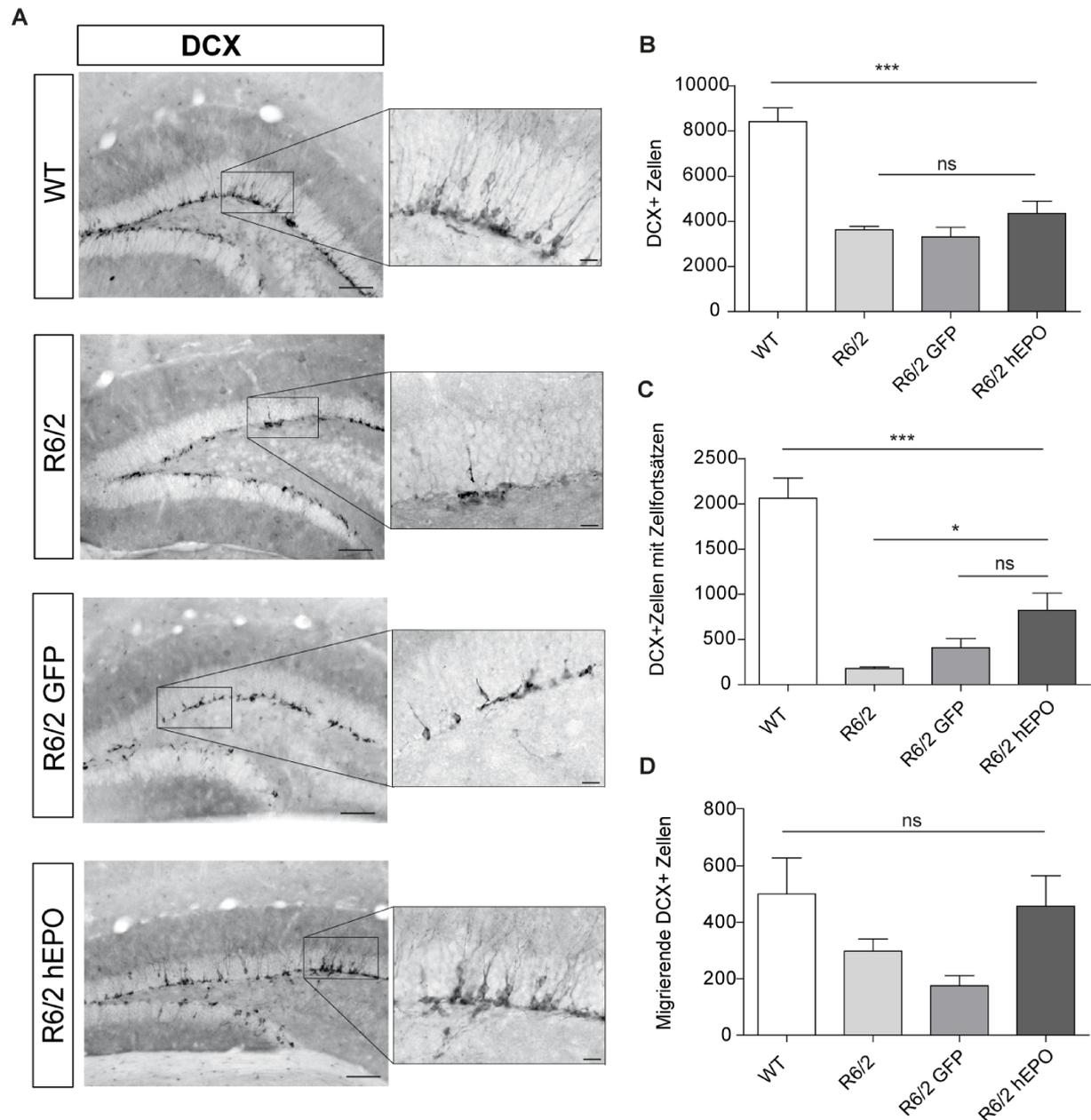


Abbildung 32: hEPO fördert das Wachstum von Neuroblasten im Gyrus dentatus (DG) von R6/2 Mäusen 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel

A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von DAB-gefärbten DCX-exprimierenden Zellen des DG 30 Tage nach ICV. 10-fache Vergrößerung, Messbalken 100 μ m. Schwarz umrandete hervorgehobene Vergrößerungen erlauben eine nähere Betrachtung der Morphologie von DCX-exprimierenden Zellen des DG. 40-fache Vergrößerung, Messbalken 20 μ m. **B)** Quantifizierung an DCX-exprimierenden Zellen innerhalb des DG. Es konnte kein Unterschied in der Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen im Vergleich zu LV-GFP behandelten und unbehandelten R6/2 Mäusen ermittelt werden. Die Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen von LV-hEPO behandelten R6/2 Mäusen im Vergleich zur WT Kontrolle war signifikant erniedrigt ($F_{3,21}=22,79$, $p<0,0001$). **C)** Quantifizierung von DCX-exprimierenden Zellen mit Zellfortsätzen. Die Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen mit Zellfortsätzen nach Behandlung mit LV-hEPO war signifikant erhöht im Vergleich zur unbehandelten R6/2 Gruppe, jedoch signifikant niedriger im Vergleich zur WT-Kontrolle ($F_{3,21}=24,21$, $p<0,0001$). **D)** Quantifizierung der Anzahl an migrierenden DCX-exprimierenden Zellen des DG. Es konnte kein Unterschied hinsichtlich der Migrationsfähigkeit DCX-exprimierender Zellen von LV-hEPO behandelten Tieren zu allen Kontrollgruppen ausgemacht werden ($F_{3,21}=2,376$, $p=0,0989$). Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. R6/2 hEPO analysiert und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=5-7$ Tiere pro Gruppe), * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, ns= nicht signifikant.

Die gewonnenen Ergebnisse einer verminderten Anzahl an DCX-exprimierenden Neuroblasten im DG von R6/2 Mäusen (Abbildung 32B) sind konsistent mit einer vorausgegangenen Studie (Gil *et al.*, 2005). Die Behandlung mit LV-hEPO führte nicht zu einer verstärkten Bildung an DCX-exprimierenden Zellen, da die Anzahl im Vergleich zur WT-Kontrolle signifikant niedriger war (R6/2 **hEPO**: 4344 ± 588 , **WT**: 8410 ± 655 (Mittelwert \pm SEM)). Auch konnte zwischen den einzelnen R6/2 Gruppen kein Unterschied ausgemacht werden (R6/2 **GFP**: 3300 ± 435 , **R6/2**: 3622 ± 140 (Mittelwert \pm SEM)). Im adulten Hippocampus können sechs verschiedene Stadien (Typ 1, Typ 2a, Typ 2b, Typ 3, Typ 4 und Typ 5) der neuronalen Entwicklung auf Basis der Morphologie, Zellproliferationseigenschaften sowie der Expression von zellspezifischen Markern unterschieden werden (Kempermann *et al.*, 2004). Während der ersten drei Wochen nach der Bildung neuer Neuronen erfahren die Zellen weitreichende morphologische und synaptische Veränderungen. So erreichen innerhalb der ersten zwei Wochen erste Zellfortsätze neu gebildeter Neuronen die ersten Zellreihen der Molekularzellschicht des DG. Innerhalb der dritten Woche nach Zellbildung befinden sich die Zellfortsätze innerhalb der Molekularzellschicht und die Neuronen erfahren einen extensiven GABAergen Input, welcher eine große Rolle beim Zellwachstum zu ausgereiften Neuronen spielt (Aasebo *et al.*, 2011; Toni und Sultan, 2011). Die mit dem Wachstum neuer Neuronen assoziierte Bildung von Zellfortsätzen ist involviert in Hippocampus-abhängige Gedächtnisleistungen (Tronel *et al.*, 2010). Aus diesem Zusammenhang heraus entwickelte sich die Hypothese, dass möglicherweise stabil exprimiertes hEPO Einfluss auf den Differenzierungsprozess von Neuroblasten nimmt. Aus diesem Grund wurde die Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen mit Zellfortsätzen 30 Tage nach ICV quantifiziert. Es zeigte sich, dass LV-hEPO behandelte Tiere signifikant mehr DCX-exprimierende Neuroblasten mit Zellfortsätzen im DG im Vergleich zu unbehandelten R6/2 Tieren aufwiesen (R6/2 **hEPO**: 822 ± 215 , **R6/2**: 179 ± 17 (Mittelwert \pm SEM)) (Abbildung 32C). Bei näherer Betrachtung der Morphologie der Zellen konnte für LV-GFP behandelte Tiere festgestellt werden, dass DCX-exprimierende Zellen des DG eine deutlich unreifere Morphologie mit kürzeren Zellfortsätzen im Vergleich zu LV-hEPO behandelten Tieren zeigten (Abbildung 32A). Die Migration neu gebildeter Neurone von der subgranulären Zone (SGZ) hin zur Körnerzellschicht (GCL) des DG ist ein Charakteristikum einer funktionellen hippocampalen Neurogenese. In einer vorausgegangenen Studie ist bereits beschrieben worden, dass die Migration von Neuroblasten im DG von R6/2 Mäusen gestört ist, was in diesem Zusammenhang mit einer gestörten Reifung von Neuroblasten in Verbindung gebracht wurde (Phillips *et al.*, 2005). Basierend auf dieser Datenlage wurde die Anzahl an migrierenden DCX-exprimierenden Neuroblasten im DG 30 Tage nach LV-hEPO Behandlung quantifiziert. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen LV-hEPO behandelten R6/2 Mäusen im Vergleich zu

LV-GFP behandelten und unbehandelten R6/2 Mäusen ermittelt werden (R6/2 **hEPO**: 457 ± 111 , R6/2 **GFP**: 175 ± 36 , **R6/2**: 298 ± 23 (Mittelwert \pm SEM)). Allerdings kann Abbildung 32D entnommen werden, dass in LV-hEPO behandelten R6/2 Tieren unreife Neuronen eine Migrationsfähigkeit auf dem Niveau von WT-Tieren aufwiesen, da kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen nachgewiesen werden konnte (R6/2 **hEPO**: 457 ± 111 , **WT**: 500 ± 137 (Mittelwert \pm SEM)). Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass stabil exprimiertes hEPO im ZNS von R6/2 Mäusen zu keiner verstärkten Neuroblastenbildung führte, jedoch die Reifung und funktionelle Integration in bestehende neuronale Netzwerke förderte.

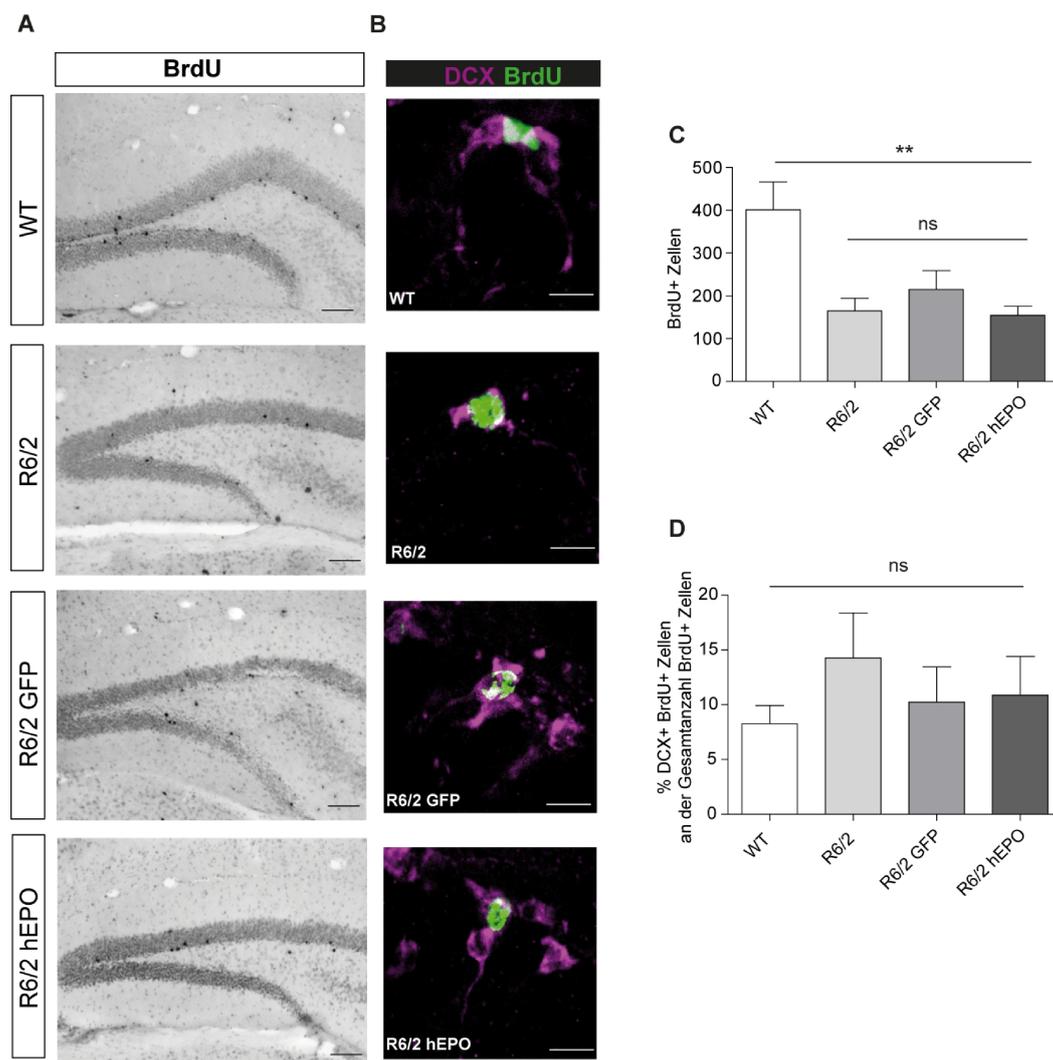


Abbildung 33: Einfluss von hEPO auf Stammzellen des hippocampalen DG von R6/2 Mäusen

A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von DAB-gefärbten BrdU-positiven Zellen des DG 30 Tage nach ICV. 10-fache Vergrößerung, Messbalken 100 μ m. **B)** Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen 30 Tage nach ICV. Messbalken 10 μ m. **C)** Quantifizierung an BrdU-positiven Zellen innerhalb des DG. Es konnte kein Unterschied in der Anzahl an BrdU-positiven Zellen im Vergleich zu LV-GFP behandelten und unbehandelten R6/2 Mäusen ermittelt werden. Die Anzahl an BrdU-positiven Zellen von LV-hEPO behandelten R6/2 Mäusen war im Vergleich zur WT Kontrolle signifikant erniedrigt ($F_{3,21}=6,807$, $p=0,0022$). **D)** Quantifizierung an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen. Es konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen des Experiments ausgemacht werden ($F_{3,21}=0,05852$, $p=0,631$). Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. R6/2 hEPO analysiert und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=5-7 Tiere pro Gruppe), ** $p \leq 0,01$, ns= nicht signifikant.

Die Quantifizierung an BrdU-positiven Zellen 30 Tage nach ICV zeigte, dass für alle drei R6/2 Gruppen des Experiments eine verminderte Anzahl an BrdU-positiven Zellen im Vergleich zu WT-Tieren nachgewiesen werden konnte (**WT**: 401 ± 70 , **R6/2**: 165 ± 27 , **R6/2 GFP**: 215 ± 44 , **R6/2 hEPO**: 155 ± 23 , (Mittelwert \pm SEM)) (Abbildung 33A+C). Aufgrund der Injektion von BrdU zu Beginn des Experiments wurden vornehmlich mitotisch ruhende neuronale Typ-1-Stammzellen des DG quantifiziert, welche durch asymmetrische Teilung aus einer aktivierten Stammzelle hervorgegangen sein müssen. Dies lässt sich durch die gewonnenen Erkenntnisse des prozentualen Anteils von DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen an der Gesamtanzahl BrdU-positiver Zellen treffen, welcher bei $10,6 \pm 1,3$ % (Mittelwert \pm SEM) lag. Typ-2b-Zellen, Typ-3-Zellen und unreife Neuronen des DG exprimieren DCX während ihrer Reifung zu Neuronen (Kempermann *et al.*, 2004). Bei Typ-2b-Zellen und Typ-3-Zellen des DG handelt es sich um mitotisch aktive Zellen, welche BrdU während der S-Phase inkorporieren können. Der Nachweis an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen ist somit wahrscheinlich auf post-mitotische unreife Neuronen des 5. Stadiums zurückzuführen, welche aus mitotisch aktiven Typ-3-Zellen hervorgegangen sind. Diese Aussage lässt sich aufgrund des morphologischen Phänotyps von DCX-positiven Zellen mit unterschiedlich langen Zellfortsätzen erschließen (Abbildung 33B). Aufgrund der Zellzykluszeiten von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen von 22-27 h (Brandt *et al.*, 2012) und dem Wachstum zu reifen Neuronen innerhalb eines Zeitraums von 3 Wochen (Toni und Sultan, 2011) ist damit höchstwahrscheinlich ein Anteil ~ 90 % der quantifizierten Anzahl BrdU-positiver Zellen auf mitotisch ruhende neuronale Typ-1-Stammzellen zurückzuführen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die LV-hEPO Behandlung keinen Einfluss auf die Bildung von neuronalen Stammzellen des Gyrus dentatus von R6/2 Mäusen nimmt. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu erwähnen, dass neben der eingeschränkten Differenzierung von Neuroblasten ebenso die Bildung neuronaler Stammzellen im Gyrus dentatus von R6/2 Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren beeinträchtigt ist.

3.4.7 Die Langzeitexpression von hEPO nimmt keinen Einfluss auf die Neurogenese der SVZ im R6/2 Mausmodell

Neben des Einflusses von stabil exprimiertem hEPO auf Prozesse der hippocampalen Neurogenese wurde weiterhin analysiert, ob das Zytokin auch Einfluss auf die Neurogenese der SVZ im R6/2 Mausmodell nimmt. So wurde 30 Tage nach ICV der Einfluss von hEPO auf die Bildung von Neuroblasten sowie neuronaler Stammzellen in der SVZ untersucht.

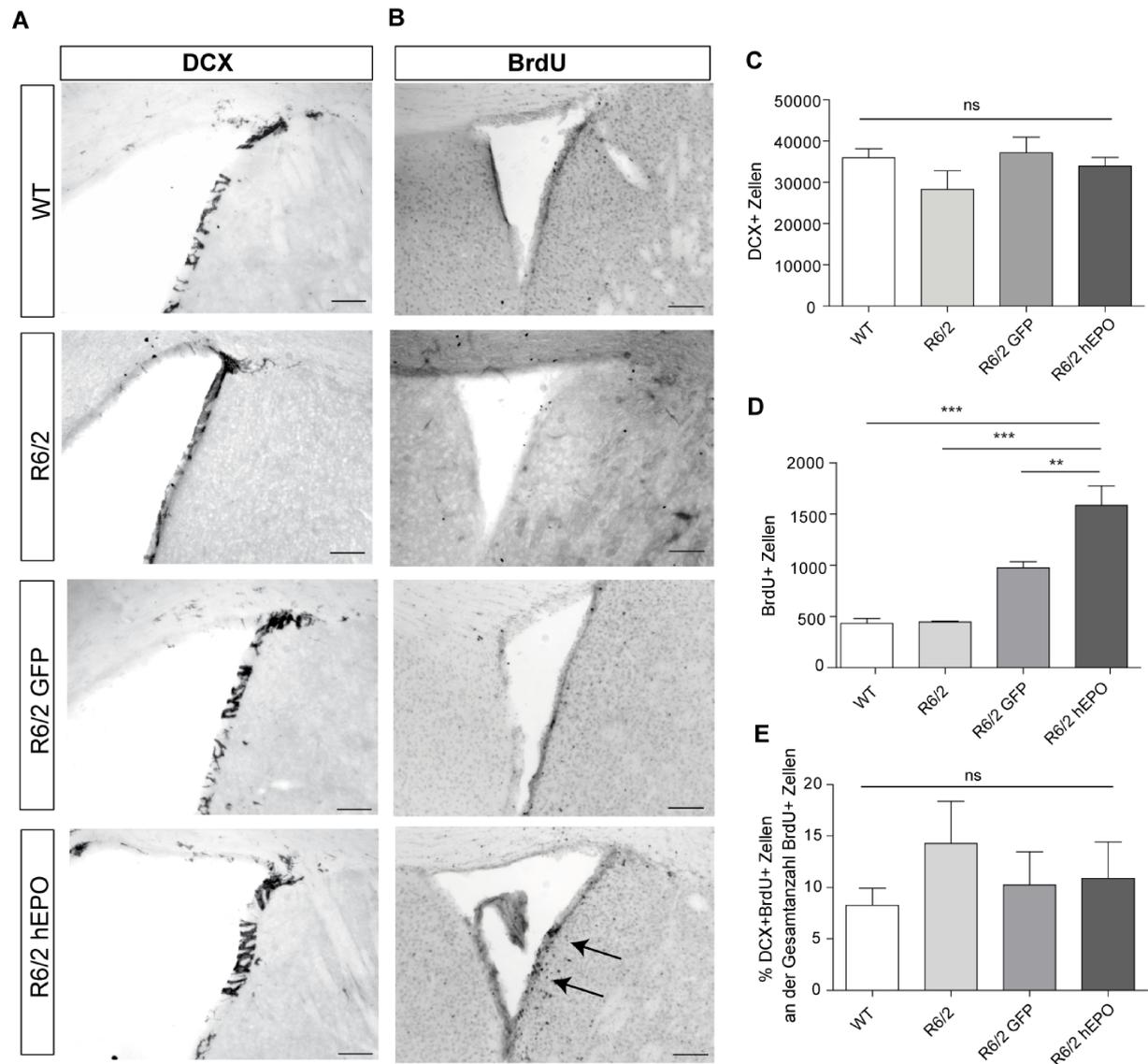


Abbildung 34: Einfluss von hEPO auf die Neurogenese der SVZ von R6/2 Mäusen

A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von DAB-gefärbten DCX-exprimierenden Zellen in der SVZ 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel. 10-fache Vergrößerung, Messbalken 100 μ m. **B)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von DAB-gefärbten BrdU-positiven Zellen in der SVZ 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel. 10-fache Vergrößerung, Messbalken 100 μ m. **C)** Stereologische Quantifizierung von DCX-exprimierenden Zellen in der SVZ. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich der Anzahl an Neuroblasten der SVZ festgestellt werden ($F_{3,22}=1,412$, $p=0,2659$). **D)** Stereologische Quantifizierung von BrdU-positiven Zellen in der SVZ. Es konnten signifikant mehr BrdU-Zellen für LV-hEPO behandelte Tiere im Vergleich zu allen Kontrollgruppen nachgewiesen werden ($F_{3,21}=23,91$, $p<0,001$). **E)** Quantifizierung an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen. Es konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen des Experiments festgestellt werden ($F_{3,21}=0,52852$, $p=0,6316$). Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. R6/2 hEPO analysiert und sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n=5-7$ Tiere pro Gruppe), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, ns= nicht signifikant.

Wie bereits unter physiologischen Bedingungen in WT-Tieren nachgewiesen (siehe Abbildung 22) resultierte die stabile Expression von hEPO im ZNS von R6/2 Mäusen nicht in einer Zunahme der Anzahl an Neuroblasten der SVZ (Abbildung 34C). Die Quantifizierung an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen der SVZ zeigte auf, dass sich $11,6 \pm 1,7$ % (Mittelwert \pm SEM) aller gezählten BrdU-positiven Zellen der SVZ als Neuroblasten

identifizieren ließen (Abbildung 34E). Somit konnten auch in diesem Versuchsvorhaben ~ 90 % der quantifizierten BrdU-positiven Zellen aufgrund der angewandten BrdU-Applikationsstrategie als neuronale Stammzellen der SVZ identifiziert werden. Wie bereits im Vorversuch mit LV-hEPO behandelten WT-Tieren konnte auch im R6/2 Mausmodell nachgewiesen werden, dass die stabile Langzeitexpression von hEPO zu einer verstärkten Bildung von ruhenden neuronalen Stammzellen führt.

3.4.8 Lentiviral exprimiertes hEPO fungiert nicht als Regulator hippocampaler neuroinflammatorischer Prozesse im R6/2 Mausmodell

Die Veränderung inflammatorischer Prozesse ist Teil des Pathomechanismus der Huntington-Krankheit und kann ubiquitär sowohl im ZNS als auch in der peripheren Blutzirkulation nachgewiesen werden. Mikroglia stellen innerhalb des Gehirns eine der wichtigsten Immunzellpopulationen dar und liegen unter physiologischen Bedingungen im Ruhezustand vor (Ellrichmann *et al.*, 2013). Als Antwort auf pathologische Veränderungen innerhalb des ZNS gehen Mikrogliazellen in einen reaktiven Zustand über und sekretieren in Abhängigkeit ihres Aktivierungsstatus pro-inflammatorische oder anti-inflammatorische Zytokine. Mikroglia weisen ähnliche Charakteristika auf wie systemische Makrophagen. Makrophagen können in das ZNS infiltrieren, wo sie die Morphologie von aktivierten Mikrogliazellen annehmen (Bond und Rex, 2014). So ist bekannt, dass bereits vor dem Auftreten erster Symptome der Huntington-Krankheit eine Aktivierung und Proliferation von Mikroglia/Makrophagen-Populationen im ZNS zu beobachten ist (Politis *et al.*, 2011). Der therapeutische Einsatz von EPO in der Behandlung der Huntington-Krankheit ist in diesem Zusammenhang interessant, da bereits gezeigt werden konnte, dass EPO die Expression pro-inflammatorischer Zytokine unterdrückt, was wiederum zu der Annahme führte, dass EPO Einfluss auf den Aktivierungszustand von Mikroglia nimmt (Bond und Rex, 2014). Daraus ergab sich die Fragestellung, ob die stabile Expression von hEPO im ZNS von R6/2 Mäusen als Modulator neuroinflammatorischer Prozesse fungiert. Dabei lag das Augenmerk darauf, die Wirkung von hEPO auf neuroinflammatorische Prozesse innerhalb des Hippocampus zu analysieren, da bereits deutliche therapeutische Effekte für hEPO in dieser Region erbracht werden konnten (siehe Abbildung 29 + 30). So wurde zunächst die Wirkung von hEPO auf die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und CCL2 innerhalb des Hippocampus mittels qRT-PCR analysiert. Über die stereologische Quantifizierung von Mikroglia/Makrophagen-Populationen innerhalb des hippocampalen Gyrus dentatus sollte aufgezeigt werden, ob Mikroglia/Makrophagen in den Pathomechanismus einer gestörten Neurogenese involviert sind und ob die Expression von hEPO eine Wirkung auf diese Immunzellpopulation vermittelt. Mittels FACS-Analyse wurde abschließend untersucht, ob hippocampale Mikroglia-Populationen durch Hochregulation des

Oberflächenmarkers MHC-II sowie Expression des pro-inflammatorischen Zytokins TNF α im aktivierten Zustand vorliegen und ob eine LV-hEPO Behandlung Einfluss auf den reaktiven Zustand dieser Population nimmt.

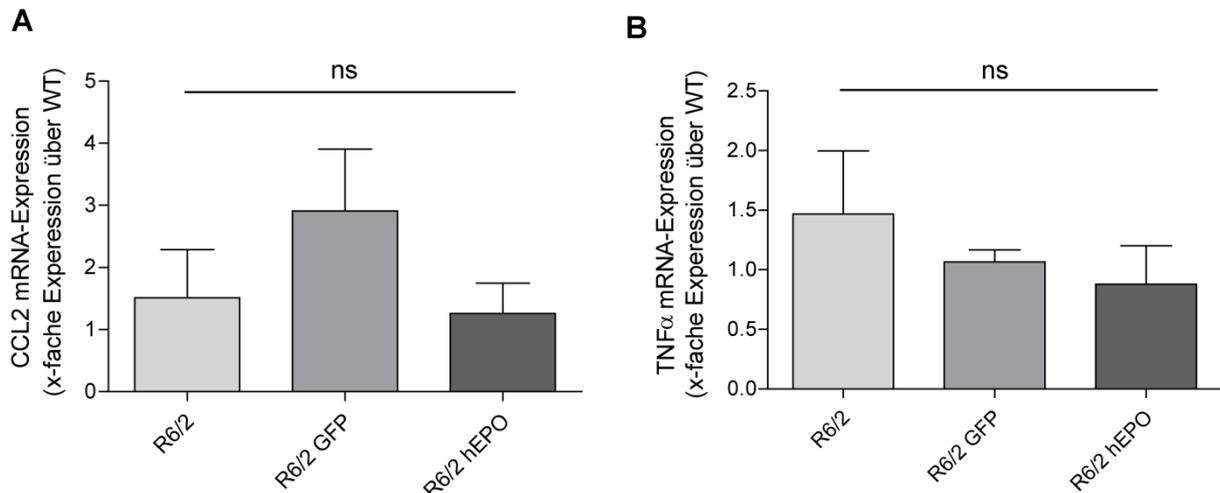
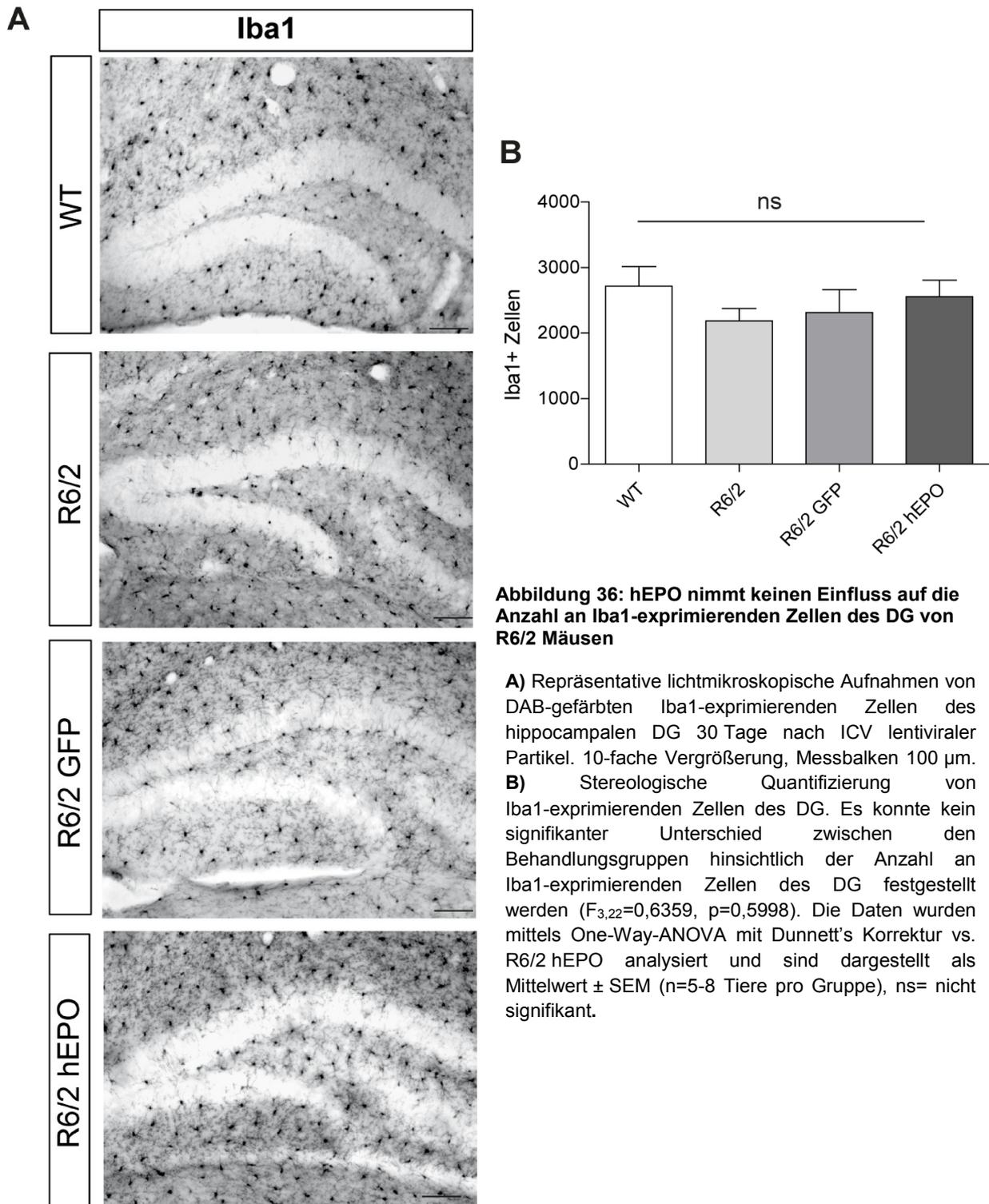


Abbildung 35: Die Expression von hEPO führt zu keiner Regulation der Expression pro-inflammatorischer Zytokine innerhalb des Hippocampus

Analyse der hippocampalen Expressionsraten von CCL2- (**A**) und TNF α -mRNA (**B**) mittels qRT-PCR 30 Tage nach ICV. Die Expressionsraten wurden mittels GAPDH normalisiert und sind dargestellt als x-fache Expression im Verhältnis zur Expression in WT-Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's Korrektur vs. R6/2 hEPO und die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM (n=3 Tiere pro Gruppe), ns= nicht signifikant.

Für die Expressionsanalyse der pro-inflammatorischen Zytokine CCL2 und TNF α wurde RNA des Hippocampus isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Eine Analyse mittels qRT-PCR zeigte, dass hEPO weder Einfluss auf die mRNA-Expression von CCL2 ($F_{2,6}=1,289$, $p=0,3421$) noch von TNF α ($F_{2,6}=0,6869$, $p=0,5388$) im Vergleich zu LV-GFP und unbehandelten R6/2 Mäusen nahm (Abbildung 35).



Mittels Quantifizierung an Iba1-exprimierenden Zellen des Gyrus dentatus wurden aktivierte Mikroglia/Makrophagen quantifiziert. Bei Iba1 handelt es sich um einen Marker, der während der Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen-Populationen des ZNS unter pathologischen Bedingungen (u.a. Inflammation, Ischämie) hochreguliert wird (Ohsawa *et al.*, 2004). Es konnte kein Nachweis eines signifikanten Unterschiedes in der Anzahl an aktivierten Mikroglia/Makrophagen des DG zwischen LV-hEPO behandelten R6/2 Mäusen und LV-GFP behandelten bzw. unbehandelten R6/2 Tieren erbracht werden (**R6/2**: 2185 ± 173 ,

R6/2 **GFP**: 2315 ± 350 , R6/2 **hEPO**: 2553 ± 294 , (Mittelwert \pm SEM)). Weiterhin konnte kein Unterschied in der Anzahl erhöhter aktivierter Mikroglia/Makrophagen im DG von R6/2 Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren nachgewiesen werden (**WT**: 2714 ± 324 (Mittelwert \pm SEM) (Abbildung 36B)). Ebenso konnte kein Unterschied hinsichtlich der Morphologie an Iba1-positiven Zellen für alle vier Untersuchungsgruppen festgestellt werden. Alle Zellen wiesen einen annähernd runden Zellkörper mit einer Vielzahl von ramifizierten Zellfortsätzen auf (Abbildung 36A).

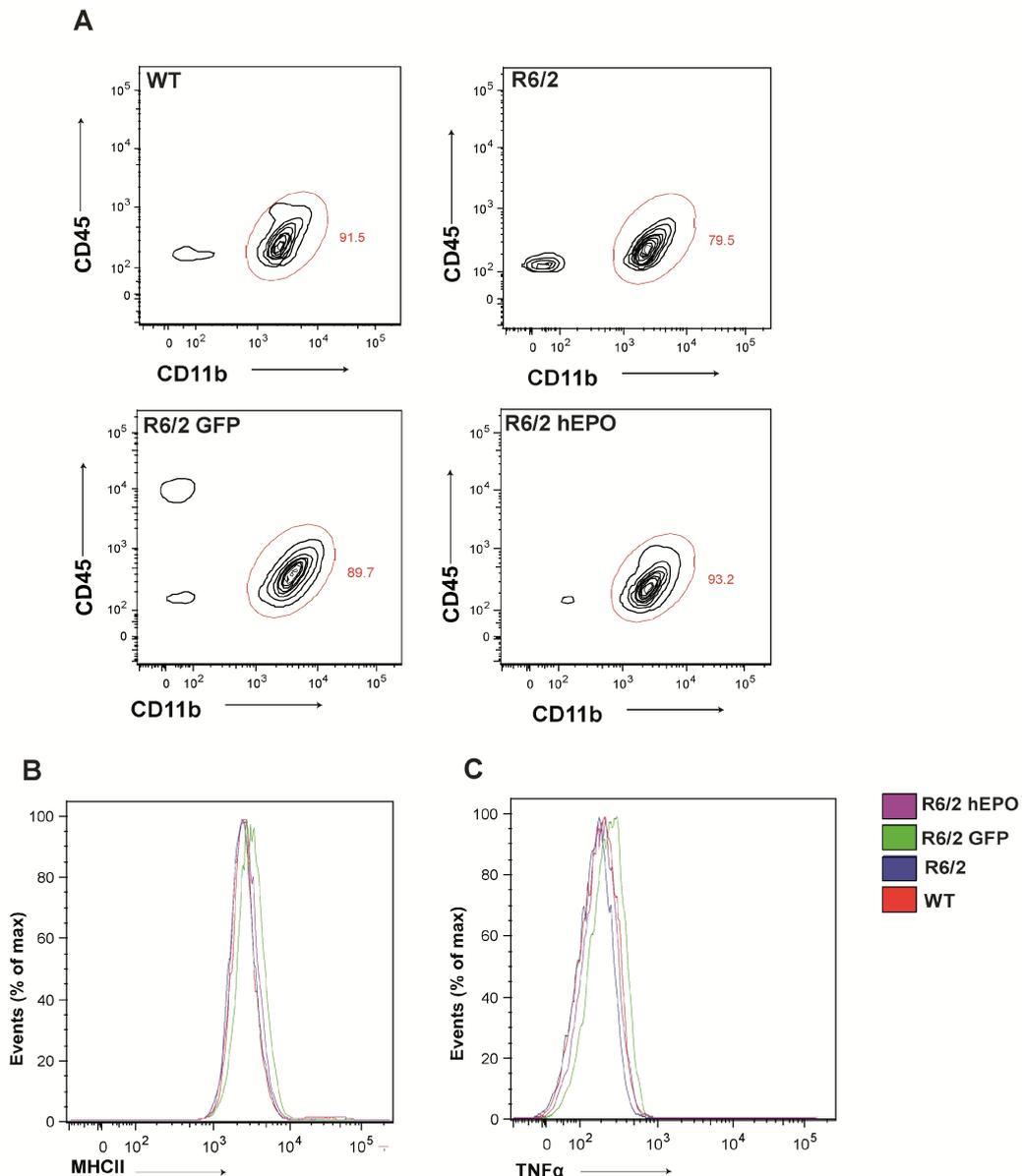


Abbildung 37: hEPO nimmt keinen Einfluss auf aktivierte hippocampale Mikroglia-Populationen im R6/2 Mausmodell

A) FACS-Analyse hippocampaler Mikroglia-Populationen. Abbildung A zeigt Dot-Blots von $CD45^+CD11b^+$ -exprimierenden Mikroglia-Populationen des Hippocampus von LV-hEPO, LV-GFP behandelten und unbehandelten R6/2 Tieren sowie WT-Mäusen. **B+C)** Im Dot-Blot eingegrenzte $CD45^+CD11b^+$ Populationen wurden hinsichtlich der Expression des Oberflächenmarkers MHC-II (**B**) sowie des pro-inflammatorischen Zytokins $TNF\alpha$ (**C**) analysiert. Die Übereinanderlagerung von Histogrammen der einzelnen Gruppen zeigt vergleichbare Expressionslevel an MHC-II (**B**) und $TNF\alpha$ (**C**).

In einem abschließenden Versuch wurde analysiert, ob stabil exprimiertes hEPO Einfluss auf den aktivierten pro-inflammatorischen Zustand von hippocampalen Mikroglia-Populationen nimmt. Dazu wurden für eine FACS-Analyse Zellen aus dem Hippocampus isoliert und hinsichtlich der Expression der Mikroglia-Marker CD45 und CD11b analysiert. Die Analyse CD45⁺CD11b⁺-exprimierender Mikroglia-Populationen zeigte, dass in keiner der Untersuchungsgruppen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression des Oberflächenmarkers MHC-II sowie des pro-inflammatorischen Zytokins TNF α nachgewiesen werden konnte (Abbildung 37B+C). Zusammenfassend fungiert hEPO somit nicht als Modulator neuroinflammatorischer Prozesse im Hippocampus von R6/2 Mäusen. In diesem Zusammenhang konnte auch kein Unterschied hinsichtlich neuroinflammatorischer Prozesse zwischen R6/2 Mäusen und WT-Tieren festgestellt werden.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung der endogenen Expression von murinem EPO und vEPO

Der Nachweis einer Expression des EPO/EPOR-Systems im murinen ZNS und die funktionelle Beteiligung bei Prozessen der embryonalen und adulten Neurogenese (Bernaudin *et al.*, 1999; Bernaudin *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007) führten zu der Hypothese, dass die im Labor für Molekulare Psychiatrie entdeckten endogen exprimierten EPO-Isoformen (vEPO) ebenso Einfluss auf die Neurogenese nehmen. Bis heute ist nicht bekannt, in welchen Regionen und unter welchen Bedingungen vEPO im embryonalen und adulten ZNS exprimiert wird. Der Nachweis der murinen EPO-Isoform mS ist in cDNA des Gehirns sowie der Niere gelungen (Bonnas, 2009). Da keine Spezifikation der mS-Expression auf spezifische Regionen des ZNS erfolgte und vor allem nicht bekannt ist, welche Zellen des ZNS mS exprimieren, wurde mittels PCR- und Western-Blot-Analyse ein Expressionsprofil von mS erstellt. Dabei konnten mS-Transkripte in murinen neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen mittels *semi-nested* PCR-Ansatz nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11). Der Nachweis einer spezifischen Proteinexpression von mS in murinem embryonalem und adultem ZNS-Gewebe mittels Western-Blot-Analyse gestaltete sich problematisch, da kein spezifisch auf die Aminosäuresequenz von mS ausgerichteter Antikörper existierte. Anwendung fand ein Antikörper, welcher sich gegen die Aminosäuresequenz 28-189 des ausgereiften humanen EPO-Proteins richtete. Die Fähigkeit des Antikörpers, ebenfalls murines EPO zu binden, liegt darin begründet, dass die EPO-Gensequenz im Verlauf der Evolution hochkonserviert vererbt wurde und die Aminosäuresequenz von humanem und murinem EPO eine Homologie von 80 % aufweist (Wen *et al.*, 1993). So stellte sich in der Western-Blot-Analyse heraus, dass mehrere spezifische EPO-Produkte zwischen 25-34 kDa in embryonalem und adultem Gewebe sowie in Proteinisolaten von Neurosphären und Astrozyten/Mikroglia-Kulturen detektiert werden konnten (siehe Abbildung 12). Weiterhin konnte ein EPO-Produkt bei ca. 50 kDa in Gewebelysaten der embryonalen Leber und der adulten Niere nachgewiesen werden. Die Spezifität der detektierten EPO-Produkte wurde mittels Präadsorption des verwendeten Antikörpers verifiziert. Bei EPO handelt es sich um ein 34 kDa großes Protein mit drei N-Glykosylierungsmotiven (Asp 24, Asp 38, Asp 83) und einem O-Glykosylierungsmotiv (Ser 126). Insgesamt können 39 % des Molekulargewichts dem Kohlenhydratanteil zugeschrieben werden (Lai *et al.*, 1986; Wen *et al.*, 1993; Wen *et al.*, 1994). So stellte sich zunächst die Frage, ob es sich bei dem 25 kDa großen Bandenprodukt aufgrund des geringen Molekulargewichts um ein mS-spezifisches Produkt handelt. Die murine EPO-Isoform mS ist charakterisiert durch Fehlen des 4. Exons und daraus folgender Deletion der Aminosäuren 82-141 des translatierten Proteins (Bonnas, 2009). Dies hat zur

Folge, dass das errechnete Molekulargewicht von mS ohne Einbeziehung posttranslationaler Modifikationen im Vergleich zum Wildtyp-EPO um ca. 6 kDa kleiner ist. Jedoch muss beachtet werden, dass durch die Deletion der Aminosäuren 82-141 des mS-Proteins das N-Glykosylierungsmotive Asp 83 sowie das O-Glykosylierungsmotiv Ser 126 entfallen, was schlussendlich zu einem deutlich geringeren Molekulargewicht im Vergleich zum Wildtyp-EPO führt. Aufgrund des abgeschätzten Molekulargewichts von mS ist es daher durchaus möglich, dass es sich bei der 25 kDa Bande um ein spezifisches mS-Produkt handelt. Der Nachweis einer verstärkten Expression des 25 kDa Produkts in Proteinlysaten von Neurosphären des adulten Hippocampus, der adulten SVZ sowie der adulten Niere sollten jedoch im Kontext mit den mittels PCR-Ansatz nachgewiesenen mS-Transkripten gesehen werden. So ist der Nachweis von mS-Transkripten in Kulturen von Neurosphären nur mittels *semi-nested* PCR-Ansatz und unter Verwendung von Primern gelungen, welche spezifisch an die mS-Sequenz binden. Dies führt zu der Annahme, dass mS-mRNA in neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen nur in sehr geringen Mengen transkribiert wird. Es stellt sich die Frage, ob es möglich ist, dass eine sehr geringe Expression von mS-spezifischer mRNA zu einer deutlich detektierbaren Proteinexpression in der Western-Blot-Analyse führen kann. Die Korrelation zwischen mRNA-Menge und der tatsächlichen Menge an translatierten Proteinen hängt von mehreren Faktoren ab, wie beispielsweise der Translationsinitiation am Ribosom oder der mRNA-Stabilität, welche durchaus zu einer verstärkten Proteintranslation geringer mRNA-Mengen beitragen können (de Sousa Abreu *et al.*, 2009; Schwanhauser *et al.*, 2011). Diese Hypothese wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Weiterhin sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass es sich bei den in der Western-Blot-Analyse nachgewiesenen EPO-Produkten in allen Fällen um murines Wildtyp-EPO handelt, welche unterschiedlich stark ausgeprägte Glykosylierungsmuster aufweisen. So wurde bereits im Jahr 1994 beschrieben, dass EPO, welches von kultivierten fetalen zerebralen Zellen exprimiert wird, ein geringeres Molekulargewicht aufweist als in der Niere gebildetes EPO. Diese Differenz hinsichtlich des Molekulargewichtes wird auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster zurückgeführt, insbesondere auf terminale Sialinsäurereste (Masuda *et al.*, 1994). Im Gegensatz zur genetischen Kontrolle der Proteinexpression werden ko- und posttranslational ablaufende Glykosylierungsprozesse über eine Vielzahl an Enzymen (Glykosyltransferasen) des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats kontrolliert und sind deshalb variabel (Brooks, 2006). Die Glykanketten von EPO setzen sich aus den Monosacchariden Mannose, Galaktose, Fucose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylneuraminsäure zusammen (Brailsford und Danishefsky, 2012). So ist allen N-Glykanen eine sogenannte Core-Struktur gemein, welche sich aus zwei Molekülen N-Acetylglucosamin und drei Molekülen Mannose zusammensetzt. An diese Core-Struktur

können bis zu fünf N-Acetylglucosamine gebunden werden, weshalb zwischen bi-, tri-, tetra- und pentaantennären N-Glykanen differenziert werden kann. An N-Acetylglucosaminreste werden Galaktose Moleküle angeheftet und an diese terminale N-Acetylneuraminsäuren (Brooks, 2006). N-Glykane des EPO-Proteins liegen als bi-, tri- und tetraantennäre Strukturen vor, weshalb das Glykosylierungsmuster von EPO variabel ist (Harazono *et al.*, 2013). Der Nachweis von mehreren EPO-spezifischen Banden kann daher auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster zurückzuführen sein. So wurde im Rahmen dieser Studie untersucht, ob in murinen Gewebeproben der embryonalen SVZ und Hippocampus sowie der adulten SVZ unterschiedlich glykosylierte EPO- bzw. vEPO-Produkte mittels Massenspektrometrie identifiziert werden konnten. Als besonders geeignete Methode hat sich bei der Analyse intakter Glykoproteine die Kopplung einer Kapillarelektrophorese mit einem Massenspektrometer mittels Elektrospray Interface (CZE-ESI-MS) erwiesen. So werden die Glykoproteine zunächst mittels Kapillarelektrophorese nach ihrer Mobilität aufgetrennt, welche im Wesentlichen von der Ladung und Größe des Glykoproteins abhängt. Dies ist besonders hilfreich bei stark glykosylierten Proteinen wie EPO, da das Glykosylierungsmuster Einfluss auf die Größe hat und endständige Sialinsäurereste Einfluss auf die Ladung des Moleküls nehmen. Die direkte Applikation und Analyse stark glykosylierter Proteine mittels Massenspektrometrie würde in sehr unscharfen, nicht auswertbaren MS-Spektren resultieren. Daher stellt die vorherige Separation unterschiedlich stark glykosylierter EPO- bzw. vEPO-Proteine eine gute Methode dar, um saubere MS-Spektren zu erhalten, welche Aussagen über die Masse der einzelnen Produkte erlauben. Anhand der gewonnenen MS-Spektren können Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz und Glykanmodifizierungen gezogen werden (Neususs *et al.*, 2005; Balaguer *et al.*, 2006). Jedoch ist es nicht gelungen, EPO bzw. vEPO-Proteine in murinen Gewebeproben mittels CZE-ESI-MS näher zu charakterisieren, da die vorausgehende notwendige Aufreinigung von Proteinisolaten (Isolation und Aufreinigung eines 25 kDa Protein-Produkts nach SDS-PAGE-Separation und Coomassie-Färbung) nicht in der gewünschten Reinheit und ausreichend analysierbaren Protein-Mengen resultierte. Es konnten mittels CZE-ESI-MS keine sauberen MS-Spektren erhalten werden, welche eine eindeutige Identifizierung und Charakterisierung von EPO- bzw. vEPO ermöglichten. Aus diesem Grund sollten zusätzliche Aufreinigungsstrategien herangezogen werden, wie beispielsweise chromatographische Methoden wie die *fast protein liquid chromatography* (FPLC). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Western-Blot-Analyse keine Aussage hinsichtlich der Unterscheidung zwischen murinem Wildtyp-EPO und EPO-Isoformen (vEPO) getroffen werden kann. So wäre auch die Entwicklung von Antikörpern, welche spezifisch zwischen Wildtyp-EPO und seiner endogen exprimierten

Isoformen mS unterscheiden, eine potentielle Herangehensweise um ein Expressionsprofil von vEPO in murinen Geweben zu erstellen.

4.2 Einfluss von rekombinantem EPO und vEPO auf *ex vivo* kultivierte NSCs/NPCs

Da EPO als potenter Modulator der Neurogenese fungiert und die Differenzierung und das Wachstum von NSCs/NPCs in Kultur fördert (Shingo *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006b; Chen *et al.*, 2007), wurde in dieser Arbeit analysiert, ob rekombinantes vEPO ebenso Einfluss auf *ex vivo* kultivierte NSCs/NPCs nimmt. So wurde zunächst untersucht, ob Einzelzellsuspensionen von NSCs/NPCs eine erhöhte Überlebensrate in Kultur aufweisen, wenn sie in Gegenwart von rekombinantem hEPO, hS3, mEPO oder mS, jedoch in Abwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und FGF inkubiert werden. Dabei stellte sich heraus, dass in Gegenwart von rekombinantem hEPO und der murinen Isoform mS eine signifikant erhöhte Vitalzellzahl im Vergleich zur PBS-Kontrolle festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 13A). Wurden die Zellen für 7 Tage in Gegenwart von rekombinanten Proteinen und EGF und FGF inkubiert, konnte kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl gebildeter Neurosphären festgestellt werden (siehe Abbildung 13B). Dies stimmt mit einer Studie überein, deren Ergebnis zeigte, dass rekombinantes EPO in ähnlicher Weise wie der Wachstumsfaktor FGF die Proliferation von NSCs/NPCs in Kultur stimuliert, dass jedoch die Kombination von rekombinantem EPO mit FGF nicht zu einer Verdopplung der Proliferationsraten führt (Chen *et al.*, 2007). Das Experiment zur Untersuchung des Einflusses von rekombinantem hEPO, mEPO, hS3 und mS auf das Proliferationsverhalten *ex vivo* kultivierter NSCs/NPCs wurde dennoch dahingehend geplant, den synergetischen Effekt mit EGF und FGF zu untersuchen. Für das EPO-Derivat CEPO konnte bereits gezeigt werden, dass dieses in Gegenwart von FGF und EGF die Anzahl und Größe an gebildeten Neurosphären im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Wang *et al.*, 2007a). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnene Datenlage hinsichtlich der protektiven Wirkung von rhEPO und rmS auf *ex vivo* kultivierte NSCs/NPCs spricht daher eher für einen anti-apoptischen Effekt und keinen die Proliferation von NSCs/NPCs stimulierenden Mechanismus. Von besonderem Interesse war es zu untersuchen, ob rekombinantes EPO oder vEPO das Differenzierungsverhalten von NSCs/NPCs hinsichtlich einer bevorzugten Differenzierung zum neuronalen oder glialen Phänotyp stimulieren. Es zeigte sich, dass *ex vivo* kultivierte NSCs/NPCs nach Inkubation mit rekombinantem EPO bzw. vEPO keine bevorzugte Differenzierung zum neuronalen oder glialen Phänotyp aufwiesen (siehe Abbildung 14). Die gewonnenen Erkenntnisse einer Wirkung von rekombinantem hEPO auf das Differenzierungsverhalten von NSCs/NPCs in diesem Versuchsvorhaben stehen im Widerspruch zu mehreren Studien, welche nachweisen konnten, dass NSCs/NPCs nach Behandlung mit rekombinantem EPO bevorzugt zu Neuronen ausdifferenzieren (Shingo *et*

al., 2001; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006b). Hierbei sollte beachtet werden, dass sich das experimentelle Design für die Untersuchung des Differenzierungsverhaltens von NSCs/NPCs in Gegenwart von rhEPO in diesem Versuchsvorhaben deutlich von den oben genannten Studien unterschied. So wurde in dieser Arbeit der Effekt von rekombinanten Proteinen in vollständiger Abwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und FGF durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurde beispielsweise in der Studie von Shingo *et al.*, NSCs/NPCs nach sechstägiger Inkubation in Gegenwart von EGF für 6 Stunden bzw. 24 Stunden in Gegenwart von rekombinatem EPO inkubiert. Im Anschluss an die kurzzeitige Inkubation mit EPO wurden die Zellen für weitere 7 Tage in Gegenwart von EGF inkubiert und erst im Anschluss an diese siebentägige Inkubation das Differenzierungsverhalten der Zellen unter adhären den Bedingungen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass auf diese Weise kultivierte Neurosphären vermehrt zu Neuronen ausdifferenzieren (Shingo *et al.*, 2001). Somit stellt sich die Frage, ob in der vorliegenden Arbeit nicht vornehmlich ein Überlebenseffekt von NSCs/NPCs unter adhären den Bedingungen aufgrund der Abwesenheit von Wachstumsfaktoren, anstelle eines Effekts auf ein bevorzugtes Differenzierungsverhalten, untersucht wurde. Diese Hypothese ist nicht abwegig, da nach Inkubation von NSCs/NPCs mit rekombinatem hEPO, hS3, mEPO und mS eine Tendenz zur vermehrten Bildung sowohl von Neuroblasten als auch Astrozyten im Vergleich zur Kontrolle ausgemacht werden konnte (siehe Abbildung 14). Um diese These zu überprüfen, wäre es insbesondere hier sinnvoll gewesen, die Anzahl an apoptotischen Zellen mittels TUNEL-Assay zu erfassen, um die bereits durch den Überlebens-Assay gewonnene Aussage, dass rekombinantes hEPO und mS das Überleben *ex vivo* kultivierter NSCs/NPCs fördern, zu verifizieren. Übereinstimmend mit vorausgehenden Studien (Wang *et al.*, 2006b; Wang *et al.*, 2007a) konnte allerdings in der vorliegenden Arbeit eindeutig nachgewiesen werden, dass rekombinantes hEPO den Reifungsprozess von Neuroblasten unterstützt. Über eine Quantifizierung der Zellfortsätze DCX-exprimierender Zellen konnte ebenso für rekombinantes hS3, mEPO als auch mS gezeigt werden, dass alle eingesetzten rekombinanten Proteine den Reifungsprozess von Neuroblasten im Vergleich zur Kontrolle unterstützen (siehe Abbildung 15). Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass sowohl EPO als auch vEPO als trophische Faktoren wirken und so Einfluss auf den Differenzierungsprozess von liniendeterminierten Zellen nehmen. Zusammenfassend kann für die durchgeführte *in vitro* Studie die Aussage getroffen werden, dass alle rekombinanten Proteine einen deutlichen Effekt hinsichtlich einer wachstumsfördernden Wirkung auf Neuroblasten vermitteln und insbesondere rekombinantes hEPO und mS das Überleben von NSCs/NPCs in Kultur fördern.

4.3 Stabile Transgenexpression nach ICV von hEPO/vEPO-kodierenden lentiviralen Partikeln im ZNS von Wildtyp-Mäusen

Für die Analyse der Wirkung von vEPO und hEPO auf die murine Neurogenese *in vivo*, wurde ein gentherapeutischer Ansatz basierend auf einem lentiviralen Vektorkonstrukt gewählt. Dazu wurden lentivirale Partikel, welche für vEPO bzw. hEPO kodierten, einseitig in den lateralen Ventrikel von WT-Mäusen injiziert und der Effekt der Transgenexpression auf die Neurogenese evaluiert. Im Vergleich zu der konventionellen intravenösen Verabreichung von rekombinantem EPO bietet ein gentherapeutischer Ansatz im ZNS mit viralen Vektoren zwei Vorteile. Durch die intraventrikuläre Applikation von hEPO/vEPO-kodierenden lentiviralen Partikeln wird zum einen die Blut-Hirn-Schranke umgangen, zum anderen ermöglicht die stabile Expression des Transgens weiterhin dauerhaft therapeutische Level an vEPO bzw. hEPO im ZNS zu erzielen. In dieser Arbeit wurden lentivirale Vektoren verwendet, da sie gegenüber anderen viralen Vektorsystemen (Adenoviren, Adeno-assoziierte-Viren (AVV)) Vorteile bieten (Lundberg *et al.*, 2008; Segura *et al.*, 2008; Terzi und Zachariou, 2008). Die Problematik in der klinischen Anwendung von Adenoviren liegt beispielsweise darin begründet, dass eine starke Immunreaktion gegen das virale Kapsid zu einer Zerstörung transduzierter Zellen und damit zu einer deutlichen Abnahme der Transgenexpression führt (Thomas *et al.*, 2001). Insbesondere lentivirale und adeno-assoziierte Vektorsysteme haben sich für den gentherapeutischen Einsatz innerhalb des ZNS bewährt, da beide Systeme in der Lage sind, sich nicht-teilende oder langsam teilende Zellen zu transduzieren und stabile Langzeitexpressionen hervorrufen (Kantor *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu Lentiviren integrieren Adeno-assoziierte-Viren einen Großteil ihrer viralen DNA nicht in das Wirtsgenom, sondern sie liegt in episomaler Form vor (Lentz *et al.*, 2012). Ein großer Vorteil in der Verwendung von Adeno-assoziierten-Viren für den klinischen Einsatz liegt daher darin begründet, dass aufgrund episomal vorliegender viraler DNA die Gefahr für eine Insertionsmutagenese minimiert ist (Heilbronn und Weger, 2010). Für lentivirale Vektorsysteme ist beschrieben, dass es bei Integration in kodierende Bereiche des Wirtsgenoms zu Insertionsmutagenesen und im Fall von Proto-Onkogenen zu einer malignen Entartung der Zielzelle kommen kann. Das Risiko der transkriptionellen Aktivierung von Proto-Onkogenen mittels lentiviraler Vektorsysteme wurde jedoch durch die Entwicklung selbstinaktivierender viraler Partikel (SIN) und durch den Einsatz von Isolatoren minimiert (Modlich und Baum, 2009; Montini *et al.*, 2009). Ein Nachteil in der Verwendung von Adeno-assoziierten-Viren liegt darin begründet, dass sie mit ca. 4,7 kb ein kleines Vektorgenom aufweisen und somit in der Größe des Transgens beschränkt sind (Lentz *et al.*, 2012). Weiterhin weist bereits ein Großteil der Bevölkerung eine bestehende Immunität gegen eine Vielzahl von AVV-Serotypen (hauptsächlich Serotyp 2) auf, was die klinische Einsetzbarkeit ebenfalls erschwert. Insbesondere gegen das virale Kapsid gerichtete

neutralisierende Antikörper können eine Langzeitexpression des Transgens verhindern (Halbert *et al.*, 2006). Aufgrund der beschriebenen Nachteile von Adeno-assoziierten-Vektorsystemen kam in dieser Arbeit ein lentivirales Vektorsystem zum Einsatz. Es wurde das lentivirale Vektorkonstrukt pCL20c-MSCV verwendet, welches aufgrund der Pseudotypisierung mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) ein extrem breites Wirtsspektrum aufweist (Hanawa *et al.*, 2002; Hanawa *et al.*, 2004). Das breite Wirtsspektrum von VSV-G pseudotypisierten viralen Partikeln liegt darin begründet, dass sie an den auf nahezu allen tierischen Zellen vorkommenden LDL-Rezeptor (*low density lipoprotein*) binden und so eine Großzahl an Zellen transduzieren können (Finkelshtein *et al.*, 2013; Kantor *et al.*, 2014). Zunächst wurde in dieser Arbeit ein Etablierungsexperiment mit *ex vivo* kultivierten NSCs/NPCs durchgeführt, um zu überprüfen, ob lentivirale Partikel diese Zellen effizient transduzieren und sich somit für einen späteren *in vivo* Einsatz eignen. Es konnte für alle Transgene eindeutig nachgewiesen werden, dass transduzierte NSCs/NPCs in der Lage sind, GFP, hEPO, hS3 und mS zu exprimieren (siehe Abbildung 16). Für die Beurteilung einer Wirkung von stabil exprimierten hEPO, hS3 und mS auf Zellen der SVZ *in vivo* wurden lentivirale Partikel in die lateralen Ventrikel von Wildtyp-Mäusen injiziert. 3 Tage und 30 Tage nach Injektion wurden die Gehirne der Tiere entnommen und eine Analyse der Transgenexpression vorgenommen. So konnte sowohl 3 Tage und 30 Tage nach Injektion von pCL20c-MSCV-GFP eine deutliche GFP-Expression in ependymalen Zellen des lateralen Ventrikels nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17B+C). Ebenso konnte ein Nachweis der Expression des hEPO-Proteins in dem den lateralen Ventrikel umgebenden striatalen Gewebe mittels ELISA erbracht werden (siehe Abbildung 17D). Dabei konnte eine erhöhte hEPO-Proteinexpression 30 Tage nach ICV im Vergleich zur hEPO-Proteinexpression 3 Tage nach ICV nachgewiesen werden. Der Nachweis einer GFP-Expression in ependymalen Zellen der lateralen Ventrikel führt zu der Vermutung, dass intraventrikulär injizierte virale Partikel nicht weit in das ZNS-Parenchym diffundieren und nur Zellen des Ependyms transduzieren. So wird die Wirkung von hEPO, hS3 und mS höchstwahrscheinlich dadurch vermittelt, dass ependymale Zellen der lateralen Ventrikel die Transgene exprimieren und exprimiertes hEPO bzw. vEPO direkt auf neuronale Stamm- und Vorläuferzellen der SVZ wirken. Dies ist übereinstimmend mit einer Studie, welche nach einer intraventrikulären Injektion VSV-G pseudotypisierter lentiviraler Partikel vornehmlich eine Transgenexpression in ependymalen Zellen der lateralen Ventrikel adulter Mäuse 2 Wochen, 3 Monate und 6 Monate nach Injektion nachweisen konnte (Consiglio *et al.*, 2004). Hervorzuheben ist weiterhin, dass die stabile Expression von hEPO im ZNS von Wildtyp-Mäusen nicht zu einer Erhöhung der Hämatokritwerte weder 3 Tage noch 30 Tage nach ICV lentiviraler hEPO-kodierender lentiviraler Partikel führte (siehe Abbildung 18). Dies lässt darauf schließen, dass die angewandte Injektionsstrategie ausschließlich eine

Expression von hEPO im ZNS vermittelte und exprimiertes hEPO nicht die Blut-Hirn-Schranke passierte und daher keine Wirkung auf die Erythropoese vermitteln konnte. Somit würde sich humanes EPO für einen gentherapeutischen Einsatz im ZNS eignen, da das Risiko für Hämatokrit-assoziierte Nebenwirkung im Vergleich zur peripheren Gabe von rekombinantem EPO deutlich reduziert ist. Auch für die mit den EPO-Isoformen hS3 und mS behandelten Tiere wurde nach lentiviraler Injektion der Hämatokritwert bestimmt. Die Hämatokritwerte aller Gruppen bewegten sich auf dem Niveau unbehandelter Tiere (siehe Abbildung 18).

4.4 Einfluss von lentiviral exprimiertem EPO und vEPO auf Zellen der SVZ *in vivo*

Die Evaluierung der Wirkung von rekombinantem hEPO, hS3 und mS auf *ex vivo* kultivierte NSCs/NPCs zeigte, dass alle Faktoren einen wachstumsfördernden Effekt auf Neuroblasten vermittelten und das hEPO und mS zu einem erhöhten Überleben dieser Zellen in Kultur beitrugen. Es ist jedoch von besonderem Interesse unter physiologischen Bedingungen die synergetische Wirkung aller Komponenten der neurogenen Nischen mit hEPO, hS3 oder mS *in vivo* zu untersuchen, um so ein realistisches Bild hinsichtlich der Wirkung auf die adulte murine Neurogenese zu erhalten. Zwei *in vivo* Studien haben den Einfluss von intraventrikulär verabreichtem rekombinantem EPO auf die murine Neurogenese der SVZ untersucht (Shingo *et al.*, 2001; Kadota *et al.*, 2009). So konnten Shingo *et al.* (2001) zeigen, dass Wildtyp-Mäuse, welche über ein Minipumpensystem an sechs aufeinanderfolgenden Tagen täglich 25 IU an rekombinantem EPO erhielten, im Vergleich zu unbehandelten Mäusen in der SVZ eine reduzierte Anzahl an BrdU-positiven Zellen aufwiesen. Im RMS konnte hingegen eine verstärkte Zellproliferation nachgewiesen werden. Dies führte schlussendlich zu einer vermehrten Bildung von Interneuronen im Bulbus olfactorius. Dieser Effekt wurde begleitet von einer Zunahme der Anzahl an Typ-C-Vorläuferzellen und einer Abnahme der Anzahl neuronaler Stammzellen (Typ-B-Zellen) der SVZ. Die Autoren vermuteten daher, dass eine intraventrikuläre Verabreichung von rekombinantem EPO die Migration von Neuroblasten sowie ihre Reifung zu Interneuronen im Bulbus olfactorius fördert (Shingo *et al.*, 2001). Unter pathologischen Bedingungen im Mausmodell der Parkinson-Krankheit stellte sich heraus, dass die tägliche intraventrikuläre Gabe von 100 IU an rekombinantem EPO mittels Minipumpensystem über einen Zeitraum von 7 Tagen zu einer verstärkten Bildung von Neuroblasten in der SVZ führte (Kadota *et al.*, 2009). Diese Studien zeigen auf, dass rekombinantes EPO Einfluss auf neuronale Stamm- und Vorläuferzellen nimmt, wenn es direkt an den Ort der Neurogenese injiziert wird. In diesem Versuchsvorhaben wurde untersucht, ob in Zellen der lateralen Ventrikel stabil exprimiertes hEPO und vEPO Einfluss auf Prozesse der Neurogenese innerhalb der SVZ nehmen. Daraus ableitend sollte die Frage beantwortet werden, ob vEPO

(hS3 und mS) im Vergleich zu hEPO ebenso als potente Modulatoren der Neurogenese fungierten. Der Einfluss von lentiviralen exprimierenden hEPO und vEPO auf zelluläre Prozesse der SVZ wurde zum einen 3 Tage nach ICV als auch 30 Tage nach ICV untersucht. Aufgrund der angewandten BrdU-Injektionsstrategie konnte zum einen der Kurzzeiteffekt von hEPO, hS3 und mS auf sich häufig teilende Typ-C-Zellen der SVZ 3 Tage nach ICV untersucht werden. Weiterhin konnte der Langzeiteffekt einer Wirkung von hEPO, hS3 und mS auf sich selten teilende neuronale Stammzellen (Typ-B-Zellen) der SVZ 30 Tage nach ICV näher beleuchtet werden. So zeigte sich, dass 3 Tage nach intraventrikulärer Injektion lentiviraler Partikel die Anzahl an DCX-exprimierenden Neuroblasten der SVZ in Tieren deutlich erhöht war, welche zuvor mit mS-kodierenden lentiviralen Partikeln behandelt wurden (siehe Abbildung 19). Die Anzahl an Neuroblasten der SVZ bewegte sich für Tiere, welche hEPO oder hS3 in Zellen der lateralen Ventrikel exprimierten, auf dem basalen Niveau beider Kontrollen. Die Wirkung von hEPO, hS3 und mS auf mitotisch aktive Zellen der SVZ zeigte, dass 3 Tage nach Injektion alle drei Behandlungsgruppen eine erhöhte Anzahl an BrdU-positiven Zellen in der SVZ aufwiesen (siehe Abbildung 20). Die nachgewiesenen Effekte sind nicht auf die Prozedur der OP oder der Transduktion von Zellen mit lentiviralen Partikeln zurückzuführen, da die intraventrikuläre Injektion von GFP-kodierenden lentiviralen Partikeln zu keiner erhöhten Anzahl an DCX-exprimierenden oder BrdU-positiven Zellen der SVZ im Vergleich zur sham-Kontrolle führte. Insbesondere die nachgewiesenen Effekte nach Behandlung mit mS-kodierenden lentiviralen Partikeln legten den Verdacht nahe, dass eine erhöhte Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen der SVZ auf eine erhöhte Anzahl an BrdU-positiven Zellen zurückzuführen ist. Überraschenderweise bestätigte die Quantifizierung des prozentualen Anteils an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen der SVZ diese Annahme nicht (siehe Abbildung 21). Der prozentuale Anteil DCX-BrdU-doppelpositiver Zellen lag für LV-mS behandelte Tiere im Mittel bei 24 %. Es konnte kein signifikanter Unterschied zu beiden Kontrollgruppen festgestellt werden. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass der restliche Anteil an 76 % BrdU-positiven Zellen der SVZ von LV-mS behandelten Tieren auf eine verstärkte Proliferation von Typ-B- und Typ-C-Zellen zurückzuführen sein kann. Es stellt sich die Frage, wie es zu einer vermehrten Bildung von DCX-exprimierenden Zellen 3 Tage nach ICV mS-kodierender lentiviraler Partikel kommen kann, ohne dass vermehrt DCX-exprimierende Zellen (Typ-A-Zellen) BrdU inkorporieren. In diesem Zusammenhang sollten nochmal die bereits im Ergebnisteil erwähnten Zellzykluszeiten und die Häufigkeit an Zellteilungsereignissen von Zellen der SVZ Erwähnung finden. So ist bekannt, dass eine mitotisch aktive B-Zelle sich innerhalb von 17-18 h nach ihrer Aktivierung durch asymmetrische Teilung in eine Typ-C-Vorläuferzelle sowie in eine mitotisch ruhende B-Zelle teilt. Typ-C-Vorläuferzellen der SVZ teilen sich dreimal symmetrisch mit jeweils einer

Zellzykluszeit von 18-25 h. Nach der dreimaligen Teilung differenzieren Typ-C-Vorläuferzellen zu DCX-exprimierenden Neuroblasten (Typ-A-Zellen), welche sich ebenfalls noch ein- bis zweimal mit einer Zellzyklusrate von 17-40 h teilen, bevor sie über den RMS zum Bulbus olfactorius wandern (Ponti *et al.*, 2013; Lim und Alvarez-Buylla, 2014). Hieraus wird ersichtlich, dass der Schritt der Liniendeterminierung von Typ-C-Zellen zu DCX-exprimierenden Neuroblasten der SVZ nicht mit einem weiteren Zellteilungsschritt verbunden ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine lentiviral vermittelte Expression von mS in Zellen der SVZ zu einer verstärkten Liniendeterminierung von multipotenten Typ-C-Zellen zu Neuroblasten führt. Die Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit LV-hEPO oder LV-hS3 resultierte nicht in einer erhöhten Anzahl an DCX-exprimierenden Neuroblasten der SVZ (siehe Abbildung 19). In diesem Zusammenhang ist es jedoch interessant zu erwähnen, dass 3 Tage nach ICV von hEPO-kodierenden lentiviralen Partikeln ein erhöhter prozentualer Anteil an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen der SVZ nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 21). Hier liegt die Vermutung nahe, dass hEPO Einfluss auf die Teilung von Neuroblasten nimmt und damit vermutlich den Prozess der Migration zum Bulbus olfactorius beschleunigt. Diese Hypothese wäre auch übereinstimmend mit der Shingo *et al.* Studie (2001), in welcher beschrieben wird, dass intraventrikulär verabreichtes rekombinantes EPO zu einer erhöhten Anzahl an migrierenden Zellen im RMS erhöht und weiterhin die Differenzierung zu Interneuronen im Bulbus olfactorius unterstützt (Shingo *et al.*, 2001). Allerdings wird in der benannten Studie beschrieben, dass die Behandlung mit rekombinantem EPO zu einer erniedrigten Anzahl an BrdU-positiven Zellen der SVZ führt, was bei genauerer Betrachtung auf eine reduzierte Anzahl an Stammzellen zurückgeführt wurde. Die Anzahl an neuronalen Typ-C-Vorläuferzellen in der Shingo *et al.* Studie war hingegen erhöht. In der vorliegenden Arbeit konnte 3 Tage nach Injektion hEPO-kodierender lentiviraler Partikel eine erhöhte Anzahl an BrdU-positiven Zellen in der SVZ nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz in der Totalanzahl an BrdU-positiven Zellen im Vergleich zur Shingo *et al.* Studie ist auf verschiedene BrdU-Applikationsstrategien zurückzuführen. In der Studie von Shingo *et al.* erhielten die Tiere fünf Injektionen von BrdU (120 mg/kg) in einem Abstand von 2 h und wurden 0,5 h nach der letzten BrdU-Injektion getötet. In der vorliegenden Arbeit erhielten die Tiere jedoch sechs Injektionen an BrdU (50 mg/kg) im 12-Stunden-Rhythmus. Das heißt in der Shingo *et al.* Studie wurde ein Zeitraum von 10 h beleuchtet, in dem Zellen BrdU während der S-Phase inkorporieren können. Die Bioverfügbarkeit von systemisch verabreichten BrdU beträgt im ZNS-Parenchym 2 h (Hayes und Nowakowski, 2000; Cameron und McKay, 2001). Eine Publikation aus dem Jahr 2013, welche die Zellzykluslängen und S-Phasenlängen von aktivierten B-Zellen, Typ-C-Zellen sowie Typ-A-Zellen der SVZ näher betrachtet hat, konnte nachfolgend beschriebene Zeiten festlegen. So befinden sich B-Zellen für 17 – 18 h im Zellzyklus und haben eine

überraschend kurze S-Phasenlänge von 4 h. Typ-C-Zellen durchlaufen den Zellzyklus innerhalb von 18 – 25 h mit einer sehr langen S-Phasenlänge von 14 – 17 h. DCX-exprimierende Neuroblasten der SVZ durchlaufen den Zellzyklus innerhalb von 17 - 40 h mit einer S-Phasenlänge von 9 h (Ponti *et al.*, 2013). Daraus ergibt sich für die Shingo *et al.* Studie, dass statistisch gesehen aufgrund der langen Zellzykluslängen von B-Zellen mit ihrer kurzen S-Phase sowie ihrer sehr geringen Teilungsrate vornehmlich sich häufig teilende C-Zellen mit langen S-Phasen und ihre Nachkommen markiert wurden. Diese Annahme trifft auch für die in dieser Arbeit angewandte BrdU-Injektionsstrategie zu, wobei der BrdU-Puls in deutlich größeren Zeitabständen erfolgte und in einer geringeren Konzentration mit 50 mg/kg verabreicht wurde. Daraus ergibt sich ein anderes BrdU-Markierungsprofil, weshalb die Ergebnisse der benannten Studie auch nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen werden sollten. Für die vorliegende Arbeit kann die Aussage getroffen werden, dass aufgrund des mittleren prozentualen Anteils von $24,4 \pm 2,2$ % (Mittelwert \pm SEM) an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen 3 Tage nach ICV hEPO/vEPO-kodierender lentiviraler Partikel der restliche Anteil von ca. 75 % BrdU-positiver Zellen auf proliferierende Typ-B- oder -C-Zellen der SVZ zurückzuführen sein kann. Weiterhin befinden sich neben Typ-B-, -C- und -A-Zellen ebenso Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPCs) in der SVZ, welche allerdings in sehr geringen Mengen vorliegen und sich zudem nur selten teilen (99,5 % aller Zellen in der SVZ sind negativ für den Oligodendrozyten-Vorläufermarker *neuron-glia antigen 2* (NG2)) (Menn *et al.*, 2006; Komitova *et al.*, 2009). Ebenso finden sich Mikrogliazellen in der SVZ (Ekdahl *et al.*, 2009). Unter physiologischen Bedingungen sind die Teilungsraten von Mikrogliazellen jedoch gering (Lawson *et al.*, 1992). Obwohl die Quantifizierung an BrdU-positiven Zellen ausschließlich auf die laterale Zellwand der SVZ beschränkt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein geringer Anteil an BrdU-positiven Zellen auf OPCs und Mikrogliazellen zurückzuführen ist. Der Hauptanteil BrdU-positiver Zellen 3 Tage nach ICV kann jedoch Typ-B- und Typ-C-Zellen zugeschrieben werden. Zusammenfassend führt sowohl lentiviral exprimiertes hEPO, hS3 als auch mS 3 Tage nach ICV dazu, dass verstärkt neuronale Stamm- und Vorläuferzellen (Typ-B- und -C-Zellen) der SVZ 3 Tage proliferieren. Folgerichtig müsste dementsprechend 30 Tage nach ICV hEPO/vEPO-kodierender lentiviraler Partikel eine verstärkte Bildung an Neuroblasten nachweisbar sein. Hier ergab sich für die Anzahl an DCX-positiven Zellen der SVZ jedoch ein ähnliches Bild wie 3 Tage nach ICV. Die Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen der SVZ war ausschließlich für LV-mS behandelte Tiere gegenüber der sham-Kontrolle signifikant erhöht (siehe Abbildung 22). Keine signifikant erhöhte Anzahl DCX-exprimierender Zellen der SVZ konnte gegenüber der GFP-Kontrolle erbracht werden. Da jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl an DCX-exprimierenden Zellen der SVZ zwischen der sham-Kontrolle und der

GFP-Kontrolle ausgemacht werden konnte, ist der Effekt der Injektion und der Transduktion von Zellen der SVZ mit lentiviralen Partikeln in diesem Fall zu vernachlässigen. Somit muss auch hier davon ausgegangen werden, dass der Langzeiteffekt von mS darauf beruht, die Liniendeterminierung von Typ-C-Vorläuferzellen zu Neuroblasten zu stimulieren. Die vermehrte Anzahl an proliferierenden Typ-B-Zellen und Typ-C-Zellen 30 Tage nach ICV mündete für lentiviral exprimiertes hS3 und hEPO nicht in einer vermehrten Anzahl an DCX-exprimierenden Neuroblasten der SVZ. In der SVZ gebildete DCX-exprimierende Neuroblasten migrieren entlang des RMS zum Bulbus olfactorius, wo sie innerhalb von 15 bis 30 Tagen nach ihrer Bildung aus einer neuronalen Stammzelle zu Interneuronen ausdifferenzieren (Petreanu und Alvarez-Buylla, 2002). Der Zeitraum für die Bildung von DCX-exprimierenden Neuroblasten aus einer Typ-B-Zelle beträgt 3,5 - 4 Tage (Ponti *et al.*, 2013). Daraus lässt sich schließen, dass eine kontinuierliche Expression von hEPO und hS3 möglicherweise zwar in einer verstärkten Proliferation neuronaler Vorläuferzellen resultierte, aber gleichzeitig auch die Migration neugebildeter Neuroblasten zum Bulbus olfactorius beschleunigt haben könnte. Im Vergleich dazu scheint die murine Isoform mS vorrangig die Liniendeterminierung zu Neuroblasten zu stimulieren. Aufgrund der angewandten BrdU-Applikationsstrategie zu Beginn des Experiments wurden 30 Tage nach ICV hauptsächlich BrdU-positive Stammzellen (Typ-B-Zellen) der SVZ quantifiziert. Stammzellen, die sich während eines BrdU-Pulses in der S-Phase des Zellzyklus befinden, geben das BrdU-Signal an Typ-C-Zellen oder Typ-B-Zellen weiter. Verbleibt eine BrdU-markierte Typ-B-Stammzelle in einem mitotisch ruhenden Zustand kann das BrdU-Signal über einen langen Zeitraum detektiert werden (Yadlapalli und Yamashita, 2013). Hinsichtlich der Quantifizierung an BrdU-positiven Zellen 30 Tage nach Injektion ergab sich, dass hEPO und mS eine Wirkung auf Stammzellen vermitteln, da die Anzahl BrdU-positiver Stammzellen 30 Tage nach Injektion für diese beiden Konditionen gegenüber der LV-GFP-Kontrolle und der sham-Kontrollen signifikant erhöht war (siehe Abbildung 23). Somit scheinen diese beiden Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf das Selbstregenerationspotenzial von neuronalen Stammzellen der SVZ zu nehmen. Weiterhin zeigte sich, dass im Mittel ein Anteil von über 90 % der quantifizierten BrdU-positiven Zellen für LV-hEPO und LV-hS3 behandelte Tiere auf mitotisch ruhende neuronale Stammzellen (Typ-B-Zellen) der SVZ zurückzuführen sein kann. Dieser Rückschluss basiert auf der Datenlage, dass ein Anteil von $5,8 \pm 2,0$ % für LV-hEPO behandelte Tiere und ein Anteil von $7,1 \pm 1,6$ % (Mittelwert \pm SEM) für LV-hS3 behandelte Tiere als DCX-BrdU-doppelpositive Zellen identifiziert werden konnte. Jedoch sollte auch hier in Betracht gezogen werden, dass ein kleiner Anteil auf OPCs und Mikroglia der SVZ zurückzuführen sein kann. DCX-BrdU-doppelpositive Zellen müssen demnach 30 Tage nach ICV entweder aus BrdU-markierten Typ-C-Vorläuferzellen oder aus mitotisch aktiven Neuroblasten hervorgegangen sein, welche noch nicht aus der SVZ

ausgewandert sind (siehe Abbildung 24). Für LV-mS behandelte Tiere ergab sich eine Erhöhung der Anzahl an BrdU-DCX-positiven Zellen auf $10,5 \pm 4,5$ % (Mittelwert \pm SEM), was jedoch kein statistisch signifikantes Niveau gegenüber beiden Kontrollen erreichte. Jedoch stützt dieses Ergebnis die These, dass es unter Einfluss von mS zu einer verstärkten Liniendeterminierung zu Neuroblasten kommt, jedoch diese Zellen im Vergleich zu hEPO und hS3 behandelten Zellen eine weniger starke Migrationsfähigkeit zum Bulbus olfactorius aufweisen. Um zum einen die Thesen einer verstärkten Selbstregeneration von Stammzellen der SVZ unter Einfluss von hEPO und mS zu prüfen, könnte eine Doppelmarkierung von proliferierenden Zellen der SVZ mit BrdU und dem Thymidinanalogon 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU) erfolgen. EdU baut sich ebenso wie BrdU anstelle des Nukleotids Thymidin während der S-Phase des Zellzyklus ein und kann im Gegensatz zu BrdU „click-chemisch“ nachgewiesen werden, was eine Doppelmarkierung von proliferierenden Zellen mit BrdU erlaubt (Salic und Mitchison, 2008). So könnten am Anfang des Experiments mehrere BrdU-Pulse erfolgen und kurz vor Ende des Experimentes (Tag 28) könnten mehrere Pulse mit 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU) in kurzen Zeitabständen (2 h) gesetzt werden. Aufgrund der Quantifizierung von BrdU-EdU-doppelpositiven Zellen der SVZ könnte näher beleuchtet werden, ob BrdU-positive Stammzellen (Typ-B-Zellen) der SVZ unter Einfluss von hEPO und mS eine erhöhte Selbstregeneration aufweisen. Zum anderen könnte über die Quantifizierung an EdU-positiven Zellen im RMS nachverfolgt werden, ob unter Einfluss von hEPO und hS3 verstärkt Vorläuferzellen proliferieren und diese einer verstärkten Migration entlang des RMS zum Bulbus olfactorius unterliegen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass unter Einfluss von hEPO und mS vermutlich vermehrt neuronale Stammzellen (Typ-B-Zellen) in den mitotisch aktiven Zustand übergehen und dadurch eine erhöhte Anzahl an mitotisch aktiven neuronalen Vorläuferzellen (Typ-C-Zellen) und mitotisch ruhenden Stammzellen (Typ-B-Zellen) hervorbringen. Für die EPO-Isoform hS3 konnte keine direkte Wirkung auf neuronale Stammzellen gezeigt werden, da sich die Anzahl an Zellen, welche BrdU inkorporiert haben, 30 Tage nach intraventrikulärer Injektion auf dem Niveau beider Kontrollen bewegte (siehe Abbildung 23). Somit vermittelt die humane EPO-Isoform hS3 vermutlich ein anderes Wirkspektrum auf neuronale Stamm- und Vorläuferzellen der SVZ im Vergleich zu hEPO und der murinen EPO-Isoform mS. Diese Annahme liegt darin begründet, dass hS3 ausschließlich die Proliferation von neuronalen Typ-C-Vorläuferzellen der SVZ stimuliert. Weiterhin führt die stabile Expression von hEPO und hS3 in Zellen der SVZ von Wildtyp-Mäusen vermutlich zu einer beschleunigten Migration von Neuroblasten entlang des RMS zum Bulbus olfactorius. Die murine EPO-Isoform mS führte zum einen zu einer verstärkten Liniendeterminierung von Typ-C-Zellen zu Neuroblasten und vermittelte weiterhin einen proliferativen Effekt auf neuronale Stamm- und Vorläuferzellen der SVZ. Um jedoch

diese getroffenen Aussagen zu verifizieren, sollten weitere Untersuchungen angeschlossen werden, welche zum einen die Migrationsgeschwindigkeit von Neuroblasten zum Bulbus olfactorius genauer beleuchten und weiterhin eine genaue Unterscheidung zwischen proliferierenden Typ-B-Zellen und Typ-C-Zellen der SVZ erlauben. Dies könnte beispielsweise durch eine Quantifizierung an ausdifferenzierten Neuronen im Bulbus olfactorius erfolgen. Weiterhin könnte zwischen Typ-B-Zellen und Typ-C-Zellen der SVZ mit spezifischen Oberflächenmarkern unterschieden werden. So exprimieren Typ-C-Zellen der SVZ den Marker Mash1, welcher auf Typ-B-Zellen nicht nachweisbar ist. Typ-B-Zellen der SVZ können von Typ-C-Zellen über die Expression von GFAP unterschieden werden (Doetsch *et al.*, 1999; Doetsch *et al.*, 2002; Parras *et al.*, 2004). Es stellt sich dennoch die Frage, wie es zu so einem breiten Wirkungsspektrum von EPO und vEPO auf Zellen der murinen SVZ kommt. Dies könnte bei den beiden Isoformen hS3 und mS daraus resultieren, dass sie aufgrund ihrer strukturellen Zusammensetzung eine deutlich verminderte Affinität zum konventionellen EPO-Rezeptor aufweisen (siehe Abbildung 3). Somit sind vermutlich alternative Rezeptoren in der Vermittlung der Wirkung von hS3 und mS involviert. So ist bekannt, dass carbamylisiertes EPO (CEPO) nicht in der Lage ist, an den herkömmlichen EPO-Rezeptor zu binden und somit seine neuroprotektiven und neurotrophen Eigenschaften über ein alternatives Rezeptorsystem vermittelt, welches sich aus einer Untereinheit des klassischen EPO-Rezeptors und einer Untereinheit der β -Kette der IL-3 Rezeptorfamilie zusammensetzt (Brines *et al.*, 2004). Die Vermutung liegt nahe, dass auch hS3 und mS über ein alternatives Rezeptorsystem binden und so ihre vielfältigen Effekte auf Zellen der SVZ vermitteln. Da nicht bekannt ist, um welches Rezeptorsystem es sich hierbei handelt, sollten nachfolgende Experimente eine nähere Charakterisierung möglicher Rezeptorsysteme miteinbeziehen. Die Kontrolle der Spezifizierung von Vorläuferzellen zu Neuronen sowie der Migration zum Bulbus olfactorius wird in den neurogenen Nischen über eine Kombination von extrazellulären Faktoren (Wachstumsfaktoren, Freisetzung von Neurotransmittern), intrazellulären Faktoren (epigenetische Genmodifikation, transkriptionelle Regulation) sowie Zell-Zellinteraktionen kontrolliert (Fuentealba *et al.*, 2012; Lim und Alvarez-Buylla, 2014). So wird beispielsweise die terminale Differenzierung von multipotenten Vorläuferzellen zu Neuroblasten über den Transkriptionsfaktor NeuroD1 reguliert (Boutin *et al.*, 2010). Für sich allein genommen handelt es sich bei NeuroD1 um einen relativ schwachen Aktivator der Transkription, da seine Aktivität in entscheidendem Maße von der Anwesenheit Promotor-assoziiierter Transkriptionsfaktoren (E-Proteinen) und den Koaktivatoren p300/CBF und PCAF abhängt (Ray *et al.*, 2014). So führt möglicherweise die Expression von mS in Zellen der SVZ dazu, dass spezifische Signaltransduktionswege ausgelöst werden, welche zu einer erhöhten Aktivität von NeuroD1 führen, was schlussendlich in einer erhöhten Anzahl an Neuroblasten in der SVZ resultiert. So ist auch bekannt, dass der

Sonic-Hedgehog-Signaltransduktionsweg in der Aufrechterhaltung des Stammzellpools und der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen der SVZ involviert ist (Balordi und Fishell, 2007). Für carbamylisiertes EPO (CEPO) ist beschrieben, dass dieses EPO-Derivat zu einer verstärkten Proliferation von *ex vivo* kultivierten NSCs/NPCs beiträgt. Dieser Effekt wird über eine Hochregulation von Sonic Hedgehog (Shh) und dem zugehörigen Rezeptor PTC vermittelt (Wang *et al.*, 2007a). Somit vermitteln möglicherweise ebenso hEPO, hS3 und mS über eine Aktivierung des Sonic-Hedgehog-Signaltransduktionswegs einen Effekt auf die Stamm- und Vorläuferpopulationen der SVZ. Die Regulation der Migration von Neuroblasten zum Bulbus olfactorius ist ein komplexer Vorgang, welcher über Zell-Zellinteraktion von Neuroblasten mit Zellfortsätzen von Astrozyten als auch durch Neuroblasten-Neuroblasten Interaktionen reguliert wird (Doetsch und Alvarez-Buylla, 1996; Peretto *et al.*, 1997; Lim und Alvarez-Buylla, 2014). Andererseits wurde beschrieben, dass im adulten Gehirn Slit-Proteine die Regulation der Migration verantworten, welche vom Septum und dem Plexus choroideus sekretiert werden (Wu *et al.*, 1999b). Somit ergibt sich auch hier eine Vielzahl von Ansatzpunkten, welche zu einer durch hEPO und hS3 vermittelten verstärkten Migration von Neuroblasten führen könnten. Insgesamt fungieren hS3 und mS im Vergleich zu hEPO ebenso als potente Modulatoren der Neurogenese, wobei sich die Wirkung auf Zellpopulationen der SVZ deutlich voneinander unterscheidet.

4.5 Der Gentransfer von LV-hEPO in das ZNS von R6/2 Mäusen führt zu einer weitreichenden Transgenexpression

Das derzeit am häufigsten verwendete Mausmodell für die Evaluierung potenzieller therapeutischer Behandlungsansätze der Huntington-Krankheit ist das transgene R6/2 Mausmodell. R6/2 Mäuse exprimieren ubiquitär Exon1 des humanen *HTT*-Gens mit 150 CAG-Wiederholungen, was zu einem schnell fortschreitenden Krankheitsverlauf führt, welcher begleitet wird von einer eingeschränkten hippocampalen Neurogenese und stark ausgeprägter Atrophie des Gehirns (Mangiarini *et al.*, 1996; Gil *et al.*, 2005; Ferrante, 2009). Obwohl in einer Vielzahl von präklinischen Studien mit R6/2 Mäusen vielversprechende therapeutische Ansätze nachgewiesen werden konnten, ist es bis heute noch nicht gelungen, diese auf klinische Studien zu übertragen (Schiefer *et al.*, 2002; Verbessem *et al.*, 2003; Stack *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Dies ist möglicherweise auf angewandte Behandlungsstrategien zurückzuführen, welche eher zur Symptomlinderung beitragen als tatsächlich Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu nehmen. Außerdem fehlen Daten, welche den Effekt einer Langzeit-Therapie deutlich herausstellen. Die Behandlung der Huntington-Krankheit beginnt in der Regel erst, nachdem die Patienten erste Symptome entwickelt haben, die den Lebensalltag erschweren. Nach Beginn der Symptome verläuft die Krankheit innerhalb von 15-20 Jahren tödlich. Deshalb ist es notwendig, eine den Krankheitsverlauf verlangsamende Langzeit-Therapie zu finden (Roos, 2010). Dabei stellt

das stabile Einbringen von therapeutisch wirksamen Genen in Zellen des ZNS beispielsweise mittels viraler Vektoren einen möglichen Therapieansatz dar, um Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu nehmen. So kann im Gegensatz zu einer systemischen Gabe von Therapeutika mittels Gentherapie eine stabile Langzeitexpression eines therapeutisch wirksamen Gens direkt am Ort des Pathomechanismus erfolgen und so möglicherweise den Krankheitsverlauf beeinflussen. So konnte in diesem Versuchsvorhaben gezeigt werden, dass der Gentransfer von hEPO mittels lentiviraler Vektoren in die lateralen Ventrikel von R6/2 Mäusen zu einer stabilen weitreichenden Expression des Transgens führte (siehe Abbildung 26 + 27). Bei der Verwendung einer ZNS-spezifischen Gentherapie mit hEPO, sollte jedoch immer in Betracht gezogen werden, dass die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke als auch die vaskuläre Zusammensetzung des ZNS unter pathologischen Bedingungen verändert sein kann. Daraus resultierend sollte insbesondere die Wirkung von viral exprimiertem hEPO auf die Erythropoese gut kontrolliert werden. So ist für das R6/2 Mausmodell beschrieben, dass eine verstärkte striatale Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke vorliegt (Drouin-Ouellet *et al.*, 2015). In dieser Arbeit resultierte die stabile Expression von lentiviral exprimiertem hEPO jedoch nicht in einer Erhöhung des Hämatokritwerts (siehe Abbildung 27D). Basierend auf dieser Datenlage kann daher ausgeschlossen werden, dass exprimiertes hEPO oder hEPO-kodierende lentivirale Partikel die Blut-Hirn-Schranke passiert haben und einen Effekt auf die Erythropoese vermittelten. Für die Evaluierung der therapeutischen Wirksamkeit von lentiviral exprimiertem hEPO im R6/2 Mausmodell wurde in dieser Arbeit die Verteilung lentiviraler Partikel im ZNS und die Expression des Transgens genauer untersucht. In diesem Zusammenhang war es besonders wichtig, die Verteilung von lentiviral exprimiertem hEPO im ZNS zu kennen, da ein möglicherweise nachgewiesener therapeutischer Effekt mit einer Expression von hEPO in bestimmten Hirnarealen in Verbindung gebracht werden kann. Dabei konnte eine weitreichende Verteilung lentiviraler Partikel sowie Transgenexpression innerhalb des ZNS von R6/2 Tieren nachgewiesen werden. So ist es gelungen, GFP- und hEPO-Transkripte im Cortex, SVZ+Striatum und Hippocampus 30 Tage nach Injektion nachzuweisen (siehe Abbildung 26A+B). Mittels ELISA konnte gezeigt werden, dass im Cortex, SVZ+Striatum und Hippocampus von R6/2 Tieren 30 Tage nach Injektion deutlich messbare Konzentrationen an lentiviral exprimiertem hEPO nachweisbar waren (Abbildung 26C). Auch hier lag zunächst die Vermutung nahe, dass ependymale Zellen des Ventrikelsystems, welches sich angrenzend zum Striatum und Hippocampus befindet, sowie cortikale Zellen des Injektionskanals hEPO exprimieren und dieses von dort in das ZNS-Parenchym diffundiert. Überraschenderweise ergaben sich jedoch Hinweise, dass Neuronen der hippocampalen Pyramidenzellschicht und des Gyrus dentatus hEPO exprimieren (siehe Abbildung 27B). Aus diesem Zusammenhang heraus stellt sich die Frage, wie Neuronen innerhalb des

Hippocampus nach intraventrikulärer Injektion lentiviraler Partikel transduziert werden können und eine hEPO-Expression induzieren. So ist für VSV-G pseudotypisierte lentivirale Vektoren beschrieben, dass sie einen hohen neuronalen Tropismus aufweisen (Yaguchi *et al.*, 2013). Dennoch müssen virale Partikel in das ZNS-Parenchym diffundieren, um Neuronen des Hippocampus zu transduzieren. Eine mögliche Erklärung ist, dass es durch die Injektion hochtitriger Virusmengen in beide lateralen Ventrikel der Mäuse zu einer weitreichenden Verteilung der Partikel durch die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) kam. Die Cerebrospinalflüssigkeit ist innerhalb des Gehirns in äußeren und inneren Liquorräumen zu finden. Der Superarachnoidalraum stellt den äußeren Liquorraum da, welcher sich zwischen den Hirnhäuten Pia mater und Arachnoidea befindet und mittels sogenannter Robinson-Virchow-Räume Kontakt zu den inneren Liquorräumen des Ventrikelsystems herstellt. Robinson-Virchow-Räume sind perivaskuläre Spalträume, welche entlang der Blutgefäße des ZNS-Parenchyms laufen (Kwee und Kwee, 2007; Iliff *et al.*, 2012). So ist es möglich, dass durch einen Transport viraler Partikel über das innere Liquorsystem diese in Virchow-Robinson-Räume gelangten und es so zu einer weitreichenden Verteilung innerhalb des ZNS kam. Möglicherweise ist noch ein zweiter Mechanismus involviert, welcher dazu führen könnte, dass hippocampale neuronale Zellen hEPO exprimieren. Eine Studie aus dem Jahr 2007 zeigte, dass pCL20c-MSCV VSV-G pseudotypisierte lentivirale Partikel nach intrastriatler Injektion bevorzugt Neuronen transduzieren und über einen retrograden als auch anterograden Transportmechanismus innerhalb der Zellen transportiert werden (Kitagawa *et al.*, 2007). Dies würde die mittels Immunhistochemie detektierbare Expression von hEPO im Zellkörper von Neuronen erklären (siehe Abbildung 27C). Neuronen des Hippocampus wurden vermutlich über ihre weit ins Parenchym reichenden Zellfortsätze transduziert und transportierten über einen axonalen retrograden Transport virale Partikel zum Zellkern. Der genaue Mechanismus, in welcher Weise lentivirale Partikel innerhalb des ZNS R6/2 Mausmodells diffundieren, wurde in dieser Arbeit nicht näher beleuchtet. Jedoch liegt die Vermutung nahe, dass parazelluläre Veränderungen im ZNS dieses Mausmodells die weitreichende Expression von hEPO-Transkripten und des hEPO-Proteins 30 Tage nach ICV ebenso begünstigen.

4.6 Beurteilung des therapeutischen Effekts einer lentiviral vermittelten Expression von hEPO im ZNS von R6/2 Mäusen

Bis heute hat sich noch keine Studie mit der therapeutischen Wirksamkeit von hEPO im R6/2 Mausmodell beschäftigt. Insbesondere die anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen, anti-oxidativen und die Neurogenese fördernden Eigenschaften von EPO machen das Zytokin für die Behandlung der Huntington-Krankheit interessant, in dessen Pathogenese zahlreiche Exzitotoxizität, Apoptose und oxidativen Stress auslösende Mechanismen involviert sind (Gil und Rego, 2008; Byts und Siren, 2009; Ross und Tabrizi, 2011). Für die

Beurteilung der Wirkung eines therapeutischen Agens ist es wichtig, dass die Anzahl an CAG-Wiederholungen innerhalb der R6/2 Mauskolonie relativ stabil ist. Unterschiedliche Längen an CAG-Wiederholungen können zu einer unterschiedlichen Ausprägung des Phänotyps führen. So konnte mittels Sequenzierung gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit verwendete R6/2 Kolonie eine durchschnittliche Anzahl von 136-156 CAG-Wiederholungen aufwies. Für Huntington-Patienten ist bekannt, dass die Anzahl an CAG-Wiederholungen mit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Krankheit positiv korreliert (Langbehn *et al.*, 2004; Losekoot *et al.*, 2013). Bei R6/2 Mäusen besteht jedoch eine andere Korrelation zwischen CAG-Repeat-Länge und Ausprägung des Phänotyps. Eine erhöhte Anzahl an CAG-Wiederholungen im R6/2 Mausmodell führt nicht zu einem erschweren und beschleunigten Krankheitsverlauf. Es verhält sich genau gegensätzlich. Jedoch ist dieses Phänomen erst für CAG-Wiederholungen von >210 beschrieben worden (Cummings *et al.*, 2012). Aus diesem Zusammenhang heraus kann für eine Anzahl von 136-156 CAG-Wiederholungen von einer stabilen R6/2 Kolonie hinsichtlich der Ausprägung des neurologischen Phänotyps ausgegangen werden. Ähnlich wie bei Huntington-Patienten weisen R6/2 Mäuse bis zum Auftreten erster Symptome ein normales Körpergewicht auf, welches jedoch mit fortschreitendem Alter der Tiere kontinuierlich sinkt (van der Burg *et al.*, 2008). So wiesen auch alle R6/2 Untersuchungsgruppen dieser Arbeit zu Beginn des Experiments in einem Alter von 8 Wochen ein normales Körpergewicht im Vergleich zu WT-Tieren auf (siehe Abbildung 28A). Über einen Zeitraum von 30 Tagen wurde im fünftägigen Abstand zu einer festgelegten Uhrzeit das Gewicht der Tiere kontrolliert. Hier zeigte sich, dass eine stabile Expression von hEPO im ZNS von R6/2 Mäusen nicht den kontinuierlichen Gewichtsverlust gegenüber WT-Mäusen abmildern konnte. Als Grund für den starken Gewichtsverlust in R6/2 Mäusen wird ein erhöhter Stoffwechsel vermutet (van der Burg *et al.*, 2008), auf den die hEPO Behandlung keinen Einfluss nahm. R6/2 Mäuse entwickeln erste motorische Auffälligkeiten in einem Alter von 3 Wochen. In diesem Alter zeigen die Tiere ein hyperaktives Bewegungsverhalten. Innerhalb von 5 Wochen kehrt sich das hyperaktive Verhalten der Tiere ins Gegenteil und die Tiere zeigen in einem Alter von 8 Wochen ein deutlich hypoaktives Bewegungsverhalten (Luesse *et al.*, 2001). So bestätigte sich eindeutig, dass alle R6/2 Gruppen dieses Experiments unabhängig von der Behandlung eine deutlich reduzierte Gesamtaktivität im Open-Field-Test bereits zu Beginn des Experiments zeigten (siehe Abbildung 28C). Die Ausprägung der Hypoaktivität erhöhte sich mit fortschreitendem Alter der Tiere in allen drei R6/2 Untersuchungsgruppen. Die Behandlung mit hEPO nahm keinen Einfluss auf das explorative Verhalten von R6/2 Mäusen im Vergleich zu allen Kontrollen. Ein ähnliches Bild ergab sich für die Erfassung der Koordinations- und Ausdauerfähigkeit der Tiere auf dem RotaRod. Auch hier zeigte sich, dass schon zu Beginn des Experiments alle drei R6/2 Gruppen

deutliche Defizite hinsichtlich der Fähigkeit, sich auf dem RotaRod zu halten im Vergleich zu WT-Tieren aufwiesen (siehe Abbildung 28B). Auch hier vermittelte die stabile Expression von hEPO keinerlei Effekt hinsichtlich einer Verbesserung der motorischen Koordinations- und Ausdauerfähigkeit von R6/2 Mäusen. Die eingeschränkte motorische Koordinationsfähigkeit von R6/2 Mäusen ist auf ein verändertes Gangbild, dyskinetische Bewegungsmuster sowie auf stereotypisches Putzverhalten der Hinterläufe zurückzuführen (Carter *et al.*, 1999; Luesse *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005). Zusammenfassend konnte die stabile Expression von hEPO im ZNS von R6/2 Mäusen keinen effizienten therapeutischen Effekt hinsichtlich einer Verbesserung motorischer Defizite erzielen. Ein Grund für die fehlende therapeutische Wirksamkeit ist vermutlich, dass die Injektion lentiviraler Partikel zu spät erfolgte. Wie bereits erwähnt, zeigen R6/2 Mäuse in einem Alter von 8 Wochen bereits ausgeprägte motorische Defizite. Um den Effekt von hEPO auf motorische Defizite im R6/2 Mausmodell zu studieren, wäre es somit nützlich, zu einem früheren Zeitpunkt eine Injektion von hEPO-kodierenden lentiviralen Partikeln vorzunehmen. Weiterhin besteht eine enge Korrelation zwischen der für das R6/2 Mausmodell beschriebenen ausgeprägten Atrophie des Gehirns mit motorischen Defiziten (Zhang *et al.*, 2010). So konnte in dieser Arbeit mittels zerebraler MRT-Aufnahmen und sich anschließender Volumetrie verschiedener Hirnareale deutlich gezeigt werden, dass eine hEPO-Behandlung keinen Einfluss auf die ausgeprägte fortschreitende Atrophie des Cortex und Striatums nahm und die hEPO Behandlung daher möglicherweise nicht zu einer Verbesserung der Motorik von R6/2 Mäusen beitrug (siehe Abbildung 30C+D und Abbildung 31A+B). Bereits in einem Alter von 3-4 Wochen zeigen R6/2 Mäuse eine ausgeprägte kognitive Leistungsminderung (Lione *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2000). Ein häufig angewandter kognitiver Test um die Gedächtnisleistung von Versuchstieren zu überprüfen ist das Morris Wasserlabyrinth. Dieser Test setzt allerdings voraus, dass die Versuchstiere möglichst wenige motorische Einschränkungen aufweisen (Vorhees und Williams, 2006). Für R6/2 Tiere ist bekannt, dass sie nur bis zu einem Alter von 7 Wochen in der Lage sind, diesen Test auszuführen. Ab einem Alter von 8 Wochen sind die motorischen Defizite zu stark ausgeprägt, als dass R6/2 Mäuse in der Lage wären, den Test in einer adäquaten Weise zu durchlaufen (Murphy *et al.*, 2000). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ein alternatives Testverfahren genutzt, welches das räumliche Arbeitsgedächtnis testet. So konnte mittels Y-Maze-Test gezeigt werden, dass die hEPO-Behandlung sowohl 15 Tage als auch 30 Tage nach intraventrikulärer Injektion die räumliche Gedächtnisleistung gegenüber GFP-behandelten Mäusen und unbehandelten R6/2 Mäusen signifikant verbesserte (siehe Abbildung 29A+B). Da es sich beim räumlichen Arbeitsgedächtnis um eine vom Hippocampus abhängige Gedächtnisleistung handelt (Kouzu *et al.*, 2000), lag der Fokus der anschließenden Untersuchungen darauf, den Einfluss von hEPO auf die hippocampale Atrophie sowie die eingeschränkte hippocampale Neurogenese von

R6/2 Mäusen näher zu untersuchen. So stellte sich bei der volumetrischen Vermessung des Hippocampus von hEPO-behandelten Tieren heraus, dass diese 15 Tage nach intraventrikulärer Injektion deutlich größere Hippocampi im Vergleich zu GFP-behandelten und unbehandelten R6/2 Mäusen aufwiesen (siehe Abbildung 30A+B). Insbesondere in klinischen Studien mit älteren Patientengruppen konnte gezeigt werden, dass der Hippocampus jährlich 1-2 % an Volumen verliert und eine hippocampale Atrophie schließlich in einem erhöhten Risiko für kognitive Leistungseinschränkungen mündet (Raz *et al.*, 2005; Jack *et al.*, 2010). Interessanterweise konnte eine kürzlich publizierte Studie zeigen, dass Patienten mit einer behandlungsresistenten Depression und Patienten mit einer bipolaren Störung nach Behandlung mit einer Hochdosistherapie an rekombinantem EPO eine Vergrößerung der CA1-3 Region/Subiculum des Hippocampus aufwiesen. Diese Vergrößerung korreliert mit einer Verbesserung der verbalen Gedächtnisleitung (Miskowiak *et al.*, 2014). Daher ist es auch für die vorliegende Arbeit durchaus gerechtfertigt, eine Korrelation zwischen einer abgemilderten Atrophie des Hippocampus und einer verbesserten räumlichen Gedächtnisleistung von hEPO-behandelten R6/2 Mäusen herzustellen. Für R6/2 Mäuse ist beschrieben, dass eine mit zunehmendem Alter auftretende kognitive Leistungsminderung mit einer Veränderung der synaptischen Plastizität des Hippocampus in der CA1-Region und des Gyrus dentatus einhergeht (Murphy *et al.*, 2000). Obwohl in der vorliegenden Arbeit nicht die synaptische Plastizität von Zellen im Hippocampus untersucht wurde, liegt die Vermutung nahe, dass hEPO-exprimierende Neuronen des Gyrus dentatus und der Pyramidenzellschicht des Hippocampus möglicherweise dazu beitragen, die neuronale Plastizität zu erhöhen, was wiederum in einem verbesserten räumlichen Arbeitsgedächtnis der Mäuse resultiert. Dies ist nicht abwegig, da bekannt ist, dass die neuronale Plastizität über einen PI3-Kinase und MAP-Kinase vermittelten Signaltransduktionsweg moduliert werden kann (Hayley und Litteljohn, 2013). Hierbei handelt es sich um klassische Signaltransduktionswege, welche durch Bindung von EPO an sein Rezeptorsystem induziert werden (Rossert und Eckardt, 2005). Eine weitere diese Hypothese unterstützende Studie wurde in einem Tiermodell der Alzheimer-Krankheit erbracht, wo gezeigt werden konnte, dass eine systemische Gabe von rekombinantem EPO zu einer verbesserten synaptischen Plastizität von Zellen des Hippocampus führte, was wiederum in einer deutlich messbaren Verbesserung der stark eingeschränkten Gedächtnisleistung dieser Tiere resultierte (Esmaili Tazangi *et al.*, 2015). Von besonderem Interesse war es jedoch, den Effekt von stabil exprimierten hEPO auf die stark eingeschränkte hippocampale Neurogenese im R6/2 Mausmodell zu untersuchen. Es existieren mehrere Studien, welche zeigten, dass die kontinuierliche Bildung neuer Neuronen im Gyrus dentatus und die funktionelle Integration dieser in bestehende neuronale Netzwerke eng mit kognitiven Funktionen wie z. B. dem Lernen und der Gedächtnisleistung

verbunden ist (Shors *et al.*, 2001; Dupret *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Stone *et al.*, 2011). Für das R6/2 Mausmodell ist bekannt, dass die Bildung von Neuroblasten im Gyrus dentatus sowie die Reifung und funktionelle Integration von Neuronen stark beeinträchtigt ist (Gil *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2005). Hinsichtlich einer eingeschränkten Proliferation neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen im Gyrus dentatus von R6/2 Mäusen existieren widersprüchliche Studien (Gil *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2005). In dieser Arbeit konnte für alle drei R6/2 Gruppen des Experiments eindeutig gezeigt werden, dass deutlich weniger DCX-exprimierende Neuroblasten in 12 Wochen alten R6/2 Tieren im Vergleich zu WT-Tieren ausgemacht werden konnten. Die stabile Expression von hEPO nahm somit keinen Einfluss auf die Bildung von Neuroblasten im R6/2 Mausmodell (siehe Abbildung 32B). Die bereits im Vorversuch mit *ex vivo* kultivierten NSCs/NPCs ermittelten Effekte von rekombinantem hEPO auf das Wachstum von unreifen Neuronen (siehe Abbildung 15A+B) sowie der hypothetische Effekt von stabil exprimierten hEPO im ZNS von Wildtyp-Mäusen auf die Migration von Neuroblasten führten in diesem Zusammenhang zu der Annahme, dass hEPO in R6/2 Mäusen ebenso die Reifung von Neuroblasten induziert und die Integration in neuronale Netzwerke fördert. Eine Studie aus dem Jahr 2011 konnte in eindrucksvoller Weise darstellen, dass die mit dem Wachstum von Neuronen assoziierte Bildung von Zellfortsätzen in die Ausbildung hippocampaler Gedächtnisleistungen involviert ist (Tronel *et al.*, 2010). Während der Bildung neuer Neuronen erfahren die Zellen weitreichende morphologische Veränderungen, wobei DCX-exprimierende Neuronen des 5. Stadiums Zellfortsätze aufweisen, welche die ersten Zellreihen der Molekularzellschicht des Gyrus dentatus erreichen (Kempermann *et al.*, 2004; Aasebo *et al.*, 2011; Toni und Sultan, 2011). So zeigte die Quantifizierung von DCX-exprimierenden Zellen mit Zellfortsätzen, dass hEPO-behandelte R6/2 Tiere signifikant mehr Neuroblasten des 5. Stadiums im Vergleich zu unbehandelten R6/2 Tieren aufwiesen (siehe Abbildung 32C). Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen hEPO- und GFP-behandelten R6/2 Tieren festgestellt werden. Bei genauerer Betrachtung der Morphologie von DCX-exprimierenden Zellen GFP-behandelter Tiere wird jedoch deutlich, dass diese Zellen eine unreifere Morphologie aufweisen. So führte die hEPO-Behandlung ebenso dazu, dass die Migrationsfähigkeit DCX-exprimierender Neuroblasten von der subgranulären Zone zur Körnerzellschicht auf das Niveau von WT-Tieren normalisiert werden konnte (siehe Abbildung 32D). Der durch die hEPO-Behandlung vermittelte Effekt auf die Migrationskapazität von Neuroblasten zur Körnerzellschicht des Gyrus dentatus sollte jedoch näher untersucht werden, da kein signifikanter Unterschied zu GFP-behandelten und unbehandelten R6/2 Mäusen hergestellt werden konnte. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die stabile Expression von hEPO im ZNS von R6/2 Mäusen Einfluss auf den Reifungsprozess neugebildeter Neuronen nimmt und so möglicherweise zu einem

verbesserten räumlichen Arbeitsgedächtnis der Mäuse beiträgt. Hinsichtlich der widersprüchlichen Datenlagen der Proliferationsfähigkeit von neuronalen Vorläuferzellen und Stammzellen im R6/2 Mausmodell konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass deutlich weniger neuronale Stammzellen im Gyrus dentatus von R6/2 Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 33). Die Expression von hEPO nahm keinen Einfluss auf neuronale Stammzellen des Gyrus dentatus von R6/2 Mäusen. Aufgrund der angewandten BrdU-Applikationsstrategie zu Beginn des Experiments wurden ausschließlich BrdU-positive Typ-1-Stammzellen in der Quantifizierung erfasst. Allerdings führte die intraventrikuläre Injektion von hEPO-kodierenden lentiviralen Partikeln in R6/2 Mäusen zu einer erhöhten Anzahl neuronaler Stammzellen in der SVZ 30 Tage nach ICV (siehe Abbildung 34D). Diese Diskrepanz in der Wirkung auf neuronale Stammzellen der SVZ und des Gyrus dentatus im R6/2 Mausmodell ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass neuronale Stammzellen der SVZ mit hEPO-kodierenden lentiviralen Viren transduziert wurden und somit hEPO exprimieren können. Neuronale Stammzellen (B1-Zellen) der SVZ besitzen ziliäre Zellfortsätze, welche bis in die Cerebrospinalflüssigkeit hineinreichen und somit in der Lage sind, über diese mit lentiviralen Partikeln transduziert zu werden (Singla und Reiter, 2006). Der Gyrus dentatus liegt weit abseits von der eigentlichen Injektionsstelle und der daraus resultierenden weitaus geringeren Transduktionswahrscheinlichkeit von neuronalen Stammzellen des Hippocampus mit lentiviralen Viren. Die Wirkung von hEPO auf neuronale Stammzellen des Gyrus dentatus wird daher wahrscheinlich durch neuronal exprimiertes hEPO vermittelt, welches seine Wirkung jedoch noch nicht zum Zeitpunkt des BrdU-Pulses entwickelte. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die Bildung von DCX-exprimierenden Neuroblasten der SVZ im R6/2 Mausmodell nicht beeinträchtigt ist. Hier zeigte sich, dass lentiviral exprimiertes hEPO nicht zu einer erhöhten Anzahl an DCX-exprimierenden Neuroblasten in der SVZ führte (siehe Abbildung 34A+C). Erwähnenswert ist hierbei jedoch, dass sich das R6/2 Mausmodell eignet, um den für hEPO beschriebenen hypothetischen Effekt auf die Migrationskapazität von Neuroblasten der SVZ zum Bulbus olfactorius zu untersuchen. Für R6/2 Mäuse ist bekannt, dass diese im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine verminderte Anzahl an neugebildeten periglomulären und granulären Interneuronen des Bulbus olfactorius aufweisen (Kohl *et al.*, 2010). Da in R6/2 Mäusen allem Anschein nach nicht die Bildung von Neuroblasten aus neuronalen Stammzellen der SVZ beeinträchtigt ist, führt die hEPO-Behandlung möglicherweise dazu, die eingeschränkte Migration von Neuroblasten zum Bulbus olfactorius zu unterstützen. Dies ließe sich durch eine Quantifizierung an Neuronen im Bulbus olfactorius von R6/2 Mäusen ermitteln.

4.7 Die lentiviral induzierte Expression von hEPO trägt zu keiner Regulation hippocampaler neuroinflammatorischer Prozesse im R6/2 Mausmodell bei

Eine Vielzahl von Faktoren wirkt auf zelluläre Prozesse der adulten Neurogenese. Insbesondere eine Aktivierung von Mikroglia mit einer assoziierten neuroinflammatorischen Antwort des ZNS wird im Zusammenhang mit einer beeinträchtigten hippocampalen Neurogenese und daraus resultierenden kognitiven Leistungseinschränkungen diskutiert. (Ekdahl *et al.*, 2003; Monje *et al.*, 2003; Ekdahl *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson ist der derzeitige Kenntnisstand bei Chorea Huntington hinsichtlich der Beteiligung einer Aktivierung von Mikroglia und neuroinflammatorischer Prozesse unzureichend (Moller, 2010). Jedoch gibt es Hinweise, dass die Aktivierung von Mikroglia und die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen als Teil des Pathomechanismus betrachtet werden kann (Bjorkqvist *et al.*, 2008). Somit besteht der Verdacht, dass inflammatorische Prozesse zu einer eingeschränkten hippocampalen Neurogenese in der R6/2 Mauslinie führen. Daher wurde in dieser Arbeit überprüft, ob EPO, welches als anti-inflammatorisches Zytokin fungiert, Einfluss auf die neuroinflammatorische Antwort im R6/2 Mausmodell nimmt und dementsprechend eine positive Wirkung auf die eingeschränkte hippocampale Neurogenese vermittelt. Es ist bekannt, dass EPO die Expression pro-inflammatorischer Zytokine unterdrückt und möglicherweise auch den Aktivierungszustand von Mikrogliazellen beeinflusst (Bond und Rex, 2014). Die Analyse einer Wirkung von lentiviral exprimiertem hEPO auf die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen des Hippocampus zeigte allerdings, dass weder die mRNA-Expression von CCL2 noch von TNF α durch die hEPO-Behandlung im R6/2 Mausmodell moduliert wurde (siehe Abbildung 35). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass im Gegensatz zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Parkinson, der Eintritt peripher zirkulierender Immunzellen in das ZNS von Huntington-Patienten aber auch im R6/2 Mausmodell nicht nachgewiesen werden konnte (Appel *et al.*, 2010; Moller, 2010). Daher wird vermutet, dass neuroinflammatorische Prozesse als Teil des Pathomechanismus von Chorea Huntington hauptsächlich auf die Interaktion von Mikroglia, Neuronen und Makroglia zurückzuführen sind (Moller, 2010). So wurde mittels Quantifizierung an aktivierten Mikroglia/Makrophagen-Populationen (Iba1-positive Zellen) des Gyrus dentatus evaluiert, ob die Expression von hEPO im ZNS von R6/2 Mäusen möglicherweise einen Effekt auf neuroinflammatorische Prozesse vermittelt. Jedoch konnte kein Effekt von hEPO auf Mikroglia/Makrophagen-Populationen des Gyrus dentatus im Vergleich zu GFP-behandelten und unbehandelten R6/2 Mäusen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 36A+B). Ebenso stellte sich bei der Auswertung der Anzahl an aktivierten

Mikroglia/Makrophagen-Populationen des Gyrus dentatus heraus, dass WT-Tiere im Vergleich zu R6/2 Mäusen keine erhöhte Anzahl an Iba1-exprimierenden Zellen aufwiesen. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit einer Studie, welche nachweisen konnte, dass die Anzahl an Mikroglia im Gyrus dentatus von R6/2 Mäusen sich auf dem Niveau von WT-Tieren bewegt (Phillips *et al.*, 2005). Die Erforschung der Rolle von Mikroglia bei Chorea Huntington ist ein derzeit hochaktuelles Forschungsfeld. So ist für das R6/2 Mausmodell beschrieben worden, dass eine erhöhte Anzahl an aktivierten Mikrogliazellen im Striatum vorliegt (Simmons *et al.*, 2007). Als Antwort auf pathologische Veränderungen gehen Mikrogliazellen in einen reaktiven Zustand über und sekretieren in Abhängigkeit ihres Aktivierungsstatus pro-inflammatorische oder anti-inflammatorische Zytokine (Bond und Rex, 2014). Die FACS-Analyse hippocampaler Mikroglia-Populationen zeigte, dass hEPO vermutlich keinen Einfluss auf den pro-inflammatorischen Aktivierungszustand von hippocampalen Mikroglia nimmt, da kein Unterschied in der Expression des Oberflächenmarkers MHC-II sowie des pro-inflammatorischen Zytokins TNF α ermittelt werden konnte (siehe Abbildung 37). Überraschenderweise konnte ebenso kein Unterschied in der Expression von MHC-II und TNF α zwischen R6/2 Tieren und WT-Tieren festgestellt werden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant gewesen, den Einfluss von hEPO auf den anti-inflammatorischen Aktivierungszustand von Mikroglia zu untersuchen. Es ist bekannt, dass aktivierte Mikrogliazellen in der Lage sind, BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) zu exprimieren (Coull *et al.*, 2005). BDNF ist ein Wachstumsfaktor, welcher die Neurogenese positiv beeinflusst und die Expression und Sekretion mittels EPO-Behandlung induzieren lässt (Viviani *et al.*, 2005; Waterhouse *et al.*, 2012; Parkhurst *et al.*, 2013). So konnte gezeigt werden, dass eine Expression von BDNF einen starken Einfluss auf Hippocampus-assoziierte Gedächtnisleistungen nimmt und weiterhin als ein potenter Modulator der synaptischen Plastizität zu sehen ist (Poo, 2001). Somit wäre es interessant zu untersuchen, ob eine stabile Expression von hEPO im ZNS von R6/2 Mäusen zu einer verstärkten Mikroglia-abhängigen Expression von BDNF führt. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass neuroinflammatorische Prozesse vermutlich nicht zu den vom Hippocampus abhängigen kognitiven Leistungseinschränkungen im R6/2 Mausmodell beitragen.

4.8 Ausblick

Der Nachweis einer endogenen Expression von murinem vEPO (mS) in Zellen der SVZ sowie einer Induktion der Neurogenese nach einer lentiviralen Überexpression von vEPO (mS) im ZNS von Wildtyp-Mäusen zeigten auf, dass murines vEPO eine funktionelle Rolle bei der Regulation der Neurogenese übernimmt. Jedoch stellt sich die Frage, welchen Einfluss endogen exprimiertes vEPO (mS) auf die adulte Neurogenese *in vivo* nimmt. Diese Frage könnte mit Hilfe eines spezifischen *knockdowns* des mS-Gens im ZNS unter

physiologischen als auch pathologischen Bedingungen im Mausmodell erfolgen. Anwendung könnte ein lentiviral basierter Ansatz mit *small hairpin RNA* (sh-RNA) zum spezifischen *knockdown* des *mS*-Gens finden. Im Vergleich zur lentiviralen Überexpression von hEPO in der SVZ von Wildtyp-Mäusen ergaben sich für das lentivirale überexprimierte murine vEPO (mS) Hinweise, dass murines vEPO die Liniendeterminierung von Vorläuferzellen zu Neuroblasten stimuliert und weiterhin die Proliferation von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen fördert. Dieser Aspekt sollte in zukünftigen Experimenten unter pathologischen Bedingungen im R6/2 Mausmodell näher beleuchtet werden. So könnte über eine lentivirale Überexpression von vEPO (mS) im ZNS von R6/2 Mäusen dargestellt werden, ob murines vEPO ebenso wie hEPO therapeutische Effekte im R6/2 Mausmodell vermittelt und insbesondere Einfluss auf die eingeschränkte Bildung von Neuroblasten im Gyrus dentatus dieses Mausmodells nimmt.

5. Zusammenfassung

Das Zytokin Erythropoietin (EPO) fungiert in zahlreichen Geweben als Wachstums- und Überlebensfaktor. So werden EPO und sein Rezeptor (EPOR) von Zellen des sich entwickelnden und des reifen zentralen Nervensystems (ZNS) exprimiert, wo sie das Überleben neuronaler Zellen sowie ihre Reifung fördern. In tierexperimentellen Studien des Schlaganfalls, des Schädelhirntraumas oder der Alzheimer-Krankheit konnte nachgewiesen werden, dass systemisch verabreichtes rekombinantes EPO die Neurogenese fördert und zu einer Abmilderung neurologischer Beeinträchtigungen führt. Klinische Studien zeigten jedoch, dass multiple Verabreichungen und hohe Mengen an rekombinantem EPO notwendig sind, um ausreichende therapeutische Level im ZNS zu erhalten. Systemisch verabreichtes EPO eignet sich jedoch nicht für eine Langzeitbehandlung aufgrund des erhöhten Risikos für gefährliche Hämatokrit-assoziierte Nebeneffekte wie beispielsweise Schlaganfälle oder Thrombosen. Vor Kurzem im Labor für Molekulare Psychiatrie entdeckte endogen exprimierte jedoch nicht-hämatopoetisch wirkende EPO-Isoformen (vEPOs) konnten *in vitro* als zyto- und neuroprotektiv beschrieben werden. In dieser Arbeit ist der Nachweis von murinem vEPO in *ex vivo* kultivierten neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen (NSCs/NPCs) gelungen, was auf eine funktionelle Beteiligung von vEPO in der Regulation der Neurogenese hindeutet. Unter Verwendung von rekombinantem EPO/vEPO konnte nachgewiesen werden, dass vEPO ebenso wie EPO das Überleben und Reifung von *ex vivo* kultivierten NSCs/NPCs unterstützt. Um den Kurzzeit- und Langzeiteffekt von humanem EPO (hEPO) und vEPO auf die murine Neurogenese *in vivo* zu evaluieren, erhielten Wildtyp-Mäuse eine unilaterale intraventrikuläre Injektion an hEPO-/vEPO-kodierenden lentiviralen Partikeln (LV-hEPO, LV-vEPO). Dabei zeigte sich, dass die Überexpression von murinem vEPO die Differenzierung von Neuroblasten sowie die Proliferation von Stamm- und Vorläuferzellen der subventrikulären Zone (SVZ) fördert, wohingegen überexprimiertes humanes vEPO vorrangig einen Effekt auf neuronale Vorläuferzellen vermittelte. Diese Ergebnisse suggerieren, dass vEPO als potenter Modulator der adulten Neurogenese fungiert. Abschließend wurde das therapeutische Potenzial von LV-hEPO im transgenen R6/2 Mausmodell der Huntington-Krankheit (HD) evaluiert. Dazu erhielten R6/2 Mäuse bei Krankheitseintritt eine bilaterale intraventrikuläre Injektion von LV-hEPO. Über einen Zeitraum von 4 Wochen nach Injektion lentiviraler Partikel konnte eine weitreichende Expression von hEPO im ZNS nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten hEPO-behandelte R6/2 Mäuse eine verbesserte räumliche Arbeitsgedächtnisleistung. Die Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit korrelierte mit einer Abnahme der hippocampalen Atrophie und einer verstärkten Reifung von Neuroblasten im Gyrus dentatus. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass hEPO als ein vielversprechendes Zytokin in der Behandlung kognitiver Leistungseinschränkungen der Huntington-Krankheit zu sehen ist.

6. Abstract

The cytokine erythropoietin acts as a growth and survival factor for multiple tissues. EPO and its receptor (EPOR) are expressed in the developing and mature central nervous system (CNS) where they are involved in maintaining neuronal survival and neural cell maturation. Systemically administered EPO has been shown to increase neurogenesis and to reduce neurological impairments in several animal models of stroke, traumatic brain injury and Alzheimer's disease. Results obtained from clinical trials showed that multiple applications and large amounts of recombinant EPO are required to achieve therapeutic benefits in the CNS. However, long-term application of EPO is problematic due to the elevated risk for serious hematocrit-associated side-effects such as stroke or thrombosis. Recently, in the laboratory of molecular psychiatry, endogenous non-erythropoietic EPO-isoforms (vEPOs) were identified and proven to exert cyto- and neuroprotective effects *in vitro*. In this study, murine vEPO was detected in murine neuronal stem- and precursor cells (NSCs/NPCs) *ex vivo*, implying its functional role in the regulation of neurogenesis. The treatment of *ex vivo* cultured murine NSCs/NPCs with recombinant EPO/vEPO revealed that similarly to EPO, vEPO supports the survival and maturation of these cells. To study the short- and long-term effects of stably expressed vEPO and human EPO (hEPO) on murine neurogenesis *in vivo*, wild-type mice received a unilateral intraventricular injection of lentivirus encoding hEPO/vEPO (LV-hEPO/LV-vEPO). The overexpression of murine vEPO resulted in a strong induction of neuronal differentiation and proliferation of neuronal stem- and precursor cells in the subventricular zone (SVZ), whereas overexpressed human vEPO mediated a preferential effect on neuronal precursor cells. These results suggest that vEPO is a potent modulator of adult neurogenesis. Lastly, the therapeutic potential of LV-hEPO was evaluated in R6/2 transgenic mice, a mouse model of Huntington's disease (HD). R6/2 mice received a bilateral intraventricular injection of LV-hEPO. A stable expression of hEPO was observed in the CNS for 4 weeks after virus administration. Notably, R6/2 mice injected with LV-hEPO showed improved spatial working memory. This finding correlated with a long-term deceleration of hippocampal atrophy and the enhancement of neuroblast maturation in the dentate gyrus. Taken together, these results suggest hEPO as a promising cytokine for the treatment of cognitive impairment in HD.

7. Literaturverzeichnis

- Aasebo, I. E., Blankvoort, S., & Tashiro, A. (2011). Critical maturational period of new neurons in adult dentate gyrus for their involvement in memory formation. *Eur J Neurosci*, 33(6), 1094-1100.
- Adam, O. R., & Jankovic, J. (2008). Symptomatic treatment of Huntington disease. *Neurotherapeutics*, 5(2), 181-197.
- Ahmet, I., Tae, H. J., Juhaszova, M., Riordon, D. R., Boheler, K. R., Sollott, S. J., et al. (2011). A small nonerythropoietic helix B surface peptide based upon erythropoietin structure is cardioprotective against ischemic myocardial damage. *Mol Med*, 17(3-4), 194-200.
- Akina, R. K., Walton, R. M., Chen, M. L., Li, Q. X., Planelles, V., & Chen, I. S. (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol*, 70(4), 2581-2585.
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 137(4), 433-457.
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124(3), 319-335.
- Altman, J., & Das, G. D. (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol*, 126(3), 337-389.
- Alvarez-Buylla, A., & Garcia-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*, 22(3), 629-634.
- Alvarez-Buylla, A., & Lim, D. A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41(5), 683-686.
- Appel, S. H., Beers, D. R., & Henkel, J. S. (2010). T cell-microglial dialogue in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: are we listening? *Trends Immunol*, 31(1), 7-17.
- Bahlmann, F. H., de Groot, K., Haller, H., & Fliser, D. (2004). Erythropoietin: is it more than correcting anaemia? *Nephrol Dial Transplant*, 19(1), 20-22.
- Balaguer, E., Demelbauer, U., Pelzing, M., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., & Neuss, C. (2006). Glycoform characterization of erythropoietin combining glycan and intact protein analysis by capillary electrophoresis - electrospray - time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis*, 27(13), 2638-2650.
- Balordi, F., & Fishell, G. (2007). Mosaic removal of hedgehog signaling in the adult SVZ reveals that the residual wild-type stem cells have a limited capacity for self-renewal. *J Neurosci*, 27(52), 14248-14259.

- Bernaudin, M., Bellail, A., Marti, H. H., Yvon, A., Vivien, D., Duchatelle, I., et al. (2000). Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia*, 30(3), 271-278.
- Bernaudin, M., Marti, H. H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E. T., et al. (1999). A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19(6), 643-651.
- Bjorkqvist, M., Wild, E. J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., et al. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med*, 205(8), 1869-1877.
- Blanchard, K. L., Acquaviva, A. M., Galson, D. L., & Bunn, H. F. (1992). Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Mol Cell Biol*, 12(12), 5373-5385.
- Blomer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I. M., & Gage, F. H. (1997). Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol*, 71(9), 6641-6649.
- Boesch, S., Nachbauer, W., Mariotti, C., Sacca, F., Filla, A., Klockgether, T., et al. (2014). Safety and tolerability of carbamylated erythropoietin in Friedreich's ataxia. *Mov Disord*, 29(7), 935-939.
- Bond, W. S., & Rex, T. S. (2014). Evidence That Erythropoietin Modulates Neuroinflammation through Differential Action on Neurons, Astrocytes, and Microglia. *Front Immunol*, 5, 523.
- Bonnas, C. (2009). Identification of erythropoietin isoforms and evaluation of their biological importance. *Dissertation*. Aus dem Institut Experimentelle Neurologie der Klinik für Neurologie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin.
- Boutin, C., Hardt, O., de Chevigny, A., Core, N., Goebbels, S., Seidenfaden, R., et al. (2010). NeuroD1 induces terminal neuronal differentiation in olfactory neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(3), 1201-1206.
- Brailsford, J. A., & Danishefsky, S. J. (2012). Probing the stability of nonglycosylated wild-type erythropoietin protein via reiterative alanine ligations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(19), 7196-7201.
- Brandt, M. D., Hubner, M., & Storch, A. (2012). Brief report: Adult hippocampal precursor cells shorten S-phase and total cell cycle length during neuronal differentiation. *Stem Cells*, 30(12), 2843-2847.
- Brewer, G. J. (1995). Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res*, 42(5), 674-683.
- Brines, M., Grasso, G., Fiordaliso, F., Sfacteria, A., Ghezzi, P., Fratelli, M., et al. (2004). Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41), 14907-14912.
- Brines, M., Patel, N. S., Villa, P., Brines, C., Mennini, T., De Paola, M., et al. (2008). Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(31), 10925-10930.

- Brines, M. L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N. C., Cerami, C., et al. (2000). Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(19), 10526-10531.
- Brooks, S. A. (2006). Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins. *Expert Rev Proteomics*, 3(3), 345-359.
- Broudy, V. C., Lin, N., Brice, M., Nakamoto, B., & Papayannopoulou, T. (1991). Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood*, 77(12), 2583-2590.
- Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M., et al. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol*, 41(5), 646-653.
- Byts, N., & Siren, A. L. (2009). Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent. *Exp Transl Stroke Med*, 1, 4.
- Calvillo, L., Latini, R., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., Ghezzi, P., et al. (2003). Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(8), 4802-4806.
- Cameron, H. A., & McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 435(4), 406-417.
- Carter, R. J., Lione, L. A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P., et al. (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci*, 19(8), 3248-3257.
- Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C., & Schumacker, P. T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20), 11715-11720.
- Cheetham, J. C., Smith, D. M., Aoki, K. H., Stevenson, J. L., Hoeffel, T. J., Syed, R. S., et al. (1998). NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nat Struct Biol*, 5(10), 861-866.
- Chen, Z. Y., Asavaritikrai, P., Prchal, J. T., & Noguchi, C. T. (2007). Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *J Biol Chem*, 282(35), 25875-25883.
- Chong, Z. Z., Kang, J. Q., & Maiese, K. (2002). Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(5), 503-514.
- Consiglio, A., Gritti, A., Dolcetta, D., Follenzi, A., Bordignon, C., Gage, F. H., et al. (2004). Robust in vivo gene transfer into adult mammalian neural stem cells by lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41), 14835-14840.
- Constantinescu, S. N., Ghaffari, S., & Lodish, H. F. (1999). The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends Endocrinol Metab*, 10(1), 18-23.

- Coull, J. A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., et al. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438(7070), 1017-1021.
- Cummings, D. M., Alaghband, Y., Hickey, M. A., Joshi, P. R., Hong, S. C., Zhu, C., et al. (2012). A critical window of CAG repeat-length correlates with phenotype severity in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J Neurophysiol*, 107(2), 677-691.
- Curtis, M. A., Penney, E. B., Pearson, A. G., van Roon-Mom, W. M., Butterworth, N. J., Dragunow, M., et al. (2003). Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(15), 9023-9027.
- de Sousa Abreu, R., Penalva, L. O., Marcotte, E. M., & Vogel, C. (2009). Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst*, 5(12), 1512-1526.
- Dhaliwal, J., & Lagace, D. C. (2011). Visualization and genetic manipulation of adult neurogenesis using transgenic mice. *Eur J Neurosci*, 33(6), 1025-1036.
- Digicaylioglu, M., Bichet, S., Marti, H. H., Wenger, R. H., Rivas, L. A., Bauer, C., et al. (1995). Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(9), 3717-3720.
- Doetsch, F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 13(5), 543-550.
- Doetsch, F., & Alvarez-Buylla, A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(25), 14895-14900.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), 703-716.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*, 17(13), 5046-5061.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, 36(6), 1021-1034.
- Drouin-Ouellet, J., Sawiak, S. J., Cisbani, G., Lagace, M., Kuan, W. L., Saint-Pierre, M., et al. (2015). Cerebrovascular and blood-brain barrier impairments in Huntington's disease: Potential implications for its pathophysiology. *Ann Neurol*, 78(2), 160-177.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., et al. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, 72(11), 8463-8471.
- Dupret, D., Revest, J. M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., et al. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One*, 3(4), e1959.
- Ehrenreich, H., Degner, D., Meller, J., Brines, M., Behe, M., Hasselblatt, M., et al. (2004). Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 9(1), 42-54.

- Ehrenreich, H., Fischer, B., Norra, C., Schellenberger, F., Stender, N., Stiefel, M., et al. (2007). Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis. *Brain*, 130(Pt 10), 2577-2588.
- Ehrenreich, H., Hasselblatt, M., Dembowski, C., Cepek, L., Lewczuk, P., Stiefel, M., et al. (2002). Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med*, 8(8), 495-505.
- Ehrenreich, H., Hinze-Selch, D., Stawicki, S., Aust, C., Knolle-Veentjer, S., Wilms, S., et al. (2007). Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry*, 12(2), 206-220.
- Ehrenreich, H., Weissenborn, K., Prange, H., Schneider, D., Weimar, C., Wartenberg, K., et al. (2009). Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke*, 40(12), e647-656.
- Ehrenreich, H. B., Claudia; Begemann, Martin; Krampe, Henning. (2008). Neue Ansätze zu Modellierung und Behandlung der neurodegenerativen Prozesse der Schizophrenie Tätigkeitsbericht 2008, Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen Arbeitsgruppe - Division Klinische Neurowissenschaften
- Ekdahl, C. T., Claasen, J. H., Bonde, S., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(23), 13632-13637.
- Ekdahl, C. T., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2009). Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience*, 158(3), 1021-1029.
- El-Akabawy, G., Rattray, I., Johansson, S. M., Gale, R., Bates, G., & Mado, M. (2012). Implantation of undifferentiated and pre-differentiated human neural stem cells in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *BMC Neurosci*, 13, 97.
- Ellrichmann, G., Reick, C., Saft, C., & Linker, R. A. (2013). The role of the immune system in Huntington's disease. *Clin Dev Immunol*, 2013, 541259.
- Engelman, A., & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*, 10(4), 279-290.
- Erbayraktar, S., Grasso, G., Sfacteria, A., Xie, Q. W., Coleman, T., Kreilgaard, M., et al. (2003). Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(11), 6741-6746.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., et al. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4(11), 1313-1317.
- Esmaeili Tazangi, P., Moosavi, S. M., Shabani, M., & Haghani, M. (2015). Erythropoietin improves synaptic plasticity and memory deficits by decrease of the neurotransmitter release probability in the rat model of Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav*, 130, 15-21.
- Faigle, S. (2013). Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1830(2), 2435-2448.

- Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoj, B., & Butto, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*, 46(1), 5-14.
- Fandrey, J., & Bunn, H. F. (1993). In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood*, 81(3), 617-623.
- Fassler, M., Weissberg, I., Levy, N., Diaz-Griffero, F., Monsonego, A., Friedman, A., et al. (2013). Preferential lentiviral targeting of astrocytes in the central nervous system. *PLoS One*, 8(10), e76092.
- Ferrante, R. J. (2009). Mouse models of Huntington's disease and methodological considerations for therapeutic trials. *Biochim Biophys Acta*, 1792(6), 506-520.
- Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., & Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(18), 7306-7311.
- Fuentealba, L. C., Obernier, K., & Alvarez-Buylla, A. (2012). Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell*, 10(6), 698-708.
- Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 287(5457), 1433-1438.
- Gil, J. M., Leist, M., Popovic, N., Brundin, P., & Petersen, A. (2004). Asialoerythropoietin is not effective in the R6/2 line of Huntington's disease mice. *BMC Neurosci*, 5, 17.
- Gil, J. M., Mohapel, P., Araujo, I. M., Popovic, N., Li, J. Y., Brundin, P., et al. (2005). Reduced hippocampal neurogenesis in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. *Neurobiol Dis*, 20(3), 744-751.
- Gil, J. M., & Rego, A. C. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci*, 27(11), 2803-2820.
- Gil-Mohapel, J., Simpson, J. M., Ghilan, M., & Christie, B. R. (2011). Neurogenesis in Huntington's disease: can studying adult neurogenesis lead to the development of new therapeutic strategies? *Brain Res*, 1406, 84-105.
- Gratzner, H. G. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218(4571), 474-475.
- Halbert, C. L., Miller, A. D., McNamara, S., Emerson, J., Gibson, R. L., Ramsey, B., et al. (2006). Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther*, 17(4), 440-447.
- Han, Y. G., et al. "Hedgehog Signaling and Primary Cilia Are Required for the Formation of Adult Neural Stem Cells." *Nat Neurosci* 11.3 (2008): 277-84.
- Hanawa, H., Hematti, P., Keyvanfar, K., Metzger, M. E., Krouse, A., Donahue, R. E., et al. (2004). Efficient gene transfer into rhesus repopulating hematopoietic stem cells using a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector system. *Blood*, 103(11), 4062-4069.

- Hanawa, H., Kelly, P. F., Nathwani, A. C., Persons, D. A., Vandergriff, J. A., Hargrove, P., et al. (2002). Comparison of various envelope proteins for their ability to pseudotype lentiviral vectors and transduce primitive hematopoietic cells from human blood. *Mol Ther*, 5(3), 242-251.
- Harazono, A., Hashii, N., Kuribayashi, R., Nakazawa, S., & Kawasaki, N. (2013). Mass spectrometric glycoform profiling of the innovator and biosimilar erythropoietin and darbepoetin by LC/ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal*, 83, 65-74.
- Hayes, N. L., & Nowakowski, R. S. (2000). Exploiting the dynamics of S-phase tracers in developing brain: interkinetic nuclear migration for cells entering versus leaving the S-phase. *Dev Neurosci*, 22(1-2), 44-55.
- Hayley, S., & Litteljohn, D. (2013). Neuroplasticity and the next wave of antidepressant strategies. *Front Cell Neurosci*, 7, 218.
- HD Collaborative Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*, 72(6), 971-983.
- Heilbronn, R., & Weger, S. (2010). Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics. *Handb Exp Pharmacol*(197), 143-170.
- Herrera, D. G., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol*, 46(6), 867-877.
- Hsieh, J. (2012). Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes Dev*, 26(10), 1010-1021.
- Iliff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W., Gundersen, G. A., et al. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med*, 4(147), 147ra111.
- Imai, N., Higuchi, M., Kawamura, A., Tomonoh, K., Oh-Eda, M., Fujiwara, M., et al. (1990). Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro. *Eur J Biochem*, 194(2), 457-462.
- Jack, C. R., Jr., Wiste, H. J., Vemuri, P., Weigand, S. D., Senjem, M. L., Zeng, G., et al. (2010). Brain beta-amyloid measures and magnetic resonance imaging atrophy both predict time-to-progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain*, 133(11), 3336-3348.
- Jakobsson, J., Ericson, C., Jansson, M., Bjork, E., & Lundberg, C. (2003). Targeted transgene expression in rat brain using lentiviral vectors. *J Neurosci Res*, 73(6), 876-885.
- Jelkmann, W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *J Physiol*, 589(Pt 6), 1251-1258.
- Juul, S. E., Anderson, D. K., Li, Y., & Christensen, R. D. (1998). Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res*, 43(1), 40-49.

- Kadota, T., Shingo, T., Yasuhara, T., Tajiri, N., Kondo, A., Morimoto, T., et al. (2009). Continuous intraventricular infusion of erythropoietin exerts neuroprotective/rescue effects upon Parkinson's disease model of rats with enhanced neurogenesis. *Brain Res*, 1254, 120-127.
- Kantor, B., Bailey, R. M., Wimberly, K., Kalburgi, S. N., & Gray, S. J. (2014). Methods for gene transfer to the central nervous system. *Adv Genet*, 87, 125-197.
- Kaplan, M. S. (1981). Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. *J Comp Neurol*, 195(2), 323-338.
- Kaplan, M. S. (1985). Formation and turnover of neurons in young and senescent animals: an electronmicroscopic and morphometric analysis. *Ann N Y Acad Sci*, 457, 173-192.
- Kaplan, M. S., & Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197(4308), 1092-1094.
- Kegel, K. B., Kim, M., Sapp, E., McIntyre, C., Castano, J. G., Aronin, N., et al. (2000). Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci*, 20(19), 7268-7278.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., & Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 27(8), 447-452.
- Kitagawa, R., Miyachi, S., Hanawa, H., Takada, M., & Shimada, T. (2007). Differential characteristics of HIV-based versus SIV-based lentiviral vector systems: Gene delivery to neurons and axonal transport of expressed gene. *Neurosci Res*, 57(4), 550-558.
- Knabe, W., Knerlich, F., Washausen, S., Kietzmann, T., Siren, A. L., Brunnett, G., et al. (2004). Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing midbrain. *Anat Embryol (Berl)*, 207(6), 503-512.
- Kohl, Z., Regensburger, M., Aigner, R., Kandasamy, M., Winner, B., Aigner, L., et al. (2010). Impaired adult olfactory bulb neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *BMC Neurosci*, 11, 114.
- Komitova, M., Zhu, X., Serwanski, D. R., & Nishiyama, A. (2009). NG2 cells are distinct from neurogenic cells in the postnatal mouse subventricular zone. *J Comp Neurol*, 512(5), 702-716.
- Kordower, J. H., Emborg, M. E., Bloch, J., Ma, S. Y., Chu, Y., Leventhal, L., et al. (2000). Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*, 290(5492), 767-773.
- Kornack, D. R., & Rakic, P. (1999). Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10), 5768-5773.
- Kouzu, Y., Moriya, T., Takeshima, H., Yoshioka, T., & Shibata, S. (2000). Mutant mice lacking ryanodine receptor type 3 exhibit deficits of contextual fear conditioning and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, 76(1), 142-150.
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., & Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*, 16(6), 2027-2033.

- Kwee, R. M., & Kwee, T. C. (2007). Virchow-Robin spaces at MR imaging. *Radiographics*, 27(4), 1071-1086.
- Lacombe, C., Da Silva, J. L., Bruneval, P., Fournier, J. G., Wendling, F., Casadevall, N., et al. (1988). Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest*, 81(2), 620-623.
- Lai, P. H., Everett, R., Wang, F. F., Arakawa, T., & Goldwasser, E. (1986). Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem*, 261(7), 3116-3121.
- Langbehn, D. R., Brinkman, R. R., Falush, D., Paulsen, J. S., Hayden, M. R., & International Huntington's Disease Collaborative, G. (2004). A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. *Clin Genet*, 65(4), 267-277.
- Law, M. L., Cai, G. Y., Lin, F. K., Wei, Q., Huang, S. Z., Hartz, J. H., et al. (1986). Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(18), 6920-6924.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., & Gordon, S. (1992). Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 48(2), 405-415.
- Leconte, C., Bihel, E., Lepelletier, F. X., Bouet, V., Saulnier, R., Petit, E., et al. (2011). Comparison of the effects of erythropoietin and its carbamylated derivative on behaviour and hippocampal neurogenesis in mice. *Neuropharmacology*, 60(2-3), 354-364.
- Leist, M., Ghezzi, P., Grasso, G., Bianchi, R., Villa, P., Fratelli, M., et al. (2004). Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*, 305(5681), 239-242.
- Lentz, T. B., Gray, S. J., & Samulski, R. J. (2012). Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiol Dis*, 48(2), 179-188.
- Li, J. Y., Popovic, N., & Brundin, P. (2005). The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington's disease in attempts to develop novel therapeutic strategies. *NeuroRx*, 2(3), 447-464.
- Li, S. H., & Li, X. J. (2004). Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet*, 20(3), 146-154.
- Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends Neurosci*, 37(10), 563-571.
- Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., et al. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(22), 7580-7584.
- Linterman, K. S., Palmer, D. N., Kay, G. W., Barry, L. A., Mitchell, N. L., McFarlane, R. G., et al. (2011). Lentiviral-mediated gene transfer to the sheep brain: implications for gene therapy in Batten disease. *Hum Gene Ther*, 22(8), 1011-1020.
- Lione, L. A., Carter, R. J., Hunt, M. J., Bates, G. P., Morton, A. J., & Dunnett, S. B. (1999). Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci*, 19(23), 10428-10437.

- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145-1148.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science*, 271(5251), 978-981.
- Lombardero, M., Kovacs, K., & Scheithauer, B. W. (2011). Erythropoietin: a hormone with multiple functions. *Pathobiology*, 78(1), 41-53.
- Losekoot, M., van Belzen, M. J., Seneca, S., Bauer, P., Stenhouse, S. A., Barton, D. E., et al. (2013). EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. *Eur J Hum Genet*, 21(5), 480-486.
- Luesse, H. G., Schiefer, J., Spruenken, A., Puls, C., Block, F., & Kosinski, C. M. (2001). Evaluation of R6/2 HD transgenic mice for therapeutic studies in Huntington's disease: behavioral testing and impact of diabetes mellitus. *Behav Brain Res*, 126(1-2), 185-195.
- Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Gotz, M., et al. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*, 6(5), 445-456.
- Lundberg, C., Bjorklund, T., Carlsson, T., Jakobsson, J., Hantraye, P., Deglon, N., et al. (2008). Applications of lentiviral vectors for biology and gene therapy of neurological disorders. *Curr Gene Ther*, 8(6), 461-473.
- Luskin, M. B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 11(1), 173-189.
- Ma, D. K., Ming, G. L., & Song, H. (2005). Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, 15(5), 514-520.
- Mamber, C., Kozareva, D. A., Kamphuis, W., & Hol, E. M. (2013). Shades of gray: The delineation of marker expression within the adult rodent subventricular zone. *Prog Neurobiol*, 111, 1-16.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., et al. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, 87(3), 493-506.
- Marti, H. H., Wenger, R. H., Rivas, L. A., Straumann, U., Digicaylioglu, M., Henn, V., et al. (1996). Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci*, 8(4), 666-676.
- Martin, J. B., & Gusella, J. F. (1986). Huntington's disease. Pathogenesis and management. *N Engl J Med*, 315(20), 1267-1276.
- Masuda, S., Chikuma, M., & Sasaki, R. (1997). Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. *Brain Res*, 746(1-2), 63-70.
- Masuda, S., Okano, M., Yamagishi, K., Nagao, M., Ueda, M., & Sasaki, R. (1994). A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem*, 269(30), 19488-19493.

- Mclver, S. R., Lee, C. S., Lee, J. M., Green, S. H., Sands, M. S., Snider, B. J., et al. (2005). Lentiviral transduction of murine oligodendrocytes in vivo. *J Neurosci Res*, 82(3), 397-403.
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J. M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., & Alvarez-Buylla, A. (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci*, 26(30), 7907-7918.
- Miskowiak, K. W., Vinberg, M., Macoveanu, J., Ehrenreich, H., Koster, N., Inkster, B., et al. (2014). Effects of Erythropoietin on Hippocampal Volume and Memory in Mood Disorders. *Biol Psychiatry*.
- Modlich, U., & Baum, C. (2009). Preventing and exploiting the oncogenic potential of integrating gene vectors. *J Clin Invest*, 119(4), 755-758.
- Moller, T. (2010). Neuroinflammation in Huntington's disease. *J Neural Transm*, 117(8), 1001-1008.
- Molofsky, A. V., Pardal, R., & Morrison, S. J. (2004). Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol*, 16(6), 700-707.
- Monje, M. L., Toda, H., & Palmer, T. D. (2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*, 302(5651), 1760-1765.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Bartholomae, C. C., Ranzani, M., et al. (2009). The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J Clin Invest*, 119(4), 964-975.
- Morrens, J., Van Den Broeck, W., & Kempermann, G. (2012). Glial cells in adult neurogenesis. *Glia*, 60(2), 159-174.
- Morrison, S. J., Shah, N. M., & Anderson, D. J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88(3), 287-298.
- Morshead, C. M., Reynolds, B. A., Craig, C. G., McBurney, M. W., Staines, W. A., Morassutti, D., et al. (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*, 13(5), 1071-1082.
- Murphy, K. P., Carter, R. J., Lione, L. A., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P., et al. (2000). Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci*, 20(13), 5115-5123.
- Nagai, A., Nakagawa, E., Choi, H. B., Hatori, K., Kobayashi, S., & Kim, S. U. (2001). Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60(4), 386-392.
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D., & Verma, I. M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(21), 11382-11388.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., et al. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259), 263-267.

- Nau, R., Sorgel, F., & Eiffert, H. (2010). Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*, 23(4), 858-883.
- Neususs, C., Demelbauer, U., & Pelzing, M. (2005). Glycoform characterization of intact erythropoietin by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 26(7-8), 1442-1450.
- Oh, D. H., Lee, I. Y., Choi, M., Kim, S. H., & Son, H. (2012). Comparison of Neurite Outgrowth Induced by Erythropoietin (EPO) and Carbamylated Erythropoietin (CEPO) in Hippocampal Neural Progenitor Cells. *Korean J Physiol Pharmacol*, 16(4), 281-285.
- Ohab, J. J., Fleming, S., Blesch, A., & Carmichael, S. T. (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci*, 26(50), 13007-13016.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*, 88(4), 844-856.
- Oka, Y., Nakajima, K., Nagao, K., Miura, K., Ishii, N., & Kobayashi, H. (2010). 293FT cells transduced with four transcription factors (OCT4, SOX2, NANOG, and LIN28) generate aberrant ES-like cells. *J Stem Cells Regen Med*, 6(3), 149-156.
- Olson, A. K., Eadie, B. D., Ernst, C., & Christie, B. R. (2006). Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus*, 16(3), 250-260.
- Palmer, T. D., Willhoite, A. R., & Gage, F. H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*, 425(4), 479-494.
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., 3rd, Lafaille, J. J., et al. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, 155(7), 1596-1609.
- Parras, C. M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., et al. (2004). Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J*, 23(22), 4495-4505.
- Patel, N. S., Nandra, K. K., & Thiernemann, C. (2012). Bench-to-bedside review: Erythropoietin and its derivatives as therapies in critical care. *Crit Care*, 16(4), 229.
- Peng, Q., Masuda, N., Jiang, M., Li, Q., Zhao, M., Ross, C. A., et al. (2008). The antidepressant sertraline improves the phenotype, promotes neurogenesis and increases BDNF levels in the R6/2 Huntington's disease mouse model. *Exp Neurol*, 210(1), 154-163.
- Peretto, P., Merighi, A., Fasolo, A., & Bonfanti, L. (1997). Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull*, 42(1), 9-21.
- Petreau, L., & Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci*, 22(14), 6106-6113.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.

- Phillips, W., Morton, A. J., & Barker, R. A. (2005). Abnormalities of neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease are attributable to the in vivo microenvironment. *J Neurosci*, *25*(50), 11564-11576.
- Politis, M., Pavese, N., Tai, Y. F., Kiferle, L., Mason, S. L., Brooks, D. J., et al. (2011). Microglial activation in regions related to cognitive function predicts disease onset in Huntington's disease: a multimodal imaging study. *Hum Brain Mapp*, *32*(2), 258-270.
- Ponti, G., Obernier, K., Guinto, C., Jose, L., Bonfanti, L., & Alvarez-Buylla, A. (2013). Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(11), E1045-1054.
- Poo, M. M. "Neurotrophins as Synaptic Modulators." *Nat Rev Neurosci* 2.1 (2001): 24-32
- Rakic, P. (1985). DNA synthesis and cell division in the adult primate brain. *Ann N Y Acad Sci*, *457*, 193-211.
- Ramón y Cajal, S. (1913). *Trans. Day, R. M.*(Degeneration and Regeneration of the Nervous System).
- Ray, S. K., Li, H. J., Metzger, E., Schule, R., & Leiter, A. B. (2014). CtBP and associated LSD1 are required for transcriptional activation by NeuroD1 in gastrointestinal endocrine cells. *Mol Cell Biol*, *34*(12), 2308-2317.
- Raz, N., Lindenberger, U., Rodrigue, K. M., Kennedy, K. M., Head, D., Williamson, A., et al. (2005). Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers. *Cereb Cortex*, *15*(11), 1676-1689.
- Recny, M. A., Scoble, H. A., & Kim, Y. (1987). Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin. *J Biol Chem*, *262*(35), 17156-17163.
- Reynolds, B. A., & Rietze, R. L. (2005). Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nat Methods*, *2*(5), 333-336.
- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, *255*(5052), 1707-1710.
- Roos, R. A. (2010). Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis*, *5*, 40.
- Rosas, H. D., Koroshetz, W. J., Chen, Y. I., Skeuse, C., Vangel, M., Cudkowicz, M. E., et al. (2003). Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology*, *60*(10), 1615-1620.
- Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol*, *10*(1), 83-98.
- Rosser, J., & Eckardt, K. U. (2005). Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrol Dial Transplant*, *20*(6), 1025-1028.
- Rui, T., Feng, Q., Lei, M., Peng, T., Zhang, J., Xu, M., et al. (2005). Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res*, *65*(3), 719-727.

- Sakanaka, M., Wen, T. C., Matsuda, S., Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M., et al. (1998). In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8), 4635-4640.
- Sakuma, T., Barry, M. A., & Ikeda, Y. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J*, 443(3), 603-618.
- Salic, A., & Mitchison, T. J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(7), 2415-2420.
- Sanchez, I., Xu, C. J., Juo, P., Kakizaka, A., Blenis, J., & Yuan, J. (1999). Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron*, 22(3), 623-633.
- Sargin, D., Friedrichs, H., El-Kordi, A., & Ehrenreich, H. (2010). Erythropoietin as neuroprotective and neuroregenerative treatment strategy: comprehensive overview of 12 years of preclinical and clinical research. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 24(4), 573-594.
- Schiefer, J., Landwehrmeyer, G. B., Luesse, H. G., Sprunken, A., Puls, C., Milkereit, A., et al. (2002). Riluzole prolongs survival time and alters nuclear inclusion formation in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Mov Disord*, 17(4), 748-757.
- Schwanhausser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., et al. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473(7347), 337-342.
- Segura, M. M., Alba, R., Bosch, A., & Chillon, M. (2008). Advances in helper-dependent adenoviral vector research. *Curr Gene Ther*, 8(4), 222-235.
- Seki, T., & Arai, Y. (1993). Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci*, 13(6), 2351-2358.
- Shi, Y., Rafiee, P., Su, J., Pritchard, K. A., Jr., Tweddell, J. S., & Baker, J. E. (2004). Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels. *Basic Res Cardiol*, 99(3), 173-182.
- Shihabuddin, L. S., Horner, P. J., Ray, J., & Gage, F. H. (2000). Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*, 20(23), 8727-8735.
- Shingo, T., Sorokan, S. T., Shimazaki, T., & Weiss, S. (2001). Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci*, 21(24), 9733-9743.
- Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., & Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410(6826), 372-376.
- Signore, A. P., Weng, Z., Hastings, T., Van Laar, A. D., Liang, Q., Lee, Y. J., et al. (2006). Erythropoietin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem*, 96(2), 428-443.

- Simmons, D. A., Casale, M., Alcon, B., Pham, N., Narayan, N., & Lynch, G. (2007). Ferritin accumulation in dystrophic microglia is an early event in the development of Huntington's disease. *Glia*, 55(10), 1074-1084.
- Singla, V., & Reiter, J. F. (2006). The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science*, 313(5787), 629-633.
- Spassky, N., Merkle, F. T., Flames, N., Tramontin, A. D., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci*, 25(1), 10-18.
- Stack, E. C., Kubilus, J. K., Smith, K., Cormier, K., Del Signore, S. J., Guelin, E., et al. (2005). Chronology of behavioral symptoms and neuropathological sequela in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *J Comp Neurol*, 490(4), 354-370.
- Stack, E. C., Smith, K. M., Ryu, H., Cormier, K., Chen, M., Hagerty, S. W., et al. (2006). Combination therapy using minocycline and coenzyme Q10 in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. *Biochim Biophys Acta*, 1762(3), 373-380.
- Stone, S. S., Teixeira, C. M., Zaslavsky, K., Wheeler, A. L., Martinez-Canabal, A., Wang, A. H., et al. (2011). Functional convergence of developmentally and adult-generated granule cells in dentate gyrus circuits supporting hippocampus-dependent memory. *Hippocampus*, 21(12), 1348-1362.
- Strong, T. V., Tagle, D. A., Valdes, J. M., Elmer, L. W., Boehm, K., Swaroop, M., et al. (1993). Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat Genet*, 5(3), 259-265.
- Suhonen, J. O., Peterson, D. A., Ray, J., & Gage, F. H. (1996). Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature*, 383(6601), 624-627.
- Sun, Z., Del Mar, N., Meade, C., Goldowitz, D., & Reiner, A. (2002). Differential changes in striatal projection neurons in R6/2 transgenic mice for Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, 11(3), 369-385.
- Tan, C. C., Eckardt, K. U., Firth, J. D., & Ratcliffe, P. J. (1992). Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol*, 263(3 Pt 2), F474-481.
- Tan, C. C., Eckardt, K. U., & Ratcliffe, P. J. (1991). Organ distribution of erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats. *Kidney Int*, 40(1), 69-76.
- Terzi, D., & Zachariou, V. (2008). Adeno-associated virus-mediated gene delivery approaches for the treatment of CNS disorders. *Biotechnol J*, 3(12), 1555-1563.
- Thomas, C. E., Birkett, D., Anozie, I., Castro, M. G., & Lowenstein, P. R. (2001). Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain. *Mol Ther*, 3(1), 36-46.
- Toni, N., & Sultan, S. (2011). Synapse formation on adult-born hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 33(6), 1062-1068.

- Tronel, S., Fabre, A., Charrier, V., Oliet, S. H., Gage, F. H., & Abrous, D. N. (2010). Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(17), 7963-7968.
- Tsai, P. T., Ohab, J. J., Kertesz, N., Groszer, M., Matter, C., Gao, J., et al. (2006). A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci*, *26*(4), 1269-1274.
- van der Burg, J. M., Bacos, K., Wood, N. I., Lindqvist, A., Wierup, N., Woodman, B., et al. (2008). Increased metabolism in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, *29*(1), 41-51.
- Verbessem, P., Lemiere, J., Eijnde, B. O., Swinnen, S., Vanhees, L., Van Leemputte, M., et al. (2003). Creatine supplementation in Huntington's disease: a placebo-controlled pilot trial. *Neurology*, *61*(7), 925-930.
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Corsini, E., Villa, P., Ghezzi, P., Garau, A., et al. (2005). Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem*, *93*(2), 412-421.
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*, *1*(2), 848-858.
- Wang, H., Chen, X., Li, Y., Tang, T. S., & Bezprozvanny, I. (2010). Tetrabenazine is neuroprotective in Huntington's disease mice. *Mol Neurodegener*, *5*, 18.
- Wang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, R., & Chopp, M. (2004). Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*, *35*(7), 1732-1737.
- Wang, L., Zhang, Z. G., Gregg, S. R., Zhang, R. L., Jiao, Z., LeTourneau, Y., et al. (2007). The Sonic hedgehog pathway mediates carbamylated erythropoietin-enhanced proliferation and differentiation of adult neural progenitor cells. *J Biol Chem*, *282*(44), 32462-32470.
- Wang, L., Zhang, Z. G., Zhang, R. L., Gregg, S. R., Hozeska-Solgot, A., LeTourneau, Y., et al. (2006). Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *J Neurosci*, *26*(22), 5996-6003.
- Wang, L., Zhang, Z. G., Zhang, R. L., Jiao, Z. X., Wang, Y., Pourabdollah-Nejad, D. S., et al. (2006). Neurogenin 1 mediates erythropoietin enhanced differentiation of adult neural progenitor cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, *26*(4), 556-564.
- Wang, Y., Zhang, Z. G., Rhodes, K., Renzi, M., Zhang, R. L., Kapke, A., et al. (2007). Post-ischemic treatment with erythropoietin or carbamylated erythropoietin reduces infarction and improves neurological outcome in a rat model of focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol*, *151*(8), 1377-1384.
- Waterhouse, E. G., An, J. J., Orefice, L. L., Baydyuk, M., Liao, G. Y., Zheng, K., et al. (2012). BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J Neurosci*, *32*(41), 14318-14330.
- Weidemann, A., & Johnson, R. S. (2009). Nonrenal regulation of EPO synthesis. *Kidney Int*, *75*(7), 682-688.

- Wen, D., Boissel, J. P., Showers, M., Ruch, B. C., & Bunn, H. F. (1994). Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J Biol Chem*, 269(36), 22839-22846.
- Wen, D., Boissel, J. P., Tracy, T. E., Gruninger, R. H., Mulcahy, L. S., Czelusniak, J., et al. (1993). Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals. *Blood*, 82(5), 1507-1516.
- Weydt, P., Pineda, V. V., Torrence, A. E., Libby, R. T., Satterfield, T. F., Lazarowski, E. R., et al. (2006). Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab*, 4(5), 349-362.
- Winner, B., Cooper-Kuhn, C. M., Aigner, R., Winkler, J., & Kuhn, H. G. (2002). Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci*, 16(9), 1681-1689.
- Winner, B., Kohl, Z., & Gage, F. H. (2011). Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 33(6), 1139-1151.
- Wu, H., Lee, S. H., Gao, J., Liu, X., & Iruela-Arispe, M. L. (1999). Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development*, 126(16), 3597-3605.
- Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J. Y., et al. (1999). Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature*, 400(6742), 331-336.
- Yadlapalli, S., & Yamashita, Y. M. (2013). DNA asymmetry in stem cells - immortal or mortal? *J Cell Sci*, 126(Pt 18), 4069-4076.
- Yaguchi, M., Ohashi, Y., Tsubota, T., Sato, A., Koyano, K. W., Wang, N., et al. (2013). Characterization of the properties of seven promoters in the motor cortex of rats and monkeys after lentiviral vector-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther Methods*, 24(6), 333-344.
- Yasuda, Y., Masuda, S., Chikuma, M., Inoue, K., Nagao, M., & Sasaki, R. (1998). Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem*, 273(39), 25381-25387.
- Zanjani, E. D., Ascensao, J. L., McGlave, P. B., Banisadre, M., & Ash, R. C. (1981). Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J Clin Invest*, 67(4), 1183-1188.
- Zeron, M. M., Chen, N., Moshaver, A., Lee, A. T., Wellington, C. L., Hayden, M. R., et al. (2001). Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol Cell Neurosci*, 17(1), 41-53.
- Zhang, C. L., Zou, Y., He, W., Gage, F. H., & Evans, R. M. (2008). A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature*, 451(7181), 1004-1007.
- Zhang, J., Peng, Q., Li, Q., Jahanshad, N., Hou, Z., Jiang, M., et al. (2010). Longitudinal characterization of brain atrophy of a Huntington's disease mouse model by automated morphological analyses of magnetic resonance images. *Neuroimage*, 49(3), 2340-2351.

- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645-660.
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Jr., Ming, G. L., & Gage, F. H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci*, 26(1), 3-11.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., et al. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol*, 72(12), 9873-9880.

8. Publikationsverzeichnis

Publikationen

Böttcher C., Fernández-Klett F., Gladow N., **Rolfes S.**, Priller J. (2013)
„*Targeting myeloid cells to the brain using non-myeloablative conditioning*“
PLoS One 8(11):e80260

Janova H., Böttcher C., Holtman I., Regen T., van Rossum D., Götz A., Ernst A.S., Fritsche C., Ulla Gertig U., Saiepour N., Gronke K., Wrzos C., Ribes S., **Rolfes S.**, Weinstein J., Ehrenreich H., Pukrop T., Kopatz J., Stadelmann-Nessler C., Salinas-Riester G., Prinz M., Brück W., Eggen B., Boddeke H., Priller J., Hanisch U.K.
„*CD14 is a key organizer in TLR4-mediated responses of microglia to CNS infection and damage*“
J Mol Cell Biol (Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht)

Rolfes S., Lyras E.M., Matute E., Böttcher C.*, Priller J.*
„*Lentiviral vector encoding erythropoietin attenuates hippocampal atrophy and improves cognition in a mouse model of Huntington’s disease*“
* beide Autoren haben zu gleichen Teilen zum Manuskript beigetragen und teilen sich die Letztautorenschaft
(Manuskript in Vorbereitung)

Posterpräsentationen

Rolfes, S., Lyras, E.M., Böttcher, C., Priller, J. (2013)
„*The impact of erythropoietin (EPO) and its isoforms on murine neurogenesis*“
XI European Meeting on Glial Cells in Health and Disease 2013, Berlin

Rolfes, S., Böttcher, C., Priller J. (2014)
„*Therapeutic potential of erythropoietin in a mouse model of Huntington’s disease*“
ESGCT and NVGCT Collaborative Congress 2014, The Hague

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

10. Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

AVV	Adeno-assoziiertes-Virus
BrdU	5-Bromo-3'-desoxyuridin
CCL2	<i>Chemokine (C-C-motif) ligand 2</i>
CHO-S	Suspensionszelllinie aus den Ovarien von chinesischen Hamstern (<i>chinese hamster ovary cells</i>)
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
DAB	3,3' Diaminobenzidin
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol
DCX	<i>Doublecortin</i>
DG	Gyrus dentatus
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin
EGF	Epidermale Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietin Rezeptor
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase</i>
GCL	Körnerzellschicht
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
h	Stunden
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie

hEPO	Humanes Erythropoietin
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hS3	Humane Erythropoietin-Isoform
hS4	Humane Erythropoietin-Isoform
i.p.	Intraperitoneal
Iba1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
ICV	Intraventrikuläre Injektion
IE	Infektiöse Einheit
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
LV	Lentivirus
Mash 1	<i>Mammalian achaete-scute homologue</i>
MCL	Molekularzellschicht
min	Minuten
mS	Murine Erythropoietin-Isoform
MSCV	<i>Murine stem cell virus</i>
NCSs/NPCs	Neuronale Stamm- und Vorläuferzellen (<i>neuronal stem- and precursor cells</i>)
NDS	<i>Normal donkey serum</i>
NeuN	<i>Neuronal nuclear protein</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLL	Poly-L-Lysin
qRT-PCR	Quantitative <i>real-time</i> PCR
rEPO	Rekombinantes Erythropoietin
rhEPO	Rekombinantes humanes Erythropoietin
rhS3	Rekombinantes hS3
rmEPO	Rekombinantes murines Erythropoietin
RMS	Rostraler migratorischer Strom

rmS	Rekombinantes mS
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SGZ	Subgranuläre Zone
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
SVZ	Subventrikuläre Zone
TNF α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
vEPO	Endogen exprimierte Erythropoietin- Isoformen hS3 oder mS
VSV-G	Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

10.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die adulte Neurogenese der subventrikulären Zone (SVZ).....	4
Abbildung 2:	Die adulte Neurogenese der subgranulären Zone (SGZ).....	6
Abbildung 3:	Strukturelle Organisation von EPO und vEPO	16
Abbildung 4:	Lentivirales System der dritten Generation	21
Abbildung 5:	pCL20c-MSCV-Vektorplasmid	43
Abbildung 6:	Standardkurven zur Bestimmung des Virustiters (IE/µl).....	48
Abbildung 7:	Y-Maze-Testapparatur zur Bestimmung der Arbeitsgedächtnisleistung	53
Abbildung 8:	Bestimmung des Hämatokritwerts	54
Abbildung 9:	Morphologische Charakterisierung DCX-exprimierender Zellen im DG	60
Abbildung 10:	Gating-Schema zur Erfassung hippocampaler Mikroglia-Populationen.....	62
Abbildung 11:	Nachweis von mS-Transkripten in Neurosphären.....	64
Abbildung 12:	Western-Blot-Analyse der basalen Proteinexpression von EPO und vEPO	66
Abbildung 13:	Einfluss von rekombinantem EPO und vEPO auf das Überleben und die Proliferation von ex vivo kultivierten NSCs/NPCs	68
Abbildung 14:	Differenzierung von NSCs/NPCs in Gegenwart von rekombinantem EPO und vEPO.....	70
Abbildung 15:	Rekombinates EPO und vEPO fördern das Wachstum von Neuroblasten...	71
Abbildung 16:	Nachweis einer Transgenexpression in mit lentiviralen Partikeln (pCL20c-MSCV) transduzierten NSCs/NPCs	73
Abbildung 17:	Experimentelles Design und Nachweis der Transgenexpression 3 Tage und 30 Tage nach ICV	75
Abbildung 18:	Bestimmung der Hämatokritwerte 3 Tage und 30 Tage post ICV lentiviraler Partikel	77
Abbildung 19:	Einfluss von hEPO, hS3 und mS auf die Anzahl an Neuroblasten 3 Tage nach ICV lentiviraler Partikel.....	78
Abbildung 20:	Einfluss von hEPO, hS3 und mS auf proliferierende Zellen der SVZ 3 Tage nach ICV lentiviraler Partikel.....	80
Abbildung 21:	Bestimmung des prozentualen Anteils an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen der SVZ 3 Tage nach ICV lentiviraler Partikel.....	81
Abbildung 22:	Einfluss von hEPO, hS3 und mS auf die Anzahl an Neuroblasten der SVZ 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel.....	83
Abbildung 23:	Einfluss von hEPO, hS3 und mS auf proliferierende Zellen der SVZ 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel.....	84
Abbildung 24:	Bestimmung des prozentualen Anteils an DCX-BrdU-doppelpositiven Zellen der SVZ 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel.....	86
Abbildung 25:	Experimentelles Design.....	88

Abbildung 26	Analyse der Genexpression von hEPO und GFP 30 Tage nach ICV	89
Abbildung 27:	Immunhistochemischer Nachweis einer spezifischen hEPO-Expression in hippocampalen Neuronen und Bestimmung der Hämatokritwerte 30 Tage nach ICV	91
Abbildung 28:	Einfluss von hEPO auf das Körpergewicht, die Koordinations- und Ausdauerfähigkeit auf dem RotaRod sowie auf die Gesamtaktivität im Open-Field-Test	93
Abbildung 29:	Die Expression von hEPO führt zu einer Verbesserung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses von R6/2 Mäusen.....	95
Abbildung 30:	Volumetrie des Hippocampus und Striatums	97
Abbildung 31:	Volumetrie des Cortex und Corpus callosum	98
Abbildung 32:	hEPO fördert das Wachstum von Neuroblasten im Gyrus dentatus (DG) von R6/2 Mäusen 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel.....	100
Abbildung 33:	Einfluss von hEPO auf Stammzellen des hippocampalen DG von R6/2 Mäusen.....	102
Abbildung 34:	Einfluss von hEPO auf die Neurogenese der SVZ von R6/2 Mäusen	104
Abbildung 35:	Die Expression von hEPO führt zu keiner Regulation der Expression pro-inflammatorischer Zytokine innerhalb des Hippocampus.....	106
Abbildung 36:	hEPO nimmt keinen Einfluss auf die Anzahl an Iba1-exprimierenden Zellen des DG von R6/2 Mäusen	107
Abbildung 37:	hEPO nimmt keinen Einfluss auf aktivierte hippocampale Mikroglia-Populationen im R6/2 Mausmodell	108

10.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammenfassung der Wirkung einer lentiviral vermittelten Expression von hEPO, hS3 und mS auf Zellen der SVZ 3 Tage nach ICV lentiviraler Partikel	82
Tabelle 2:	Zusammenfassung der Wirkung einer lentiviral vermittelten Expression von hEPO, hS3 und mS auf Zellen der SVZ 30 Tage nach ICV lentiviraler Partikel	87
Tabelle 3:	Wirkung der lentiviral vermittelten Expression von hEPO, hS3 und mS auf Zellen der SVZ	87

10.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

Ein Promotionsverfahren wurde zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich beantragt.

Berlin,

Simone Rolfes