

Aus der Abteilung Klinische Neurowissenschaften
(Leiterin Prof. Dr. med. Dr. med. vet. H. Ehrenreich)
des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin
in Göttingen

**Zur Rolle des homodimeren Erythropoietin-
Rezeptors für erythropoietininduzierte
Neurogenese und kognitive Funktionen im
Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Matthias Achim Richard Zillmann

aus

Höxter

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuerin: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. H. Ehrenreich

Ko-Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. S. Rizzoli

Prüfungskommission

Referentin: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. H. Ehrenreich

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. S. Rizzoli

Datum der mündlichen Prüfung: 23.06.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Zur Rolle des homodimeren Erythropoietin-Rezeptors für erythropoietininduzierte Neurogenese und kognitive Funktionen im Mausmodell" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 11.12.2021

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Wakhloo D, Scharkowski F, Curto Y, Javed Butt U, Bansal V, Steixner-Kumar AA, Wüsterfeld L, Rajput A, Arinrad S, **Zillmann MR**, et al. (2020): Functional hypoxia drives neuroplasticity and neurogenesis via brain erythropoietin. *Nat Commun* 11, 1313

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Erythropoietin.....	1
1.2 Funktion von Erythropoietin im zentralen Nervensystem.....	3
1.3 Funktion von Erythropoietin im Hippocampus	4
1.4 Homodimerer Erythropoietin-Rezeptor	6
1.5 Ziele dieser Arbeit	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Versuchsablauf.....	9
2.2 Mauslinien NexCre::EpoR und NexCre::Epo	10
2.3 Genotypisierung	11
2.4 Tierhaltung und Tierethik	12
2.5 Verhaltensexperimente	12
2.5.1 Complex Running Wheel.....	12
2.5.2 Puzzle Box.....	13
2.6 Histologische Untersuchung	14
2.6.1 Gehirnentnahme und Verarbeitung zu Hirnschnitten	14
2.6.2 Auswahl und Färbung der Hirnschnitte	14
2.6.3 Mikroskopie und Auswertung der Hirnschnitte.....	15
2.7 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.....	16
2.7.1 Präparation des Cornu ammonis 1	16
2.7.2 Extraktion der Ribonukleinsäuren.....	16
2.7.3 Synthese komplementärer Desoxyribonukleinsäure aus Ribonukleinsäure	17
2.7.4 Amplifizierung komplementärer Desoxyribonukleinsäure.....	17
2.7.5 Auswertung	18
2.8 Verblindung und statistische Analyse	18
2.9 Materialien	19
3 Ergebnisse	29
3.1 Rolle des homodimeren Erythropoietin-Rezeptors für kognitive Funktionen	29
3.1.1 Complex Running Wheel.....	29
3.1.2 Puzzle Box.....	32
3.2 Rolle des homodimeren Erythropoietin-Rezeptors für erythropoietininduzierte Neurogenese.....	35

3.3	Genexpression von Erythropoietin und homodimeren Erythropoietin-Rezeptor.....	36
4	Diskussion	39
4.1	Complex Running Wheel.....	39
4.2	Puzzle Box.....	40
4.3	Erythropoietininduzierte Neurogenese.....	44
4.4	Genexpression von Erythropoietin und homodimerem Erythropoietin-Rezeptor.....	45
4.5	Limitationen	47
4.6	Ausblick	47
5	Zusammenfassung.....	49
6	Summary	50
7	Literaturverzeichnis	51

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsablauf zur Testung kognitiver Funktionen mittels Complex Running Wheel und Puzzle Box und zur Untersuchung der erythropoietininduzierten Neurogenese in der Mauslinie NexCre::EpoR.	9
Abbildung 2: Versuchsablauf zur Untersuchung der Genexpression von Erythropoietin und homodimerem Erythropoietin-Rezeptor im Cornu ammonis 1 in den Mauslinien NexCre::EpoR und NexCre::Epo.	10
Abbildung 3: Aufbau des Complex Running Wheel.	12
Abbildung 4: Aufbau der Puzzle Box.	13
Abbildung 5: Complex Running Wheel: Vergleich der Laufstrecken erythropoietin- bzw. placebobehandelter Wildtypen und Knockouts der Mauslinie NexCre::EpoR.	30
Abbildung 6: Puzzle Box: Vergleich der Hindernisüberwindungszeiten zwischen erythropoietinbehandelten Wildtypen und placebobehandelten Wildtypen der Mauslinie NexCre::EpoR.	32
Abbildung 7: Puzzle Box: Vergleich der Hindernisüberwindungszeiten zwischen erythropoietinbehandelten Wildtypen und erythropoietinbehandelten Knockouts der Mauslinie NexCre::EpoR.	33
Abbildung 8: Puzzle Box: Vergleich der Hindernisüberwindungszeiten zwischen placebobehandelten Wild-typen und placebobehandelten Knockouts der Mauslinie NexCre::EpoR.	34
Abbildung 9: Puzzle Box: Vergleich der Hindernisüberwindungszeiten zwischen placebobehandelten Knockouts und erythropoietinbehandelten Knockouts der Mauslinie NexCre::EpoR.	35
Abbildung 10: Erythropoietininduzierte Neurogenese im Cornu ammonis 1: Vergleich zwischen Wildtypen und Knockouts der Mauslinie NexCre::EpoR.	36
Abbildung 11: Genexpression von Erythropoietin und homodimeren Erythropoietin-Rezeptor im Cornu ammonis 1: Vergleich von Wildtypen und Knockouts der Mauslinien NexCre::EpoR und NexCre::Epo.	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsablauf Puzzle Box.....	13
Tabelle 2: Chemikalien.....	19
Tabelle 3: Lösungen.....	22
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.....	24
Tabelle 5: Antikörper.....	24
Tabelle 6: PCR-Primer.....	25
Tabelle 7: Tierhaltung und Verhaltensexperimente.....	26
Tabelle 8: Geräte.....	27
Tabelle 9: Software.....	28

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäuren
BP	Basenpaare
CA	<i>Cornu ammonis</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRW	<i>Complex Running Wheel</i>
Ctip2	<i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor Interacting Protein 2</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
Epo	Erythropoietin
EpoR	homodimerer Erythropoietin-Rezeptor
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
IU	internationale Einheiten
KG	Körpergewicht
KO	Knockout(s)
Nex	Nex1/NeuroD6 Promotor 51
NHS	<i>Normal Horse Serum</i>
Oligo(dT)	Oligodesoxythymidinnukleotide
P	postnataler Tag
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHD2	<i>Prolyl Hydroxylase Domain Protein 2</i>
QIAzol®	Phenol-Guanidinthiocyanat-Lösung
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
REP	<i>Renal-Erythropoietin-Producing</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SE	Schnittebene
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WT	Wildtyp(en)

1 Einleitung

Das Gehirn erfüllt vielfältige Funktionen, darunter Sinneswahrnehmung, Lernen, Denken, Emotionsverarbeitung und die Koordination von Körperfunktionen. Erkrankungen des Gehirns beeinträchtigen die Lebensqualität betroffener Patienten entsprechend stark, sie treten in allen Altersklassen auf und sind insgesamt häufig (Vos et al. 2020). Trotz unterschiedlicher Ätiologie der Gehirnerkrankungen treten im Verlauf zumeist Schädigungen ein, für die bislang nur begrenzt wirksame Therapien zur Verfügung stehen.

Erythropoietin (Epo) ist ein körpereigener Wachstumsfaktor, der im Kontext der Blutbildung entdeckt und nach seiner stimulierenden Wirkung auf die Bildung von Erythrozyten benannt wurde (Bonsdorff und Jalavisto 1948; Reissmann 1950; Erslev 1953; Jelkmann 2007). Epo vermittelt Proliferation, Differenzierung und antiapoptotische Wirkung auf hämatopoietische Vorläuferzellen (Jelkmann 1992). Die rekombinante Herstellung von Epo ermöglicht eine therapeutische Anwendung bei Anämie infolge chronischer Niereninsuffizienz (Lin et al. 1985). Unter Epo-Behandlung wurden bei Patienten auch kognitive Verbesserungen beobachtet (Nissenson 1989). Dies führte zur Untersuchung pleiotroper Effekte von Epo. In klinischen Studien zeigte Epo positive Wirkungen in zahlreichen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen (Nekoui und Blaise 2017; Suresh et al. 2020). Die gegenwärtige Aufdeckung der zugrunde liegenden Wirkmechanismen dient der Entwicklung gezielter, wirksamer Therapien.

Im Folgenden soll zunächst die Funktion von Epo, insbesondere im zentralen Nervensystem, sowie die diesbezügliche Bedeutung des *Hippocampus* erläutert werden, um hieraus die Fragestellung der vorliegenden Arbeit zu entwickeln.

1.1 Erythropoietin

Das Glykoprotein und Zytokin Epo besteht aus 165 Aminosäuren (AS), es weist vier α -Helices auf (Jacobs et al. 1985; Recny et al. 1987; Cheetham et al. 1998). Zwei intramolekulare Disulfidbrücken Cys²⁹–Cys³³ und Cys⁷–Cys¹⁶¹ stabilisieren die globuläre Tertiärstruktur (Wang et al. 1985; Boissel et al. 1993; Cheetham et al. 1998). Das Molekulargewicht des Glykoproteins beträgt 30,4 Kilodalton, wovon jedoch nur circa 40 % auf den Peptidanteil entfallen (Lai et al. 1986; Davis et al. 1987). Eine umfangreiche, komplexkettige Glykosylierung mit heterogener Sialysierung findet an den AS Ser¹²⁶, Asn²⁴, Asn³⁸ sowie Asn⁸³ statt und trägt

zur metabolischen Beständigkeit und strukturellen Stabilität des Zytokins bei (Sasaki et al. 1987; Takeuchi et al. 1990; Narhi et al. 1991; Wasley et al. 1991).

Die Epo-Synthese erfolgt in Abhängigkeit zur Sauerstoffverfügbarkeit und wird transkriptionell reguliert (Beru et al. 1986; Bondurant und Koury 1986). Eine erhöhte Genexpression findet statt, wenn der *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) am 3' gelegenen *Hypoxia Responsive Element* (HRE) des *Epo*-Gens bindet (Semenza und Wang 1992; Wang und Semenza 1993a; Wang und Semenza 1993b). Voraussetzung dieser Bindung ist, dass das Heterodimer HIF, bestehend aus der zytosolischen Untereinheit α und der nukleären Untereinheit β , zusammentritt (Wang und Semenza 1995). Bei ausreichend hoher Sauerstoffverfügbarkeit wird das Zusammentreten jedoch verhindert, indem die *Oxygen-Dependent Degradation* (ODD)-Domäne der zytosolischen α Untereinheit durch das Enzym *Prolyl Hydroxylase Domain Protein 2* (PHD2) hydroxyliert wird, infolgedessen durch das Enzym von-Hippel-Lindau (VHL)-Ubiquitin-E3-Proteinligase ubiquitinyliert und schließlich durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert wird (Ivan et al. 2001; Jaakkola et al. 2001; Yu et al. 2001; Bruick und McKnight 2001; Epstein et al. 2001; Maxwell et al. 1999; Kamura et al. 2000; Salceda und Caro 1997). Bei geringer Sauerstoffverfügbarkeit hingegen verliert das Enzym PHD2 das zur Hydroxylierung notwendige Redoxpotential, sodass die Untereinheit α nicht mehr degradiert wird und infolgedessen mit der nukleären Untereinheit β zusammentritt und die Epo-Synthese stimuliert wird (Bruick und McKnight 2001; Epstein et al. 2001; Guzy et al. 2005; Mansfield et al. 2005).

Der Ort der meisten Epo-Synthese wechselt während der ontogenetischen Entwicklung. Pränatal überwiegt die hepatische Synthese in Hepatozyten und interstitiellen Ito-Zellen (Zanjani et al. 1977; Maxwell et al. 1994; Koury et al. 1991). Postnatal überwiegt die renale Synthese durch *Renal-Erythropoietin-Producing* (REP)-Zellen, eine Subpopulation tubulointerstitieller Fibroblasten des Nierenkortex und der kortikomedullären Übergangzone, die mehrheitlich von Neuralleistenzellen abstammt (Koury et al. 1988; Lacombe et al. 1988; Bachmann et al. 1993; Suzuki 2015; Nolan und Wenger 2018; Shih et al. 2018). Die REP-Zellen verlieren bei chronischer Niereninsuffizienz die Funktion der Epo-Synthese durch Transdifferenzierung in Myofibroblasten (Asada et al. 2011).

Die Anämie infolge chronischer Niereninsuffizienz kann mithilfe rekombinanten Epos zuverlässig behandelt werden (Lin et al. 1985; Bondurant und Koury 1986). Unter Epo-Therapie fiel auf, dass kognitive Funktionen zunehmen, ebenfalls Wohlbefinden, Appetit, Aktivität, Sexualfunktion und Lebensqualität (Eschbach et al. 1989; Nissenson 1989; Nissenson 1991). Als streng objektive Korrelate liegen u. a. eine beschleunigte Prozessierung evozierter

Potentiale sowie ein messbar höherer Intelligenzquotient (IQ) vor (Grimm et al. 1990; Temple et al. 1992; Temple et al. 1995). Die Beobachtung kognitiver Funktionsverbesserung infolge einer Behandlung mit Epo begründete das für diese Arbeit relevante Forschungsfeld über die Funktion von Epo im zentralen Nervensystem.

1.2 Funktion von Erythropoietin im zentralen Nervensystem

Die Expression von Epo wurde im Gehirn von Menschen wie auch von Mäusen nachgewiesen, darüber hinaus in Lungen, Herz, Milz und Geschlechtsorganen (Tan et al. 1991; Tan et al. 1992; Fandrey und Bunn 1993; Masuda et al. 1994; Digicaylioglu et al. 1995; Marti et al. 1996; Yasuda et al. 1998; Masuda et al. 2000; Magnanti et al. 2001; Mengozzi et al. 2006). Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass *Hippocampus* und *Cortex* die höchste Expression von Epo aufweisen (Digicaylioglu et al. 1995; Marti et al. 1996). In geringerem Maße findet sie in *Cerebellum*, *Mesencephalon*, *Amygdala*, *Capsula interna* und *Plexus choroideus* statt (Digicaylioglu et al. 1995; Marti et al. 1996; Dame et al. 2000; Sirén et al. 2001a). Die an der Epo-Expression beteiligten Zellen sind Neurone, Astrozyten, Mikroglia, Endothelzellen und Perizyten (Juul et al. 1999; Bernaudin et al. 1999; Bernaudin et al. 2000; Chin et al. 2000; Nagai et al. 2001; Sirén et al. 2001a; Masuda et al. 1994; Marti et al. 1996; Yamaji et al. 1996; Urrutia et al. 2016; Ma et al. 2016). Vergleichbar zum hämatopoietischen System erfolgt unter Sauerstoffmangel eine erhöhte Expression, außerdem bei intensiver neuronaler Aktivität und mechanischem Trauma (Tan et al. 1992; Lewczuk et al. 2000; Sirén et al. 2001a; Ott et al. 2015; Wakhloo et al. 2020; Butt et al. 2021)

Der direkte Nachweis einer zentralnervösen Funktion von Epo gelang erstmals *in vitro*, wo Epo Neurone des *Hippocampus* und *Cortex* vor Glutamat-induzierter Exzitotoxizität schützt (Morishita et al. 1996; Sakanaka et al. 1998). Auch *in vivo* besteht eine neuroprotektive Wirkung von endogen gebildetem Epo: Durch intrakranielle Injektion eines löslichen Epo-Rezeptors kann das von Mäusen endogen gebildete Epo neutralisiert werden, woraufhin ein nachfolgend induzierter ischämischer Schaden deutlich stärker ausgeprägt ist als in Kontrollen (Sakanaka et al. 1998). Die Verabreichung von exogenem, rekombinantem Epo offenbart zusätzliches neuroprotektives und somit therapeutisches Potential in Ischämie- und Trauma-Modellen (Sadamoto et al. 1998; Brines et al. 2000). Darüber hinaus besteht Evidenz für antiinflammatorische, antioxidative, antiapoptotische und angiogene Wirkungen von Epo im zentralen Nervensystem (Agnello et al. 2002; Bartels et al. 2008; Maiese et al. 2008; Kimáková et al. 2017).

Es wurde ferner gezeigt, dass peripher verabreichtes Epo die intakte menschliche Blut-Hirn-Schranke überwindet (Ehrenreich et al. 2004). Klinische Studien untersuchten daraufhin das therapeutische Potential einer Epo-Behandlung für Erkrankungen des menschlichen Gehirns. Nachfolgend sollen exemplarisch einige dieser neuropsychiatrischen Krankheitsbilder vorgestellt werden. In chronischer Schizophrenie beeinflusst Epo die neurodegenerative Krankheitskomponente durch den Erhalt grauer Substanz und Besserung krankheitsrelevanter kognitiver Funktionen (Ehrenreich et al. 2007a; Wüstenberg et al. 2011). Eine Epo-Behandlung bei multipler Sklerose verbessert motorische und kognitive Funktionen (Ehrenreich et al. 2007b; Varzaneh et al. 2014). Die prokognitive Funktion von Epo ist auch bei unipolarer Depression und bipolarer Störung nachweisbar, insbesondere wird die Gedächtnisfunktion verbessert (Miskowiak et al. 2009; 2010; 2014a; 2014b; 2015). Gleichzeitig werden affektive Krankheitskomponenten durch die Therapie mit Epo nur gering beeinflusst, was das Potential als sichere, prokognitive *Add-On*-Strategie verdeutlicht (Miskowiak et al. 2014a). Auch die Behandlung gesunder Probanden mit Epo führt in funktioneller Bildgebung zu erhöhter Aktivität des *Hippocampus* (Miskowiak et al. 2007).

Die in klinischen Studien und bei gesunden Probanden beobachtete kognitive Funktionsverbesserung wurde detailliert im Tiermodell untersucht, um zugrunde liegende Wirkmechanismen von Epo zu entschlüsseln. Hierbei wurde der *Hippocampus* als eine besonders Epo-responsive Hirnregion identifiziert, sodass die entsprechenden Erkenntnisse nachfolgend im Kontext des *Hippocampus* vorgestellt werden sollen.

1.3 Funktion von Erythropoietin im Hippocampus

Der *Hippocampus* ist eine Hirnregion des *Telencephalons*, dessen phylogenetische Entwicklung bis zu den Amnioten zurückreicht und die somit allen Säugetieren gemein ist (Striedter 2016). Die Funktion des *Hippocampus* besteht einerseits in der Gedächtnisbildung (Opitz 2014), sodass nach beidseitiger operativer Entfernung des *Hippocampus* bei dem Patienten H.M. eine irreversible, anterograde Amnesie auftrat (Scoville und Milner 1957). Andererseits spielt der *Hippocampus* eine wichtige Rolle für das Erinnerungsvermögen. Dies erklärt die Symptomatik der Alzheimer Demenz, bei welcher der *Hippocampus* in besonderer Weise betroffen ist (Moodley und Chan 2014). Weiterhin ist der *Hippocampus* an räumlicher Orientierung beteiligt (Lisman et al. 2017).

Der histologische Aufbau des *Hippocampus* umfasst drei Regionen: *Cornu ammonis* (CA), *Gyrus dentatus* und *Subiculum* (Schultz und Engelhardt 2014). Alle Regionen zählen zum *Allocortex*

und sind aus drei Zellschichten aufgebaut. Hierbei wird jeweils eine kompakte, innere Zellschicht von zwei zellarmen Schichten umgeben. Die kompakte Zellschicht des CA wird als *Stratum pyramidale* bezeichnet und besteht überwiegend aus glutamatergen Pyramidenzellen. Im *Gyrus dentatus* wird die zellreiche Schicht, genannt *Stratum granulare*, von glutamatergen Körnerzellen gebildet. Die Pyramidenzellen des CA unterscheiden sich in ihren Afferenzen und Efferenzen, sodass als Subregionen CA 1, CA 2 und CA 3 unterschieden werden. Die Pyramidenzellen des CA 3 erhalten über die sog. Moosfasern Projektionen aus dem *Stratum granulare* des *Gyrus dentatus*. Über Schaffer-Kollaterale projizieren die Pyramidenzellen des CA 3 zu den Pyramidenzellen des CA 1, welche wiederum über das *Subiculum* mit dem entorhinalen Kortex verbunden sind, von wo der *Gyrus dentatus* Afferenzen erhält (Knowles 1992). Das *Stratum granulare* des *Gyrus dentatus* ist als Region der postnatalen Neurogenese bekannt und liegt im Bereich des inneren Übergangs zur zellarmen Schicht, der subgranulären Zone.

Der *Hippocampus* wurde als besonders Epo-responsive Hirnregion identifiziert, als die aus klinischen Studien bekannte Epo-induzierte kognitive Funktionsverbesserung systematisch im Tiermodell untersucht wurde. Hierzu erfolgte eine Behandlung mit Epo über drei Wochen mit intraperitonealen Injektionen von jeweils 5.000 internationalen Einheiten (IU) pro Kilogramm Körpergewicht (KG) an jedem zweiten Tag (Adamcio et al. 2008; El-Kordi et al. 2009; Hassouna et al. 2016). Die Epo-Behandlung verbessert vom *Hippocampus* abhängige kognitive Funktionen wie kontextspezifische Angstkonditionierung oder operante Konditionierung mittels *Five Choice Serial Reaction Time Task* oder *Touch Screen Paradigm* (Adamcio et al. 2008; El-Kordi et al. 2009; Hassouna et al. 2016). Ferner steigt die Langzeitpotenzierung als elektrophysiologisches Korrelat von Lernen und Gedächtnis, ebenso die synaptische Plastizität in Schaffer-Kollaterale des CA 1 sowie die Dichte dendritischer Fortsätze (Adamcio et al. 2008; Wakhloo et al. 2020). Auf zellulärer Ebene induziert Epo eine Neurogenese von Pyramidenzellen und Oligodendrozyten im CA 1 und CA 3 von 20 % der vorbestehenden Zellen, begleitet von einer Volumenzunahme des *Hippocampus* (Hassouna et al. 2016). Die beobachtete Neurogenese beruht weder auf erhöhter Proliferation noch verringerter Apoptose, sondern kann auf eine Differenzierung aus Vorläufzellen zurückgeführt werden. Die erhöhte Zahl an Pyramidenzellen bleibt unter andauernder kognitiver Aktivität erhalten, wohingegen sie ohne Aktivität wieder abnimmt (Hassouna et al. 2016). Es wurde ferner gezeigt, dass bei kognitiver Herausforderung eine funktionelle Hypoxie in Pyramidenzellen induziert wird, einhergehend mit einer Zunahme der Epo-Expression. Dies deutet darauf hin, dass Epo eine physiologische Funktion im *Hippocampus* erfüllt, die durch eine exogene Epo-

Behandlung verstärkt werden kann (Hassouna et al. 2016; Wakhloo et al. 2020; Butt et al. 2021).

Zusammenfassend besteht beachtlicher Fortschritt im Verständnis der Wirkung von Epo im zentralen Nervensystem. Gleichzeitig ist jedoch noch weitgehend unverstanden, an welchem Rezeptor Epo die prokognitiven Effekte vermittelt. Zur Entwicklung zielgerichteter Therapien ist dies von besonderer Bedeutung. Daher soll in dieser Arbeit die Rolle des „klassischen“, homodimeren Epo-Rezeptors untersucht werden. Dieser wurde im Kontext der Hämatopoiese charakterisiert und anschließend auch in Neuronen des Gehirns nachgewiesen (D’Andrea et al. 1989a; Digicaylioglu et al. 1995). Daneben werden gegenwärtig drei weitere Epo-Rezeptoren im zentralen Nervensystem diskutiert: erstens ein heterodimerer Epo-Rezeptor, bestehend aus dem homodimeren Epo-Rezeptor und dem *Common Beta Receptor*, zweitens der *Human Orphan Cytokine Receptor-Like Factor 3* und drittens der *Ephrin B4 Receptor* (Ostrowski und Heinrich 2018). Hieraus ergibt sich die Relevanz zu untersuchen, welche Rolle der homodimere Epo-Rezeptor für die Vermittlung der prokognitiven Effekte von Epo spielt.

Nachfolgend soll zur Überleitung auf die Ziele dieser Arbeit eine Zusammenfassung grundlegender Kenntnisse über den homodimeren Epo-Rezeptor (im Folgenden als „EpoR“ bezeichnet) vorgestellt werden.

1.4 Homodimerer Erythropoietin-Rezeptor

Der EpoR ist ein Transmembran-Rezeptor, der zu den Typ-1-Zytokinrezeptoren zählt und dessen Untereinheiten aus jeweils 507 AS bestehen (D’Andrea et al. 1989b; D’Andrea et al. 1989a; Bazan 1990; Cosman et al. 1990). Die Signaltransduktion beruht einerseits auf dem Zusammentreten zweier Untereinheiten zu einem Dimer und andererseits auf einer Konformationsänderung des Dimers infolge der Ligandenbindung (Livnah et al. 1998; Livnah et al. 1999). Hierdurch werden die zytosolisch mit dem Rezeptor assoziierten Januskinasen JAK2 einander angenähert und durch Transphosphorylierung aktiviert (Witthuhn et al. 1993; Feng et al. 1997). JAK2 vermittelt daraufhin die Phosphorylierung mehrerer Tyrosinreste des EpoR, sodass Interaktionen mit SH2-Proteindomänen stattfinden und zusätzliche Signalwege aktiviert werden, darunter STAT, PI3K/AKT/PKB, Ras-MEK, ERK1/2 und NF- κ B (Dusanter-Fourt et al. 1992; Sirén et al. 2001b; Byts et al. 2008; Digicaylioglu und Lipton 2001).

Die Untersuchung des EpoR im zentralen Nervensystem war lange Zeit durch methodische Limitationen, darunter unspezifische Antikörper, erschwert (Ott et al. 2015). *In-vivo*-Untersuchungen mithilfe einer Deletion des *Epor*-Gens führten embryonal zu Letalität infolge schwerer Anämie und Hypoxie (Lin et al. 1996). In diesen Tiermodellen liegt zwar eine Fehlentwicklung der embryonalen Neurogenese vor, für die neben dem zerebralen EpoR-Mangel jedoch auch die Hypoxie ursächlich sein könnte (Tsai et al. 2006). Die selektive Expression des EpoR ausschließlich in hämatopoietischen Zellen bewahrt vor embryonaler Letalität, sodass bessere Rückschlüsse auf die Funktion des EpoR im zentralen Nervensystem möglich sind (Suzuki et al. 2002). Hierbei tritt eine verringerte Proliferationsrate in der subventrikulären Zone auf und die Regenerationsfähigkeit im Schlaganfall- und Traumamodell ist eingeschränkt (Tsai et al. 2006; Chen et al. 2007; Xiong et al. 2008). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Induktion des EpoR in Neuronen der *Amygdala* die neuroprotektive Wirkung einer Epo-Behandlung bei Pilocarpin-induziertem *Status epilepticus* erhöht (Sanchez et al. 2009). Auch nimmt die Prognose eines Glioblastoms mit der Expression des protektiven EpoR in Tumorzellen ab (Yin et al. 2007).

Ein genetisch veränderter, konstitutiv aktivierter EpoR in Pyramidenneuronen des *Cortex* und *Hippocampus* von Mäusen führt zu verbesserter kognitiver Funktion, darunter räumliches Lernen, soziales Gedächtnis, Aufmerksamkeit und kognitive Flexibilität (Sargin et al. 2011).

1.5 Ziele dieser Arbeit

Die bisherigen Untersuchungen zum EpoR im zentralen Nervensystem beruhen überwiegend auf ungezielten Knockout-Modellen oder unspezifischen Antikörpern (Ott et al. 2015). Gleichzeitig werden vier verschiedene Rezeptoren für Epo diskutiert (Ostrowski und Heinrich 2018). Bislang ist unklar, welcher Rezeptor die Epo-induzierte kognitive Funktionsverbesserung maßgeblich vermittelt. Daher soll diese Arbeit erstmals mit einem zielgerichteten und zellspezifischen Ansatz die Rolle des (homodimeren) EpoR in Projektionsneuronen untersuchen. Hierfür wird die Mauslinie *NexCre::EpoR* verwendet, in welcher die Deletion des *Epor*-Gens mittels Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des projektionsneuronspezifischen *Nex1/NeuroD6* Promotors 51 (*Nex*) möglich ist.

Folgende Hypothesen sollen unter Annahme einer maßgeblichen Rolle des EpoR durch den Vergleich von Wildtypen (WT) und Knockouts (KO) überprüft werden:

Erstens: Der Knockout des EpoR in Projektionsneuronen führt zu verminderten kognitiven Funktionen.

Zweitens: Der Knockout des EpoR in Projektionsneuronen verhindert die Epo-induzierte kognitive Funktionsverbesserung.

Hierzu werden die Verhaltenstests *Complex Running Wheel* (CRW) und *Puzzle Box* genutzt, in denen das Zusammenwirken verschiedener kognitiver Funktionen benötigt wird.

Drittens: Der Knockout des EpoR in Projektionsneuronen verhindert die Epo-induzierte Neurogenese im CA 1 des *Hippocampus*.

Hierzu erfolgt die histologische Quantifizierung der Pyramidenzellen des CA 1.

Viertens: Der Knockout des EpoR in Projektionsneuronen bewirkt eine Veränderung des Genexpressionsmusters des EpoR.

Hierzu erfolgt eine quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) aus Gewebe des CA 1.

Somit verfolgt diese Arbeit das Ziel, die Rolle des EpoR in Projektionsneuronen des zentralen Nervensystems und insbesondere des *Hippocampus* hinsichtlich kognitiver Funktionen, Epo-induzierter Neurogenese und Genexpression zu untersuchen. Die Ergebnisse sollen somit einen Beitrag zur Identifizierung von molekularen Zielstrukturen wirksamer Therapiestrategien für neurologische und psychiatrische Erkrankungen leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsablauf

In Abbildung 1 wird der Versuchsablauf zur Verhaltenstestung kognitiver Funktionen in CRW und *Puzzle Box* sowie zur Untersuchung der Epo-induzierten Neurogenese dargestellt. Männliche Mäuse der Linie NexCre::EpoR erhielten ab dem postnatalen Tag (P) 28 an jedem zweiten Tag intraperitoneale Injektionen mit Epo bzw. Placebo bis einschließlich P 48. Verabreicht wurden 10 g Eprex-Lösungsmittel (Placebo) je Kilogramm KG bzw. darin gelöst 5.000 IU rekombinantes humanes Epo je Kilogramm KG. Anschließend erfolgte die Verhaltenstestung mit CRW von P 54 auf P 55 (18:00 Uhr – 06:00 Uhr) und *Puzzle Box* von P 56 bis P 60. An P 62 wurde der Versuch beendet und das Gehirn für histologische Untersuchungen gewonnen. Unmittelbar vor Gewebegewinnung erfolgte erneut Laufen im CRW (18:00 Uhr – 22:00 Uhr), um neuronale Aktivitätsmuster histologisch erfassen zu können.

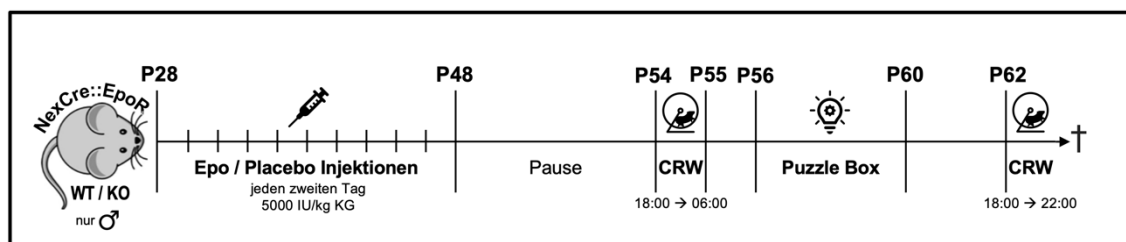


Abbildung 1: Versuchsablauf zur Testung kognitiver Funktionen mittels Complex Running Wheel und Puzzle Box und zur Untersuchung der erythropoietininduzierten Neurogenese in der Mauslinie NexCre::EpoR. Zu den angegebenen postnatalen Tagen (P) erhielten männliche Wildtypen (WT) und Knockouts (KO) der o.g. Mauslinie intraperitoneale Injektionen mit Erythropoietin (Epo) bzw. Placebo, berechnet nach internationalen Einheiten (IU) und Kilogramm Körpergewicht (KG). Es folgten Verhaltenstestungen mittels *Complex Running Wheel* (CRW) und *Puzzle Box* sowie eine postmortale (†) Gewebegewinnung zur Untersuchung der Epo-induzierten Neurogenese.

In Abbildung 2 wird der Versuchsablauf zur Untersuchung der Genexpression von Epo und EpoR dargestellt. Männliche und weibliche Mäuse der Linie NexCre::EpoR wurden zum Zeitpunkt P 28 untersucht, dem Beginn der dreiwöchigen Behandlung in Abbildung 1. Einerseits erfolgte die intraperitoneale Injektion von Epo bzw. Placebo, andererseits die Stimulation der endogenen Epo-Expression durch Hypoxie (6 % O₂) im Vergleich zu Normoxie (21 % O₂). Nach sechs Stunden wurde das Gewebe zur Untersuchung mittels qRT-PCR gewonnen. Der Ablauf für Mäuse der Linie NexCre::Epo war identisch.

Zur Untersuchung alterskorrelierter Expressionsmuster wurden weibliche Mäuse der Linie NexCre::EpoR im Alter von elf Monaten (M) genutzt, die zuvor eine Verhaltenscharakterisierung absolviert hatten. Es erfolgte eine sechsstündige Exposition in Hypoxie (6 % O₂) bzw. Normoxie (21 % O₂) bevor das Gewebe gewonnen wurde.

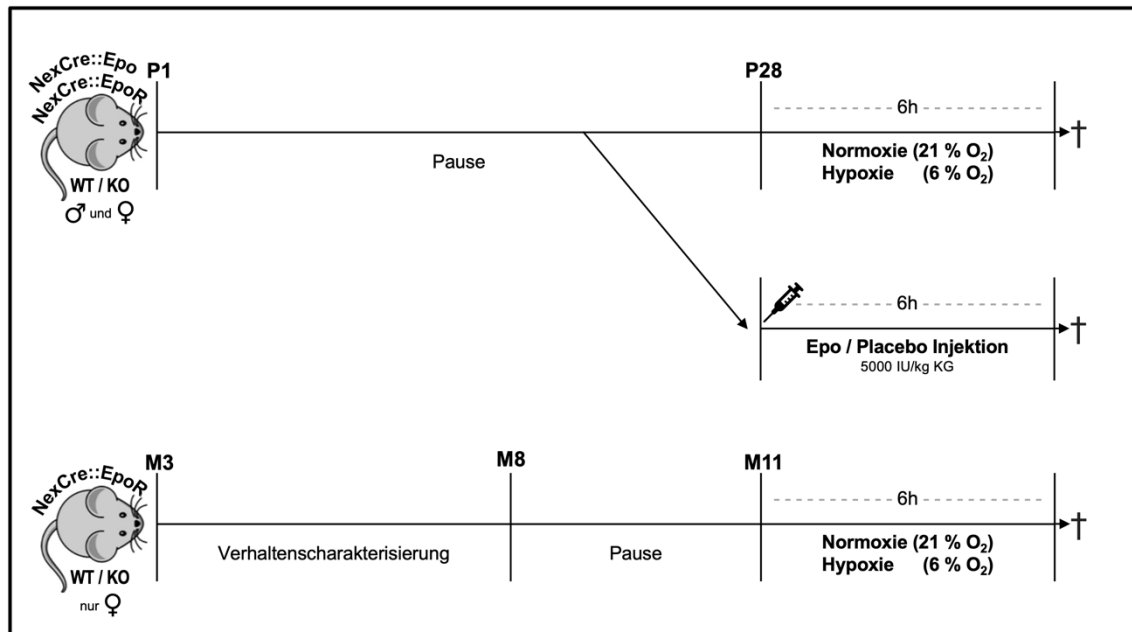


Abbildung 2: Versuchsablauf zur Untersuchung der Genexpression von Erythropoietin und homodimerem Erythropoietin-Rezeptor im Cornu ammonis 1 in den Mauslinien NexCre::EpoR und NexCre::Epo. Zum angegebenen postnatalen Tag (P) bzw. Monat (M) erhielten männliche und/oder weibliche Wildtypen (WT) und Knockouts (KO) der o.g. Mauslinien entweder eine intraperitoneale Injektion mit Erythropoietin bzw. Placebo, berechnet nach internationalen Einheiten (IU) und Kilogramm Körpergewicht (KG), oder eine Exposition gegenüber Hypoxie, jeweils sechs Stunden vor postmortaler (†) Gewebegewinnung.

2.2 Mauslinien NexCre::EpoR und NexCre::Epo

Zur Untersuchung der Funktion des EpoR in Projektionsneuronen wurde die Mauslinie NexCre::EpoR verwendet, in welcher die Deletion des *Epor*-Gens mittels Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des projektionsneuronenspezifischen Promotors Nex möglich ist. Die Entwicklung der Mauslinie erfolgte mit embryonalen Stammzellen der Zelllinie EPD0316_5_A03 des *Knockout Mouse Projects*, welche das *Knockout First Allel* $Epor^{tm1a(KOMP)Wtsi}$ tragen. Die embryonalen Stammzellen wurden in C57BL/6N-Blastozysten injiziert, welche in pseudoträchtige C57BL/6N Weibchen transplantiert und ausgetragen wurden. Chimären, die das Allel $Epor^{tm1a(KOMP)Wtsi}$ in der Keimbahn trugen, zeugten mit C57BL/6N-Weibchen Nachkommen, in denen das Allel $Epor^{tm1a(KOMP)Wtsi}$ nunmehr nicht chimär, sondern ubiquitär vorliegt. Zur Entwicklung des *Conditional Allels* $Epor^{tm1c(KOMP)Wtsi}$ erfolgte die Exzision der lacZ-neo-Kassette durch FLIP-Rekombinasen durch Kreuzung mit 129S4/SvJaeSor-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(FLP1)Dym/J} auf C57BL/6N-Hintergrund. Die Exone 3-6 des *Epor*-Gens sind

von loxP flankiert. Ein spezifischer Knockout des *Epor*-Gens in Projektionsneuronen wurde erreicht, indem eine Kreuzung mit Mäusen stattfand, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle von Nex exprimieren. Das somit vorliegende Allel lautet *Epor*^{tm1d(KOMP)Wtsi}. Im Folgenden werden Mäuse des Genotyps NexCre^{-/-}::EpoR^{fl/fl} als WT und Mäuse des Genotyps NexCre^{+/-}::EpoR^{fl/fl} als KO bezeichnet (Goebbels et al. 2006; Wakhloo et al. 2020).

Die Entwicklung der Mauslinie NexCre::Epo basiert auf embryonalen Stammzellen der Zelllinie HEPD0983_1_A03 des *Knockout Mouse Projects*, welche das *Knockout First* Allel *Epo*^{tm1a(EU-COMM)Hmgv} tragen, und erfolgte äquivalent, sodass unter der Kontrolle des projektionsneuronspezifischen Nex eine Deletion des *Epo*-Gens erfolgen kann. Mäuse des Genotyps NexCre^{-/-}::Epo^{fl/fl} werden nachfolgend im entsprechenden Kontext als WT und Mäuse des Genotyps NexCre^{+/-}::Epo^{fl/fl} als KO bezeichnet.

2.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte anhand von fünf bis sieben Tagen postnatal gewonnenen Gewebes aus einer Schwanzspitzenbiopsie per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung des *Biozym Red HS Taq Master Mix*. Den Vorgaben des Herstellers wurde gefolgt.

Zum Nachweis des *Nex*-Wildtyp-Allels wurden als *Forward*-Primer Nex148.s (5'GAGTCCTGGAATCAGTCTTTTTC3') und als *Reverse*-Primer Nex.as (5'AGAATGTGGAGTAGGGTGAC3') verwendet, die 770 Basenpaare (BP) umspannen. Für das *Nex*-Knockout-Allel wurde der *Forward*-Primer Nex148.s mit dem *Reverse*-Primer Cre.a (5'CCGCATAACCAGTGAAACAG3') kombiniert, sodass 520 BP umspannt werden.

Zum Nachweis des *Epor*-Wildtyp-Allels wurden als *Forward*-Primer EpoR-P1 (5'GTCCTCAGGACTGGGTGGC3') und als *Reverse*-Primer EpoR-P2 (5'CATCGATGTCGCTCCCAT3') verwendet, die 759 BP umspannen. Zum Nachweis des *Epor*-Knockout-Allels wurde erneut der Primer EpoR-P1 und als *Reverse*-Primer EpoR-P4 (5'GAGCTCAGACCATAACTTTCG3') verwendet, sie umspannen 203 BP.

Für den Nachweis des *Epo*-Wildtyp-Allels wurden der *Forward*-Primer Epo-P1 (5'CAGCCTCCACGTGCACTAAG3') und der *Reverse*-Primer Epo-P2 (5'GCAGGGTGGGACGTTCTIG3') genutzt, die 613 BP umspannen. Zum Nachweis des *Epo*-Knockout-Allels wurde erneut Epo-P1 als *Forward*-Primer und als *Reverse*-Primer Epo-P4 (5'CAACGGGTTCTTCTGTAGTCC3') eingesetzt, sodass 290 BP umspannt werden.

Die Amplifizierung der DNA erfolgte über 39 Zyklen mit folgendem Temperaturverlauf: Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Primeranlagerung bei 58 °C für 30 s und Elongation bei

72 °C für 60 s. Anschließend erfolgte die Auftragung und Elektrophorese in Agarosegel. Das Ergebnis der initialen Genotypisierung wurde postmortal anhand einer Schwanzspitzenbiopsie validiert.

2.4 Tierhaltung und Tierethik

Alle Tierversuche wurden nach Vorgaben des Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt und durchgeführt. Die zugehörigen Aktenzeichen sind auf Anfrage erhältlich. Die Haltung der Mäuse erfolgte in Gruppen von vier Tieren gleichen Genotyps, Geschlechts und Alters in Standardkäfigen. Diese befanden sich in Scantainern mit regulierter Temperatur (21 ± 2 °C), Luftfeuchtigkeit (55 ± 5 %) und Tagesrhythmus (hell: 06:00 Uhr – 18:00 Uhr, dunkel: 18:00 Uhr – 06:00 Uhr). Die Käfige beinhalteten holzbasiertes Einstreu, Nestmaterial sowie ein Papiertuch; Es bestand freier Zugang zu Wasser und Nahrung.

2.5 Verhaltensexperimente

2.5.1 Complex Running Wheel

Das CRW ist ein Verhaltenstest zur Messung von motorischen Funktionen, Kognition, Ausdauer und Motivation. Er beruht auf freiwilligem Laufen in einem Laufrad mit wechselndem Abstand der einzelnen Sprossen (siehe Abbildung 3). Die Versuchstiere wurden für eine Nacht (von P 54, 18:00 Uhr bis P 55, 06:00 Uhr) in Einzelkäfigen mit CRW platziert. Es bestand freier Zugang zu Wasser und Nahrung. Mit der Software *TSE Phenomaster* wurde die gelaufene Strecke aufgezeichnet.

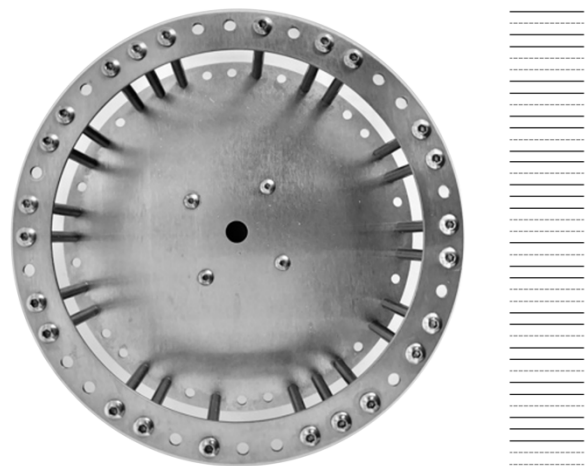


Abbildung 3: Aufbau des Complex Running Wheel. Fotografie (links) sowie schematisierte Darstellung (rechts) über die Anordnung von Sprossen (durchgezogene Linien) bzw. fehlenden Sprossen (gestrichelte Linien).

2.5.2 Puzzle Box

Die *Puzzle Box* ist ein Verhaltenstest für Exekutivfunktion (Ben Abdallah et al. 2011), welcher die natürliche Präferenz von Mäusen für kleine, dunkle Räume gegenüber weiten, hellen Räumen nutzt. Abbildung 4 zeigt den Aufbau der *Puzzle Box*. Die Versuchstiere wurden in einem weiten, hellen Raum positioniert und mussten ein Hindernis überwinden, um in den kleinen, dunklen Raum zu gelangen. Die Startposition ist in Abbildung 4 mit einem Kreuz markiert.

Die Mäuse wurden mit Blickrichtung zum Hindernis abgesetzt und die Zeit zur Überwindung des Hindernisses gemessen. Es wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen (P 56 – P 60) fünf zunehmende Schwierigkeitsgrade als Hindernis getestet (siehe Tabelle 1). Pro Tag wurden bis zu drei Messungen durchgeführt, hiervon zwei Messungen des gleichen Schwierigkeitsgrads

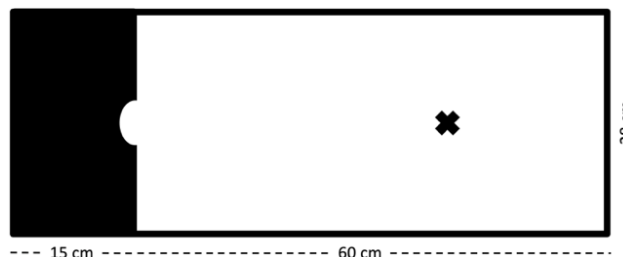


Abbildung 4: Aufbau der Puzzle Box. Schematisierte Darstellung: Startposition (Kreuz) im hell beleuchteten Bereich (weiß) mit Übergang (weiße halbkreisförmige Ausbuchtung) in den dunklen Bereich (schwarz). Die zu überwindenden Hindernisse befinden sich vor dem bzw. im Übergang.

zur Erfassung des Kurzzeitgedächtnisses und eine Messung des Schwierigkeitsgrads des Vortags zur Erfassung des Langzeitgedächtnisses. Entsprechend fand am letzten Tag nur eine Messung statt und am ersten Tag konnte kein Langzeitgedächtnis überprüft werden. Überschritt ein Versuchstier die vorgegebene Maximalzeit, wurde es manuell in den kleinen, dunklen Raum positioniert.

Tabelle 1: Versuchsablauf Puzzle Box. Darstellung der Hindernisse mit jeweiliger Maximalzeit zur Hindernisüberwindung (t_{max}) sowie Zuordnung von Hindernis zu Tag und Abfolge/Reihenfolge.

	offen			Tunnel			Tunnel mit Einstreu			Papierknäuel			Nestmaterial		
	$t_{max} = 240$ s			$t_{max} = 240$ s			$t_{max} = 240$ s			$t_{max} = 360$ s			$t_{max} = 360$ s		
Tag	1			2			3			4			5		
Abfolge	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.		

2.6 Histologische Untersuchung

2.6.1 Gehirnentnahme und Verarbeitung zu Hirnschnitten

Zur Entnahme des Gehirns wurden die Mäuse zunächst intraperitoneal mit Avertin-Lösung anästhesiert. Nach Eintritt einer vollständigen Areflexie wurde der Brustkorb eröffnet und das Herz präpariert. Die Perfusion erfolgte mithilfe einer peristaltischen Pumpe transkardial (Kanülierung des linken Ventrikels und Inzision des rechten Atriums) für die Dauer von 5 min mit Eis-gekühlter Ringer-Lösung. Die Versuchstiere wurden anschließend dekapitiert und der Schädel entlang der *Suturæ sagittalis* und *coronalis* eröffnet. Das Gehirn wurde kaudal des *Cerebellums* abgesetzt, entnommen und entlang der *Fissura longitudinalis* halbiert. Das native Gewebe der rechten Hemisphäre wurde für molekularbiologische Untersuchungen bei - 80 °C eingefroren, das Gewebe der linken Hemisphäre wurde zur histologischen Untersuchung fixiert. Die Fixierung erfolgte immersiv in 4 % Formaldehyd-Lösung für 35 h bei 4 °C. Anschließend erfolgte die Dehydrierung des fixierten Gewebes in 30 % Saccharose-Lösung für 24 h bei 4 °C. Daraufhin wurde das Gewebe mit *Tissue-Tek*[®] kryoprotektiv eingebettet und auf Trockeneis gefroren. Es wurden 15 µm dünne koronare Hirnschnitte der gesamten Hemisphäre mithilfe eines Kryomikrotoms angefertigt und in kryoprotektiver Lösung bei - 20 °C aufbewahrt.

2.6.2 Auswahl und Färbung der Hirnschnitte

Die Färbung der Hirnschnitte erfolgte zur Quantifizierung der Pyramidenzellen im CA 1 des *Hippocampus*, die mithilfe von Antikörpern gegen den Transkriptionsfaktor *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor Interacting Protein 2* (Ctip2) immunhistochemisch gefärbt werden können (Leid et al. 2004).

Je Versuchstier wurden insgesamt sechs Hirnschnitte aus drei verschiedenen Schnittebenen (SE) des *Hippocampus* zur Färbung ausgewählt. Je SE wurden zwei direkt benachbarte Hirnschnitte entnommen. Die erste SE ergibt sich durch den rostralsten gemeinsamen Anschnitt von infra- und suprapyramidalem Blatt des *Gyrus dentatus*. Die zweite und dritte SE befanden sich 150 µm bzw. 300 µm kaudal davon.

Zur Optimierung der Färbung wurden verschiedene Konzentrationen der Anti-Ctip2-Primär-Antikörper (1:500, 1:1000, 1:2000), deren Inkubationszeiten (35 h, 52 h) sowie verschiedene Sekundärantikörper (Cy3, Alexa 633, Alexa 488) getestet. Das nachfolgend beschriebene Protokoll zeigte die besten Ergebnisse und wurde für die auszuwertenden Hirnschnitte verwendet.

Es wurde auf einem Schüttler und bei Raumtemperatur (RT) gearbeitet, sofern nicht anders angegeben. Zur Entfernung des Kryoprotektivums wurden die Hirnschnitte in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) 5 x 10 min frei flottierend gewaschen, anschließend mit 5 % *Normal Horse Serum* (NHS) in 0,3 % *Triton*TM-Lösung für 60 min geblockt und permeabilisiert. Alle weiteren Schritte erfolgten zusätzlich lichtgeschützt. Je zwei Hirnschnitte inkubierten gemeinsam in 500 µl Primär-Antikörper-Lösung für 48 h bei 4 °C. Die Primär-Antikörper-Lösung enthielt Anti-Ctip2-Antikörper (Meerschweinchen, 1:2000), Anti-c-Fos-Antikörper (Kaninchen, 1:1000) und 3 % NHS in 0,3 % *Triton*TM-Lösung. Danach wurden die Hirnschnitte in PBS 5 x 10 min gewaschen. Anschließend inkubierten je zwei Hirnschnitte gemeinsam in 500 µl Sekundär-Antikörper-Lösung für 2 h. Diese enthielt Alexa Fluor 488 Anti-Meerschweinchen-Antikörpern (Esel, 1:500), Alexa Fluor 647 Anti-Kaninchen-Antikörpern (Esel, 1:500) und 3 % NHS in 0,3 % *Triton*TM-Lösung. Erneut wurde 5 x 10 min mit PBS gewaschen, daraufhin 1 x 10 min in 4',6-Diamidin-2-phenylindol(DAPI)-Lösung (0,2 µg/ml) inkubiert und abschließend 4 x 10 min in PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Hirnschnitte auf Objektträger aufgezogen, Eindeckmedium aufgetragen, ein Deckglas aufgelegt und bei 4 °C gelagert.

2.6.3 Mikroskopie und Auswertung der Hirnschnitte

Mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop Leica TCS SP5 wurde die Zielregion CA 1 des *Hippocampus* aufgenommen. Es wurde ein 20X Objektiv (Numerische Apertur 0,7) verwendet. Die räumliche Tiefe des Hirnschnitts von 15 µm wurde im Schichtbildverfahren mit 0,42 µm pro Schichtbild aufgelöst.

Ausgewertet wurde die Anzahl Ctip2-DAPI-doppelpositiver Zellen im *Stratum pyramidale* des CA 1 normiert zur Fläche. Die Quantifizierung erfolgte manuell unter Verwendung der Software *Imaris*. Aufgrund häufig überlagert liegender Zellen wurde zur sicheren Identifizierung der Zellen mehrschrittig vorgegangen: Zunächst wurde das Ctip2-Signal in einer einzelnen zweidimensionalen Schichtebene überprüft. Die Zellkonturen konnten dabei ohne Überlagerung durch Signale höher-/tieferliegender Schichtebenen beurteilt werden. Schrittweise wurden die Zellkonturen in angrenzende Schichtebenen durch den Hirnschnitt nachverfolgt und eine räumliche Vorstellung entwickelt. Anschließend wurde die digitale dreidimensionale Rekonstruktion des Hirnschnitts aus allen Schichtebenen angezeigt. Diese wurde aus verschiedenen räumlichen Perspektiven betrachtet und auf den zweidimensional gewonnen Ein-

druck hin überprüft. Schließlich wurde zusätzlich zum Ctip2-Signal das DAPI-Signal angezeigt, die Zellen erneut überprüft und doppelpositive Zellen markiert. Die Anzahl der Markierungen wurde mit *Imaris* erfasst.

Die Flächenbestimmung erfolgte mithilfe der Software *ImageJ*. Zunächst wurde die dreidimensionale Aufnahme zweidimensional projiziert, anschließend das CA 1 begrenzt. Der Übergang zu *Subiculum* und CA 2 wurde anhand abnehmender Zelldichte und abnehmender Ctip2-Signalintensität festgelegt. Das *Stratum pyramidale* wurde durch Kontrastierung des Ctip2-Zellsignals gegenüber dem Hintergrund abgegrenzt, als Fläche erfasst und gemessen.

2.7 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

2.7.1 Präparation des Cornu ammonis 1

Bis einschließlich der Entnahme des Gehirns wurde verfahren wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben. Die anschließende Präparation des CA 1 erfolgte in eisgekühlter Ringer-Lösung. Zunächst wurden die *Hippocampi* separiert und mit einem *McIlwain Tissue Chopper* in 600 µm breite koronare Schnitte aufgetrennt. Unter einem Stereomikroskop wurde das CA 1 aus den *Hippocampus*-Schnitten manuell präpariert, in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und umgehend mit flüssigem Stickstoff gefroren.

2.7.2 Extraktion der Ribonukleinsäuren

Die Extraktion der gesamten Ribonukleinsäuren (RNA) erfolgte mit dem *miRNeasy Mini Kit* nach den Vorgaben des Herstellers: Das Gewebe wurde auf Eis gekühlt und zur Lysierung mit 700 µl Phenol-Guanidinthiocyanat-Lösung (*QLAzol[®]*) versetzt. Durch den Einsatz eines Dispergiergeräts wurden die einzelnen Zellen aus dem Gewebe gelöst und für *QLAzol[®]* zugänglich gemacht. Die Homogenisierung erfolgte durch dreimaliges Aufziehen mit einer 27G Spritzennadel. Es folgten 5 min Inkubation bei RT zur Dissoziation von Nukleoproteinen. Anschließend wurden 140 µl Chloroform hinzugegeben und mit einem Vortexmischer für 15 s kräftig vermischt. In der folgenden Inkubation bei RT für 3 min setzt eine Phasenbildung ein, die durch anschließende Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C für 15 min abgeschlossen wurde. Die obere, RNA-enhaltende Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß pipettiert und mit dem 1,5-fachen Volumen Ethanol (99,8 %) versetzt, woraufhin die RNA kristallisiert. Die Suspension wurde in die Säule des *miRNeasy mini Kits* pipettiert. Durch Zentrifugation bei 8.000 g und RT für 15 s wurde die kristallisierte RNA auf der Membran

der Säule zurückgehalten, der Durchsatz wurde verworfen. Zur Aufreinigung der RNA wurden in drei Schritten ethanolbasierte Puffer (700 µl RWT, 500 µl RPE, 500 µl RPE) pipettiert und wie zuvor zentrifugiert und verworfen. Im letzten Zentrifugationsschritt wurde die Zeit auf 2 min verlängert, um Ethanolrückstände vollständig aus der Säule zu entfernen. Die aufgereinigte RNA auf der Membran wurde in Abhängigkeit von der ursprünglichen Gewebemenge in 20 µl – 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei 8.000 g für 1 min in ein neues Mikroreaktionsgefäß zentrifugiert. Diese konzentrierte RNA-Lösung wurde umgehend auf Eis gekühlt. Die RNA-Konzentration wurde mit einem Photometer bestimmt. Hierzu wurde die Extinktion einer verdünnten RNA-Probe bei der Wellenlänge 260 nm gemessen. Zur Kontrolle von Proteinverunreinigungen wurde zusätzlich das Extinktionsverhältnis (260 nm / 280 nm) gemessen. Die Lagerung der konzentrierten RNA-Lösung erfolgte bei - 80 °C.

2.7.3 Synthese komplementärer Desoxyribonukleinsäure aus Ribonukleinsäure

Die extrahierte RNA wurde mit einer reversen Transkriptase in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. Vorbereitend wurden 10 µl RNA-Lösung der Konzentration 100 ng/µl angesetzt. Hierzu wurde die konzentrierte RNA-Lösung entsprechend den gemessenen Konzentrationen mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Im nächsten Schritt wurden die Primer der reversen Transkriptase hinzugefügt: 1 µl Oligodesoxythymidinnukleotide (Oligo(dT)) (Konzentration: 0,6 pmol/µl) und 1 µl *Random Hexamers* (Konzentration 50 µmol/l). Mit einem Thermocycler inkubierten diese bei 70 °C für 2 min. Hierbei binden die Oligo(dT) an den Poly-A-Schwanz der RNA und die *Random Hexamers* an unterschiedliche, weiter 5'-gelegene Strangabschnitte der RNA. Im nächsten Schritt wurden zur Synthese des DNA-Strangs 1 µl Reverse Transkriptase (*Superscript III*) und 1 µl Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) hinzugefügt, außerdem zur Stabilisierung der Reversen Transkriptase 2 µl Dithiothreitol (DTT) und 4 µl *5X First Strand Puffer*. Im Thermocycler wurde zur Synthese der cDNA für 10 min bei 45 °C, danach für 45 min bei 50 °C und zuletzt für 45 min bei 55 °C inkubiert.

2.7.4 Amplifizierung komplementärer Desoxyribonukleinsäure

Die cDNA spezifischer Gene wurde mittels qRT-PCR amplifiziert. Zur Messung der Konzentration wurde *SYBR[®]-Green* verwendet. *SYBR[®]-Green* ist ein Fluoreszenz-Reporter, der durch Bindung an doppelsträngige DNA aktiviert wird, sodass bei zunehmender Amplifizierung das Fluoreszenzsignal zunimmt. Da *SYBR[®]-Green* unabhängig von spezifischen Genen an doppelsträngige DNA bindet, wurden die Gen-spezifischen Primer getrennt pipettiert.

Zusätzlich wurden Triplets pipettiert, um Pipettier-/Messfehler später ausschließen zu können. Zum Ausschluss von Verunreinigungen wurden Wasserkontrollen genutzt. Für jeden Reaktionsansatz wurden vorbereitend 4 µl cDNA-Lösung der Konzentration 10 pmol/µl angesetzt. Hierzu wurde die synthetisierte cDNA im Verhältnis 1:10 mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) verdünnt. Anschließend wurden 5 µl *SYBR[®]-Green Master Mix*, 1 µl ddH₂O und je 0,1 µl des spezifischen *Forward*- und *Reverse*-Primers (Konzentration: 10 pmol/l) hinzugefügt (siehe Tabelle 6). Der *SYBR[®]-Green Master Mix* enthält bereits die DNA-Polymerase und dNTP. Die Amplifizierung der DNA erfolgte über 45 Zyklen im PCR-Cycler mit folgendem Temperaturverlauf: Denaturierung bei 95 °C für 15 s, Primeranlagerung und Elongation bei 60 °C für 1 min.

2.7.5 Auswertung

Die aufgezeichneten Daten wurden mit der Software *LightCycler[®]480 SW 1.5* überprüft. Lagern primerspezifische Schmelzkurven und keine Amplifizierung in den Wasserkontrollen vor, wurden die *Cycle Threshold*(Ct)-Werte der Triplets analysiert.

Anschließend wurden die für jede Probe pipettierten Triplets überprüft. Ein Ct-Wert des Triplets wurde als Pipettierfehler ausgeschlossen, wenn die Standardabweichung aller Triplett-Werte größer als 0,1 war und die Abweichung eines Wertes vom nächstgelegenen Wert größer ist als das Dreifache der Differenz der zwei verbleibenden Werte. Aus den verbleibenden Werten wurden arithmetische Mittelwerte gebildet, die zum *Housekeeper*-Gen Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) normiert wurden. Danach wurde nach der Formel $1 / (2^{\wedge} \text{normierter Wert})$ entlogarithmiert.

2.8 Verblindung und statistische Analyse

Alle Experimente und Analysen wurden ohne Kenntnis von Genotyp oder Behandlung durchgeführt. Die statistische Analyse und graphische Darstellung wurde mit *GraphPad-Prism 8* durchgeführt. Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurde der *Two-Way ANOVA*, zum Vergleich zweier Gruppen der *Unpaired Student's t-Test* verwendet. Statistische Ausreißer wurden mit dem *Grubbs' Outlier Test* ausgeschlossen. Die graphische Darstellung erfolgt in Mittelwert \pm Standardfehler (SEM). Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ gewertet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

2.9 Materialien

Die nachfolgenden Tabellen listen die verwendeten Chemikalien (siehe Tabelle 2), Lösungen (siehe Tabelle 3), Verbrauchsmaterialien (siehe Tabelle 4), Antikörper (siehe Tabelle 5), PCR-Primer (siehe Tabelle 6), Utensilien für Tierhaltung und Verhaltensexperimente (siehe Tabelle 7), Geräte (siehe Tabelle 8) und Software (siehe Tabelle 9) auf.

Tabelle 2: Chemikalien.

Chemikalien	Bezeichnung	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	DAPI for nucleic acid staining	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH
5X First Strand Puffer	5X First Strand Buffer	invitrogen (Thermo Fisher Scientific)
Biozym Red HS Taq Master Mix	Biozym Red HS Taq Master Mix	Biozym Scientific GmbH
Chloroform	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Chloroform for analysis	Merck KGaA
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	siehe Reinstwassersystem
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP)	100 mM dNTP Set, PCR Grade	invitrogen (Thermo Fisher Scientific)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	EMSURE® di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, zur Analyse	Merck KGaA
Dithiothreitol (DTT)	0.1M DTT, 500 µl	invitrogen (Thermo Fisher Scientific)
Erythropoietin (Epo)	NeoRecormon® 30000 I.E. Injektionslösung in Fertigspritze Epoetin beta	Roche
Ethanol	Ethanol, absolute, reag. ISO, reag. Ph. Eur., ≥99,8 % (GC), liquid (clear, colorless)	Honeywell (Riedel-de Haën®, SIGMA AL- DRICH CHEMIE GmbH)

Chemikalien	Bezeichnung	Hersteller
Ethylenglykol	Ethylene glycol, anhydrous, 99.8 %, 1 L	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH
Formaldehyd	Formaldehydelösung min. 37 % säurefrei	Merck KGaA
Glycerin	Glycerol, puriss., meets analytical specification of Ph. Eur., BP, USP, FCC, E422, anhydrous, 99.0-101.0 % (alkalimetric)	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH
Immersionsmedium Glycerin	Immersol™ G, Glycerin for fluorescence-microscopy	Carl Zeiss Jena GmbH
Kaliumchlorid	EMSURE® Kaliumchlorid	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat	Kaliumdihydrogenphosphat, zur Analyse (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA
Natriumchlorid	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Natriumchlorid	Merck KGaA
Natriumhydroxid	EMSURE® ISO, Sodium hydroxide pellets for analysis	Merck KGaA
Normal Horse Serum (NHS)	Normal Horse Serum 10.0 ml	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
Oligodesoxythymidin-nukleotid (Oligo(dT)) Primer	Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer, 25 µg (0,5 µg/µl)	inivtrogen (Thermo Fisher Scientific)
QIAzol®	QIAzol® Lysis Reagent, 50 ml	QIAGEN Sciences
Random Hexamers Primer	Random Hexamers, Qty: 50 µM, 5 nmoles	invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Reverse Transkriptase	SuperScript® III, Reverse Transcriptase, 10,000 U (200 U/µL)	invitrogen, Thermo Fisher Scientific
RNase-freies Wasser	RNase-Free Water, 10 ml	QIAGEN GmbH

Chemikalien	Bezeichnung	Hersteller
RPE-Puffer	Buffer RPE, Wash Buffer, 11 ml concentrate + 44 ml Ethanol	QIAGEN GmbH
RWT-Puffer	Buffer RWT, Wash Buffer, 15 ml concentrate + 30 ml Ethanol	QIAGEN GmbH
Saccharose	Saccharose, für die Mikrobiologie	Merck KGaA
Salzsäure	EMURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Hydrochloric acid fuming 37 %	Merck KGaA
SuperScript® III	SuperScript® III, Reverse Transcriptase, 10,000 U (200 U/μL)	invitrogen, Thermo Fisher Scientific
SYBR® Green Master Mix	Power SYBR® Green PCR Master Mix, Qty: 5 mL	Life Technologies LTD, Thermo Fisher Scientific
tert-Amylalkohol	tert-Amylalkohol, zur Analyse	Merck KGaA
Tissue-Tek®	Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe B.V.
Tribromethanol	2,2,2-Tribromethanol, 97 %	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH
Triton™	Triton™ X-100, for molecular biology	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH

Tabelle 3: Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung	Bezeichnung und Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol(DAPI)-Lösung	20 µl DAPI 100 ml PBS	siehe DAPI siehe PBS
Avertin-Lösung	1,00 g 2,2,2-Tribromethanol 1,00 ml tert-Amylalkohol 71,49 ml ddH ₂ O	siehe Tribromethanol siehe tert-Amylalkohol siehe ddH ₂ O
Eporex [®] -Lösungsmittel	3,00 mg Polysorbat 80 50,00 mg Glycin 43,80 mg Natriumchlorid 5,13 mg Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat 22,30 mg di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat 10,0 g Wasser für Injektionszwecke	gekauft als Fertiglösung: Apotheke der Universitätsmedizin Göttingen
Erythropoietin-Lösung	5.000 IU Epo 10 ml Eprex [®] -Lösungsmittel	siehe Epo siehe Eprex [®] -Lösungsmittel
Formaldehyd-Lösung 4 %	20 g Formaldehyd 500 ml PBS mit Natronlauge und Salzsäure auf pH = 7,2 titrieren	siehe Formaldehyd siehe PBS siehe Natriumhydroxid siehe Salzsäure
kryoprotektive Lösung	25 % Glycerin 25 % Ethylenglykol 50 % PBS	siehe Glycerin siehe Ethylenglykol siehe PBS

Lösung	Zusammensetzung	Bezeichnung und Hersteller
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	160,00 g Natriumchlorid 4,00 g Kaliumchlorid 28,80 g di-Natriumhydrogenphosphat 4,80 g Kaliumdihydrogenphosphat 20 L ddH ₂ O mit Salzsäure auf pH = 7,4 titrieren	siehe Natriumchlorid siehe Kaliumchlorid siehe di-Natriumhydrogenphosphat siehe Kaliumdihydrogenphosphat siehe ddH ₂ O siehe Salzsäure
Placebo-Lösung	siehe Eprex®-Lösungsmittel	
Ringer-Lösung	8,60 g Natriumchlorid 0,30 g Kaliumchlorid 0,33 g Calciumchlorid-Dihydrat 1 L Wasser für Injektionszwecke	gekauft als Fertiglösung: Ringer B. Braun Ecotainer®, B. Braun Melsungen AG
Saccharose-Lösung 30 %	300 g Saccharose mit PBS auf 1 L auffüllen	siehe Saccharose siehe PBS
Triton™-Lösung	3 ml Triton™ X-100 997 ml PBS	siehe Triton™ X-100 siehe PBS

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.

Material	Bezeichnung	Hersteller
Deckglas	High Precision, Deckgläser, 24x50 mm, 170±5 µm, No. 1.5H	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Eindeckmedium	Aqua-Poly/Mount, 20 ml	Polysciences Inc.
Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf Safe-Lock Tubes 1.5 ml	Eppendorf AG
miRNeasy Kit	miRNeasy® Mini Kit (50)	QIAGEN GmbH
Objektträger	Menzel Gläser, SUPERFROST® PLUS, Objektträger, 25x75x1,0 mm, geputzt/gebrauchsfertig/geschliffen	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG
Spritze	BD Plastipak™ Spritze 1 ml Luer	Becton Dickinson S.A.
Spritzennadel	BD Microlance™ 3, 27 G	Becton, Dickinson and Company Limited

Tabelle 5: Antikörper.

Antikörper-Bezeichnung	Herkunftsorganismus	Antigen	Hersteller
Alexa Fluor 488	Esel	Meerschweinchen	Jackson ImmunoResearch
Alexa Fluor 647	Esel	Kaninchen	invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Anti-c-Fos-Antikörper	Kaninchen	c-Fos	Synaptic Systems GmbH
Anti-Ctip2-Antikörper	Meerschweinchen	Ctip2 (Carboxyterminus)	Synaptic Systems GmbH
Cy3	Esel	Meerschweinchen	Jackson ImmunoResearch

Tabelle 6: PCR-Primer.

Gen	Primer	Sequenz (5' – 3')
Cre-Wildtyp	Forward	GAGTCCTGGAATCAGTCTTTTTC (Nex148.s)
	Reverse	AGAATGTGGAGTAGGGTGAC3 (Nex.as)
Cre-Knockout	Forward	GAGTCCTGGAATCAGTCTTTTTC (Nex148.s)
	Reverse	CCGCATAACCAGTCAAACAG3 (Cre.a)
Epo	Forward	AAGGTCCCAGACTGAGTGAAAATATTAC
	Reverse	GGACAGGCCCTTGCCAAACT
Epo-Wildtyp	Forward	CAGCCTCCACGTGCACTAAG (Epo-P1)
	Reverse	GCAGGGTGGGACGTTCTG (Epo-P2)
Epo-Knockout	Forward	CAGCCTCCACGTGCACTAAG (Epo-P1)
	Reverse	CAACGGGTTCCTTCTGTTAGTCC (Epo-P4)
EpoR	Forward	CTCATCTCGTTGTTGCTGA
	Reverse	CAGGCCAGATCTTCTGCTG
EpoR-Wildtyp	Forward	GTCCTCAGGACTGGGTGGC (EpoR-P1)
	Reverse	CATCGATGTCGCTCCCAT (EpoR-P2)
EpoR-Knockout	Forward	GTCCTCAGGACTGGGTGGC (EpoR-P1)
	Reverse	GAGCTCAGACCATAACTTCG (EpoR-P4)
PBGD	Forward	ACAAGATTCTTGATACTGCACTCTCTAAG
	Reverse	CCTTCAGGGAGTGAACAACCA
VEGF	Forward	AGCACAGCAGATGTGAATGC
	Reverse	TTGACCCTTTCCCTTTCCTC

Hersteller: AGCT-Lab, Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin

Tabelle 7: Tierhaltung und Verhaltensexperimente.

Gegenstand	Bezeichnung	Hersteller
Einstreu	LIGNOCEL [®] Hygienic Animal Bedding	J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co. KG
Einzelkäfig	1290D-00SU Eurostandard Typ III	Techniplast S.p.A.
Epo	siehe Erythropoietin-Lösung	siehe Erythropoietin-Lösung
Hypoxiekammer	Hypoxiekammer 164x121x112 cm	Coy Laboratory Products Inc.
Nahrung	V1534-300, Ratte/Maus-Haltung, 10 mm Pellets, autoklavierbar	ssniff Spezialdiäten GmbH
Nestmaterial	Sizzlenest [®] , Certified Nesting Material	Datesand Ltd.
Papierknäuel	Kleenex [®] Ultra Handtücher	Kimberly-Clark Corporation
Papiertuch	Kleenex [®] Ultra Handtücher	Kimberly-Clark Corporation
Placebo	siehe Eprex [®] -Lösungsmittel	siehe Eprex [®] -Lösungsmittel
Puzzle Box	Puzzle Box	Feinmechanik des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin
Scantainer	Typ D-110	Scanbur BK A/S
Standardkäfig	1284L-00SU Eurostandard Type II L	Techniplast S.p.A.

Tabelle 8: Geräte.

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Complex Running Wheel (CRW)	Phenomaster Voluntary Running Wheels, nach Liebetanz et al. (2007)	TSE Systems GmbH
Dispergiergerät	Polytron® PT 1200 E	Kinematica AG
Fluoreszenzmikroskop	Leica TCS SP5 II	Leica Microsystems CMS GmbH
Kryomikrotom	Leica CM1950	Leica Biosystems Nussloch GmbH
McIlwain Tissue Chopper	Model MTC/2E	Cavey Laboratory Engineering Co. Ltd.
Objektiv	HCX PL APO CS 20x 0,7	Leica Microsystems GmbH
PCR-Cycler	System LightCycler® 480	Hoffmann-La Roche AG
Photometer	CLARIOstar®	BMG Labtech GmbH
Photometer	GeneQuant II RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech
Pumpe, peristaltisch	MPII Mini-Peristaltic Pump	Harvard Apparatus
Reinstwassersystem	arium® pro VF	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Schüttler	Kreisschüttler 3015	Gesellschaft für Labor-technik mbH
Stereomikroskop	Stemi 2000 / Stemi SV 11	Carl Zeiss AG
Thermocycler	Biometra TAdvanced 96 S	Biometra GmbH
Vortexmischer	Vortex-Genie 2™, G-560E	Scientific Industries, Inc.
Zentrifuge (12.000 g)	Heraeus Megafuge 16R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Thermo Electron LED GmbH
Zentrifuge (8.000 g)	MiniSpin® plus	Eppendorf AG

Tabelle 9: Software.

Software	Version	Hersteller
GraphPad Prism	Prism 8 for macOS, Version 8.42 (464)	GraphPad Software, Inc.
ImageJ	1.52n	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Imaris	9.1.2 und 9.3.0 64-bit	Bitplane AG
Leica Application Suite Advanced Fluorescence	2.7.3.9723	Leica Microsystems GmbH
LightCycler [®] 480	1.5.0 SP4 Version 1.5.0.39	Hoffmann-La Roche AG
Microsoft [®] Excel [®]	2013 (15.0.5172.1000) 32-bit	Microsoft Corporation
RunningWheelSoftware	TSE PhenoMaster V5.3.8	TSE Systems GmbH

3 Ergebnisse

In klinischen Studien und Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Epo auf das zentrale Nervensystem wirkt und prokognitive Funktionen vermittelt. Bei beachtlichem Fortschritt in der Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen ist gleichzeitig noch weitgehend unverstanden, über welchen der vier mutmaßlichen Rezeptoren für Epo im zentralen Nervensystems Epo seine Funktion ausübt. Zur Entwicklung zielgerichteter Therapien ist dieses jedoch von besonderer Bedeutung. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle des (homodimeren) EpoR untersucht. Hierzu fand die Mauslinie *NexCre::EpoR* Verwendung, in welcher das *Epor*-Gen mittels Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des projektionsneuronenspezifischen Promotors *Nex* deletiert werden kann. Durch den Vergleich von WT und KO wurde die Rolle des EpoR für die Vermittlung prokognitiver Funktionen in den Verhaltenstests CRW und *Puzzle Box* untersucht. Zum weitergehenden Verständnis der prokognitiven Wirkung von Epo wurde zusätzlich histologisch untersucht, welchen Einfluss der EpoR auf die Epo-induzierte Neurogenese im CA 1 des *Hippocampus* hat. Ebenfalls analysiert wurde die Genexpression von Epo und EpoR mittels qRT-PCR.

3.1 Rolle des homodimeren Erythropoietin-Rezeptors für kognitive Funktionen

3.1.1 Complex Running Wheel

Das Laufen im CRW ist eine kognitiv-motorische Herausforderung, sie erfordert das Erlernen des Bewegungsablaufs, Koordination, Motivation und Ausdauer (siehe Abschnitt 2.5.1). Vor Durchführung der Verhaltenstestung erfolgte eine dreiwöchige Behandlung mit Epo bzw. Placebo an jedem zweiten Tag, beginnend an P 28 bis einschließlich P 48. Zum Ausschluss nachwirkender Effekte der letzten Injektion (Stress) wurde eine Pause von sechs Tagen eingehalten, ehe der Verhaltenstest an P 54 durchgeführt wurde (siehe Abbildung 1). Das Laufen im CRW fand in der Dunkelphase von 18:00 Uhr bis 06:00 Uhr statt, während der die Aktivität der Mäuse am höchsten ist. Die Laufstrecken wurden registriert und in 30-minütigem Abstand summiert. Durch den Vergleich der Laufstrecken zwischen Epo- bzw. placebobehandelten WT und KO wurde einerseits untersucht, ob die per se bekannte Epo-induzierte Zunahme kognitiver Funktionen auch im Verhaltenstest CRW beobachtet werden kann und andererseits, welche Rolle der EpoR dafür spielt.

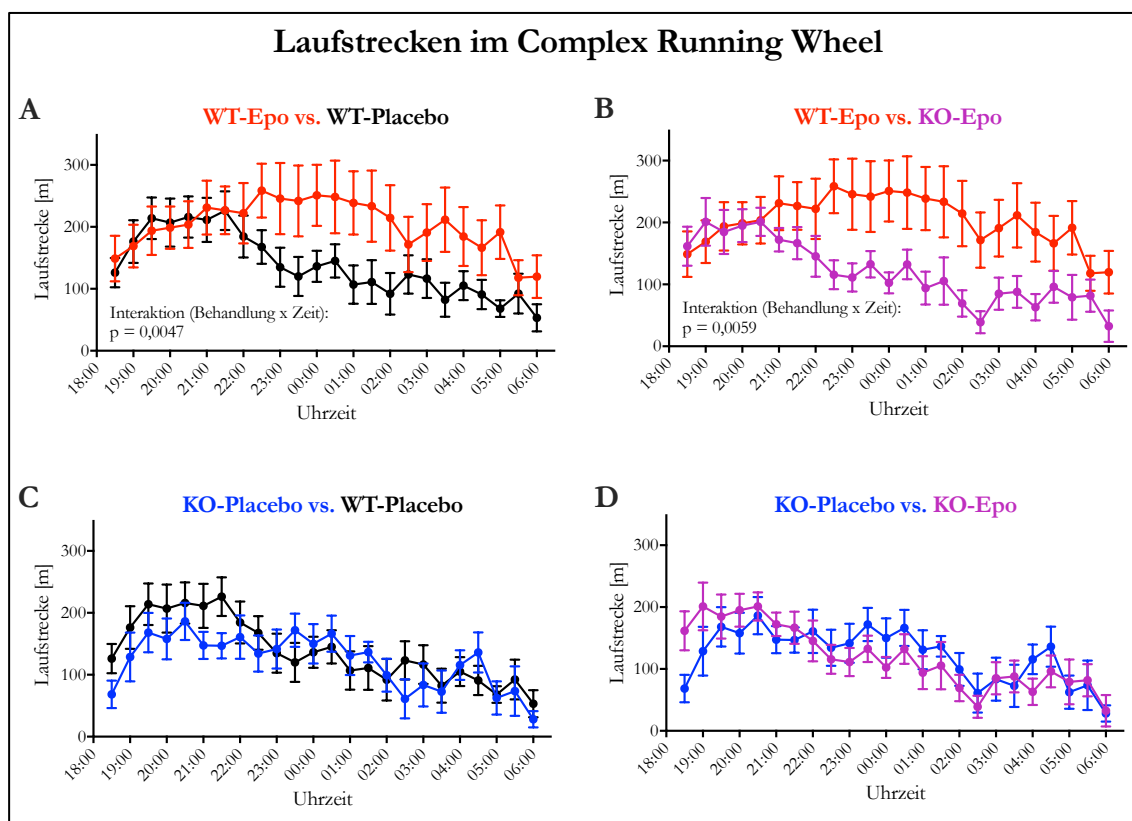


Abbildung 5: Complex Running Wheel: Vergleich der Laufstrecken erythropoietin- bzw. placebobe-handelter Wildtypen und Knockouts der Mauslinie NexCre::EpoR. Nach dreiwöchiger Behandlung mit Epo bzw. Placebo (siehe auch Abbildung 1) liefen männliche Mäuse der o.g. Mauslinie im Alter von 54 Tagen während der Dunkelphase von 18:00 Uhr bis 06:00 Uhr im CRW. Die Laufstrecken wurden alle 30 min summiert und zum Ende des zugehörigen Zeitraums abgebildet. WT-Epo (rot): $n = 8$; WT-Placebo (schwarz): $n = 8$; KO-Epo (lila): $n = 6$; KO-Placebo (blau): $n = 6$. Darstellung als Mittelwert \pm SEM, statistische Analyse mit *Two-Way ANOVA*. Modifiziert nach Wakhloo et al. (2020), Verwendung gemäß *Creative Commons Attribution 4.0 International License*.

In Abbildung 5A werden die durchschnittlichen Laufstrecken Epo- bzw. placebobebehandelter WT dargestellt. Sie waren zu Beginn (18:00 Uhr – 21:30 Uhr) vergleichbar und nahmen in beiden Gruppen zu: Epo-behandelte WT liefen in den ersten 30 min (18:00 Uhr – 18:30 Uhr) durchschnittlich 149 m, placebobebehandelte WT durchschnittlich 126 m. Die Laufstrecke nach drei Stunden (21:00 Uhr – 21:30 Uhr) betrug in Epo-behandelten WT durchschnittlich 227 m, in placebobebehandelten WT durchschnittlich 226 m. Anschließend nahm die Laufstrecke placebobebehandelter WT deutlich ab, wohingegen die Laufstrecke Epo-behandelter WT zunächst weiter anstieg und über weitere vier Stunden (bis 01:30 Uhr) auf hohem Niveau verblieb und anschließend nur langsam abnahm: Die Laufstrecke Epo-behandelter WT betrug nach sechs Stunden (00:00 Uhr – 00:30 Uhr) durchschnittlich 248 m, in placebobebehandelten WT durchschnittlich 145 m. In der letzten Phase des Tests (05:30 Uhr – 06:00 Uhr) liefen Epo-behandelte WT durchschnittlich 120 m, placebobebehandelte WT durchschnittlich 53 m. Es lag eine signifikante Interaktion von Behandlung und

Zeit auf die Laufstrecke ($p = 0,0047$) vor, sodass die Behandlung von WT mit Epo zu erhöhten Laufstrecken im CRW führte.

In Abbildung 5B werden die durchschnittlichen Laufstrecken zwischen Epo-behandelten WT und Epo-behandelten KO verglichen. Sie nahmen wie zuvor beschrieben während der ersten Phase des Tests (18:00 Uhr – 20:30 Uhr) zu. Anschließend sank die Laufstrecke Epo-behandelter KO deutlich, wohingegen die Laufstrecke Epo-behandelter WT weiter anstieg und vier Stunden (bis 01:30 Uhr) auf hohem Niveau verblieb und danach nur leicht abfiel: Die Laufstrecke Epo-behandelter WT betrug nach zwei Stunden (20:00 Uhr – 20:30 Uhr) durchschnittlich 204 m und nach sechs Stunden (00:00 Uhr – 00:30 Uhr) durchschnittlich 248 m, wohingegen sie bei Epo-behandelten KO von durchschnittlich 201 m (20:00 Uhr – 20:30 Uhr) auf durchschnittlich 132 m (00:00 Uhr – 00:30 Uhr) abnahm. In der letzten Phase des Tests (05:30 Uhr – 06:00 Uhr) betrug die Laufstrecke Epo-behandelter WT durchschnittlich 120 m, in Epo-behandelten KO durchschnittlich 33 m. Die Interaktion von Genotyp und Zeit wirkte sich signifikant auf die Laufstrecke aus ($p = 0,0059$). Somit führte eine Epo-Behandlung nur in WT, aber nicht in KO, zu erhöhten Laufstrecken.

In Abbildung 5C werden die Laufstrecken von WT und KO dargestellt, die mit Placebo behandelt wurden. Zu Beginn stieg die Laufstrecke placebobehandelter WT von durchschnittlich 126 m (18:00 Uhr – 18:30 Uhr) auf durchschnittlich 216 m (20:00 Uhr – 20:30 Uhr) und sank anschließend auf durchschnittlich 145 m (00:00 Uhr – 00:30 Uhr) bzw. durchschnittlich 82 m (03:00 Uhr – 03:30 Uhr). Die Laufstrecke placebobehandelter Knock-outs stieg anfangs vergleichbar von durchschnittlich 68 m (18:00 Uhr – 18:30 Uhr) auf durchschnittlich 186 m (20:00 Uhr – 20:30 Uhr) und nahm anschließend ebenfalls ab auf durchschnittlich 166 m (00:00 Uhr – 00:30 Uhr) bzw. durchschnittlich 72 m (03:00 Uhr – 03:30 Uhr). Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, sodass unter Placebo-Behandlung KO und WT vergleichbar abschnitten.

In Abbildung 5D werden die Laufstrecken placebobehandelter KO und Epo-behandelter KO verglichen. Sie nahmen während der ersten Phase in beiden Gruppen zu auf durchschnittlich 186 m für placebobehandelte KO und durchschnittlich 201 m für Epo-behandelte KO (20:00 Uhr – 20:30 Uhr). Anschließend nahmen die Laufstrecken wieder ab auf unter 150 m für Zeiträume nach 24:00 Uhr. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede, sodass in KO ungeachtet der Behandlung vergleichbare Laufstrecken vorlagen.

3.1.2 Puzzle Box

Die *Puzzle Box* wurde als zweiter Verhaltenstest für kognitive Funktionen durchgeführt und begann an P 56, einen Tag nach Abschluss des CRW (siehe Abbildung 1). In der *Puzzle Box* müssen Mäuse an fünf aufeinander folgenden Tagen Hindernisse steigender Schwierigkeit überwinden, um einen großflächigen, hell ausgeleuchteten Raum verlassen zu können und in den präferierten, kleinen und dunklen Bereich übertreten zu können (siehe Abschnitt 2.5.2). Hierfür bedarf es Orientierung, Exploration, Planung, Motivation und Ausdauer. Es erfolgten sowohl tagesgleiche als auch tagesübergreifende Wiederholungen von Hindernissen, so dass außerdem Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis getestet wurden (siehe Tabelle 1). Die Hindernisüberwindungszeiten wurden gemessen und zwischen Epo- bzw. placebobehandelten WT und KO verglichen, um den Einfluss des Genotyps und der Behandlung zu untersuchen.

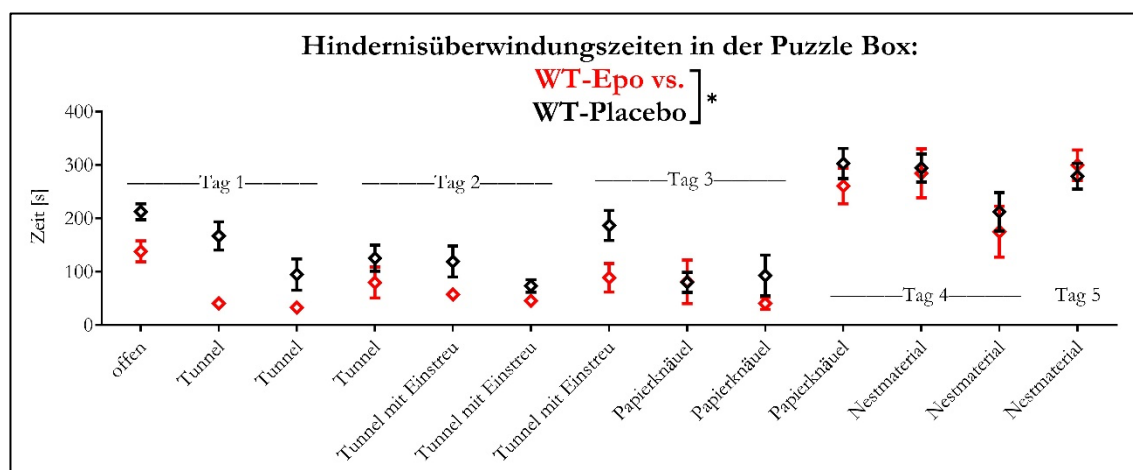


Abbildung 6: Puzzle Box: Vergleich der Hindernisüberwindungszeiten zwischen erythropoietinbehandelten Wildtypen und placebobehandelten Wildtypen der Mauslinie NexCre::EpoR. Nach dreiwöchiger Behandlung mit Epo bzw. Placebo (siehe auch Abbildung 1) absolvierten männliche Wildtypen (WT) der o.g. Mauslinie (Alter zu Beginn 56 Tage) die *Puzzle Box*. Zuordnung der Hindernisüberwindungszeiten zu Versuchstag und Hindernis (siehe auch Tabelle 1). WT-Epo (rot): $n = 8$; WT-Placebo (schwarz): $n = 9$. Darstellung als Mittelwert \pm SEM, statistische Analyse mit *Two-Way ANOVA*.

In Abbildung 6 werden die Hindernisüberwindungszeiten Epo- bzw. placebobehandelter WT dargestellt. Die erste Aufgabe bestand im Auffinden des noch unversperrten Durchgangs, dies gelang Epo-behandelten WT mit durchschnittlich 138 s schneller als placebobehandelten WT mit durchschnittlich 212 s. Auch die Durchquerung der Hindernisse „Tunnel“, „Tunnel mit Einstreu“ und „Papierknäuel“ gelang Epo-behandelten WT schneller als den placebobehandelten, wobei Epo-behandelte WT durchschnittlich zwischen 33 s und 89 s benötigten und placebobehandelte WT durchschnittlich zwischen 73 s und 187 s. Die Wiederholung des jeweiligen Hindernisses am Folgetag erforderte in beiden Gruppen mehr Zeit als am Vortag. Die Wiederholung des Hindernisses „Papierknäuel“ wurde noch von fünf der acht Epo-behandelten WT innerhalb der vorgegebenen Zeit erfüllt, jedoch nur von

vier der neun der placebobehandelten WT. In der höchsten Schwierigkeitsstufe „Nestmaterial“ schnitten Epo- und placebobehandelte WT vergleichbar ab. Es ergab sich über alle Hindernisse zusammengenommen ein signifikanter Einfluss der Behandlung ($p = 0,02$). Epo-behandelte Wildtypen benötigten durchschnittlich weniger Zeit zur Überwindung der Hindernisse als placebobehandelte Wildtypen.

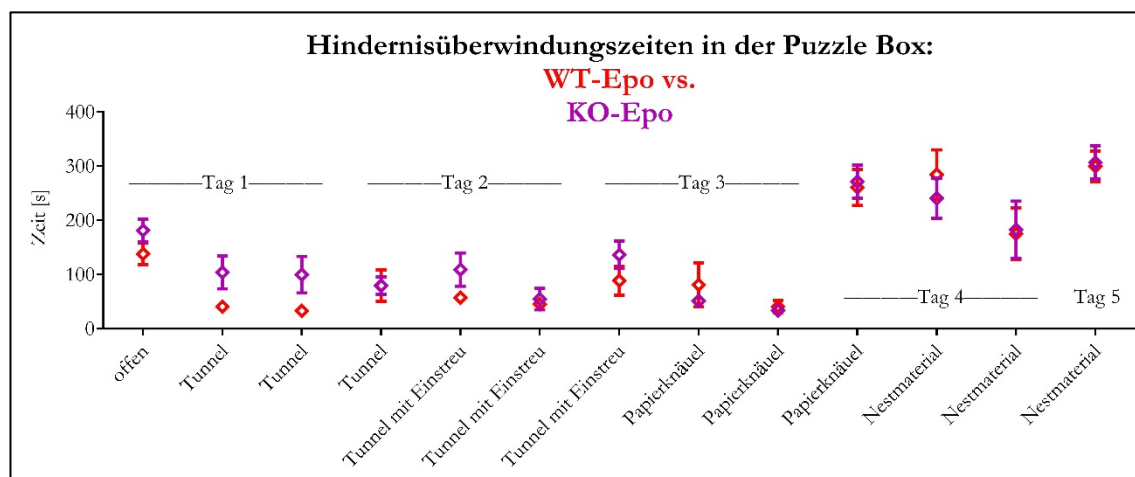


Abbildung 7: Puzzle Box: Vergleich der Hindernisüberwindungszeiten zwischen erythropoietinbehandelten Wildtypen und erythropoietinbehandelten Knockouts der Mauslinie NexCre::EpoR. Nach dreiwöchiger Behandlung mit Epo (siehe auch Abbildung 1) absolvierten männliche Wildtypen (WT) und Knockouts (KO) der o.g. Mauslinie (Alter zu Beginn 56 Tage) die *Puzzle Box*. Zuordnung der Hindernisüberwindungszeiten zu Versuchstag und Hindernis (siehe auch Tabelle 1). WT-Epo (rot): $n = 8$; KO-Epo (lila): $n = 8$. Darstellung als Mittelwert \pm SEM, statistische Analyse mit *Two-Way ANOVA*.

Abbildung 7 zeigt die Hindernisüberwindungszeiten Epo-behandelter WT und Epo-behandelter KO. Bei vergleichbarem Zeitbedarf für die Passage des offenen Durchgangs überwand den Epo-behandelte WT mit durchschnittlich 41 s das Hindernis „Tunnel“ schneller als Epo-behandelte KO mit durchschnittlich 104 s. In der Wiederholung des Hindernisses „Tunnel“ am Folgetag war keine Gruppe überlegen. Das Hindernis „Tunnel mit Einstreu“ absolvierten Epo-behandelte WT im Erstversuch und in der Wiederholung am Folgetag zügiger, in der tagesgleichen Wiederholung schlossen die Epo-behandelten KO jedoch auf. Die weiteren Hindernisse wurden von beiden Gruppen in vergleichbar Zeit überwunden, die Wiederholung „Papierknäuel“ am Folgetag sowie die höchste Schwierigkeitsstufe benötigten wie in den übrigen Gruppen deutlich mehr Zeit. Über alle Hindernisse unterscheidet sich der Zeitbedarf Epo-behandelter WT und Epo-behandelter KO nur tendenziell ($p = 0,12$).

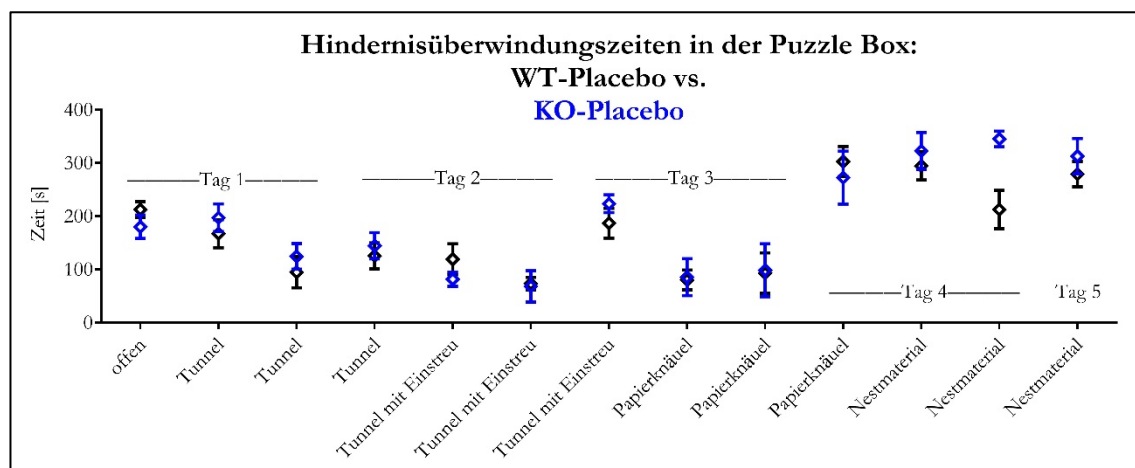


Abbildung 8: Puzzle Box: Vergleich der Hindernisüberwindungszeiten zwischen placebobehandelten Wildtypen und placebobehandelten Knockouts der Mauslinie NexCre::EpoR. Nach dreiwöchiger Behandlung mit Placebo (siehe auch Abbildung 1) absolvierten männliche Wildtypen (WT) und Knockouts (KO) der o.g. Mauslinie (Alter zu Beginn 56 Tage) die *Puzzle Box*. Zuordnung der Hindernisüberwindungszeiten zu Versuchstag und Hindernis (siehe auch Tabelle 1). WT-Placebo (schwarz): $n = 9$ und KO-Placebo (blau): $n = 7$. Darstellung als Mittelwert \pm SEM, statistische Analyse mit *Two-Way ANOVA*.

In Abbildung 8 werden die Hindernisüberwindungszeiten placebobehandelter WT und placebobehandelter KO verglichen. Beide Gruppen passierten den offenen Durchgang vergleichbar schnell. Für die Überwindung der Hindernisse „Tunnel“, „Tunnel mit Einstreu“ und „Papierknäuel“ benötigten placebobehandelte WT durchschnittlich zwischen 73 s und 212 s, die placebobehandelten KO durchschnittlich zwischen 68 s und 223 s, beide Gruppen schnitten ähnlich ab. Der Zeitbedarf zur Überwindung eines Hindernisses während eines Versuchstages nahm in beiden Gruppen ab. Für die Wiederholung des Hindernisses „Papierknäuel“ am Folgetag sowie die höchste Schwierigkeitsstufe „Nestmaterial“ benötigten beide Gruppen deutlich mehr Zeit, nur die zweite Wiederholung „Nestmaterial“ wurde von placebobehandelten WT mit durchschnittlich 213 s schneller absolviert als von placebobehandelten KO mit durchschnittlich 345 s. Über alle Schwierigkeitsstufen hinweg war keine Gruppe signifikant überlegen.

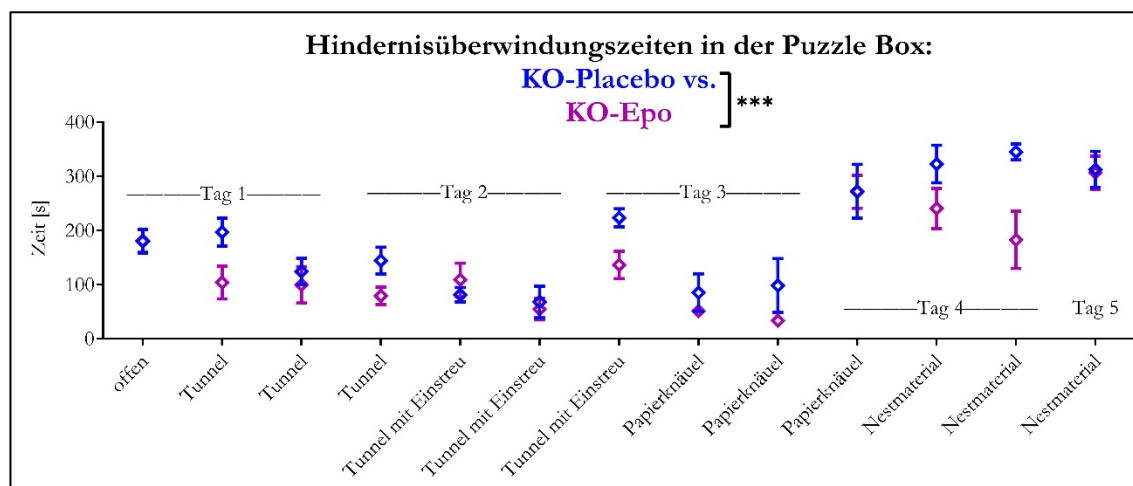


Abbildung 9: Puzzle Box: Vergleich der Hindernisüberwindungszeiten zwischen placebobehandelten Knockouts und erythropoietinbehandelten Knockouts der Mauslinie NexCre::EpoR. Nach dreiwöchiger Behandlung mit Epo bzw. Placebo (siehe auch Abbildung 1) absolvierten männliche Knockouts (KO) der o.g. Mauslinie (Alter zu Beginn 56 Tage) die *Puzzle Box*. Zuordnung der Hindernisüberwindungszeiten zu Versuchstag und Hindernis (siehe auch Tabelle 1). KO-Placebo (blau): $n = 7$; KO-Epo (lila): $n = 8$. Darstellung als Mittelwert \pm SEM, statistische Analyse mit *Two-Way ANOVA*.

Abbildung 9 zeigt die Hindernisüberwindungszeiten von placebo- bzw. Epo-behandelten KO. Beide Gruppen absolvierten die erste Schwierigkeitsstufe durchschnittlich in der gleichen Zeit von 181 s. Das Hindernis „Tunnel“ wurde im Erstversuch von Epo-behandelten KO mit durchschnittlich 104 s schneller abgeschlossen als von placebobehandelten KO mit durchschnittlich 197 s. In der tagesgleichen Wiederholung jedoch näherte sich der Zeitbedarf der placebobehandelten KO mit 124 s dem der Epo-behandelten KO an. Die Wiederholung des Hindernisses „Tunnel“ am Folgetag jedoch schlossen die Epo-behandelten KO erneut durchschnittlich schneller ab (78 s vs. 144 s). Ebenfalls absolvierten die Epo-behandelten KO die Wiederholung „Tunnel mit Einstreu“ am Folgetag durchschnittlich zügiger (136 s vs. 223 s). Auch die tagesgleiche Wiederholung der Hindernisse „Papierknäuel“ und „Nestmaterial“ schlossen Epo-behandelte KO durchschnittlich schneller ab. Der Zeitbedarf für die übrigen Hindernisse unterschied sich nicht relevant. Über alle Schwierigkeitsstufen der *Puzzle Box* bestand ein signifikanter Einfluss der Behandlung ($p = 0,0001$). Somit konnte in KO durch Epo-Behandlung eine verbesserte Hindernisüberwindungszeit nachgewiesen werden.

3.2 Rolle des homodimeren Erythropoietin-Rezeptors für erythropoietininduzierte Neurogenese

Im vorangegangenen Abschnitt 3.1 wurde mithilfe der Mauslinie NexCre::EpoR die Rolle des EpoR für die von Epo-induzierten prokognitiven Funktionen untersucht. Nach Abschluss der Verhaltenstests CRW und *Puzzle Box* erfolgte zum weiterführenden Verständnis

über die Funktion des EpoR eine Untersuchung zur aus Vorarbeiten bekannten Epo-induzierten Neurogenese im CA 1 des *Hippocampus* (siehe Abbildung 1). Hierzu wurden Hirnschnitte des *Hippocampus* angefertigt, die Pyramidenzellen durch Ctip2 und DAPI angefärbt und quantifiziert (siehe Abschnitt 2.6). Durch den Vergleich Epo- bzw. placebobehandelter WT und KO wurde die Rolle des EpoR für die Epo-induzierte Neurogenese im CA 1 des *Hippocampus* untersucht.

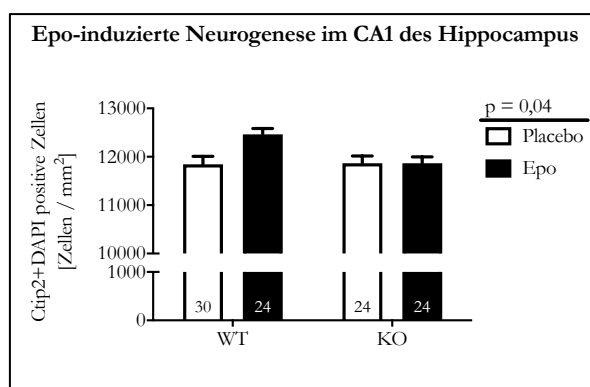


Abbildung 10: Erythropoietininduzierte Neurogenese im Cornu ammonis 1: Vergleich zwischen Wildtypen und Knockouts der Mauslinie NexCre::EpoR. Nach dreiwöchiger Behandlung mit Epo (schwarz) bzw. Placebo (weiß) und Absolvierung der Verhaltenstests wurde das Gehirn männlicher Wildtypen (WT) und Knockouts (KO) der o.g. Mauslinie im Alter von 62 Tagen gewonnen (siehe auch Abbildung 1). Die Pyramidenzellen im *Cornu ammonis* (CA) 1 des *Hippocampus* wurden mit Ctip2 und DAPI angefärbt, quantifiziert und zur Fläche normiert. Die Anzahl ausgewerteter Hirnschnitte ist im jeweiligen Balken notiert. Darstellung als Mittelwert \pm SEM mit unterbrochener Ordinatenachse zur Hervorhebung relevanter Bereiche, statistische Analyse mit *Two-Way ANOVA*.

In Hirnschnitten placebobehandelter WT betrug die Anzahl der Ctip2-DAPI-doppelpositiver Zellen im *Stratum pyramidale* des CA 1 durchschnittlich 11.843 Zellen/mm². In Epo-behandelten WT wurden durchschnittlich 12.463 Zellen/mm² nachgewiesen, eine signifikante Zunahme um 5,2 % ($p = 0,04$). In WT konnte somit eine Epo-induzierte Neurogenese festgestellt werden. In KO betrug die Anzahl der Pyramidenzellen nach Behandlung mit Placebo 11.867 Zellen/mm² bzw. nach Behandlung mit Epo 11.864 Zellen/mm². Die Anzahl der Pyramidenzellen in KO ist somit den placebobehandelten WT vergleichbar und es konnte in KO keine Epo-induzierte Neurogenese nachgewiesen werden.

3.3 Genexpression von Erythropoietin und homodimeren Erythropoietin-Rezeptor

Epo und EpoR interagieren auf molekularer Ebene zur Vermittlung prokognitiver Effekte. Dieses Zusammenspiel wurde auch hinsichtlich der Genexpression von Epo und EpoR näher untersucht. Die verwendeten Mauslinien NexCre::EpoR und NexCre::Epo weisen eine zellspezifische Deletion von EpoR bzw. Epo auf und erlauben durch den Vergleich von WT

und KO Rückschlüsse auf die Bedeutung der Projektionsneuronen. Hierzu erfolgten mittels qRT-PCR Untersuchungen zur Genexpression in männlichen und weiblichen Mäusen im Alter von 28 Tagen. Einerseits wurde eine sechsstündige Exposition gegenüber Hypoxie (6 % O₂), andererseits die Wirkung einer intraperitonealen Injektion von Epo sechs Stunden vor Gewebegewinnung analysiert (siehe Abbildung 2). Zusätzlich wurden weibliche Mäuse der Linie NexCre::EpoR im Alter von elf Monaten (M 11) gegenüber Hypoxie (6 % O₂) exponiert, um erste Hinweise auf alterskorrelierte Regulationsmechanismen zu erhalten.

Abbildung 11A zeigt zu Kontrollzwecken die Genexpression des vom Knockout nicht beeinflussten *Vascular Epithelial Growth Factor* (VEGF) in Mäusen der Linie NexCre::EpoR (P 28) nach sechsstündiger Hypoxie im Vergleich zu Normoxie. Es gelang, die bekannte hypoxieinduzierte Genexpression von VEGF zu reproduzieren (Abbildung 11A, $p < 0,0001$). Sie lag auch in den weiteren hypoxiebehandelten Gruppen vor (Abbildung 11D, J, jeweils $p < 0,0001$). Die Injektion von Epo hingegen führte zu keiner Veränderung der VEGF-Genexpression (Abbildung 11G, M).

Abbildung 11B zeigt die Genexpression von Epo in Mäusen der Linie NexCre::EpoR (P 28) nach sechsstündiger Hypoxie im Vergleich zu Normoxie. Sowohl in WT als auch KO liegt unter Hypoxie eine erhöhte Genexpression vor ($p < 0,0001$). Sie lag ebenfalls in älteren Mäusen vor (Abbildung 11E, $p = 0,0091$). In Mäusen des Genotyps NexCre::Epo nahm die Epo-Expression unter Hypoxie sowohl in WT als auch in KO zu (Abbildung 11K, $p = 0,0009$). Es lag kein signifikanter Effekt des Genotyps vor ($p = 0,55$). Infolge einer Epo-Injektion konnte kein Einfluss auf die Epo-Genexpression festgestellt werden (Abbildung 11H, N).

In Abbildung 11C wird die Genexpression des EpoR in Mäusen der Linie NexCre::EpoR (P 28) nach sechsstündiger Hypoxie im Vergleich zu Normoxie dargestellt. Es lag ein signifikanter Unterschied des Genotyps vor ($p < 0,0001$). Zusätzlich führte die Exposition in Hypoxie zu einer Abnahme der EpoR-Expression ($p = 0,0093$). In älteren Mäusen (Abbildung 11F) wurde der signifikante Unterschied des Genotyps ($p < 0,0001$) wie auch die hypoxieinduzierte Abnahme der EpoR-Expression nachgewiesen ($p = 0,0041$). Der Genotyp war auch in injizierten Mäusen der Linie NexCre::EpoR signifikant unterschiedlich (Abbildung 11I, $p = 0,0008$), es bestand jedoch kein signifikanter Effekt einer Epo-Behandlung sechs Stunden vor Gewebegewinnung ($p = 0,10$). In Mäusen des Genotyps NexCre::Epo lag kein Effekt des Genotyps auf die EpoR-Expression vor und ebenfalls kein Effekt der sechsstündigen Hypoxie (Abbildung 11L, $p = 0,80$). Die geschlechtsspezifische Auswertung aller Gene ergab keinen Anhalt für geschlechtsspezifische Effekte.

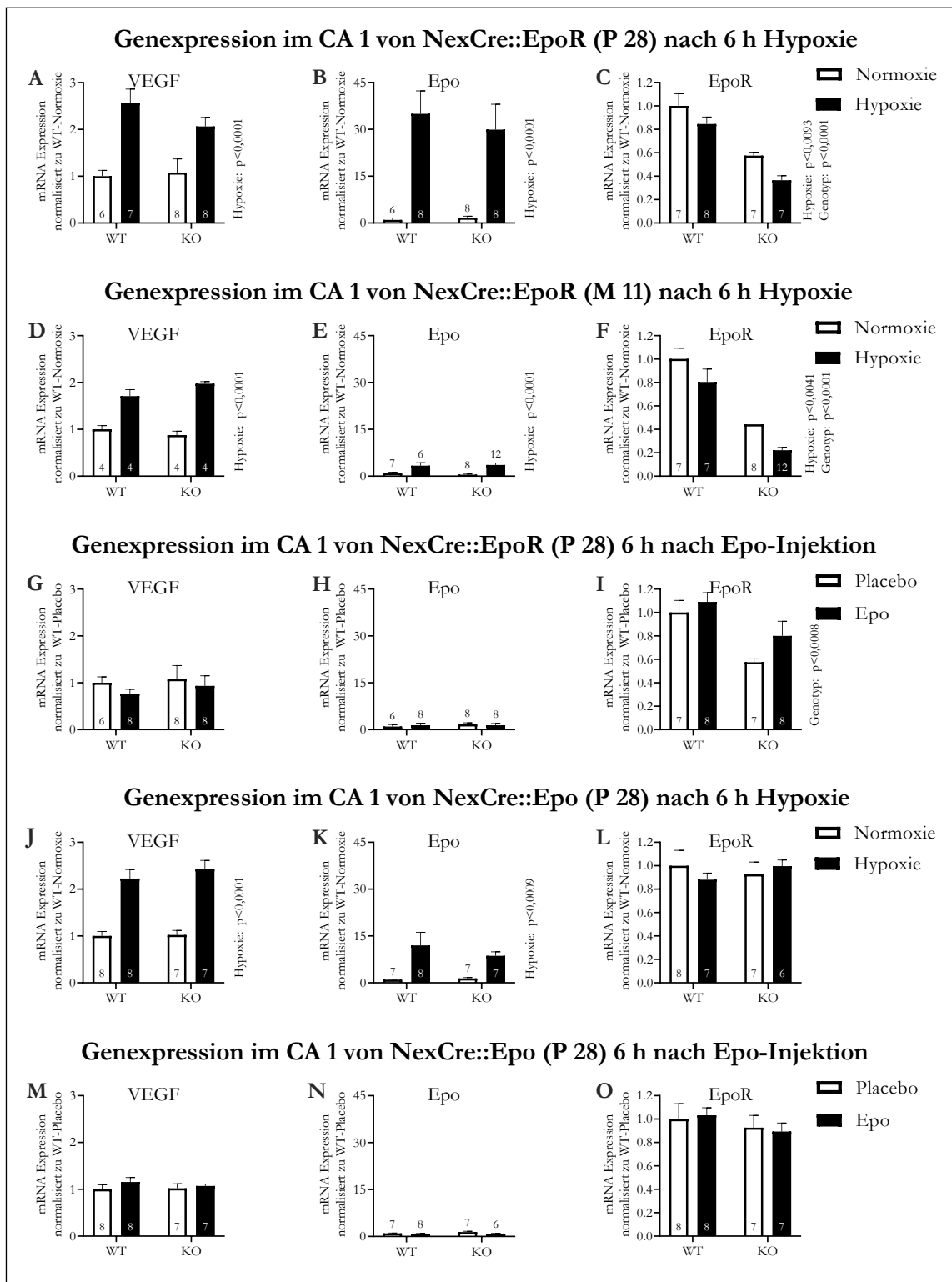


Abbildung 11: Genexpression von Erythropoietin und homodimeren Erythropoietin-Rezeptor im Cornu ammonis 1: Vergleich von Wildtypen und Knockouts der Mauslinien NexCre::EpoR und NexCre::Epo. Gewebeentnahme von gemischtgeschlechtlichen Wildtypen (WT) und Knockouts (KO) der o.g. Mauslinien am postnatalen Tag (P) 28 bzw. im Alter von 11 Monaten (M) nach sechsständiger Exposition gegenüber Hypoxie (6 % O₂) bzw. Normoxie (21 % O₂) oder 6 h nach Erythropoietin- bzw. Placebo-Injektion (siehe auch Abbildung 2). Messung der Genexpression mittels qRT-PCR aus RNA (VEGF als vom Genotyp unabhängiges Kontrollgen). Anzahl der Mäuse in/über den Balken. Aufgrund der Variabilität des absoluten Expressionsniveaus zwischen den Kohorten erfolgt jeweils eine Normierung zu Wildtypen unter Normoxie bzw. Placebo-Behandlung. Darstellung als Mittelwert \pm SEM, statistische Analyse mit *Two-Way ANOVA*.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht die Rolle des EpoR in Projektionsneuronen. Hierzu wurde die Mauslinie *NexCre::EpoR* genutzt, in welcher das *Epor*-Gen mittels Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des projektionsneuronenspezifischen Nex-Promotors deletiert werden kann. Der Vergleich von WT und KO erfolgte einerseits hinsichtlich kognitiver Funktionen in den Verhaltenstests CRW und *Puzzle Box*. Andererseits wurde die Rolle des EpoR für die Epo-induzierte Neurogenese untersucht. Hierfür wurde die Dichte der Pyramidenzellen im CA 1 des *Hippocampus* bestimmt. Zuletzt wurde die Genexpression von Epo und EpoR in Gewebe des CA 1 mithilfe der Mauslinien *NexCre::EpoR* und *NexCre::Epo* analysiert.

4.1 Complex Running Wheel

Mit dem Verhaltenstest CRW wurden kognitive und motorische Funktionen überprüft, darunter das Erlernen des Bewegungsablaufs, Koordination, Motivation und Ausdauer. Im Vergleich der durchschnittlichen Laufstrecken von Epo- bzw. placebobehandelten WT und KO wurde die höchste durchschnittliche Laufstrecke von Epo-behandelten WT erreicht. Sie unterschieden sich signifikant gegenüber placebobehandelten WT. Diese Beobachtung bestätigt die Überlegenheit Epo-behandelter WT aus vorherigen Untersuchungen, wie operanter Konditionierung mittels *Five Choice Serial Reaction Time Task* bzw. *Touch Screen Paradigm* oder kontextspezifischer Angstkonditionierung (Adamcio et al. 2008; El-Kordi et al. 2009; Hassouna et al. 2016). Somit ist der Verhaltenstest CRW bei Anwendung an WT und KO der Linie *NexCre::EpoR* dazu geeignet, die Rolle des EpoR für die Vermittlung prokognitiver Effekte von Epo zu untersuchen.

Der Vergleich Epo-behandelter WT und KO offenbarte signifikant höhere Laufstrecken in Epo-behandelten WT. Dies zeigt, dass der EpoR in Projektionsneuronen eine wichtige Rolle für die Vermittlung des Epo-Effekts auf die Laufstrecke im CRW spielt und andere Epo-Rezeptoren des zentralen Nervensystems die Deletion des EpoR in Projektionsneuronen nicht maßgeblich kompensieren können. Die hier gezeigte Bedeutung des EpoR steht im Einklang mit Vorarbeiten von Sargin et al. (2011), in denen ein konstitutiv aktivierter EpoR in Pyramidenzellen zu spezifisch verbesserten kognitiven Funktionen führte.

Für die prokognitiven Effekte einer Epo-Behandlung wird häufig diskutiert, dass diese auf einem erhöhten Hämatokrit bzw. einer erhöhten Sauerstoffverfügbarkeit beruhen. Dies kann

mithilfe des Vergleichs Epo-behandelter WT und Epo-behandelter KO widerlegt werden: Beide Gruppen unterlagen infolge der intraperitonealen Epo-Injektionen den gleichen peripheren Effekten, jedoch waren die Laufstrecken Epo-behandelter KO im CRW signifikant geringer. Weitere Evidenz weist in die gleiche Richtung: Epo-Analoga mit non-hämatopoietischen Eigenschaften entfalten ebenfalls prokognitive Wirkung (Leist et al. 2004; Sathyanesan et al. 2018). Auch konnte in klinischen Studien keine Korrelation zwischen Hämatokrit und neuronaler Epo-Wirkung nachgewiesen werden (Miskowiak et al. 2007; 2018). Neben der gezeigten Bedeutung des EpoR für die Vermittlung prokognitiver Effekte einer Epo-Behandlung stellt sich die Frage, ob der EpoR eine Rolle für grundlegende kognitive Funktionen, also ohne Epo-Behandlung, spielt.

Im Vergleich placebobehandelter WT mit placebobehandelten KO ist kein signifikanter Unterschied feststellbar, sodass die grundlegenden kognitiven Funktionen im CRW unabhängig vom EpoR in Projektionsneuronen erbracht werden können. Dies kann als Hinweis gewertet werden, dass das Zusammenspiel von Epo und EpoR in Projektionsneuronen vorrangig der kognitiven Funktionssteigerung dient.

Die in dieser Arbeit gezeigte Bedeutung des EpoR für die Vermittlung positiver Epo-Effekte im CRW basiert auf der intraperitonealen Verabreichung von Epo. Weitere Untersuchungen von Wakhloo et al. (2020) an der Mauslinie *NexCre::EpoR* erfolgten unter dem Einfluss von inspiratorischer Hypoxie (6 % O₂) zur endogenen Freisetzung von Epo. In 17 aufeinander folgenden Nächten wurden die Laufstrecken von WT und KO unter dem Einfluss inspiratorischer Hypoxie gemessen. Die Laufstrecke der WT übertraf signifikant die Laufstrecke der KO. Dies bestätigt die Rolle des EpoR in Projektionsneuronen und zeigt zusätzlich, dass der durch inspiratorische Hypoxie induzierte Epo-Effekt vergleichbar mit dem Epo-Effekt nach intraperitonealer Injektion ist (Wakhloo et al. 2020; Butt et al. 2021).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der EpoR in Projektionsneuronen maßgeblich die prokognitiven Effekte einer Epo-Behandlung im CRW vermittelt, jedoch grundlegende (basale) kognitive Funktionen unabhängig vom EpoR in Projektionsneuronen erbracht werden können.

4.2 Puzzle Box

In dem Verhaltenstest *Puzzle Box* müssen Mäuse an fünf aufeinander folgenden Tagen Hindernisse steigender Schwierigkeit überwinden, um einen großflächigen, hell ausgeleuchteten Raum verlassen zu können und in den präferierten, kleinen und dunklen Bereich zu gelangen.

Hierzu bedarf es Orientierung, Exploration, Planung, Motivation, Ausdauer und aufgrund wiederholter Testung von Hindernissen ebenfalls Erinnerungsvermögen. Die Hindernisüberwindungszeiten wurden zwischen Epo- bzw. placebobehandelten WT und KO verglichen, um die Rolle des EpoR für Exekutivfunktionen zu untersuchen.

Es gelang Epo-behandelten WT signifikant schneller als placebobehandelten WT, die Hindernisse zu überwinden. In dem Verhaltenstest *Puzzle Box* bestehen somit infolge einer Epo-Behandlung überlegene kognitive Funktionen, vergleichbar dem CRW und vorangegangenen Studien (Adamcio et al. 2008; El-Kordi et al. 2009; Hassouna et al. 2016).

Der Vergleich zwischen Epo-behandelten WT und KO ergab keinen signifikanten Unterschied. Die Deletion des EpoR in Projektionsneuronen wirkt sich somit nicht nachteilhaft auf die Wirkung von Epo in der *Puzzle Box* aus. Gleichzeitig offenbarte der Vergleich Epo-behandelter KO und placebobehandelter KO ebenfalls keinen signifikanten Unterschied, jedoch eine signifikante Interaktion von Genotyp und Hindernis. Demzufolge wird die prokognitive Wirkung einer Epo-Behandlung nur in ausgewählten Hindernissen vermittelt, was darauf hindeutet, dass der Epo-Effekt in WT stärker ausgeprägt sein könnte als in KO.

Im Vergleich zwischen placebobehandelten WT und placebobehandelten KO bestanden keine signifikanten Unterschiede, sodass die grundlegenden, basalen kognitiven Funktionen, also ohne Epo-Behandlung, in der *Puzzle Box* unabhängig vom EpoR erbracht werden können.

Diese Einordnung beruht auf der Auswertung des gesamten Versuchszeitraums. Darüber hinaus erlaubt der Versuchsaufbau zu untersuchen, ob bei der Wiederholung von Hindernissen ein Erinnerungseffekt eintritt. Die Hindernisse „Tunnel“, „Tunnel mit Einstreu“, „Papierknäuel“ und „Nestmaterial“ wurden jeweils an zweiter Stelle von täglich drei Versuchen begonnen und insgesamt zwei Mal wiederholt, sodass die erste Wiederholung am gleichen Tag und die zweite Wiederholung am Folgetag an erster Stelle stattfand. Dies ermöglicht zu untersuchen, ob nach vorheriger erfolgreicher Überwindung des Hindernisses ein Erinnerungseffekt zu einer schnelleren Überwindung führt, ob ein solcher Erinnerungseffekt bis zum Folgetag andauert und welchen Einfluss Genotyp und Behandlung darauf haben.

Für die tagesgleiche Wiederholung des Hindernisses „Tunnel“ konnte in den placebobehandelten Gruppen unabhängig vom Genotyp beobachtet werden, dass die Wiederholung schneller gelang. Die Epo-behandelten Gruppen hingegen erreichten diese schnelle Hindernisüberwindungszeit bereits im Erstversuch und schlossen die Wiederholung wie den Erstversuch ab. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Epo-behandelte Tiere das

einfache Hindernis „Tunnel“ bereits im Erstversuch so schnell überwinden, dass nur noch wenig Verbesserungspotential besteht. Die placebobehandelten Mäuse hingegen können vom Wiederholungseffekt profitieren. In der nächsthöheren Schwierigkeitsstufe „Tunnel mit Einstreu“ schlossen Epo-behandelte WT die tagesgleiche Wiederholung erneut so schnell wie den Erstversuch ab, Epo-behandelte KO hingegen konnten sich angesichts höherer Hindernisüberwindungszeit im Erstversuch in der tagesgleichen Wiederholung verbessern, ebenso die placebobehandelten Gruppen. Besonders deutlich zeigt sich ein Wiederholungseffekt in der höchsten Schwierigkeitsstufe „Nestmaterial“: Hier schlossen auch Epo-behandelte WT in der tagesgleichen Wiederholung deutlich schneller ab als im Erstversuch, ebenso die Epo-behandelten KO und placebobehandelten WT. Die placebobehandelten KO hingegen konnten sich in der höchsten Schwierigkeitsstufe bei Wiederholung nicht mehr verbessern. Zusammengefasst ergibt sich hieraus ein Stufenmodell, nach welchem die Epo-behandelten WT in tagesgleichen Wiederholungen von Hindernissen der *Puzzle Box* am besten abschneiden, sie überwinden einfache Hindernisse bereits im Erstversuch zügig, ein Wiederholungseffekt zeigt sich daher erst bei dem anspruchsvollsten Hindernis „Nestmaterial“. Die Epo-behandelten KO schneiden vergleichbar gut ab, profitieren tendenziell jedoch schon ab einer leichteren Schwierigkeitsstufe vom Wiederholungseffekt. Die placebobehandelten Gruppen profitieren von Beginn an vom Wiederholungseffekt, wobei die placebobehandelten KO anders als die placebobehandelten WT in der höchsten Schwierigkeitsstufe nicht mehr profitieren können.

Die Untersuchung tagesübergreifender Erinnerungseffekte beurteilt das Langzeitgedächtnis. Für die Wiederholung am Folgetag des einfachen Hindernisses „Tunnel“ benötigten alle Gruppen durchschnittlich die gleiche Zeit wie in der Wiederholung des Vortags. Die Überwindung des nächstanspruchsvollen Hindernisses „Tunnel mit Einstreu“ hingegen bedurfte am Folgetag mehr Zeit als am Vortag. Hierbei war der zusätzliche Zeitbedarf bei Epo-behandelten Mäusen geringer als bei placebobehandelten Mäusen. In den anspruchsvollsten Schwierigkeitsstufen „Papierknäuel“ und „Nestmaterial“ stieg der Zeitbedarf zur Hindernisüberwindung am Folgetag in allen Gruppen erheblich, viele Versuchstiere schlossen die Wiederholung nicht mehr erfolgreich ab. Es ist somit für Wiederholungen am Folgetag ein Erinnerungseffekt für leichtere Hindernisse feststellbar, der in anspruchsvollen Hindernissen jedoch nicht mehr beobachtet werden kann.

Zusammenfassend ergibt die Untersuchung der tagesgleichen Wiederholung und der Wiederholung am Folgetag Hindernis-spezifische Erinnerungseffekte in Abhängigkeit von Be-

handlung und Genotyp. Die Epo-behandelten Gruppen sind den placebobehandelten Gruppen überlegen. Innerhalb der Epo-behandelten Gruppen sind WT in tagesgleichen Wiederholungen geringfügig besser als KO. Somit ergibt sich ein hierarchisches Stufenmodell, das die Ergebnisse der Gesamtauswertung bestätigt.

Das herausgearbeitete Stufenmodell legt nahe, dass der Effekt der Epo-Behandlung auf das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen kognitiven Funktionen in der *Puzzle Box* nicht ausschließlich über den klassischen EpoR vermittelt wird. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass neben dem EpoR auch weitere Epo-Rezeptoren im zentralen Nervensystem vorliegen (Ostrowski und Heinrich 2018). Eine für bestimmte kognitive Funktionen relevante Rolle dieser weiteren Rezeptoren könnte insbesondere erklären, warum die Epo-Behandlung in KO nur in Interaktion mit bestimmten Hindernissen einen signifikanten Effekt bewirkt. Entsprechend könnte der EpoR in Projektionsneuronen einen zusätzlichen Epo-Effekt auf andere kognitive Funktionen vermitteln. Ob die weiteren Epo-Rezeptoren für kognitive Funktionen tatsächlich eine relevante Rolle spielen, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Weitergehende Untersuchungen könnten die Rolle der jeweiligen Rezeptoren für kognitive Funktionen untersuchen. Dem vorteilhaften Epo-Effekt in KO könnte andererseits die Epo-Wirkung auf andere Zellen als Pyramidenzellen zugrunde liegen. So exprimieren beispielsweise Mikroglia, Oligodendrozyten und Astrozyten den EpoR (Ott et al. 2015). Die Funktion dieser Zellen kann durch Epo positiv beeinflusst werden (Bond und Rex 2014; Wang et al. 2017; Zhou et al. 2017; Dewan et al. 2020). Der vorteilhafte Epo-Effekt auf Gliazellen könnte somit zur Verbesserung kognitiver Funktionen beitragen.

Der Versuchsaufbau der *Puzzle Box* sieht die Testung von Hindernissen verschiedenen Schwierigkeitsgrades vor. Die anspruchsvollen Hindernisse „Papierknäuel“ in der Wiederholung am Folgetag sowie „Nestmaterial“ wurden von vielen Mäusen nicht mehr innerhalb der vorgegebenen Zeit abgeschlossen, sodass sie manuell in den dunklen Bereich der *Puzzle Box* umgesetzt wurden. Dies beeinträchtigt die Untersuchung der kognitiven Funktionen, weil die tatsächlich benötigte Zeit zur Überwindung der Hindernisse und mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen nicht ermittelt werden können. Eine Anpassung des Versuchsablaufs könnte somit folgerichtig erscheinen. Allerdings verwundert, dass das Hindernis „Papierknäuel“ am Vortag von deutlich mehr Mäusen gelöst wurde und die vorgegebene Zeit ausreichend war. Dies deutet darauf hin, dass die Motivation zur Überwindung anspruchsvoller Hindernisse maßgeblich von einem vorherigen Erfolgserlebnis abhängen könnte. Hierfür spricht, dass auch das Hindernis „Nestmaterial“ im Erstversuch von wenigen Mäusen gelöst wurde, die Mäuse daraufhin manuell in den dunklen Bereich der *Puzzle*

Box gesetzt wurden und das Hindernis in der tagesgleichen Wiederholung schließlich von deutlich mehr Mäusen gelöst werden konnte. Die Bedeutung der Motivation wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die Hindernisse an zweiter Stelle des jeweiligen Versuchstages schneller überwunden wurden als die Hindernisse an erster Stelle, obwohl der Schwierigkeitsgrad zunimmt. Somit könnte erwogen werden, bei den anspruchsvollsten Hindernissen auf die Wiederholung am Folgetag zu verzichten, da für die höchsten Schwierigkeitsgrade ohnehin kein Wiederholungseffekt mehr nachweisbar ist, und stattdessen ein leichteres Hindernis zu wiederholen, das zuverlässig innerhalb der vorgegebenen Zeit überwunden werden kann. Dieses Erfolgserlebnis könnte die Motivation für den nächsthöheren Schwierigkeitsgrad steigern, sodass weniger Mäuse die vorgegebene Zeit ausreizten und eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen bestünde. Die Motivation könnte ebenfalls erhöht werden, indem im dunklen Bereich der *Puzzle Box* eine zusätzliche Belohnung, beispielsweise *Enrichment* oder Futter, bereitgestellt wird, die nach erfolgreichem Überwinden des Hindernisses zugänglich wären.

4.3 Erythropoietininduzierte Neurogenese

Aus Vorarbeiten von Hassouna et al. (2016) ist bekannt, dass infolge des auch in Abbildung 1 gezeigten dreiwöchigen Behandlungsschemas mit Epo eine Neurogenese im CA 1 beobachtet werden kann. Hierbei nimmt die Anzahl der Pyramidenzellen um 20 % zu. Zur Untersuchung der Rolle des EpoR für die Epo-induzierte Neurogenese wurde das Behandlungsschema in der Mauslinie *NexCre::EpoR* angewendet und die Zelldichte nach dreiwöchiger Behandlung mit Epo bzw. Placebo in WT und KO quantifiziert.

In Epo-behandelten WT lag die Dichte der Pyramidenzellen signifikant und um 5,2 % höher als in placebobehandelten WT, sodass die Zunahme der Zelldichte qualitativ reproduzierbar ist, quantitativ jedoch geringer ausfällt als von Hassouna et al. (2016) beobachtet.

Eine daraufhin durchgeführte retrospektive Analyse ergab, dass die geringere Zunahme der Zelldichte anteilig auf das folgende Artefakt zurückzuführen sein könnte: In den analysierten Hirnschnitten Epo-behandelter WT konnte vermehrt eine abweichende Konfiguration des CA 1 festgestellt werden. Hierbei variierte die auf dem Hirnschnitt repräsentierte Ausdehnung des *Stratum pyramidale*. In Hirnschnitten mit schmalen *Stratum pyramidale* zwischen *Stratum oriens* und *Stratum radiatum* lag eine regelmäßige Dichte der Pyramidenzellen vor. Hirnschnitte mit breitem *Stratum pyramidale* hingegen wiesen zentral eine höhere Dichte an Pyramidenzellen auf als an den Grenzen zu *Stratum oriens* und *Stratum radiatum*. Bei anzunehmender unbeeinträchtigter Anatomie des CA 1 kann hierfür ein abweichender Schnittwinkel bei

der Anfertigung der Hirnschnitte infrage kommen. Da die Hirnschnitte nur aus der linken Hemisphäre angefertigt wurden, konnte keine exakte Ausrichtung des Schnittwinkels mithilfe des Vergleichs zur rechten Hemisphäre erfolgen. Wird das CA 1 nicht mehr exakt koronar geschnitten, sondern in einem abweichenden Winkel, so vergrößert sich die angeschnittene Fläche. Hierbei ist die per se regelmäßige Zelldichte des CA 1 an den Außengrenzen des Hirnschnitts vermindert, weil dort durch abweichenden Winkel zusätzliche Fläche aus dem CA 1 abgebildet wird. Dies kann erklären, warum die Zunahme der Zelldichte nach Epo-Behandlung mit ca. 5 % geringer ausfiel als von Hassouna et al. (2016) beschrieben.

Eine weitere mögliche Erklärung für die geringere Zunahme der Zelldichte könnte in der geänderten Rezeptur der verwendeten Epo-Spritzen liegen. Hinweisend hierauf ist eine geänderte Empfehlung der Applikationsroute durch den Hersteller, die anders als zuvor Infusionen nicht mehr berücksichtigt. Eine Verringerung der Epo-stabilisierenden Begleitstoffe zum Schutz vor missbräuchlicher Verwendung wie beispielsweise Doping könnte zugrunde liegen. Somit würde das für die Versuchsdurchführung verdünnte Epo eine geringere biologische Aktivität als berechnet aufweisen und somit erklären, warum der Effekt auf die Zelldichte im CA 1 geringer ausfiel als von Hassouna et al. (2016) beschrieben.

Es gilt jedoch, dass die potente Wirkung von Epo trotz der o.g. Umstände weiterhin nachweisbar ist. Zusammenfassend ist die Zelldichte Epo-behandelter WT im Vergleich zu Epo-behandelten KO signifikant höher. Somit spielt der EpoR eine relevante Rolle für die Epo-induzierte Neurogenese. Die placebobehandelten WT, placebobehandelten KO und Epo-behandelten KO weisen eine vergleichbare Zelldichte auf, sodass die Zelldichte des *Stratum pyramidale* durch die Deletion des EpoR unbeeinträchtigt scheint. Vergleichbar dem CRW kann dies als Hinweis gewertet werden, dass das Zusammenspiel von Epo und EpoR vorwiegend funktionssteigernde Effekte vermittelt.

4.4 Genexpression von Erythropoietin und homodimerem Erythropoietin-Rezeptor

Die Untersuchung der Genexpression von Epo und EpoR ermöglicht ein besseres Verständnis ihres Zusammenwirkens zur Vermittlung prokognitiver Effekte. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass der *Hippocampus* und das CA 1 besonders Epo-responsive Hirnareale sind (Hassouna et al. 2016). Daher erfolgte die Untersuchung der Genexpression aus Gewebe des CA 1. Die Expression von Epo und EpoR wurde mithilfe von jungen Mäusen (P 28) der Linien NexCre::EpoR und NexCre::Epo untersucht. Hierzu erfolgte ein Vergleich

der jeweiligen WT und KO nach einer sechsstündigen endogenen Stimulation der Epo-Synthese mittels inspiratorischer Hypoxie (6 % O₂) im Vergleich zu Normoxie (21 % O₂).

Die Untersuchung der Genexpression von Epo und EpoR unterliegt methodisch der Herausforderung, dass sie sich an der unteren Grenze der Nachweisbarkeit mittels qRT-PCR bewegt. Beispielsweise konnte die Genexpression von Epo nur unter Hypoxie detektiert werden. In Einzelzell-RNA-Sequenzierung sind Epo und EpoR hingegen gar nicht detektierbar (Wakhloo et al. 2020). Andererseits lag eine erhebliche Variabilität des absoluten Expressionsniveaus zwischen den Kohorten vor, sodass eine Normierung zum jeweiligen Wildtyp unter Normoxie bzw. Placebo-Behandlung erfolgte. Dies erlaubt eine verbesserte Beurteilung der relativen Veränderungen in Abhängigkeit von der Behandlung. Vor diesem Hintergrund sollten die untersuchten Veränderungen der Genexpression jedoch vorwiegend qualitativ und nachrangig quantitativ beurteilt werden.

In den Mauslinien NexCre::EpoR und NexCre::Epo wurde die bekannte hypoxieinduzierte Genexpression von Epo bestätigt (Marti et al. 1996). In der Mauslinie NexCre::Epo nahm die Epo-Expression unter Hypoxie sowohl in WT als auch in KO zu. Dies lässt den Schluss zu, dass entweder andere Zellen als Pyramidenzellen die Epo-Synthese verantworten oder diese den Epo-Knockout in Pyramidenzellen kompensieren können.

In der Mauslinie NexCre::EpoR war die Expression des EpoR in KO signifikant geringer als in WT, ungeachtet der Behandlung. Dieses Ergebnis bestätigt quantitativ den Knockout des EpoR. Dennoch konnte in KO eine Expression des EpoR nachgewiesen werden. Dies belegt die bekannte Expression des EpoR durch beispielsweise Mikroglia, Astrozyten, Oligodendrozyten und Endothelzellen (Bernaudin et al. 1999; Ott et al. 2015). Unter dem Einfluss von Hypoxie nahm die Expression des EpoR in diesen Zellen signifikant ab.

Somit ergeben sich aus der Genexpression von Epo und EpoR Hinweise auf das Zusammenwirken und die Bedeutung verschiedener Zelltypen für die Vermittlung prokognitiver Epo-Effekte. Diesbezüglich können weitere Untersuchungen erfolgen. Wie die methodisch erschwerte Nachweisbarkeit dokumentiert, bewirken bereits sehr niedrige Konzentrationen von Epo eine beachtliche Verbesserung kognitiver Funktionen. Die weitergehenden Untersuchungen zur Rolle des EpoR im Zusammenspiel verschiedener Zelltypen könnte daher beispielsweise mithilfe weiterer Knockout-Mauslinien der entsprechenden Zelltypen erfolgen.

4.5 Limitationen

Die Rolle des EpoR in Projektionsneuronen wurde mithilfe der Mauslinie NexCre::EpoR in den Verhaltenstests CRW und *Puzzle Box* untersucht. In beiden Tests wurde das Zusammenwirken mehrerer kognitiver Funktionen erfasst, sodass eine Aussage über die allgemeine kognitive Funktion in Abhängigkeit vom EpoR getroffen werden kann. Die zugrunde liegenden spezifischen kognitiven Funktionen können mithilfe der verwendeten Verhaltenstests jedoch nicht abgegrenzt werden. Dies sollte insbesondere beachtet werden, da die Vermittlung des vorteilhaften Epo-Effekts im CRW maßgeblich vom EpoR abhängig war, in der *Puzzle Box* jedoch nur teilweise. Daher weisen die Ergebnisse dieser Arbeit in Richtung weitergehender Untersuchungen mit spezifischen Verhaltenstests. Mithilfe dieser könnte auch die bislang begrenzte Aussagekraft zu Störfaktoren präzisiert werden. Grundsätzlich gilt für die Verhaltenstestung, dass hoch komplexes Verhalten gemessen wird, in welches eine Vielzahl verschiedener Faktoren einfließt. Trotz standardisierter Durchführung sollten diese als mögliche Limitation respektiert werden (Kafkafi et al. 2018).

Zum weitergehenden Verständnis der Rolle des EpoR wurde die Epo-induzierte Neurogenese und die Regulation der Genexpression in Abhängigkeit vom EpoR untersucht. Beide Untersuchungen erfolgten an Gewebe des CA 1 des *Hippocampus*, sodass eine Aussage über die Involvierung weiterer Hirnareale nicht getroffen werden kann. Die Ergebnisse aller Untersuchungen deuten darauf hin, dass ein komplexes Zusammenspiel von Epo und EpoR in verschiedenen Zellentypen die positiven Epo-Effekte vermittelt. Die Expressionsanalyse aus Gewebe des CA 1 lässt jedoch nur begrenzte Rückschlüsse auf die Rolle einzelner Zellen zu, sodass diesbezüglich weitere Untersuchungen erfolgen sollten.

Obwohl zahlreiche Studien die Wirksamkeit von Epo im Menschen nachweisen konnten und Epo ein phylogenetisch konserviertes Glykoprotein darstellt, soll darauf hingewiesen werden, dass die Ergebnisse aus dem Mausmodell nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auf den Menschen übertragbar sind.

4.6 Ausblick

Die Wirkung von Epo offenbart das Potential des Gehirns im Hinblick auf Neurogenese, neuronale Plastizität, Myelogenese, Inflammationskontrolle und kognitiver Leistungssteigerung. Somit vermittelt Epo Effekte, die der Pathogenese häufiger Erkrankungen des zentralen Nervensystems entgegenstehen: beispielsweise bei neurodegenerativen Erkrankungen,

Schlaganfall, Multiple Sklerose, Schizophrenie oder affektiven Störungen. Die für diese Erkrankungen zur Verfügung stehenden Therapien sind bislang unzureichend, sodass für die Patienten ein großer Leidensdruck und für die Gesellschaft beachtliche ökonomische Kosten entstehen. Dies verdeutlicht den Bedarf verbesserter Behandlungsmöglichkeiten, die eine Reduzierung pathologischer bzw. Wiederherstellung physiologischer Prozesse ermöglichen sollten. Hierbei kommt der Wirkung von Epo und den zugrunde liegenden Mechanismen eine besondere Bedeutung zu. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der EpoR als maßgeblich beteiligte Struktur zur Vermittlung prokognitiver Effekte von Epo identifiziert und stellt somit für die Entwicklung zielgerichteter Therapien ein relevantes Ziel dar. Perspektivisch vorstellbar wäre beispielsweise eine zukünftige Anwendung zur Behandlung der Alzheimer Demenz, bei der bereits in frühen Stadien Neurone des CA zugrunde gehen. Hier könnte eine zielgerichtete Therapie entwickelt werden, die auf der Epo-induzierten und EpoR-vermittelten Neurogenese basiert.

5 Zusammenfassung

Der Verlust kognitiver Funktionen kennzeichnet neurodegenerative Gehirnerkrankungen und ist bislang nur unzureichend behandelbar. Erythropoietin, benannt nach seiner Rolle für die Blutbildung, zeigte in zahlreichen klinischen Studien auch kognitionssteigernde Funktionen. Diese beruhen auf einer gehirnspezifischen Wirkung unabhängig vom Hämatokrit, beispielsweise auf einer Erhöhung der synaptischen Plastizität und Neurogenese im *Hippocampus*. Bislang ist jedoch unbekannt, welcher der vier mutmaßlichen Erythropoietin-Rezeptoren des Gehirns diese Funktionen vermittelt. Dieses Verständnis ist allerdings Voraussetzung für die Entwicklung zielgerichteter Therapien. Daher untersucht die vorliegende Arbeit die Rolle des „klassischen“, homodimeren Erythropoietin-Rezeptors (EpoR). Hierzu wird die Mauslinie NexCre::EpoR verwendet, die eine Deletion des *Epor*-Gens spezifisch in Projektionsneuronen erlaubt. Der Vergleich von Wildtypen und Knockouts erfolgt einerseits hinsichtlich der erythropoietininduzierten Zunahme kognitiver Funktionen in den Verhaltenstests *Complex Running Wheel* und *Puzzle Box*, andererseits hinsichtlich der erythropoietininduzierten Neurogenese und Genexpression im *Cornu ammonis* (CA) 1 des *Hippocampus*, welche histologisch bzw. mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion beurteilt werden. Im *Complex Running Wheel* erreichen erythropoietinbehandelte Wildtypen die höchsten Laufstrecken, wohingegen erythropoietinbehandelte Knockouts den placebobehandelten Wildtypen und Knockouts ähneln. In der *Puzzle Box* sind Wildtypen tendenziell überlegen, jedoch profitieren auch Knockouts von einer Erythropoietin-Behandlung. Dies deutet auf eine differenzierte Bedeutung des homodimeren EpoR für spezifische Gehirnfunktionen hin. Die erythropoietininduzierte Neurogenese im CA 1 liegt in Wildtypen, jedoch nicht in Knockouts vor. Die Genexpression in den Mauslinien NexCre::EpoR und NexCre::Epo gibt Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen verschiedenen Zelltypen zur Vermittlung der Effekte von Erythropoietin. Zusammenfassend ist der (homodimere) EpoR in Projektionsneuronen unabdingbar für die erythropoietininduzierte Zunahme kognitiver Funktionen im *Complex Running Wheel* sowie für die Neurogenese im CA 1. Für spezifische Hirnfunktionen besteht eine differenzierte Bedeutung des homodimeren EpoR. Gleichzeitig erscheinen die basalen kognitiven Funktionen placebobehandelter Mäuse durch den Knockout des EpoR unbeeinträchtigt. Demnach dient der homodimere EpoR in Projektionsneuronen vorrangig der Optimierung kognitiver Funktionen. Zukünftig könnte hieraus eine gezielte Therapie für kognitiven Funktionsverlust bei neurodegenerativen Erkrankungen entwickelt werden.

6 Summary

Cognitive dysfunction and decline are clinical hallmarks of neurodegenerative brain diseases and yet await sufficient therapy. Proven in numerous clinical studies, erythropoietin, named after its function in stimulating hematopoiesis, also enhances cognitive function. Mechanistically, erythropoietin exerts specific brain functions, independent of hematocrit, for instance an increase of synaptic plasticity and *hippocampal* neurogenesis. However, little is known about the brain erythropoietin receptor (EpoR) mediating these effects. Amongst four suspected brain EpoR, the ‘classical’, homodimeric EpoR is investigated in this thesis, aiming at revealing therapeutic targets suitable for counterbalancing cognitive decline. Utilizing the mouse line NexCre::EpoR, which allows a specific knockout of *Epor* gene in principal neurons, wildtypes and knockouts are compared with regard to erythropoietin-induced cognitive improvement in the behavioral tests *complex running wheel* and *puzzle box*. In addition, erythropoietin-mediated *hippocampal* neurogenesis and gene expression patterns in *cornu ammonis* (CA) 1 are assessed by immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction, respectively. In the overnight *complex running wheel*, erythropoietin-treated wildtype mice perform superior, whereas erythropoietin-treated EpoR knockout mice match placebo treated wildtype and knockout mice. In *puzzle box*, wildtype mice tend to surpass knockout mice but both genotypes are responsive to erythropoietin treatment, indicating a varying role of the homodimeric EpoR on principal neurons depending on specific brain functions. CA 1 neurogenesis is observed in wildtype mice following erythropoietin treatment, while knockout mice remain baseline irrespective of treatment. Gene expression patterns in knockout mice of NexCre::EpoR and NexCre::Epo mouse lines give first hints of an interaction between different cell types that collectively support erythropoietin brain function. In summary, the ‘classical’, homodimeric EpoR in principal neurons is indispensable for mediating enhanced cognitive function in *complex running wheel*, and also plays an important role for CA 1 neurogenesis. Additionally, a different involvement of the homodimeric EpoR for specific brain function is noticed. Baseline cognitive function, represented by placebo treated mice, is not diminished in EpoR knockout mice, indicating that the homodimeric EpoR in principal neurons primarily serves as an ‘upgrading system’. Ultimately, this might be a promising, targeted approach for an advanced therapy of cognitive decline in brain diseases.

7 Literaturverzeichnis

- Adamcio B, Sargin D, Stradomska A, Medrihan L, Gertler C, Theis F, Zhang M, Müller M, Hassouna I, Hannke K, et al. (2008): Erythropoietin enhances hippocampal long-term potentiation and memory. *BMC Biol* 6, 37
- Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, Ghezzi P (2002): Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 952, 128–134
- Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N, Yamamura K, Nagoshi N, Shibata S, Rao TN, et al. (2011): Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest* 121, 3981–3990
- Bachmann S, Le Hir M, Eckardt K-U (1993): Co-localization of Erythropoietin mRNA and Ecto-5'-Nucleotidase Immunoreactivity in Peritubular Cells of Rat Renal Cortex Indicates That Fibroblasts Produce Erythropoietin. *J Histochem Cytochem* 41, 335–341
- Bartels C, Späte K, Krampe H, Ehrenreich H (2008): Recombinant human erythropoietin: novel strategies for neuroprotective/neuroregenerative treatment of multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 1, 193–206
- Bazan JF (1990): Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6934–6938
- Ben Abdallah NM-B, Fuss J, Trusel M, Galsworthy MJ, Bobsin K, Colacicco G, Deacon RMJ, Riva MA, Kellendonk C, Sprengel R, et al. (2011): The puzzle box as a simple and efficient behavioral test for exploring impairments of general cognition and executive functions in mouse models of schizophrenia. *Exp Neurol* 227, 42–52
- Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E (1999): A Potential Role for Erythropoietin in Focal Permanent Cerebral Ischemia in Mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 643–651
- Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, MacKenzie ET, Petit E (2000): Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 30, 271–278
- Beru N, McDonald J, Lacombe C, Goldwasser E (1986): Expression of the Erythropoietin Gene. *Mol Cell Biol* 6, 2571–2575
- Boissel JP, Lee W-R, Presnell SR, Cohen FE, Bunn HF (1993): Erythropoietin Structure-Function Relationships - Mutant Proteins That Test a Model of Tertiary Structure. *J Biol Chem* 268, 15983–15993

- Bond WS, Rex TS (2014): Evidence that erythropoietin modulates neuroinflammation through differential action on neurons, astrocytes, and microglia. *Front Immunol* 5, 523
- Bondurant MC, Koury MJ (1986): Anemia Induces Accumulation of Erythropoietin mRNA in the Kidney and Liver. *Mol Cell Biol* 6, 2731–2733
- Bonsdorff E, Jalavisto E (1948): A Humoral Mechanism in Anoxic Erythrocytosis. *Acta Physiol Scand* 16, 150–170
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A (2000): Erythropoietin crosses the blood–brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10526–10531
- Bruick RK, McKnight SL (2001): A Conserved Family of Prolyl-4-Hydroxylases That Modify HIF. *Science* 294, 1337–1340
- Butt UJ, Steixner-Kumar AA, Depp C, Sun T, Hassouna I, Wüstefeld L, Arinrad S, Zillmann MR, Schopf N, Garcia-Agudo LF, et al. (2021): Hippocampal neurons respond to brain activity with functional hypoxia. *Mol Psychiatry* (im Druck)
- Byts N, Samoylenko A, Fasshauer T, Ivanisevic M, Hennighausen L, Ehrenreich H, Sirén A-L (2008): Essential role for Stat5 in the neurotrophic but not in the neuroprotective effect of erythropoietin. *Cell Death Differ* 15, 783–792
- Cheetham JC, Smith DM, Aoki KH, Stevenson JL, Hoeffel TJ, Syed RS, Egrie J, Harvey TS (1998): NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nat Struct Biol* 5, 861–866
- Chen Z-Y, Asavaritikrai P, Prchal JT, Noguchi CT (2007): Endogenous Erythropoietin Signaling Is Required for Normal Neural Progenitor Cell Proliferation. *J Biol Chem* 282, 25875–25883
- Chin K, Yu X, Beleslin-Cokic B, Liu C, Shen K, Mohrenweiser HW, Noguchi CT (2000): Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Brain Res Mol Brain Res* 81, 29–42
- Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG, March CJ (1990): A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem Sci* 15, 265–270
- Dame C, Bartmann P, Wolber E-M, Fahnenstich H, Hofmann D, Fandrey J (2000): Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 125, 69–74
- D’Andrea AD, Lodish HF, Wong GG (1989a): Expression Cloning of the Murine Erythropoietin Receptor. *Cell* 57, 277–285
- D’Andrea AD, Fasman GD, Lodish HF (1989b): Erythropoietin receptor and interleukin-2 receptor β chain: A new receptor family. *Cell* 58, 1023–1024

- Davis JM, Arakawa T, Strickland TW, Yphantis DA (1987): Characterization of Recombinant Human Erythropoietin Produced in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biochemistry* 26, 2633–2638
- Dewan MV, Serdar M, van de Looij Y, Kowallick M, Hadamitzky M, Endesfelder S, Fandrey J, Sizonenko SV, Herz J, Felderhoff-Müser U, et al. (2020): Repetitive Erythropoietin Treatment Improves Long-Term Neurocognitive Outcome by Attenuating Hyperoxia-Induced Hypomyelination in the Developing Brain. *Front Neurol* 11, 804
- Digicaylioglu M, Lipton SA (2001): Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- κ B signalling cascades. *Nature* 412, 641–647
- Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M (1995): Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3717–3720
- Dusanter-Fourt I, Casadevall N, Lacombe C, Muller O, Billat C, Fischer S, Mayeux P (1992): Erythropoietin Induces the Tyrosine Phosphorylation of Its Own Receptor in Human Erythropoietin-responsive Cells. *J Biol Chem* 267, 10670–10675
- Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, B  h   M, Hasselblatt M, Woldt H, Falkai P, Knerlich F, Jacob S, et al. (2004): Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 9, 42–54
- Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S, Aust C, Knolle-Veentjer S, Wilms S, Heinz G, Erdag S, Jahn H, Degner D, et al. (2007a): Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry* 12, 206–220
- Ehrenreich H, Fischer B, Norra C, Schellenberger F, Stender N, Stiefel M, Sirén A-L, Paulus W, Nave K-A, Gold R, et al. (2007b): Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis. *Brain* 130, 2577–2588
- El-Kordi A, Radyushkin K, Ehrenreich H (2009): Erythropoietin improves operant conditioning and stability of cognitive performance in mice. *BMC Biol* 7, 37
- Epstein ACR, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, et al. (2001): *C. elegans* EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation. *Cell* 107, 43–54
- Erslev A (1953): Humoral Regulation of Red Cell Production. *Blood* 8, 349–357
- Eschbach JW, Kelly MR, Haley NR, Abels RI, Adamson JW (1989): Treatment of the Anemia of Progressive Renal Failure with Recombinant Human Erythropoietin. *N Engl J Med* 321, 158–163
- Fandrey J, Bunn HF (1993): In Vivo and In Vitro Regulation of Erythropoietin mRNA: Measurement by Competitive Polymerase Chain Reaction. *Blood* 81, 617–623

- Feng J, Witthuhn BA, Matsuda T, Kohlhuber F, Kerr IM, Ihle JN (1997): Activation of Jak2 Catalytic Activity Requires Phosphorylation of Y¹⁰⁰⁷ in the Kinase Activation Loop. *Mol Cell Biol* 17, 2497–2501
- Goebbels S, Bormuth I, Bode U, Hermanson O, Schwab MH, Nave K-A (2006): Genetic Targeting of Principal Neurons in Neocortex and Hippocampus of NEX-Cre Mice. *Genesis* 44, 611–621
- Grimm G, Stockenhuber F, Schneeweiss B, Madl C, Zeitlhofer J, Schneider B (1990): Improvement of brain function in hemodialysis patients treated with erythropoietin. *Kidney Int* 38, 480–486
- Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, Schumacker PT (2005): Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* 1, 401–408
- Hassouna I, Ott C, Wüstefeld L, Offen N, Neher RA, Mitkovski M, Winkler D, Sperling S, Fries L, Goebbels S, et al. (2016): Revisiting adult neurogenesis and the role of erythropoietin for neuronal and oligodendroglial differentiation in the hippocampus. *Mol Psychiatry* 21, 1752–1767
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr (2001): HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing. *Science* 292, 464–468
- Jaakkola P, Mole DR, Tian Y-M, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, et al. (2001): Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science* 292, 468–472
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, et al. (1985): Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313, 806–810
- Jelkmann W (1992): Erythropoietin: Structure, Control of Production, and Function. *Physiol Rev* 72, 449–489
- Jelkmann W (2007): Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* 78, 183–205
- Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD (1999): Immunohistochemical Localization of Erythropoietin and Its Receptor in the Developing Human Brain. *Pediatr Dev Pathol* 2, 148–158
- Kafkafi N, Agassi J, Chesler EJ, Crabbe JC, Crusio WE, Eilam D, Gerlai R, Golani I, Gomez-Marin A, Heller R, et al. (2018): Reproducibility and replicability of rodent phenotyping in preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 87, 218–232

- Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW (2000): Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10430–10435
- Kimáková P, Solár P, Solárová Z, Komel R, Debeljak N (2017): Erythropoietin and Its Angiogenic Activity. *Int J Mol Sci* 18, 1519
- Knowles WD (1992): Normal Anatomy and Neurophysiology of the Hippocampal Formation. *J Clin Neurophysiol* 2, 252–263
- Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ (1988): Localization of Erythropoietin Synthesizing Cells in Murine Kidneys By In Situ Hybridization. *Blood* 71, 524–527
- Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL (1991): Localization of Cells Producing Erythropoietin in Murine Liver by In Situ Hybridization. *Blood* 77, 2497–2503
- Lacombe C, Da Silva J-L, Bruneval P, Fournier J-G, Wendling F, Casadevall N, Camilleri J-P, Bariety J, Varet B, Tambourin P (1988): Peritubular Cells Are the Site of Erythropoietin Synthesis in the Murine Hypoxic Kidney. *J Clin Invest* 81, 620–623
- Lai P-H, Everett R, Wang F-F, Arakawa T, Goldwasser E (1986): Structural Characterization of Human Erythropoietin. *J Biol Chem* 261, 3116–3121
- Leid M, Ishmael JE, Avram D, Shepherd D, Fraulob V, Dollé P (2004): CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis. *Brain Res Gene Expr Patterns* 4, 733–739
- Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, et al. (2004): Derivatives of Erythropoietin That Are Tissue Protective But Not Erythropoietic. *Science* 305, 239–242
- Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H, Heyer A, Unzicker C, Sirén A-L, Ehrenreich H (2000): Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuroreport* 11, 3485–3488
- Liebetanz D, Baier PC, Paulus W, Meuer K, Bähr M, Weishaupt WH (2007): A highly sensitive automated complex running wheel test to detect latent motor deficits in the mouse MTPT model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 205, 207–213
- Lin C-S, Lim S-K, D'Agati V, Costantini F (1996): Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* 10, 154–164
- Lin F-K, Suggs S, Lin C-H, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinisky Z, et al. (1985): Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7580–7584

- Lisman J, Buzsáki G, Eichenbaum H, Nadel L, Ranganath C, Redish AD (2017): Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nat Neurosci* 20, 1434–1447
- Livnah O, Johnson DL, Stura EA, Farrell FX, Barbone FP, You Y, Liu KD, Goldsmith MA, He W, Krause CD, et al. (1998): An antagonist peptide-EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation. *Nat Struct Biol* 5, 993–1004
- Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA (1999): Crystallographic Evidence for Preformed Dimers of Erythropoietin Receptor Before Ligand Activation. *Science* 283, 987–990
- Ma C, Cheng F, Wang X, Zhai C, Yue W, Lian Y, Wang Q (2016): Erythropoietin Pathway: A Potential Target for the Treatment of Depression. *Int J Mol Sci* 17, 677
- Magnanti M, Gandini O, Giuliani L, Gazzaniga P, Marti HH, Gradilone A, Frati L, Aglianò AM, Gassmann M (2001): Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells. *Blood* 98, 2872–2874
- Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC (2008): Erythropoietin and Oxidative Stress. *Curr Neurovasc Res* 5, 125–142
- Mansfield KD, Guzy RD, Pan Y, Young RM, Cash TP, Schumacker PT, Simon MC (2005): Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation. *Cell Metab* 1, 393–399
- Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M (1996): Erythropoietin Gene Expression in Human, Monkey and Murine Brain. *Eur J Neurosci* 8, 666–676
- 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, 19488–19493
- Masuda S, Kobayashi T, Chikuma M, Nagao M, Sasaki R (2000): The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E1038-E1044
- Maxwell PH, Ferguson DJP, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Doe BG, Johnson MH, Ratcliffe PJ (1994): Expression of a Homologously Recombined Erythropoietin-SV40 T Antigen Fusion Gene in Mouse Liver: Evidence for Erythropoietin Production by Ito Cells. *Blood* 84, 1823–1830

- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang G-W, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999): The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271–275
- Mengozi M, Latini R, Salio M, Sfacteria A, Piedimonte G, Gerwien JG, Leist M, Siren AL, Ghezzi P, Chimenti S (2006): Increased erythropoietin production after myocardial infarction in mice. *Heart* 92, 838–839
- Miskowiak K, O'Sullivan U, Harmer CJ (2007): Erythropoietin Enhances Hippocampal Response during Memory Retrieval in Humans. *J Neurosci* 27, 2788–2792
- Miskowiak KW, Favaron E, Hafizi S, Inkster B, Goodwin GM, Cowen PJ, Harmer CJ (2009): Effects of erythropoietin on emotional processing biases in patients with major depression: an exploratory fMRI study. *Psychopharmacology (Berl)* 207, 133–142
- Miskowiak KW, Favaron E, Hafizi S, Inkster B, Goodwin GM, Cowen PJ, Harmer CJ (2010): Erythropoietin modulates neural and cognitive processing of emotional information in biomarker models of antidepressant drug action in depressed patients. *Psychopharmacology (Berl)* 210, 419–428
- Miskowiak KW, Vinberg M, Christensen EM, Bukh JD, Harmer CJ, Ehrenreich H, Kessing LV (2014a): Recombinant Human Erythropoietin for Treating Treatment-Resistant Depression: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase 2 Trial. *Neuropsychopharmacology* 39, 1399–1408
- Miskowiak KW, Ehrenreich H, Christensen EM, Kessing LV, Vinberg M (2014b): Recombinant Human Erythropoietin to Target Cognitive Dysfunction in Bipolar Disorder: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase 2 Trial. *J Clin Psychiatry* 75, 1347–1355
- Miskowiak KW, Vinberg M, Macoveanu J, Ehrenreich H, Køster N, Inkster B, Paulson OB, Kessing LV, Skimminge A, Siebner HR (2015): Effects of Erythropoietin on Hippocampal Volume and Memory in Mood Disorders. *Biol Psychiatry* 78, 270–277
- Miskowiak KW, Petersen NA, Harmer CJ, Ehrenreich E, Kessing LV, Vinberg M, Macoveanu J, Siebner HR (2018): Neural correlates of improved recognition of happy faces after erythropoietin treatment in bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand* 138, 336–347
- Moodley KK, Chan D: The Hippocampus in Neurodegenerative Disease. In: Szabo K, Hennerici MG (Hrsg.): *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*. Karger, Basel 2014, 95–108
- Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R (1996): Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 76, 105–116

- Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU (2001): Erythropoietin and Erythropoietin Receptors in Human CNS Neurons, Astrocytes, Microglia, and Oligodendrocytes Grown in Culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 386–392
- Narhi LO, Arakawa T, Aoki KH, Elmore R, Rohde MF, Boone T, Strickland TW (1991): The Effect of Carbohydrate on the Structure and Stability of Erythropoietin. *J Biol Chem* 266, 23022–23026
- Nekoui A, Blaise G (2017): Erythropoietin and Nonhematopoietic Effects. *Am J Med Sci* 353, 76–81
- Nissenson AR (1989): Recombinant human erythropoietin: impact on brain and cognitive function, exercise tolerance, sexual potency, and quality of life. *Semin Nephrol* 9, 25–31
- Nissenson AR, Nimer SD, Wolcott DL (1991): Recombinant Human Erythropoietin and Renal Anemia: Molecular Biology, Clinical Efficacy, and Nervous System Effects. *Ann Intern Med* 114, 402–416
- Nolan KA, Wenger RH (2018): Source and microenvironmental regulation of erythropoietin in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 27, 277–282
- Opitz B: Memory Function and the Hippocampus. In: Szabo K, Hennerici MG (Hrsg.): *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*. Karger, Basel 2014, 51–59
- Ostrowski D, Heinrich R (2018): Alternative Erythropoietin Receptors in the Nervous System. *J Clin Med* 7, 24
- Ott C, Martens H, Hassouna I, Oliveira B, Erck C, Zafeiriou M-P, Peteri U-K, Hesse D, Gerhart S, Altas B, et al. (2015): Widespread Expression of Erythropoietin Receptor in Brain and Its Induction by Injury. *Mol Med* 21, 803–815
- Recny MA, Scoble HA, Kim Y (1987): Structural Characterization of Natural Human Urinary and Recombinant DNA-derived Erythropoietin - Identification of des-Arginine 166 Erythropoietin. *J Biol Chem* 262, 17156–17163
- Reissmann KR (1950): Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood* 5, 372–380
- Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R (1998): Erythropoietin Prevents Place Navigation Disability and Cortical Infarction in Rats with Permanent Occlusion of the Middle Cerebral Artery. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 26–32
- Sakanaka M, Wen T-C, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R (1998): In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4635–4640

- Salceda S, Caro J (1997): Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions - Its Stabilization by Hypoxia Depends on Redox-induced Changes. *J Biol Chem* 272, 22642–22647
- Sanchez PE, Fares RP, Risso J-J, Bonnet C, Bouvard S, Le-Cavorsin M, Georges B, Moulin C, Belmeguenai A, Bodenec J, et al. (2009): Optimal neuroprotection by erythropoietin requires elevated expression of its receptor in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9848–9853
- Sargin D, El-Kordi A, Agarwal A, Müller M, Wojcik SM, Hassouna I, Sperling S, Nave K-A, Ehrenreich H (2011): Expression of constitutively active erythropoietin receptor in pyramidal neurons of cortex and hippocampus boosts higher cognitive functions in mice. *BMC Biol* 9, 27
- Sasaki H, Bothner B, Dell A, Fukuda M (1987): Carbohydrate Structure of Erythropoietin Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells by a Human Erythropoietin cDNA. *J Biol Chem* 262, 12059–12076
- Sathyasesan M, Watt MJ, Haiar JM, Scholl JL, Davies SR, Paulsen RT, Wiederin J, Ciborowski P, Newton SS (2018): Carbamoylated erythropoietin modulates cognitive outcomes of social defeat and differentially regulates gene expression in the dorsal and ventral hippocampus. *Transl Psychiatry* 8, 113
- Schultz C, Engelhardt M: Anatomy of the Hippocampal Formation. In: Szabo K, Hennerici MG (Hrsg.): *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*. Karger, Basel 2014, 6–17
- Scoville WB, Milner B (1957): Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20, 11–21
- Semenza GL, Wang GL (1992): A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via De Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation. *Mol Cell Biol* 12, 5447–5454
- Shih H-M, Wu C-J, Lin S-L (2018): Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *J Formos Med Assoc* 117, 955–963
- Sirén A-L, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H (2001a): Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 101, 271–276
- Sirén A-L, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, et al. (2001b): Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4044–4049
- Striedter GF (2016): Evolution of the Hippocampus in Reptiles and Birds. *J Comp Neurol* 524, 496–517

- Suresh S, Rajvanshi PK, Noguchi CT (2020): The Many Facets of Erythropoietin Physiologic and Metabolic Response. *Front Physiol* 10, 1534
- Suzuki N (2015): Erythropoietin Gene Expression: Developmental-Stage Specificity, Cell-Type Specificity, and Hypoxia Inducibility. *Tohoku J Exp Med* 235, 233–240
- Suzuki N, Ohneda O, Takahashi S, Higuchi M, Mukai HY, Nakahata T, Imagawa S, Yamamoto M (2002): Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood* 100, 2279–2288
- Takeuchi M, Takasaki S, Shimada M, Kobata A (1990): Role of Sugar Chains in the in Vitro Biological Activity of Human Erythropoietin Produced in Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells. *J Biol Chem* 265, 12127–12130
- Tan CC, Eckardt K-U, Ratcliffe PJ (1991): Organ distribution of erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats. *Kidney Int* 40, 69–76
- Tan CC, Eckardt K-U, Firth JD, Ratcliffe PJ (1992): Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol Renal Physiol* 263, F474–F481
- Temple RM, Langan SJ, Deary IJ, Winney RJ (1992): Recombinant erythropoietin improves cognitive function in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 7, 240–245
- Temple RM, Deary IJ, Winney RJ (1995): Recombinant erythropoietin improves cognitive function in patients maintained on chronic ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 10, 1733–1738
- Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, Liu X, Wu H, Carmichael ST (2006): A Critical Role of Erythropoietin Receptor in Neurogenesis and Post-Stroke Recovery. *J Neurosci* 26, 1269–1274
- Urrutia AA, Afzal A, Nelson J, Davidoff O, Gross KW, Haase VH (2016): Prolyl-4-hydroxylase 2 and 3 coregulate murine erythropoietin in brain pericytes. *Blood* 128, 2550–2560
- Varzaneh FN, Varzaneh FN, Azimi AR, Rezaei N, Sahraian MA (2014): Efficacy of combination therapy with erythropoietin and methylprednisolone in clinical recovery of severe relapse in multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg* 114, 273–278
- Vos T, Lim SS, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi M, Abbasifard M, Abbasi-Kangevari M, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdelalim A, et al. (2020): Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* 396, 1204–1222

- Wakhloo D, Scharkowski F, Curto Y, Butt UJ, Bansal V, Steixner-Kumar AA, Wüstefeld L, Rajput A, Arinrad S, Zillmann MR, et al. (2020): Functional hypoxia drives neuroplasticity and neurogenesis via brain erythropoietin. *Nat Commun* **11**, 1313
- Wang FF, Kung CK-H, Goldwasser E (1985): Some Chemical Properties of Human Erythropoietin. *Endocrinology* **116**, 2286–2292
- Wang GL, Semenza GL (1993a): General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4304–4308
- Wang GL, Semenza GL (1993b): Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1 and Regulation of DNA Binding Activity by Hypoxia. *J Biol Chem* **268**, 21513–21518
- Wang GL, Semenza GL (1995): Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. *J Biol Chem* **270**, 1230–1237
- Wang R, Li J, Duan Y, Tao Z, Zhao H, Luo Y (2017): Effects of Erythropoietin on Gliogenesis during Cerebral Ischemic/Reperfusion Recovery in Adult Mice. *Aging Dis* **8**, 410–419
- Wasley LC, Timony G, Murtha P, Stoudemire J, Dorner AJ, Caro J, Krieger M, Kaufman RJ (1991): The Importance of N- and O-Linked Oligosaccharides for the Biosynthesis and In Vitro and In Vivo Biologic Activities of Erythropoietin. *Blood* **77**, 2624–2632
- Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN (1993): JAK2 Associates with the Erythropoietin Receptor and Is Tyrosine Phosphorylated and Activated following Stimulation with Erythropoietin. *Cell* **74**, 227–236
- Wüstenberg T, Begemann M, Bartels C, Gefeller O, Stawicki S, Hinze-Selch D, Mohr A, Falkai P, Aldenhoff JB, Knauth M, et al. (2011): Recombinant human erythropoietin delays loss of gray matter in chronic schizophrenia. *Mol Psychiatry* **16**, 26–36
- Xiong Y, Mahmood A, Lu D, Qu C, Kazmi H, Goussev A, Zhang Z, Noguchi CT, Schallert T, Chopp M (2008): Histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice null for the erythropoietin receptor in the central nervous system. *Brain Res* **1230**, 247–257
- Yamaji R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, Nakano Y (1996): Brain Capillary Endothelial Cells Express two forms of Erythropoietin Receptor mRNA. *Eur J Biochem* **239**, 494–500
- 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**, 25381–25387
- Yin D, Kawabata H, Tcherniamtchouk O, Huynh T, Black KL, Koeffler HP (2007): Glioblastoma multiforme cells: Expression of erythropoietin receptor and response to erythropoietin. *Int J Oncol* **31**, 1193–1198

- Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS (2001): HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9630–9635
- Zanjani ED, Poster J, Burlington H, Mann LI, Wasserman LR (1977): Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J Lab Clin Med* 89, 640–644
- Zhou Z-W, Li F, Zheng Z-T, Li Y-D, Chen T-H, Gao WW, Chen J-L, Zhang J-N (2017): Erythropoietin regulates immune/inflammatory reaction and improves neurological function outcomes in traumatic brain injury. *Brain Behav* 7, e00827

Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Erstbetreuerin Frau Prof. Dr. Dr. Hannelore Ehrenreich für die Vergabe einer besonders interessanten wissenschaftlichen Fragestellung, für ihre hervorragende Betreuung meines Promotionsvorhabens sowie ihre jederzeitige, kompetente Beratung, ihre fortwährende Unterstützung und wissenschaftliche Förderung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Silvio Rizzoli für seine Bereitschaft mein Promotionsvorhaben als Zweitbetreuer zu begleiten, seine anregenden Vorschläge während der Fortschrittsberichte und seine Bemühungen zur Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Ich möchte mich weiterhin bei allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung „Klinische Neurowissenschaften“ am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin für ihre Unterstützung bei der Durchführung meines Promotionsvorhabens bedanken, insbesondere bei Dr. Franziska Scharkowski, Dr. Sahab Arinrad, Dr. Liane Wüstefeld, Dr. Imam Hassouna, Dr. Debia Wakhloo, Dr. Umer Butt, Anja Ronnenberg, Nadine Barnkothe, Viktoria Bonet, Annett Sporning und Wiebke Timmer.

Ferner danke ich dem Promotionskolleg der Universitätsmedizin Göttingen für die Ausrichtung des Doktorandenkongresses, der mir Gelegenheit bot, meine Erstbetreuerin Frau Prof. Dr. Dr. Hannelore Ehrenreich kennenzulernen und somit den Weg meines Promotionsvorhabens ebnete.