

Christian Bauer

## **Wie sich Hirnzellen gegen Sauerstoffmangel wehren**

Vortrag im Plenum der Leibniz-Sozietät am 16. September 2004

### **Herrn Professor Samuel Mitja Rapoport *in memoriam***

Patienten, die an einem chronischen Nierenversagen leiden und deshalb dialysepflichtig sind, leiden oft an einer schweren Anämie und müssen deshalb mit rekombinantem, humanem Erythropoietin (rHuEpo) behandelt werden. Nun haben die Kliniker, welche diese Patientengruppe behandelt haben, oftmals eine signifikante geistige Aufhellung ihrer Patienten beobachtet, ohne dass man genau wusste, ob diese Verbesserung der geistigen Leistungsfähigkeit auf eine Erhöhung der Erythrozytenzahl (und damit der Sauerstofftransportkapazität im Blut) oder auf eine direkte Wirkung von rHuEpo im Gehirn zurückzuführen sei.

### **Was hat es mit dem Epo auf sich?**

Zunächst zur Ausgangslage: Erythropoietin (Epo) ist ein Glykoproteinhor-mon, das von interstitiellen Zellen in der Niere beim Erwachsenen gebildet wird und im Knochenmark die Bildung von erythroiden Vorläuferzellen „be-feuert“. Die erythroiden Vorläuferzellen bestehen aus zwei zellulären Einheiten, den „Burst Forming Units – Erythroid“ (BFU-E) sowie den „Colony Forming Units-Erythroid (CFU-E). Diese beiden zellulären Einheiten unterscheiden sich bezüglich ihrer „Ansprechbarkeit“ bezüglich Epo: die BFU-Es stellen eine zelluläre Frühform in der erythroiden Differenzierung dar. Sie tragen nur eine geringe Anzahl von Rezeptoren für Epo (Epo-R) auf ihrer zellulären Oberfläche und die Rezeptoren sind auch bezüglich ihrer intrazellulären Signalübermittlung viel unempfindlicher als diejenigen der CFU-Es (Koury and Bondurant, 2002; De Maria et al., 1999). Die CFU-Es wiederum sind mit Epo-Rezeptoren bestens ausgestattet und freuen sich nur darauf, mit Epo zu reagieren. Was geschieht in diesen erythroiden Vorläuferzellen, wenn sie mit ihren Rezeptoren die von der Niere gelieferten Epo-Moleküle einfangen? In diesem Moment wird innerhalb der CFU-Es ein Programm in Gang

gesetzt, das den programmierten Zelltod, die so genannte „Apoptose“ hemmt (Gregory et al, 1999).

Was muss man sich unter dem Begriff „Apoptose“ genauer vorstellen? Der Begriff wurde 1972 von Kerr, Wyllie und Currie geprägt und bedeutet so viel wie „Abfallen“ (vom Präfix „apo“ mit der Bedeutung von: „weg“, „ab“ und „ptosis“, das Fallen). In der Zellbiologie wird dieser Begriff des „Abfallens“ auch mit „programmiertem Zelltod“ beschrieben, der für die Entwicklung und Erhaltung vielzelliger Organismen wichtig ist. Die Apoptose stellt ein genau kontrolliertes Ereignis dar, wo in Zellen, welche planmässig entfernt werden sollen, die DNA im Zellkern in Bruchstücke zerlegt wird und die betroffenen Zellen danach absterben.

Die Apoptose ist ein Energie verbrauchender Prozess, der durch spezifische Gene kontrolliert und durch „Überlebenssignale“ wie Epo aufrecht erhalten wird (Strasser et al., 2000).

Solche apoptotischen Ereignisse finden in unserem Körper ständig statt und erlauben zum Beispiel eine ständige Erneuerung der Darmschleimhaut, der immunkompetenten Zellen oder der erythroiden Zellen im Knochenmark. Welche Zellen fallen also weg, wie welches Laub? Diejenigen, die nicht durch biochemische Signale, wie z.B. Epo, am Leben gehalten werden und sich somit unter der Schutzwirkung von Epo vermehren und differenzieren können (Koury and Bondurant, 2002). Interessanterweise sind diejenigen Vorgänge, die eine zelluläre Apoptose entweder verhindern oder auslösen können, in den meisten Zellen sehr ähnlich und unterscheiden sich z.B. in erythroiden Knochenmarkszellen und Hirnzellen nicht nennenswert voneinander (Digicaylioglu and Lipton, 2001; De Maria, 1999).

Steigt also die Epo-Konzentration im Blut an, so werden weniger erythroide Knochenmarkszellen dem programmierten Zelltod unterliegen und es kommt mit einer Zeitverzögerung von etwa einer Woche zu einer Zunahme der Erythrozytenzahl im Blut. Damit steigt auch die Sauerstoff-Transportkapazität des Blutes an, wodurch die Epo-Bildung wieder gedrosselt wird. Auf diesen interessanten Rückkopplungsmechanismus wird gleich in den nächsten Abschnitten eingegangen.

### **Wo wird Epo gebildet?**

Das im Blut zirkulierende Epo stammt beim Erwachsenen zu 80 – 90% aus der Niere, wo es von einer morphologisch unscheinbaren Zellpopulation, den peritubulären Fibroblasten (interstitielle Zellen) gebildet wird. Diese sitzen rundherum verteilt um die Harnkanälchen (Tubuli) in der Nierenrinde. In die-

sem Nierenabschnitt herrschen auch grosse Gradienten für den Sauerstoff-Partialdruck ( $pO_2$ ), also derjenigen Grösse, welche die Sauerstoffdiffusion entlang von  $pO_2$ -Gradienten bewirkt. Für die Epo-bildenden Fibroblasten heisst dies, dass sie auf nur geringe Änderungen des  $pO_2$  sehr empfindlich mit einer „Epo-Antwort“ reagieren können. Beim chronischen Nierenversagen sind auch diese Zellen in ihrer Zahl und ihrer Funktion massiv beeinträchtigt, mit dem Resultat, dass sie keine ausreichenden Mengen von Epo bilden können: es kommt zu schweren (renalen) Anämien, die erfolgreich mit rekombinantem, humanem Epo (rHuEpo) behandelt werden können.

Jedoch ist die Niere keineswegs der einzige Bildungsort von Epo im Körper. Vor allem im Gehirn (Marti, 2004) und im Herz (Semenza, 2004) wurde das „Epo-System“ nachgewiesen, das aus Epo und dem zugehörigen Rezeptor besteht. Im Gehirn sind es vor allem die Neurone und eine Untergruppe der neuronalen Gliazellen, die Astrozyten, die das „Epo-System“ aufweisen. In diesen Organen wird Epo durch eine Gewebshypoxie nach oben reguliert, aber wie „merkt“ eine Zelle, dass ein Sauerstoffmangel herrscht? Damit kommen wir zum  $O_2$ -Sensor, der viele  $O_2$ -abhängige Reaktionen steuert und eben auch die Epo-Bildung.

### **Wie wird der $pO_2$ im Körper gemessen?**

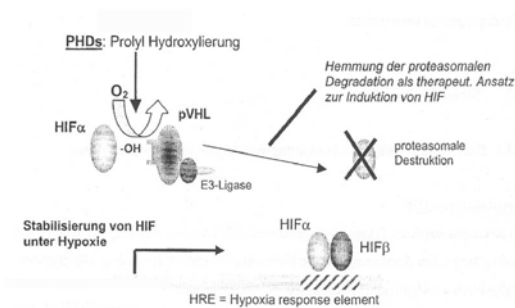
Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren (HIF) spielen eine zentrale Rolle bei der lokalen und systemischen Anpassung an eine verminderte Sauerstoffversorgung. HIF aktiviert Gene, die massgeblich an Anpassungsprozessen wie beispielsweise der Gefässneubildung (VEGF), der Modulation des Gefässstonus (NO-Synthase, Endothelin), dem zellulären Glukose-Einwärtstransport (GLUT 1 und 3), der Glykolyse (glykolytische Enzyme) und der Erythropoese (Epo) beteiligt sind (Schofield and Ratcliffe, 2004; Semenza, 2004).

HIF ist ein Protein, das aus zwei Untereinheiten besteht (Heterodimer). Die  $\beta$ -Untereinheit wird konstitutiv gebildet, während die  $\alpha$ -Untereinheit sauerstoffabhängig reguliert wird. Mehrere Isoformen der HIF $\alpha$ -Untereinheit sind beschrieben worden, von denen HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  von entscheidender funktioneller Bedeutung sind. Die Regulation der  $\alpha$ -Untereinheiten erfolgt durch sauerstoffabhängige proteosomale Degradation (Abb. und Tab. 1). Grundlage dieser Regulation ist die sauerstoffabhängige Hydroxylierung zweier Prolinreste der HIF $\alpha$ -Untereinheiten (Schofield and Ratcliffe, 2004; Semenza, 2004). Nur in dieser hydroxylierten Form können die HIF $\alpha$ -Untereinheiten das von Hippel-Lindau Protein (pVHL) als Bestandteil einer E3-

Ubiquitin Ligase binden, wodurch der Abbau von HIF $\alpha$  eingeleitet wird. Die Hydroxylierungsreaktion wird durch die so genannten Prolylhydroxylasen vermittelt, von denen vier Isoformen identifiziert werden konnten. Neben den Prolylhydroxylasen wurde auch eine Asparaginy-Hydroxylase geortet, die HIF $\alpha$  an einem Asparaginyrest hydroxyliert, welcher seinerseits für die Wechselwirkung mit weiter helfenden Transkriptionsfaktoren (CBP/p300) zuständig ist.

Die Zusammenfassung ist, dass die Hydroxylierung der Prolylreste 402 und 564 bei HIF-1 $\alpha$  (Pro-405 und Pro-531 bei HIF-2 $\alpha$ ) zu einem Abbau von HIF $\alpha$  in Minutenschnelle führt (Jewell et al., 2001), während die Hydroxylierung von Asn-803 bei HIF-1 $\alpha$  und Asn-851 bei HIF-2 $\alpha$  eine verminderte Wechselwirkung mit den die Genexpression „verstärkenden“ Transkriptionsfaktoren (CBP, p300) bewirkt. Diese letztgenannte Form der Wechselwirkung ist eher chronischer Natur, womit das „Asparaginy-System“ eine physiologisch sinnvolle Ergänzung zur schnellen Anpassung über das „Prolyl-System“ bildet (Wiesener et al., 2003).

#### Schema der HIF-Regulation



O <sub>2</sub> -abhängig regulierte Isoformen	Prolin-Hydroxylierungsstellen	Prolylhydroxylasen (PHDs)	Asparagin-Hydroxylierungsstelle	Asparagin-Hydroxylase
HIF-1 $\alpha$	Pro 402; Pro 564	PHD 1, PHD 2, PHD 3	Asn 803	FIH-1
HIF-2 $\alpha$	Pro 405; Pro 531		Asn 851	

Abb. 1: Komponenten der HIF-Regulation, die die Komplexität des Systems bestimmen.

Unabhängiges Substrat für beide Systeme sind molekularer Sauerstoff und Fe<sup>2+</sup>. Da beide Systeme eine O<sub>2</sub>-Abhängigkeit im physiologischen Bereich zeigen, kann man mit Fug und Recht von einer biologischen O<sub>2</sub>-Sonde, bzw.

von einer biologischen  $pO_2$ -Elektrode sprechen. Noch ist nicht ganz klar, welche funktionelle Bedeutung die verschiedenen Isoformen der Prolyl-Hydroxylasen genau besitzen, jedoch wurde klar gezeigt, dass sie durch unterschiedliche  $pO_2$ -Werte aktiviert werden, wobei der Prolyl-Hydroxylase 2 (PHD2) eine führende Rolle für die schnelle Regulation von HIF zukommt (Berra et. al. 2003, William et al., 2002).

Alles zusammen genommen, erfüllt das „HIF-Hydroxylase-System“ die Voraussetzungen, welche man an einen physiologischen  $O_2$ -Sensor zu stellen hat und zwar sowohl bezüglich der direkten Ansprechbarkeit im physiologischen  $pO_2$  Bereich (Hydroxylasen) und der Aktivierung von  $O_2$ -abhängigen Genen durch HIF. Diese Aussage trifft glasklar auch für das Gehirn zu (Sharp and Bernaudin, 2004) und Epo ist eines der Paradebeispiele für ein solches  $O_2$ -abhängiges Gen, dessen Rolle bei der Blutbildung oben beschrieben wurde. Nun wollen wir betrachten, was dieses Hormon besonders im Gehirn zu tun hat.

### **Welche physiologische Rolle hat das „Epo-System“ im Gehirn?**

Obschon Epo ausserhalb der Niere auch nachgewiesen wurde, wie z.B. im Hirn, Herz und im Pankreas (Jelkmann and Wagner, 2004), ist doch sein Vorkommen im ZNS besonders interessant, da das ZNS den Geist gestaltet und dazu noch besonders empfindlich ist gegen heftiges Lebensungemach, wie etwa apoplektische Krisen. Die physiologische Bedeutung von Epo im ZNS ist systematisch noch wenig erforscht, aber folgende Befunde sind doch klar erhoben worden:

Epo und sein Rezeptor (Epo-R) kommen im ZNS vor, und dieses lokale „Epo-System“ (Epo / Epo-R) konnte im ZNS von verschiedenen Säugetieren, inklusive des Menschen klar nachgewiesen werden. (Marti, 2004; Genc et al., 2004). Was hat es dort für eine physiologische Rolle?

Wichtig ist die Beteiligung des „Epo-Systems“ an der Regulation der Glutamat-Konzentration in der interstitiellen Flüssigkeit im ZNS. Glutamat ist der wichtigste „anregende“ Überträger (Transmitter) im ZNS, der auch bei der Bildung von Gedächtnisinhalten eine bedeutende Rolle spielt. Bei der Konstanthaltung der physiologischen Konzentration von Glutamat spielt Epo eine wichtige Rolle, und dient damit auch bei der Verfestigung (Konsolidierung) von Gedächtnisinhalten (Tang et al., 1999; Miu et al., 2004). Eine solche Konsolidierung des Gedächtnisses durch Epo wurde auch in Orientierungsexperimenten bei Ratten im Schwimmtest nachgewiesen (Sadamoto et al., 1998) und wurde bestätigt durch die verbesserte synaptische

Übertragung, die durch Epo im ZNS bewirkt wird (Weber et al., 2002). Beim Menschen haben sich ähnliche Befunde ergeben, die alle zeigen, dass rHuEpo wenn es Patienten mit chronischem Nierenversagen verabreicht wird, zu einer Verbesserung aller gemessenen kognitiven Funktionen führt, *bevor* die Erythrozytenzahl und damit die O<sub>2</sub>-Kapazität des Blutes ansteigt (Ehrenreich and Sirén, 2001).

Aber Epo hat auch noch andere Funktionen: Es „befeuert“ nämlich die zerebrale Durchblutung im Akutversuch (Springborg et al., 2002) und führt in chronischen Experimenten zu einer gesteigerten Angiogenese und Arteriogenese, indem es die Proliferation von Endothelzellen (Buschmann and Schaper, 1999; Marti, 2004) und von glatten Gefäßmuskelzellen (Smith et al., 2003) anregt und so zu einer Durchblutungsverbesserung im Gehirn beiträgt. Diese angiogenetische Wirkung von Epo hat auch direkt zu tun mit dem therapeutischen Einsatz von Epo beim Schlaganfall.

### **Welche pathophysiologische Rolle hat das „Epo-System“ im Gehirn?**

Um es gleich vorwegzunehmen: Eine erstaunlich große Menge von in sich konsistenten Daten hat klar gezeigt, dass das „Epo-System“ im ZNS durch verschiedene Formen des Sauerstoffmangels wie Verminderung der Blutversorgung (ischämische Hypoxie) oder der O<sub>2</sub>-Konzentration im Blut (anämische Hypoxie) aktiviert wird (Marti, 2004). Die Aktivierung des „Epo-Systems“ führt zu einem Schutz der O<sub>2</sub>-empfindlichen Neurone gegenüber der toxischen Wirkung von NO-Radikalen sowie überschüssenden Mengen von Calcium, die als Folge einer ca.1000-fach erhöhten Konzentration von Glutamat im Gehirn als Folge einer zerebralen Minderdurchblutung entstehen. Diese riesige Anhäufung von Glutamat im Zwischenzellraum des Gehirns als Folge einer zerebralen Minderdurchblutung führt zu der so genannten „Glutamat-Toxizität“, die als eine der wichtigsten Ursachen des ischämischen Hirnschadens angesehen wird (Dirnagl et al., 2003). Die Calcium-induzierte Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials führt zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, wodurch die neuronale Apoptose eingeleitet wird (Vannucci and Hagberg, 2004). Epo verhindert diese „Glutamat-Toxizität“ in verschiedenen *in vitro* Modellen von Hirnzell-Kulturen, indem es die Glutamat-Freisetzung hemmt und gleichzeitig die Glutamat-Rezeptoren auf den Neuronen unempfindlicher macht (Bumi et al., 2003).

Die überzeugendsten Hinweise, dass Epo zu einer Neuroprotektion *in vivo* bei Versuchstieren führt, wurden von der Arbeitsgruppe um Sasaki erbracht.

Diese Autoren konnten zeigen, dass endogen gebildetes Epo eine Schutzwirkung auf ischämische CA1 Neurone im Hippokampus ausübt und dass die "Rettung" dieser CA1 Neurone von einer signifikanten Verbesserung der Gedächtnisleistung dieser Tiere begleitet ist (Sakanaka et al., 1998). Es sei hier daran erinnert, dass der Hippokampus diejenige Hirnstruktur darstellt, die eng mit Gedächtnisleistungen verbunden ist und sich auch besonders anfällig gegenüber Durchblutungsstörungen erwiesen hat. Diese *in vivo* Befunde bestätigen die Schutzwirkung von Epo in neuronalen Zellkulturmodellen, die durch eine Stimulierung des anti-apoptotischen Komplexes bcl-xL bewirkt wird (Siren et al., 2001; Wen et al., 2003). Darüber hinaus befördert Epo die Differenzierung von kortikalen, dopaminergen Neuronen (Studer et al., 2000), die Rekrutierung von neuronalen Stammzellen (Shingo et al., 2001; Rossi and Cattaneo, 2002) und damit die Neurogenese. Somit besitzt Epo eine erstaunlich vielfältige Anzahl von Wirkungen, welche die Neurogenese, die neuronale Differenzierung, die zerebrale Angiogenese und den Schutz des Gehirns vor Schäden durch Sauerstoffmangel umfassen.

### **Epo kann auch therapeutisch eingesetzt werden**

In Anbetracht der Tatsache, dass Epo so viele physiologische und pathophysiologische Wirkungen ausübt, war es naheliegend, Patienten mit einem Schlaganfall mit Epo zu behandeln. Zunächst standen diesem mutigen Zugang theoretische Erwägungen gegenüber: wie kann das stark negativ geladene Epo mit einer relativen Molekularmasse von immerhin 30 kDa überhaupt in das Gehirn gelangen, welches doch durch seine Blut-Hirn-Schranke so gut geschützt ist? Brines und seine Mitarbeiter konnten nun zeigen, dass die Blut-Hirn-Schranke doch kein so unüberwindliches Hindernis darstellt, wie angenommen wurde und es zeigte sich, dass Epo, wenn es intravenös oder intraperitoneal verabreicht wird, sehr wohl die Gehirnzellen erreichen kann (Brines et al., 2000). Diese Autoren haben sich damit aber noch nicht zufrieden gegeben und haben weiterhin überprüft, ob Epo auch eine Schutzwirkung bei verschiedenen experimentellen Schäden von Versuchstieren haben kann. Tatsächlich wurde in diesen Experimenten klar gezeigt, dass Epo die Blut-Hirn-Schranke durch Transzytose überwindet und das Gehirn gegenüber so verschiedenen experimentellen Schäden wie Ischämie, Hirntrauma, Enzephalitis und Epilepsie zu schützen vermag. Besonders erwähnenswert ist auch das experimentelle Zeitfenster, innerhalb dessen Epo seine Schutzwirkung ausübt: es beträgt für den experimentellen Schlaganfall im-

merhin sechs Stunden; eine Zahl, die für den Einsatz von Epo in der Klinik von hoher Relevanz ist.

Hannelore Ehrenreich und ihre Mitarbeiter haben nun kürzlich getestet, ob intravenös verabreichtes Epo auch bei Patienten mit Schlaganfall erfolgreich eingesetzt werden kann (Ehrenreich et al., 2002). Zunächst wurde mit 13 Patienten eine Sicherheitsstudie durchgeführt, wobei rHuEpo für drei Tage in einer vergleichsweise hohen Dosierung (33'000 Einheiten pro Tag) nach dem Schlaganfall verabreicht wurde. Danach wurde die eigentliche Studie an 40 Patienten durchgeführt, wobei ein therapeutisches Fenster von weniger als acht Stunden gewählt wurde. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten ein hochsignifikant vermindertes Infarktvolumen, gemessen mit der Methode des „Magnetic Resonance Imaging“ (MRI) bei denjenigen Patienten, die mit rHuEpo behandelt worden waren. Die Verminderung der Infarktgröße ging einher mit einer Verbesserung aller untersuchten neurologischen Parameter. Somit ist die Therapie des Schlaganfalls mit rHuEpo, das ein überragendes Sicherheitsprofil besitzt, in greifbare Nähe gerückt und muss nun noch durch Multizenter-Studien mit einem großen Patientenkollektiv bestätigt werden.

Die Gesamtheit dieser Daten bestätigt überzeugend, wie die Grundlagenforschung direkt in die Klinik überführt werden kann. Damit ist eines der Konzepte erfüllt, welches Inge und Mitja Rapoport stets verfolgten: „Denke klar und verliere nicht den Boden unter den Füßen“.

Ganz persönlich möchte ich den wundersamen Mächten danken, die mir die Freundschaft zu Inge und Mitja Rapoport geschenkt haben.

## Literatur

1. Berra E., Benizri E., Ginouvès A., Volmat V., Roux D., Pouysségur J.: HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *EMBO J*; 22: 4082–4090, 2003
2. Brines ML, Ghezzi P., Keenan S., Agnello D., de Lanerolle NC., Cerami C., Itri LM., Cerami A.: erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 97:10526–10531, 2000
3. Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, Corica F, Frisina N. The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. *J. Neuropathol Exp Neurol.* 62(3):228-36, 2003
4. Buschmann I., Schaper W.: Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci* 14: 121–125, 1999
5. De Maria R, Zeuner A., Eramo A., Domenichelli C., Bonci D., Grignani F., Srinivasula SM, Alnemri ES., Testa U., Peschle C.: Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 401: 489–493, 1999



6. Digicaylioglu M., Lipton StA.: Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- $\kappa$ B signalling cascades. *Nature* 412: 641–647, 2001
7. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM: Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 26(5):248–254, 2003
8. Ehrenreich H., Hasselblatt M., Dembowski C., Cepek I., Lewczuk P., Stiefel M., Rustenbeck HH., Breiter N., Jacob S., Knerlich F et al.: Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Molecular Medicine* 8: 495–505, 2002
9. Ehrenreich, H., Siren, A.-L: Benefits of recombinant erythropoietin on cognitive function. *Erythropoiesis*, 11: 35-39, 2001
10. Genc S., Koroglu TF., Genc K.: Erythropoietin and the nervous system. *Brain Research*: 1000: 19–31, 2004
11. Gregory T., Yu Ch., Ma A., Orkin StH., Blobel GA, Weiss MJ.: GATA-1 and Erythropoietin Cooperate to Promote Erythroid Cell Survival by Regulating bcl-xL Expression. *Blood* 94: 87–96, 1999
12. Jelkmann W., Wagner K.: Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Annals of Hematology*, 83: 673–686, 2004
13. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M.: Induction of HIF-1 $\alpha$  in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 15: 1312–1314, 2001
14. Koury MJ., Sawyer ST., Brandt St J.: New insights into erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology* 9: 93-100, 2002
15. Marti HH.: Erythropoietin and the hypoxic brain. *J. Exp. Biology* 207: 3233–3242, 2004
16. Miu AC., Olteanu AI., Chis I., Heilman RM.: Have no fear, erythropoietin is here: erythropoietin protects fear conditioning performances after functional inactivation of the amygdala. *Behav. Brain Res.* 155: 223–229, 2004
17. Rossi F., Cattaneo E.: Neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nature Rev. Neurosci.* 3: 401–409, 2002
18. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M., Sato K., Otsuka H., Sakaki S., Masuda S., Sasaki R.: Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of middle cerebral artery. *Biochem. Res. Commun.* 253: 26–32, 1998
19. Sakanaka Ch., Joseph B. Weiss JB., Williams LT.: Bridging of  $\beta$ -catenin and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  by Axin and inhibition of  $\beta$ -catenin-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95: 3020–3023, 1998
20. Schofield CHJ., Ratcliffe PJ.: Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 5: 343–354, 2004
21. Semenza GL.: Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology* 19: 176–182. 2004
22. Sharp FR., Bernaudin M.: HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nature Rev. Neurosci.* 5: 437–448, 2004

23. Shingo T., Sorokan ST., Shimazaki T., Weiss S.: Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *Neurosci* 21: 9733–9743, 2001
24. Sirén AL., Fratelli M., Brines M., Goemans Ch., Casagrande S., Lewczuk P., Keenan S., Gleiter Ch., Pasquali C., Capobianco A., Mennini T., Heumann R., Cerami A., Ehrenreich H., Ghezzi P.: Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98: 4044–4049, 2001
25. Smith KJ, Bleyer AJ, Little WC, Sane DC. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res.* 59(3): 538–548, 2003
26. Springborg JB., Ma XD, Rochat P., Knudsen GM., Amtorp O., Paulson OB., Juhler M., Olsen NV.: A single subcutaneous bolus of erythropoietin normalizes cerebral blood flow autoregulation after subarachnoid haemorrhage in rats. *Brit. J. Pharmacol.* 135: 823–829, 2002
27. Strasser A., O'Connor L., Dixit VM.: Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 217–245, 2000
28. Studer L., Csete M., Lee SH., Kabbani N., Walikonis JI, Wold B., McKay R.: Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J. Neurosci.* 20: 7377–7383, 2000
29. Tang YP., Shimizu E., Dube GR., Rampon R., Kerchner GA., Zhou M., Liu G., Tsien JZ.: Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401: 63–69, 1999
30. Vannucci SJ., Hagberg H. Hypoxia–ischemia in the immature brain. *Journal of Experimental Biology* 207, 3149–3154, 2004
31. Weber, A., Maier, R. F., Hoffmann, U., Grips, M., Hoppenz, M., Aktas, A. G., Heinemann, U., Obladen, M., and Schuchmann, S. Erythropoietin improves synaptic transmission during and following ischemia in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res.* 958: 305–311, 2002
32. Wen TC., Sadamoto Y., Tanaka J., Zhu PX., Nakata K., Ma YJ., Hata R., Sakana M.: Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bel-X<sub>L</sub> expression. *J. Neurosci. Res.* 67: 795–803, 2003
33. Wiesener MS., Jürgensen JS., Rosenberger C., Scholze ChK., Hörstrup JH., Warnecke C. Mandriota St., Bechmann I., Frei UA., Pugh ChW., Ratcliffe PJ., Bachmann S., Maxwell PH., Eckardt KU.: Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 $\alpha$  in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* 17: 271–273, 2003
34. Willam C., Masson N., Tian YM., Mahmood SA, Wilson MI., Bicknell R., Eckardt KU., Maxwell PH, Ratcliffe PJ., Pugh CHW.: Peptide blockade of HIF $\alpha$  degradation modulates cellular metabolism and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (16): 10423–10428, 2002