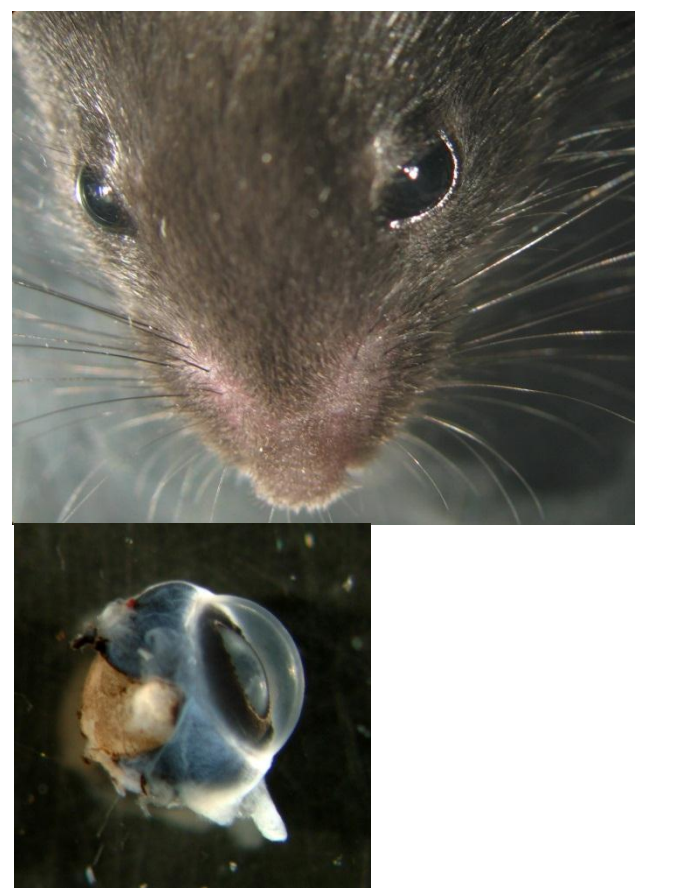


Zur Expression von BMP-Rezeptoren in der gesunden humanen Retina und in Retinoblastomzellen und zum Einfluss von BMP4 auf Apoptose und Proliferation in humaner und muriner Retina



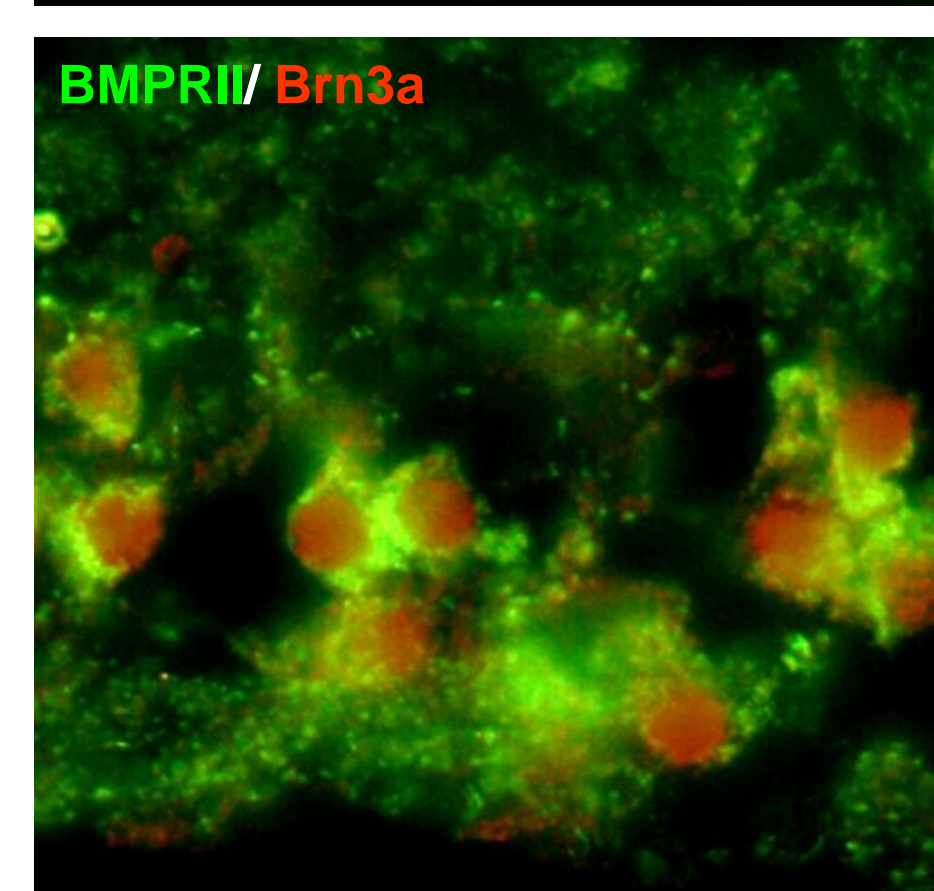
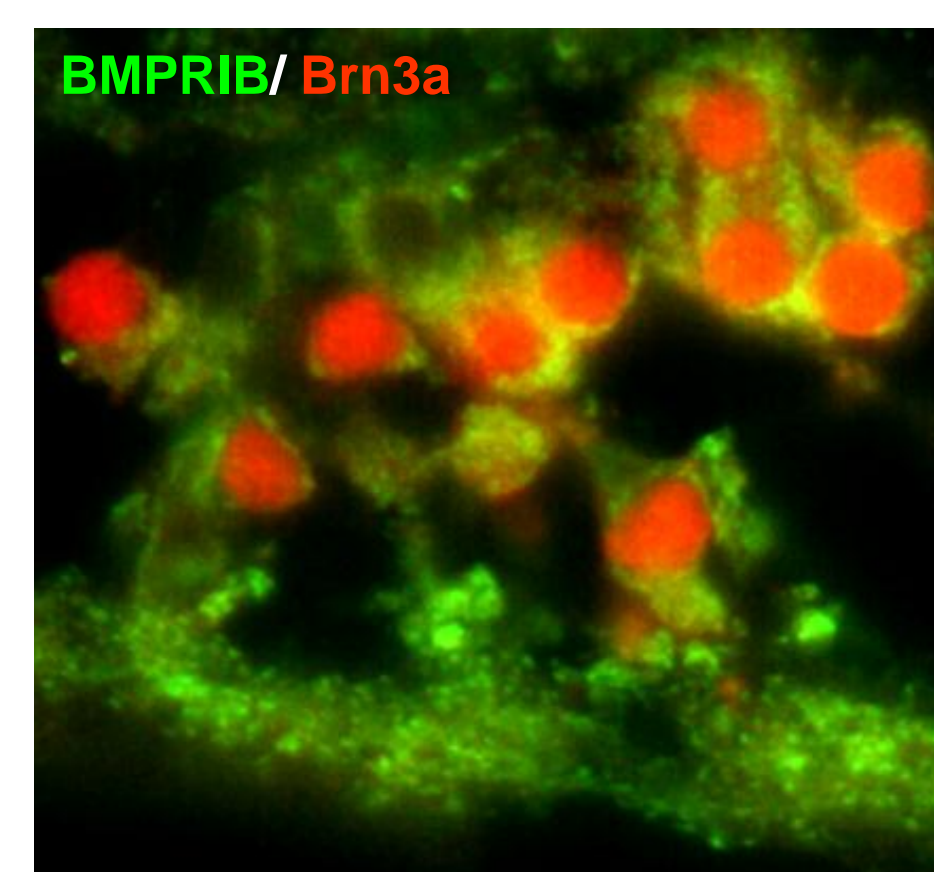
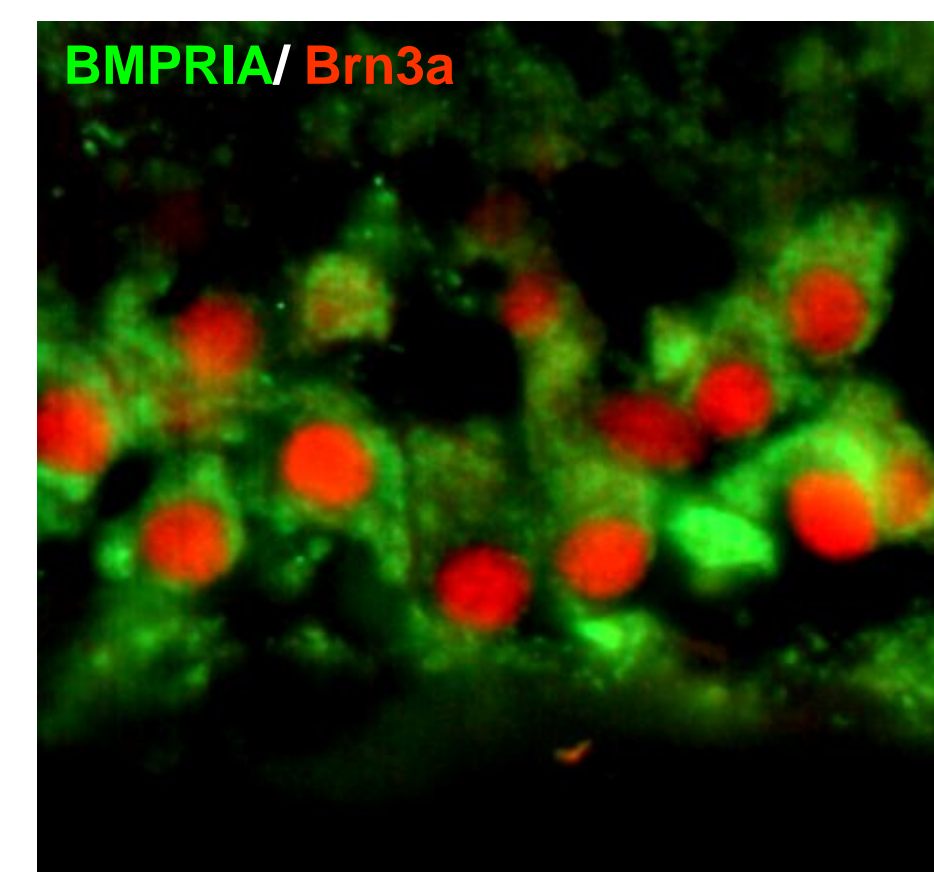
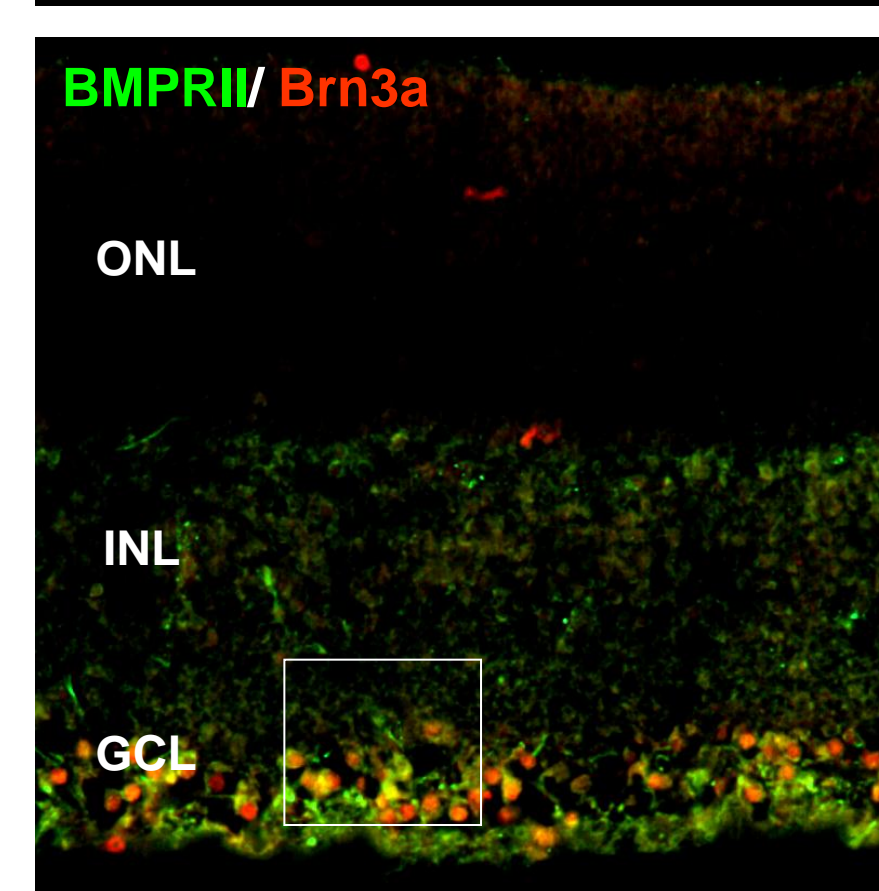
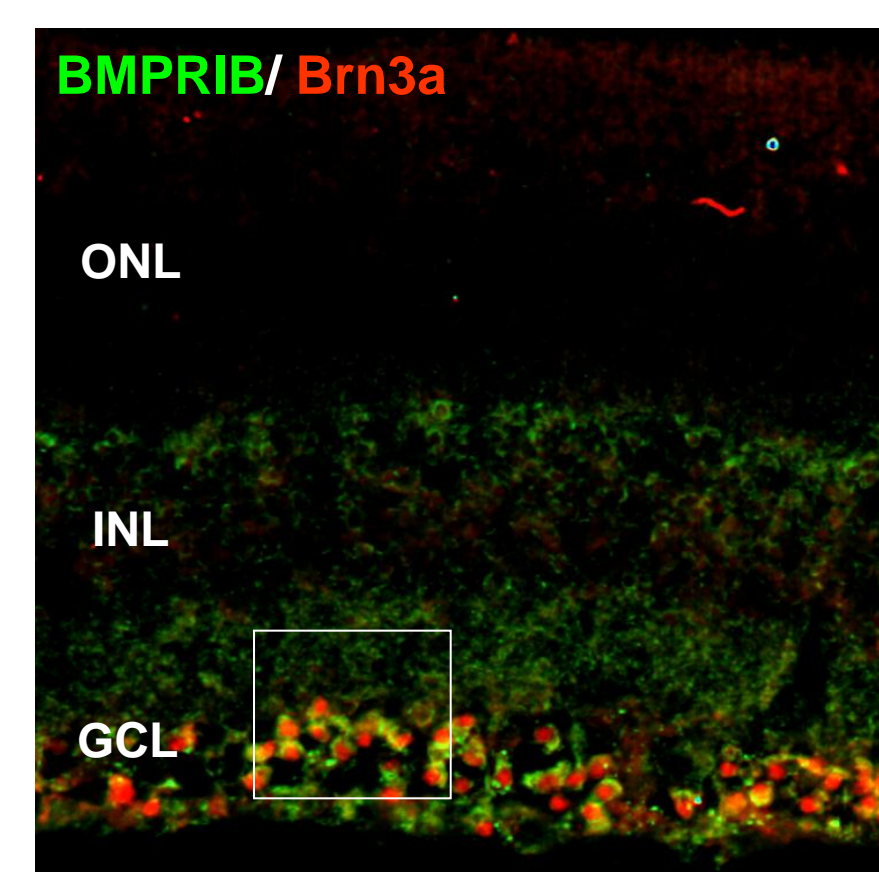
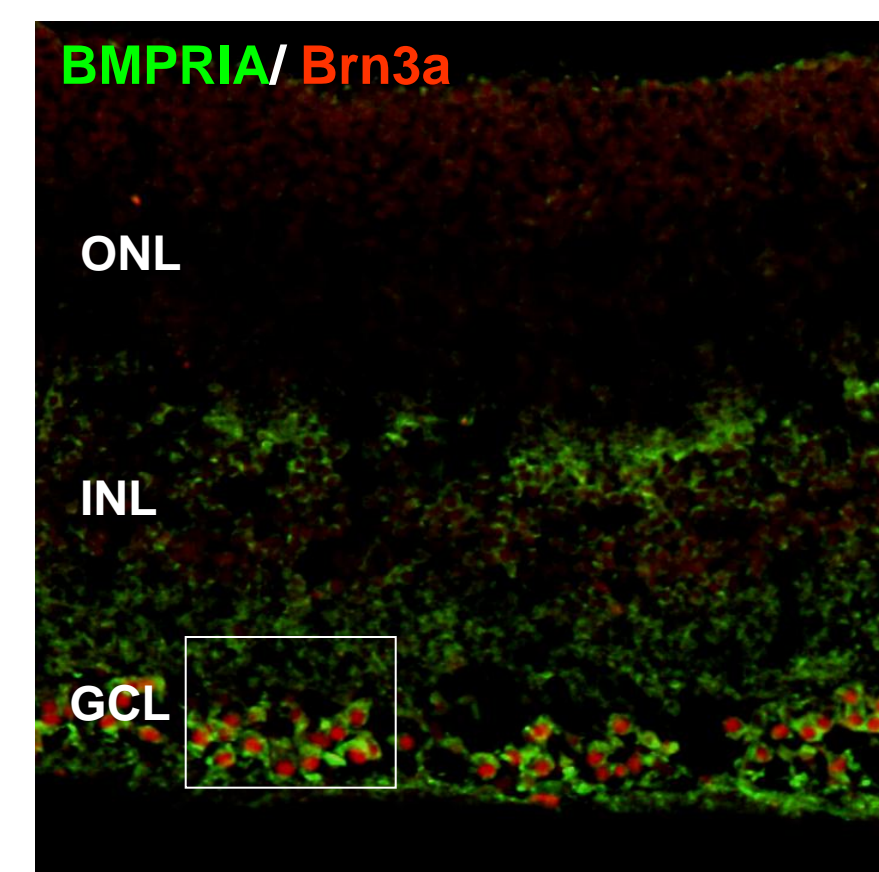
Dr. med. Maike Anna Julie Haubold
Betreuerin: Prof. Dr. rer. nat. Nicole Dünker

Zusammenfassung

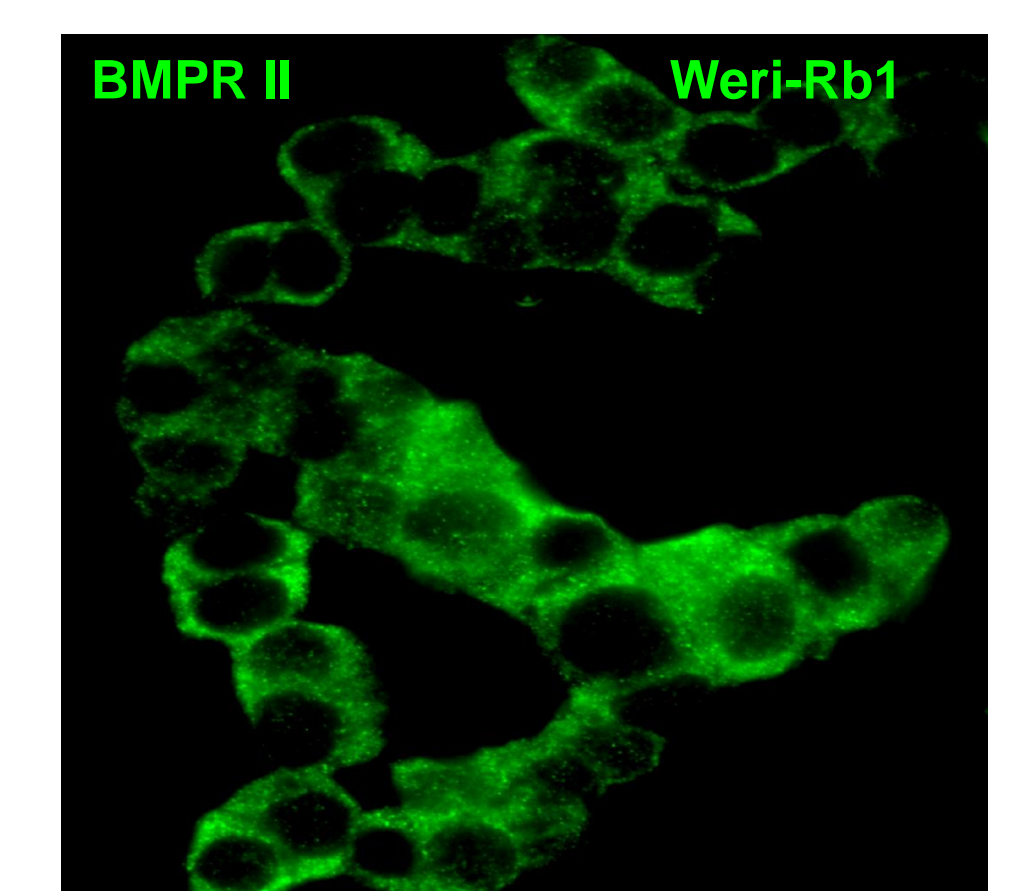
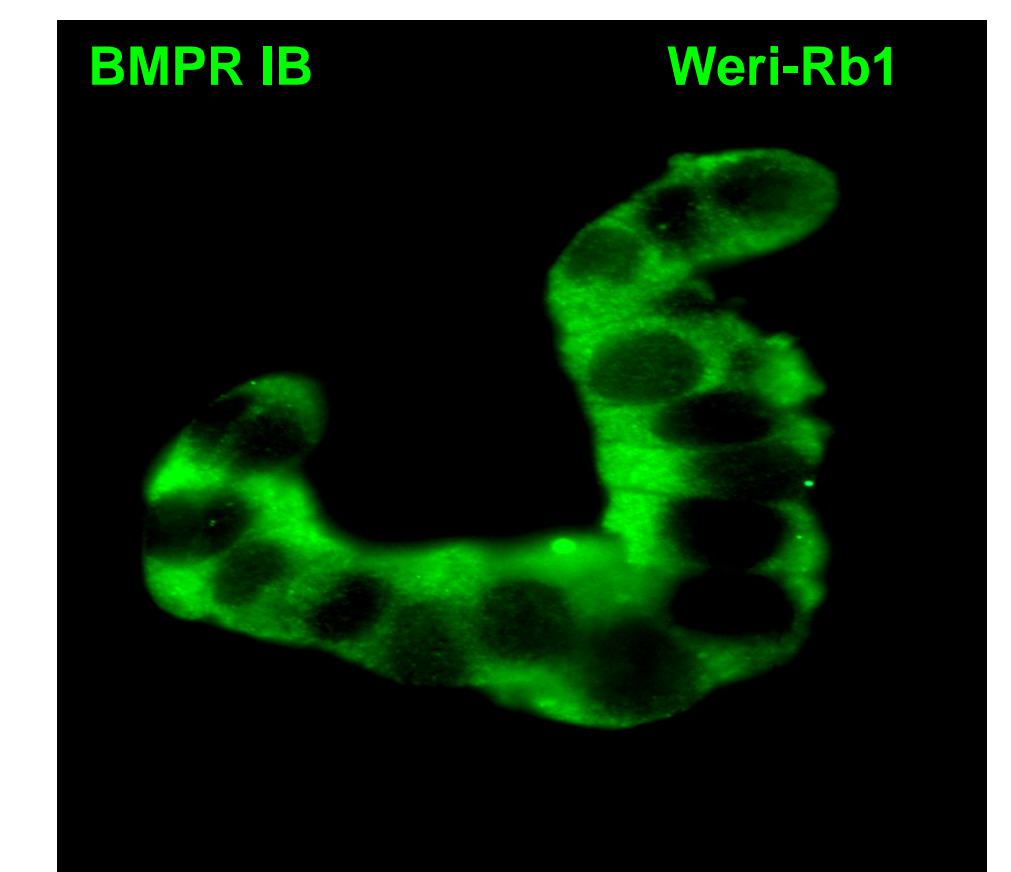
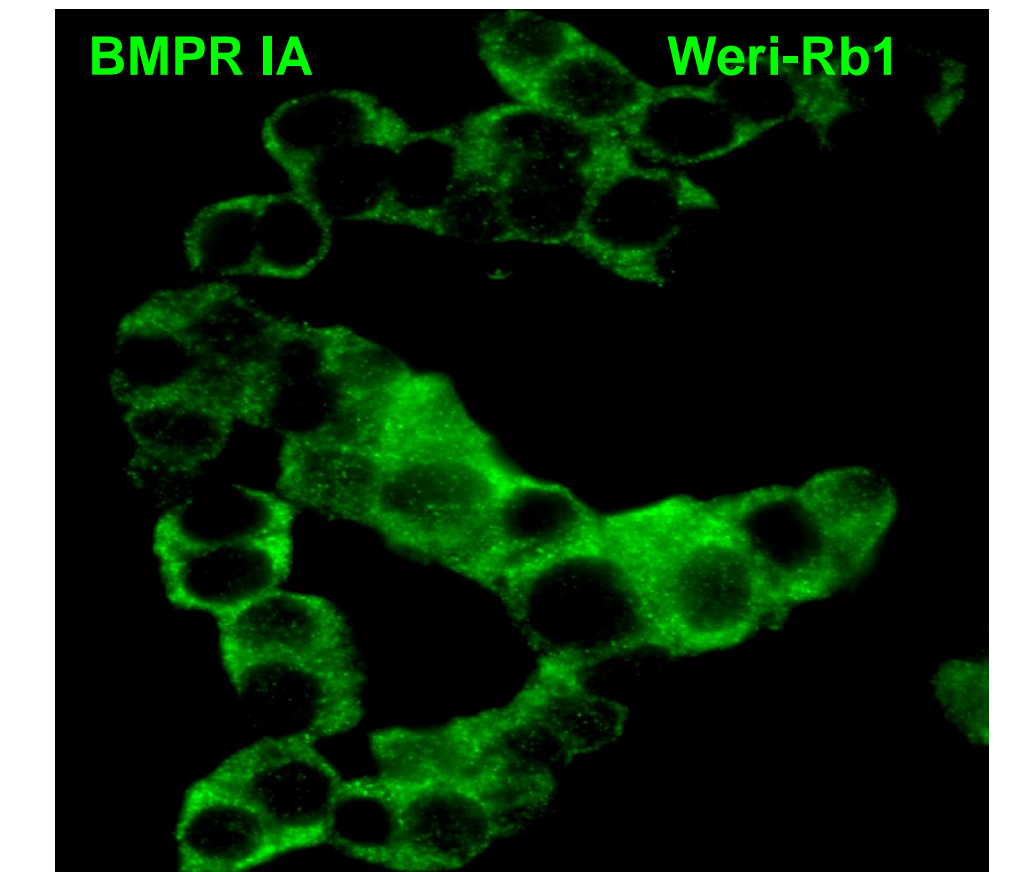
Der Knochenwachstumsfaktor BMP (= bone morphogenetic protein), ein Mitglied der Transforming growth factor beta (TGF β -) Superfamilie, ist beteiligt an Neurulation, Zelltod, und Retinaentwicklung im embryonalen Nervensystem und scheint einen Einfluss auf Wachstum und Proliferation in verschiedenen Tumorspezies zu haben. BMPs binden an zwei verschiedene Typen von Serin-/ Threonin-Kinase-Rezeptoren (BMPR Typ -IA, -IB und -II). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die drei BMP-Rezeptoren IA, IB und II in der gesunden humanen Retina exprimiert werden. Im Gegensatz zu TGF- β werden auch in Retinoblastomzellen (Rb-Zellen) alle notwendigen Rezeptoren für die Transduktion des BMP4-Signals exprimiert. BMP4 selbst wird in fünf von acht untersuchten Rb-Zelllinien gar nicht und in den anderen drei Zelllinien nur vermindert exprimiert. Auf diese Weise scheinen sich die Tumorzellen dem proapoptotischen Effekt von BMP4 zu entziehen. In den Funktionsanalysen zeigte sich, dass BMP4 sowohl in der gesunden murinen Retina, als auch in der Rb-Zelllinie Weri-Rb-1 signifikant die Apoptoserate steigert. BMP4 scheint jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation in diesen Zellen zu haben. Um der Frage nachzugehen, warum BMP4 in retinalen Zellen anscheinend keinen Einfluss auf die Proliferationsrate hat, wurden weitere Untersuchungen bezüglich des Signalweges durchgeführt. Id-Proteine (Id = inhibitor of differentiation) sind Zellzykluspromotoren, scheinen eine Rolle bei der Entstehung verschiedener Krebsarten zu spielen und können durch Mitglieder der BMP-Familie induziert werden. BMPs führen durch Induktion von p21 zu einer Hypophosphorylierung des Retinoblastom-Tumorsuppressor-Proteins und somit zu Zellzyklusarrest und einem Abfall der Proliferationsrate. Der anti-proliferative Effekt von p21 kann jedoch z.B. durch Id 2 gehemmt werden. Induziert BMP4 in einer Zellspezies nun Id-Proteine, wirkt es somit seinem eigentlich anti-proliferativen Effekt entgegen. Die basale mRNA-Expression von Id 1 und Id 2 scheint in Rb-Zellen nicht reguliert zu sein. Es konnte aber gezeigt werden, dass BMP4 signifikant die Expression von Id 1, Id 2 und Id 3 in Weri-Rb-1-Zellen steigert, sodass der Effekt auf die Proliferation insgesamt nivelliert wird. Da eine Induktion von Id 1 und Id 2 durch BMP4 auch in gesunden murinen Retinae detektiert wurde, ist dies nicht ausschließlich als Escape-Mechanismus in Rb-Zellen zu verstehen, sondern scheint ein retinaspezifischer Effekt zu sein. Auf Grund der Expression der BMP-Rezeptoren in Rb-Zellen und des nachweislich pro-apoptotischen Effektes, könnte BMP4 aber dennoch in Zukunft eine Rolle in der Rb-Therapie spielen.

Immunzytochemischer Nachweis der Expression von BMP-Rezeptoren in der gesunden humanen Retina und in Retinoblastomzellen

Gesunde humane Retina:



Retinoblastomzellen:



Material und Methoden

Retinale Primärkultur (murin):
Organotypische Kultivierung der kompletten Mausretina als „Wholemount“ am 2. postnatalen Tag. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden in 2 ng/ml BMP4 und DME-Medium in einer 24-Well-Zellkulturplatte im CO $_2$ -Brutschrank. Anschließend wurde die Retina mechanisch und enzymatisch dissoziiert, fixiert, zentrifugiert und mit DAPI eingefärbt. Die Apoptoserate wurde anhand von Cytospins ausgezählt.

In vitro-Kultivierung von humanen Retinoblastomzelllinien:
Kultivierung der Retinoblastomzellen in DME-Medium bei 37°C und 10% CO $_2$ in Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden mit BMP4 in verschiedenen Konzentrationen für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden Apoptose- und Proliferationsfraktion quantitativ per FACS-Analyse bestimmt.

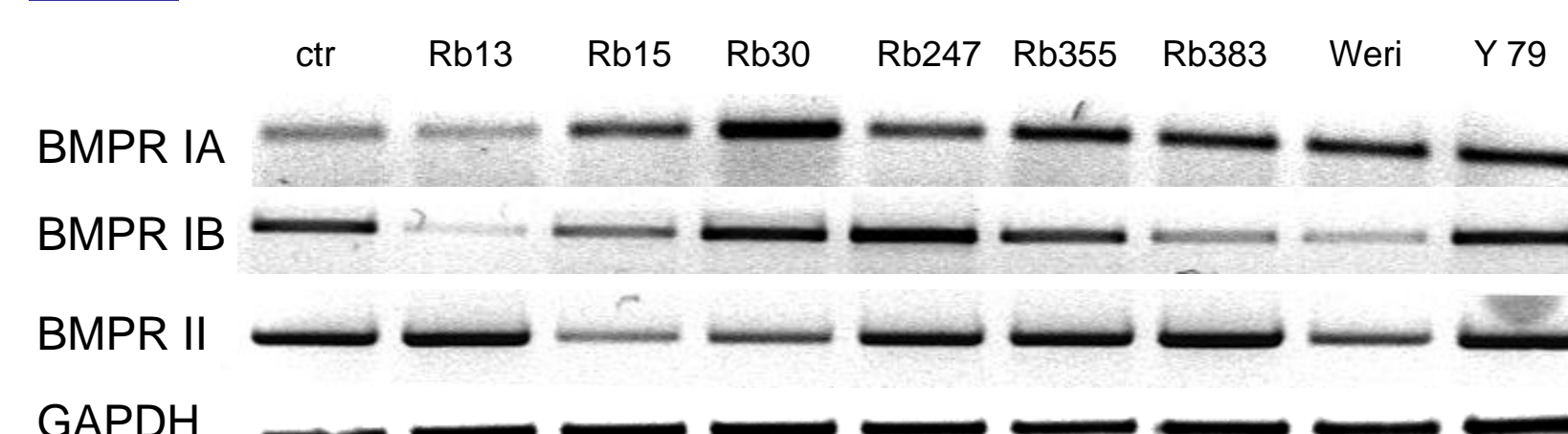
Western-Blot:
Detektion von BMP-Rezeptor-Proteinen in Retinoblastomzellen und gesunden humanen Retinazellen.

PCR (Polymerase chain reaction):
Detektion von cDNA verschiedener Proteine (siehe Abb.) in muriner Retina, Retinoblastomzellen und gesunden humanen Retinazellen.

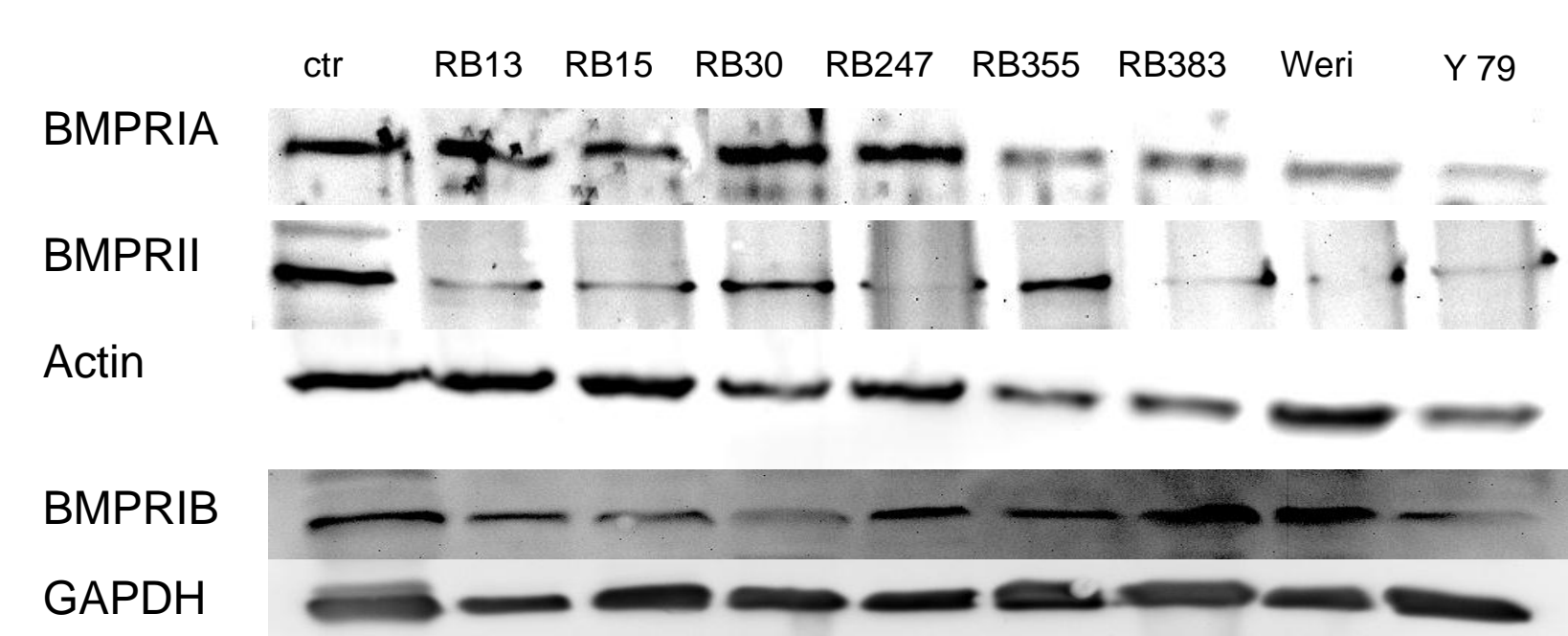
Immunzytochemie:
Immunzytochemische Färbung der BMP-Rezeptoren auf Zellen der gesunden humanen Retina und auf Weri-Rb1-Retinoblastomzellen an coverslips.

Molekularbiologischer Nachweis der BMP-Rezeptor-Expression in 8 Retinoblastomzelllinien

PCR:



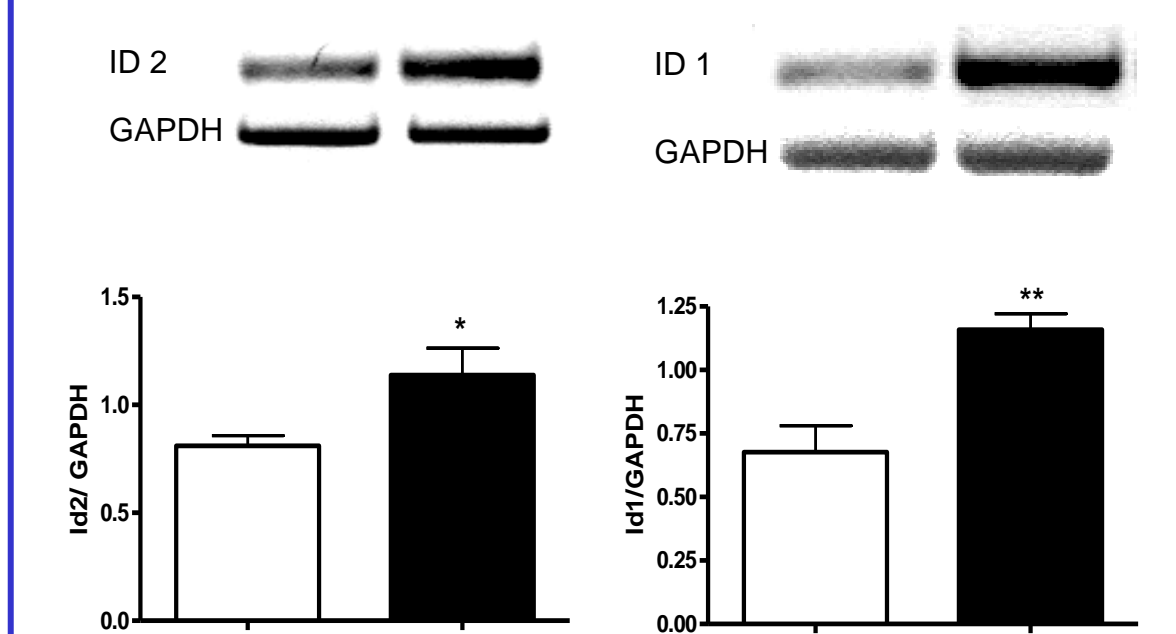
Western-Blot:



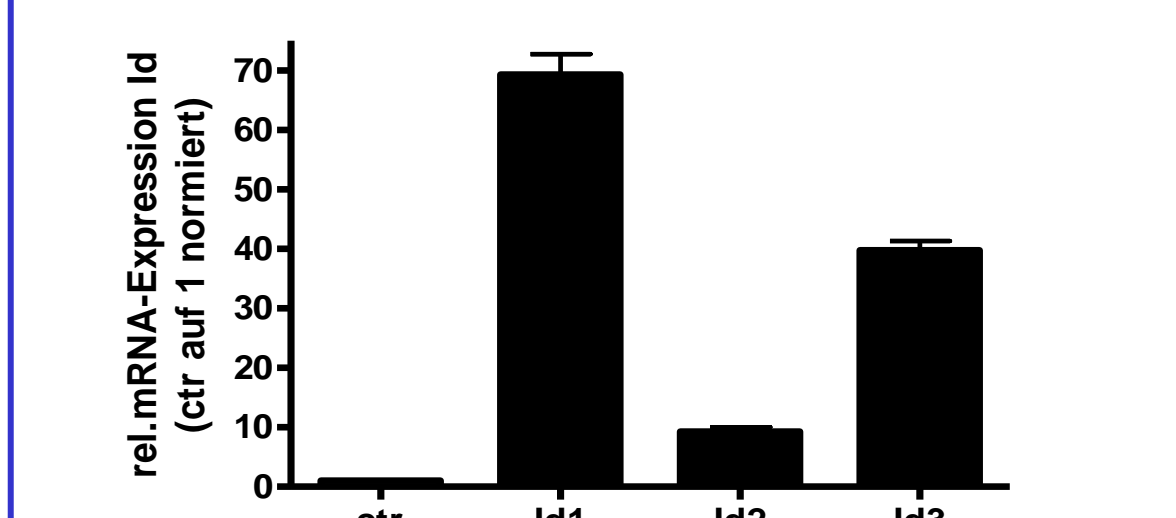
Ergebnis: Alle 3 BMP-Rezeptoren werden sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene in allen 8 untersuchten Retinoblastomzelllinien exprimiert

Id-Induktion durch BMP4 in der murinen Retina und in Retinoblastomzellen

Murine Retina:

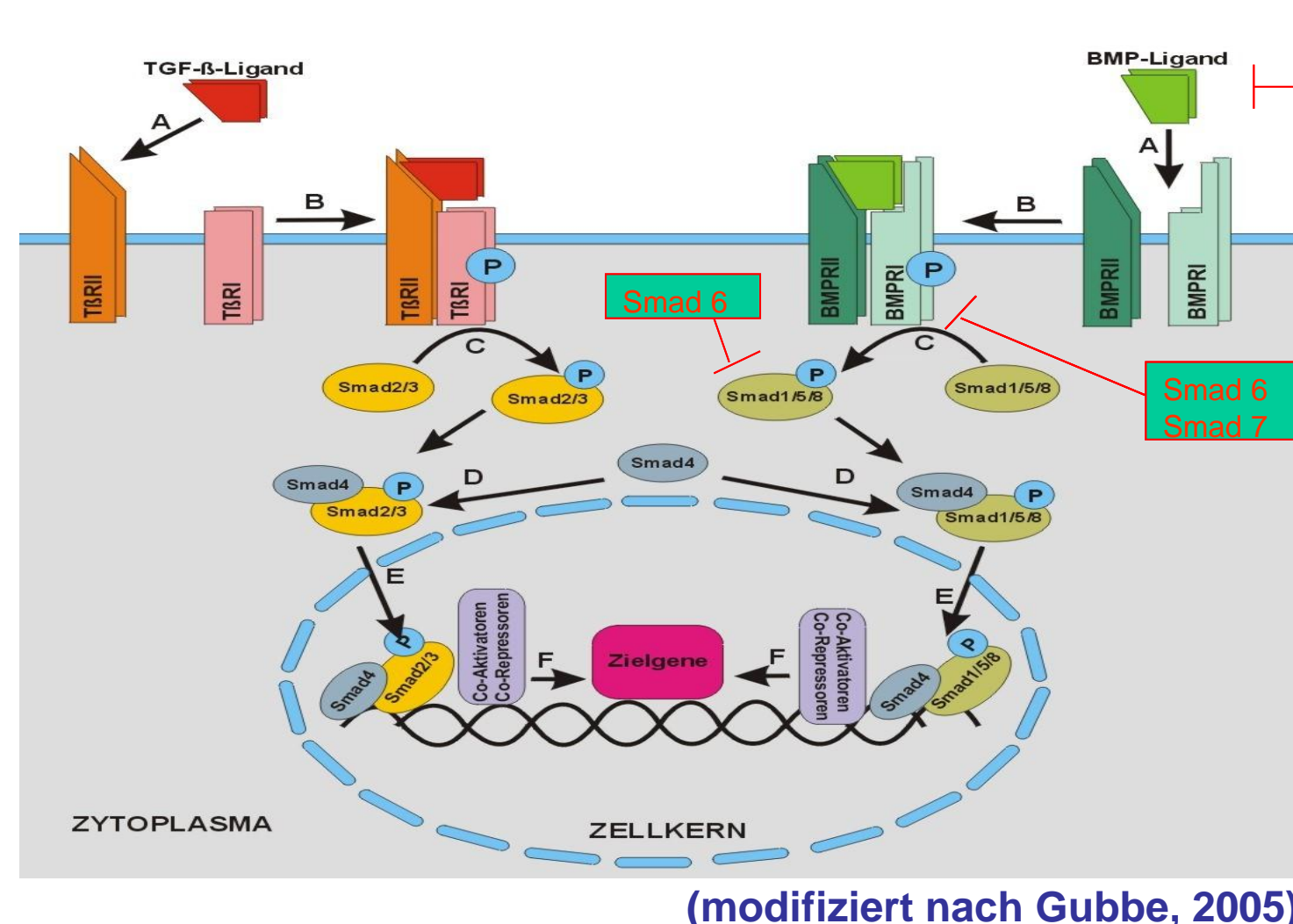


Weri-Rb1 – Retinoblastomzellen:



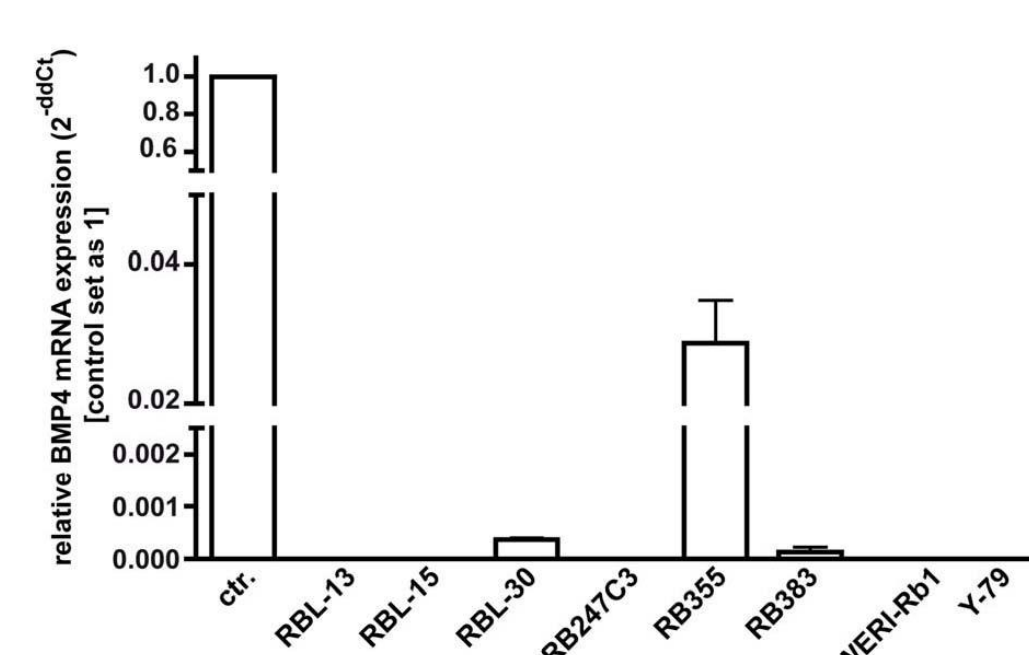
Ergebnis: Expressionssteigerung von Id-mRNA in der murinen Retina und in Weri-Rb1 durch BMP4

Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege von TGF- β und BMP



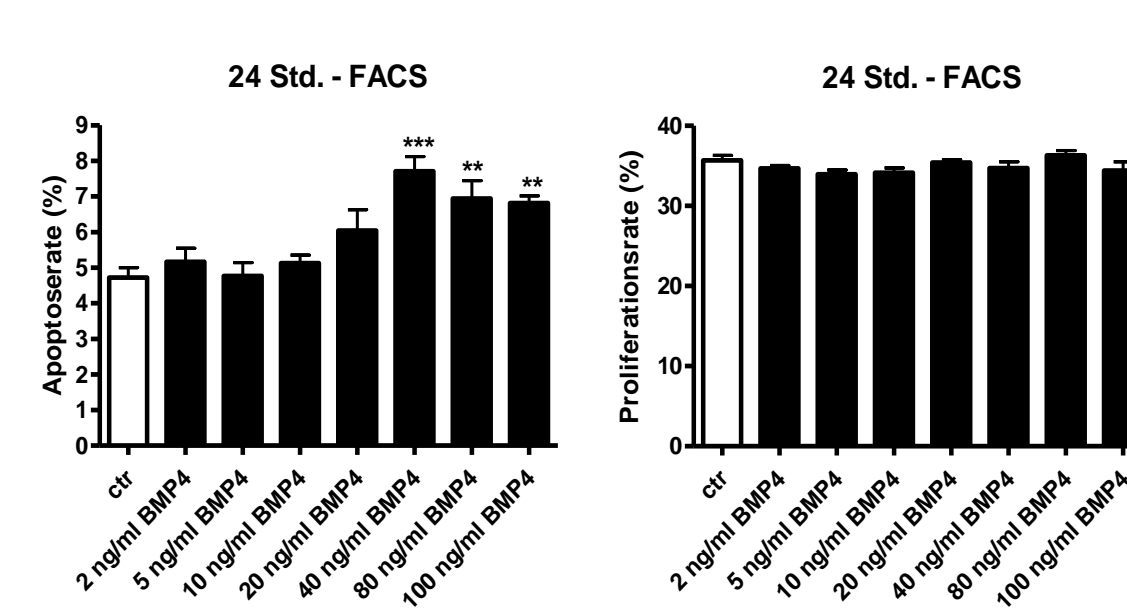
(modifiziert nach Gubbe, 2005)

BMP4-Expression in Retinoblastomzellen



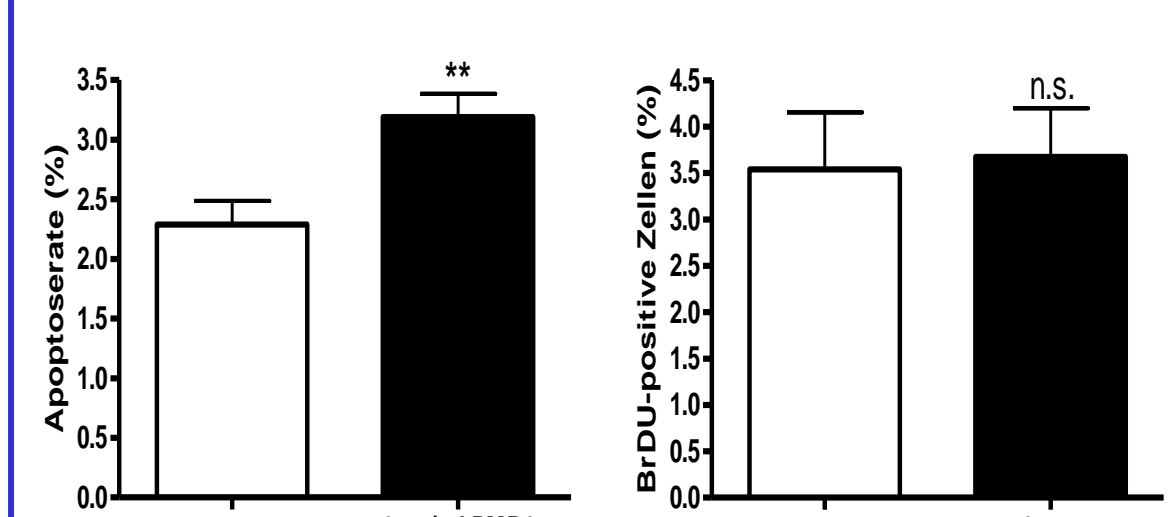
Ergebnis: BMP4-mRNA wird nur in 3 von 8 untersuchten Retinoblastomzellen exprimiert, die Expressionslevel sind dort signifikant vermindert

Einfluss von BMP4 auf Retinoblastomzellen



Ergebnis: BMP4 führt zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate, hat jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation in Weri-Rb1-Retinoblastomzellen

Einfluss von BMP4 auf Zellen der murinen Retina



Ergebnis: Auch in der juvenilen murinen Retina wirkt BMP4 pro-apoptotisch, ein Einfluss auf die Proliferationsrate lässt sich jedoch nicht nachweisen