

Expression und Wirkung von Erythropoietin während der Retinaentwicklung der Maus

¹Nina Scheerer, ²Nicole Dünker, ³Shigehiko Imagawa, ⁴Masayuki Yamamoto, ⁴Norio Suzuki und ¹Joachim Fandrey

¹Institut für Physiologie und ²Institut für Anatomie, Universität Duisburg-Essen; ³Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Japan; ⁴Department of Medical Biochemistry, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

Einleitung

Das hämatopoietische Hormon Erythropoietin (Epo) wird nicht nur in Niere und Leber, sondern auch in weiteren Organen einschließlich des Nervensystems exprimiert und vermittelt dort neuroprotektive Wirkung. Die Expression und Funktion von Epo im Nervensystem wurde bisher insbesondere anhand von Modellen pathologischer Zelltodprozesse beschrieben. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Epo in neuronalen Zellen erstmals an einem Modell physiologischer, postnataler Apoptose untersucht, wie sie während der Entwicklung der murinen Retina, einem leicht erreichbaren Teil des Zwischenhirns, auftritt. Es sollten der Expressionsort und die Wirkung von Epo in der Retina charakterisiert werden.

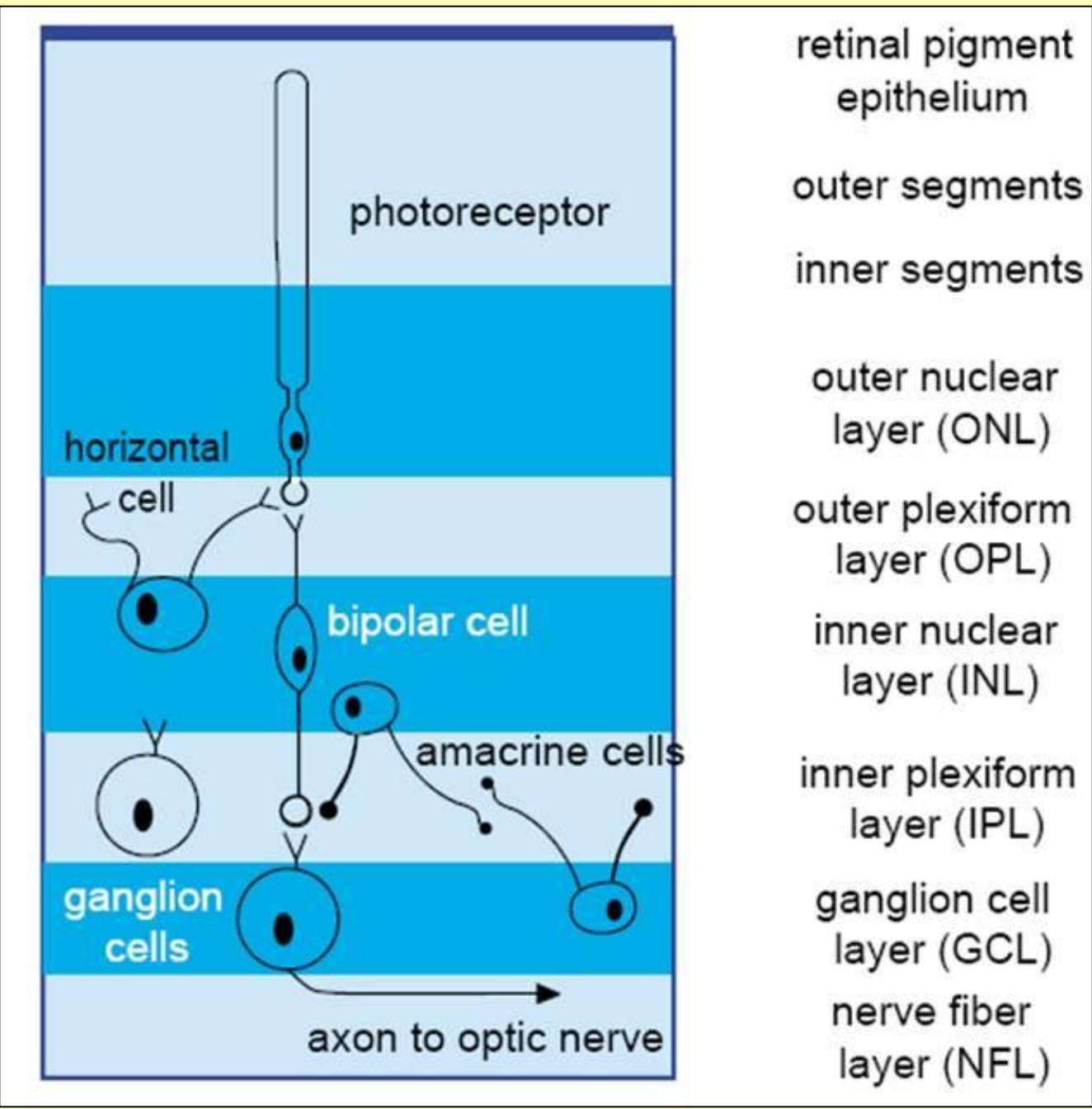


Abb. 1. Anatomie der Retina

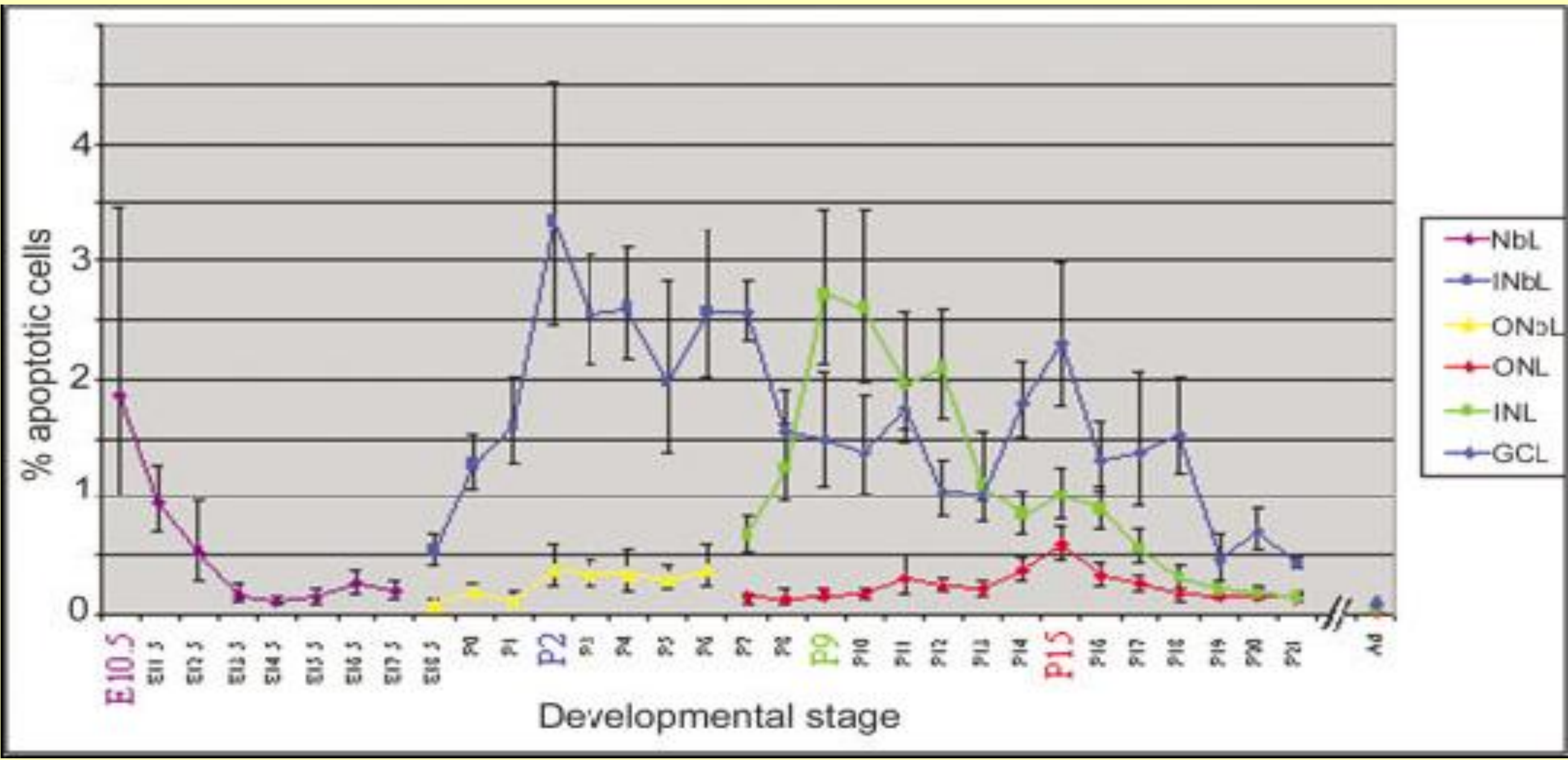
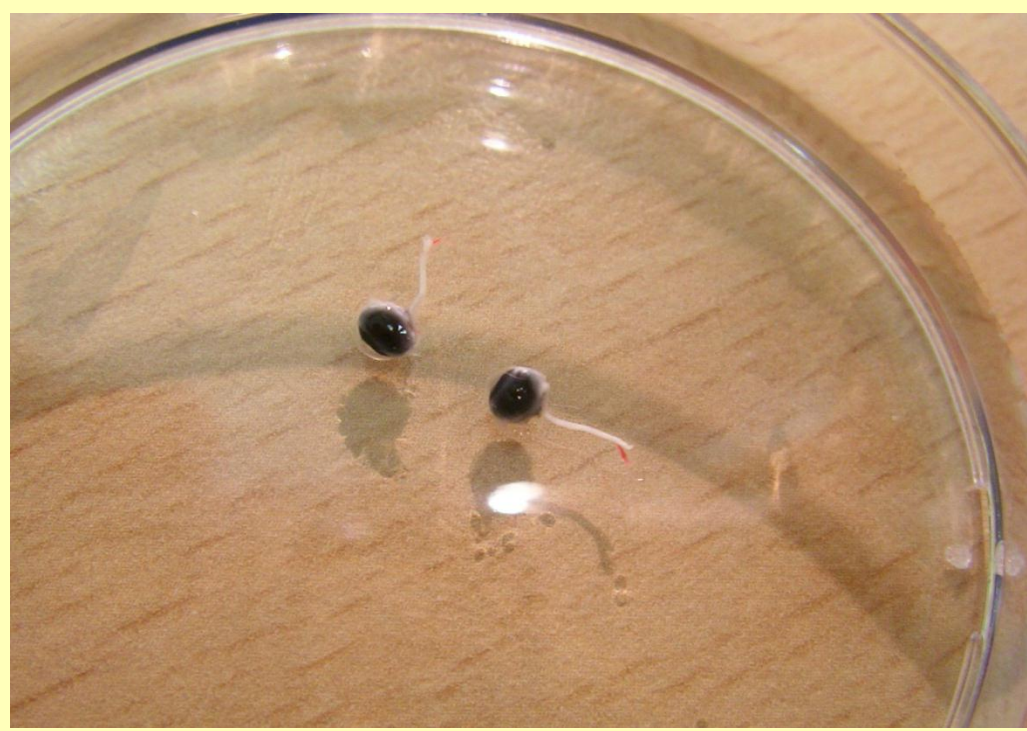


Abb. 2. Apoptose während der Entwicklung der Retina. Péquinet et al.; 2003

Material und Methoden



Retinale Whole-mount Kultur

Retinale Whole-mounts wurden für 24 h in DME-Medium unter Zugabe von Epo kultiviert. Anschließend wurden die Retinae mechanisch und enzymatisch dissoziiert und fixiert. Die Einzelzellsuspension wurde auf Objektträger aufgebracht und mit 4',6'-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) gefärbt, um apoptotische Zellen zu quantifizieren.

RNS-Präparation und RT-PCR

Gesamt-RNS wurde mittels der Guanidinium Thiocyanat / Phenol / Chloroform-Methode extrahiert. 1 µg der Gesamt-RNS wurde zu cDNS umgeschrieben. Real-time PCR erfolgte mit SYBR® green.

Hämatokritbestimmung

Zur Hämatokritbestimmung wurde Vollblut in Hämatokritkapillaren für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Immunhistochemie

Es wurden Augen von Wildtyp- und GFP-transgenen Mauslinien präpariert, die GFP (Grün-fluoreszierendes Protein) unter der Kontrolle Epo-Gen-regulierender DNS-Regionen exprimieren (Suzuki et al.; 2007). Die Augen wurden über Nacht in 4 % Paraformaldehyd / PBS fixiert, mit PBS gewaschen und in 20 % Succrose über Nacht inkubiert und dann in Einbettmedium aufgefroren. Die Gefrierschnitte dieser Augen wurden für 1 h in 3 % Wasserstoffperoxid / PBS inkubiert, mit PBS gewaschen und dann mit Blockierungslösung behandelt. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-anti-GFP-Antikörper und als Sekundärantikörper ein HRP-konjugierter anti-Kaninchen IgG-Antikörper verwendet. Die spezifische Färbung wurde mit 3', 3' Diaminobenzidin visualisiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt..

Abb. 3. Präparation von Whole-mount Retinae.

Ergebnisse

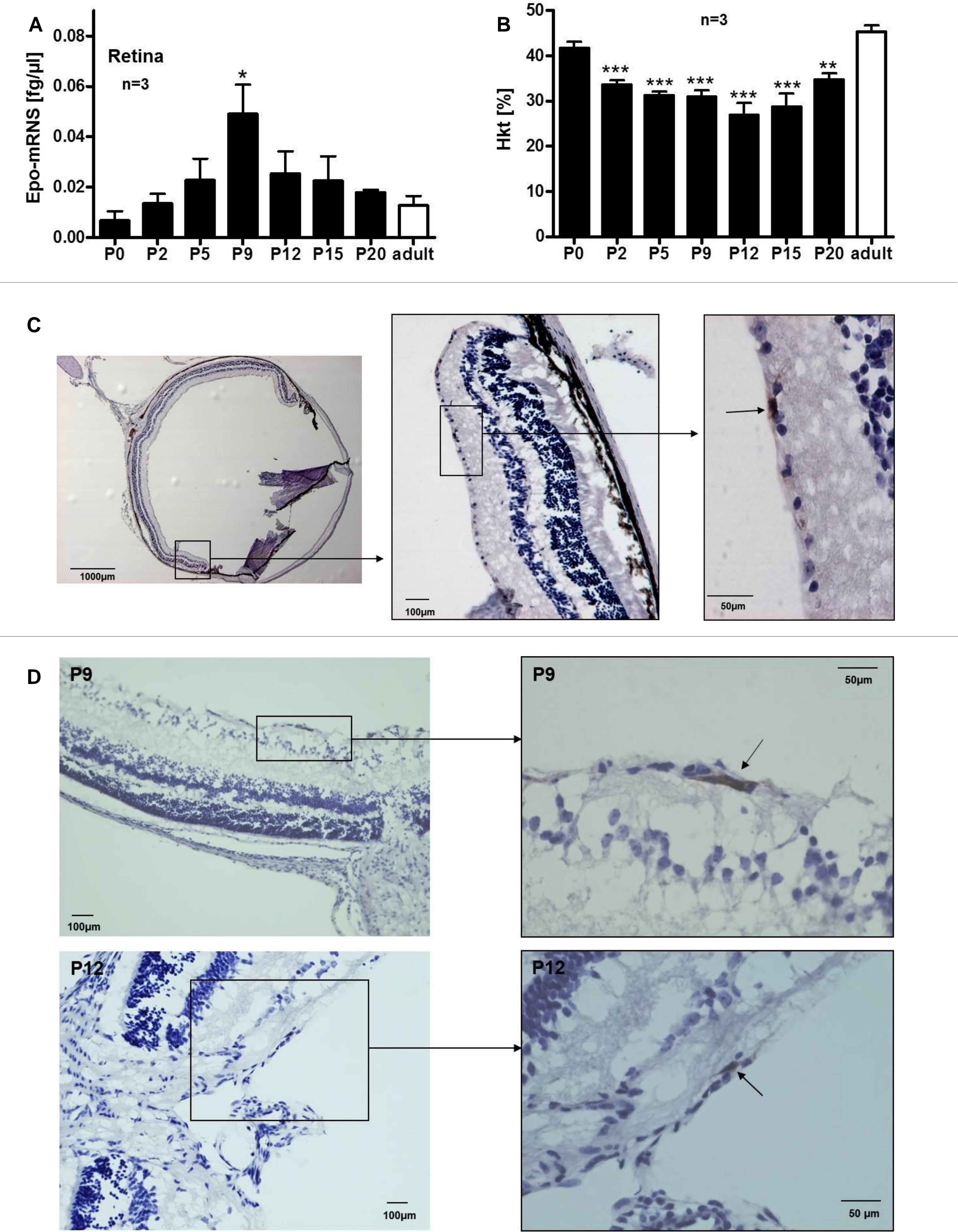


Abb. 4: (A) Retinale Epo-mRNA Expression und (B) Hämatokritwerte von Wildtypmäusen während der postnatalen Entwicklung im Vergleich zu adulten Mäusen. GFP-exprimierende Zellen in der Retina von (C) adulten und (D) früh postnatalen transgenen Mäusen, die GFP unter der Kontrolle Epo-Gen-regulierender DNS-Regionen exprimieren.

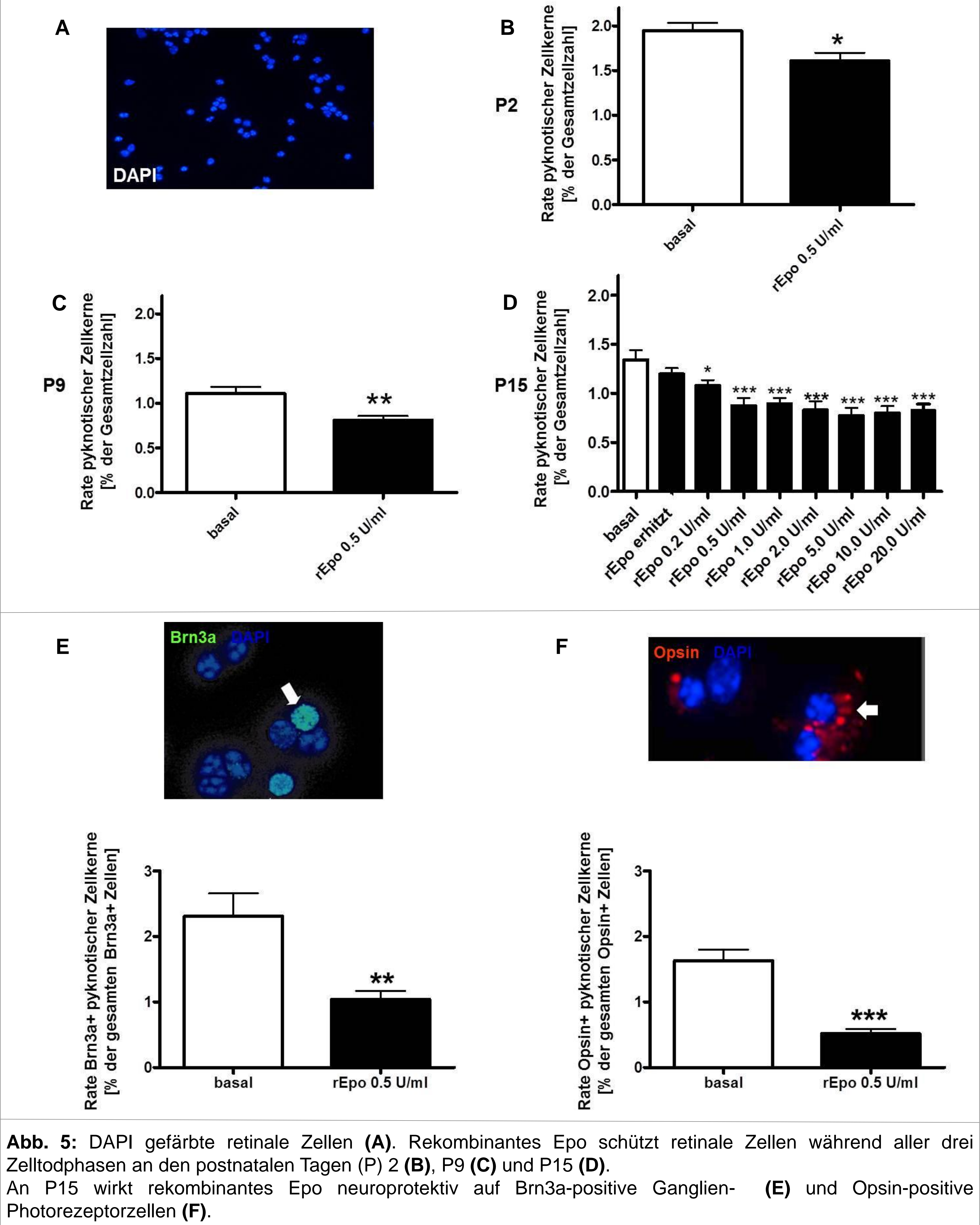


Abb. 5: DAPI gefärbte retinale Zellen (A). Rekombinantes Epo schützt retinale Zellen während aller drei Zelltodphasen an den postnatalen Tagen (P) 2 (B), P9 (C) und P15 (D). An P15 wirkt rekombinantes Epo neuroprotektiv auf Brn3a-positive Ganglienzellen (E) und Opsin-positive Photorezeptorzellen (F).

Schlussfolgerung

Epo-exprimierende Zellen konnten in der retinalen Ganglienzellschicht identifiziert werden. Dabei verlagert sich während der Entwicklung der Expressionsort in Abhängigkeit von der retinalen Sauerstoffversorgung vom Zentrum in die Peripherie. Epo wirkt während der postnatalen Entwicklung stark anti-apoptotisch auf Ganglienzellen und Photorezeptorzellen. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass Epo auch im Rahmen physiologischer Zelltodprozesse neuroprotektive Wirkung vermitteln kann.