

# Expression und Wirkung von Erythropoietin während der Retinaentwicklung der Maus

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

<sup>1</sup>Institut für Physiologie und <sup>2</sup>Institut für Anatomie, Universität Duisburg-Essen; <sup>3</sup>Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Japan; <sup>4</sup>Department 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.

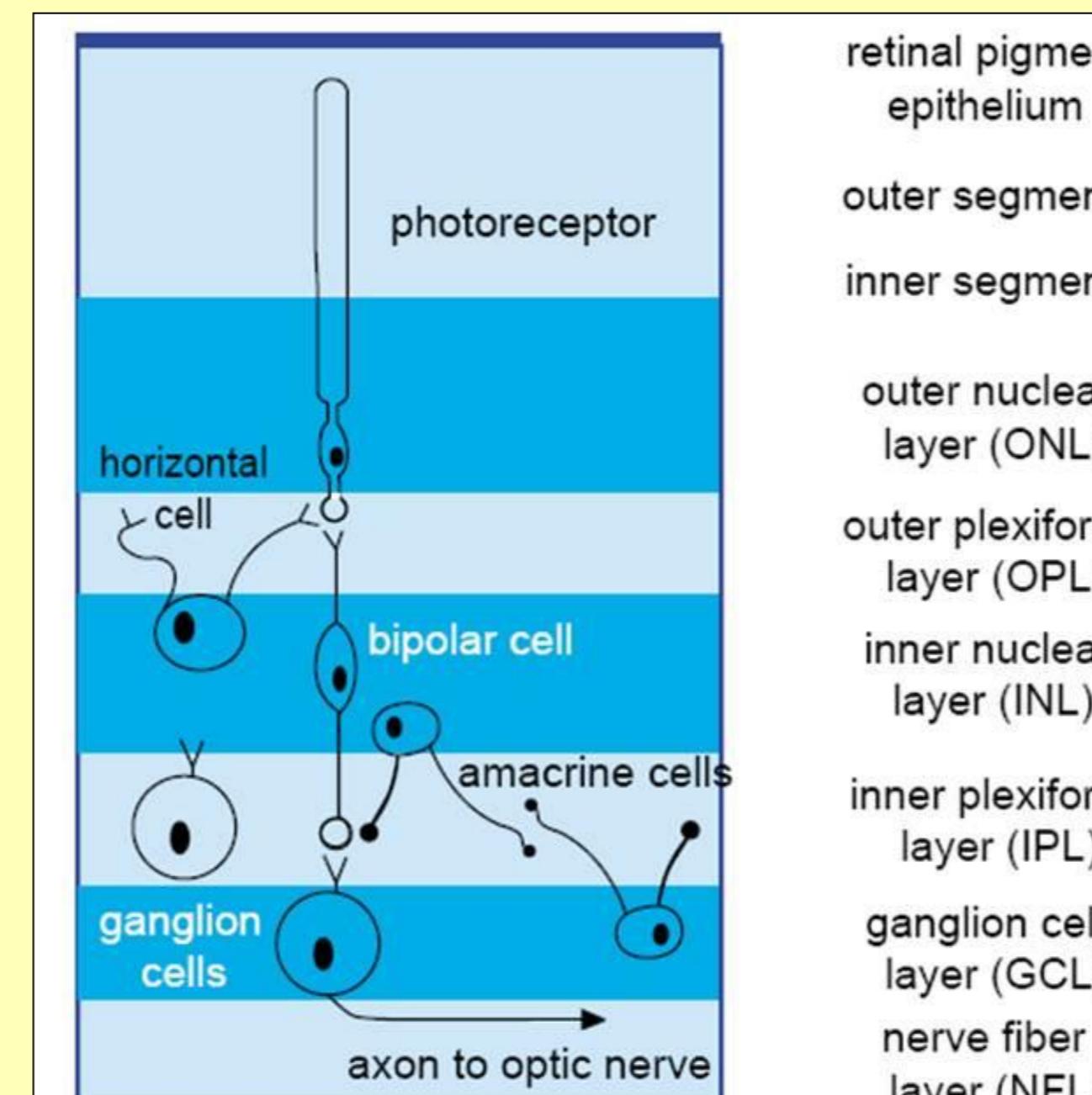


Abb. 1. Anatomie der Retina

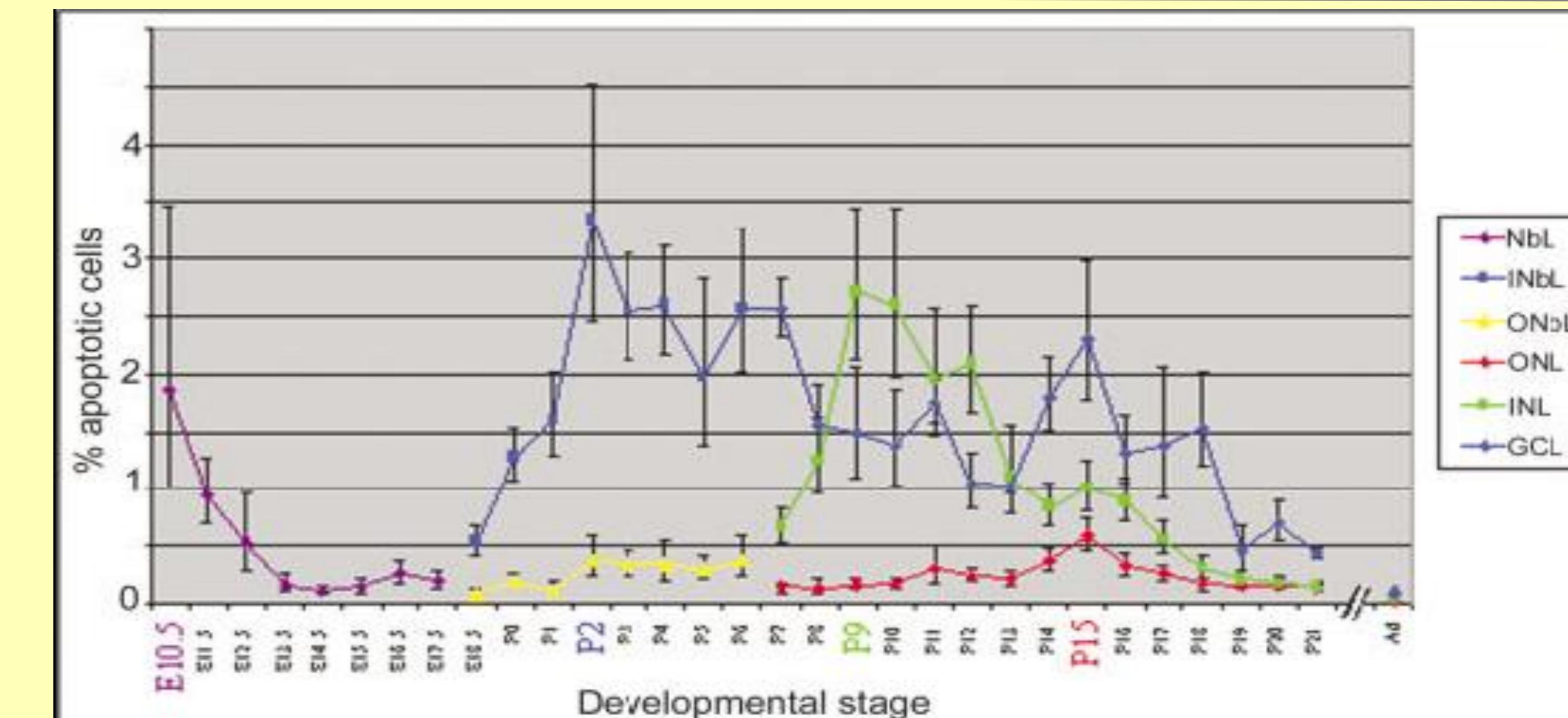


Abb. 2. Apoptose während der Entwicklung der Retina. Péquinot et al.; 2003

## Material und Methoden

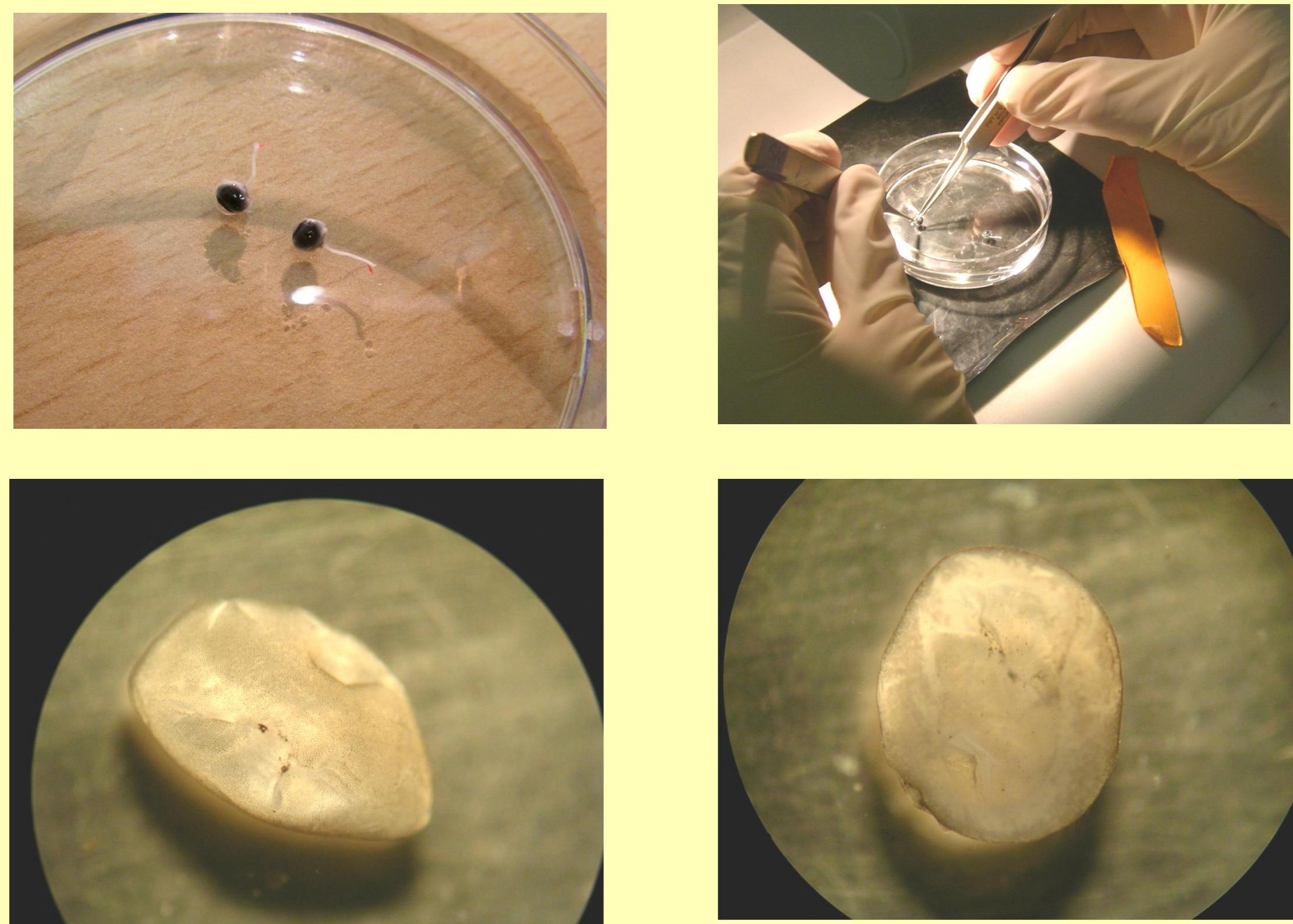


Abb. 3. Präparation von Whole-mount Retinae.

### 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 dissoziert und fixiert. Die Einzelzellensuspension wurde auf Objekträger 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 Thiocyanate / Phenol / Chloroform-Methode extrahiert. 1 µg der Gesamt-RNS wurde zu cDNA 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 % Sucrose 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 polyclonaler 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..

## Ergebnisse

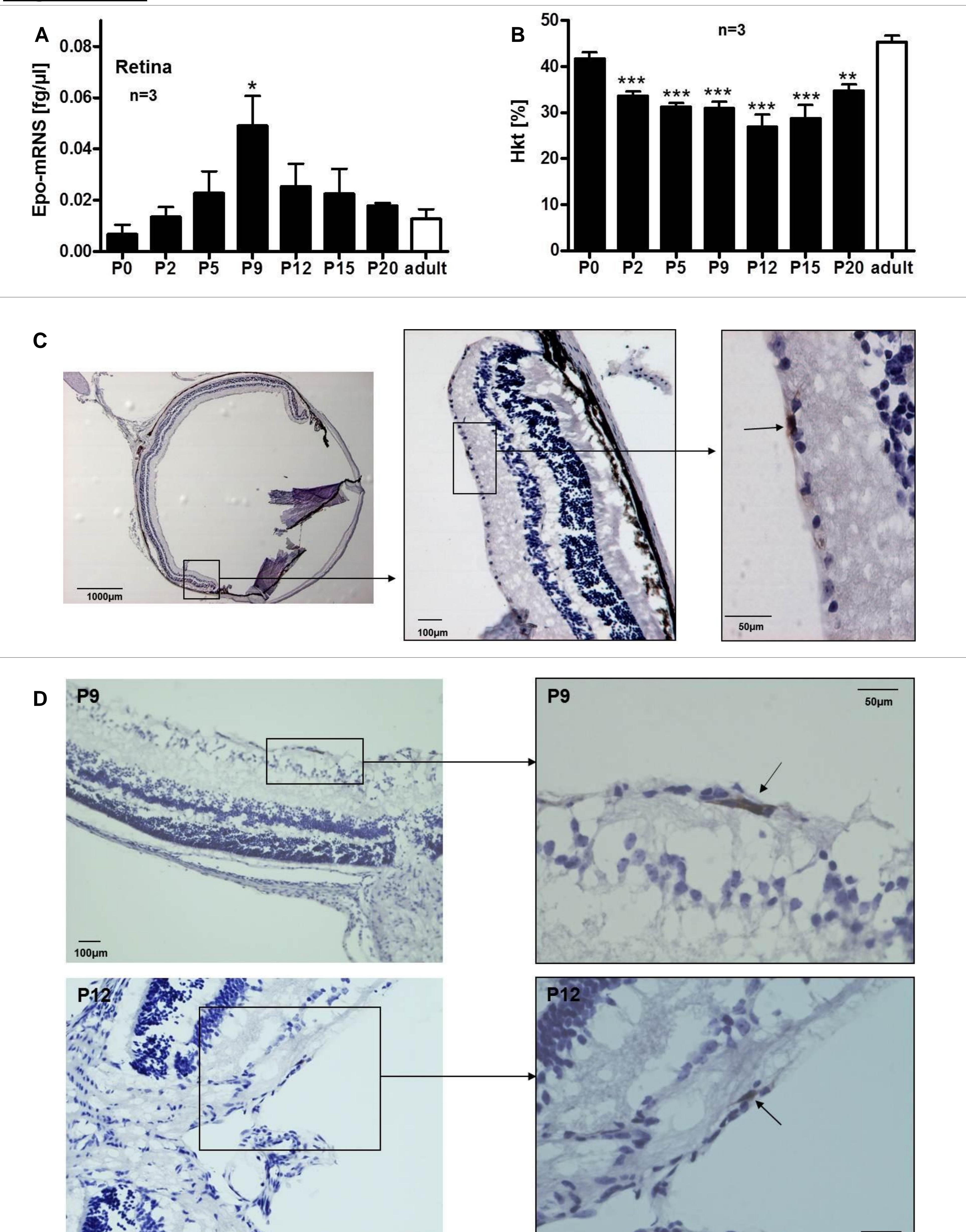


Abb. 4: (A) Retinale Epo-mRNS Expression und (B) Hämatokritwerte von Wildtypmäusen während der postnatalen Entwicklung im Vergleich zu adulten Mäusen. GFP-exprimierende Zellen in der Retina von (C) adulten und (D) früh postnatalen transgenen Mäusen, die GFP unter der Kontrolle Epo-Gen-regulierender DNS-Regionen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

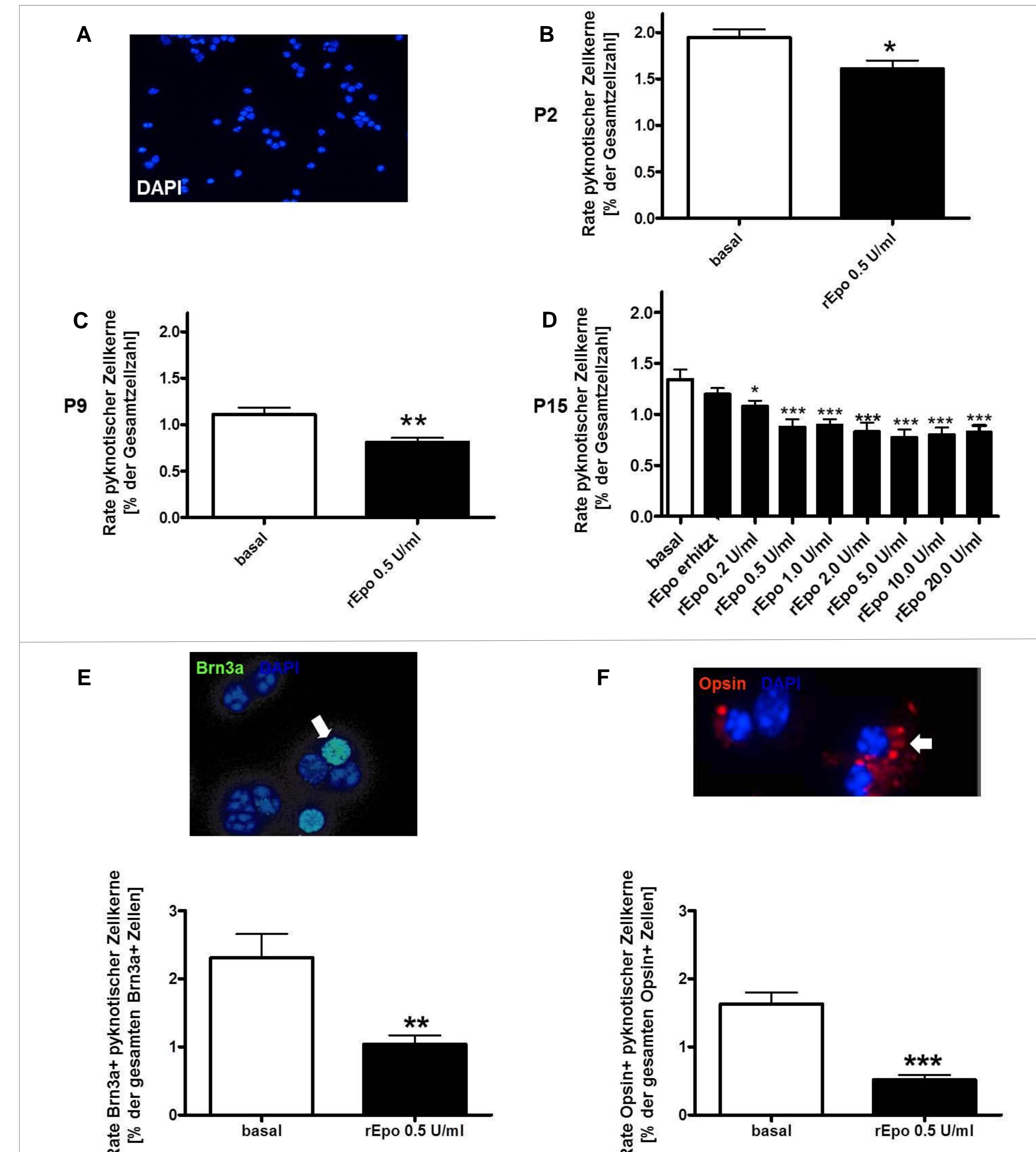


Abb. 5: DAPI gefärbte retinale Zellen (A). Rekombinantes Epo schützt retinale Zellen während aller drei Zelltodphasen an den postnatalen Tagen (P) 2 (B), P9 (C) und P15 (D). An P15 wirkt rekombinantes Epo neuroprotektiv auf Brn3a-positive Ganglien- (E) und Opsin-positive Photorezeptorzellen (F).

## 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 Ganglion- und Photorezeptorzellen. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass Epo auch im Rahmen physiologischer Zelltodprozesse neuroprotektive Wirkung vermitteln kann.