

Untersuchung der Funktion des Rho Kinase Inhibitors Y27632 in einem neuen 3D Modell zur Analyse der kornealen Nervenregeneration

Sonja Mertsch, Cosima Rose, Gerd Geerling and Stefan Schrader

Klinik für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Düsseldorf

Einleitung

Die neurotrophe Keratopathie (NK) ist eine degenerative Hornhauterkrankung, welche aus einer verminderten Innervation der Kornea resultiert und bei schweren Formen bis hin zur Erblindung führen kann. Bis heute gibt es keine kurative Behandlungsmöglichkeit der Erkrankung. Ziel dieses Projektes ist durch eine Analyse von neuen Faktoren zur Verbesserung der Nervenregeneration der Kornea unter Nutzung neu etablierter 3D Modelle *in vitro* mögliche neue therapeutische Ansätze aufzuzeigen. Als ersten möglicher Faktor wurde in dieser Studie der Rho Kinase Inhibitor Y27632 auf seinen Einfluss auf die neuronale Regeneration in einem 2D und dem neuen 3D Modell vergleichend untersucht.

Methoden

Murine Hinterwurzelganglienzellen (DRGs) oder murine Trigeminal Ganglionzellen (TG) wurden in frisch hergestellte „Plastic compressed Collagen“ (PCC) Gele eingebracht. Der ROCK Inhibitor Y27632 (100µM) wurde 12 Std nach Aussaat und anschließend alle 24 Std appliziert. Die PCC Gele wurden als „whole mount“ zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und die Nervenfasern wurden spezifisch mittels α - β III-tubulin Antikörper gefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels eines konfokalen Mikroskops (Leica SP8) und der Software NeuronJ. Für die 2D Experimente wurden Scratch-Assays durchgeführt. Die DRGs wurden in einer Dichte von 1×10^5 Zellen auf Laminin-beschichtete 48-well Platten ausgesät und 48 Std nach Aussaat wurden die ausgewachsenen Fasern gescratched. Nach Zugabe des Inhibitors Y27632 (analog zum 3D Ansatz) wurde das Einwachsen der Fasern in den entstandenen Spalt (0 Std, 24 Std, 48 Std) dokumentiert und erneut mit der Software NeuronJ ausgewertet.

3D Modellsysteme

Darstellung der verschiedenen 3D Modellsysteme

A) Komprimiertes Kollagen Gel (PCC, (D,E)) mit murinen neuronalen Zellen

B) Humane Kornea (dezellularisiert (F) oder nativ (G)) umgeben von dem PCC Gel mit eingebetteten murinen neuronalen Zellen

C) Humane Kornea (F, G) mit präparierten stromalen Taschen mit murinen neuronalen Zellen

Darstellung der neuronalen Zellgewinnung.

H) Murine TG nach Explantation.

I) Murine DRGs nach Explantation und Vereinzeln gefärbt mit anti- β III-tubulin (rot) und DAPI (blau).

J) Gewinnung der TG und DRG aus Mäusen und deren weitere Verarbeitung mittels Zellvereinzeln.

Wachstum DRGs 2D vs 3D

Wachstum von DRGs auf Lamininbeschichteten wells (A-D) oder in den PCC Gelen (E-H) zu verschiedenen Zeitpunkten von D1 bis D14. Neurone in dem PCC Gel zeigen ein verzögertes Auswachsen der Dendriten, es bildet sich jedoch ab Tag 5 ein vergleichbares Netzwerk der Fasern wie beim 2D Wachstum auf Laminin an Tag 2. Die DRGs wurden mittels anti- β III-tubulin (rot) und DAPI (blau) gefärbt.

DRG und TG im PCC Gel

Vergleich des Wachstums von DRGs (mit und ohne Inhibitor) mit TGs. Zellen sind GFP markiert und wurden zusätzlich mit anti- β III-tubulin (rot) und DAPI (blau) gefärbt. (A-C) zeigt DRGs nach 5 Tage im PCC Gel, (D-E) zeigt DRGs mit Inhibitor nach 5 Tagen im Gel und (G-I) zeigt TGs im Gel nach 5 Tagen. Es zeigt sich ein vergleichbares Auswachsen der Fasern zwischen DRGs und TGs. Der Inhibitor führt zu einem deutlichen Anstieg der Faserzahl.

Einfluss von Y27632 im 2D Modell

(A,B) zeigt ein Beispiel eines Scratch Assays mit murinen Neuronen. (A) zeigt die Kontrolle nach 48h Wachstum und (B) die mit einem Inhibitor behandelten Neurone zum gleichen Zeitpunkt. Hier zeigt sich deutlich das der Inhibitor zu einem gesteigertem Einwachsen der Fasern führt. (C) zeigt die Auswertung des 2D Scratch Assays bezogen auf die durchschnittliche Axonlänge pro Versuchsansatz. Verglichen werden unbehandelte Neurone (Kontrolle) mit Y27632 behandelten Neuronen. Sowohl an Tag 1 als auch an Tag 2 zeigt sich eine Steigerung der Axonlänge durch Inhibitorgabe.

Zeitpunkt	Kontrolle	Y27632
D1	~4000	~6500
D2	~5500	~8000

Einfluss von Y27632 im 3D Modell

DRGs im PCC Gel nach 5 Tagen Wachstum. (A) zeigt die Kontrolle und (B) das Wachstum mit Inhibitor. (C) stellt ein Beispiel der Auswertung mit dem „fiber tracking“ mittels NeuronJ Software dar. (D) zeigt die Auswertung der durchschnittlichen Axonlänge pro Gel. Es wurden je Ansatz 4 Gele untersucht mit je 1×10^5 Zellen. Pro Gel wurden 20 Fotos gemacht und ausgewertet. Es zeigt sich das im 3D Gel der Einfluss des Inhibitors vergleichbar zu den Ergebnissen im 2D Ansatz sind. Auch hier zeigt sich eine Erhöhung der Axonlänge der Zellen mit Inhibitorgabe sowohl auf dem PCC Gel als auch direkt in dem PCC Gel.

Modell	Kontrolle	Y27632
DRGs auf PCC	~3500	~7000
DRGs im PCC	~1500	~5000

Fazit

Es konnte gezeigt werden, dass das PCC Gel basierte 3D Modell geeignet ist, um die korneale Nervenregeneration *in vitro* zu untersuchen. Mit dem ROCK Inhibitor Y27632 konnte ein erster Faktor aufgezeigt werden, welcher einen signifikanten Einfluss auf das Auswachsen neuronaler Fasern *in vitro* im 2D und im 3D Modell zeigt.