

Einfluss von Lipidperoxidationsprodukten auf die Lipofuszinogenese in retinalen Pigmentepithelzellen

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn**

Nina Kristina Stratmann

Bonn

2009

**Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. F. G. Holz**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. C. Kurts**

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.10.2009

Aus der Augenklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. F. G. Holz

Gewidmet

Meinen Eltern

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	7
Einleitung	9
1 Altersabhängige Makuladegeneration	9
1.1 Manifestationsformen	9
1.2 Pathogenetische Faktoren.....	12
2 Rolle des retinalen Pigmentepithels.....	14
2.1 In vivo Detektion mittels konfokaler Scanning Laser Ophthalmoskopie	14
2.2 Lipofuszin	14
3 Oxidative Schäden.....	17
3.1 Oxidative Schädigungsmechanismen in der Retina	17
3.2 Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (HNE).....	18
Fragestellung.....	22
Material und Methoden	23
1 Materialien	23
1.1 Geräte	23
1.2 Chemikalien	23
2 Methoden.....	25
2.1 RPE-Zellkultur	25
2.2 Isolation porciner Photorezeptor-Außensegmente.....	26
2.4 Modifikation von POS mit MDA und HNE	27

2.4	Durchflusszytometrie	28
2.5	Spektralanalysen.....	32
2.6	Fluoreszenzmikroskopie	32
	Ergebnisse	34
1.	Fluoreszenzmikroskopie zellulärer Lipofuszinogenese	34
2.	Quantifizierung der zellulären Autofluoreszenz	35
3.	Autofluoreszenzspektren	40
	Diskussion	42
	Zusammenfassung.....	52
	Literaturverzeichnis.....	53
	Danksagung.....	61
	Lebenslauf.....	62

Abkürzungsverzeichnis

A ₂ E	N-Retinylden-N-Retinyloethanolamin
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
CNV	Choroidale Neovaskularisation
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	forward scatter
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HNE	4-Hydroxynonenal
LDL	low density lipoprotein
MDA	Malondialdehyd
3-MA	3-Methyladenin
PBS	phosphat buffered saline
PE	Phyoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
POS	photoreceptor outer segments
PUFA	poly unsaturated fatty acids
RPE	Retinales Pigmentepithel
SLO	Scanning-Laser-Ophthalmoskop
SSC	sideward scatter

UV

Ultraviolettes Licht

VEGF

vascular endothelial growth factor

Einleitung

1 Altersabhängige Makuladegeneration

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) gehört zu den wesentlichsten Ursachen einer Visusminderung bei über 50-Jährigen und stellt in den westlichen Industrienationen zugleich den häufigsten Grund für irreversiblen zentralen Sehverlust im Alter dar (Ambati et al., 2003). Infolge der steigenden Lebenserwartung werden in den nächsten Jahren die Zahl der betroffenen Personen und somit auch die gesellschaftliche Bedeutung der Erkrankung weiter zunehmen (Williams et al., 1998).

Die AMD ist eine multifaktorielle Erkrankung mit charakteristischen degenerativen Prozessen im Bereich der Makula, dem Ort des zentralen Sehens. Zu den Ursachen der Sehinderung gehören die choroidale Neovaskularisation (CNV) und die geographische Atrophie des retinalen Pigmentepithels (RPE). Viele Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass diese Veränderungen sekundär aus Funktionsstörungen des RPEs und pathologischen Veränderungen der Bruchmembran entstehen. Dabei scheinen exzessive Lipofuszin-Akkumulationen im lysosomalen Kompartiment eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Dysfunktion des RPEs zu spielen.

1.1 Manifestationsformen

Bei der AMD wird ein Frühstadium von einem Spätstadium abgegrenzt (Pauleikhoff und Holz, 1996). Kennzeichnend für das Frühstadium sind Drusen sowie irreguläre fokale Hyper- oder Hypopigmentierungen des RPEs, die für die Spätmanifestationen wie CNV, Abhebung des RPEs und geographische Atrophie prädisponieren. Während in den Frühstadien der Visus i. d. R. kaum beeinflusst wird, leiden AMD-Patienten in den Spätstadien der Erkrankung unter einer erheblichen Sehinderung bis hin zum Verlust des zentralen Gesichtsfeldes (Pauleikhoff und Holz, 1996).

Frühstadien

- Makuläre Drusen
- Irreguläre Hypo- oder Hyperpigmentationen des RPEs

Spätstadien

- Choroidale Neovaskularisation
 - Abhebung des retinalen Pigmentepithels
 - Riss des retinalen Pigmentepithels
 - Disziforme Narbe
- Geographische Atrophie

Tab. 1: Einteilung der AMD in Früh- und Spätstadien (Holz et al., 2004)

Klinisch wird eine trockene von einer feuchten Form unterschieden. Zu den Merkmalen der trockenen bzw. nicht-exsudativen Form zählen im Frühstadium Drusen der Bruchmembran, während das Spätstadium durch die sog. „geographische Atrophie“ gekennzeichnet ist. Choroidale Neovaskularisation, Abhebung und Riss des RPEs sowie, als Endstadium der Erkrankung, die disziforme Narbe der Makula sind Kennzeichen der feuchten bzw. exsudativen Form.

Drusen als Kennzeichen des Frühstadiums der AMD stellen extrazelluläre Ablagerungen komplexer Zusammensetzung dar – u.a. Lipide, Proteine und Oligosaccharide – deren Ursprung v. a. auf das anterior gelegene RPE zurückgeht (Mullins und Hageman, 1999; Pauleikhoff und Holz, 1996). Diese Ablagerungen finden sich typischerweise zwischen der Basalmembran der RPE-Zellen und der inneren kollagenen Schicht der Bruchmembran (Burns und Feeney-Burns, 1980). Sie haben primär keinen wesentlichen Einfluss auf die Sehschärfe. Ursächlich vermutet man, dass degenerative Dysfunktionen im RPE sowie oxidativer Stress (Crabb et al., 2002) bei der Drusenbildung eine pathogenetische Bedeutung besitzen. Da Drusen als Diffusionsbarriere die Versorgung des Pigmentepithels aus der Aderhaut erschweren, wird angenommen, dass ihre Gegenwart eine altersabhängige Degeneration des RPEs begünstigt (Young, 1987). Im weiteren Krankheitsverlauf gehen sie mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten der visusreduzierenden Spätstadien einher (Klein et al., 2002; Pauleikhoff et al. 1990).

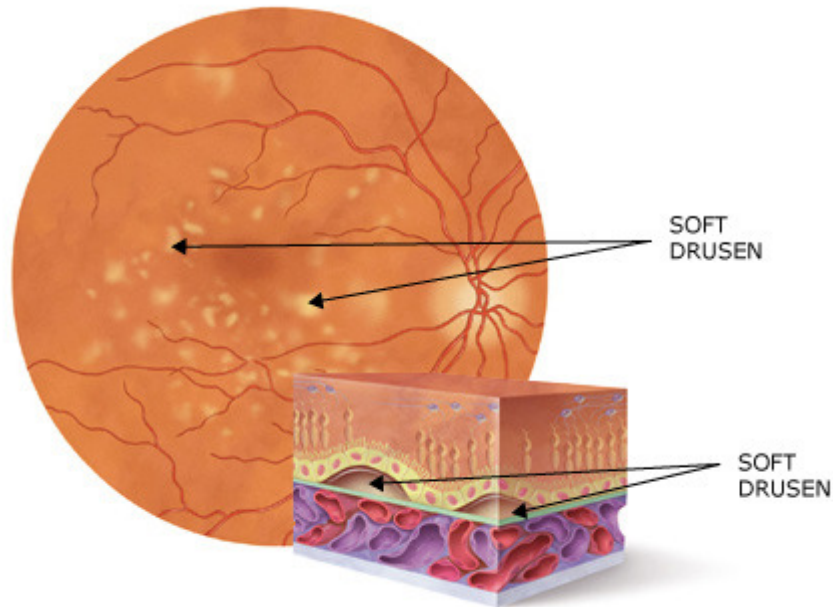


Abb. 1: *Ophthalmoskopische und histologische Darstellung von Drusen. (Quelle: AMD Alliance International; www.amdcanada.com)*

Die **geographische Atrophie** gehört zu den Spätstadien der AMD, die histologisch neben dem Verlust von RPE-Zellen auch durch ein sekundäres Absterben von Photorezeptoren und der Choriokapillaris gekennzeichnet ist. Zurzeit sind ca. 4 % der älteren Bevölkerung ab 75 Jahren betroffen. Sie kann entweder primär entstehen oder aber auch sekundär aus anderen Manifestationsformen, wie z. B. nach Abflachung einer Abhebung des RPEs oder nach Involution einer CNV. In den junktionalen Bereichen geographischer Atrophien findet man eine vermehrte Autofluoreszenz durch Lipofuszinakkumulationen. Eine intrazelluläre Ansammlung von zytotoxischen Lipofuszingranula löst offensichtlich bei Erreichen einer kritischen Obergrenze einen frühzeitigen pigmentepithelialen Zelltod aus. Als sekundäre Phänomene atrophieren die äußere neurosensorische Netzhaut und die Choriokapillaris. In dem Zusammenhang beschreiben Holz et al. (2001) anhand von Fundusaufnahmen mit dem Scanning-Laser-Ophthalmoskop (SLO) eine Ausdehnung der Atrophie in die Bereiche, die zuvor eine erhöhte Autofluoreszenz aufwiesen (Abb. 2). In der Regel wird die Fovea lange ausgespart, so dass erst im späten Krankheitsverlauf der Verlust der zentralen Sehschärfe auftritt (Sarks et al., 1988; Sunness, 1999).

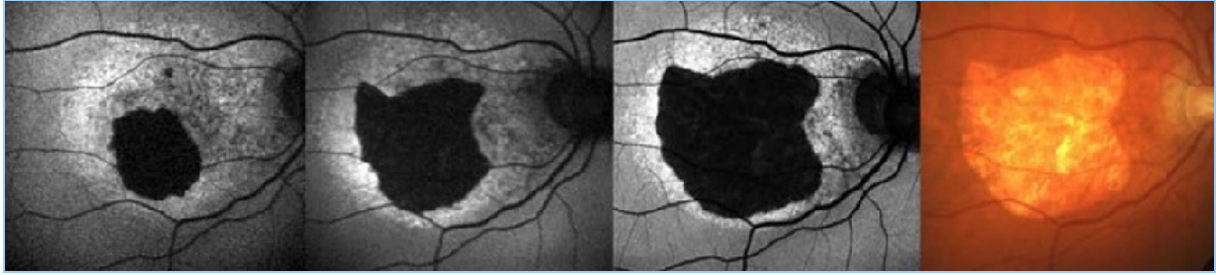


Abb. 2: Fluoreszenzangiographische/Ophthalmoskopische Aufnahmen: Ausdehnung der geographischen Atrophie in Richtung autofluoreszierender Bereiche (Quelle: Modifiziert nach Holz et al., 2007)

Die CNV kennzeichnet die feuchte Form der AMD und ist eine von der Aderhaut ausgehende Einsprossung von Kapillaren durch die Bruchmembran unter oder über das RPE. Diese wird durch den Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) initiiert und unterhalten. Ursächlich für die erhöhte VEGF-Konzentration vermutet man u. a. entzündliche Prozesse (Mullins et al., 2000), sowie die Ablagerung polarer Lipide (Holz et al., 1994) mit konsekutiver Diffusionsänderung der von den Pigmentepithelzellen gebildeten Wachstumsfaktoren (Moore et al. 1995). Die CNV führt durch Leckage von Serumbestandteilen aus neugebildeten Gefäßen in die Netzhaut (Makulaödem) zu Visuseinschränkung und Metamorphopsien. Durch eine Spaltung der Bruchmembran mit anschließender Flüssigkeitsansammlung zwischen Bruchmembran und RPE kann sekundär eine Abhebung des retinalen Pigmentepithels entstehen (Müller et al., 2002). Im weiteren Verlauf der Erkrankung fibrosiert die CNV und wird dann zusammen mit der begleitenden Netzhautatrophie als disziforme Narbe oder Junius-Kuhnt-Makulopathie bezeichnet (beschrieben 1926 von den Augenärzten der Universitäts-Augenklinik Bonn, Paul Junius und Hermann Kuhnt).

1.2 Pathogenetische Faktoren

Bisher ist die Pathogenese der AMD nur unvollständig geklärt. Wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, lassen zahlreiche Befunde vermuten, dass Funktionsstörungen auf der Ebene des RPEs, der einlagigen Zellschicht zwischen Bruchmembran und neurosensorischer Netzhaut, eine zentrale Rolle spielen. Die Folgen solcher Störungen erklären sich aus den vielfältigen Aufgaben des RPEs. Zu diesen zählen die Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke, die Teilnahme am Vitamin A Kreislauf, Phagozytose der distalen Photorezeptoraußensegmente (POS), Synthese der extrazellulären Matrix sowie der Molekültransport innerhalb der Interphotorezeptorenmatrix. Besonders bedeutend im Rahmen der AMD sind Störungen in den

Phagozytose- und anschließenden Abbauvorgängen der POS. Die phagozytierten lipidreichen Membranscheibchen der POS werden in den Lysosomen enzymatisch abgebaut. Die nicht wiederverwertbaren Abbauprodukte werden anschließend an der basalen Zellseite ausgeschleust und gelangen nach Diffusion durch die Bruchmembran zum Abtransport in die Choroidegefäße. Dieser Prozess gewährleistet eine ständige Erneuerung und Normalfunktion der Photorezeptoren.

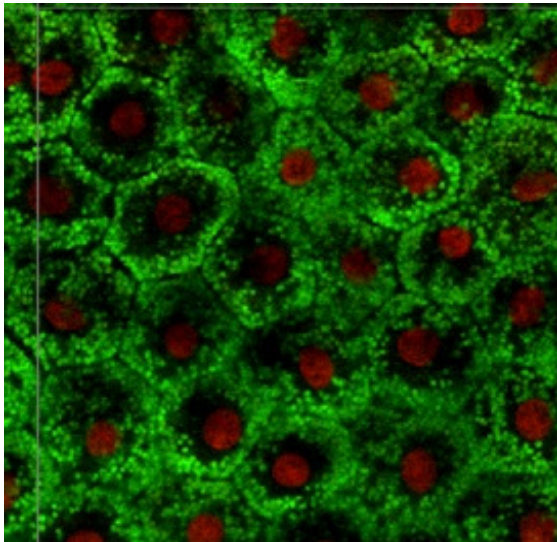


Abb. 3: Darstellung der intrazellulären Lipofuszingranula mittels konfokaler Scanning-Laser-Mikroskopie (Quelle: Roth et al., 2005)

Es wird vermutet, dass mit zunehmendem Alter oxidativer Stress Funktionsstörungen auf lysosomaler Ebene hervorruft (Kopitz et al., 2004), so dass phagozytiertes Material unvollständig abgebaut wird, akkumuliert und die Bildung von Lipofuszin begünstigt. Klinisch spiegelt sich dies in einer erhöhten Autofluoreszenz des RPEs wieder. Die Ansammlung von zytotoxischen Lipofuszingranula trägt zu weiteren Zellschäden sowie im Verlauf auch zur Apoptose des RPEs bei (Beatty et al., 2000; Schutt et al., 2002b). Die erhebliche Sehminderung durch eine geographische Atrophie resultiert somit sekundär aus den Funktionsstörungen der RPEs und den Veränderungen der Bruchmembran (Holz et al., 2004).

2 Rolle des retinalen Pigmentepithels

2.1 In vivo Detektion mittels konfokaler Scanning Laser Ophthalmoskopie

Mittels sog. Fundusautofluoreszenzaufnahmen ist es möglich, Lipofuszinakkumulationen in den RPE-Zellen in vivo zu detektieren und topographische Veränderungen auch mit der Zeit zu bestimmen. Während ursprünglich nur eine in-vitro-Erfassung mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken möglich war (Feeney-Burns et al., 1980; Weiter et al., 1986), können mit der Entwicklung der konfokalen Scanning-Laser-Ophthalmoskopie (Bellmann et al., 1997; Holz, Springer, 2004) und des Fundusspektrophotometers (Arend et al., 1995; Delori et al., 1995) die autofluoreszenten Lipofuszingranula im RPE auch in vivo erfasst werden. Das konfokale Prinzip des SLO ermöglicht durch Minimierung des Fluoreszenzstreulichts eine Optimierung des Bildkontrastes. Vorteilhaft gegenüber dem Fundusspektrophotometer gestattet das Verfahren des SLO eine Bestimmung der topographischen Verteilung über größere Flächen. Fokal erhöhte Autofluoreszenz findet man bspw. in Gegenwart von Drusen, von choroidalen Neovaskularisationen sowie von disziformen Narben (Bellmann et al., 1997). Atrophische Bereiche fluoreszieren vermindert, jedoch akkumuliert in den junktionalen Bereichen verstärkt autofluoreszentes Material. In klinischen Studien konnte eine prognostische Bedeutung der Ausdehnung und Verteilung der Fundusautofluoreszenz für das Fortschreiten der Erkrankung belegt werden (Schmitz-Valckenberg et al., 2006; Holz et al., 2007).

2.2 Lipofuszin

Die spektrale Analyse der Fundusautofluoreszenz bei AMD-Patienten mit Hilfe des Fundusspektrophotometers konnte Lipofuszin als Auslöser der intrinsischen Autofluoreszenz im RPE bestätigen. Aufgrund seiner altersabhängigen Akkumulation sind Synonyme wie „Alterspigment“ (Beatty et al., 2000) und die Bezeichnung als „Biomarker der Alterung“ (Donato et al., 1979) entstanden. Es entsteht in metabolisch aktiven postmitotischen Zellen wie Neuronen, Herzmuskelzellen und RPE-Zellen (Katz et al., 1999; Terman et al., 2004) und ist assoziiert mit pathologischen Erscheinungen wie Myokardhypertrophie, Leberzirrhose und AMD. Sowohl die Zusammensetzung als auch die Bildung des Lipofuszins unterscheidet sich innerhalb der verschiedenen Zelltypen. Neben der AMD korrelieren auch genetisch bedingte Netzhaut-

dystrophien wie z. B. M. Stargardt und M. Best mit vermehrter Lipofuszinablagerung (Delori et al., 1995).

Digitale Fundusautofluoreszenzaufnahmen in vivo mit einem SLO geben Aufschluss über die Intensitätsverteilung von Lipofuszin. Die höchsten Konzentrationen werden im perifovealen Anteil der Makula, dem Ausgangspunkt der AMD, erreicht. Sowohl in Richtung der Fovea centralis als auch zur Fundusperipherie nimmt die Autofluoreszenzdichte ab. Zu den lipofuszinfreien Strukturen gehören zum einen der Sehnervenkopf und zum anderen die retinalen Gefäße. Das Makulapigment im Foveabereich ist darüber hinaus in der Lage, das Fluoreszenzlicht der darunterliegenden Netzhautschichten abzuschatten. Topographisch betrachtet reichert sich Lipofuszin gemäß der Dichteverteilung der Photorezeptoren an (Hayasaka, 1989; Kennedy et al., 1995).

Eine Betrachtung in Abhängigkeit vom Lebensalter offenbart einen sigmoidalen Verlauf der Lipofuszinanreicherung im RPE, d.h. in den ersten 20 Lebensjahren nimmt die retinale Lipofuszinkonzentration am stärksten zu (Feeney-Burns et al., 1984) und stagniert dann bis zum 40. Lebensjahr. Danach kommt es erneut zu einer Lipofuszinakkumulation, diesmal mit verstärkter retinaler Streuung, so dass nach 80 Lebensjahren das zytoplasmatische Volumen durchschnittlich 20 % Lipofuszin enthält (Feeney, 1978; Feeney-Burns et al., 1980).

Morphologisch entspricht Lipofuszin einem granulierten elektronendichten intrazellulär gelegenen Pigment, das gelblich-bräunlich fluoresziert. Die einzelnen Granula haben eine weitgehend einheitliche Größe von 1-1,2 μm (Feeney-Burns et al., 1980) und sind umgeben von einer Lipidmembran lysosomalen Ursprungs. Das Pigment besteht aus einem heterogenen Gemisch verschiedener Makromoleküle und Molekülaggregate, die vorwiegend Proteine, Lipide, Nukleinsäuren, Retinylpalmitat und mindestens zehn unterschiedliche Fluorophore (Eldred und Katz, 1988; Kennedy et al., 1995) aufweisen. Palmitin-, Arachidon- und Ölsäure überwiegen dabei unter den Fettsäuren. Die genaue chemische Zusammensetzung bleibt bisher noch im Unklaren. Die Fluorophore können gemäß ihrer Exzitations- und Emissionswellen in vier Gruppen eingeteilt werden (vgl. Tab. 2).

Fluorophor (e)	Anregung (nm)	Emission (nm)
grün emittierend	330	520
gelb-grün emittierend	280, 330	568
gelb-gold emittierend	280, 330	585
orange-rot emittierend	285, 335, 420	605, 633, 670

Tab. 2: Fluorophore des Lipofuszin aus retinalen Pigmentepithelzellen nach Chloroformextraktion (nach Eldred und Katz, 1988)

Die fluoreszierenden Granula besitzen ein Exzitationsspektrum oberhalb von 400 nm und ein Emissionsspektrum zwischen 620 und 630 nm. Unter UV-Bestrahlung (< 380 nm) zeigen die Granula eine goldgelbe Autofluoreszenz mit einem Emissionspeak zwischen 570 und 605 nm (Delori et al., 1995; Eldred und Katz, 1988).

Das Lipofuszin enthält toxische Biomoleküle, welche die normale Zellfunktion beeinträchtigen können. Nach Inkubation von RPE-Zellen mit Lipofuszin unter Lichtexposition stellten Shamsi und Boulton (2001) schon innerhalb von 24h eine Abnahme der Zellvitalität, der lysosomalen Enzymaktivität (Phosphatase, Glucuronidase und Cathepsin D) sowie eine Hemmung antioxidativer Funktionen fest. Lichtinduziert vermag das Pigment Lipidperoxidationen auszulösen (Rozanowska et al., 1998 Wassell et al., 1999). Zu den zytotoxischen Bestandteilen gehört das 1993 von Eldred und Lasky entdeckte Hauptfluorophor N-Retinylden-N-Retinyethanolamin (A₂E). A₂E hemmt indirekt lysosomale Enzyme, indem es die lysosomalen ATP-abhängigen Protonenpumpen inhibiert, so dass der pH-Wert außerhalb des enzymatischen Aktivitätsoptimums ansteigt (Bergmann et al., 2004). Außerdem wird dem A₂E oberhalb kritischer Konzentrationen die Fähigkeit zur Desintegration von Organellmembranen zugeschrieben (Schutt et al., 2002b).

Die genauen biochemischen Mechanismen, die mit einer Lipofuszinogenese einhergehen, sind zurzeit noch unvollständig geklärt. Vermutet wird eine Entstehung durch lebenslange Akkumulation unvollständig abgebauter lipid- und retinolreicher POS in den Lysosomen. Es bestehen Hinweise, dass Lipidperoxidationen eine lysosomale Dysfunktion begünstigen und dadurch den Abbau der POS hemmen (Kaemmerer et al., 2007). Daneben legen Untersuchungen

des Lipofuszinproteoms in humanen RPE-Zellen nahe, dass auch autophagierte Biomoleküle an der Lipofuszinogenese beteiligt sind (Schutt et al., 2002a).

3 Oxidative Schäden

3.1 Oxidative Schädigungsmechanismen in der Retina

Wie bereits oben angeführt (vgl. 1.2 und 2.2), spielen oxidative Prozesse eine wichtige Rolle bei der Lipofuszinogenese (Crabb et al., 2002; Winkler et al., 1999). Auch bei anderen altersabhängigen Erkrankungen, wie Atherosklerose (Esterbauer et al., 1990), Alzheimer (Montine et al., 2002), Parkinson (Yoritaka et al., 1996) und diabetische Retinopathie (Kumar et al., 2001) sind oxidative Mechanismen beteiligt. Die Retina scheint durch den schleichenden altersabhängigen Funktionsverlust der Antioxidationsysteme bei gleichbleibender Lichtexposition und konstant hohen Sauerstoffpartialdrücken sowie in Gegenwart hoher Konzentration ungesättigter Fettsäuren für oxidative Schädigungen besonders prädisponiert zu sein (Beatty et al., 2000).

Der chemische Prozess der Lipidperoxidation stellt ein wichtiges biochemisches Korrelat der Schädigung durch oxidativen Stress dar. Initial ausgelöst werden die ablaufenden Reaktionen durch freie Sauerstoffradikale, die durch den Besitz ungepaarter Elektronen in der Außenschale einen instabilen und somit reaktiven Status aufweisen (Southorn und Powis, 1988). Die Entstehung dieser Radikale wird neben UV-Strahlung und einem erhöhten Sauerstoffpartialdruck auch durch Entzündungsprozesse, Luftverschmutzung (O_3 , NO_2) und Zigarettenrauchen begünstigt (Machlin und Bendich, 1987). Freie Radikale erstreben einen stabilen Zustand, den sie erreichen können, indem sie die Elektronen anderer Moleküle an sich ziehen. Dabei sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren besonders empfindlich gegenüber Schädigungen durch freie Radikale. Witting (1965) beschreibt in diesem Zusammenhang eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der Doppelbindungen und der Empfindlichkeit gegenüber Radikalangriffen. Im Zuge von Radikalkettenreaktionen entstehen Lipidperoxide, die sich wiederum an den Elektronen anderer mehrfach ungesättigter Fettsäuren bedienen, um Stabilität zu erlangen. Im Rahmen dieser Reaktionen werden die wertvollen ungesättigten Fettsäuren in zytotoxisch wirksame Lipidperoxidationsprodukte gespalten.

Da das Membransystem der POS zu etwa 50 % aus ungesättigten Fettsäuren besteht und die Docosahexaensäure, eine Vorstufe der α -Linolensäure mit sechs Doppelbindungen, unter den

Fettsäuren der Phospholipide dominiert, scheinen die POS-Membranen einen zentralen Angriffspunkt für oxidativen Stress darzustellen. Zur Sicherheit vor Bildung freier Radikale verfügen sowohl das RPE als auch die POS über Antioxidationsysteme (Beatty et al., 2000). Zu diesen Schutzmechanismen gehören hydrophile Antioxidantien wie Vitamin C und Glutathione, die lipophilen Antioxidantien Vitamin E, Retinoide und Karotenoide, sowie die Enzyme Superoxiddismutase, Katalase oder Glutathionperoxidase. Auch die in der Makula enthaltenen Pigmente Zeaxanthin und Lutein besitzen antioxidative Eigenschaften und filtern kurzwelliges Licht. Mit zunehmendem Alter kann der oxidative Stress, vermutlich in Folge der abnehmenden antioxidativen Enzymaktivität im Alter und der altersbedingten Abnahme des Makulapigments, nicht mehr kompensiert werden (Shamsi und Boulton, 2001). Letzten Endes führt bei gleichbleibender Sauerstoffkonzentration eine lebenslange intensive Bestrahlung mit kurzwelligem blauem Licht zu fortwährenden Oxidationsprozessen in der Lipiddoppelschicht der POS (Feeney-Burns et al., 1980; Tate et al., 1995). Aus den ungesättigten Fettsäuren entstehen zunächst höhermolekulare Lipidperoxide, die sich zu Carbonylverbindungen und vor allem zu reaktiven Aldehyden umwandeln können.

3.2 Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (HNE)

Unter den vielen unterschiedlichen Aldehyden, die während Lipidperoxidationen entstehen können, spielen Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal allein aufgrund der Konzentration eine herausragende Rolle und wurden deshalb bisher am ausgiebigsten untersucht (Esterbauer et al., 1990; Poli et al., 2000).

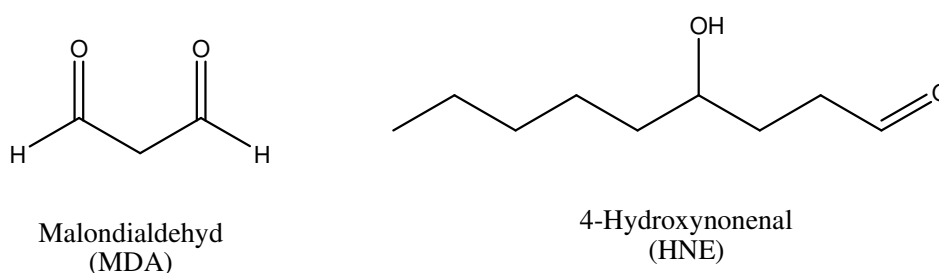


Abb. 4: Strukturformeln der untersuchten Lipidperoxidationsprodukte

Im Vergleich zu den freien Sauerstoffradikalen sind MDA und HNE langlebiger und in der Lage aus Lipidmembranen zu diffundieren, so dass sie intra- und extrazelluläre Verbindungen angreifen und schädigen können (Esterbauer et al., 1990). Darüber hinaus besitzen beide Aldehyde genotoxische und mutagene Eigenschaften. Sie können DNA-Reparatursysteme

hemmen und erhöhen somit die Anzahl spontaner Mutationen. Außerdem besitzen MDA und HNE das Potential inflammatorische Reaktionen auszulösen, die die Entwicklung einer AMD begünstigen (Anderson et al., 2002).

HNE wurde erstmals 1981 während Studien zur Charakterisierung von zytotoxischen und karzinogenen Substanzen in autooxidierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren entdeckt (Itoh et al., 1981). Nach Pryor und Porter (1990) kann HNE ausschließlich aus ω -6-Fettsäuren hervorgehen, und zwar in der Regel durch Oxidation von Linolensäure- oder Arachidonsäureestern. Diese sind in den POS-Membranen gehäuft vertreten. HNE weist eine Aldehydgruppe, eine CC-Doppelbindung und eine Hydroxylgruppe als funktionelle Gruppen auf. Esterbauer et al. (1990) untersuchten die Zytotoxizität sowie die möglichen biologischen Effekte. In hoher Konzentration (100 μ M) wirkt es unspezifisch toxisch, hemmt die anabolen und katabolen Zellfunktionen und führt in der Regel zu einem schnellen Zelltod. Unterhalb der letalen Konzentration ist HNE in der Lage, die Zellproliferation zu blockieren. HNE in einer Konzentration von 1-20 μ M inhibiert die DNA- und Proteinsynthese und stimuliert die Phospholipase C. In geringen Mengen, d. h. im Bereich von 0,1- 1,0 μ M, wirkt HNE chemotaktisch, induziert genotoxische Effekte und moduliert die Aktivität der Adenylat- und Guanylatcyclase.

Das MDA nimmt mengenmäßig den größten Anteil innerhalb der Lipidperoxidationsprodukte ein. Man bedient sich deshalb der quantitativen Bestimmung von MDA zur Bewertung von oxidativen Schäden in biologischen Systemen. Beispielsweise können Malondialdehyde im Blut und Urin detektiert werden. Es entsteht hauptsächlich aus dem oxidativen Abbau der mehrfach ungesättigten Fettsäuren Arachidon- und Docosahexaensäure (DHA) und kann sowohl in gebundener als auch in freier Form vorliegen. Gerade DHA kommt in POS-Membranen höher konzentriert vor als in allen anderen Geweben des menschlichen Körpers.

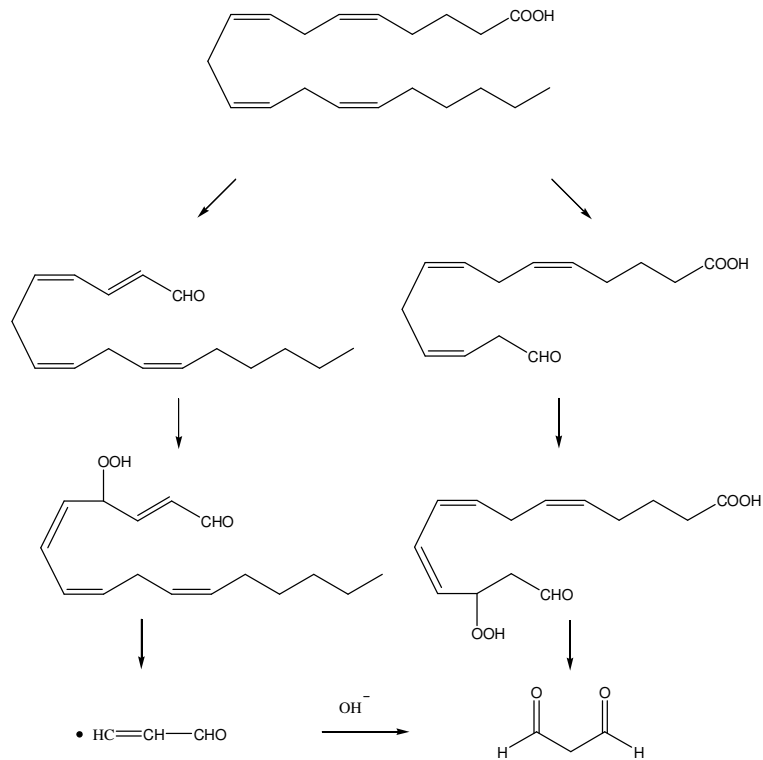


Abb. 5: Möglicher Entstehungsmechanismus von MDA aus Arachidonsäure durch Interaktion mit freien Radikalen (nach Esterbauer et al., 1991)

Die reaktiven elektrophilen Aldehyde HNE und MDA knüpfen leicht kovalente Bindungen mit zellulären Molekülen und lagern sich dabei bevorzugt an Cystein-, Lysin- oder Histidinresten von Proteinen an.

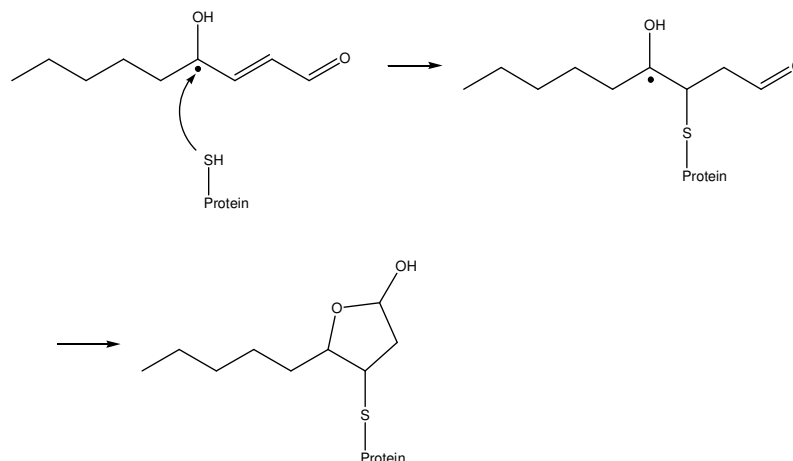


Abb. 6: Prinzip der Adduktbildung von HNE an Proteinen (Esterbauer et al. 1991)

Aus strukturveränderten Proteinen resultieren in der Regel Funktionsstörungen sowie ein reduzierter Katabolismus. Burcham et al. (1997) konnte in diesem Zusammenhang eine herabgesetzte Proteolyseanfälligkeit von MDA- und HNE-modifizierten Proteinen bestätigen. Es

wird vermutet, dass die Lipidperoxidationsprodukte MDA und HNE bei der Lipofuszinogenese und somit in der Pathogenese der AMD eine bedeutende Rolle spielen. Diese Vermutungen basieren u. a. auf den Ergebnissen von Schutt et al. (2003), welche ergaben, dass ein Großteil der Proteine im RPE-Lipofuszin durch die Lipidperoxidationsprodukte MDA und HNE modifiziert sind.

Inzwischen wird angenommen, dass die reaktiven Aldehyde lysosomale Dysfunktionen induzieren, die eine Ansammlung unverdaulichem Material und somit die Bildung von Lipofuszin nach sich ziehen. (Kopitz et al., 2004; Kaemmerer et al., 2007).

Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es aufzuklären, ob die Phagozytose oxidativ geschädigter POS über den Weg der lysosomalen Dysfunktion eine intrazelluläre Lipofuszinogenese induzieren kann. Dabei soll an kultivierten RPE-Zellen die intrazelluläre Bildung autofluoreszenten Materials infolge Speicherung MDA- bzw. HNE-modifizierter POS quantifiziert werden. Im Falle einer erhöhten Autofluoreszenz der Zellen soll das autofluoreszente Material anhand der Emissionsspektren und morphologischen Untersuchungen genauer charakterisiert werden. Schliesslich soll untersucht werden, ob autophagische Prozesse bei der Lipofuszinogenese eine Rolle spielen könnten.

Material und Methoden

1 Materialien

1.1 Geräte

CO ₂ - Brutschrank Heracell 150	Thermo
Fluoreszenzmikroskop DM RXE	Leica
Analysenwaage AE160	Mettler
Fluoreszenzmikroskop IX 71	Olympus
Wasseraufbereitungssystem Direct Q	Millipore
Varioklav 250 T	H + P
Laborzentrifuge Multifuge 1S- R	Heraeus
Spektrophotometer DU650	Beckmann
Freezer Forma 906	Thermo
Wasserbad W350	Memmert
Schüttler Julabo SW	Heinz Eich GmbH
Sterilwerkbank Antair ZKB	Antos
Rotor für Multifuge TTH 400	Heraeus
Durchflusszytometer: FACS Canto	BD Biosciences
Spektrofluorometer: Safire	TecanKühlschrank
Magnetheizrührer	VELP Scientifica
Pipetus akku	Brand

1.2 Chemikalien

Alle genannten Chemikalien wurden in der Reinheitsstufe p. A./z. A. verwendet

Bradford-Reagenz	Sigma
CaCl ₂	AppliChem
DABCO	Sigma
DAPI	AppliChem
DMEM High Glucose with Sodium Pyruvate with Glutamine	PAA
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA
Formaldehyd	Merck
Glycerol	Applichem
H ₂ O dest.	Millipore
HCl	Roth
HEPES	Roche Diagnostics
HNE-DMA	Sigma
KCl	Applichem
MDA-DMA	Axxora
Methanol	Merck
MgCl ₂	Applichem
Mowiol	Sigma
NH ₄ Cl	Baker
PBS Dulbecco`s with Ca & Mg	PAA
PBS Dulbecco`s without Ca & Mg	PAA
Penstrep (Penicillin-Streptomycin-Lösung)	PAA
Stickstoff	Linde
Sucrose	Roth
TrisHCL	Merck
Trypsin-EDTA	PAA
3-MA	Sigma

2 Methoden

2.1 RPE-Zellkultur

Die verwendeten humanen RPE-Zellen der stabilen ARPE-19 Zelllinie stammen von „American Type Culture Collection“ (ATCC; Rockville, MD). Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen, d. h. bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO₂, im Begasungsbrutschrank. Das eingesetzte Nährmedium bestand aus einer 1:1 Mischung mit Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium und Ham`s F-12-Medium mit 2,5 M L-Glutamin, 0,5 M Natriumpyruvat und 17,5 M D-Glucose. Hinzugegeben wurden 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum. Zur Zellpassagierung wurden konfluente Zellen mit kalzium- und magnesiumfreien PBS (phosphat buffered saline) gewaschen und zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden mit Trypsin für 5 min im Begasungsbrutschrank inkubiert. Die Trypsinierung wurde mit serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellsuspension danach auf vier neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Zellen wurden alle 7 Tage passagiert.

Reagenzien:

- Medium
- Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
- PBS

Arbeitsschritte:

- Medium, Trypsin und PBS im Wasserbad auf 37°C erwärmen
- Medium aus 75er Zellkulturflaschen absaugen
- RPE-Zellen mit 10 ml PBS waschen
- RPE-Zellen mit 2 ml Trypsin bedecken
- Inkubation im Brutschrank für 5-10 min
- Stopfung der Trypsinierung mit 3 ml Medium
- Zellsuspension auf vier neue 75er Flaschen aufteilen
- Zugabe von jeweils 9 ml Medium in die Flaschen

Für alle Versuche wurden die RPE-Zellen in einer Zelldichte von $1,66 \times 10^5$ Zellen/cm² (Dunn et al., 1996) ausgesät. Vor der Inkubation mit POS wurden die Zellen für 7 Tage kultiviert, um die Ausbildung einer konfluenten Einzelzellschicht zu ermöglichen.

2.2 Isolation porciner Photorezeptor-Außensegmente

Die Isolierung von porcinen POS orientiert sich an der Methode von Schraermeyer et al. (1997) sowie von Bergmann et al. (2004). Die Retinae aus 20 Schweineaugen wurden für eine POS-Isolierung verwendet. In der Regel können daraus etwa 1 mg POS isoliert werden.

Reagenzien:

- Hepes-Lösung (50 ml)
 - 1,19 g HEPES (N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N-2-ethansulfonsäure)(MW 238,3)
 - In 50 ml H₂O dest.
- Ca/Mg-Lösung (500 ml)
 - 0,37 g CaCl₂ (MW 147,0)
 - 1,02 g MgCl₂ (MW 203,3)
 - In 500 ml H₂O dest.
- KCl-Puffer mit/ohne Sucrose (25 ml+25 ml)
 - 1128 mg KCl (MW 74,6) (0,3 M)
 - 5 ml HEPES-Lösung
 - 5 ml Ca/Mg-Lösung
 - In 40 ml H₂O dest.
 - 25 ml davon mit 12 g Sucrose (= Saccharose)
 - pH einstellen auf 7,0
 - Sterilfiltrieren

Arbeitsschritte:

Nach Desinfektion in Betaisodona wurden die Bulbi radiär mit einem Skalpell eingeschnitten, der Glaskörper mit einer Pipette abgezogen und die Retinae abgelöst. Je fünf Retinae wurden auf 15 ml Röhren mit jeweils 2 ml Sucrose-Lösung verteilt und durch kräftiges Vortexen und Pipettieren suspendiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 5000 g für 5 min bei Raumtemperatur. Der gewonnene Überstand wurde durch eine Gaze filtriert und das Pellet erneut zweimal in 2 ml Sucrose-Lösung resuspendiert, abzentrifugiert und filtriert. Danach wurden

alle Überstände gepoolt, 1:1 mit KCL-Puffer ohne Sucrose gemischt und auf vier 15 ml Röhren verteilt. Anschließend wurde die Suspension bei 4000 g für 7 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gewonnenen POS-Pellets wurden in je 1 ml D-PBS mit Ca/Mg resuspendiert, in vier sterile Eppendorfgefäße umgefüllt und bei -80°C gelagert. Vor HNE- bzw. MDA-Modifikation wurden die POS mit D-PBS gewaschen, d.h. bei 15000 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Dieses Standardverfahren beruht auf der spezifischen Komplexbildung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau mit Proteinen, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Dabei erfolgt die Zunahme der Absorption proportional zur Proteinkonzentration.

2 µl POS wurden in einer Küvette mit 800 µl D-PBS und 200 µl Bradford-Reagent suspendiert. Der Leerwert wurde mit 800 µl D-PBS und 200 µl Bradford-Reagent ohne POS-Zugabe erstellt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 5-10 min inkubiert und im Photometer bei 595 nm ausgewertet. Die Konzentrationen wurden auf der Basis einer Eichkurve, die anhand verschiedener Konzentrationen von bovinem Serumalbumin als Standardprotein bestimmt wurde, errechnet.

Für alle Experimente wurden POS in einer Konzentration entsprechend 4 µg Gesamtprotein pro cm² Zellkulturfläche eingesetzt, da Vorversuche ergeben haben, dass bei dieser POS-Konzentration eine annähernd maximale POS-Phagozytose über einen Zeitraum von 24 h erreicht werden kann.

2.4 Modifikation von POS mit MDA und HNE

Nach Isolation und Proteinbestimmung wurden jeweils 250-500 µg POS mit MDA (20 mM) bzw. HNE (1 mM) behandelt.

1. MDA-Modifikation:

Reagenzien:

- MDA-DMA (Sigma 87670-100ML)
- HCL
- PBS

Arbeitsschritte:

Zur Herstellung einer 20 mM MDA-Lösung wurden 20 µl MDA-DMA in 1 ml HCl (1 mM) verdünnt und anschließend bei Raumtemperatur für 30 min hydrolysiert.

Im Anschluss erfolgte die POS-Modifikation, indem 1 ml MDA-Lösung mit 5 ml D-PBS verdünnt und das gewaschene POS-Pellet in 600 µl dieser 20 mM MDA-Lösung resuspendiert wurde. Die Suspension wurde über Nacht auf einem Schüttler inkubiert, danach mit PBS gewaschen und bei 15000 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert.

2. HNE-Modifikation

Reagenzien:

- HNE-DMA (Sigma H9538-5MG)
- Stickstoff (gasförmig)
- HCL
- PBS

Arbeitsschritte:

Zur Herstellung einer 5 mM HNE-Lösung wurde zunächst das Hexan unter Stickstoff verdunstet, anschließend 100 µl HNE-DMA in 100 µl HCl (1 mM) resuspendiert und für 30 min bei 4°C hydrolysiert.

Zur POS-Modifikation wurden 100 µl HNE-Lösung mit 540 µl PBS verdünnt und das gewaschene POS-Pellet in 600 µl dieser 5 mM HNE-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde über Nacht auf einem Schüttler inkubiert, danach mit PBS gewaschen und bei 15000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert.

2.4 Durchflusszytometrie

Die intrazelluläre Autofluoreszenz wurde in einem FACS-Canto quantifiziert. Bei einer Exzitation von 488 nm (blue laser) wurde im FITC-Kanal (525 nm) gemessen. Jeder Messwert basierte auf 3 Versuchsansätzen. Aus den drei gemessenen Fluoreszenzwerten wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt. Im Dot-Plot wurden die Zellen nach Granularität und Zellgröße zur Autofluoreszenzmessung selektiert.

1. Messung der Gesamtautofluoreszenz nach 7 Tagen

Im ersten FACS-Phagozytose-Versuch wurden die RPE-Zellen für einen Zeitraum von 7 Tagen täglich entweder mit unbehandelten POS, MDA-modifizierten POS oder mit HNE-modifizierten POS (Konzentration: 4 µg POS-Gesamtprotein pro cm² Zellkulturfläche) inkubiert bzw. nur das Medium gewechselt. Verwendet wurde eine 24well-Platte mit konfluenten ARPE-Zellen ca. 5-7 Tage nach Umsetzung.

Versuchsaufbau:

- Messreihe A: 0,6 ml Medium
- Messreihe B: 0,6 ml Medium +
10 µg unbehandelte POS
- Messreihe C: 0,6 ml Medium +
10 µg MDA-modifizierte POS
- Messreihe D: 0,6 ml Medium +
10 µg HNE-modifizierte POS

2. Messung der Autofluoreszenz im Zeitverlauf

Der zweite FACS-Phagozytose-Versuch sollte die tägliche Autofluoreszenzentstehung über den Zeitraum von einer Woche demonstrieren. Der Versuchsaufbau ähnelt dem obigen, nur dass die Messreihen aus 7 Zeitreihen à 3 wells aufgebaut waren. Verwendet wurden zwei 24well-Platten mit ARPE-Zellen ca. 5-7 Tage nach Umsetzung.

Versuchsaufbau:

- Messreihe A: 0,6 ml Medium
- Messreihe B: 1 0,6 ml Medium
10 µg unbehandelte POS (1 Tag)
- 2 0,6 ml Medium
10 µg unbehandelte POS (2 Tage)
- 3 0,6 ml Medium
10 µg unbehandelte POS (3 Tage)
- 4 0,6 ml Medium
10 µg unbehandelte POS (4 Tage)
- 5 0,6 ml Medium

- | | | |
|----------------|---|---------------------------------|
| | | 10 µg unbehandelte POS (5 Tage) |
| | 6 | 0,6 ml Medium |
| | | 10 µg unbehandelte POS (6 Tage) |
| | 7 | 0,6 ml Medium |
| | | 10 µg unbehandelte POS (7 Tage) |
| • Messreihe C: | 1 | 0,6 ml Medium |
| | | 10 µg HNE-POS (1 Tag) |
| | 2 | 0,6 ml Medium |
| | | 10 µg HNE-POS (2 Tage) |
| | 3 | 0,6 ml Medium |
| | | 10 µg HNE-POS (3 Tage) |
| | 4 | 0,6 ml Medium |
| | | 10 µg HNE-POS (4 Tage) |
| | 5 | 0,6 ml Medium |
| | | 10 µg HNE-POS (5 Tage) |
| | 6 | 0,6 ml Medium |
| | | 10 µg HNE-POS (6 Tage) |
| | 7 | 0,6 ml Medium |
| | | 10 µg HNE-POS (7 Tage) |

3. Einfluss lysosomaler Dysfunktionen und Autophagiehemmung auf die Autofluoreszenz-entstehung

Zur direkten Autophagiehemmung wurde 3-Methyladenin (3-MA), zur Auslösung lysosomaler Dysfunktionen Ammoniumchlorid eingesetzt.

Herstellung von Ammoniumchlorid

Nach Bergmann et al. (2004) kann Ammoniumchlorid in einer Konzentration von 20 mM die Lysosomen hemmen. Für unsere Versuche wurden 535 mg Ammoniumchlorid in 5 ml D-PBS gelöst und anschließend sterilfiltriert. Die gewonnene Lösung wurde dann 1:100 in Medium verdünnt.

Herstellung von 3-Methyladenin

Nach Bergmann et al. (2004) kann 3-MA in einer Konzentration von 10 mM die Autophagie hemmen, indem es die Ausbildung von Autophagie-Vakuolen im Zytoplasma blockiert. Die Lysosomen bleiben unbeeinflusst. Hierfür wurden 100 µl 3-MA mit 10 ml Medium verdünnt (1:100) und im Anschluss sterilfiltriert.

Versuchsaufbau:

Der Versuchsaufbau gleicht den obigen beiden. Verwendet wurde eine 24well-Platte mit ARPE-Zellen ca. 5-7 Tage nach Umsetzung.

- Messreihe A: 0,6 ml Medium
- Messreihe B: 0,6 ml Medium +
10 µg unbehandelte POS
- Messreihe C: 0,6 ml Medium +
10 µg HNE-modifizierte POS
- Messreihe D: 0,6 ml Medium +
10 µg unbehandelter POS +
6 µl Ammoniumchlorid
- Messreihe D: 0,6 ml Medium +
6 µl Ammoniumchlorid
- Messreihe E: 0,6 ml Medium +
6 µl 3-Methyladenin

Im Anschluss an die 7 Tage erfolgte jeweils bei den o. g. Versuchen die Autofluoreszenzmessung im FACS-Canto. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die wells jeweils mit 1,5 ml PBS gespült. Zum Lösen der Zellen vom Boden wurden den wells jeweils 0,2 ml Trypsin hinzugegeben und im Brutschrank inkubiert. Nach Beendigung der Trypsinierung durch Zugabe von Medium wurden die Zellen in Eppendorfgefäße umgefüllt, dann kurz bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Messung im FACS-Canto wurden die Zellen in 500 µl D-PBS resuspendiert.

2.5 Spektralanalysen

Die RPE-Zellen wurden für einen Zeitraum von 7 Tagen täglich entweder mit unbehandelten POS, MDA-modifizierten POS oder mit HNE-modifizierten POS (Konzentration: 4 µg POS-Gesamtprotein pro cm² Zellkulturfläche) behandelt bzw. nur das Medium gewechselt. Jede Messreihe bestand aus 3 wells. Verwendet wurde eine 6well-Platte mit konfluenten ARPE-Zellen ca. 5-7 Tage nach Umsetzung.

Versuchsaufbau:

- Messreihe A: 2,5 ml Medium
- Messreihe B: 2,5 ml Medium +
40 µg unbehandelte POS
- Messreihe C: 2,5 ml Medium +
40 µg MDA-modifizierte POS
- Messreihe D: 2,5 ml Medium +
40 µg HNE-modifizierte POS

Nach 14 Tagen wurde das Medium abgesaugt, jedes well mit 5 ml D-PBS gespült. Zum Lösen der Zellen vom Boden wurden in jedes well 1 ml Trypsin hinzugegeben und für 5-10 min inkubiert. Nach Stoppung der Trypsinierung mit jeweils 2 ml Medium wurden die Zellsuspensionen jeweils in 14 ml Röhrchen umgefüllt bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Überstände jeweils in 200 ml PBS resuspendiert und zur Messung in die wells der nicht-transparenten 96well-Platte umgefüllt.

2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die RPE-Zellen wurden für einen Zeitraum von 7 Tagen täglich entweder mit unbehandelten POS, MDA-modifizierten POS oder mit HNE-modifizierten POS (Konzentration: 4 µg POS-Gesamtprotein pro cm² Zellkulturfläche) behandelt bzw. nur das Medium gewechselt. Verwendet wurden 8 well-Objektträger mit konfluenten ARPE-Zellen ca. 5-7 Tage nach Umsetzung.

Versuchsaufbau:

- Messreihe A: 0,3 ml Medium

- Messreihe B: 0,3 ml Medium +
4 µg unbehandelte POS
- Messreihe C: 0,3 ml Medium +
4 µg MDA-modifizierte POS

Nach 7 Tagen wurden die Kerne mit DAPI eingefärbt, die Zellen mit Moda eingedeckt und anschließend die intrazelluläre Autofluoreszenz fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert.

Reagenzien:

- Mowiol 4-88 (Sigma)
- DABCO (Sigma)
- Glycerol (100 %)
- TrisHCL (0,2 M; pH 8,5)
- Aqua dest.
- DAPI 10 mg (AppliChem)
- Stammlösung: 1 mg/ml (mit Wasser angesetzt und bei -80°C gelagert)
- Arbeitslösung: 1 µg/ml (Stammlösung 1:1000 mit Methanol verdünnt)
- 4 % Paraformaldehyd (PFA)

Herstellung von MODA

Zur Herstellung von MODA wurde 2,4 g Mowiol in 4,8 ml Glycerol (100 %) gelöst. Die Lösung wurde nach Zugabe von 6 ml Aqua dest. mehrere Stunden gerührt. Dann wurde 12 ml 0,2 M TrisHCl (pH 8,5) hinzugefügt und bei 50°C bis zur Lösung inkubiert. Abschließend wurde 0,45 g DABCO hinzugegeben.

Färbemethode

Die Zellen wurden 15 min mit 4 % PFA fixiert und danach mit D-PBS gewaschen. Nach Inkubation des Objektträgers mit DAPI/Methanol (1µg/ml) bei 37°C für 15 min wurde dieser mit Methanol gewaschen und daraufhin die RPE-Zellen mit MODA eingedeckt.

Ergebnisse

1. Fluoreszenzmikroskopie zellulärer Lipofuszinogenese

Im ersten Versuch wurden die RPE-Zellen täglich über einen Zeitraum von 7 Tagen entweder mit MDA-modifizierten, HNE-modifizierten oder unbehandelten POS inkubiert. Als Kontrolle dienten RPE-Zellen, die ohne POS kultiviert wurden. Die Messungen wurden in jeweils drei unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt. Am 8. Tag wurden die RPE-Zellen nach DAPI-Kernfärbung unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Lipofuszin-ähnliche Autofluoreszenz untersucht.

Die Ergebnisse zeigen eine intrazelluläre Akkumulation von gelb fluoreszierenden Strukturen nach Anregung mit blauem Licht (488 nm). Diese Autofluoreszenz ist bei den mit modifizierten POS behandelten Zellen deutlich stärker ausgeprägt als bei den mit unbehandelten POS inkubierten Zellen. Die höhere Vergrößerung verdeutlicht den granulären Aufbau des akkumulierten Materials.

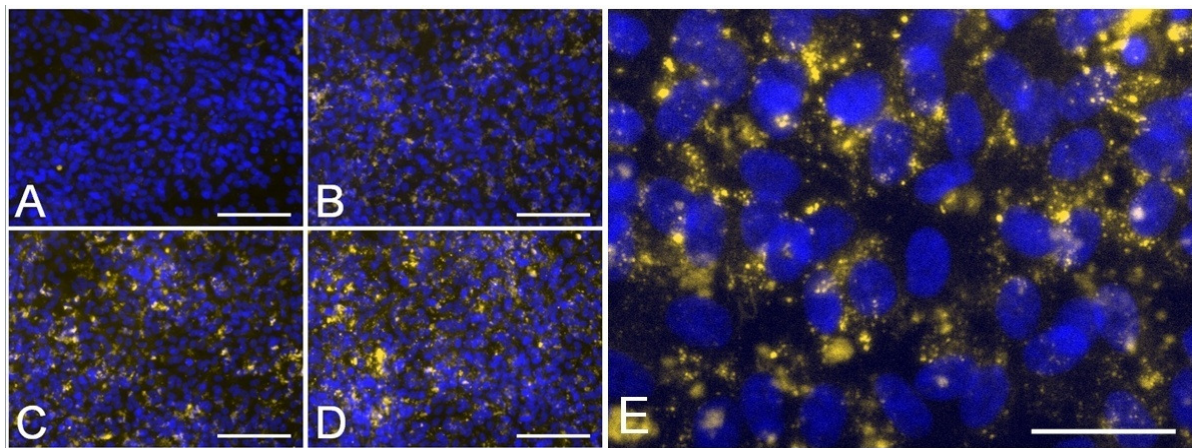


Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der RPE-Zellen nach einwöchiger Inkubation (A) in Medium ohne POS (Kontrolle), (B) mit unbehandelten POS, (C) mit MDA-modifizierten POS, und (D) mit HNE-modifizierten POS. Die zelluläre Autofluoreszenz wurde bei 200facher Vergrößerung mittels GFP-Filterset (Exzitation 450-490 nm, Detektion >505 nm) dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. (E) Mit HNE-modifizierten POS inkubierte Zellen wurden zusätzlich bei 400facher Vergrößerung dargestellt. (Maßstab A-D: 100 µm; E: 20 µm)

2. Quantifizierung der zellulären Autofluoreszenz

Nachdem mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden konnte, dass die RPE-Zellen nach Phagozytose oxidativ behandelter POS verstärkt Lipofuszin bilden, sollten die anschließenden Versuche die Lipofuszinogenese anhand der zellulären Autofluoreszenz quantifizieren. Die Behandlung der Zellen war dieselbe wie im vorausgegangenen Versuch. Am 8. Tag wurden die Autofluoreszenzintensitäten der Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS-Canto) im FITC-Kanal (Exzitation 488 nm; Detektion 525 nm) gemessen.

Nachweis gesteigerter Lipofuszinogenese mittels FACS-Analyse

Die mittels FACS-Analyse erhobenen Autofluoreszenzintensitäten verdeutlichen, dass die Phagozytose oxidativ geschädigter POS im Vergleich zu den unbehandelten POS eine bedeutend stärkere Lipofuszinogenese auslösen konnte (Abb. 8).

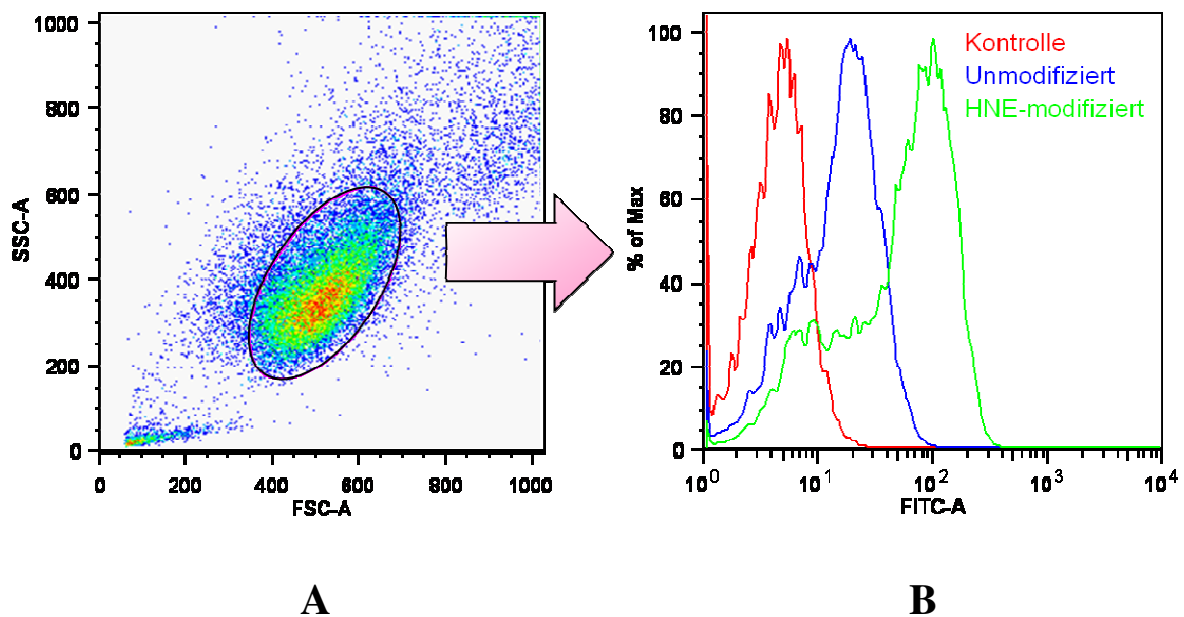


Abb. 8: (A) Dot-Plot: Selektion der Zellen gemäß der Streulichteigenschaften; (B) Autofluoreszenzintensitäten detektiert im FITC-Kanal. (Kontrolle: Unbehandelte Zellen; Unmodifiziert: Mit unmodifizierten POS inkubierte Zellen; HNE-modifiziert: Mit HNE-modifizierten POS inkubierte Zellen)

Erhöhte Granularität der autofluoreszierenden Zellen

Da Lipofuszin sich intrazellulär in granulärer Form ansammelt, sollten nachfolgend die Auswirkungen der Lipidperoxidationsprodukte auf die Granularität des Zytoplasmas der RPE-

Zellen im FACS analysiert werden. Vergleicht man die Ergebnisse in der Darstellung als Dot-Plot (Abb. 9), so fällt auf, dass die Seitwärtsstreulichtwerte, die als Maß der zellulären Granularität dienen, deutlich höher ausfielen, wenn die RPE-Zellen oxidativ veränderten POS ausgesetzt waren. Dem zur Folge kann aufgrund sowohl der FACS-Analyse als auch der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung angenommen werden, dass eine Inkubation mit oxidativ behandelten POS die Bildung intrazellulärer autofluoreszenter Strukturen mit granulärem Aufbau nach sich zieht, wie sie im Rahmen einer Lipofuszinakkumulation zu erwarten sind.

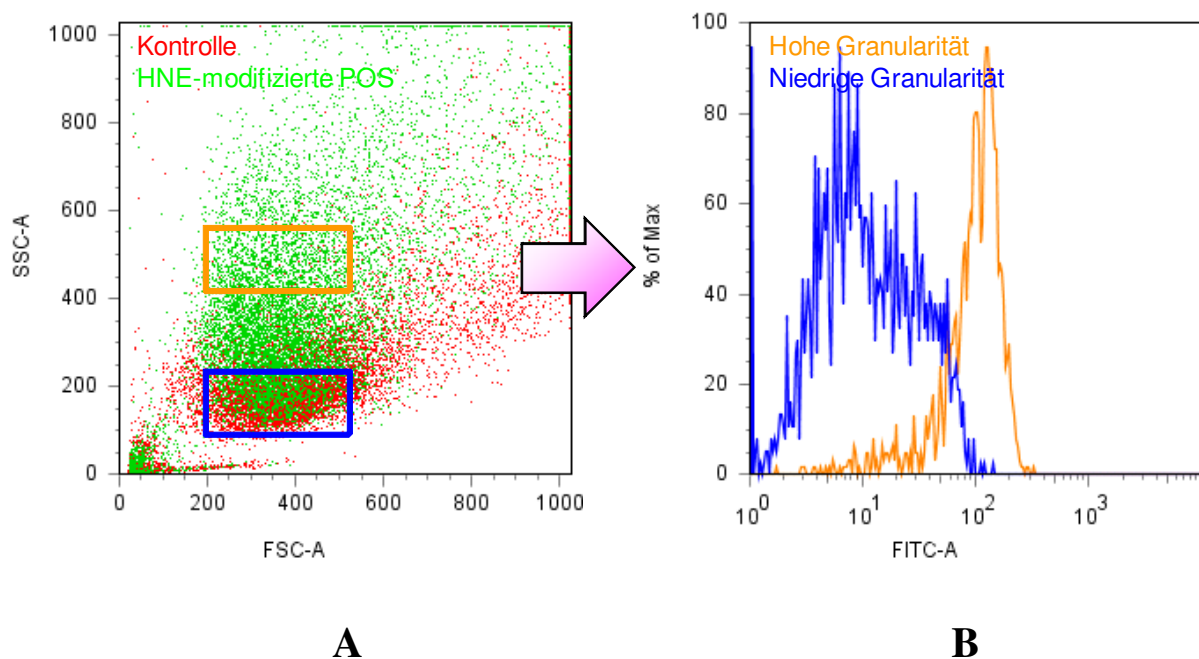


Abb. 9: Streulichteigenschaften der Zellen in der FACS-Analyse. (A) Die Vorwärtsstreuung (forward scatter, FSC) ist ein Maß für die Größe, die Seitwärtsstreuung (sideward scatter, SSC) für die Granularität der Zellen. Behandlung der Zellen mit modifizierten POS führt zu einem deutlichen Anstieg der Granularität. (B) Die erhöhte Granularität der Zellen korreliert mit einer gesteigerten zellulären Autofluoreszenz als Hinweis auf eine verstärkte Einlagerung von Lipofuszingranula in diesen Zellen.

Zusammenfassend zeigen die aus diesen Versuchen gewonnenen Daten, dass die Phagozytose MDA- bzw. HNE-modifizierter POS die intrazelluläre Bildung autofluoreszenter Granula induziert, die dem Lipofuszin vergleichbare Autofluoreszenzeigenschaften aufweisen.

Zeitverlauf der Lipofuszinogenese

In einem weiteren Versuch sollte der Zeitverlauf der Lipofuszinogenese über einen Beobachtungszeitraum von einer Woche untersucht werden. Hierzu wurden die RPE-Zellen erneut

täglich mit HNE-modifizierten oder nativen POS behandelt. Die intrazelluläre Autofluoreszenz aller drei Versuchsgruppen nahm im Zeitverlauf zu. In allen untersuchten Gruppen stiegen dabei die Autofluoreszenzwerte bis Tag 5 an, während danach kein nennenswerter weiterer Anstieg stattfand. Übereinstimmend mit den Vorversuchen war jedoch der Anstieg bei Inkubation mit modifizierten POS deutlich ausgeprägter als der nach Behandlung mit unbehandelten POS (Abb. 10). Dieser Versuch verdeutlicht den progressiven Charakter der Lipofuszinakkumulation in den RPE-Zellen und identifiziert den 5.-7. Tag nach Beginn der POS-Inkubation als optimalen Zeitpunkt für die Quantifizierung der Autofluoreszenz.

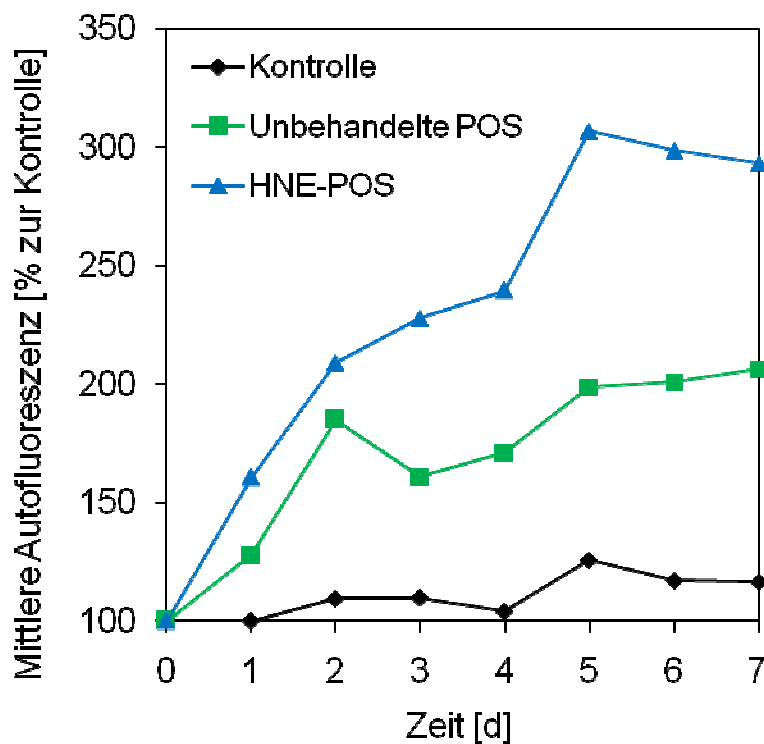


Abb. 10: Zelluläre Autofluoreszenzentstehung von RPE-Zellen quantifiziert im FACS nach einwöchiger täglicher Inkubation mit HNE-modifizierten bzw. nativen POS.

Lipofuszinogenese durch Hemmung des lysosomalen POS-Abbaus

Nachdem wir nachgewiesen haben, dass die durch modifizierte POS induzierte Lipofuszinogenese mittels FACS messbar ist und wir den optimalen Zeitpunkt für die Messung identifizieren konnten, sollte nun die Autofluoreszenz in unterschiedlich behandelten Zellen verglichen werden. In diesen Experimenten bildeten RPE-Zellen, die unbehandelte POS phagozytierten, nur in geringem Maße autofluoreszentes Material. So lag deren Autofluoreszenzintensität nach 7 Tagen 2,4-fach so hoch wie die in unbehandelten Kontrollzellen gemessene Inten-

sität. Im Vergleich dazu entwickelten die mit MDA-modifizierten POS behandelten Zellen innerhalb desselben Zeitraumes eine 5,4-fach erhöhte Autofluoreszenz verglichen mit den Kontrollzellen (Abb. 11). Nach Inkubation mit HNE-modifizierten POS stieg die Autofluoreszenz sogar um das 8,2-fache an (Abb. 11).

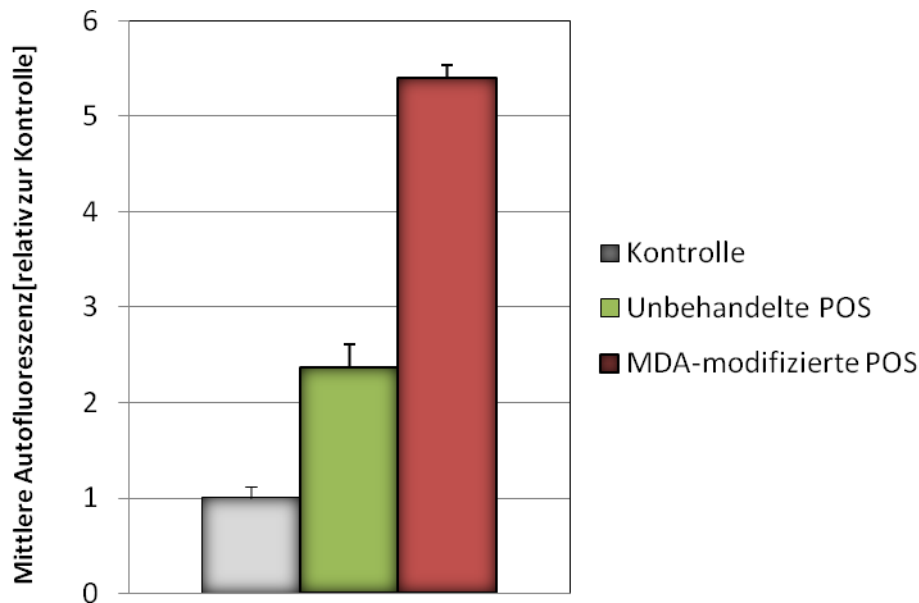


Abb. 11: Zelluläre Autofluoreszenz von RPE- Zellen wurde im FACS- Canto nach 1-wöchiger Inkubation mit unbehandelten bzw. MDA-modifizierten POS quantifiziert. Gemessen wurde die Autofluoreszenz im FITC-Kanal (Exzitation 488 nm, Detektion 525 nm). Der Versuch wurde in Triplets durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Es bestehen Vermutungen, dass Lipidperoxidationsprodukte eine Lipofuszinogenese induzieren könnten, indem sie lysosomale Funktionen hemmen. Unter diesen Gesichtspunkten sollte eine lysosomale Dysfunktion durch die Gabe von Ammoniumchlorid induziert und anschließend die Bildung autofluoreszenten Materials nach POS-Phagozytose untersucht werden. Interessanterweise führte die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit unmodifizierten POS und einem Blocker der lysosomalen Funktion (Ammoniumchlorid) zu einer ähnlich starken, 8,0-fachen Autofluoreszenzsteigerung (Abb. 12). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die gesteigerte Lipofuszinogenese durch HNE- und MDA-modifizierte POS durch die Hemmung der lysosomalen Abbaufunktion verursacht werden könnte.

Lipofuszinogenese durch Hemmung der Autophagie

Da infolge lysosomaler Funktionsstörungen auch autophagisches Material nicht abgebaut wird, bestehen Anhaltspunkte, dass oxidativer Stress auch durch Beeinflussung autophagischer Wege eine Lipofuszinogenese zusätzlich verstärken könnte. Deshalb erfolgte in einem weiteren Versuchsansatz eine Inkubation der RPE-Zellen ohne POS aber mit Ammoniumchlorid (AC), das unspezifisch alle lysosomalen Enzyme hemmt, oder 3-Methyladenin (3-MA), welches eine Autophagieblockade induziert, indem es die Phosphatidylinositol-3-Kinasen hemmt. Dabei zeigte sich nach 7-tägiger Behandlung mit AC ein 2,7-facher Anstieg und nach Behandlung mit 3-MA ein 2,0-facher Anstieg der Autofluoreszenz im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 12). Da diese Zellen keine POS erhalten hatten, muss das Lipofuszin im Rahmen des Abbaus zelleigener Bestandteile (Autophagie) entstanden sein.

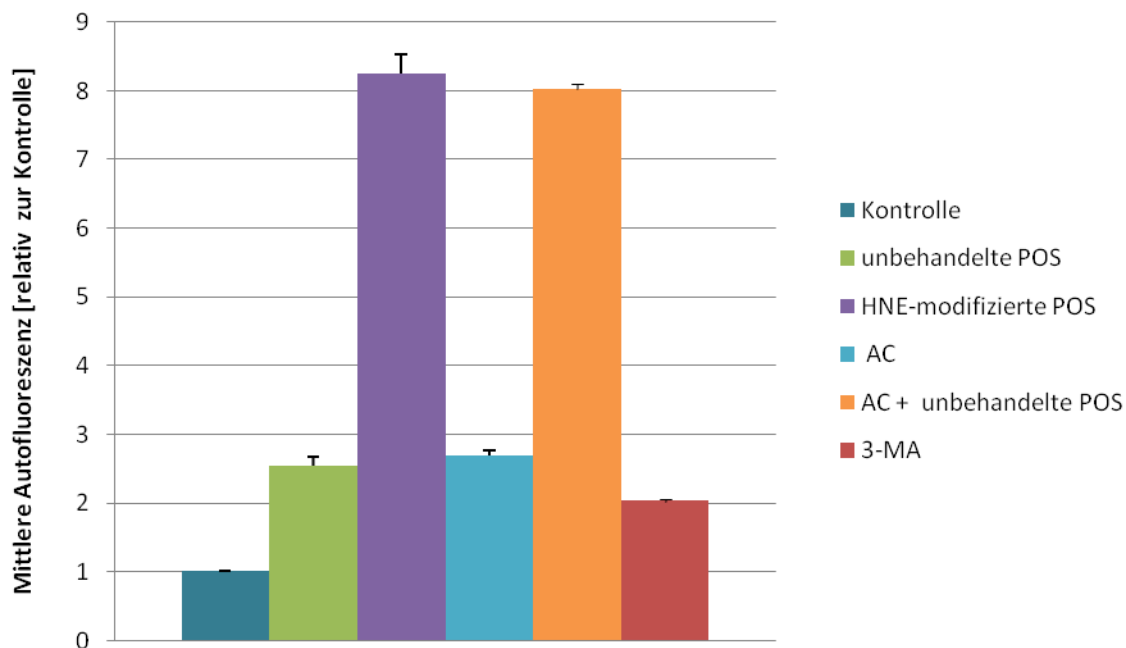


Abb. 12: Zelluläre Autofluoreszenz von RPE-Zellen wurde im FACS-Canto nach 1-wöchiger Inkubation mit HNE-modifizierten POS mit und ohne AC quantifiziert. Gemessen wurde die Autofluoreszenz im FITC-Kanal (Exzitation 488 nm, Detektion 525 nm). Der Versuch wurde in Triplets durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Zusammenfassend kann nach diesem Versuch festgestellt werden, dass oxidativ geschädigte POS eine Lipofuszinogenese in RPE-Zellen induzieren können. Dabei haben die modifizierten POS einen sehr ähnlichen Effekt wie unbehandelte POS, deren intralysosomaler Abbau mittels Ammoniumchlorid gehemmt wurde. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die durch modifizierte POS ausgelöste Lipofuszinbildung auf ihrer bekannten inhibitorischen Wirkung auf die lysosomale Funktion beruht. Schließlich zeigte sich, dass auch die alleinige Hemmung der Autophagie (ohne Zugabe von POS) mittels Ammoniumchlorid oder 3-MA zu einer Lipofuszinakkumulation führt.

3. Autofluoreszenzspektren

Nun sollten die Autofluoreszenzspektren der intrazellulär entstehenden autofluoreszenten Granula analysiert und mit denen in der Literatur für okuläres Lipofuszin beschriebenen Spektren verglichen werden. Die RPE-Zellen wurden täglich für 7 Tage mit unbehandelten POS, MDA- oder HNE-modifizierten POS inkubiert. Bei den Kontrollzellen wurde täglich das Medium ohne Zugabe von POS gewechselt. Am 8. Tag erfolgte die Messung der Autofluoreszenzspektren im Spektrophotometer.

Die Emissions- bzw. Exzitationsspektren der 4 Versuchsgruppen unterschieden sich in ihren Autofluoreszenzintensitäten. In Übereinstimmung mit den FACS-Ergebnissen wurden die höchsten Autofluoreszenzen bei den RPE-Zellen gefunden, die täglich MDA- bzw. HNE-modifizierte POS erhielten, wobei die Inkubation mit HNE-modifizierten POS die stärksten Autofluoreszenzen hervorrufen konnte. Bei einer Exzitationswellenlänge von 380 nm ergaben sich Emissionspeaks bei 440 nm und 515 nm. Bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm, wie sie bei der klinischen Fundusautofluoreszenzmessung verwendet wird, wiesen die Zellen ein Emissionsmaximum bei 540 nm auf. Die gemessenen Exzitationsspektren bei einer Emissionswellenlänge von 570 nm besaßen drei Maxima bei 270 nm, 360 nm und 445 nm.

Interessanterweise blieben im Rahmen der Steigerung der Autofluoreszenz nach Gabe von modifizierten POS die Profile der Emissions- und Exzitationsspektren der Zellen unverändert gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. Gleiches ließ sich auch nach alleiniger Hemmung der Autophagie mittels Ammoniumchlorid und 3-MA (ohne Zugabe von POS) beobachten (Daten nicht gezeigt).

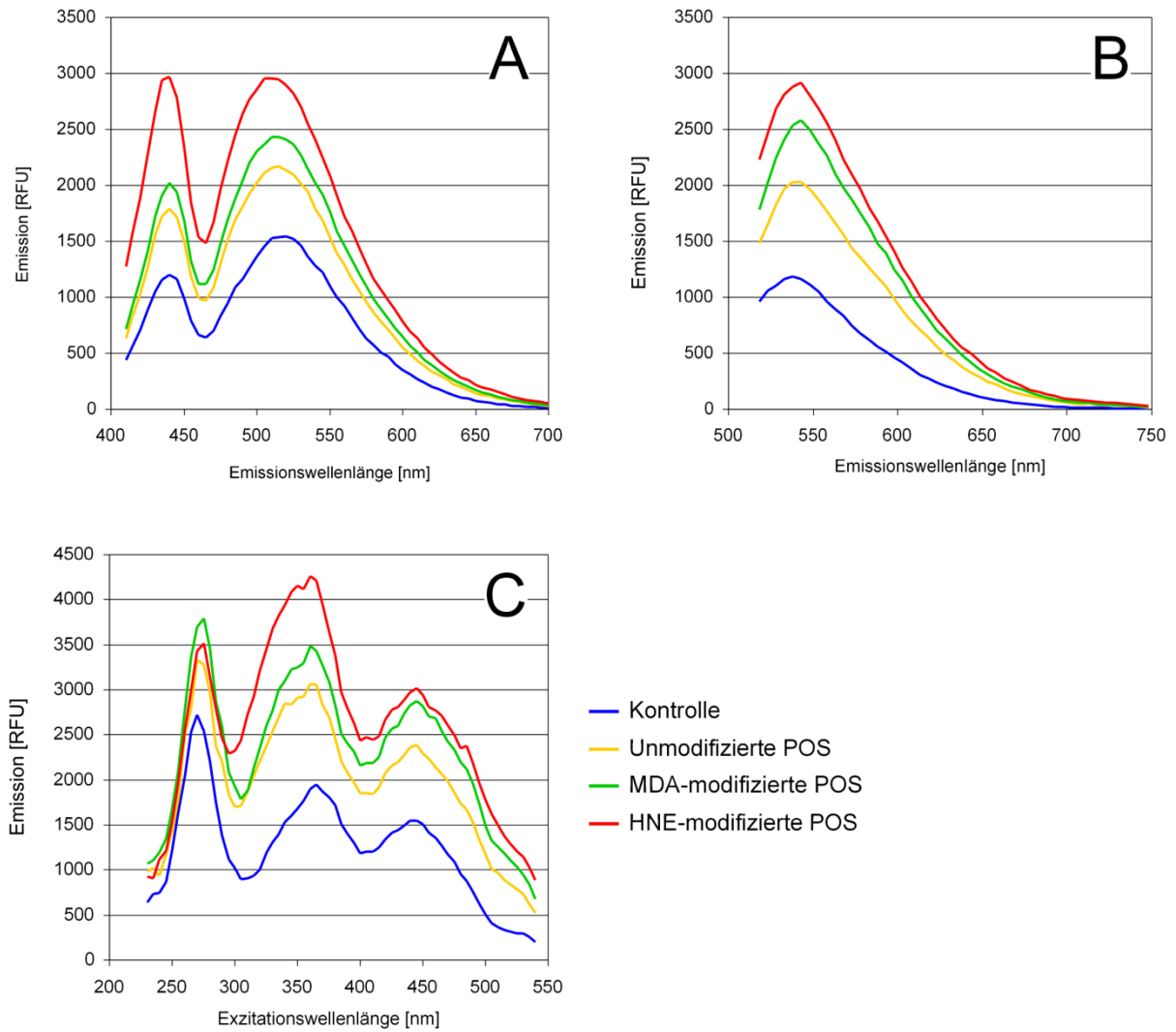


Abb. 13: Spektrale Analyse der zellulären Autofluoreszenz nach Inkubation der RPE-Zellen mit unbehandelten, MDA-modifizierten und HNE-modifizierten POS. Emissionsspektren bei UV-Exzitation (380 nm) (A) und bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm (B). Exzitationsspektren für eine Emissionswellenlänge von 570 nm (C).

Diskussion

Die AMD stellt eine progrediente Erkrankung des zentralen Netzhaut-, Pigmentepithel- und Choriokapillaris-Komplexes dar, die zu einem irreversiblen Verlust der zentralen Sehschärfe führen kann. Während letztendlich eine Schädigung auf Photorezeptorebene in der Makula den Sehverlust verursacht, weisen mehrere sowohl experimentell als auch klinische Befunde darauf hin, dass die Dysfunktion des RPEs bei der multifaktoriellen Erkrankung gerade in den Frühstadien eine wichtige Rolle spielt (Zarbin, 2004; de Jong, 2006). Aufgrund der metabolischen Interaktion zwischen RPE und POS wirken sich Funktionsstörungen des Pigmentepithels sekundär auch auf die neurosensorische Netzhaut aus.

Die RPE-Funktionsverluste im Rahmen der AMD sind mit Akkumulationen von zytotoxischen Lipofuszingranula in den Zellen assoziiert (Holz et al., 2001). Zahlreiche Autoren geben oxidativem Stress eine bedeutende Rolle in der intrazellulären Lipofuszinogenese. Dabei scheinen insbesondere die POS wegen des hohen Gehalts an mehrfach ungesättigten Fettsäuren für eine oxidative Schädigung durch Lipidperoxidation anfällig zu sein. Nachdem kürzlich von Kämmerer et al. (2007) demonstriert wurde, dass eine Modifikation der POS mit Lipidperoxidationsprodukten die POS gegen lysosomale Degradation stabilisieren kann, untersucht die vorliegende experimentelle Arbeit, ob die Phagozytose oxidativ geschädigter POS über diesen Mechanismus eine intrazelluläre Lipofuszinogenese induzieren und somit zur Pathogenese der AMD beitragen kann.

Methodische Aspekte des verwendeten Zellkulturmodells

Untersucht wurde die Lipofuszinogenese in ARPE-19 Zellen. Dabei handelt es sich um eine stabile humane RPE-Zelllinie, die u. a. von Dunn et al. (1996) weitreichend charakterisiert wurde, und die am häufigsten verwendete RPE-Zelllinie darstellt.

Die in den Versuchen verwendeten POS wurden aus Schweineaugen isoliert. Menschliche POS wären in den benötigten großen Mengen nicht verfügbar gewesen. Schweineaugen sind den menschlichen anatomisch sehr ähnlich und ihre POS werden von den Phagozytose-Rezeptoren humaner RPE-Zellen erkannt. Schon in vorausgegangenen Studien wie z. B. Kämmerer et al. (2007) und Bergmann et al. (2004) gehörten porcine POS zum Versuchsaufbau.

MDA und HNE wurden in den vorliegenden Versuchen als Lipidperoxidationsprodukte untersucht. Sie wurden ausgewählt, da sie zu den häufigsten und am ausgiebigsten untersuchten Lipidperoxidationsprodukten gehören (Esterbauer et al., 1990). Außerdem bestehen Hinweise, dass HNE und MDA im RPE in vivo eine bedeutende Rolle spielen. So gelang es Schutt et al. (2002a), HNE- und MDA-Modifikationen im Lipofuszin humaner RPE-Zellen nachzuweisen. Diese Aldehyde entstehen durch den oxidativen Abbau mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFA), insbesondere von Linolen- und Arachidonsäure. PUFA kommen in den POS-Membranen in extrem hoher Konzentration vor und machen hier etwa 50-60 mol% aller enthaltenen Fettsäuren aus (Fiesler et al., 1983). Generell sind in Gewebe oder ganzen Organen im Rahmen von oxidativem Stress HNE-/MDA-Konzentrationen von bis zu 1-5 μM gemessen worden (Esterbauer et al., 1991; Schaur, 2003). In oxidativ geschädigten Lipiddoppelschichten können dabei lokal noch sehr viel höhere Konzentrationen erreicht werden. So wies Esterbauer et al. (1991) in peroxidierten Mikrosomenmembranen HNE-Konzentrationen von 4,5 mM nach. Da Lipidmembranen zu den Bestandteilen von POS gehören, kann angenommen werden, dass auch die POS vergleichbar hohen Konzentrationen an Lipidperoxidationsprodukten ausgesetzt sind. Aus diesem Grunde kann davon ausgegangen werden, dass die in unseren Experimenten ausgewählten Konzentrationen von 5 mM HNE und 20 mM MDA der in vivo Situation vergleichbar sind.

Der Vorteil unseres Modells gegenüber vergleichbaren anderen Studien liegt darin, dass in unserem Zellkulturmodell die biochemischen Ursachen, die die beobachteten Veränderungen auslösen, genau definiert sind (HNE- und MDA-Modifikationen der POS-Proteine). Bei bisherigen Studien wie der von Whilmark et al. (1996) wurden dagegen die POS mittels unspezifischer Methoden, wie z. B. Sauerstoffbehandlung und UV-Bestrahlung, oxidativem Stress ausgesetzt, so dass die ursächlichen chemischen Abläufe unbekannt blieben.

POS-Phagozytose und Lipofuszinogenese

Die genaue chemische Zusammensetzung des Lipofuszin bleibt bisher noch im Unklaren. Feeney-Burns et al. (1980) beschreiben Lipofuszin als ein granuläres, intrazellulär gelegenes Pigment. Die Granula haben eine einheitliche Größe von etwa 1-1,2 μm . Bei Exzitation mit blauem Licht (oder UV-Bestrahlung) zeigen die autofluoreszenten Granula eine goldgelbe Autofluoreszenz mit einem breiten Emissionsmaximum zwischen 570 nm und 605 nm (Delori et al., 1995). Basierend auf den o. g. Referenzen kann festgehalten werden, dass die im Rahmen unserer Studie gemessenen spektralen Charakteristika und die mikroskopisch beobachteten morphologischen Eigenschaften des intrazellulären autofluoreszenten Materials denen von

Lipofuszin vergleichbar sind. Die mikroskopischen Untersuchungen sowie ergänzend auch die Resultate der Durchflusszytometrie belegen die Entstehung granulärer Strukturen mit goldgelber Autofluoreszenz in den RPE-Zellen. Das in unserer Studie in RPE-Zellen nachgewiesene Material zeichnet sich somit durch intrazelluläre Lage, granuläre Struktur und typische Autofluoreszenz aus und erfüllt damit alle Voraussetzungen für die Definition als Lipofuszin.

Die Lipofuszinentstehung in unseren Versuchen war ausgeprägter bei den Zellkulturen, die mit modifizierten POS inkubiert worden waren, als bei mit unbehandelten POS inkubierten Kontrollzellen. Schon vorausgegangene Untersuchungen ließen die Vermutung zu, dass POS gegenüber oxidativen Schäden prädisponiert sind und dass dieser Mechanismus an der Lipofuszin-Entstehung in RPE-Zellen beteiligt ist. So fanden Wiegand et al. (1983) bei Tierversuchen mit Albino-Ratten heraus, dass eine retinale Lichtbestrahlung eine Degeneration der POS herbeiführt, indem die langen Ketten der mehrfach ungesättigten Fettsäuren unter Entstehung von Lipidhydroperoxiden reduziert werden. Whilmark et al. (1996) untersuchten anhand eines Phagozytosemodells mit aus Kaninchen isolierten RPE-Zellen und bovinen POS den Einfluss von oxidativem Stress auf die intrazelluläre Lipofuszinogenese. Als photooxidative Triggerfaktoren diente einmal eine vorausgegangene UV-Bestrahlung der POS. Ein anderes Mal wurden die RPE-Zellen während der POS-Behandlung unter einer 40 %-igen Sauerstoffkonzentration kultiviert. Zur Messung wurden Elektronenmikroskopie sowie Zytofluorometrie angewandt. Der Versuchszeitraum war mit unserem vergleichbar. Dabei wiesen die Zellen, die nativen POS ausgesetzt waren, eine mehr als doppelt so hohe Autofluoreszenz auf wie unbehandelte Kontrollzellen. Boulton et al. (1989) fanden schon heraus, dass humane RPE-Zellen, die länger als 3 Monate mit POS gefüttert wurden, in der Lage waren autofluoreszente lipofuszinähnliche Granula zu bilden, die schon nach 2 Wochen nachzuweisen waren. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Lipofuszin in RPE-Zellen im Laufe des Lebens als Nebenprodukt aus dem Abbau phagozytierter POS entsteht.

Lysosomale Dysfunktion als eine Ursache der Lipofuszinogenese

Weiterhin ist noch unklar, über welche biochemischen Mechanismen die oxidativ geschädigten POS die Lipofuszinogenese induzieren könnten. Jedoch bestehen einige Anhaltspunkte, dass ursächlich Störungen auf lysosomaler Ebene beteiligt sind. Die POS binden an einen Rezeptor auf der Zellmembran und werden dann durch die Ausbildung eines Phagosoms in die RPE-Zelle eingeschleust (Young und Bok, 1969; Finnemann et al., 1997). Die Phagosomen verschmelzen mit vom Golgi-Apparat gebildeten primären Lysosomen zu sekundären

Lysosomen (Bosch et al., 1993), in denen das phagozytierte Material durch Enzyme abgebaut wird. Anschließend werden die Endprodukte entweder wiederverwertet oder exozytiert.

Katz et al. (1999) wiesen in Mäusen nach intravitrealer Injektion des Lysosomenhemmers Leupeptin über den Zeitraum von 32 Stunden bis 84 Tagen eine gesteigerte Lipofuszinogenese im RPE nach. Die Proteomanalyse von Lipofuszin durch Schutt et al. (2002a) konnte nachweisen, dass zahlreiche Proteinbestandteile von Lipofuszin, isoliert aus humanen RPE-Zellen, durch Lipidperoxidationsprodukte wie HNE und MDA modifiziert sind. Kämmerer et al. (2007) untersuchten eine mögliche Beteiligung dieser Lipidperoxidationsprodukte am molekularen Mechanismus der Lipofuszinbildung. Eine Beeinflussung der POS-Phagozytoseprozesse durch MDA- bzw. HNE-Modifikationen findet nach diesen Ergebnissen zumindest über den kurzen Zeitrahmen des Kulturmodells nicht statt. Die Lipidperoxidationsprodukte scheinen jedoch die Abbauprozesse in den sekundären Lysosomen zu beeinflussen, so dass die POS intralysosomal akkumulieren. In diesem Zusammenhang untersuchten Kämmerer et al. den Abbau MDA- bzw. HNE-modifizierter POS in RPE-Zellen (Abb. 14). Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde in wöchentlichen Abständen der Abbau radioaktiv markierter modifizierter und un behandelter POS ausgewertet. Innerhalb einer Woche wurden die nativen POS fast komplett abgebaut. Hingegen verlief die lysosomale Degradation der modifizierten POS deutlich verzögert, so dass sie sich intrazellulär ansammelten.

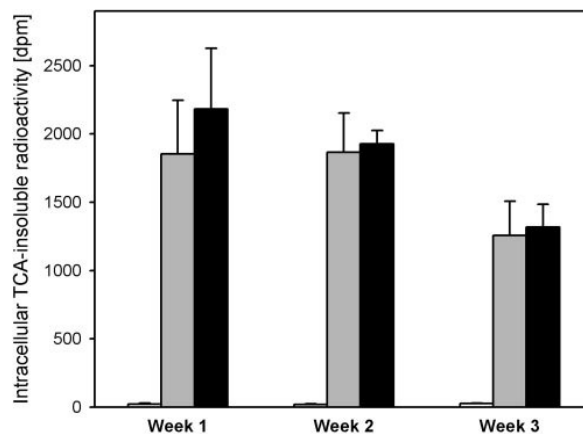


Abb. 14: Intrazelluläre Speicherung MDA- bzw. HNE-modifizierter POS-Proteine in kultivierten RPE-Zellen (Quelle: Kämmerer et al., 2007)

Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass die Lipidperoxidationsprodukte lysosomale Dysfunktionen verursachen, indem sie die proteolytische Aktivität der Enzyme hemmen (Kopitz et al., 2004). Zuvor gelang es bereits O'Neil et al (1997) eine Inaktivierung des lysosomalen Enzyms Cathepsin B durch HNE-modifizierte LDL (low density lipoprotein) nachzuweisen. Krohne et al.

(2005) untersuchten mögliche Mechanismen zur Herabsetzung der Enzymaktivität (Abb. 15). Die MDA- bzw. HNE-Modifikation bewirkt zum einen eine Stabilisierung der Substrate gegen die lysosomale Proteolyse, zum anderen lösen die modifizierten POS-Proteine auf kompetitivem Wege eine lysosomale Enzymhemmung aus. Schließlich können HNE und MDA durch kovalente Bindung ans aktive Zentrum die Enzyme auch direkt hemmen.

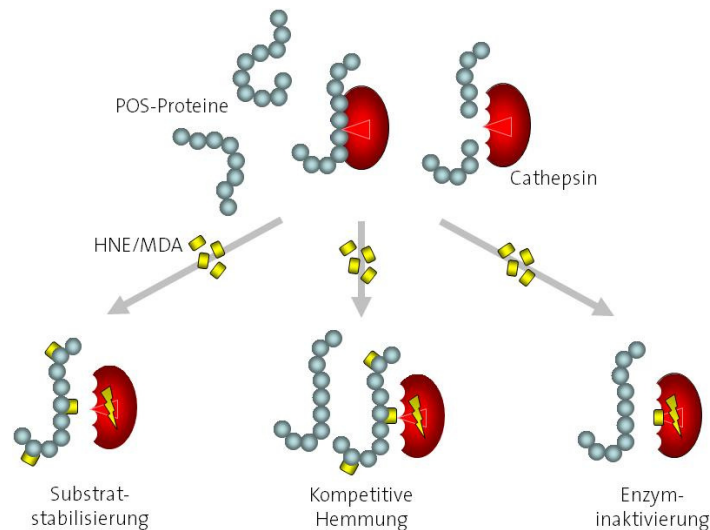


Abb. 15: Übersicht zu den Mechanismen der Hemmung lysosomaler Enzyme durch Lipidperoxidationsprodukte (Quelle: Krohne et al., 2005)

Unser Zellkulturmodell untersuchte die intrazelluläre Lipofuszinogenese von RPE-Zellen, zum einen nach Phagozytose oxidativ geschädigter POS und zum anderen bei Induktion lysosomaler Dysfunktion und gleichzeitiger Inkubation mit nativen POS. Zur Hemmung der Lysosomen wurden die Zellen mit Ammoniumchlorid (NH_4Cl) inkubiert. Ammoniumchlorid ist ein spezifischer Inhibitor intralysosomaler Abbauprozesse, da es in den Lysosomen akkumuliert und dort den intralysosomalen pH-Wert erhöht. Da das Aktivitätsmaximum der Hydrolasen in einem sauren pH-Bereich liegt, wird durch Hebung des pH ihre katalytische Aktivität herabgesetzt. Bei unseren Versuchen stellte sich heraus, dass eine lysosomale Funktionsstörung induziert durch sowohl HNE/MDA-behandelte POS als auch durch Ammoniumchlorid eine Lipofuszinogenese begünstigt. Dabei resultierte aus der gleichzeitigen Behandlung mit Ammoniumchlorid und unbehandelten POS eine ähnlich hohe Lipofuszinausbeute wie nach Inkubation mit HNE-modifizierten POS. Aus diesem Grunde kann angenommen werden, dass modifizierte POS über dem Weg einer lysosomalen Hemmung eine Lipofuszinogenese herbeirufen können.

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass HNE/MDA-Modifikationen eine lysosomale Hemmung induzieren, indem sie die Enzymaktivität herabsetzen. Dem zu Folge können die phagozytierten Membranscheibchen nur unvollständig abgebaut werden, so dass sie intra-lysosomal akkumulieren und so zur Lipofuszinbildung beitragen.

Lipofuszinogenese durch gestörte Autophagie

Burk et al. (1998) untersuchten über einen Gesamtzeitraum von 2 Jahren in kultivierten RPE-Zellkulturen - ohne zusätzliche Inkubation mit POS - die Bildung autofluoreszenten Materials durch Autophagie mittels Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie. Dabei stellte sich eine progrediente Akkumulation autofluoreszenten Materials heraus, welches bei Exzitation mit blauem Licht gelb fluoreszierte. Auch unseren fluorozytometrischen Ergebnissen zufolge löst eine POS-freie Inkubation der RPE-Zellen sowohl mit Ammoniumchlorid (spezifische Hemmung der lysosomalen Funktion) als auch mit 3-Methyladenin (spezifische Hemmung der Autophagie) eine Lipofuszinogenese aus. Das Material zur Lipofuszinbildung scheint dabei aus der Autophagie zelleigener Bestandteile zu entstammen. Somit könnte es sein, dass eine Hemmung autophagischer Prozesse auch *in vivo* zur Entstehung autofluoreszenter Lipofuszingranula beiträgt. Es stellt sich nun die Frage, inwiefern autophagische Funktionsstörungen zur Lipofuszinbildung bei der AMD beitragen.

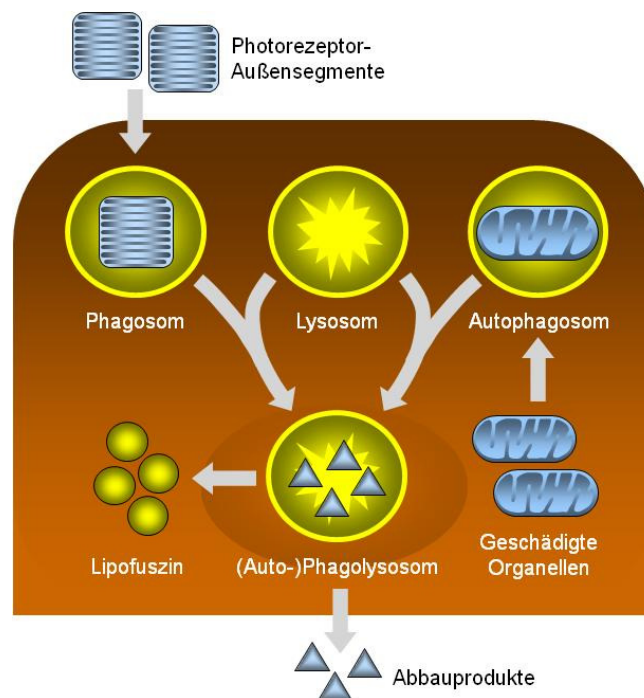


Abb. 16: Wichtige Funktionen des lysosomalen Abbaus in RPE-Zellen: POS-Degradation und Autophagie (Quelle: Krohne et al., 2008)

Zu den essentiellen Funktionen von Lysosomen gehören neben der Degradation von phagozytierten Materials auch die von zelleigenen Bestandteilen, um die ständige Erneuerung verschiedener Biomoleküle und Zellorganellen zur gewährleisten (Brunk und Termann, 2002b; Cuervo und Dice, 2000). Es ist davon auszugehen, dass im Rahmen von Oxidationsprozessen auch Zytosolproteine strukturell so verändert werden, dass ihre lysosomale Degradation erschwert wird, sie folglich akkumulieren und zur Lipofuszinogenese beitragen. Diese Hypothese wird unterstützt durch Ergebnisse der Proteomanalyse des Lipofuszins von Schutt et al. (2002a), in der auch MDA- bzw. HNE-modifizierte mitochondriale Proteine nachgewiesen wurden, die nicht Bestandteil der POS sind. Darüber hinaus kann die durch oxidativ veränderte POS induzierte lysosomale Dysfunktion zu einer verminderten Autophagieaktivität und somit zur Akkumulation zelleigener Bestandteile beitragen. In einer Studie von Krohne et al. (2008) wurde untersucht, ob eine durch MDA- bzw. HNE-modifizierte POS gestörte lysosomale Funktion der RPE-Zellen zu einer Störung der Autophagie führen kann. In einem Zellkulturmodell wurden die RPE-Zellen über einen Zeitraum von einer Woche mit MDA- bzw. HNE-modifizierten POS inkubiert und gleichzeitig der Abbau zelleigener Proteine durch Autophagie gemessen (Abb. 17).

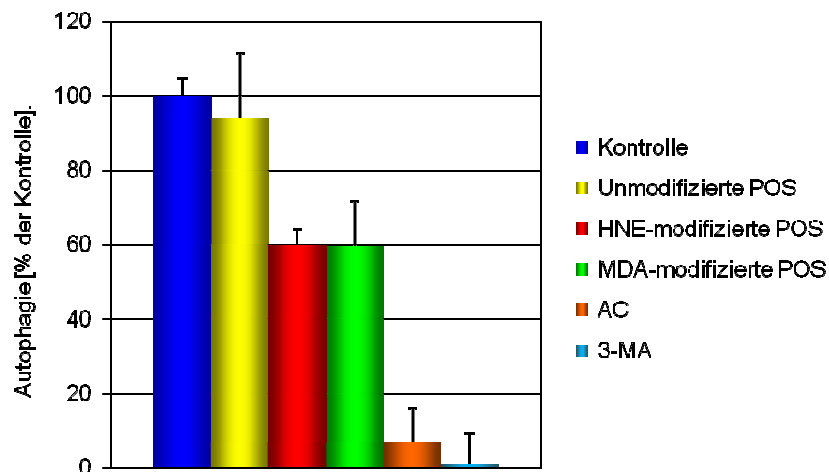


Abb. 17: Abbau endogener zellulärer Proteine während Induktion lysosomaler Dysfunktionen durch Phagozytose oxidativ modifizierter POS (Quelle: Krohne et al., 2008)

Nach Phagozytose modifizierter POS konnte in den RPE-Zellen eine um etwa 40 % reduzierte Autophagierate festgestellt werden. Demnach kann angenommen werden, dass durch oxidativen Stress induzierte lysosomale Funktionsstörungen den Abbau sowohl der POS als auch zelleigener Komponenten stören und somit eine Lipofuszinogenese induzieren können. Insbesondere in postmitotischen Zellen wie dem RPE ist die Autophagie ein wichtiger Mechanis-

mus der Zellreinigung, da diese Zellen keine Möglichkeit haben, intrazellulär akkumulierende Schadstoffe durch Zellteilung zu „verdünnen“. Störungen der Autophagie haben somit besonders in postmitotischen Zellen schwerwiegende Auswirkungen auf die Zellhomöostase. In RPE-Zellen reichen bereits unter gesunden Bedingungen die lysosomalen Kapazitäten nicht aus, um eine langsame progressive Akkumulation von posttranslational modifizierten Proteinen und defekten Organellen in Form von Lipofuszin zu verhindern (Brunk und Terman, 2002a). Selbst bei einer geringen Verminderung der lysosomalen Kapazität z.B. durch Lipidperoxydationsprodukte ist somit mit einer weiteren Steigerung der Lipofuszinogenese zu rechnen.

Neben Lipidperoxydationsprodukten wurde auch für N-Retinylden-N-Ethanolamin (A₂E), das Hauptfluorophor des okulären Lipofuszins, eine hemmende Wirkung auf die lysosomale Funktion der RPE-Zellen und eine Störung der Autophagie nachgewiesen (Bergmann et al., 2004). A₂E blockiert die ATP-gesteuerte Protonenpumpe der Lysosomen, so dass intralysosomal der pH ansteigt und die Hydrolasen inaktiviert werden. Somit könnte auch eine A₂E-vermittelte Autophagiehemmung zur RPE-Zellschädigung im Rahmen der AMD beitragen.

Insgesamt ist davon auszugehen, dass oxidativ modifizierte POS durch die Störung der lysosomalen Funktion auch autophagische Prozesse blockieren und auf diesem Wege eine zusätzliche Lipofuszinestehung aus zelleigenen Material induzieren können.

Spektrale Charakterisierung des Lipofuszins

Sowohl im Spektrophotometer als auch in der Durchflusszytometrie konnten wir einen Anstieg der Autofluoreszenz bei POS-behandelten Zellen nachweisen. Die gemessenen Spektren bei Exzitation mit 380 nm sowie bei Emission von 570 nm ähneln in Ihren Maxima den spektralen Eigenschaften des Lipofuszins in mit POS inkubierten RPE-Zellen, die 1998 von Wasell et al. beschrieben wurden.

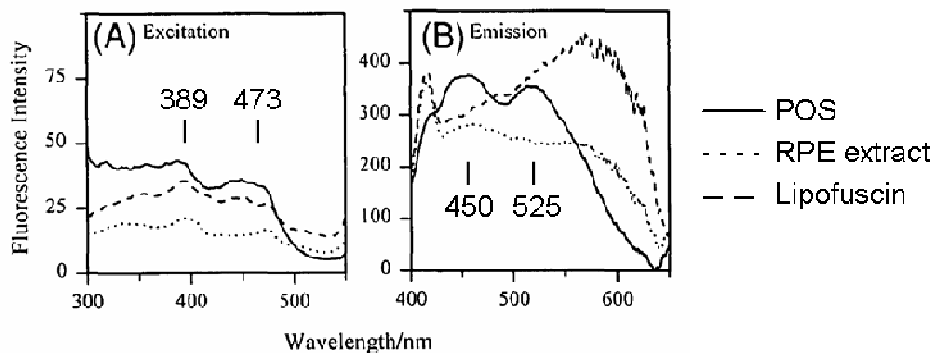


Abb. 18: Vergleich der spektralen Eigenschaften von autofluoreszenten Granula aus humanen RPE-Zellen bei Exzitation mit 380 nm (A) und bei Emission mit 570 nm (B);(—) nach 56-tägiger Inkubation mit POS; (...) humanem RPE-Extrakt von fünf 60-69 Jahre alten Spendern,(---) und Lipofuszin von humanen Spendern (Quelle: modifiziert nach Wassell et al., 1998)

Wassell et al. (1998) verglichen die spektralen Eigenschaften von okulärem Lipofuszin mit dem von humanen RPE-Zellen nach 56-tägiger Inkubation mit POS. Die gemessenen Exzitationsmaxima bei Emission mit 570 nm sind mit denen des Lipofuszins vergleichbar. Die Ergebnisse der Exzitation zeigen dagegen eine wesentliche Abweichung. Während sowohl unsere RPE-Zellen als auch die von Wassell et al. (1998) überwiegend zwischen 440 und 525 nm emittieren, weist Lipofuszin einen breiten Emissionspeak im Wellenlängenbereich von 560 bis 625 nm auf. Die spektralen Abweichungen zum okulären Lipofuszin basieren wahrscheinlich auf den Unterschieden der in vivo und in vitro Bedingungen. Im Wesentlichen sind zwei Punkte zu berücksichtigen:

1. Da das retinale Lipofuszin Derivate von Retinoiden und Carotenoiden enthält, vermutet man eine wichtige Rolle von Vitamin A in der Lipofuszinogenese (Katz et al., 1995; Wassell et al., 1997). Dabei wirken sich die Retinoide insbesondere auf die charakteristischen Autofluoreszenzeigenschaften aus. Während der Versuche liegt jedoch deren intrazelluläre Konzentration unterhalb der Werte, die in vivo erreicht werden können. Außerdem sind die RPE-Kulturen an die in vitro Lichtbedingungen adaptiert, wodurch das Vitamin-A-Gleichgewicht zugunsten der weniger reaktiven Retinol-Form verschoben ist. Nach Eldred und Lasky (1993) ist aber eher das Retinal für die Entstehung der Lipofuszinfluorophore verantwortlich.

2. In dieser Studie haben die postkonfluenten Zellen nur über einen relativ kurzen Zeitraum die Möglichkeit zur Bildung autofluoreszenten Materials. Das Lipofuszin benötigt in vivo aber Jahre, um im RPE zu akkumulieren. Demzufolge wäre ein längeres postmitotisches Intervall für die Zellen notwendig, um die charakteristischen Fluorophore von „reifem“ Lipofuszin zu entwickeln. Wahrscheinlich entspricht somit das gebildete autofluoreszente Material Lipofuszinvorstufen, die noch nicht vollständig Fluoreszenzeigenschaften erworben haben. Das „junge“ Lipofuszin besitzt vor allem blau-grün emittierende Fluorophore (450 nm, 525 nm) (Boulton et al., 1990), wohin gegen das reife Lipofuszin die golden gelbe Autofluoreszenz bei Exzitation mit blauem Licht auszeichnet (Boulton et al., 1990; Docchio et al., 1991).

In der gleichen Studie untersuchten Wassell et al. außerdem den Einfluss von Phagozytose und Autophagie auf die spektralen Eigenschaften der RPE-Zellen. Über einen Zeitraum von 56 Tagen wurden humane RPE-Zellen in Medium mit bzw. ohne POS kultiviert. Es zeigten sich keine Abweichungen der spektralen Eigenschaften. Auch in unserer Studie waren die Autofluoreszenzspektren der Zellen nahezu identisch, unabhängig davon, ob die Lipofuszinogenese durch Autophagiehemmung allein (ohne Zugabe von POS) oder durch modifizierte POS induziert wurde. Eine mögliche Interpretation dieser Ergebnisse lautet, dass Lipofuszin *in vitro*, unabhängig davon, ob es aus zelleigenen oder aus POS-Bestandteilen entsteht, eine ähnliche molekulare Zusammensetzung aufweist, zumindest was die autofluoreszierenden Komponenten betrifft.

Schlussfolgerungen

Grundsätzlich kann aus den diskutierten Ergebnissen festgehalten werden:

1. Eine Hemmung des lysosomalen Abbaus von POS kann eine Lipofuszinogenese induzieren. HNE/MDA-Modifikationen der POS bewirken eine lysosomale Hemmung und können damit zur Lipofuszinentstehung beitragen.
2. Durch eine lysosomale Dysfunktion wird auch die Autophagie gehemmt, was unabhängig von der POS-Aufnahme zu einer zusätzlichen Lipofuszinakkumulation aus intrazellulärem Material führt.
3. Da sowohl Lipofuszinakkumulation als auch Autophagiehemmung die RPE-Zelle auf Dauer schädigen, könnten POS-Modifikationen durch HNE/MDA über diese beiden Mechanismen zur RPE-Dysfunktion im Rahmen der AMD beitragen.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Phagozytose oxidativ geschädigter Photorezeptoren über dem Weg einer lysosomalen Dysfunktion eine intrazelluläre Lipofuszinogenese in retinalen Pigmentepithelzellen induzieren kann.

Dazu wurden zunächst Photorezeptoren-Außensegmente aus Schweineaugen isoliert und *in vitro* mit den Lipidperoxidationsprodukten Malondialdehyd bzw. 4-Hydroxynonenal modifiziert. In humanen retinalen Pigmentepithelzellen wurde die intrazelluläre Bildung autofluoreszenten Materials nach Inkubation mit modifizierten Photorezeptoren mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. In Kontrollen wurde eine lysosomale Dysfunktion durch die Gabe von Ammoniumchlorid induziert.

Die Phagozytose von Malondialdehyd- bzw. 4-Hydroxynonenal-modifizierter Photorezeptoren induzierte die intrazelluläre Bildung autofluoreszenter Granula, die anhand der Emissionsspektren und der morphologischen Untersuchungen Lipofuszin vergleichbare Eigenschaften aufwiesen. Die erhobenen Autofluoreszenzintensitäten zeigten, dass die Phagozytose oxidativ geschädigter Photorezeptoren im Vergleich zu unbehandelten Photorezeptoren eine bedeutend höhere Autofluoreszenz auslösen konnte. Unbehandelte Photorezeptoren, deren intralysosomaler Abbau gehemmt wurde, erbrachten eine vergleichbar hohe Lipofuszinausbeute. Im selben Experiment zeigte sich auch, dass bereits eine alleinige Hemmung der Autophagie ohne Zugabe von Photorezeptoren eine Lipofuszinogenese induzieren kann.

Anhand unserer Ergebnisse und unter Berücksichtigung weiterer Befunde aus der rezenten Literatur kann festgehalten werden, dass oxidativ geschädigte Photorezeptoren eine lysosomale Dysfunktion des retinalen Pigmentepithels hervorrufen können. Da eine intralysosomale Akkumulation von Photorezeptoren zur Lipofuszinentstehung beiträgt, wird davon ausgegangen, dass mit Lipidperoxidationsprodukten behandelte Photorezeptoren über dem Weg einer lysosomalen Hemmung zu einer Lipofuszinogenese beitragen. Funktionsstörungen auf lysosomaler Ebene hemmen zusätzlich die Autophagie, was einen unvollständigen Abbau auch von zelleigenem Material nach sich zieht. Unter dem Gesichtspunkt, dass sowohl Lipofuszinakkumulationen als auch Autophagiehemmung die Zelle auf Dauer schädigen, kann zu-

sammenfassend angenommen werden, dass oxidativ geschädigte Photorezeptoren über diese beiden Mechanismen zur RPE-Dysfunktion im Rahmen der AMD beitragen können.

Literaturverzeichnis

1. **Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ, Ambati BK. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. Nat Med 2003; 9: 1390-1397.**
2. **Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. Am J Ophthalmol 2002; 134: 411-431.**
3. **Arend O, Weiter JJ, Goger DG, Delori FC. [In vivo fundus fluorescence measurements in patients with age related macular degeneration]. Ophthalmologie 1995; 92: 647-653.**
4. **Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 2000; 45: 115-134.**
5. **Bellmann C, Holz FG, Schapp O, Volcker HE, Otto TP. [Topography of fundus autofluorescence with a new confocal scanning laser ophthalmoscope]. Ophthalmologie 1997; 94: 385-391.**
6. **Bergmann M, Schütt F, Holz FG, Kopitz J. Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. FASEB J 2004; 18: 562-564.**
7. **Boulton M, Mc Kechnie NM, Breda J, Bayly M, Marshall J. The formation of autofluorescent granules in cultured human RPE. Invest Ophthalmol Vis Sci 1989; 30: 82-89.**
8. **Boulton ME, Docchio F, Dayhaw-Barker P, Ramponi R, Cubeddu R. Age-related changes in the morphology, absorption and fluorescence of melanosomes and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium. Vision Res 1990; 30: 1291-1303.**

9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
10. Brunk UT und Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 2002b; 269: 1996-2002.
11. Brunk UT und Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 2002a; 33: 611-619.
12. Burcham PC, Kuhan YT. Diminished susceptibility to proteolysis after protein modification by the lipid peroxidation product malondialdehyde: inhibitory role for crosslinked and noncrosslinked adducted proteins. *Arch Biochem Biophys* 1997; 340: 331-337.
13. Burke JM, Skumatz CM. Autofluorescent inclusions in long term postconfluent cultures of retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1478-1486.
14. Burns RP, Feeney-Burns L. Clinico-morphologic correlations of drusen of Bruch's membrane. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1980; 78: 206-225.
15. Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H, Kamei M, Hassan A, Yan L, Rayborn ME, Salomon RG, Hollyfield JG. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14682-14687.
16. Cuervo AM und Dice JF. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 2000; 275: 31505-31513.
17. Dastgheib K und Green WR. Granulomatous reaction to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 813-818.
18. De Jong PT. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355: 1474-1485.
19. Delori FC, Dorey CK, Staurenghi G, Arend O, Goger DG, Weiter JJ. In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 718-729.
20. Docchio F, Boulton ME, Cubeddu R, Ramponi R, Barker PD. Age-related changes in the fluorescence of melanin and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium: a time-resolved fluorescence spectroscopy study. *Photochem Photobiol* 1991; 54: 247-253.

21. Donato HJ, Hoselton MA, Sohal RS. Lipofuscin accumulation: effects of individual variation and selective mortality on population averages. *Exp Gerontol* 1979; 14: 141-147.
22. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* 1996; 62: 155-169.
23. Eldred GE und Lasky MR. Retinal age pigments generated by self-assembling lysosomotropic detergents. *Nature* 1993; 361: 724-726.
24. Eldred GE und Katz ML. Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: separation and spectral characterization. *Exp Eye Res* 1988; 47: 71-86.
25. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Puhl H, Tatzber F. Endogenous antioxidants and lipoprotein oxidation. *Biochem Soc Trans* 1990; 18:1059-1061.
26. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81-128.
27. Feeney L. Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978; 17: 583-600.
28. Feeney-Burns L, Berman ER, Rothmann H. Lipofuscin of human retinal pigment epithelium. *Am J Ophthalmol* 1980; 90: 783-791.
29. Feeney-Burns L, Hilderbrand ES, Eldridge S. Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25: 195-200.
30. Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez-Boulan E. Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12932-12937.
31. Fliesler SJ, Anderson RE. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog Lipid Res* 1983; 22: 79-131.
32. Hayasaka, S. Aging changes in lipofuscin, lysosomes and melanin in the macular area of human retina and choroid. *Jpn J Ophthalmol* 1989; 33(1): 36-42.
33. Holz FG, Bellman C, Staudt S, Schutt F, Volcker HE. Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1051-1056.

34. Holz FG, Bindewald-Wittich A, Fleckenstein M, Dreyhaupt J, Scholl HP, Schmitz-Valckenberg S. Progression of geographic atrophy and impact of fundus autofluorescence patterns in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2007; 143: 463-472.
35. Holz FG, Pauleikhoff D, Klein R, Bird AC. Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am J Ophthalmol* 2004; 137: 504-510.
36. Holz FG, Pauleikhoff D, Spaide RF, Bird AC. *Age-related Macular Degeneration*. Heidelberg: Springer, 2004.
37. Holz FG, Sheraidah G, Pauleikhoff D, Bird AC. Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 402-406.
38. Itoh K, Nakamura M, Akino T. Comparison of phospholipid profiles of primary adenocarcinoma in the lung and other organs. *Lipids* 1981; 16:876-880.
39. Kaemmerer E, Schutt F, Krohne TU, Holz FG, Kopitz J. Effects of lipid peroxidation-related protein modifications on RPE lysosomal functions and POS phagocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 1342-1347.
40. Katz ML, Rice LM, Gao CL. Reversible accumulation of lipofuscin-like inclusions in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 175-181.
41. Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium. *Eye* 1995; 9: 763-771.
42. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Meuer SM, Huang GH. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology* 2002; 109: 1767-1779.
43. Kopitz J, Holz FG, Kaemmerer E, Schutt F. Lipids and lipid peroxidation products in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Biochimie* 2004; 86: 825-831.
44. Krohne TU, Kämmerer E, Kopitz J, Holz FG. Detection of HNE- and MDA-modifications on lysosomal cathepsins in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1374.
45. Krohne TU, Kämmerer E, Wegener A, Kopitz J, Holz FG. Products of lipid peroxidation reduce lysosomal cathepsin activities in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 257.

46. Krohne TU, Stratmann N, Kopitz J, Holz FG. Impaired autophagy and increased lipofuscinogenesis induced by POS modified with lipid peroxidation products in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49: 220.
47. Kumar RS, Anthrayose CV, Iyer KV, Vimala B, Shashidar S. Lipid peroxidation and diabetic retinopathy. *Indian J Med Sci* 2001; 55: 133-138.
48. Machlin LJ und Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J* 1987; 1: 441-445.
49. Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Beal MF, Markesbery WR, Roberts LJ, Morrow JD. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 620-626.
50. Moore DJ, Hussain AA, Marshall J. Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 1290-1297.
51. Müller C, Spital G, Radermacher M, Dohrmann J, Lommatzsch A, Pauleikhoff D. [Pigment epithelium detachments in AMD (age-associated macular degeneration) and "polypoid choroidal vasculopathy". A fluorescein and indocyanine green angiography study]. *Ophthalmologie*. 2002; 99: 85-89.
52. Mullins RF und Hageman GS. Human ocular drusen possess novel core domains with a distinct carbohydrate composition. *J Histochem Cytochem*. 1999; 47: 1533-1540.
53. Mullins RF, Russel SR, Anderson DH, Hagemann GS. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis and dense deposit disease. *FASEB J*. 2000; 14: 835-846.
54. O'Neil J, Hoppe G, Sayre LM, Hoff HF. Inactivation of Cathepsin B by oxidized LDL involves complex formation induced by binding of putative reactive sites exposed at low pH to thiols on the enzyme. *Free Radic Biol Med*. 1997; 23: 215-225.
55. Pauleikhoff D und Holz FG. [Age-related macular degeneration. 1. Epidemiology, pathogenesis and differential diagnosis]. *Ophthalmologie* 1996; 93: 299-315.
56. Pauleikhoff D, Barondes MJ, Minassian D, Chrisholm IH, Bird AC. Drusen as risk factors in age-related macular disease. *Am J Ophthalmol*. 1990; 109: 38-43.
57. Poli G und Schaur RJ. 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life* 2000; 50: 315-321.

58. Pryor WA und Porter NA. Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 541-543.
59. Roth F, Bindewald A, Penzel R, Löffler KU, Welge-Lüssen UC, Scholl HP, Kopitz J, Holz FG. Variation and Distribution of Lipofuscin Granules in Human RPE Cells Determined With Confocal Scanning Laser Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 252.
60. Rozanowska M, Wassel J, Boulton M, Burke JM, Rodgers MA Truscott TG, Sarna T. Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1107-1112.
61. Sarks JP, Sarks SH, Killingworth MC. Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye* 1988; 2: 552-577.
62. Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* 2003; 24: 149-159.
63. Schmitz-Valckenberg S, Bindewald-Wittich A, Dolar-Szczasny J, Dreyhaupt J, Wolf S, Scholl HP, Holz FG. Correlation between the area of increased autofluorescence surrounding geographic atrophy and disease progression in patients with AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 2648-2654.
64. Schraermeyer U, Enzmann V, Kohen L, Addicks K, Wiedemann P, Heimann K. Porcine iris pigment epithelial cells can take up retinal outer segments *Exp Eye Res* 1997; 65: 277-287.
65. Schutt F, Bergmann M, Holz FG, Kopitz J. Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 3663-3668.
66. Schutt F, Bergmann M, Kopitz J, Holz FG. [Detergent-like effects of the lipofuscin retinoid component A2-E in retinal pigment epithelial cells]. *Ophthalmologie* 2002b; 99: 861-865.
67. Schutt F, Ueberle B, Schnolzer M, Holz FG, Kopitz J. Proteome analysis of lipofuscin in human retinal pigment epithelial cells. *FEBS Lett* 2002a; 528: 217-221.
68. Shamsi FA und Boulton M. Inhibition of RPE lysosomal and antioxidant activity by the age pigment lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 3041-3046.
69. Southorn PA und Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-389.

70. Sunness JS. The natural history of geographic atrophy, the advanced atrophic form of age-related macular degeneration. *Mol Vis* 1999; 5: 25.
71. Tate DJ Jr, Miceli MV, Newsome DA. Phagocytosis and H₂O₂ induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 1271-1279.
72. Terman A und Brunk UT. Aging of cardiac myocytes in culture: oxidative stress, lipofuscin accumulation, and mitochondrial turnover. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1019: 70-77.
73. Wassell J und Boulton M. A role for vitamin A in the formation of ocular lipofuscin. *Br J Ophthalmol* 1997; 81: 911-918.
74. Wassell J, Davies S, Bardsley W, Boulton M. The photoreactivity of the retinal age pigment lipofuscin. *J Biol Chem* 1999; 274: 23828-23832.
75. Wassell J, Ellis S, Burke J, Boulton M. Fluorescence properties of autofluorescent granules generated by cultured human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1487-1492.
76. Weiter JJ, Delori FC, Wing GL, Fitch KA. Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 145-152.
77. Wiegand RD, Giusto NM, Rapp LM, Anderson RE. Evidence for rod outer segment lipid peroxidation following constant illumination of the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24: 1433-1435.
78. Wihlmark U, Wrigstad A, Roberg K, Brunk UT, Nilsson SE. Formation of lipofuscin in cultured retinal pigment epithelial cells exposed to pre-oxidized photoreceptor outer segments. *Apmis* 1996; 104: 272-279.
79. Williams, RA, Brody BL, Thomas RG, Kaplan RM, Brown SI. The psychosocial impact of macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 514-520.
80. Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P. Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis* 1999; 5: 32.
81. Witting LA. Lipid peroxidation in vivo. *J Am Oil Chem Soc* 1965; 42: 908-913.
82. Yau TM. Mutagenicity and cytotoxicity of malonaldehyde in mammalian cells. *Mech Ageing Dev* 1979; 11: 137-144
83. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2696-2701.

- 84. Young RW und Bok D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. J Cell Biol 1969; 42: 392-403.**
- 85. Young RW. Pathophysiology of age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 1987; 31: 291-306.**
- 86. Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol 2004 Apr; 122: 598-614.**

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die freundliche Unterstützung sowie für die vielen Anregungen und Vorschläge, die mir während der Anfertigung dieser Arbeit zuteil wurden.

Herzlichen Dank an Herrn Professor Dr. Holz für die Belassung des Themas und die Begutachtung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Tim Krohne für die Einarbeitung im Labor und für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne seine umfassende Betreuung wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Claudine Strack für ihre Unterstützung im Labor.

Ein Dank geht auch an das molekularbiologische Labor der Chirurgie für die Bereitstellung des Spektrophotometers, sowie an das Institut für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie für die Bereitstellung des FACS-Canto.