

# Altersbedingte Makuladegeneration: die Rolle von Licht bei der Entstehung degenerativer Veränderungen im menschlichen RPE und möglicher Zell-Schutz durch Minocyclin

The Role of Light in the Development of RPE Degeneration in AMD and Potential Cytoprotection of Minocycline

## Autoren

M. Kernt, S. Thiele, C. Hirneiss, A. S. Neubauer, C.-A. Lackerbauer, M. W. Ulbig, A. Kampik

## Institut

Augenklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München

## Schlüsselwörter

- oxidativer Stress
- Minocyclin
- AMD
- Apoptose
- Zytoprotektion

## Key words

- oxidative stress
- Pharmacology
- AMD
- apoptosis
- minocycline

**eingereicht** 4.8.2010

**akzeptiert** 2.11.2010

## Bibliografie

**DOI** <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1245892>

Klin Monatsbl Augenheilkd 2010; 227: 1–8 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York · ISSN 0023-2165

## Korrespondenzadresse

**Dr. Marcus Kernt**

Augenklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München

Mathildenstr.8

80336 München

Tel.: ++49/89/51 60 38 11

Fax: ++49/89/51 60 51 60

marcus.kernt@med.uni-muenchen.de

## Zusammenfassung



**Hintergrund:** Lichtinduzierter oxidativer Stress wird als mögliche Ursachen degenerativer Veränderungen im retinalen Pigmentepithel (RPE) bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) angesehen. Diese Studie untersucht den Einfluss von Licht auf die Induktion von intrazellulären freien Sauerstoffradikalen (ROS) und Apoptose im menschlichen RPE sowie mögliche anti-apoptische, zytoprotektive Wirkungen des Tetracyclin-Antibiotikums Minocyclin.

**Methoden:** Kulturen primärer humaner RPE-Zellen wurden mit weißem Licht bestrahlt oder oxidativem Stress ausgesetzt (600 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und zusätzlich mit Minocyclin behandelt. Es wurden Vitalität, Induktion von Apoptose und intrazellulären ROS sowie die Expression von BAX und Bcl-2 auf zellulärer Ebene bestimmt (RT-PCR/Western Blot/ELISA).

**Ergebnisse:** Sowohl die Bestrahlung der RPE Zellen mit weißem Licht als auch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Exposition führten zu einer bestrahlungszeitabhängigen Abnahme der Vitalität und der Expression von Bcl-2 sowie zu einer Induktion von Apoptose, ROS und der Bildung von BAX. Diese Zellschädigung wurde unter bestimmten Bedingungen durch Behandlung der Zellen mit Minocyclin reduziert.

**Schlussfolgerung:** Diese Studie zeigt, dass Minocyclin humane RPE-Zellen wirkungsvoll vor oxidativem Stress schützt. Aufgrund seiner photosensibilisierenden Wirkung muss die mögliche Anwendung von Minocyclin bei AMD aber weiter evaluiert werden.

## Einleitung

Aufgrund der demografischen Entwicklung unserer Gesellschaft steigt die Prävalenz der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) stetig

## Abstract



**Background:** Light-induced oxidative stress is an suggested reason for retinal pigment epithelium (RPE) degeneration in age-related macular degeneration (AMD). This study investigates the influence of light on intracellular reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in the human RPE and potential cytoprotective effects of the tetracycline antibiotic minocycline.

**Methods:** Primary human RPE cells were either pre- or post-incubated with minocycline and then exposed to white light or oxidative stress (600 µM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Then viability, induction of intracellular reactive oxygen species (ROS), apoptosis and cell death was determined. Expression of apoptotic BAX and anti-apoptotic Bcl-2 protein and their mRNA were determined by RT-PCR and Western blot analysis.

**Results:** Both light exposure and oxidative stress decreased RPE cell viability and Bcl-2 expression and increased intracellular ROS, apoptotic cell death, and BAX expression. Minocycline reduced these effects under certain conditions.

**Conclusions:** This study demonstrates that minocycline effectively protects human RPE cells against oxidative damage. However, in the light of minocycline's photosensitising properties its potential role in AMD treatment needs further evaluation.

an. Sie stellt in den westlichen Industrienationen die Hauptursache für Sehbehinderung und Erblindung im Sinne des Gesetzes dar [1, 2]. Trotz jüngster Erfolge bei der Behandlung der exsudativen AMD [3, 4] und intensiver wissen-

■ Korrektorexemplar: Veröffentlichung (auch online), Vervielfältigung oder Weitergabe nicht erlaubt! ■

Kernt M et al. Altersbedingte Makuladegeneration: die... Klin Monatsbl Augenheilkd 2010; 227: 1–8

schaftlicher Anstrengungen gibt es bisher keine ursächliche Therapie für die AMD.

Als mögliche Ursache der für die AMD pathognomonischen degenerativen Veränderungen im retinalen Pigmentepithel (RPE) konnte eine Reihe von Risikofaktoren aufgefunden werden. Neben genetischen und ernährungsbedingten Einflussfaktoren [5–7] scheint auch die lebenslang kumulierende Einwirkung des Sonnenlichts auf die Netzhaut und die Bildung oxidativer Stoffwechselprodukte an der Entstehung und dem Fortschreiten der AMD maßgeblich beteiligt zu sein [8–12]. Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, welchen Einfluss das Licht auf die Induktion von Apoptose als Faktor für Zellverlust im menschlichen RPE bei der Pathogenese der AMD hat und inwieweit diese Apoptose-induzierende Wirkung des Lichtes auf einer durch die Strahlung verursachte Freisetzung von oxidativen Stoffwechselprodukten beruht.

Das Tetrazyklin-Antibiotikum Minocyclin weist neben seinen antimikrobiellen auch antiinflammatorische und antioxidative Eigenschaften auf. Jüngst konnten zudem experimentell zytoprotektive Effekte von Minocyclin aufgezeigt werden, die mit der Modulation des programmierten Zelltods (Apoptose) einhergehen [13–18]. Deshalb wurde untersucht, ob das Tetrazyklin-Antibiotikum Minocyclin Eigenschaften besitzt, die das menschliche RPE vor den schädlichen Auswirkungen von Licht und oxidativem Stress schützen können.

## Methoden

### Kultivierung, Bestrahlung und Behandlung primärer RPE-Zellen mit oxidativem Stress und Minocyclin

Um die Wirkung erhöhter Lichteinstrahlung auf das menschliche RPE hinsichtlich Zelltod, Apoptose und Vitalität zu untersuchen und zu prüfen, ob Minocyclin schützende Effekte vor möglichen phototoxischen Schäden hat, wurden frühe Passagen (2 und 3) von primären, humanen RPE-Zellen für 4 h mit 600  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder für 15–60 min mit rein weißem Licht bestrahlt. Hierzu wurde eine Hochleistungs-Xenon-Lichtquelle mit homogenem Licht-Spektrum (400–700 nm) verwendet. An die Lichtquelle wurde ein Lichtleiter angeschlossen, über den die Bestrahlung der Zellen erfolgte. Unmittelbar vor der Bestrahlung wurde das Zellkulturmedium gegen phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) getauscht. Die Zellen wurden von oben für 15–60 min mit einer Intensität von 350  $\text{mW}/\text{cm}^2$  bestrahlt unter Kontrolle des Lichtspektrums und der Strahlungsintensität mittels Spektralphotometer. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde die PBS-Lösung gegen serumfreies Zellkulturmedium oder aber mit 20  $\mu\text{M}$  Minocyclin versetztem Medium ausgetauscht und die Zellen für 24 h in Dunkelheit gehalten. Bei den Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden und die für 4 h mit 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt wurden, wurde im Anschluss ebenfalls das  $\text{H}_2\text{O}_2$ -haltige Medium abgesaugt und gegen serumfreies Zellkulturmedium ausgetauscht und die Zellen dann ebenfalls für 24 h in Dunkelheit gehalten. Im Anschluss daran wurden 3 etablierte Testverfahren zur Beurteilung der Vitalität, der Induktion von Zelltod und der Induktion von Apoptose durchgeführt: MTT-Assay, Live-Dead-Assay und Cell-Death Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Außerdem wurde mittels einer Fluoreszenzfärbung die Induktion von intrazellulären freien Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species; ROS) und mittels RealTime-PCR eine quantitative Analyse der mRNA-Expression des anti-apoptotisch wirk-

samen Bcl-2-Proteins sowie des stark Apoptose-fördernden BAX-Proteins und die Umsetzung der entsprechenden mRNA-Transkripte in die entsprechenden Proteine durch Western-Blot-Analyse untersucht.

RPE-Zellen wurden von 5 Spenderaugen an der Hornhautbank der Augenklinik der LMU gewonnen und wie andernorts beschrieben kultiviert [19]. Dabei wurden nur die zweite und dritte Passage für die Versuche verwendet. Frühe Passagen von primären RPE-Zellen weisen noch zelleigenes Lipofuscin auf, das als Photosensitizer wirkt und bei der Entstehung der exsudativen AMD eine wichtige Rolle spielt [20, 21]. Dieser natürliche Lipofuscin-Gehalt geht mit zunehmender Kultivierungsdauer der Zellen verloren [22–24].

Die Untersuchungen erfolgten an stationären Zellkulturen. Stationäre Zellkulturen erleichtern, besonders im MTT-Assay, die Abgrenzung von zytotoxischen gegenüber antiproliferativen Effekten. Hierzu wurden ca.  $3 \times 10^5$  Zellen pro Well auf 35 mm-Petrischalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert.

### MTT-Assay

Der Tetrazolium-Farb-Reduktions-Assay (MTT; 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase und ist eine Standard-Untersuchungstechnik von Substanzen in Zellkultur. Details des Untersuchungsganges sind andernorts beschrieben [19, 25]. Prinzipiell werden die Zellen mit dem initial gelben MTT-Farbstoff inkubiert. Der Farbstoff wird dem Vitalitätsgrad der Zellen entsprechend verstoffwechselt und schlägt ins Violette über. Diese Farbänderung wird photometrisch erfasst und erlaubt Rückschlüsse auf die Vitalität und Proliferationsfähigkeit der untersuchten Zellen.

### Live-Dead-Assay

Im Live-Dead-Assay wird die Induktion von Zelltod unter dem Einfluss bestimmter Bedingungen untersucht. Die Zellkerne nicht lebensfähiger Zellen werden durch den roten, membranundurchlässigen Farbstoff Propidiumjodid angefärbt. Gleichzeitig werden die Kerne aller Zellen durch den blauen, membranundurchlässigen Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Eine Zweifarben-Fluoreszenzuntersuchung ermöglicht die Differenzierung beider Färbungen, und die Anzahl der lebenden und der toten Zellen lässt sich bestimmen. Der Test wurde entsprechend vorangehender Beschreibung [26] und den Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich) durchgeführt.

### Nachweis von Apoptose im RPE

Die Apoptose ist charakterisiert durch Kondensation des Zytoplasmas und die Aktivierung endogener Endonucleasen. Dies führt zu internukleosomaler Spaltung von DNA mit Entstehung von Mono- und Oligonucleosomen, die eng mit Histonen vernetzt sind. Zum quantitativen Nachweis von Apoptose im RPE wurden Histon-assoziierte DNA-Fragmente in Mono- und Oligonucleosomen, als Marker für Apoptose, durch einen ELISA-Test entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) und nach vorangegangenen Beschreibungen untersucht [19].

### Nachweis intrazellulärer freier Sauerstoffradikale (ROS) im RPE

Intrazelluläre freie Sauerstoffradikale (ROS) wurden nach der Methode von Nishikawa detektiert [27]. Entsprechend vorangegangenen Protokollen wurden die Zellen hierzu nach der Be-

■ Korrektorexemplar: Veröffentlichung (auch online), Vervielfältigung oder Weitergabe nicht erlaubt! ■

Kernt M et al. Altersbedingte Makuladegeneration: die... Klin Monatsbl Augenheilkd 2010; 227: 1–8

handlung und weiteren 24 h Ruhephase mit 10  $\mu\text{M}$  5-(und-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein-diacetateacetyl-ester (CM-H2DCFDA; Molecular Probes, Eugene, OR, USA), das in einem Krebs-Ringer Bicarbonat-Puffer (135 mM NaCl, 3,6 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0,5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4) gelöst wurde, für 30 min beladen. Dann wurden die Zellen für 2 h mit serumfreien DMEM Medium inkubiert und anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop (Aristoplan, Leitz, Wetzlar, Germany) analysiert [28, 29].

### RNA-Isolation und quantitative RT-PCR

Die Gesamt-RNA zur Untersuchung der BAX und Bcl-2-Expression wurde aus 35 mm Petrischalen nach der Guanidium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) isoliert. Die quantitative RealTime-PCR ermöglicht die Erfassung von sehr kleinen Mengen mRNA. Nach der üblichen Isolierung der mRNA wird diese in cDNA durch Reverse-Transkriptase umgeschrieben. Diese cDNA wird dann für die spezifische PCR verwendet.

Um Unterschiede in der Höhe der Bcl-2- und BAX-RNA-Expression in jeder untersuchten Probe zu bestimmen, wird die Expression von 18S rRNA gleichzeitig in ein und derselben Probe als interne Kontrolle mitgeführt und die entsprechende Bcl-2- und BAX-RNA ins Verhältnis dazu gesetzt.

### Protein-Extraktion, Fluoreszenzimmunhistochemie und Western-Blot-Analyse

Um zu überprüfen, ob die lichtinduzierte Abnahme der Bcl-2- und Zunahme der BAX-mRNA-Transkription und deren mögliche Abmilderung durch die Minocyclin-Inkubation in verminderte Proteinsynthese umgesetzt wird, wurde ein Gesamtprotein-Extrakt aus den Zellen gewonnen und mit einem Maus-anti-Bcl-2- oder BAX-RNA-Antikörper entsprechend vorangehender Beschreibungen [26] durch Western-Blotting analysiert.

### Statistische Auswertung

Die Analyse der Versuchsergebnisse erfolgte mit SPSS 13.0 für Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Für die Ergebnisse aus dem MTT-Assay und der RT-PCR wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. Bei allen statistischen Tests wurde  $p < 0,05$  als signifikant angesehen. Alle Versuche wurden mindestens 3-mal und mit RPE-Zellen von je 3 verschiedenen Spendern durchgeführt.

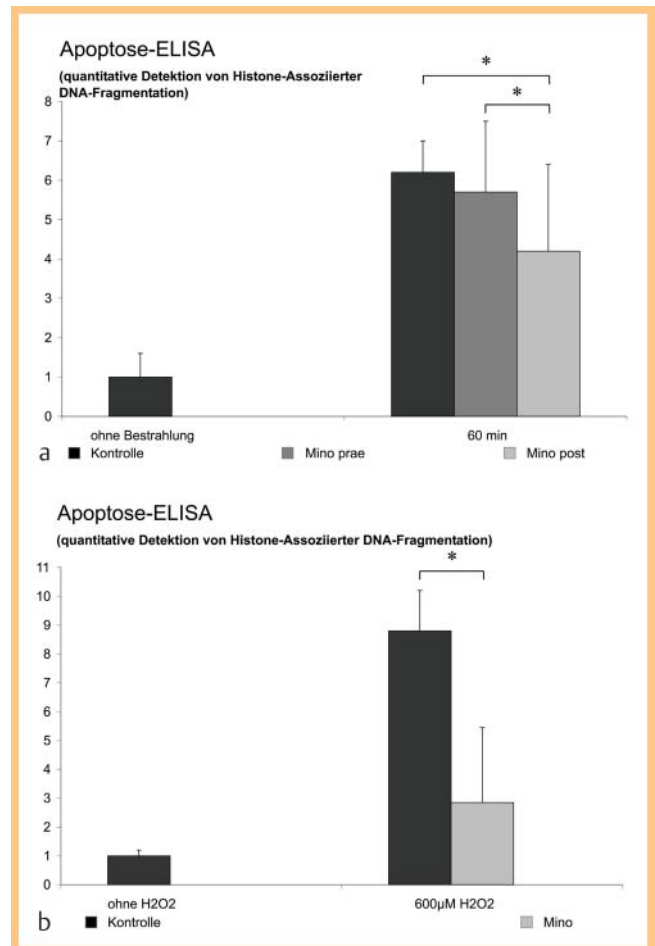
### Ergebnisse

#### Sowohl oxidativer Stress als auch die Bestrahlung mit rein weißem Licht vermindern die Vitalität und induzieren intrazelluläre ROS, Zelltod und Apoptose im RPE

Die Bestrahlung primärer, humaner RPE-Zellen mit rein weißem Licht (400 – 700 nm, 350  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) führte nach 60 min Bestrahlungszeit zur signifikanten Induktion von Zelltod und Apoptose (● **Abb. 1a, 2a**). Auch die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität, die Rückschlüsse auf die Vitalität und Proliferationsfähigkeit der untersuchten Zellen erlaubt, nahm im MTT-Assay mit der Bestrahlungszeit stetig ab (● **Abb. 3a**).

Außerdem ließ sich nach einer Bestrahlungszeit von 60 min eine signifikante Induktion von ROS (● **Abb. 2a**) nachweisen.

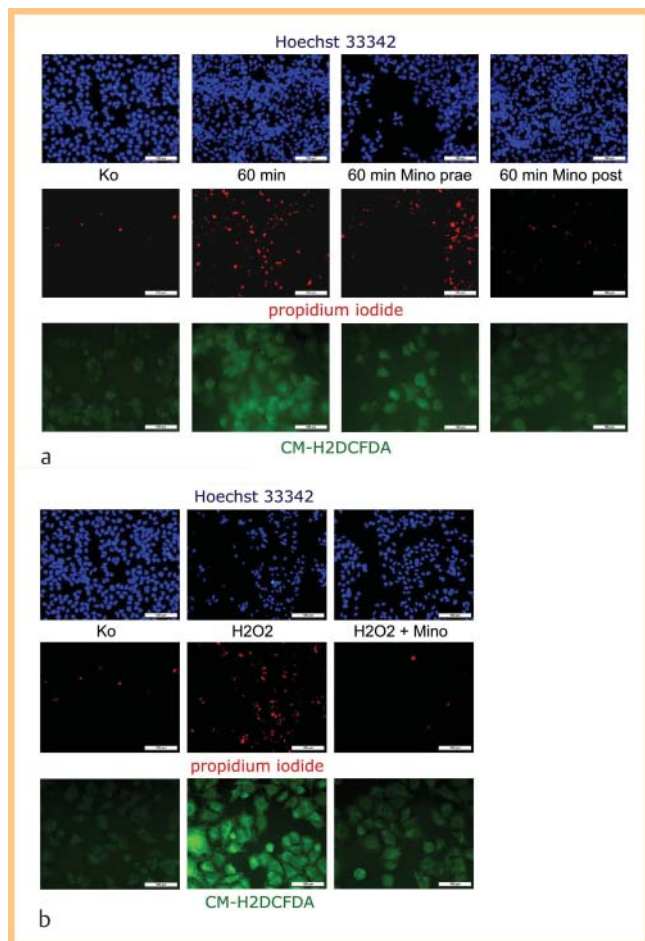
Ein ähnliches Bild zeigte sich nach der Behandlung der RPE-Zellen mit 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Hier ließ sich nach 24 h ebenfalls eine signifikante Reduktion der Vitalität im MTT-Assay sowie die Induktion von ROS, Zelltod und Apoptose zeigen (● **Abb. 1b, 2n, 3b**).



**Abb. 1** **a** Apoptose-ELISA (Bestrahlung). **b** Apoptose-ELISA ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung). Quantitativer Nachweis von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten in Mono- und Oligonucleosomen als Marker für Apoptose mittels ELISA: Nach Bestrahlung der RPE-Zellen mit rein weißem Licht (60 min) kam es zu einer signifikanten Induktion von Apoptose. Wenn die Zellen direkt nach der Bestrahlung mit Minocyclin behandelt wurden, konnte dieser Effekt signifikant reduziert werden **a**. Auch die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung führte zu einer signifikanten Induktion von Apoptose bei den primären humanen RPE-Zellen. Wenn die Zellen zuvor mit Minocyclin behandelt worden waren, war dieser Effekt signifikant geringer ausgeprägt **b**. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch einen „\*“ gekennzeichnet.

#### Minocyclin schützt das RPE vor oxidativem Stress

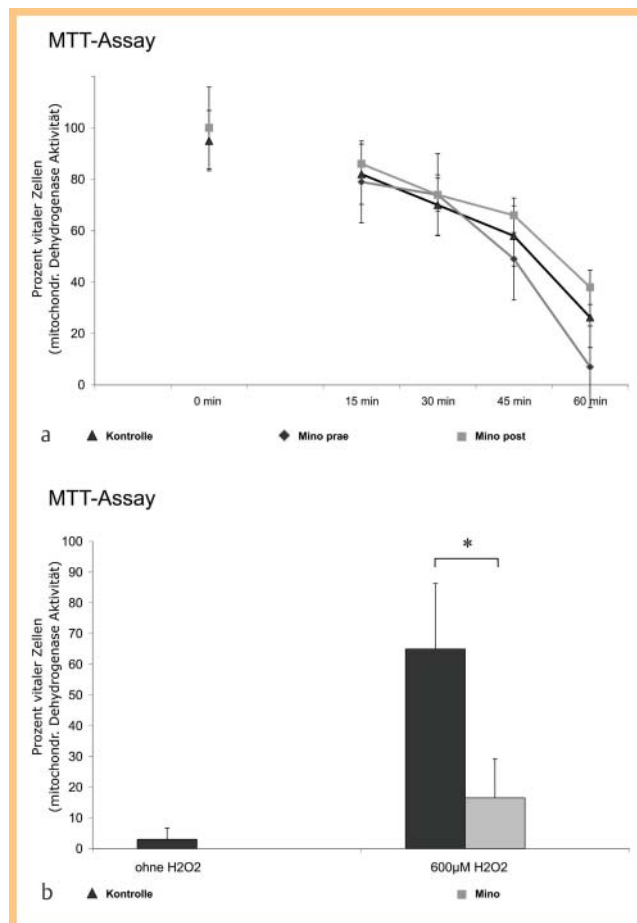
RPE-Zellen, die für 24 h mit 20  $\mu\text{M}$  Minocyclin vorbehandelt wurden, zeigten sich signifikant resistenter gegenüber oxidativem Stress. Bei diesen so vorbehandelten Zellen konnte nach der Behandlung mit 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  eine signifikant geringere Abnahme der Vitalität im MTT-Assay (● **Abb. 3b**) sowie eine signifikant geringere Zahl toter Zellen im Live-Dead-Assay und eine Abnahme intrazellulärer ROS nachgewiesen werden (● **Abb. 2b**). Zudem war die Zahl der Histon-assoziierten DNA-Fragmente in Mono- und Oligonucleosomen, als Marker für Apoptose, signifikant reduziert (● **Abb. 1b**).



**Abb. 2** **a** Live-Dead + ROS (Bestrahlung). **b** Live-Dead + ROS ( $H_2O_2$ ). Live-Dead-Assay (Hoechst 33342/propidium iodide). **a** Induktion von Zelltod nach Bestrahlung der primären humanen RPE Zellen mit rein weißem Licht (60 min), nach Vorbehandlung mit Minocyclin (60 min Mino prae) oder nach Zugabe des Wirkstoffs nach der Bestrahlung (60 min Mino post). **b** Induktion von Zelltod unter den Bedingungen des oxidativen Stresses ( $H_2O_2$  + Mino). Die Gesamtzahl der Zellen ist blau dargestellt, die Anzahl toter Zellen rot. Nach 60 min Bestrahlung mit oder ohne Vorbehandlung mit Minocyclin kam es zu einer deutlichen Induktion von Zelltod bei den primären RPE-Zellen. Ebenso nach 4 h ( $600 \mu M$ )  $H_2O_2$ -Exposition konnte eine signifikante Induktion von Zelltod detektiert werden. Diese nahm deutlich ab, wenn die Zellen vor der Behandlung mit  $H_2O_2$  mit Minocyclin vorbehandelt wurden oder wenn Minocyclin direkt nach der Bestrahlung zugegeben wurde. Nachweis intrazellulärer ROS (CM-H2DCFDA): Die Bestrahlung der RPE-Zellen für 60 min sowie die  $H_2O_2$ -Exposition führten zu einer deutlichen Induktion von intrazellulären ROS. Unter dem Einfluss von Minocyclin waren fluoreszenzmikroskopisch deutlich weniger ROS nachweisbar.

### Minocyclin erhöht die Photosensibilität von RPE-Zellen, kann aber auch helfen, die lichtinduzierte Verminderung von Vitalität und Proliferationsfähigkeit sowie die Induktion von intrazellulären ROS, Zelltod und Apoptose nach Bestrahlung zu vermindern

Bei den RPE-Zellen, die vor der Bestrahlung für 24 h mit  $20 \mu M$  Minocyclin vorbehandelt wurden, zeigte sich nach 60 min Bestrahlungszeit eine signifikant höhere Abnahme der Vitalität der Zellen im MTT-Assay (Abb. 3a). Außerdem zeigte sich bei diesen Zellen fluoreszenzmikroskopisch eine geringfügige Zunahme der intrazellulären ROS, verglichen ■■■■ mit ■■■■ zu den Zellen, die ohne Vorbehandlung mit Minocyclin be-



**Abb. 3** **a** MTT-Assay (Bestrahlung). **b** MTT-Assay ( $H_2O_2$ -Behandlung). Im Zellvitalitäts-Assay (MTT-Assay) kam es bei den primären RPE-Zellen unter Bestrahlung mit rein weißem Licht zu einer bestrahlungszeitabhängigen Abnahme der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität (MDA). Nach Vorbehandlung der Zellen mit  $20 \mu M$  Minocyclin kam es nach 60 min zu einer signifikanten Abnahme der MDA. Bei den Zellen, die zunächst bestrahlt wurden und direkt im Anschluss mit Minocyclin behandelt wurden, war nach 60 min Bestrahlungszeit die Abnahme der MDA geringer ausgeprägt als bei den Zellen, die nur bestrahlt worden waren **a**. Nach  $H_2O_2$ -Exposition der RPE-Zellen war die MDA der Zellen, die mit Minocyclin vorbehandelt wurden, signifikant weniger reduziert als nach alleiniger  $H_2O_2$ -Exposition **b**.

strahlt worden waren (Abb. 2a). Induktion von Zelltod und Apoptose waren hingegen nicht signifikant erhöht (Abb. 1a, 2a).

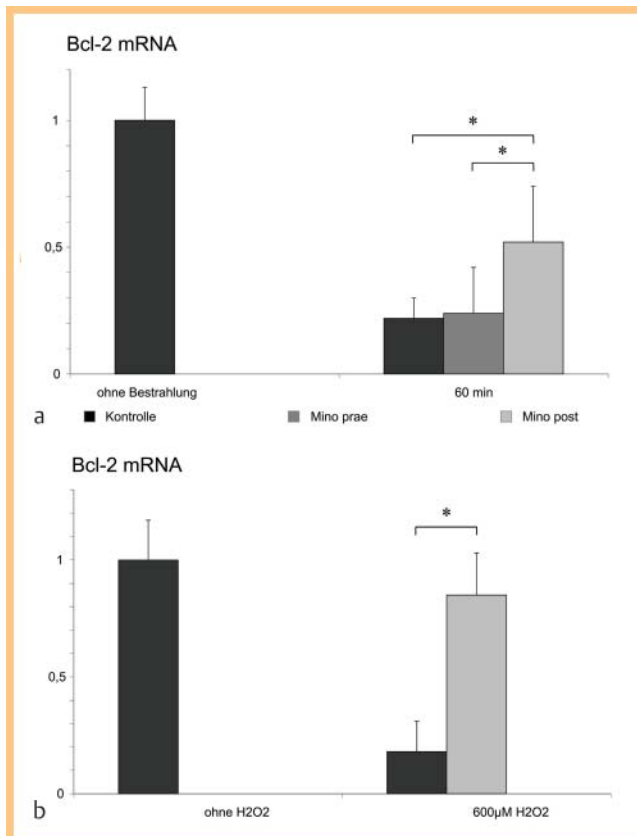
Wenn  $20 \mu M$  Minocyclin direkt nach der Bestrahlung zum Zellkulturmedium hinzugegeben wurde, zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied in der Vitalität der RPE-Zellen im Vergleich zu den ohne Minocyclinbehandlung bestrahlten Zellen (Abb. 3a), die Induktion von ROS, Zelltod und Apoptose war aber signifikant geringer als nach Bestrahlung ohne die anschließende Minocyclin-Behandlung (Abb. 1a, 2a).

### Die Überexpression des pro-apoptotischen BAX und die Reduktion des anti-apoptotisch wirksamen Bcl-2 unter den Bedingungen des oxidativen Stresses sowie nach erhöhter Lichtexposition des RPE kann durch Minocyclin vermindert werden

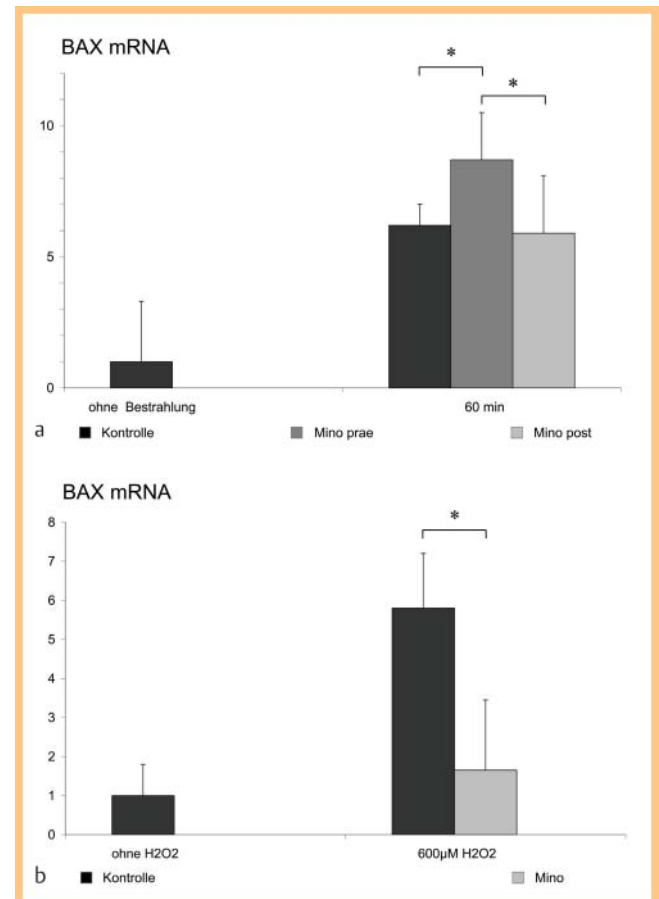
Nach 60 min Bestrahlung mit rein weißem Licht kam es bei den RPE-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der mRNA-Expression des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins sowie zu einer

■ Korrektorexemplar: Veröffentlichung (auch online), Vervielfältigung oder Weitergabe nicht erlaubt! ■

Kernt M et al. Altersbedingte Makuladegeneration: die... Klin Monatsbl Augenheilkd 2010; 227: 1–8



**Abb. 4** a RT-PCR (Bcl-2 mRNA nach Bestrahlung). b RT-PCR (Bcl-2 mRNA nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung). Expression von Bcl-2 mRNA (RT-PCR) nach Bestrahlung der RPE-Zellen mit rein weißem Licht (60 min). Bei den Zellen, die direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit Minocyclin behandelt wurden, kam es zu einer signifikant geringeren Abnahme der Bcl-2 mRNA-Expression **a**. Auch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung führte zu einer signifikanten Abnahme der Bcl-2 mRNA. Wenn die Zellen zuvor mit Minocyclin behandelt worden waren, war diese Bcl-2-Reduktion signifikant geringer ausgeprägt **b**. Statistisch signifikante Unterschiede in der Bcl-2-mRNA-Expression sind durch einen „\*“ gekennzeichnet.



**Abb. 5** a RT-PCR (BAX mRNA nach Bestrahlung). b RT-PCR (BAX mRNA nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung). Expression von BAX mRNA (RT-PCR). Nach Bestrahlung der RPE-Zellen mit rein weißem Licht (60 min) kam es zu einer signifikanten Induktion von BAX mRNA. Bei den Zellen, die vor der Bestrahlung mit Minocyclin behandelt wurden, kam es zu einer signifikant stärker ausgeprägten Induktion von BAX mRNA als nur nach Bestrahlung allein **a**. Auch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung führte zu einer signifikanten Zunahme der BAX-mRNA-Expression. Wenn die Zellen zuvor mit Minocyclin behandelt worden waren, war dieser Anstieg der BAX mRNA signifikant geringer ausgeprägt **b**. Statistisch signifikante Unterschiede in der BAX-mRNA-Expression sind durch einen „\*“ gekennzeichnet.

signifikant erhöhten mRNA-Expression des apoptotischen BAX-Proteins (☉ **Abb. 4a, 5a**). Auch die Behandlung mit 600 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte vergleichbare Effekte (☉ **Abb. 4b** und ☉ **5b**).

Wenn nun die RPE-Zellen mit 20 µM Minocyclin vorinkubiert wurden, kam es nach der Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer signifikanten Abmilderung dieser pro-apoptischen Effekte auf die BAX und Bcl-2-mRNA-Expression (☉ **Abb. 4b, 5b**). Wenn Minocyclin direkt nach der Bestrahlung zum Zellkulturmedium hinzugegeben wurde, zeigte sich bei den RPE-Zellen, die mit rein weißem Licht bestrahlt wurden, ein ähnlicher, wenn auch schwächer ausgeprägter Effekt (☉ **Abb. 4a, 5a**). Hier kam es zu einer signifikanten Zunahme der Bcl-2-mRNA-Expression. Im Vergleich zu den Zellen, die ohne nachträgliche Zugabe von Minocyclin bestrahlt worden waren, zeigte die BAX-mRNA-Expression hingegen keine signifikante Veränderung (☉ **Abb. 4a, 5a**).

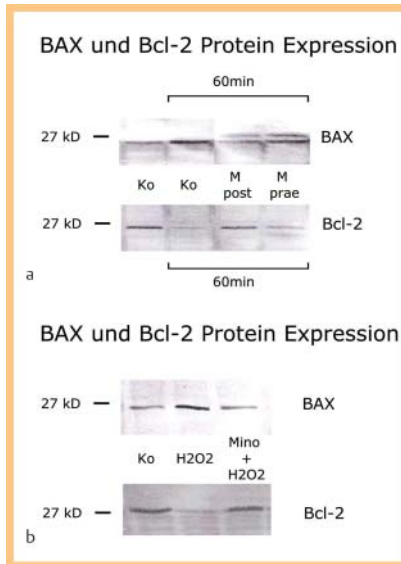
Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse, die nach einer Vorbehandlung mit Minocyclin und anschließender Bestrahlung erzielt wurden: Nach 60 min Bestrahlungszeit kam es zu einer signifikant höheren Induktion der BAX-mRNA-Expression, die Bcl-2-mRNA-Expression war hingegen auf gleich niedrigem Niveau wie das der Zellen, die ohne Vorbehandlung mit Minocyclin bestrahlt worden waren (☉ **Abb. 4a, 5a**).

Die Western-Blot-Analyse bestätigte die Ergebnisse zur mRNA-Expression: Sowohl nach 60 min Bestrahlungszeit als auch nach der Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kam es zu einer deutlichen Induktion von BAX sowie zu einer Reduktion des anti-apoptischen wirksamen Bcl-2-Proteins (☉ **Abb. 6a, b**).

Wenn die RPE-Zellen mit Minocyclin vorinkubiert und dann oxidativem Stress ausgesetzt wurden, kam es zu einer deutlich verminderten Überexpression des BAX-Proteins. Die Bcl-2-Protein-Expression stabilisierte sich auf dem Niveau der nicht mit oxidativem Stress behandelten Zellen (☉ **Abb. 6b**).

Die Zellen, die zunächst bestrahlt wurden und im Anschluss mit Minocyclin behandelt wurden, zeigten ein ähnliches, wenn auch schwächer ausgeprägtes Proteinexpressionsverhalten im Bezug auf BAX und Bcl-2 (☉ **Abb. 6a**).

Bei den Zellen, die mit Minocyclin vorbehandelt wurden und die dann für 60 min bestrahlt wurden, konnten keine Unterschiede in der BAX- und Bcl-2-Protein-Expression im Vergleich zu den nur bestrahlten Zellen gefunden werden (☉ **Abb. 6a**).



**Abb. 6** a Western (Bestrahlung). b Western ( $H_2O_2$ ). Repräsentativer Western-Blot der BAX- und Bcl-2-Protein-Expression in primären RPE Zellen nach Bestrahlung a oder nach  $H_2O_2$ -Exposition b: unbehandelte Zellen (Ko), nach 60 min Lichtexposition (Ko/60 min), nach Vorbehandlung mit Minocyclin (Mino post/60 min) oder wenn Minocyclin vor der Bestrahlung zum Zellkulturmedium hinzugefügt wurde (Mino prae/60 min). Nach  $H_2O_2$ -Behandlung mit (Mino +  $H_2O_2$ ) oder ohne Minocyclin prae-Inkubation ( $H_2O_2$ ).

## Diskussion

Die Prävalenz der AMD steigt mit der zunehmenden Lebenserwartung unserer Gesellschaft. Sie verursacht 8,7% aller Erblindungen im Sinne des Gesetzes und stellt neben dem grauen Star und dem Glaukom die dritthäufigste Ursache für Sehhinderung weltweit dar [30]. Etwa 10% der Patienten mit AMD entwickeln die neovaskuläre Form, die häufig innerhalb kurzer Zeit zu einem deutlichen Verlust an zentraler Sehschärfe führt [31]. Bei der überwiegenden Anzahl der Patienten liegen aber trockene Formen, wie die geografische Atrophie (GA) vor [6, 30–32]. Hierbei kommt es zum Untergang von RPE-Zellen und als Folge davon zu einer Schädigung der Photorezeptoren [33].

Auch wenn die Ergebnisse großer epidemiologischer Studien teils widersprüchlich sind, wird schon seit Langem die kumulative Lichtexposition für die Entstehung der AMD mitverantwortlich gemacht [8–12]. Hierbei scheinen oxidative Prozesse und Apoptose eine wichtige Rolle zu spielen.

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass oxidativer Stress zu Zellschädigung im RPE führen kann und maßgeblich zur Zellalterung beiträgt [10–12]. Die Ergebnisse unserer Untersuchung zeigen nun, dass intensive Bestrahlung mit rein weißem Licht zur Induktion von intrazellulären ROS im RPE, aber auch vermehrter Apoptose führt.

Photochemische Zellschädigung und lichtinduzierte Apoptose sind als Mechanismen für die atrophische Degeneration von RPE-Zellen bekannt [34]. So bewirkt starke Strahlung in Photorezeptoren die Bildung freier Sauerstoffradikale [35–38], die oxidative Zellschädigung hervorrufen kann. Als Folge dessen können apoptotischer Zelltod der Photorezeptoren und im Verlauf auch von RPE-Zellen induziert werden [39–42].

Ein solcher lichtinduzierter apoptotischer RPE-Zellverlust ist nicht zuletzt deswegen besonders schwerwiegend, da beim Menschen das RPE aus postmitotischen Zellen besteht und sich diese somit unter Normalbedingungen lebenslang nicht mehr teilen [43].

Die Apoptose stellt einen zelleigenen, genetisch kontrollierten Mechanismus zur gezielten Selbsttötung dar. Hieraus resultiert

die Aktivierung sogenannter Tumor-Suppressor-Proteine (TSP) und Apoptose-initialisierender Caspasen [44]. Ein wichtiger Mechanismus des programmierten Zelltods resultiert aus der Hochregulation des pro-apoptotisch wirksamen BAX-Proteins. Unsere Studie zeigt eindeutig, dass vermehrte Lichteinwirkung von RPE-Zellen mit einer signifikanten Überexpression des BAX-Proteins einhergeht. Ein Anstieg der BAX-Expression kann wiederum zu einer veränderten Permeabilität der Mitochondrien-Membran führen. Dies bewirkt ein Entweichen von Cytochrom C aus dem mitochondrialen Inneren und Caspasen-Aktivierung. Als Ergebnis werden Zellbestandteile proteolytisch zersetzt und der Zelluntergang eingeleitet [45].

Bcl-2 nimmt eine Schlüsselfunktion zur Inhibierung apoptotischer Prozesse ein. Das Bcl-2-Gen vermag sowohl BAX als auch p53 herunterzuregulieren und kann so diesen wichtigen Schüsselpfad der Apoptose inhibieren [45, 46]. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen aber, dass durch die vermehrte Bestrahlung das Bcl-2-Protein im RPE signifikant herunterreguliert wird. Im Gegensatz dazu konnte in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit in vitro gezeigt werden, dass Bcl-2 die durch kurzweiliges Licht verursachte Apoptose reduzieren helfen kann [21]. Ein interessanter Ansatzpunkt zum wirkungsvollen Schutz für das RPE vor Strahlenschädigung könnte also die pharmakologische Hochregulation von Bcl-2 und eine Unterdrückung der lichtinduzierten Überexpression von BAX sein.

Das halb-synthetische Tetracyclin-Antibiotikum Minocyclin wird seit vielen Jahren aufgrund seiner guten antimikrobiellen, aber auch antientzündlichen Eigenschaften, auch in der Augenheilkunde, eingesetzt [47, 48]. Durch seine antientzündlichen Eigenschaften wurde vereinzelt eine mögliche Anwendung zur Behandlung der AMD vorgeschlagen [49]. Zudem konnte in mehreren experimentellen Studien neben den antibiotischen und antientzündlichen Eigenschaften von Minocyclin zytoprotektive Eigenschaften dieses Wirkstoffs bei einer Reihe neurodegenerativer Erkrankungen wie Multipler Sklerose, Chorea Huntington, Amyotropher Lateralsklerose, nach zerebralem Insult oder traumatischer Hirnschädigung, aber auch nach Sehnerven-Dissektion gezeigt werden [13–18].

In 2 jüngst veröffentlichten Arbeiten konnte auch unsere Arbeitsgruppe zytoprotektive Eigenschaften von Minocyclin auf humane okuläre Zellen belegen. So konnte Minocyclin in vitro wirkungsvoll humane Trabekelwerkzellen (TMC) und Astrozyten aus dem Sehnervenkopf (ONHA) vor 2 potenziellen Risikofaktoren, die für die Entstehung und Progression des Glaukoms von Bedeutung sind, schützen: dem oxidativen Stress und den negativen Einflüssen von bestimmten Wachstumsfaktoren [50–52]. Auch an humanen kornealen Endothelzellen (CEC) konnten wir einen potenziellen Schutzmechanismus vor oxidativen Einflüssen auf das Hornhautendothel durch Minocyclin demonstrieren, der mit einer Induktion der anti-apoptotischen Proteine, Bcl-2 und XIAP, einherging [28]. Die hier vorgestellte Studie zeigt nun deutlich, dass Minocyclin auch auf das menschliche RPE schützende Effekte hat. So konnten sowohl der vermehrte Zelltod und die Abnahme der Vitalität der RPE-Zellen unter den Bedingungen des oxidativen Stresses durch Minocyclin deutlich reduziert werden, zum anderen wurde aber auch die Induktion von Apoptose unter Minocyclinschutz nachhaltig gemindert.

Auch die negativen Einflüsse des Lichtes auf Zelltod und Apoptose ließen sich durch die Zugabe von Minocyclin nach der Bestrahlung signifikant mildern und gingen mit einer signifikanten Induktion des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins sowie

■ Korrektorexemplar: Veröffentlichung (auch online), Vervielfältigung oder Weitergabe nicht erlaubt! ■

Kernt M et al. Altersbedingte Makuladegeneration: die... Klin Monatsbl Augenheilkd 2010; 227: 1–8

einer deutlichen Abschwächung der lichtinduzierten BAX-Überexpression einher. Wenn die RPE-Zellen aber vor der Bestrahlung mit Minocyclin inkubiert wurden, so zeigte sich insbesondere nach längeren Bestrahlungszeiten (>45 min) eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Licht, die auch mit einer vermehrten Induktion von BAX und einer Abschwächung der Bcl-2-Expression einherging.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Minocyclin auch am menschlichen RPE protektive Eigenschaften besitzt, welche eine Schädigung durch oxidative Prozesse reduzieren helfen kann, welche auch bei der AMD eine pathogenetische Rolle spielen. Da Minocyclin in unserer Studie aber auch photosensibilisierende Eigenschaften auf das RPE besaß, muss ein möglicher therapeutischer Einsatz dieser Substanz bei AMD weiter evaluiert werden.

## Danksagung

Die Autoren danken Frau Katja Obholzer für hervorragende technische Unterstützung.

Diese Studie wurde im Rahmen der „Themenbezogene Forschungsförderung für innovative wissenschaftliche Projekte in der Augenheilkunde 2008“ durch die Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) sowie eine Förderung des Herrmann Wacker Fonds unterstützt.

**Interessenkonflikt:** Nein

## Literatur

- Hawkins BS, Bird A, Klein R et al. Epidemiology of age-related macular degeneration. *Mol Vis* 1999; 5: 26
- Klein R, Klein BE, Jensen SC et al. Age-related maculopathy in a multiracial United States population: the National Health and Nutrition Examination Survey III. *Ophthalmology* 1999; 106: 1056–1065
- Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355: 1419–1431
- Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36: 336–339
- A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related cataract and vision loss: AREDS report no. 9. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 1439–1452
- Klein R, Peto T, Bird A et al. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2004; 137: 486–495
- Schmidt S, Hauser MA, Scott WK et al. Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 852–864
- Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE. Sunlight and age-related macular degeneration. The Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 514–518
- Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 1992; 99: 933–943
- Beatty S, Murray IJ, Henson DB et al. Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a Northern European population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 439–446
- Cai J, Nelson KC, Wu M et al. Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res* 2000; 19: 205–221
- Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD et al. Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis* 1999; 5: 32
- Chen M, Ona VO, Li M et al. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 2000; 6: 797–801
- Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M et al. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 15769–15774
- Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 2002; 417: 74–78
- Sanchez Mejia RO, Ona VO, Li M et al. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery* 2001; 48: 1393–1399; discussion 1399–1401
- Popovic N, Schubart A, Goetz BD et al. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Ann Neurol* 2002; 51: 215–223
- Du Y, Ma Z, Lin S et al. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 14669–14674
- Kernt M, Hirneiss C, Neubauer AS et al. ■■■■. *Ophthalmologe* 2009; ■■■■: ■■■■
- Holz FG, Pauleikhoff D, Klein R et al. Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am J Ophthalmol* 2004; 137: 504–510
- Sparrow JR, Cai B. Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by Bcl-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1356–1362
- Barishak YR. In vitro behaviour of the pigmented cells of the retina and uvea of the adult human eye. *Acta Ophthalmol* 1960; 38: 339–346
- Flood MT, Gouras P, Kjeldbye H. Growth characteristics and ultrastructure of human retinal pigment epithelium in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980; 19: 1309–1320
- Nilsson SE, Sundelin SP, Wihlmark U et al. Aging of cultured retinal pigment epithelial cells: oxidative reactions, lipofuscin formation and blue light damage. *Doc Ophthalmol* 2003; 106: 13–16
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55–63
- Kernt M, Neubauer AS, Liegl R et al. Cytoprotective effects of a blue light-filtering intraocular lens on human retinal pigment epithelium by reducing phototoxic effects on vascular endothelial growth factor-alpha, Bax, and Bcl-2 expression. *J Cataract Refract Surg* 2009; 35: 354–362
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787–790
- Kernt M, Hirneiss C, Neubauer AS et al. Minocycline is cytoprotective in human corneal endothelial cells and induces anti-apoptotic B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) and X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP). *Br J Ophthalmol* ■■■■; 94: 940–946
- Kernt M, Hirneiss C, Wolf A et al. Indocyanine green increases light-induced oxidative stress, senescence, and matrix metalloproteinases 1 and 3 in human RPE cells. *Acta Ophthalmol* ■■■■; ■■■■: ■■■■
- Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ* 2004; 82: 844–851
- Ferris3rd FL, Fine SL, Hyman L. Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 1640–1642
- Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC et al. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004; 122: 477–485
- Knudtson MD, Klein R, Klein BE et al. Location of lesions associated with age-related maculopathy over a 10-year period: the Beaver Dam Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2135–2142
- Algvere PV, Marshall J, Seregard S. Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard. *Acta Ophthalmol Scand* 2006; 84: 4–15
- Chow CK, Chen LH, Thacker RR et al. Dietary vitamin E and pulmonary biochemical responses of rats to cigarette smoking. *Environ Res* 1984; 34: 8–17
- Chow CK, Thacker RR, Changchit C et al. Lower levels of vitamin C and carotenes in plasma of cigarette smokers. *J Am Coll Nutr* 1986; 5: 305–312
- Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64: 111–126
- Dorey CK, Delori FC, Akeo K. Growth of cultured RPE and endothelial cells is inhibited by blue light but not green or red light. *Curr Eye Res* 1990; 9: 549–559
- Demontis GC, Longoni B, Marchiafava PL. Molecular steps involved in light-induced oxidative damage to retinal rods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 2421–2427
- Grimm C, Wenzel A, Williams T et al. Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 497–505

■ Korrektorexemplar: Veröffentlichung (auch online), Vervielfältigung oder Weitergabe nicht erlaubt! ■

Kernt M et al. Altersbedingte Makuladegeneration: die... *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2010; 227: 1–8

- 41 Hafezi F, Marti A, Munz K *et al.* Light-induced apoptosis: differential timing in the retina and pigment epithelium. *Exp Eye Res* 1997; 64: 963–970
- 42 Jin GF, Hurst JS, Godley BF. Hydrogen peroxide stimulates apoptosis in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 2001; 22: 165–173
- 43 Katz ML. Potential role of retinal pigment epithelial lipofuscin accumulation in age-related macular degeneration. *Arch Gerontol Geriatr* 2002; 34: 359–370
- 44 Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323–331
- 45 Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293–299
- 46 Hockenbery DM. The bcl-2 oncogene and apoptosis. *Semin Immunol* 1992; 4: 413–420
- 47 Klein NC, Cunha BA. Tetracyclines. *Med Clin North Am* 1995; 79: 789–801
- 48 Ryan ME, Greenwald RA, Golub LM. Potential of tetracyclines to modify cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1996; 8: 238–247
- 49 Wirostko E, Wirostko WJ, Wirostko BM. Age-related macular degeneration is an inflammatory disease possibly treatable with minocycline. *Acta Ophthalmol Scand* 2004; 82: 243–244
- 50 Kernt M, Neubauer AS, Eibl KH *et al.* Minocycline is cytoprotective in human trabecular meshwork cells and optic nerve head astrocytes by increasing expression of XIAP, survivin, and Bcl-2. *Clin Ophthalmol* ■■ ■; 4: 591–604
- 51 Cao Y, Wei H, Pfaffl M *et al.* Apoptosis of human trabecular meshwork cells induced by transforming growth factor-beta2 in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004; 24: 87–89, 94
- 52 Kumar DM, Agarwal N. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence. *J Glaucoma* 2007; 16: 334–343