

HPETE, ein Arachidonsäure-Metabolit, induziert Apoptose in der Rattenretzhaut in vitro

Farhad Hafezi¹, Jörg-Joachim Reinboth^{1,2}, Andreas Wenzel¹, Kurt Münz¹, Charlotte E. Remé¹

¹ Universitäts-Augenklinik Zürich, Labor für Zellbiologie der Netzhaut, Frauenklinikstraße 24, CH-8091 Zürich (Direktor: Prof. Dr. B. Gloor)

² Jetzige Adresse: Universitäts-Augenklinik Göttingen, Robert-Koch-Straße 40, D-37075 Göttingen (Direktor: Prof. M. Vogel)

Zusammenfassung

Hintergrund Apoptose ist ein genregulierter Zelltod, der bei Netzhauterkrankungen wie der Retinitis pigmentosa, der Netzhautablösung sowie der proliferativen Vitreoretinopathie eine Rolle spielt. Ein besseres Verständnis der Regulation des apoptotischen Zelltodes könnte über eine Reduktion der Zelltodrate ein Eingreifen in den Krankheitsverlauf von Netzhauterkrankungen ermöglichen. In verschiedenen anderen Zellsystemen konnte beobachtet werden, daß oxidativer Streß über oxidierte Arachidonsäure-Metabolite Apoptose auslösen kann. Studien in unserem Labor zeigten, daß weißes Fluoreszenzlicht Apoptose in den Photorezeptoren der Rattenretzhaut in vivo auslöst. Wir beobachteten zudem die Freisetzung von Arachidonsäure und die Bildung von Arachidonsäure-Metaboliten bei der Belichtung von Ratten-Netzhäuten. Daher könnte die lichtinduzierte Apoptose der Photorezeptorzellen durch Arachidonsäure oder seine Metabolite vermittelt sein.

Material und Methoden Isolierte Rattenretzhäute wurden mit und ohne Zusatz von 30 µmol 5S-Hydroxyperoxytetraensäure (5S-HPETE) für 60, 120 und 180 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Netzhäute licht- und elektronenmikroskopisch untersucht und die Apoptoserate in den Photorezeptoren quantifiziert.

Ergebnisse Der Arachidonsäure-Metabolit 5S-HPETE löst Apoptose in den Photorezeptoren der Rattenretzhaut in vitro aus. Es wurde ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate während der Inkubation mit 5S-HPETE im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet.

Schlußfolgerung Durch Licht freigesetzte Arachidonsäure-Metabolite stellen potentielle Botenstoffe für die Apoptose von Photorezeptoren dar.

Schlüsselwörter Arachidonsäure – Lichtschaden – Apoptose – 5S-HPETE – Ratte – Netzhaut – Photorezeptor

HPETE, an arachidonic acid metabolite, induces apoptosis in the rat retina in vitro

Background Apoptosis is a gene-regulated mode of cell death which gains increasing importance in retinal pathologies such as retinitis pigmentosa, retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy. A better understanding of the regulation of apoptosis could imply the means to reduce photoreceptor cell death and thereby provide therapeutic strategies to influence the time course of retinal diseases. Previous studies in our laboratory demonstrated that light induces apoptosis in the rat retina in vivo as a function of light dose. In several cell systems, oxidative stress including oxygenated metabolites of arachidonic acid (AA) was found to evoke apoptosis. We have observed a light-elicited release of AA and the subsequent formation of its metabolites in the rat retina. Therefore, AA and its metabolites appeared to be suitable candidates for the induction of apoptosis during light exposure.

Materials and methods Isolated rat retinas were incubated for 60, 120 and 180 min, respectively, with and without the addition of 30 µmol 5S-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE). Retinas were then processed for light- and electron microscopy and examined for the morphological signs of apoptosis. The rate of apoptosis in the outer nuclear layer was assessed quantitatively.

Results 5S-HPETE induces apoptosis of photoreceptors in the rat retina in vitro. Quantitative analysis revealed a significant increase in the rate of apoptosis of 5S-HPETE-treated retinas when compared to untreated controls.

Conclusion Arachidonic acid metabolites released upon light exposure may represent messenger candidates for apoptosis in the retina.

Key words arachidonic acid – light damage – apoptosis – 5S-HPETE – rat – retina – photoreceptors

Zelltod durch Apoptose steht seit mehreren Jahren im Rampenlicht der Forschung. Im Gegensatz zur Nekrose, die mit Zell-Lyse und kollateralen Gewebsschäden in Form einer Entzündung einhergeht, wird der apoptotische Zelltod auch als „stiller Tod“ einzelner Zellen bezeichnet und kann durch spezifische morphologische (21) und biochemische (4, 19) Kriterien klar von Nekrose abgegrenzt werden. Apoptose wird sowohl in vivo als auch in vitro in einer Reihe verschiedener Gewebe und Zelltypen beobachtet und kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Apoptose ist ein genregulierter Prozeß; die Regulation erfolgt entweder über eine de novo-Genexpression oder aber über die Aktivierung

konstitutiv exprimierter Effektorsysteme wie beispielsweise Protease-Kaskaden (20). Bisher sind nur wenige Kandidatengene, die für die Regulierung von Apoptose in der Netzhaut von Bedeutung sein könnten, identifiziert worden; Signalwege und Effektormoleküle sind so gut wie unbekannt. Ein besseres Verständnis des apoptotischen Zelltodes könnte zu Therapieansätzen in der Behandlung von Netzhautdegenerationen führen. Vor kurzem konnte unser Labor nun zeigen, daß das Proto-Onkogen *c-fos* essentiell für die lichtinduzierte Photorezeptordegeneration durch Apoptose ist (6). Mäuse, denen ein funktionelles *c-fos* Gen fehlt (*c-fos* knockouts), zeigten nach Lichtexposition eine völlig

normale Netzhautstruktur, während Kontrolltiere mit intaktem *c-fos*-Gen (*c-fos* wild-type) eine massive Apoptose der Photorezeptoren und damit eine schwere Netzhautdegeneration aufwiesen.

In der Netzhaut wurde Zelltod durch Apoptose der Photorezeptoren unter anderem während der Entwicklung (22), in Tiermodellen für Retinitis Pigmentosa (RP) (12) und in Spenderaugen von an RP erkrankten Verstorbene nachgewiesen (9).

Unser Labor konnte kürzlich zeigen, daß weißes Fluoreszenzlicht über einen noch unbekannten Signalweg Apoptose in der Säugetiernetzhaut auslöst (5, 6, 17). Arachidonsäure (AA) und seine oxidierten Metabolite, wie zum Beispiel 5S-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HPETE), werden von uns aus folgenden Gründen als potentielle Mediatoren lichtinduzierter Photorezeptor-Apoptose angesehen. AA und seine oxidierten Metabolite induzieren Apoptose in anderen Systemen (1). Arachidonsäure wird bei Belichtung aus Membran-Phospholipiden der Rattennetzhaut freigesetzt (8). Bei Belichtung von Ratten-Netzhäuten *in vitro* kommt es zur Bildung von 5S-HPETE aus Arachidonsäure (15). Aus diesen Gründen haben wir in dieser Pilotstudie den Effekt von 5S-HPETE auf die Photorezeptor-Apoptose in einem *in vitro*-Modellsystem der isolierten Ratte-Netzhaut untersucht (14).

Die Netzhaut enthält hohe Mengen antioxidativ wirkender Enzyme und Radikalfänger und weist damit einen gewissen Schutz vor oxidativen Schäden auf. Diese Schutzmechanismen scheinen allerdings nicht immer auszureichen, denn eine überschwellige Lichtexposition führt im experimentellen Tierversuch zu degenerativen Netzhautveränderungen (11, 17). Verschiedene Vorgänge könnten hierfür verantwortlich gemacht werden: 1. eine akute starke Belastung könnte die antioxidativen Schutzsysteme erschöpfen; 2. eine Reduktion antioxidativer Mechanismen im Alter (7, 10) sowie 3. eine interindividuelle Variabilität der Menge antioxidativ wirkender Enzyme in der Netzhaut (2). Aus diesen Gründen haben wir, im Vergleich zu Studien in anderen Systemen (18), höhere Mengen an 5S-HPETE verwendet.

Material und Methoden

Alle im Laufe dieser Studie durchgeführten Tierversuche sind nach den Richtlinien der „ARVO-Konvention über den Gebrauch von Tieren in der Forschung auf dem Gebiet der Augenheilkunde“ durchgeführt worden.

Isolierte Rattennetzhäute wurden für 60, 120 und 180 Minuten in einem speziellen Inkubationsmedium (15) mit und ohne Zusatz von 30 μ mol 5S-HPETE inkubiert ($N=5$ pro Gruppe und Zeitpunkt). Im Anschluß an die Inkubation wurden die Netzhäute in 2,5% Glutaraldehyd (0,1 M Cacodylat-Puffer) fixiert und mit Osmiumtetroxid postfixiert. Halbdünnschnitte wurden mit Methylenblau und Dünnschnitte mit Uranylacetat

angefärbt und unter einem Zeiss Axiophot, bzw. einem Hitachi 7000-Elektronenmikroskop auf typische apoptotische Veränderungen untersucht. Morphologisch ist Apoptose durch den Tod einzelner Zellen mit progressiver Chromatin- und Zytoplasmakondensierung definiert (21).

Die verschiedenen Stadien der Kernchromatin-Kondensierung reichen von einer deutlichen Reduktion der peripheren Kernchromatins bis hin zu stark kondensierten und geschrumpften Strukturen, gefolgt vom Zerfall in die sogenannten apoptotischen Körper.

Für die **quantitative Analyse** wurden 10 elektronenmikroskopische Aufnahmen der Äußeren Körnerschicht (Vergrößerung 3000-fach) randomisiert von einem Schnitt angefertigt. Die Anzahl apoptotischer Zellkerne wurde auf jeder Fotografie gezählt, in Beziehung zur Gesamtanzahl der Photorezeptorkerne pro Photographie gesetzt und in Prozent Apoptose pro Photographie ausgedrückt. Apoptotische Körper wurden von der Zählung ausgeschlossen. Die Auszählung erfolgte durch einen der Autoren (J.R.), der in Unkenntnis über die experimentelle Bedingung der von ihm ausgezählten Schnitte war. Von den 10 Photographien pro Netzhaut ($N=5$ Netzhäute) wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet und in Prozent Apoptose ausgedrückt. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der experimentellen und der entsprechenden Kontrollgruppe nach 120 und 180 Minuten Inkubation wurden durch den unpaarigen Student t-Test bestätigt.

Ergebnisse

Kontrollnetzhäute, die für 60, 120 und 180 Minuten inkubiert worden waren, zeigten eine reguläre Chromatinstruktur der Zellkerne der Äußeren Körnerschicht (**Abb. 1a**). Im Gegensatz dazu konnte bei Inkubation mit 30 μ mol 5S-HPETE für 60, 120 und 180 Minuten eine zunehmende Anzahl von Photorezeptor-Zellkernen in verschiedenen Stadien der Kernchromatin-Kondensierung nachgewiesen werden (**Abb. 1 b,c,d (*)**).

Die Innere Körnerschicht war, abgesehen von vereinzelten geschwollenen Zellen, unauffällig. Die Quantifizierung der apoptotischen Zellkerne in der Äußeren Körnerschicht ergab statistisch signifikante Unterschiede: Kontrollnetzhäute zeigten nach 60 Minuten (0%) keine Zeichen der Apoptose und nach 120 ($0,8 \pm 0,4\%$) und 180 Minuten ($1,9 \pm 0,98\%$) eine sehr geringe Anzahl apoptotischer Zellen, während mit 5S-HPETE behandelte Netzhäute nach 60 Minuten ($3,06 \pm 0,7\%$) eine ausgeprägte Apoptoserate aufwiesen, die nach 120 ($5,3 \pm 0,5$) und 180 Minuten ($7,22 \pm 1,2\%$) im Vergleich zu den Kontrollnetzhäuten statistisch signifikant zunahm ($p < 0,05$) (**Abb. 2**).

Diskussion

Diese Resultate zeigen, daß der oxidative Arachidonsäure-Metabolit 5S-HPETE Apoptose in der Rattennetzhaut *in vitro* induzieren kann.

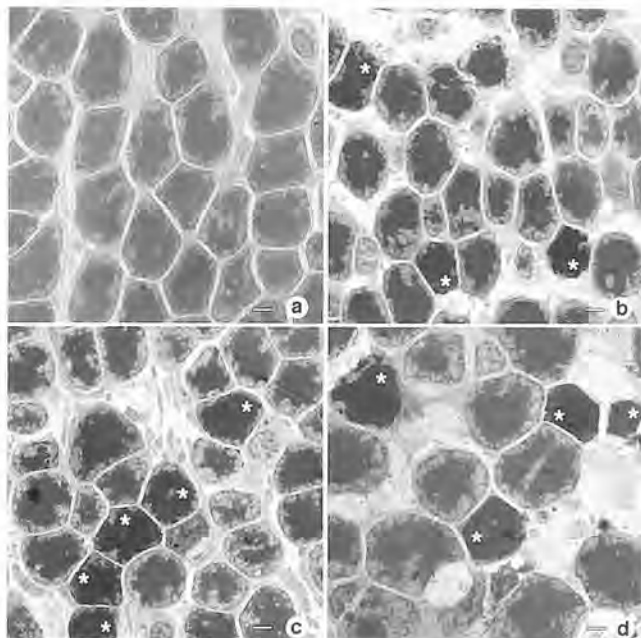


Abb. 1 a-d Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kontrollnetzhaut und mit 5S-HPETE behandelten Netzhäuten, die apoptotische Kerne aufweisen. **a)** Kontrollnetzhaut, 120 Minuten inkubiert. Die Photorezeptor-Zellkerne weisen eine normale Chromatinstruktur mit einem dunklen Zentrum und einer helleren Peripherie auf. **b)** Mit 5S-HPETE behandelte Netzhaut, 60 Minuten inkubiert. Frühe Apoptosestadien mit deutlicher Chromatin-Kondensierung sind sichtbar (*). **c-d)** Mit 5S-HPETE behandelte Netzhäute, 120 Minuten (c) und 180 Minuten (d) inkubiert. Verschiedene Stadien der Chromatin-Kondensierung in apoptotischen Zellkernen (*) sind erkennbar. Der Balken repräsentiert 1 μ m

Quantitative Analyse

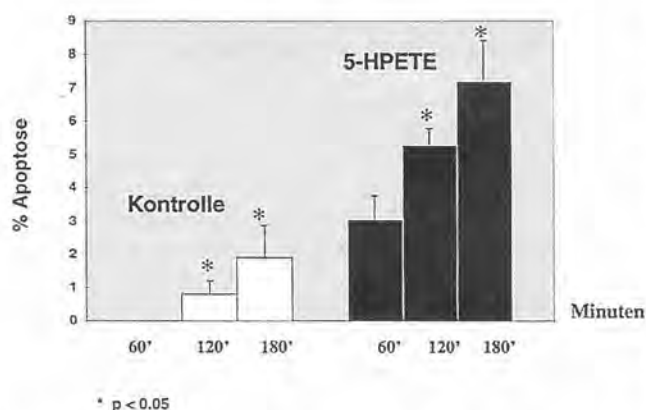


Abb. 2 Quantitative Analyse der Apoptoserate in der Äußeren Korperschicht der Rattenretina nach Inkubation mit 30 μ mol 5S-HPETE für 60, 120 und 180 Minuten. Es konnte eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellkerne in der mit 5S-HPETE behandelten Gruppe (schwarze Säulen) sowie eine schwache Zunahme in der Kontrollgruppe (weiße Säulen) beobachtet werden. Der Student-t-Test bestätigte die Signifikanz der Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der mit 5S-HPETE behandelten Gruppe für die verschiedenen Zeitpunkte ($p < 0.05$)

In einer vorangegangenen Studie über den Zeitverlauf der Apoptose bei lichtinduzierter Photorezeptor-Degeneration in vivo konnten wir zeigen, daß die morpholo-

gischen Zeichen der Apoptose in den Photorezeptoren den biochemischen Kriterien (zum Beispiel die internukleosomale DNA-Fragmentierung) circa 5 Stunden vorangehen. Da die optimale Funktionsfähigkeit von Netzhäuten in unserem Modell ebenfalls etwa 5 Stunden beträgt, konnten die biochemischen Kriterien der Apoptose in dieser Studie leider nicht dargestellt werden. Daher wurde die Apoptose allein über die morphologischen Kriterien definiert und quantifiziert. Diese stimmten allerdings völlig mit den morphologischen Veränderungen überein, die wir in unserem In-vivo-Modell im Verlauf der Photorezeptor-Apoptose zusammen mit den biochemischen Kriterien beobachten konnten (5, 6). Wir arbeiten daher daran, die Funktionsfähigkeit der Netzhäute in vitro zeitlich zu verlängern.

Da die Bildung von 5S-HPETE in der Netzhaut durch Licht ausgelöst wird (15), ist diese Substanz ein potentieller Mediator lichtinduzierter Photorezeptor-Apoptose. Neben der Freisetzung und Metabolisierung von Arachidonsäure induziert die Behandlung mit weißem Fluoreszenzlicht auch die Bildung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoff-Zwischenprodukten (3), welche in anderen Systemen Apoptose auslösen können (1). Daher könnten antioxidativ wirkende Substanzen sowie Phospholipase-Inhibitoren (8) schützend vor lichtinduzierter Apoptose wirken (Übersichtsarbeiten siehe ((11, 16))).

Schlußfolgerung

Diese Pilotstudie zeigt, daß die Freisetzung von HPETE Photorezeptor-Apoptose in vitro induziert. Wir haben vor kurzem beobachtet, daß das Protoonkogen *c-fos* essentiell für lichtinduzierte Photorezeptor-Apoptose in vivo ist (6). Interessanterweise bewirken oxidative Metabolite der Arachidonsäure in anderen Systemen eine Zunahme der *c-fos*-Expression (13). Unsere Hypothese ist es nun, daß dieser Mechanismus auch in der Netzhaut ablaufen könnte. Daher wird der Nachweis einer zunehmenden *c-fos*-Expression durch 5S-HPETE in der Netzhaut das nächste Ziel der auf diese Arbeit folgenden Studien sein.

Danksagung

Unsere Forschung wird vom Schweizerischen Nationalfonds, Nr. 31-40791.94, von der Sandoz-Stiftung, Basel, Schweiz, der Bruppacher-Stiftung, Zürich, Schweiz sowie von Ian und Caroline Leaf und Familie, Gland, Schweiz, unterstützt. Zudem danken wir Herrn Prof. Dr. B. Gloor für seine ständige Unterstützung.

Literatur

- Butke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today* 1994; 15 (1):7-10
- De La Paz MA, Zhang J, Fridovich I. Antioxidant enzymes of the human retina: effect of age on enzyme activity of macula and periphery. *Curr Eye Res* 1996; 15 (3):273-278

- ³ Dillon J. The photophysics and photobiology of the eye. *J Photochem Photobiol B* 1991; 10 (1-2): 23-40
- ⁴ Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119 (3): 493-501
- ⁵ Hafezi F, Marti A, Munz K, Remé CE. Light - induced apoptosis: differential timing in the retina and pigment epithelium. *Exp Eye Res* 1997b; 64: 963-970
- ⁶ Hafezi F, Steinbach JP, Marti A, Munz K, Wang Z-Q, Wagner EF et al. Absence of *c-fos* prevents light - induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nature Medicine* 1997; 3: 346-349
- ⁷ Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992; 6: 2675-2683
- ⁸ Jung H, Remé CE. Light-evoked arachidonic acid release in the retina: illuminance/duration dependence and the effects of quinacrine, mellitin and lithium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1994; 32: 167-175
- ⁹ Li Z-Y, Milam AH. Apoptosis in retinitis pigmentosa. In: Anderson RE, LaVail MM, and Hollyfield JG, Hrsg. *Retinal Degeneration*. New York, London: Plenum Press, 1995: 1-8
- ¹⁰ Marshall J. Radiation and the ageing eye. *Ophthalmic Physiol Opt* 1985; 5 (3): 241-263
- ¹¹ Organisciak DT, Winkler BS. Retinal light damage: practical and theoretical considerations. In: Osborne NN and Chader GJ, Hrsg. *Progress in Retinal and Eye Research*. Oxford, New York, Tokyo: Pergamon Press, 1994: 1-29
- ¹² Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 974-978
- ¹³ Rao GN, Lassègue B, Griendling KK, Alexander RW, Berk BC. Hydrogen peroxide-induced *c-fos* expression is mediated by arachidonic acid release: role of protein kinase C. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 1259-1263
- ¹⁴ Reinboth JJ, Clausen M, Remé CE. Light elicits the release of docosahexaenoic acid from membrane phospholipids in the rat retina in vitro. *Exp Eye Res* 1996; 63: 277-284
- ¹⁵ Reinboth JJ, Gautschi K, Clausen M, Remé CE. Lipid mediators in the rat retina: light exposure and trauma elicit leukotriene B 4 release in vitro. *Curr Eye Res* 1995; 14: 1001-1008
- ¹⁶ Remé CE, Hafezi F, Marti A, Munz K, Reinboth J-J. Light damage to retina and pigment epithelium. In: Marmor MF and Wolfensberger TJ, Hrsg. *The retinal pigment epithelium, current aspects of function and disease*. Oxford: Oxford University Press, 1998 (in press)
- ¹⁷ Remé CE, Reinboth JJ, Clausen M, Hafezi F. Light damage revisited: converging evidence, diverging views? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995; 33: 2-11
- ¹⁸ Sandstrom PA, Tebbey PW, Van Cleave S, Butke TM. Lipid hydroperoxides induce apoptosis in T cells displaying a HIV-associated glutathione peroxidase deficiency. *J Biol Chem* 1994; 269 (2): 798-801
- ¹⁹ Strange R, Li F, Saurer S, Burkhardt A, Friis RR. Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development* 1992; 115 (1): 49-58
- ²⁰ Weil M, Jacobson MD, Coles HSR, Davies TJ, Gardener RL, Raff KD et al. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* 1996; 133: 1053-1059
- ²¹ Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306
- ²² Young RW. Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J Comp Neurol* 1984; 229: 362-373

Buchbesprechung

U. Pleyer, Chr. Hartmann, W. Sterry (Hrsg.): **Oculodermal diseases – Immunology of bullous oculo-muco-cutaneous disorders**. Aëolus Press Science Publishers, Buren, The Netherlands, 1997. 340 Seiten. Dfl. 180/US\$ 90. ISBN 90-7043-020-7

Das vorliegende Werk befaßt sich in insgesamt 19 Kapiteln mit okulo-muko-kutanen blasenbildenden Erkrankungen, wofür es den Herausgebern gelungen ist eine sehr renommierte Gruppe internationaler Autoren zu gewinnen. Das Buch wendet sich sowohl an Ophthalmologen als auch an Dermatologen.

Zu Beginn wird in mehreren grundlegenden Kapiteln der heutige Kenntnisstand zur Funktion und Physiologie des Immunsystems der Haut dargestellt. Es folgen Abschnitte zu Autoimmunität und immunologischem Privileg des Auges und der Cornea im speziellen. Nach zwei weiteren Kapiteln, die sich mit morphologischen Aspekten der Haut und Schleimhäute befassen, schließen sich im zweiten Teil des Buches Abschnitte zu typischen Krankheitsbildern an. Im einzelnen werden medikamenteninduzierte Erkrankungen wie das Erythema exudativum multiforme, das Stevens-Johnson-Syndrom und die toxische epidermale Nekrolyse behandelt. Darüberhinaus werden die Pathophysiologie, Klinik und Therapie des vernarbenden okulären Pemphigoids ausführlich abgehandelt. Her-

vorzuheben sind weiterhin Kapitel zur Gentherapie blasenbildender Hauterkrankungen und zu Grundlagen in der chirurgischen Therapie okulärer Manifestationen der Erkrankungen.

Insgesamt bietet das vorliegende Buch einen hervorragenden Einblick in den aktuellen Stand der Grundlagenforschung und Therapie dieser interessanten Gruppe von Krankheitsbildern. Die meisten Kapitel sind erfreulicherweise übersichtlich gegliedert und jeweils mit einer kurzen Einführung versehen, so daß auch dem zuvor nicht mit der Forschung auf diesem Gebiet Vertrauten der Einstieg in die Materie einfach gemacht wird. Lesern, die sich darüberhinaus weiter informieren möchten oder wissenschaftliches Interesse haben, erleichtern die den Kapiteln angefügten, überwiegend sehr ausführlichen Literaturverzeichnisse die Arbeit.

Zusammengefaßt kann das Buch allen, die in ihrer täglichen Arbeit mit den häufig sehr schwerwiegenden Problemen der Patienten mit blasenbildenden Erkrankungen konfrontiert werden, ohne Einschränkung empfohlen werden.

Georg Häring, Kiel