

Marion Bergmann

Dr. sc. hum.

## **Wirkung des Retinoids A2E auf lysosomale Funktionen und Phagozytose-Prozesse in kultivierten retinalen Pigmentepithelzellen**

Geboren am 20.05.1969

Reifeprüfung am 11.05.1988

Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1991/92 bis SS 1998

Vordiplom am 15.10.1993 an der Universität Heidelberg

Diplom am 13.07.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Kopitz

Die Altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine Erkrankung des menschlichen Auges, die bei älteren Menschen der Industrienationen heute die häufigste Erblindungsursache darstellt. Als ursächlich für die Entstehung einer Altersabhängigen Makuladegeneration wird die erhöhte Einlagerung des Alterspigments Lipofuscin in das retinale Pigmentepithel (RPE) des Auges angesehen, die schließlich zu einem Funktionsverlust der RPE Zellen, gefolgt von einem Zugrundegehen dieser und der darüber liegenden Photorezeptorschicht führt. Lipofuscin ist ein heterogenes Gemisch verschiedener Moleküle. Die genaue Zusammensetzung ist nicht bekannt. Es besteht hauptsächlich aus Proteinen, Lipiden und mindestens 10 verschiedenen Chromophoren. Der einzig identifizierte Bestandteil des Lipofuscin ist das orange-emittierende Retinoid N-retinyliden-N-retinylethanolamin, kurz A2E, das als ein Hauptfluorophor des Lipofuscin angesehen wird. A2E reichert sich in Lysosomen der RPE Zellen an, hemmt dort den Protein- und Glykosaminoglykanabbau und hebt den sauren pH Wert in den neutralen Bereich. Über den genauen Pathomechanismus von A2E war bisher nichts bekannt. Verschiedene Wirkweisen des A2E wurden in Betracht gezogen, ohne jedoch experimentell belegt zu sein: ein direkter hemmender Effekt auf die lysosomalen Enzyme, die Möglichkeit eines Detergenzeffekts auf die Lysosomenmembran und die Hemmung der lysosomalen Protonenpumpe wurden als mögliche Mechanismen angesehen.

Unter Berücksichtigung der bisherigen Kenntnisse wurden zur Klärung des Pathomechanismus von A2E in RPE Zellen in der vorliegenden Arbeit entsprechende Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurden bei 23 repräsentativen lysosomalen Enzymen im Zellhomogenat Aktivitätsbestimmungen unter Einfluß von A2E durchgeführt. Mit den Ergebnissen konnte eine direkte Beeinflussung lysosomaler Hydrolasen durch A2E nahezu ausgeschlossen werden, da selbst hohe A2E-Konzentrationen von 10 µM keinerlei Einfluß auf die Aktivität der untersuchten Enzyme hatten. Zur Untersuchung des Effekts von A2E auf das

lysosomale Kompartiment wurde im Anschluß eine Methode zur Isolierung intakter Lysosomen aus kultivierten humanen RPE Zellen etabliert. Die gewonnene Lysosomenfraktion zeigte eine hohe Reinheit und die Organellen eine gute Stabilität. Damit wurden Messungen zu membranschädigenden Eigenschaften von A2E und Bestimmungen zum Effekt von A2E auf die lysosomale Protonenpumpe durchgeführt. Für A2E-Konzentrationen von  $> 2,5 \mu\text{M}$  konnte eine Membranschädigung der Lysosomen nachgewiesen werden. Zur Ergänzung wurde die Stabilität weiterer zellulärer Membranen unter steigenden A2E-Konzentrationen untersucht. Dabei wurde für die Mitochondrien eine Störung der Membranintegrität ab einer A2E-Konzentration von  $1,5 \mu\text{M}$  gefunden. Mikrosomen und Plasmamembran zeigten sich nur wenig empfindlich. Bei den Untersuchungen des Effekts von A2E auf die Aktivität der lysosomalen Protonenpumpe, wobei sowohl die ATPase-Aktivität als auch die protonentranslocierende Aktivität unabhängig voneinander gemessen wurden, konnte für A2E-Konzentrationen ab  $0,2 \mu\text{M}$  die Hemmung der lysosomalen Protonenpumpe nachgewiesen werden, die bei  $1 \mu\text{M}$  A2E etwa 50 %, bei einer A2E-Konzentration von  $2 \mu\text{M}$  etwa 90 % erreichte. Bei den anschließend durchgeführten Bestimmungen zur Phagozytose und zum Abbau von Photorezeptoraußensegmenten, die in vivo in großen Mengen von RPE Zellen aufgenommen und abgebaut werden müssen, konnte eine deutliche Hemmung der Abbau- und Phagozytoserate in A2E-beladenen Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nachgewiesen werden. Ergänzend hierzu wurden Versuche zum Metabolismus von A2E in retinalen Pigmentepithelzellen durchgeführt. Gezeigt werden konnte, daß RPE Zellen nach Akkumulation von A2E sich dieses Moleküls nicht mehr entledigen können, sondern A2E offensichtlich irreversibel akkumuliert wird. Abschließend wurden HPLC-Bestimmungen in verschiedenen Bereichen des Auges bei 14 Patienten beider Geschlechter im Alter von 37-85 Jahren zur Klärung einer möglichen alters- und geschlechtsspezifischen Anreicherung von A2E gemacht. Es fanden sich A2E-Gesamtgehalte zwischen 89-1199 ng/Auge. Die höchsten Konzentrationen konnten im RPE gemessen werden, jedoch fand sich auch in der Netzhaut A2E. In der Sklera konnte kein A2E gefunden werden. Eine alters- oder geschlechtsspezifische Anreicherung wurde nicht gefunden.

Mit den gewonnenen Ergebnissen dieser Arbeit und unter Berücksichtigung von Arbeiten anderer Autoren läßt sich erstmals ein Zusammenhang der Wirkweisen von A2E bei der Entstehung der AMD postulieren: so könnte die Akkumulation von A2E als Bestandteil des Lipofuscin in niedrigen Konzentrationen zu einer Hemmung der lysosomalen Protonenpumpe mit resultierender lysosomaler Dysfunktion führen. Bei Erreichen einer "kritischen Konzentration" käme es zu einer Störung der lysosomalen Membranintegrität mit Freisetzung angereicherter Substanzen in das Cytoplasma. Ein Herantreten von A2E an andere zelluläre Membranen mit anschließender Freisetzung von z.B. Apoptosefaktoren wäre möglich. Die Hemmung von Phagozytose und Abbau von ROS bei A2E-Akkumulation und die offensichtliche Unfähigkeit der RPE Zellen, angereichertes A2E wieder auszuschleiden, unterstützt die schädigende Rolle des A2E in RPE Zellen. Am Ende stünde so die Dysfunktion und das Zugrundegehen der Zellen.