

Elke Kristina Kämmerer  
Dr. med.

## **Untersuchungen zur Funktion von Lipidperoxidationsprodukten in der molekularen Pathogenese der altersabhängigen Makuladegeneration**

Promotionsfach: Pathologie  
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. J. Kopitz

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist in den Industrienationen die häufigste Ursache für den Verlust der zentralen Sehschärfe im höheren Lebensalter. Entsprechend der demographischen Entwicklung gewinnt diese mit erheblichen Einschränkungen im täglichen Leben einhergehende Erkrankung eine immer größere Bedeutung. Die Genese des Krankheitsbildes ist offenbar multifaktoriell bedingt (z.B. Umweltfaktoren, prädisponierende Gene). Allerdings ist die molekulare Basis des Entstehens der Erkrankung noch weitgehend unverstanden. Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand scheint eine Dysfunktion des retinalen Pigmentepithels (RPEs), die mit einer progressiven Ablagerung von Alterspigment (Lipofuszin) im Zytoplasma der RPE-Zelle einhergeht, von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese zu sein. Die exzessive Akkumulation lysosomal entstehenden Lipofuszins im Zytoplasma wird als ursächlich für die Funktionsstörung dieser Zellen, die letztlich zum Untergang von Photorezeptoren im Bereich der Makula führt, betrachtet. Lipofuszin ist ein hauptsächlich aus Protein- und Lipidbestandteilen zusammengesetztes komplexes Gemisch, dessen genaue molekulare Zusammensetzung noch weitgehend ungeklärt ist. Neben dem bisher identifizierten Hauptfluorophor des Lipofuszins (A2E), konnten Malondialdehyd- (MDA) bzw. 4-Hydroxynonenal- (HNE) modifizierte Moleküle im Lipofuszin nachgewiesen werden. MDA und HNE entstehen durch Lipidperoxidation bei Einwirkung freier Sauerstoffradikale auf Membransysteme. Es konnte experimentell gezeigt werden, daß MDA bzw. HNE zahlreiche Proteine modifizieren und vernetzen können. Ein pathobiochemischer Einfluß MDA- bzw. HNE-modifizierter Proteine auf die lysosomale Funktion von RPE-Zellen, ihre Bedeutung für die Lipofuszinogenese und damit für die Pathogenese der AMD wurde bisher vermutet, ohne jedoch experimentell belegt zu sein. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl der lysosomale Katabolismus MDA- bzw. HNE-modifizierter Proteine, als auch deren Wirkungen auf generelle lysosomale Funktionen, insbesondere auf die lysosomale Proteolysekapazität, untersucht.

Dazu wurden zunächst Photorezeptoraußensegmente (ROS) aus Schweineaugen sowie Zytosolproteine aus RPE-Zellen isoliert und anschließend *in vitro* mit MDA bzw. HNE

modifiziert. Die große Zahl modifizierter Proteine wurde im Western Blot nachgewiesen. Um eine Interaktion MDA- bzw. HNE-modifizierter Proteine speziell mit lysosomalen Hydrolasen zu überprüfen, wurden Lysosomenfraktionen mit hohem Reinheitsgrad durch sequentielle Dichtezentrifugationsschritte aus RPE-Zellkulturen gewonnen. Anhand dieser Lysosomenfraktion (lysosomale Hydrolasen) wurde der mögliche Einfluß von MDA bzw. HNE auf den lysosomalen ROS-Abbau untersucht. Es konnte tatsächlich sowohl für die modifizierten ROS-Proteine als auch für die modifizierten Zytosolproteine eine erheblich schlechtere Abbaubarkeit durch lysosomale Proteasen im Vergleich zu unmodifizierten Kontrollen nachgewiesen werden. In Weiterführung der Experimente wurde daraufhin untersucht, ob diese Stabilisierung von Proteinen durch MDA- bzw. HNE-Modifikation gegenüber dem lysosomalen Abbau auch an intakten Zellen nachweisbar ist. Dazu wurden kultivierten humanen RPE-Zellen radioaktiv-markierte modifizierte ROS zur Phagozytose ins Kulturmedium zugesetzt, und deren intralysosomaler Abbau bestimmt. Auch hier zeigte sich, daß ROS durch eine MDA- bzw. HNE-Modifikation gegen die lysosomale Degradation der RPE-Zelle stabilisiert werden. In Kontrollversuchen wurde deutlich, daß sich die Modifikationen nicht auf den eigentlichen Phagozytose-Schritt an der Plasmamembran auswirken, sondern erst intralysosomal wirksam werden. Daran anschließend wurde in der RPE-Zellkultur nachgewiesen, daß diese Stabilisierung der lysosomalen Substratproteine zu einer langzeitigen intralysosomalen Speicherung der modifizierten Proteine führt, wohingegen unmodifizierte ROS-Proteine schnell abgebaut wurden. Schließlich wurde untersucht, inwieweit sich die intralysosomale Akkumulation modifizierter Proteine auf den Abbau unmodifizierter Proteine, also auf die generelle Proteolysekapazität des Lysosoms, auswirkt. Die Gegenwart steigender Mengen modifizierter Proteine führte bei isolierten Lysosomen zu einer deutlichen Verringerung der Proteolyseaktivität gegenüber unmodifizierten Proteinen, was eine kompetitive Hemmwirkung der modifizierten Proteine nahelegt, und so die oben beschriebene Induktion einer lysosomalen Speicherung nicht-abgebauten Materials noch verstärkt. Analoge Versuche in der RPE-Zellkultur bestätigten, daß diese Hemmwirkung auch in der intakten Zelle wirksam ist. Mit Hilfe spezifischer Enzymtests konnte gezeigt werden, daß die lysosomalen Cathepsine B, L und D potentielle Ziele dieser Hemmung darstellen.

Durch die Ergebnisse der beschriebenen Experimente ergeben sich, in Zusammenhang mit der relevanten Literatur, neue Aspekte für das Verständnis der molekularen Pathogenese der AMD. Davon ausgehend, daß Lipofuszinablagerungen im RPE eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der AMD spielen, sind Prozesse, die die Lipofuszinogenese fördern, als wesentliche pathogenetische Faktoren zu betrachten. Hier sind insbesondere lysosomale

Dysfunktion und intralysosomale Speicherung von Makromolekülen zu berücksichtigen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß in den Photorezeptoren der Retina und im RPE ablaufende Lipidperoxidationsprozesse im RPE-Lysosom Speicherphänomene und Funktionsstörungen induzieren können und folglich einen potentiellen pathogenetischen Faktor der AMD darstellen.