

Genetische Disposition für Licht-induzierte Photorezeptor-Degeneration

Andreas Wenzel, Christian Grimm, Charlotte E. Remé

Labor für Zellbiologie der Netzhaut
Augenklinik, Universitätsspital Zürich,
Schweiz

Dieser Artikel ist
Professor **Theodore P. Williams**
(1933-2003), einem großartigen
Menschen, Freund und Forscher
gewidmet.

Zusammenfassung

Die akute Licht-induzierte Netzhautdegeneration ist ein Modellsystem zum Studium der zellbiologischen Vorgänge während des Absterbens von Photorezeptoren. In induzierten und erblichen Netzhautdegenerationen sterben Photorezeptoren überwiegend durch Apoptose, eine streng regulierte Form des Zelltodes. Das Lichtschaden-Modell erlaubt es, eine grosse Anzahl von Photorezeptoren synchron in die Apoptose zu führen. Dieser Umstand macht die Analyse biochemischer Marker über den gesamten Verlauf des Zelltodes möglich. In der vorliegenden Übersichtsarbeit wird gezeigt, wie genetische Faktoren die Empfindlichkeit der Netzhaut für Licht-induzierte Photorezeptor-Apoptose bei Mäusen beeinflussen können. Solche „genetischen Modifikatoren“ könnten ebenfalls den Krankheitsverlauf von Netzhautdegenerationen beim Menschen beeinflussen.

Schlüsselwörter

Netzhautdegeneration, Photorezeptor, Apoptose, Lichtschaden, Disposition

Genetic disposition for light-induced photoreceptor degeneration

Summary

Acute light-induced degeneration of the retina is a model to analyze cellular processes of photoreceptor cell death. In induced and inherited retinal degeneration photoreceptors mainly die by apoptosis, a strictly regulated form of cell death. Light damage enables to trigger apoptosis in a large number of photoreceptors in a very synchronised manner. This allows the analysis of biochemical markers over the entire process of cell death. The present review shows how genetic factors influence the susceptibility of the retina for light-induced photoreceptor apoptosis. Such „genetic modifiers“ might also influence the pathogenesis of retinal degeneration in patients.

Keywords

retinal degeneration, photoreceptor, apoptosis, light damage, disposition

Photorezeptor-Apoptose

Altersabhängige Makuladegeneration (AMD) und erbliche Netzhautdystrophien wie Retinitis Pigmentosa (RP) gehören zu den Hauptursachen für schwerwiegende Sehbehinderungen und/oder Blindheit in den Industrienationen. Etwa 30000 Patienten in Deutschland leiden unter RP oder dem Usher-Syndrom (Pro-Retina Deutschland e.V.) und ca. 1 Mio. Menschen in Deutschland leiden an Sehbehinderungen durch AMD (AMD Alliance International). Bei RP und AMD basiert der Verlust der Sehkraft auf dem Absterben der Photorezeptoren der Netzhaut.

Bei beiden Krankheiten sterben die Photorezeptoren durch Apoptose, eine kontrollierte und regulierte Form des Zelltodes (Zusammenfassung in: Remé et al. 1998). Bei Apoptose wird durch einen endogenen (z.B. Gendefekt) oder exogenen (z.B. toxische Noxe) Stimulus ein „Selbstmordprogramm“ in der betroffenen Zelle aktiviert. Die Zelle stirbt einen „leisen“ Tod, d.h. Effekte auf benachbarte Zellen, wie sie etwa bei der Nekrose auftreten, sind minimal.

Lichtschaden als Modellsystem zum Studium der Photorezeptor-Apoptose

Seit etwa 40 Jahren wird Licht experimentell als exogener Stimulus zum Auslösen einer Netzhautdegeneration in Labortieren genutzt. Seit Anfang der 90er Jahre ist bekannt, dass überschwellige Lichtexposition in Photorezeptoren Apoptose auslöst (zusammengefasst in: Remé et al.

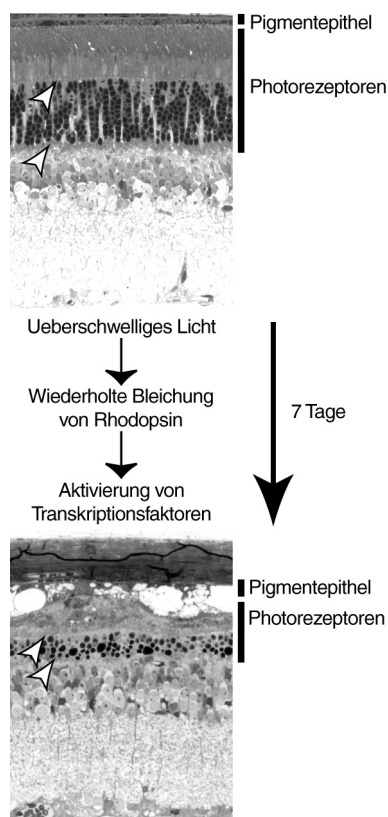


Abb 1 Licht-induzierte Netzhautdegeneration

Belichtung einer gesunden Mäusenetzhaut (oben) mit überschwelligen Lichtdosen induziert Photorezeptor-degeneration. Innerhalb von 7 Tagen sind etwa 75% der Photorezeptoren in dem betroffenen Areal abgestorben (unten, vgl. die Anzahl von Zellkernen, Pfeilspitzen). Das Pigmentepithel ist ödematös. Dieser Schaden lässt sich durch die Intensität des Lichts und die Dauer der Exposition modifizieren.

Wichtige Ereignisse sind die Absorption des Lichts durch Rhodopsin, sowie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1.

1998). Somit steht mit dem Modell der Licht-induzierten Netzhautdegeneration ein System zur Verfügung, welches die Analyse der zellbiologischen Vorgänge der Photorezeptor-Apoptose erlaubt.

Licht ist ein idealer Stimulus um Photorezeptor-Apoptose auszulösen: Es ist einfach dosier- und anwendbar. Es betrifft – je nach Spezies – selektiv Photorezeptoren und Pigmentepithel, jene Zellen die auch bei RP und AMD primär involviert sind. Je nach Dosis lässt sich Apoptose in grossen oder kleinen Zellpopulationen synchron induzieren, was die Suche nach biochemischen Markern des Zelltodes erleichtert.

Licht als potentieller Ko-Faktor der Netzhautdegeneration

Licht ist jedoch nicht nur artifizierlicher Stimulus der Photorezeptor-Apoptose im Experiment: Überschwelliges Licht, z.B. ausgehend von einem Operationsmikroskop, kann akut zum Verlust von Photorezeptoren führen. Lebenslange Exposition mit hohen Lichtdosen ohne geeigneten Schutz kann ein Risikofaktor für die AMD sein oder deren Verlauf beschleunigen. An einer Vielzahl von Tiermodellen für RP ist gezeigt worden, dass die Lichtintensität, unter der die entsprechenden Tiere gehalten werden, einen Einfluss auf den Verlauf der Netzhautdegeneration hat: Höhere

Lichtintensitäten beschleunigen den Verlust der Photorezeptoren (LaVail et al. 1999).

Es wäre also durchaus denkbar, dass Veränderungen der Lichtschadenanfälligkeit der Netzhaut sekundär zu einer Modifikation des Verlaufes einer Netzhauterkrankung führen. In Mäusen sind solche Veränderungen der Lichtschadenanfälligkeit als erbliches Merkmal beschrieben worden, und sie scheinen den altersabhängigen Verlust von Photorezeptoren zu beeinflussen (siehe unten, Danciger et al. 2000).

Signaltransduktionskaskaden der Licht-induzierten Photorezeptor-Apoptose

Was macht ausgerechnet Photorezeptoren, diejenigen Zellen, die während der Evolution speziell für die Absorption von Licht geschaffen wurden, so empfindlich? Welche(s) Molekül(e) absorbieren das Licht und initiieren das Apoptoseprogramm? Welche intrazellulären Signaltransduktionskaskaden sind beteiligt?

Diverse Kandidatenmoleküle sind über die Jahre identifiziert worden. Exzessives Licht kann die Funktion dieser Moleküle inhibieren oder stimulieren. Für das von uns angewandte Modell konnten wir eindeutig nachweisen, dass das Sehpigment der Stäbchen (Rhodopsin) für die Licht-

induzierte Apoptose essentiell ist. Mäuse, denen ein essenzielles Protein aus dem visuellen Zyklus fehlt (Rpe65^{-/-}), sind nicht in der Lage 11-cis-Retinal zu bilden. 11-cis-Retinal ist jenes Vitamin A-Derivat, welches zusammen mit Opsin das funktionelle Rhodopsin bildet. Ohne 11-cis-Retinal kann kein lichtaktivierbares Sehpigment gebildet werden. Mäuse mit homozygoter Deletion des Rpe65-Gens sind resistent gegen Licht-induzierte Photorezeptor-Apoptose (Grimm et al. 2000).

Die exzessive Absorption von Photonen durch Rhodopsin initiiert eine Signalkaskade, die letztendlich zum Absterben des Photorezeptors führt. Es stellt sich die Frage, ob hier die Phototransduktion beteiligt ist – also jene Signaltransduktionskaskade, welche von der Absorption eines Photons durch Rhodopsin über die Veränderung der Membraneigenschaften des Photorezeptors schließlich zur Transmission des Signals auf Sekundärneurone führt. Versuche mit Transduzin-defizienten Tieren (Gnat1a^{-/-}) zeigten, dass dies nicht der Fall ist. Obwohl in diesen Tieren jenes G-Protein (Transduzin) fehlte, das die Aktivierung von Rhodopsin an die restliche Kaskade weiterleitet, war die Lichtschadenssensitivität bei diesen Tieren nicht erniedrigt, wenn sie hohen Lichtdosen ausgesetzt wurden (Hao et al. 2002).

Ein wichtiges Ereignis während der lichtinduzierten Photorezeptor-Apoptose ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1. Bereits während einer Belichtung steigt die DNS-Bindungsaktivität dieses Faktors an, um dann 6-12 Stunden nach Ende der Belichtung ein Maximum zu erreichen (Wenzel et al. 2000). Inhibiert man die Aktivität von AP-1, etwa durch die Applikation von Steroiden (Wenzel et al. 2001), resultiert ein Schutz der Netzhaut.

Die Verbindung zwischen Überaktivierung von Rhodopsin durch exzessive Lichtexposition und Aktivierung von AP-1 ist ebenso Gegenstand unserer aktuellen Forschung wie die Identifikation von AP-1 Zielgenen, die auf die Apoptose der Photorezeptoren wirken

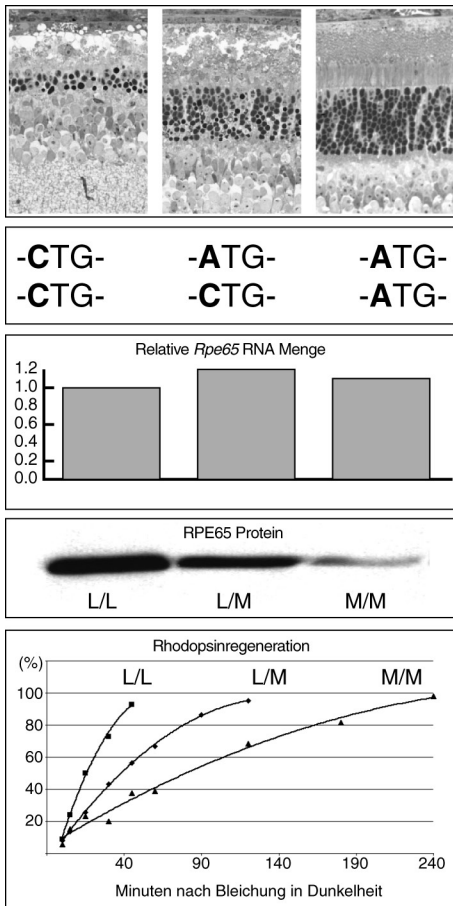


Abb 2 Eine genetische Variante des Rpe65-Gens beeinflusst Licht-induzierte Netzhautdegeneration

- Panel 1) Lichtschadenempfindlichkeit der Netzhaut ist ein erbliches Merkmal (LaVail et al., 19987). Alle Mäuse wurden der gleichen Bestrahlung unterzogen. Während bei der Maus ganz links die Photorezeptoren massiv betroffen sind, zeigt die Maus rechts kaum Schaden. Die Maus in der Mitte ist ein F1-Nachkomme der beiden äußeren Mäuse.
- Panel 2) Eine QTL-Studie identifiziert CTG > ATG Nukleotidaustausch an Position 450 von Rpe65 in resistenten Mäusen (Danciger et al., 2000). Die kodierte Aminosäure ändert sich von Leuzin (L) zu Methionin (M).
- Panel 3) Der CTG > ATG Austausch hat keinen Einfluss auf die Rpe65 RNA-Expression. RNA-Bestimmung mittels semi-quantitativer RT-PCR.
- Panel 4) Der CTG > ATG = Leuzin > Methionin Austausch führt zu reduzierten RPE65 Proteinmengen im retinalen Pigmentepithel (Western Blot von RPE Extrakten).
- Panel 5) Reduzierte RPE65-Proteinmengen reduzieren die Geschwindigkeit der Rhodopsin-Regeneration nach Bleichung. D.h. pro Zeiteinheit steht in der Netzhaut von Mäusen mit reduziertem RPE65 weniger Rhodopsin zur Bleichung zur Verfügung: Die Schadenanfälligkeit ist reduziert. Mäuse wurden einem hellen weißen Licht ausgesetzt, welches Rhodopsin nahezu vollständig bleicht. Nach verschiedenen Verweildauern im Dunkeln wurde die Menge des regenerierten Rhodopsins spektrophotometrisch bestimmt.

könnten.

Genetische Disposition für Lichtschäden

Die Empfindlichkeit der Mäuse-Netzhaut für Lichtschäden ist eine erbliche Eigenschaft. Diese Beobachtung wurde vor 15 Jahren bei Kreuzungsversuchen mit zwei Mausstämmen (C57BL/6 und BALB/c) gemacht (LaVail et al. 1987). Photorezeptoren von C57BL/6 Mäusen waren deutlich resistenter gegen Lichtexposition als diejenigen von BALB/c Mäusen. Eine „quantitative trait locus“ (QTL) Analyse des Genoms der beiden Mäusestämme resultierte in der Identifizierung von 4 QTLs, welche die Empfindlichkeit der Netzhaut für Lichtschaden beeinflussen. Ein QTL auf Chromosom 3 erwies sich als hochsignifikant, und 50% des in C57BL/6 Mäusen beobachteten Schutzes konnten diesem QTL zugeordnet werden (Danciger et al. 2000).

Die Feinkartierung dieses QTL identifizierte Rpe65 als das modifizierende Gen (Abb. 2). Eine Basensubstitution (CTG>ATG) in Codon 450 führt zu einem Leu > Met Austausch an Position 450 des RPE65 Proteins (Danciger et al. 2000). Bisher wurde dieser Austausch nur bei Mäusen beobachtet.

Funktionelle Auswirkung der Rpe65 Leu>Met Variante

Expressionsstudien zeigten, dass die Basensubstitution keinerlei Einfluss auf die Transkription des Gens hat. Im Gegensatz dazu fanden sich in den Tieren mit RPE_{450Met} niedrigere RPE65 Proteinmengen als in Tieren mit RPE_{65450Leu}. Heterozygote F1-Tiere (RPE_{65450Leu/Met}) zeigten mittlere RPE65 Proteinmengen (Abb. 2, Wenzel et al. 2001). Vermutlich bewirkt der Austausch von Leu gegen Met eine Reduktion der Stabilität des Proteins.

Wie bereits beschrieben, ist RPE65 ein Protein des retinalen Pigmentepithels, welches essentiell für die Funktion des visuellen Zyklus ist. Im visuellen Zyklus wird aus all-trans Retinal, welches bei der Bleichung des Rhodopsins durch Licht entsteht, wieder 11-cis-Retinal generiert. Dieses 11-cis-Retinal wird wieder in Opsin eingebaut; Rhodopsin ist regeneriert und bereit, ein weiteres Photon zu absorbieren.

Eine Reduktion der RPE65 Proteinmenge verlangsamt den visuellen Zyklus (Abb. 2 unten). Beim Vergleich von BALB/c- (RPE65_{450Leu}) und C57BL/6- (RPE65_{450Met})-Mäusen zeigte sich, dass die Regeneration des Rhodopsins nach einer vollständigen Blei-

chung in BALB/c-Mäusen etwa vierfach schneller geschieht als in C57BL/6-Mäusen: Pro Zeiteinheit absorbieren die Photorezeptoren der BALB/c Maus bis zu viermal mehr Photonen als die Photorezeptoren der C57BL/6! Heterozygote BALB/c-Tiere x C57BL/6 F1-Tiere (RPE65_{450Leu/Met}) lagen hinsichtlich der Rhodopsin-Regenerationsrate und ihrer Lichtschadenempfindlichkeit zwischen den Ursprungsstämmen. Es konnte ein klarer Zusammenhang zwischen Rhodopsin-Regenerationsrate und Empfindlichkeit für Lichtschäden in der Maus aufgezeigt werden (Abb. 2, Wenzel et al. 2001).

Überprüfung der Hypothese

An Rpe65^{-/-} Mäusen war bereits gezeigt worden, dass eine vollständige Inhibition des visuellen Zyklus zu einer hohen Resistenz gegen Lichtschäden führt. Da Rpe65^{-/-} Tiere aber zu keinem Zeitpunkt ihrer Entwicklung ausreichend funktionelles Rhodopsin haben, besteht die Möglichkeit, dass Entwicklungsdefizite auch unabhängig vom Rhodopsin-Status die Lichtschadenempfindlichkeit beeinflussen könnten. Um in genetisch identischen Tieren den Nachweis zu erbringen, dass die Funktion des visuellen Zyklus einen Einfluss hat, wurden Tiere mit Halothan anästhesiert. Halothan

kompetiert mit 11-cis-Retinal um die Chromophor Bindungsstelle des Opsin Moleküls (Ishizawa et al. 2002). In Tieren unter Halothan Anästhesie kann zwar Rhodopsin gebleicht werden, durch die Blockierung seiner Bindungsstelle im Opsin kann im visuellen Zyklus regeneriertes 11-cis-Retinal aber nicht wieder in das Opsin eingebaut werden. Somit kann jedes Rhodopsin-Molekül nur einmal gebleicht werden, egal wie lang die Expositionszeit ist. Im Gegensatz dazu kann es in der nicht anästhesierten Maus abhängig von der Expositionszeit und Regenerationsgeschwindigkeit mehrmals gebleicht werden. In Mäusen unter Halothan Anästhesie war die Regeneration von Rhodopsin nicht nachweisbar und die Tiere waren hochgradig resistent gegen Lichtschaden (Keller et al. 2001).

Somit war gezeigt, dass

- 1) die einmalige Bleichung von Rhodopsin nicht ausreicht, um einen Schaden zu verursachen, d.h. ein Rhodopsin-Molekül muss wiederholt gebleicht und regeneriert werden, um Photorezeptoren zu schädigen.
- 2) die Funktion und Geschwindigkeit des visuellen Zyklus essentielle Determinanten der Lichtschadenssensitivität sind (Wenzel et al. 2001).

Ausblick

Die hier beschriebenen Experimente dienen der Darstellung eines Konzeptes: Neben einer Altersabhängigkeit (bei AMD) oder dem Vorhandensein einer kausalen Mutation (bei RP) könnten zusätzliche genetische Faktoren den Verlauf einer Netzhautdegeneration beeinflussen. In der Tat ist es unserer Gruppe in Zusammenarbeit mit M. Danciger in anderen Mausstämmen gelungen, neben dem Rpe65 Locus weitere QTLs zu identifizieren, die ebenfalls einen Einfluss auf die Lichtschadenempfindlichkeit der Netzhaut haben. Einer der so identifizierten chromosomalen Loci überlappt mit einem ebenfalls von M. Danciger identifizierten QTL, der den altersabhängigen Verlust von Photorezeptoren bei Mäusen beeinflusst (unveröffentlichte Daten). Weitere Kar-

tierungen dieser beiden QTLs könnten einen genetischen Hinweis auf den vermuteten Zusammenhang von altersabhängiger Netzhautdegeneration und Lichtexposition bringen.

Angesichts der großen Anzahl von Mutationen, welche zu RP führen, scheint es beinahe nicht machbar, den jeweiligen Gendefekt zu therapieren. Ließen sich jedoch gemeinsame „genetische Modifikatoren“ finden, wäre ein alternativer therapeutischer Ansatz denkbar.

Literatur

Danciger M, Matthes MT, Yasamura D, Akhmedov NB, Rickabaugh T, Gentleman S, Redmond TM, La Vail MM, Farber DB (2000). A QTL on distal chromosome 3 that influences the severity of light-induced damage to mouse photoreceptors. *Mamm Genome* 11(6): 422-7.

Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Yu S, Redmond TM, Reme CE (2000). Protection of Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration. *Nat Genet* 25(1): 63-6.

Hao W, Wenzel A, Obin MS, Chen CK, Brill E, Krasnoperova NV, Eversole-Cire P, Kleyner Y, Taylor A, Simon MI, Grimm C, Reme CE, Lem J (2002). Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nat Genet* 32(2): 254-60.

Ishizawa Y, Pidikiti R, Liebman PA, Eckenhoff RG (2002). G protein-coupled receptors as direct targets of inhaled anesthetics. *Mol Pharmacol* 61(5): 945-52.

Keller C, Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Reme CE (2001). Protective effect of halothane anesthesia on retinal light damage: inhibition of metabolic rhodopsin regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(2): 476-80.

LaVail MM, Gorrin GM, Repaci MA, Thomas LA, Ginsberg HM (1987). Genetic regulation of light damage to photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28(7): 1043-8.

LaVail MM, Gorrin GM, Yasamura D, Matthes MT (1999). Increased susceptibility to constant light in *nr* and *pcd* mice with inherited retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(5): 1020-4.

Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Marti A, Wenzel A (1998). Apoptotic cell death in retinal degenerations. *Progr Ret Eye Res* 17(4): 443-464.

Wenzel A, Grimm C, Marti A, Kueng-Hitz N, Hafezi F, Niemeyer G, Reme CE (2000). *c-fos* controls the „private pathway“ of light-induced apoptosis of retinal photoreceptors. *J Neurosci* 20(1): 81-8.

Wenzel A, Grimm C, Seeliger MW, Jaissle G, Hafezi F, Kretschmer R, Zrenner E, Reme CE (2001). Prevention of photoreceptor apoptosis by activation of the glucocorticoid receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(7): 1653-9.

Wenzel A, Reme CE, Williams TP, Hafezi F, Grimm C (2001). The Rpe65 Leu450Met variation increases retinal resistance against light-induced degeneration by slowing rhodopsin regeneration. *J Neurosci* 21(1): 53-8.

Korrespondenzadresse

Andreas Wenzel, PhD
Augenklinik Universitätsspital Zürich
Labor für Zellbiologie der Netzhaut
Frauenklinikstrasse 24
CH-8091 Zürich
Schweiz
awenzel@ophth.unizh.ch