

Therapieversuche bei RP: Licht am Ende des Tunnels?^{1,2}

Mathias Abegg, Farhad Hafezi, Andreas Wenzel, Christian Grimm, Charlotte E. Remé

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

Zusammenfassung

Die genetisch und klinisch heterogene Netzhauterkrankung Retinitis Pigmentosa stellt mit einer Prävalenz von 3,5% eine relativ häufige Ursache für Erblindung in den Industrienationen dar. Seit Jahrzehnten wird an einer Vielzahl von Tiermodellen, die zum Teil dem Menschen analoge Mutationen tragen, die Ätiologie dieser Krankheit studiert. Es steht jedoch bis heute keine Therapie zur Verfügung, die den Verlauf dieser Erkrankung beeinflussen und den apoptotischen Zelltod der Photorezeptoren aufhalten könnte. In letzter Zeit haben sich vielversprechende neue Therapieansätze ergeben, die nun im Tiermodell erprobt werden. Neben Versuchen, die degenerierten Photorezeptorzellen durch einen prä- oder subretinal eingepflanzten Mikrochip zu ersetzen, scheinen sowohl die somatische Gentherapie als auch die Hemmung des Photorezeptorzelltodes durch Apoptose mittels Wachstumsfaktoren und anderen pharmakologischen Substanzen aussichtsreiche Ansätze für künftige Therapien zu sein. Ein besseres Verständnis der molekularen Abläufe, die der Degeneration der Photorezeptorzellen durch Apoptose zugrunde liegen, ist dabei jedoch eine unabdingbare Voraussetzung.

Schlüsselwörter: rd – Retinitis Pigmentosa – Netzhautdystrophie – Apoptose – c-fos

Therapeutic Approaches in RP: Light at the End of the Tunnel?

Retinitis pigmentosa (RP) is a hereditary retinal dystrophy which leads to severe visual impairment or blindness and affects about 3.5% of individuals in the industrial world. During the past decades, numerous animal models carrying mutations analogous to mutations in human RP have been studied to elucidate the molecular mechanisms leading to apoptotic photoreceptor cell death in this disease. Up to date, there is no effective treatment to influence the fatal outcome of RP. Recent progress in basic research promotes the development of new therapeutic strategies. In order to restore visual function in blind individuals, the development of electronic photoreceptor pros-

thesis is being investigated by several research groups. Other promising approaches are somatic gene therapy, the application of growth factors and/or pharmacological agents and the inhibition of photoreceptor cell death by interfering with the apoptotic pathway. However, a better understanding of the molecular events leading to cell loss due to photoreceptor apoptosis will be essential for the development of effective treatment.

Key words: rd – retinitis pigmentosa – retinal dystrophy – apoptosis – c-fos

Die Netzhautdystrophie Retinitis Pigmentosa (RP) ist mit einer Häufigkeit von 1:3500 die häufigste erbliche Erblindungsursache in den Industrienationen. Das klinische Bild der RP ist seit Jahren bekannt: Betroffene Patienten zeigen charakteristische Fundusveränderungen sowie einen fortschreitenden Gesichtsfeldverlust, der zu einem zapfendominierten „Tunnelblick“ (Gesichtsfeld <20 Grad) führt. Typische Frühsymptome sind Nachtblindheit und eine verzögerte Dunkeladaptation. Letztere kann im Elektroretinogramm (ERG) bereits Jahre vor der ersten subjektiven Visuseinschränkung diagnostiziert werden [4].

Das Krankheitsbild der RP zeichnet sich durch eine ausgeprägte genetische und klinische Heterogenität aus. Demzufolge variieren sowohl der Verlauf als auch das Ausmaß der klinischen Manifestation von Patient zu Patient. Es sind autosomal-dominante, autosomal-rezessive und X-Chromosom-assoziierte Vererbungsmuster der RP bekannt.

In den letzten Jahren gelang die Identifizierung einer Vielzahl von Genmutationen, die zu RP führen. Diese Mutationen betreffen verschiedene Komponenten der Phototransduktionskaskade, u.a. das Rhodopsin, die cGMP-Phosphodiesterase und Proteine des cGMP-Kanals. Allein im Rhodopsin-Molekül sind über 80 Mutationen bekannt (zusammengefasst in [17,49]). Auch Mutationen in den Strukturproteinen Periphe-

¹ Herrn Prof. Dr. Balder Gloor gewidmet.

² Manuskript eingereicht am 18. 8. 99 und in der vorliegenden Form angenommen.

rin/RDS und ROM1 (Rod Outer Segment Membrane Protein1) und dem Motorprotein Myosin VIIa können, mit variabler Penetranz, zu RP führen [49]. Neben diesen netzhautspezifischen Mutationen sind auch genetisch determinierte Systemerkrankungen wie das Bassen-Kornzweig-Syndrom, das Usher-Syndrom und die Refsum-Krankheit bekannt, welche neben anderen Symptomen zu einer RP führen [51] können.

Die RP-Forschung hat mit ihrem großen Erkenntniszuwachs der letzten Jahre entscheidend dazu beigetragen, dass die Ophthalmologie unter den Fächern der klinischen Medizin eine Vorreiterstellung in der Kenntnis um krankheitsauslösende molekulare Defekte und Mutationen einnimmt. Jedoch ist heute keine klinische Therapie bekannt, die den Verlauf der RP nachhaltig beeinflussen kann. Der Entwicklung effizienter Therapiestrategien kommt daher eine große Bedeutung zu. Dabei stellen die hereditären und in jüngerer Zeit auch die transgenen Tiermodelle für Netzhautdystrophien in den verschiedensten Tierarten eine unersetzliche Hilfe dar. In diesem Artikel beschränken wir uns auf das seit langem bekannte Modell der *rd*-Maus, um anhand dieses Modells zu veranschaulichen, dass der Schritt von der Grundlagenforschung an Tiermodellen bis zur Pathogenese der menschlichen Erkrankung sehr klein sein kann.

Tiermodelle für RP: Das Beispiel der *rd*-Maus

1924 wurde von Clyde Keeler erstmals ein hereditärer Defekt der Netzhaut bei der Maus beschrieben. Er interpretierte den Defekt als Störung der Netzhautentwicklung und bezeichnete die Mäuse als *r*-Mäuse („rodless“ mice) [28]. Mangels Interesse seiner Fachkollegen, löste Keeler im Jahre 1939, beim Umzug in ein anderes Labor, seine Zucht auf [29]. Im Jahre 1951 wurde von R. Brückner ein wilder Mausstamm aus der Umgebung von Basel mit Netzhautveränderungen beschrieben, die denjenigen der *r*-Maus von Keeler verblüffend glichen; er bezeichnete sie als *rd* (retinal degeneration)-Maus [7]. Brückner und andere [27,52] erkannten, dass es sich bei der Störung in der *rd*-Maus um eine Degeneration von teilweise bereits entwickelten Photorezeptoren handelte und nicht um eine primäre Fehlentwicklung der Stäbchen, wie sie von Keeler (irrtümlicherweise) für die *r*-Maus postuliert wurde. In den darauffolgenden Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von Studien in der *rd*-Maus durchgeführt, die sich dadurch zum wichtigsten Tiermodell für hereditäre Netzhautdystrophie entwickelte.

Erst 1989 gelang die Identifizierung der Mutation, welche zum *rd*-Phänotyp führt: Es handelt sich dabei um eine retrovirale Insertion im Gen für die beta-Untereinheit der stäbchenspezifischen Phosphodiesterase (PDE), einem Schlüsselenzym der Phototransduktionskaskade [5,6]. Diese Mutation führt zu einer Fehlfunktion der PDE, die bewirkt, dass zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) nach Lichtabsorption nicht mehr hydrolysiert wird. Das ständig erhöht vorhandene und dadurch toxisch wirkende cGMP wiederum hält den lichtempfindlichen Ionenkanal des Photorezeptors permanent offen und erzeugt so eine dauerhafte Depolarisation, wie man sie physiologischerweise nur im dunkeladaptierten Auge findet [16]. Wie es schließlich zum Photorezeptor-Zelltod durch Apoptose kommt, ist noch unbekannt: Möglicherweise induziert die hohe cGMP-Konzentration die Apoptose direkt, oder sie wird durch den konstant hohen metabolischen Umsatz und den damit verbundenen zellulären Stress ausgelöst.

Bemerkenswerterweise konnte 1993 durch Pittler und Keeler bewiesen werden, dass die Mutationen, die zum Phänotyp der *r*- und der *rd*-Maus führen, identisch sind [42]. Damit fand Keelers Kampf um die Anerkennung der Erstbeschreibung der *rd*-Maus nach über vier Jahrzehnten ein glückliches Ende. Im gleichen Jahr wiesen McLaughlin u. Mitarb. bei Patienten mit autosomal-rezessiver RP Mutationen im humanen beta-PDE-Gen nach [39].

Neben der *rd*-Maus wurde im Laufe der Zeit eine Vielzahl weiterer Spontanmutationen in der Maus und anderen Tieren beschrieben, die zu einem RP-Phänotyp der Netzhaut führen. In den letzten Jahren wurden zudem gezielt transgene Tiermodelle generiert, welche der RP im Menschen analoge Mutationen tragen.

Parallel zu den oben erwähnten Mutanten wird zudem seit nunmehr 30 Jahren [40] das Modell der lichtinduzierten Netzhautdegeneration verwendet. Hier erfolgt die Schädigung der Photorezeptoren durch Belichtung von dunkeladaptierten Tieren mit weißem Fluoreszenzlicht (ohne UV-Anteil) oder breitbandigem grünen Licht. Der Vorteil dieses Modells liegt darin, dass sowohl der Zeitpunkt, als auch die Intensität des schädigenden Stimulus beliebig variiert werden können (zusammengefasst in [45]). Dies erlaubt eine bessere Auftrennung und Erforschung der ablaufenden molekularen Mechanismen, die zur Schädigung führen.

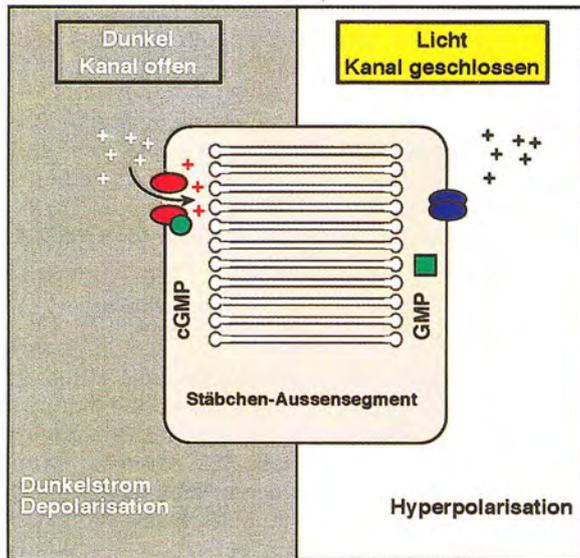
Therapieansätze für RP

Die, zur Zeit noch experimentellen, Therapieansätze für RP umfassen ein breites Spektrum. Prinzipiell kann man zwischen zwei Gruppen unterscheiden. Die erste Gruppe umfasst Netzhautprothesen sowie die Netzhauttransplantation. In beiden Fällen wird versucht, bereits degenerierte Photorezeptoren zu ersetzen: bei der Netzhautprothese durch die epi- oder subretinale Implantation eines Mikrochips und im Falle der Transplantation durch embryonale Photorezeptoren. In beiden Fällen soll der Ersatz den Anschluss an noch intakte Ganglienzellen finden.

Die zweite Gruppe von Therapieansätzen ist in den letzten Jahren mit dem explosionsartig angestiegenen Wissen um molekulare Vorgänge in der Netzhaut aufgekommen und beinhaltet die somatische Gentherapie und die Apoptosehemmung.

Ein erschwerender Faktor für die somatische Gentherapie der RP ist, dass, entsprechend der Vielzahl der bekannten Mutationen, eine große Anzahl „individueller“ Gentherapien entwickelt werden muss. Aus diesem Grunde sieht eine andere Strategie vor, den Verlauf der RP ungeachtet des zugrundeliegenden genetischen Defektes zu beeinflussen. Dies könnte über eine Hemmung des gemeinsamen Nenners aller RP-Formen, des Photorezeptorzelltodes durch Apoptose, erreicht werden. Sowohl die somatische Gentherapie als auch die Apoptosehemmung kommen allerdings nur dann als Therapieansätze in Frage, wenn noch genügend vitale Photorezeptoren vorhanden sind. Somit kommt einer effizienten (genetischen) Frühdiagnostik eine große Bedeutung zu; ein Gebiet, in dem den klinischen Ophthalmologen eine wichtige Rolle zufallen wird: das „Aufspüren und Sammeln“ von Individuen und Familien mit hereditären Netzhauterkrankungen.

A) Rolle von cGMP/GMP bei Belichtung



B) Akkumulation von cGMP im Stäbchen der rd-Maus und ARRP-Patienten



C) Phototransduktions-Kaskade in Stäbchen

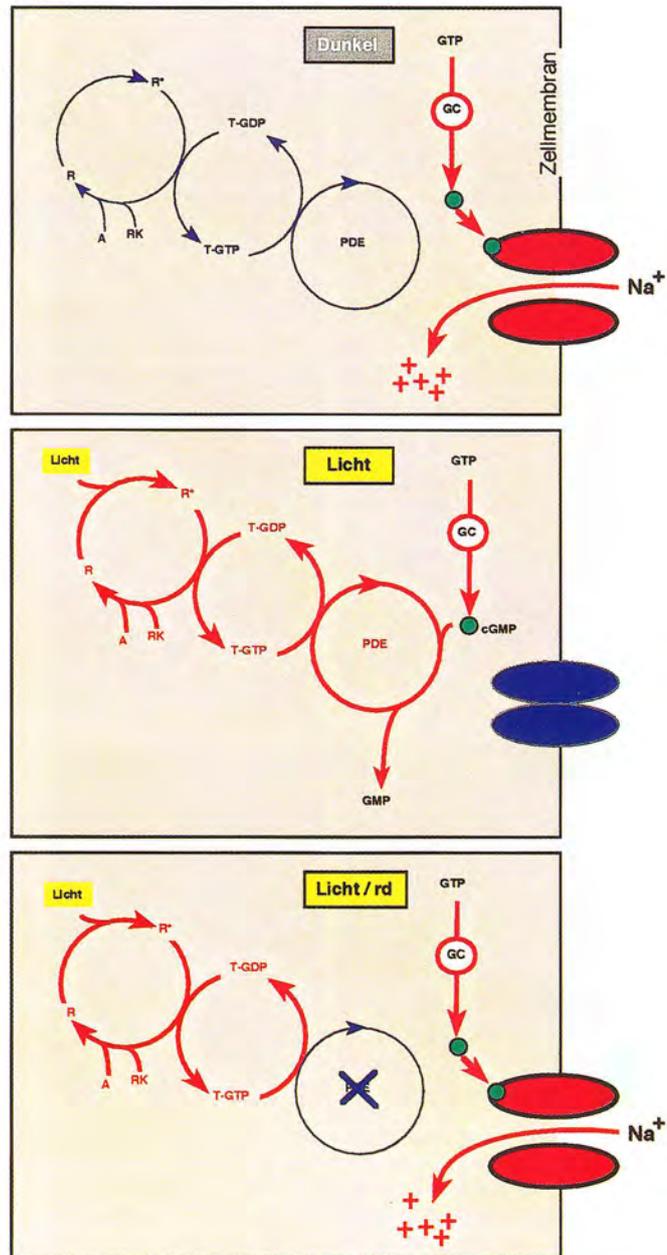


Abb. 1 Schematische, vereinfachte Darstellung der Phototransduktionskaskade der Stäbchen.

A) cGMP öffnet die lichtempfindlichen Ionenkanäle des Photorezeptor-Außensegments. In Dunkelheit ist die cGMP-Konzentration hoch, die lichtempfindlichen Ionenkanäle des Außensegments daher offen und die Zellmembran depolarisiert. Durch Licht wird die Phosphodiesterase aktiviert, die cGMP-Konzentration sinkt; als Folge schließen sich die Ionenkanäle und die Zellmembran wird hyperpolarisiert.

B) Das mutierte beta-Phosphodiesterase-Gen führt zu einer fehlerhaften beta-Untereinheit, so dass die Phosphodiesterase kein cGMP mehr spalten kann. Es kommt zur Akkumulation von cGMP und die Phototransduktionskaskade wird blockiert.

C) In Dunkelheit ist die Phosphodiesterase inaktiv; es kommt zu einer erhöhten cGMP-Konzentration, die Ionenkanäle sind offen und leiten den Dunkelstrom. Bei Licht wird die Phosphodiesterase über ver-

schiedene Stufen der Phototransduktionskaskade aktiviert, cGMP wird gespalten und die Ionenkanäle schließen sich. Durch die entstehende Hyperpolarisation des Photorezeptors entsteht der Sehreiz. In der rd-Maus kann die Phototransduktionskaskade die mutierte Phosphodiesterase nur in sehr geringem Maße aktivieren, cGMP bleibt in hoher Konzentration im Zytoplasma, die Ionenkanäle bleiben offen. Trotz Licht fließt der Dunkelstrom und es wird kein Sehreiz generiert.

Blau: inaktiv; rot: aktiv; A: Arrestin; cGMP: zyklisches Guanosin-Monophosphat; GC: Guanylatzyklase; GMP: Guanosin-Monophosphat; GTP: Guanosin-Triphosphat; Na⁺: Natrium; PDE: Phosphodiesterase; R: Rhodopsin; R*: aktiviertes Rhodopsin; RK: Rhodopsinkinase; T-GDP: Transducin-Guanosin-Diphosphat; T-GTP: Transducin-Guanosin-Triphosphat.

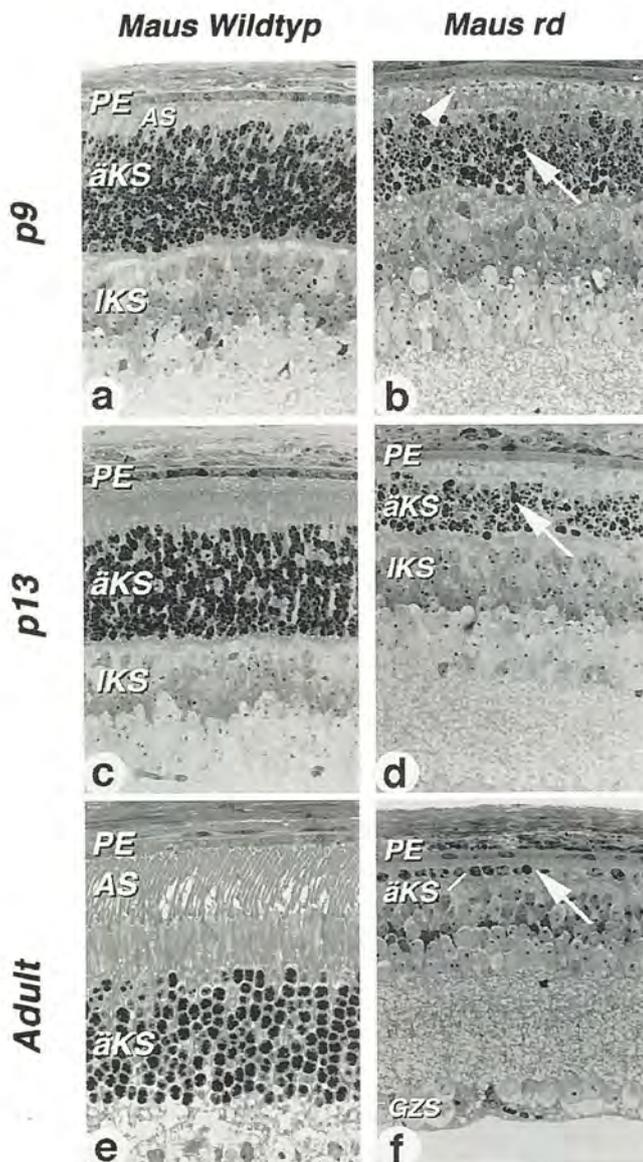


Abb. 2 Zeitlicher Verlauf der Degeneration in der *rd*-Maus im Vergleich zu einer Wildtyp-Maus. An p9 sind in der *rd*-Maus bereits Zeichen der Apoptose zu finden: pyknotische Zellkerne (Pfeil) und zerstörte Außensegmente (Pfeilspitze) (b). Im Vergleich dazu die Netzhaut einer gesunden Maus (a). An p13 ist die äußere Körnerschicht in der *rd*-Maus (Pfeil) (d) bereits deutlich schmäler als in der Wildtypmaus (c). An p21 zeigt die *rd*-Maus nur eine einzige Reihe von Photorezeptoren (Pfeil) (f), während die Wildtypmaus eine voll differenzierte Netzhaut aufweist (e). Die Zapfen, die Ganglienzellschicht und das Pigmentepithel verändern sich in der *rd*-Maus erst sekundär im Verlauf von Monaten.
 ÄKS: äußere Körnerschicht; AS: Außensegmente; GZS: Ganglienzellschicht; IKS: Innere Körnerschicht; PE: Pigmentepithel; p9: Postnataltag 9.

Netzhautprothese

Dieser Ansatz hat zum Ziel, verlorene Photorezeptoren durch eine elektronische Prothese zu ersetzen. Dabei implantiert man einen Chip, der, ähnlich wie eine Videokamera, Lichtsignale empfängt und an die noch bestehenden Ganglienzellen

weiterleitet. Am Tier wurden Halbleiterphotodioden mittels atraumatischer Methoden subretinal implantiert, und es konnte gezeigt werden, dass eine Signalübertragung vom Chip zu Neuronen über einen längeren Zeitraum ohne sekundäre Entzündungsreaktionen möglich ist [54].

Alternativ wird versucht, optische Information außerhalb des Auges zu empfangen und an einen epiretinal gelegenen Empfänger zu senden, der dann das Signal an die noch vorhandenen Ganglienzellen weiterleitet [14]. An der Johns Hopkins-Universität konnte so bei mehreren RP-Patienten Hell/Dunkel-Wahrnehmungen demonstriert werden [24].

Netzhauttransplantation

Die Idee, eine zerstörte Photorezeptorzellschicht durch ein Transplantat zu ersetzen, ist naheliegend und bestechend. Die Schwierigkeit besteht allerdings in der korrekten Orientierung der Zellen und der Ausbildung synaptischer Verbindungen mit der Ganglienzellschicht des Empfängers. Verschiedene Gruppen berichten von Transplantationsexperimenten am Tiermodell, wobei der Nachweis einer funktionierenden Phototransduktion noch aussteht. Als Transplantat werden frei präparierte ausdifferenzierte Netzhäute sowie embryonale und enzymatisch isolierte Photorezeptorzellen verwendet (zusammengefasst in [12]). Am vielversprechendsten erscheint die Transplantation embryonaler Mikrozellaggregate [18]: So konnten in der adulten *rd*-Maus nach der Injektion von Retinazell-Mikroaggregaten photophobe Reaktionen und eine schwache, lokal begrenzte Antwort auf eine visuelle Stimulation sehr hoher Intensität festgestellt werden [31].

Somatische Gentherapie

Verschiedene Grundvoraussetzungen müssen erfüllt sein, um die somatische Gentherapie zu ermöglichen. Primär muss die der Erkrankung zugrundeliegende Mutation genauestens bekannt sein. Ist diese bekannt, hängt der Erfolg der Therapie von der Wahl geeigneter viraler Vektoren ab. Deren Aufgabe ist es, das therapeutische Gen in die Zielzelle zu transportieren. Die beiden wichtigsten Parameter sind hierbei die Transfektionsrate (prozentualer Anteil Zellen, die von den viralen Vektoren transfiziert werden) sowie die Expressionsstabilität (Dauer und Stärke der Expression). Unter der Vielzahl der sich in Erprobung befindenden Vektoren sind insbesondere das adenoassoziierte Virus (AAV) [1,2] sowie das „encapsidated adenovirus minichromosome (EAM)“ [30] zu erwähnen. Beide zeichnen sich durch eine, im Vergleich zu Adenoviren der ersten Generation oder Herpesviren, vielfach höhere Transfektionsrate und Expressionsstabilität und eine erheblich geringere Immunantwort aus. Allen erwähnten Methoden ist gemeinsam, dass das therapeutische Gen unter die Kontrolle eines photorezeptorspezifischen Promotors (z. B. Opsin-Promotor) gestellt wird. Damit kann ausgeschlossen werden, dass eine akzidentelle Transfektion anderer Zellschichten zu einer unerwünschten Expression des therapeutischen Proteins führt. Auf diese Weise gelang beispielsweise kürzlich in der *rd*-Maus die Rettung von Photorezeptoren durch die transgene Expression einer intakten beta-PDE [25].

Darüber hinaus müssen, je nach Vererbungsmuster der RP, verschiedene Ansätze verfolgt werden. Bei den rezessiv vererbten RP-Formen mit mangelnder Genfunktion genügt es, eine zu-

sätzliche Kopie des intakten Gens in eine beliebige Stelle der genomischen DNA des Photorezeptors zu integrieren [3]. Bei dominant vererbten RP-Formen ist die Therapiestrategie komplexer, da nicht ein Funktionsmangel des Gens zum Zelltod führt, sondern das mutierte Genprodukt, das Protein. Hier wurden in jüngster Zeit vermehrt Versuche mit Ribozymen durchgeführt, welche spezifisch die mRNA eines wählbaren Zielgenes abbauen und somit die Produktion des mutierten Proteins verhindern oder verringern können. Kürzlich konnte in einem Tiermodell für autosomal-dominante RP gezeigt werden, dass die Einschleusung spezifischer Ribozyme mittels AAV die Photorezeptordegeneration beträchtlich verlangsamt [35].

Wachstumsfaktoren

Schon vor Jahren konnte gezeigt werden, dass die Applikation bestimmter Wachstumsfaktoren im Auge den Zelltod von Photorezeptoren in verschiedenen RP-Tiermodellen verzögern kann. So verlangsamte die subretinale Injektion von bFGF (basic fibroblast growth factor) die Photorezeptordegeneration in der RCS-Ratte [33]. In der Folge wurde eine Reihe neurotropher Faktoren (bFGF, NGF, NT-4/5) in unterschiedlichen Dosierungen und Applikationsformen auf ihre degenerationshemmende Wirkung geprüft: Einzelne neurotrophe Faktoren vermochten die Degeneration der Netzhaut in bestimmten Tiermodellen zu verzögern [15, 32, 33, 34], jedoch konnte kein Wachstumsfaktor identifiziert werden, der auf alle Formen der Netzhautdegeneration einen protektiven Einfluss hat.

Hemmung der Apoptose und mögliche Regulatorgene

Apoptose

Apoptose ist eine genregulierte Form des Zelltodes, bei der, im Gegensatz zur unspezifischen Nekrose, spezifische Proteine aktiviert werden, die unter anderem die genomische DNA internukleosomal spalten. Die Zelle zerfällt in einzelne Partikel (apoptotic bodies), welche von Makrophagen oder von be-

nachbarten Zellen phagozytiert werden. Morphologisch unterscheidet sich die Apoptose von der Nekrose vor allem darin, dass kaum Entzündungszeichen auftreten und jeweils nur einzelne Zellen und nicht ganze Zellverbände vom Zelltod betroffen sind [53].

In den letzten Jahren konnte sowohl im Tiermodell [9, 43] als später auch im Menschen [36] gezeigt werden, dass alle bekannten RP-Formen in die gemeinsame Endstrecke der Apoptose münden [41]. Daneben führen auch verschiedene Formen von zellulärem Stress in der Netzhaut zum Zelltod durch Apoptose: helles Fluoreszenzlicht im Modell der lichtinduzierten Netzhautdegeneration [46, 47], Applikation von Noxen wie Iodoacetat und Methylnitrosurea (MNU) [50] sowie eine induzierte Minderperfusion [8].

Die Idee der Hemmung des apoptotischen Zelltodes als therapeutischer Ansatz bei Netzhautdystrophien (und vielen anderen degenerativen Erkrankungen) ist bestechend, denn der Vorteil einer auf Apoptosehemmung beruhenden Therapie besteht darin, dass sie ungeachtet der zugrundeliegenden Mutation durchgeführt werden kann. Ein besseres Verständnis der molekularen Abläufe, die zur Photorezeptorapoptose führen und insbesondere die Identifizierung von Apoptoseregulatoren sind daher für die RP-Forschung von zentraler Bedeutung.

p53 und Bcl-2

Verschiedene Gene, die in anderen Systemen apoptoseregulierend wirken, sind in jüngster Zeit auch in der Netzhaut untersucht worden. So konnte gezeigt werden, dass sowohl das in anderen Systemen pro-apoptotisch wirkende Tumorsuppressorgen p53 als auch die Familie der pro- und antiapoptotisch wirkenden Bcl-Proteine in der Netzhaut weder bei der lichtinduzierten noch bei der hereditären Photorezeptordegeneration durch Apoptose eine essentielle Rolle spielen [10, 23, 37, 38].

c-Fos

Das Protoonkoprotein c-Fos bildet zusammen mit anderen Mitgliedern der Fos- und Jun-Protein-Familien den Transkriptionsfaktor AP-1, der an Regulatorsequenzen von Zielgenen bindet und so deren Expression beeinflusst [11]. Die Rolle von AP-1 scheint ferner mit der Bewältigung von zellulärem Stress zusammenzuhängen; so konnte als Reaktion auf verschiedene Formen von zellulärem Stress eine AP-1-Aktivierung beobachtet werden [26].

In der Netzhaut können Gene der Phototransduktionskaskade möglicherweise durch AP-1 reguliert werden: So tragen das beta-PDE-Gen eine Bindungsstelle für AP-1 [13] und das Opsin-Gen eine AP-1-ähnliche Bindungsstelle in seiner Promotorregion [44]. Dennoch sind die Netzhäute von transgenen Mäusen, denen das AP-1-Element c-Fos fehlt (*c-fos*^{-/-} Mäuse oder *c-fos* Knockout-Mäuse), funktionell (N. Hitz-Küing et al., submitted). Erstaunlicherweise sind aber die *c-fos* Knockout-Mäuse, im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen mit einem funktionellen *c-fos*-Gen, absolut resistent gegen lichtinduzierte Apoptose [22]. Damit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von *c-fos* einen essentiellen Schritt in der lichtinduzierten Apoptose darstellt. Mit dieser Beobachtung ist ein erstes zentrales Regulatorgen für Apoptose in der Netzhaut gefunden worden. Im

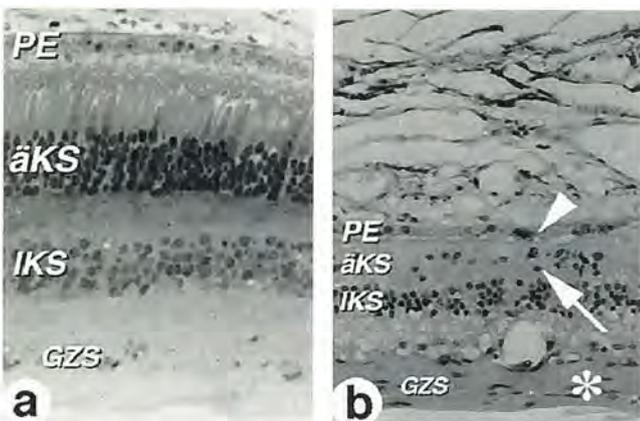


Abb. 3 Abb. 3b zeigt einen histologischen Schnitt durch die Netzhaut eines RP-Patienten. Es sind nurmehr eine schmale Ganglienzellschicht (Stern), Reste des Pigmentepithels (Pfeilspitze) und vereinzelte Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht (Pfeil) zu erkennen. Im Vergleich dazu die Netzhaut eines gesunden Menschen (a). äKS: äußere Körnerschicht; GZS: Ganglienzellschicht; IKS: Innere Körnerschicht; PE: Pigmentepithel.

Gegensatz zum Fehlen von c-Fos bewirkt das Fehlen von JunD, dem Hauptpartner von c-Fos in AP-1-Komplexen der Netzhaut [21], keine Resistenz gegen lichtinduzierte Photorezeptordegeneration [20]. Dieser Befund zeigt die überragende Rolle von c-Fos in der lichtinduzierten Apoptose.

Da eine Aktivierung von c-fos nicht nur bei der lichtinduzierten Apoptose beobachtet wird, sondern auch bei der hereditären Netzhautdystrophie in der *rd*-Maus [48], drängte sich die Frage auf, ob ein „Abschalten“ des *c-fos*-Gens auch in der *rd*-Maus eine Inhibition der Apoptose und damit die Verhinderung der Netzhautdegeneration zur Folge hat. Wir erzeugten zu diesem Zweck *rd*-Mäuse ohne funktionelles *c-fos*-Gen (*c-fos*^{-/-}, *rd/rd* Doppelmutanten). Es zeigte sich jedoch weder im zeitlichen Ablauf noch im Endresultat der Photorezeptordegeneration ein Unterschied zur normalen *rd*-Maus [19]. Dies zeigt auf, dass in der Netzhaut mindestens zwei verschiedene Apoptose-Signalwege bestehen müssen, ein c-Fos-abhängiger und ein c-Fos-unabhängiger.

Schlussfolgerung

Mutationen, die im Menschen zu RP führen können, sind erst seit wenigen Jahren bekannt. Trotzdem führte die intensiv betriebene Forschung bereits zur Entwicklung therapeutischer Strategien. Neben den Fortschritten in der Neurotechnologie ist es insbesondere die somatische Gentherapie, die auf eine baldige klinische Erprobung hoffen lässt. Dabei kristallisieren sich zwei Tendenzen klar heraus: der Ersatz eines defekten Gens mittels somatischer Gentherapie sowie die Einbringung eines Apoptose hemmenden Gens. Auf die Vorteile dieser Methoden ist eingegangen worden; jedoch sollten auch die potentiellen Risiken solcher Therapien erwähnt und diskutiert werden. Folgende Überlegungen dürfen nicht außer acht gelassen werden: Der Zelltod durch Apoptose spielt auch in der Phylogenese des Auges eine wichtige Rolle, über die physiologische Funktion der Apoptose im adulten Auge ist jedoch noch wenig bekannt; höchstwahrscheinlich spielt sie auch eine wichtige Rolle in der Zellzykluskontrolle und damit bei der Unterdrückung potentieller Neoplasien. Es ist daher wichtig, sich die möglichen Risiken einer Apoptosehemmung vor Auge zu führen. Diese können jedoch kontrolliert werden, wenn die Hemmung der Apoptose organ- oder gar zelltypspezifisch erfolgt.

Stehen uns in Zukunft geeignete gentherapeutische Methoden zur Verfügung, so wird der frühen Diagnosestellung über Mutationsanalysen eine wichtige Rolle zufallen. Nur durch sie kann ein rechtzeitiges Einschreiten vor dem eigentlichen Beginn der Degeneration ermöglicht werden. Sollte die Degeneration jedoch schon fortgeschritten sein, können elektronische Prothesen möglicherweise die Funktion der Photorezeptoren übernehmen (Abb. 1, 2, 3).

Literatur

- ¹ Ali RR, Reichel MB, De Alwis M, Kanuga N, Kinnon C, Levinsky RJ et al. Adeno-associated virus gene transfer to mouse retina. *Hum Gene Ther* 1998; 9(1): 81–86
- ² Ali RR, Reichel MB, Thrasher AJ, Levinsky RJ, Kinnon C, Kanuga N et al. Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector. *Hum Mol Genet* 1996; 5(5): 591–594

- ³ Bennett J, Tanabe T, Sun D, Zeng Y, Kjeldbye H, Gouras P et al. Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (*rd*) mice by in vivo gene therapy. *Nat Med* 1996; 2((6): 649–654
- ⁴ Berson EL. Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34((5): 1659–1676
- ⁵ Bowes C, Li T, Danciger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB. Retinal degeneration in the *rd* mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase “see comments”. *Nature* 1990; 347(6294): 677–680
- ⁶ Bowes C, Li T, Frankel WN, Danciger M, Coffin JM, Applebury ML et al. Localization of a retroviral element within the *rd* gene coding for the beta subunit of cGMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(7): 2955–2959
- ⁷ Brückner R et al. Spaltlampenmikroskopie und Ophthalmoskopie am Auge von Ratte und Maus. *Doc Ophthalmol* 1951; 5–6: 452–554
- ⁸ Buchi ER. Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischaemia-reperfusion insult: an electron microscopic study. I. Ganglion cell layer and inner nuclear layer. *Exp Eye Res* 1992; 55(4): 605–613
- ⁹ Chang GQ, Hao Y, Wong F. Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in *rd*, *rds*, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* 1993; 11(4): 595–605
- ¹⁰ Chen J, Flannery JG, LaVail MM, Steinberg RH, Xu J, Simon MI. *bcl-2* overexpression reduces apoptotic photoreceptor cell death in three different retinal degenerations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(14): 7042–7047
- ¹¹ Curran T, Franza BR Jr. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 1988; 55(3): 395–397
- ¹² del Cerro M, Lazar ES, Diloreto D Jr. The first decade of continuous progress in retinal transplantation. *Microsc Res Tech* 1997; 36(2): 130–141
- ¹³ Di Polo A, Lerner LE, Farber DB. Transcriptional activation of the human rod cGMP-phosphodiesterase beta-subunit gene is mediated by an upstream AP-1 element. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(19): 3863–3867
- ¹⁴ Eckmiller R. Learning retina implants with epiretinal contacts. *Ophthalmic Res* 1997; 29(5): 281–289
- ¹⁵ Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 1990; 347(6288): 83–86
- ¹⁶ Farber DB. From mice to men: the cyclic GMP phosphodiesterase gene in vision and disease. The Proctor Lecture [published erratum appears in *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995 May; 36(6): 976]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36(2): 263–275
- ¹⁷ Gal A, Apfelstedt-Sylla E, Janecke AR, Zrenner E. Rhodopsin mutations in inherited retinal dystrophies and dysfunctions. *Progr Ret Eye Res* 1996; 16(1): 51–79
- ¹⁸ Gouras P, Du J, Kjeldbye H, Yamamoto S, Zack DJ. Long-term photoreceptor transplants in dystrophic and normal mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35(8): 3145–3153
- ¹⁹ Hafezi F, Abegg M, Wenzel A, Grimm C, Stürmer J, Farber DB et al. Retinal degeneration in the *rd* mouse in the absence of c-fos. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(12): 2234–2244
- ²⁰ Hafezi F, Grimm C, Wenzel A, Weitzman J, Yaniv M, Abegg M et al. Retinal photoreceptors are apoptosis-competent in the absence of JunD/AP-1. *Cell Death Diff* 1999; (in press)
- ²¹ Hafezi F, Marti A, Grimm C, Wenzel A, Remé CE. Differential DNA-binding activities of the transcription factors AP-1 and Oct-1 during light-induced apoptosis of photoreceptors. *Vis Res* 1999; 39: 2511–2518
- ²² Hafezi F, Steinbach JP, Marti A, Munz K, Wang ZQ, Wagner EF et al. The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat Med* 1997; 3(3): 346–349

- ²³ Hopp RM, Ransom N, Hilsenbeck SG, Papermaster DS, Windle JJ. Apoptosis in the murine rd1 retinal degeneration is predominantly p53-independent. *Mol Vis* 1998; 4: 5
- ²⁴ Humayun MS, de Juan E, Jr., Dagnelie G, Greenberg RJ, Propst RH, Phillips DH. Visual perception elicited by electrical stimulation of retina in blind humans. *Arch Ophthalmol* 1996; 114(1): 40–46
- ²⁵ Jomary C, Vincent KA, Grist J, Neal MJ, Jones SE. Rescue of photoreceptor function by AAV-mediated gene transfer in a mouse model of inherited retinal degeneration. *Gene Ther* 1997; 4(7): 683–690
- ²⁶ Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(2): 240–246
- ²⁷ Karli P. Rétines sans cellules visuelles. Recherches morphologiques, physiologiques et physiopathologiques chez les rongeurs. *Arch Anat Histol Embryol* 1952; 35: 1–76
- ²⁸ Keeler CE. The inheritance of a retinal abnormality in white mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1924; 10: 329–333
- ²⁹ Keeler CE. Retinal Degeneration in the Mouse Is Rodless Retina. *The Journal of Heredity* 1966; 47–50
- ³⁰ Kumar-Singh R, Farber DB. Encapsulated adenovirus minichromosome (EAM)-mediated rescue of retinal degeneration in the rd mouse and construction of second generation EAMs and helper virions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(4): S1118. Abstract nr 5152
- ³¹ Kwan AS, Oliver PB, Coffey PJ, Litchfield TM, Whiteley SJ, Lund RD. Photophobic responses of rd mice and effects of retinal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(4): S95. Abstract nr 443
- ³² Lambiase A, Aloe L. Nerve growth factor delays retinal degeneration in C3H mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234 Suppl 1: S96–100
- ³³ LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH. Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(23): 11249–11253
- ³⁴ LaVail MW, Yasumura D, Matthes MT, Lau Villacorta C, Unoki K, Sung CH et al. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(3): 592–602
- ³⁵ Lewin AS, Dresner KA, Hauswirth WW, Nishikawa S, Yasumura D, Flannery JG et al. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med* 1998; 4(8): 967–971
- ³⁶ Li Z-Y, Milam AH. Apoptosis in retinitis pigmentosa. In: Anderson RE, LaVail MM, Hollyfield JG (Hrsg). *Retinal Degeneration*. Plenum Press, New York, London 1995; 1–8
- ³⁷ Marti A, Hafezi F, Linsel N, Hegi ME, Wenzel A, Grimm C et al. Light-induced cell death of retinal photoreceptors in the absence of p53. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(5): 846–849
- ³⁸ Martinou JC, Dubois Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M et al. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 1994; 13(4): 1017–1030
- ³⁹ McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1993; 4(2): 130–134
- ⁴⁰ Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S. Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1966; 5(5): 450–473
- ⁴¹ Papermaster DS. Apoptosis Of the Mammalian Retina and Lens. *Cell Death and Differentiation* 1997; 4(1): 21–28
- ⁴² Pittler SJ, Keeler CE, Sidman RL, Baehr W. PCR analysis of DNA from 70-year-old sections of rodless retina demonstrates identity with the mouse rd defect. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(20): 9616–9619
- ⁴³ Portera Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(3): 974–978
- ⁴⁴ Rehmtulla A, Warwar R, Kumar R, Ji X, Zack DJ, Swaroop A. The basic motif-leucine zipper transcription factor Nrl can positively regulate rhodopsin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(1): 191–195
- ⁴⁵ Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Marti A, Wenzel A. Apoptotic cell death in retinal degenerations. *Prog Retin Eye Res* 1998; 17(4): 443–464
- ⁴⁶ Remé CE, Hafezi F, Marti A, Munz K, Reinboth J-J. Light damage to retina and pigment epithelium. In: Marmor MF, Wolfensberger TJ (Hrsg). *The retinal pigment epithelium, current aspects of function and disease*. Oxford University Press, Oxford 1998
- ⁴⁷ Remé CE, Weller M, Szczesny P, Munz K, Hafezi F, Reinboth JJ et al. Light-induced apoptosis in the rat retina in vivo: Morphological features, threshold and time course. In: Anderson RE, LaVail MM, Hollyfield JG (Hrsg). *Retinal Degeneration*. Plenum Press, New York, London 1995; 19–25
- ⁴⁸ Rich KA, Zhan Y, Blanks JC. Aberrant expression of c-Fos accompanies photoreceptor cell death in the rd mouse. *J Neurobiol* 1997; 32(6): 593–612
- ⁴⁹ Shastry BS. Signal transduction in the retina and inherited retinopathies. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53: 419–429
- ⁵⁰ Smith SB, Hashimi W, Yielding KL. Retinal degeneration in the mouse induced transplacentally by N-methyl-N-nitrosourea: effects of constant illumination or total darkness. *Exp Eye Res* 1988; 47(3): 347–359
- ⁵¹ Sullivan LS, Daiger SP. Inherited retinal degeneration: exceptional genetic and clinical heterogeneity. *Mol Med Today* 1996; 2(9): 380–386
- ⁵² Tansley K. Hereditary degeneration of the mouse retina. *Br J Ophthalmol* 1951; 35: 573–582
- ⁵³ Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the signification of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251–306
- ⁵⁴ Zrenner E, Miliczek KD, Gabel VP, Graf HG, Guenther E, Haemmerle H et al. The development of subretinal microphotodiodes for replacement of degenerated photoreceptors. *Ophthalmic Res* 1997; 29(5): 269–280