

**Fortbildungsveranstaltung**

*im Rahmen des Programms  
„Neurowissenschaften in der gymnasialen Oberstufe“*

*der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e.V.*

**zum Thema**

# ***Krank machende Proteine im Hirn***

**15. März 2006**

am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung  
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig,  
Jahnallee 59  
D-04109 Leipzig

## **Abnorme Proteinablagerungen bei Erkrankungen mit Hirn-Leistungs-Störungen**

*Prof. Dr. Thomas Arendt, Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung,  
Abteilung Neuroanatomie, Universität Leipzig*

Die modernen Industriestaaten verzeichnen derzeit einen über die nächsten Jahrzehnte anhaltenden demografischen Umbau der Bevölkerung. Aufgrund einer weiterhin steigenden Lebenserwartung sowie eines drastischen Rückganges in der Geburtenrate nimmt der Anteil betagter und hochbetagter Menschen in der Bevölkerung stetig weiter zu. Diese Situation ist in den neuen Bundesländern, in denen es weltweit den höchsten Anteil betagter und hochbetagter Menschen gibt, besonders kritisch. Dieser anhaltende Umbau der Altersstruktur der Bevölkerung geht mit einer Zunahme von altersbegleitenden Erkrankungen einher. Hierbei steht die Alzheimersche Erkrankung, die häufigste Form der Altersdemenz, mit an erster Stelle. In Deutschland gibt es derzeit etwa 1,3 Millionen Patienten mit Alzheimerscher Erkrankung, in den nächsten 30 Jahren wird sich diese Zahl etwa verdoppeln. Die Erkrankung ist durch einen progressiven Verlust von Lern- und Gedächtnisfunktionen gekennzeichnet. Der Verlauf der Erkrankung kann in sieben qualitativ und quantitativ unterscheidbare Stadien gegliedert werden. Ganz allgemein lässt sich dabei sagen, dass die Entwicklung der Symptomatik einem inversen Muster der frühkindlichen Hirnentwicklung folgt, d.h. Leistungen und Funktionen, die in der Individualentwicklung besonders spät erworben werden, wie beispielsweise die Sprache, sind im Erkrankungslauf besonders frühzeitig gestört, während andere Leistungen, wie beispielsweise sehr einfache Formen der Kommunikation, z.B. Lächeln, welches in der frühkindlichen Hirnentwicklung frühzeitig erworben wird, auch im Erkrankungsverlauf erst in sehr fortgeschrittenen Stadien beeinträchtigt sind. Der mit den Hirn-Leistungs-Störungen verbundene Verlust von Nervenzellen im Gehirn geht bei der Alzheimerschen Erkrankung mit der Ablagerung von abnormen Proteinen einher. Hierzu zählt zum einen die im Zwischenzellraum nachweisbare Ablagerung von A- $\beta$ -Peptid sowie die innerhalb von Nervenzellen erfolgende Ablagerung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau. Die physiologische Funktion des Tau-Proteins besteht in der Stabilisierung von Mikrotubuli. Hierbei ist die Wechselwirkung zwischen dem Tau-Protein und den Mikrotubuli durch Proteinephosphorylierung des Tau-Proteins reguliert. So ist beispielsweise während Phasen der Hirnentwicklung, die ein relativ hohes Maß an Plastizität der axonalen Struktur und damit der Mikrotubuli notwendig machen, durch ein hohes Maß an Phosphorylierung die Wechselwirkung zwischen Tau-Proteinen und Mikrotubuli relativ gering. Nach Etablierung der synaptischen Kontakte kommt es zu einer Stabilisierung der axonalen Strukturen und damit auch der Mikrotubuli, was mit einer Reduzierung der Tau-Phosphorylierung einhergeht, wodurch die Wechselwirkung zwischen Tau und Mikrotubuli stabilisiert wird. Bei der Alzheimerschen Erkrankung kommt es aus bisher unbekanntem Gründen wiederum zu einer höheren Phosphorylierung des Tau-Proteins, damit zu einem verstärkten Ablösen des Tau-Proteins von den Mikrotubuli und damit zum einen zu einer Störung der Mikrotubuli-Struktur und damit des axonalen Transportes und zum anderen zu einer Aggregation des nun physiologisch nicht mehr verwendbaren Tau-Proteins. Dieses aggregierte Tau-Protein lässt sich elektronenmikroskopisch als sogenannte „paired helical filaments“ nachweisen, die die Grundstruktur der neurofibrillären Tangles bilden. Wesentliche Fortschritte im Verständnis dieser Prozesse der Tau-Protein-Phosphorylierung und seiner Konsequenzen für das Überleben von Nervenzellen sind durch das Fehlen geeigneter Tiermodelle bisher eingeschränkt gewesen. In den zurückliegenden Jahren konnten wir zeigen, dass es beim Winterschlaf von kleinen Nagetieren zu

ganz ähnlichen Veränderungen des Tau-Proteins kommt, wie sie bisher nur von der Alzheimerschen Erkrankung bekannt waren. Der Winterschlaf stellt damit ein geeignetes Modell dar, dass es erlaubt, Prozesse der Regulation der Tau-Phosphorylierung zu untersuchen und damit Ansätze für eine mögliche Therapie der Alzheimerschen Erkrankung zu identifizieren.

## **$\beta$ -Amyloid und Morbus Alzheimer**

*Prof. Dr. Reinhard Schliebs, Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung,  
Abteilung für Neurochemie, Universität Leipzig*

Die Alzheimersche Erkrankung ist die am meisten vorherrschende Form der Demenz im Alter. Heute leiden etwa 15 Millionen Menschen weltweit an dieser Erkrankung. Größtes Risiko ist das Altern. Die Prävalenz verdoppelt sich bei Menschen, die über 60 Jahre alt sind, alle fünf Jahre, d.h., sie wächst von 1% unter den 60-64-Jährigen auf über 40% bei jenen, die älter als 85 Jahre sind. Mit der zunehmenden Lebenserwartung wird diese Erkrankung damit zu einer sozialen Herausforderung, zumal es immer noch keine Therapie bzw. Präventionsmöglichkeiten gibt.

Der deutsche Neurologe Alois Alzheimer beschrieb im Jahre 1906 eine 51-jährige Patientin, die durch hochgradige präsenile Demenz imponierte. Er postulierte, daß ihre Demenz auf die in Autopsiematerial beobachteten neuropathologischen Läsionen, wie das massive Auftreten von extrazellulären senilen Plaques und die Akkumulation von neurofibrillären Tangles im Zytoplasma von Neuronen, zurückzuführen sein sollte. Sein Mentor, Emil Kraepelin, benannte dieses Erkrankungsbild später (1910) nach Alois Alzheimer.

Als man Ende der 1960-iger Jahre in Hirnautopsiematerial von alten Menschen mit dementieller Symptomatik, neuropathologische Merkmale beobachtete, die denen von Alzheimer beschriebenen sehr ähnlich waren, wurde bereits vermutet, daß die altersbedingte Demenz ihre Ursachen in der Alzheimerschen Erkrankung haben könnte. Ätiologische Studien zur Alzheimerschen Erkrankung zeigten zunächst keine erbliche Komponente. Im Jahre 1981 jedoch berichteten Leonard Heston und Mitarbeiter (University of Minnesota), von einem gehäuften Auftreten der Erkrankung bei 125 miteinander verwandten Patienten, woraus auf eine genetische Übertragung geschlossen wurde. Interessant war auch der Befund, daß Patienten mit Down-Syndrom (Trisomie 21) Alzheimer-typische Neuropathologien aufwiesen. Durch die proteinbiochemische Analyse der cerebrovaskulären Ablagerungen von Downsyndrom-Patienten durch George Glenner und Caine Wong (University of California, San Diego) im Jahre 1984 konnte ein 4 kDa großes Peptid, welches als  $\beta$ -Amyloid-Protein bezeichnet wurde, als Hauptbestandteil der Ablagerungen charakterisiert werden. Ein Jahr später konnten Colin Masters (University of Western Australia) zusammen mit der Arbeitsgruppe um Konrad Beyreuther (Universität Köln) A $\beta$  auch als den Hauptbestandteil der senilen Plaques aus Hirnautopsiematerial von Alzheimerpatienten isolieren. Auf der Grundlage der so ermittelten Aminosäuresequenz von A $\beta$ , konnten gleich vier Arbeitsgruppen (Goldgaber et al., Kang et al., Robakis et al., Tanzi et al.) im Jahre 1987 jenes Gen charakterisieren, welches für das  $\beta$ -Amyloidpräkursorprotein (APP) kodiert und woraus das  $\beta$ -Amyloidpeptid durch proteolytisches Prozessieren gebildet wird. Das APP-Gen wurde auf Chromosom 21 lokalisiert, wodurch ein Zusammenhang zum Down-Syndrom ersichtlich wurde. Genetische Studien in Alzheimer-Populationen, die familiär gehäuft und sehr frühzeitig (Ausbruch der Krankheit im Alter zwischen 45 und 50 Jahren; auch als familiäre Form der Alzheimerschen Erkrankung bezeichnet) auftreten, zeigten dann, daß ein Teil der Patienten Mutationen im APP-Gen aufwiesen, die für die frühzeitige und verstärkte Bildung des  $\beta$ -Amyloid und der damit verbundenen Plaqueablagerung bei diesen Patienten verantwortlich zu sein schienen. Jedoch konnte bei der überwiegenden Zahl der Patienten, die an der familiären Form der Alzheimer-Krankheit litten, keine Veränderungen im APP-Gen nachgewiesen werden. Nach intensiver Suche konnten im Jahre 1995 bei diesem Patientenkreis Mutationen in zwei Genen

identifiziert werden, die auf dem Chromosom 14 und Chromosom 1 lokalisiert sind und die als Präsenilin 1 bzw. Präsenilin 2 bezeichnete Proteine kodieren. Die Präseniline sind Membranproteine mit 8 transmembranalen Domänen, die einer regulierten endoproteolytischen Spaltung unterliegen. Bis heute sind bei den familiären, vererbaren Alzheimerformen 16 Mutationen im APP, 140 Mutationen im Präsenilin 1 und 10 Mutationen im Präsenilin 2 beschrieben worden, die allerdings weniger als 5% aller Alzheimerfälle repräsentieren.

Bei der späten (> 65 Jahre), sporadischen Form der Alzheimerschen Erkrankung ließen sich keine Defekte im APP- bzw. Präsenilin-Genen nachweisen, während das Vorkommen von Gen-Polymorphismen das Erkrankungsrisiko beeinflussen kann. So wurde beobachtet, daß Träger des Allels  $\epsilon 4$  von Apolipoprotein E, das eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel spielt, ein höheres Risiko haben, an Morbus Alzheimer zu erkranken als Träger des  $\epsilon 2$ -Allels.

Studien zur Funktion des APP und der Präseniline, der pathogenen Rolle der beobachteten Mutationen, die unweigerlich zum Ausbruch der Erkrankung führen, sowie der zugrundeliegenden Signal- und Stoffwechselwege sind seitdem der Gegenstand intensiver Forschung geworden. Untersuchungen dieser Gene und Proteine in Zellsystemen und geeigneten Tiermodellen (transgene Ansätze) haben die bereits von Glenner und Wong 1984 postulierte  $\beta$ -Amyloid-Hypothese der Alzheimerschen Erkrankung weiter gestützt. Diese Hypothese geht von einer zentralen Rolle des  $\beta$ -Amyloids für die Auslösung der Alzheimerschen Erkrankung aus, und argumentiert, daß die progressiven neurodegenerativen Prozesse einschließlich der Bildung der intrazellulären neurofibrillären Tangles, eine Folge der erhöhten  $\beta$ -Amyloid-Akkumulation sind, was wiederum auf eine Störung des Gleichgewichts von Bildung und Abbau des  $\beta$ -Amyloids zurückgeführt wird.

APP ist ein integrales Membranglykoprotein mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 110-130 kDa, welches eine singuläre transmembranale Domäne, eine lange extrazelluläre N-terminale Domäne und eine relativ kurze intrazelluläre C-terminale Region aufweist. Um die Bildung des  $\beta$ -Amyloid-Fragmentes aus dem APP-Molekül zu erklären, wurde eine  $\beta$ -Sekretase postuliert, die nach der Aminosäure 671, exakt am Beginn des N-Terminus des  $\beta$ -Amyloid-Fragments schneidet, gefolgt von der Wirkung der  $\gamma$ -Sekretase, die exakt am C-Terminus der  $\beta$ -Amyloid-Region proteolytisch wirkt, wodurch das  $A\beta$ -Peptid freigesetzt und ein C-terminales Fragment in der Membran zurückbleibt. Durch die  $\beta$ -Sekretase-Aktivität wird aber auch eine verkürzte Form des APP freigesetzt bzw. sekretiert (sAPP $\beta$ ; daher der Name Sekretasen, die eigentlich Endoproteasen darstellen). Erfolgt jedoch die proteolytische Spaltung zwischen den Aminosäuren 16 und 17 der  $\beta$ -Amyloid-Region, was durch eine als  $\alpha$ -Sekretase bezeichnete Protease katalysiert wird, kann kein  $\beta$ -Amyloid entstehen (nicht-amyloidogener Weg der APP-Prozessierung; physiologischer APP-Metabolismus). Durch die Wirkung der  $\alpha$ -Sekretase entsteht ein großes lösliches extrazelluläres Fragment (sAPP $\alpha$ ), und ein in der Membran zurückbleibendes C-terminales Fragment, woraus durch anschließende Wirkung der  $\gamma$ -Sekretase ein 3 kDa-großes Peptid (p3) freigesetzt wird (Abb. 1).

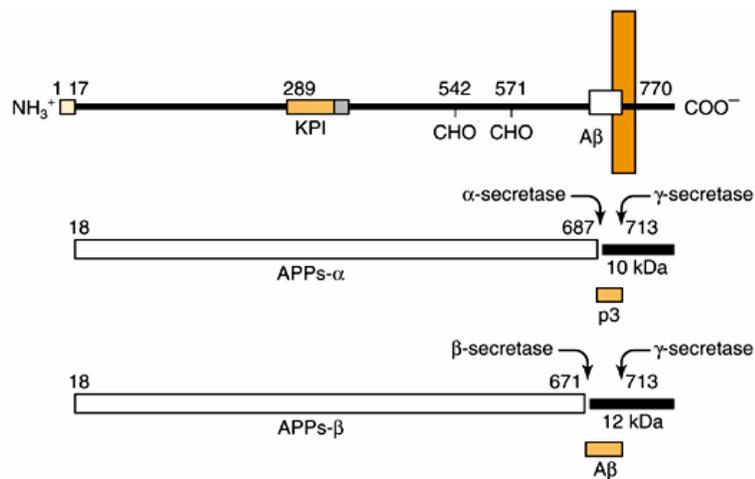


Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Wege über die das Amyloidpräkursorprotein (APP) verstoffwechselt (prozessiert) werden kann (Einzelheiten, siehe Text; Abbildung aus Basic Neurochemistry, 1999).

KPI, Kunitz-Protease-Inhibitor-Region; CHO, Glykosylierungsstellen. Die Numerierung der Aminosäuren (Zahlen) beginnt am N-Terminus des APP. Die senkrechte Box in orange symbolisiert die Zellmembran.

Der zunächst überraschende Befund, daß  $\beta$ -Amyloid als zirkulierendes Peptid im Plasma und in der Cerebrospinalflüssigkeit auch bei gesunden Menschen nachweisbar war, führte zu der Annahme, daß  $\beta$ -Amyloid auch eine physiologische Funktion haben muß. Inzwischen gibt es eine Reihe von in vitro-Befunden, die zeigen, daß physiologisch gebildetes  $\beta$ -Amyloid die zentralnervöse cholinerge Neurotransmission modulieren kann.

Neben den genannten neuropathologischen Läsionen geht die Alzheimersche Erkrankung auch mit einem früh einsetzenden Verlust cholinergischer Neuronen im basalen Vorderhirn einher. Die kognitiven Defizite der Alzheimerpatienten werden mit den Ausfällen in der cholinergen Neurotransmission in Verbindung gebracht, was auf einer Reihe von tierexperimentellen Untersuchungen und medizinischen Beobachtungen basiert. Bisherige Therapieansätze zielen daher auf eine Verbesserung der Effizienz der cholinergen Transmission, um die cholinergen Neuronenverluste zu kompensieren. Zellkultur-Studien und tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Hemmung der cholinergen Transmission die APP-Prozessierung zugunsten des amyloidogenen Weges verschiebt, was auf eine cholinerge Kontrolle des APP-Metabolismus hinweist. Inzwischen konnten eine Reihe weiterer Moleküle und Signalwege gefunden werden, die ebenso den APP-Metabolismus wechselseitig beeinflussen können: pro-inflammatorische Zytokine, der Nervenwachstumsfaktor (NGF). Dadurch ergibt sich ein komplexer Zusammenhang zwischen cholinergischer Neurotransmission, Zytokin- und Neurotrophin-Signalkaskaden, sowie des APP-Stoffwechsels (Abb. 2). Störungen in diesem komplexen Gleichgewicht werden als Auslöser der sporadischen Form der Alzheimerschen Erkrankung diskutiert, was für die Ableitung von therapeutischen und präventiven Ansätzen von großer Bedeutung ist.

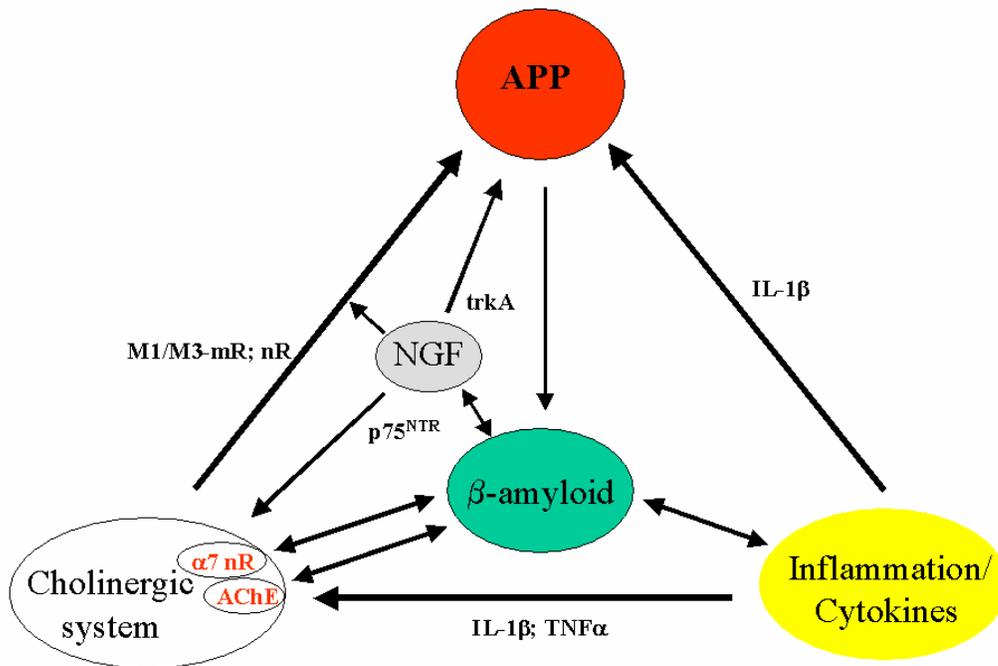


Abb. 2: Wechselbeziehung von cholinergem Neurotransmission, Stoffwechsel des Amyloidpräkursorproteins (APP) und dem durch  $\beta$ -Amyloid ausgelösten Induktion von proinflammatorischen Zytokinen (Interleukin (IL)-1 $\beta$ ; Tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$ ).

Aktivierung der M1/M3, -aber nicht der M2/M4-muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) erhöht die Sekretion von sAPP $\alpha$  und setzt die  $\beta$ -Amyloidbildung herab. Stimulierung der nikotinischen Rezeptoren (nR) moduliert die APP-Prozessierung zugunsten des nicht-amyloidogenen Weges und hemmt die  $\beta$ -Amyloidfibrillenbildung. Die Acetylcholinesterase (AChE) kann Komplexe mit  $\beta$ -Amyloid bilden, wodurch die  $\beta$ -Amyloidaggregation verhindert wird. Umgekehrt, kann  $\beta$ -amyloid selbst die Expression der AChE in Plaquenähe stimulieren, was durch Aktivierung des  $\alpha 7$ -Subtyps des nR vermittelt wird. Lösliches  $\beta$ -Amyloid kann bei physiologischen Konzentrationen (nM) Prozesse an der cholinergen Synapse inhibieren, während fibrillärem  $\beta$ -Amyloid eine zytotoxische Rolle zugeschrieben wird.

$\beta$ -Amyloidplaqueablagerungen führen zu lokalen Entzündungsreaktionen, die mit der Expression einer Reihe von inflammatorischen Zytokinen wie von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  durch aktivierte Mikro- und reaktive Astroglia in der Umgebung der Plaques einhergeht. Experimentelle Befunde, wonach IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  selektiv cholinerge Neuronen im basalen Vorderhirn ausschalten können, und IL-1 $\beta$  den amyloidogenen Weg der APP-Prozessierung begünstigt, unterstreichen die Rolle entzündlicher Mechanismen in der Pathogenese der Erkrankung.

Der Nervenwachstumsfaktor (NGF) spielt im ausgereiften Hirn eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung vitaler Funktionen von cholinergen Neuronen. Durch Wechselwirkung von NGF mit seinen Rezeptoren trkA und p75<sup>NTR</sup> und Auslösung einer spezifischen intrazellulären Signalkaskade kann NGF auch die cholinerge Kontrolle der APP-Prozessierung modulierend beeinflussen. Befunde, wonach p75<sup>NTR</sup> auch eine Rolle bei der Vermittlung der  $\beta$ -Amyloid-Zytotoxizität spielen soll, werden zur Zeit noch diskutiert.

# **Transgene Ansätze zum Studium pathogener Mechanismen**

*Dr. Uwe Ueberham, Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung Neuroanatomie,  
Universität Leipzig*

## (A) Allgemeines:

Transgene Tiere (TG) sind Tiere, deren Genom durch verschiedene molekularbiologische Techniken gezielt mutiert wurde. Diese Mutationen werden an die Nachkommen vererbt. Man unterscheidet grundsätzlich zwei Möglichkeiten der Mutation:

- (1) die (Über)expression von einem oder mehreren Genen („gain of function“),
- (2) die Inaktivierung einer Genfunktion („loss of function“).

## Welche Tierarten sind verwendbar?

Für Laborzwecke werden vorrangig transgene Mäuse oder Ratten generiert. Es wurden aber auch bereits transgene Kaninchen, Schafe, Ziegen oder Rinder hergestellt.

Grundsätzlich ist die Effizienz des Gentransfers relativ niedrig. Bei der Maus ist sie mit 10 bis 15 Prozent am höchsten, bei Schweinen beträgt sie durchschnittlich nur etwa zwei Prozent, beim Rind sogar nur ein Prozent.

Nach Schätzungen wurden inzwischen über 10.000 transgene Tiermodelle entwickelt.

## Nutzen transgener Tiere

- (1) Untersuchungen von Erbkrankheiten (So sind beim Menschen über 3.000 genetische Erkrankungen bekannt.)
- (2) Untersuchungen der Genregulation (Signalkaskaden)
- (3) Studium der Funktion eines Genes während der Entwicklung des Organismus
- (4) Herstellung von bestimmten Proteinen in großen Mengen („Gene Pharming“) und mit erwünschten posttranskriptionellen Modifikationen (Glykosylierungen)
- (5) Testsysteme (z. B. rasH2-Mäuse besitzen eine erhöhte Tumorzinzidenz und sind als Tumormodelle für humane Karzinogene geeignet. Gleichzeitig kann mit solchen Tieren eine Verringerung der notwendigen Tierzahlen, die sonst für vergleichbare Experimente erforderlich wären, erreicht werden.)
- (6) Untersuchungen von Krankheiten (Diabetes, Fettstoffwechselerkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimersche Krankheit [AD])

## Rechtliche Grundlagen

Die Herstellung und Haltung von TG ist in Deutschland strengen gesetzlichen Regelungen unterworfen und wird regelmäßig behördlich kontrolliert.

Folgende Gesetze sind von besonderer Bedeutung

1. Gentechnikgesetz, Gentechnik-Sicherheitsverordnung und Gentechnik-Aufzeichnungsverordnung
2. Embryonenschutzgesetz
3. Tierschutzgesetz

## Generierung von TG

Erste Experimente über eine direkte Einführung von fremden genetischen Materials in einen Mausembryo wurden in den frühen 70ziger Jahren des vorigen Jahrhunderts vorgenommen. Es wurde gezeigt, dass DNA des Maus Leukämie Virus (MMLV) in der Keimbahn preimplantierter

Mausembryonen mittels viraler Transfektion stabil integriert wurde. Dennoch dauerte es bis es zur verlässlichen und reproduzierbaren Integration von Fremd-DNA noch etwa weitere 10 Jahre. Die Herstellung von TG erfordert die Kombination von molekularbiologischen, proteinbiochemischen und zellbiologischen Techniken:

- Isolierung von RNA oder genomischer DNA aus Gewebe
- Vervielfältigung (Amplifikation) der Gensequenzen, die exprimiert oder mutiert werden sollen, mittels RT-PCR oder PCR (Polymerase-Kettenreaktion)
- Klonierung der nun erhaltenen PCR-Produkte in geeignete Vektoren (Gentransport- und Expressionssysteme)
- Amplifikation dieser Vektoren in Bakterien
- Nachweis der klonierten DNA durch Southern Blot oder DNA-Sequenzierung
- Transfektion von eukaryonischen Zellen zum Nachweis der Proteinexpression und umfassende funktionelle Analyse des Proteins *in vitro* (u.a. Western-Blot Analyse)
- Verwendung ausgewählter DNA-Konstrukte für die Herstellung von transgenen Tieren

Das Einführen von DNA-Konstrukten in Körperzellen eines Tieres z.B. einer Maus erfordert die Isolierung von Zygoten bzw. Blastozysten, eine sich anschließende Mikromanipulation *ex utero* und eine Implantation in scheinträchtige Weibchen.

Heute werden für das Einführen von DNA-Konstrukten folgende spezielle Verfahren verwendet:

- (1) Vorkerninjektion (Pronucleusinjektion)
- (2) Homologe Rekombination
- (3) Virale Transfektion

Nach erfolgreicher Generierung einzelner TG wird meist mittels klassischer Züchtungsmethoden die Auswahl und Vermehrung geeigneter Mäusestämme für die weiteren Untersuchungen vorgenommen.

#### Wesentliche experimentelle Probleme und Limitationen:

Transgene Tiermodelle sind oft nicht in der Lage, Krankheiten des Menschen *umfassend* darzustellen. Die gentechnische Veränderung im Erbgut der Tiere wirkt nicht für sich allein, sondern steht in Wechselwirkung mit dem gesamten genetischen Hintergrund. Da dieser bei Mensch und Tier unterschiedlich ist, ist es zum Teil sehr schwierig, menschliche Erkrankungen in Tieren zu reproduzieren.

- Ein Gendefekt, der beim Menschen eine Krankheit auslöst, führt bei Tieren nicht unbedingt zu den gleichen Symptomen.
- Verschiedene Krankheiten, sind nicht ausschliesslich genetisch bedingt, sondern haben auch andere Ursachen.

Dennoch stellt die Untersuchung an TG in der medizinischen Forschung eine wesentliche Stufe auf dem Weg zur wirksamen Therapieentwicklung für den Menschen dar.

#### (B) Wichtige transgene Tiermodelle für die Untersuchung von neurodegenerativen Erkrankungen (Beispiel Alzheimersche Krankheit)

In den letzten 15 Jahren wurden Modelle mit dem Ziel geschaffen, dem Krankheitsbild der Alzheimerschen Demenz (AD) möglichst nahe zu kommen. Da es sich bei der AD um ein sehr komplexes Geschehen handelt, sind verschiedene TG Tiermodelle etabliert worden die jeweils

einzelne Aspekte der Krankheit repräsentieren. Folgende Proteine stehen dabei im Mittelpunkt des Interesses: Amyloid Precursor Protein (APP), Tau-Protein, Apolipoprotein E (ApoE) und verschiedene Proteine des Zellzyklus. Durch Verpaarung verschiedener TG-Modelle wird dem multifaktoriellen Charakter der Erkrankung Rechnung getragen

Wichtige Fragestellungen, die mit den vorhandenen TG-Tiermodellen bearbeitet werden:

1. Sind durch einzelne oder komplexere TG einzelne/alle Krankheitszeichen der AD modellierbar (experimentell nachvollziehbar)?
  - a. Amyloidogene Plaques
  - b. Überphosphoryliertes Tau-Protein und neurofibrilläre Tangles
  - c. Verlust von Neuronen (neuronaler Zelltod, Apoptose) und kognitiven Funktionen
  - d. Verhaltensdefizite
  
2. Sind mögliche Therapieansätze, die an diesen Modellen getestet werden tatsächlich erfolgreich?
  - I.) *Ist eine Entfernung von beta-Amyloidablagerungen, aus dem Hirn möglich?*
    - a. durch den Einsatz von Antikörpern, die vorhandene Plaques auflösen
    - b. durch die Aktivierung von Zellen (Astrozyten, Mikroglia), die abgelagertes Amyloidprotein entfernen (TGF-beta-Modell)
  
  - II.) *Sind endzündliche Veränderungen durch den Einsatz von Medikamenten vermeidbar bzw. reduzierbar?*
    - z. B. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)
  
  - III.) *Ist der neuronale Zelltod vermeidbar durch Aktivierung von Inhibitoren (Hemmstoffen) des Zellzyklusses und kann daraus ein neuer therapeutischer Ansatz entwickelt werden?*

# **Pathologische Proteine bei Morbus Parkinson und Morbus Huntington**

*Prof. Dr. J. Schwarz, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universität Leipzig*

Morbus Parkinson gehört zu den häufigsten sporadischen (in Deutschland ca. 200.000 Patienten) und der Morbus Huntington zu den häufigsten monogenetisch-bedingten (in Deutschland ca. 6.000 Patienten) neurodegenerativen Erkrankungen. Das idiopathische Parkinson-Syndrom ist neuropathologisch durch die Degeneration (Abblässung) der Substantia nigra und neurochemisch durch den daraus resultierenden Dopamin-Mangel im Innervationsgebiet dieser Neuronen, als im Wesentlichen dem Striatum, charakterisiert. Das neuropathologische Charakteristikum dieser Erkrankung sind Einschlusskörperchen im Zytoplasma der verbleibenden dopaminergen Neuronen (Lewy-Körperchen). Diese Einschlusskörperchen bestehen aus ubiquitinierten Proteinen, die nicht adäquat abgebaut werden können, wie beispielsweise  $\alpha$ -Synuklein (als ein wesentlicher Bestandteil), Synphilin-1, Parkin und Ubiquitin, aber auch andere Strukturproteinen wie Tau,  $\alpha$ -Tubulin und Synaptophysin. Neben diesen zytoplasmatischen Lewy-Körperchen treten auch Aggregate in den Neuriten und Axonen auf, die ebenfalls  $\alpha$ -Synuklein enthalten.

Die Degeneration der dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta und der dadurch bedingte Dopaminmangel im Striatum führt zu Veränderungen in der direkten und indirekten motorischen Basalganglienschleife. Daraus resultiert eine gesteigerte Aktivität der Nervenzellen im Globus pallidus internus und Nucleus subthalamicus.

IN den vergangenen Jahren konnten mehrere Mutationen in Familien mit Parkinson-Syndrom identifiziert werden, die auch Relevanz für die sporadische Erkrankung haben. Nach der Identifikation der Mutationen im Gen des  $\alpha$ -Synukleins zeigte sich, dass  $\alpha$ -Synuklein ein wichtiger Bestandteil der Lewy-Körperchen ist. Der gestörte Abbau des  $\alpha$ -Synukleins zusammen mit den Mutationen im Gen des Parkins (PARK2, Ubiquitin-Ligase) und der terminalen Ubiquitinhydrolase (PARK5) stellen die Bedeutung einer gestörten proteasomalen Funktion für die Vulnerabilität der dopaminergen Neuronen heraus. Interessant ist, dass auch in Gehirngewebe von sporadischen Patienten ohne die genannten Mutationen eine Reduktion der proteasomalen Aktivität in der Substantia nigra nachgewiesen werden kann. Die Bedeutung dieses Systems wird durch Tier- und Zellkulturexperimente nochmals bestätigt, die eine selektive Sensitivität dopaminergener Neuronen gegenüber der toxischen Wirkung von chemischen Proteasom-Inhibitoren zeigen. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist das wichtigste System einer Zelle zum Abbau nicht mehr benötigter oder fehlerhafter Proteine. Gerade bei den postmitotischen Zellen stellt die Vernichtung von Proteinschrott eine wesentliche Funktion dar, da dieser nicht durch Zellteilung reduziert werden kann. Auch hier bleibt die Frage unklar, warum gerade dopaminerge Neuronen empfindlich gegenüber einer Fehlfunktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems sind. Neue Studien belegen, dass dies eng mit dem Dopaminstoffwechsel und wahrscheinlich der Produktion freier Radikale zusammen hängt. Letztendlich stellt das Ubiquitin-Proteasom-System sogar inzwischen ein interessantes Medikamentenziel dar.

Der Morbus Huntington (oder Chorea Huntington) ist eine autosomal-dominant vererbte progressive neurodegenerative Erkrankung mit Beteiligung der Basalganglien und des Kortex. Das typische Erkrankungsalter liegt um das 40. Lebensjahr, kann jedoch vom 3. bis 80. Lebensjahr variieren. Die klinische Symptomatik besteht aus nicht-kontrollierbaren Überbewegungen (Veith's-Tanz), kognitiven Störungen und psychiatrischen Symptomen und/oder Verhaltensauffälligkeiten. Die Bewegungsstörung kann jedoch insbesondere bei jüngeren Patienten und im späten Krankheitsstadium ein akinetisch-rigides Parkinson-Syndrom umfassen, so dass der Morbus Huntington eine Differentialdiagnose insbesondere des juvenilen Parkinson-Syndroms ist.

Bei der Chorea Huntington liegt der Gendefekt auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 (Locus: 4p16.3). Diese Erkrankung gehört zu den sogenannten Triplet-Repeat Erkrankungen, bei der es durch die pathologische Verlängerung einer CAG-Sequenz zur Bildung eines veränderten Proteins kommt. Beim Morbus Huntington ist diese Sequenz im Exon 1 des Gens für das Protein Huntingtin verändert, was zu einer Verlängerung einer Polyglutaminkette am N-terminalen Ende des Proteins führt. 6–35 dieser Wiederholungen („repeats“) sind physiologisch. Bei einer Wiederholungszahl von 36–39 ist die Mutation nicht vollständig penetrant, ab einer Verlängerung auf 40 Repeats oder mehr liegt eine vollständige Penetranz vor. Das Vorliegen von 60 Repeats oder mehr führt in aller Regel zu einem juvenilen Morbus Huntington. Diese Wiederholungen sind instabil, wobei es insbesondere bei paternaler Vererbung häufig zu einer weiteren Expansion der Wiederholungen kommt. Dies führt zur klinischen Erscheinung der Antizipation, d.h. eines früheren Auftretens der Symptome und einer rascheren Progression der Erkrankung in der betroffenen Folgegeneration. Dabei ist die CAG-Repeat-Verlängerung zwar sowohl in der maternalen als auch in der paternalen Meiose instabil, aber in der maternalen Vererbung kommt es selten zu einer deutlichen Verlängerung (meist zwischen 1 und 5 Repeats). Bei einer paternalen Vererbung kommt es dagegen zu einer meist deutlichen Verlängerung (bis zur Verdopplung der Repeats oder mehr), wodurch das Phänomen der deutlichen Verschlechterung der Prognose bei einer Vererbung vom Vater erklärt wird. Die physiologische Funktion des Huntingtins, welches im Zytoplasma in Assoziation mit Vesikeln gefunden wird, ist noch nicht geklärt. Durch die Verlängerung der Polyglutaminkette bekommt dies Protein andere Funktionen, ohne wahrscheinlich seine physiologischen Funktionen zu verlieren. Im Verlauf der Erkrankung kommt es dann zu abnormen nukleären Aggregaten des mutierten Huntingtins. Neuropathologisch findet sich eine im Vordergrund stehende Atrophie und Neuronenverlust im Striatum und weniger ausgeprägt auch in kortikalen Arealen. Diese Neurodegeneration ist begleitet von einer fibrillären Astrozytose.

## Pathogene Mutationen in der Retina

*Prof. Dr. Andreas Reichenbach, Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung für Neurophysiologie, Universität Leipzig*

Gegenstand der Vorlesung sind Mutationen von Genen für wichtige (obwohl teilweise noch in ihrer Funktion aufzuklärende) Proteine der Netzhaut, und ihre strukturellen und funktionellen Auswirkungen für das Sehen der Patienten.

Die Netzhaut ist ein in das Auge "vorgelagerter" Teil des Zentralnervensystems; sie ist für die Aufnahme und Verarbeitung von Lichtreizen spezialisiert. Lichtsinneszellen sind die Photorezeptoren, von denen es zwei verschiedene Klassen gibt: Zapfen (für das Tagessehen, mit hoher Sehschärfe und Farbsehen) und Stäbchen (für das Dämmerungssehen, mit hoher absoluter Empfindlichkeit). Mit Ausnahme der höheren Primaten haben die Säugetiere nur zwei Typen von Zapfen-Sehzellen mit unterschiedlichen Sehpigmenten (optimiert entweder für blau / grün oder für blau / rot: "dichromatisches Farbsehen"). Der Mensch hat ein trichromatisches System (blau / grün / rot); allerdings haben sich rotes und grünes Sehpigment erst relativ spät in der Phylogenese getrennt, und Gendefekte sind häufig (fast 10% aller Männer leiden an Rot-Grün-Schwäche oder gar -blindheit; Abb. 1).

Für das Sehen unter Dämmerungsbedingungen oder in tieferen Gewässern ("skotopisch") haben sich später in der Phylogenese die Stäbchen-Sehzellen entwickelt; sie haben eine hohe absolute Lichtempfindlichkeit. Das wird durch eine komplexe Ultrastruktur und eine noch komplexere molekulare Signalkette zwischen der Lichtabsorption im Sehfarbstoff (Rhodopsin) und den Ionenkanälen in der Zellmembran erreicht (Abb. 2). Für fast alle dieser zahlreichen Proteine sind beim Menschen Gen-Mutationen bekannt. Sie führen meist zum völligen Funktionsverlust und später zum Absterben der Stäbchenzellen (sowie zu Veränderungen des retinalen Pigmentepithels). Es ergibt sich ein äußerlich "gemeinsames" Krankheitsbild, die Retinitis pigmentosa (Abb. 3), die viele Patienten betrifft und meist zur Erblindung führt. Allerdings leiden immer nur wenige Patienten (oft einzelne Familien) am genau gleichen Gendefekt; das macht die Forschung auf diesem Gebiet schwierig (und z.B. für Pharma-Firmen "unrentabel").

Für das scharfe Sehen spezialisierte Netzhautareale wie die Fovea centralis des Menschen weisen eine hohe Dichte von Zapfen und Ganglienzellen auf; die Zapfen-Außensegmente sind lang und dünn. Für unsere bewußte visuelle Wahrnehmung ist diese winzige Netzhautregion essentiell: etwa 90% der visuellen Information werden von etwa 1% der Netzhautfläche aufgenommen. Die Entstehung des Auges, aber ganz besonders auch der Fovea centralis, wird während der Embryonalentwicklung von einem "Master-Gen", Pax6, gesteuert. Gendefekte in Pax6 führen daher zu fehlender Entwicklung der Fovea (häufig kombiniert mit fehlender Iris; Abb. 4) oder sogar zum Fehlen des gesamten Auges.

Ein weiteres Protein der Netzhaut, das bei Mutationen Netzhauterkrankungen verursacht, ist Retinoschisin. Über seine normale Funktion ist wenig bekannt; es wird von den Sinneszellen und von bipolaren Nervenzellen der inneren Körnerschicht gebildet und freigesetzt und dann wahrscheinlich von den Gliazellen aufgenommen und an die innere Netzhautoberfläche transportiert. Mutationen des Proteins führen zum Absterben von Nervenzellen und zur Schwächung der Gliazellfortsätze; schließlich bildet sich eine Netzhautspaltung ("Retinoschisis": Abb. 5), die überdehnten Gliazellfortsätze reißen ab und die inneren Netzhautschichten lösen sich vom "Rest" ab. Das führt zur Erblindung (zumindest in den betroffenen Netzhautgebieten und damit in bestimmten Anteilen des Gesichtsfeldes).

Schließlich haben neueste Forschungsergebnisse es wahrscheinlich gemacht, daß auch eine weitere Erkrankung des Auges auf ein defektes Gen für ein Netzhaut-Protein zurückzuführen sein könnte: Die Kurzsichtigkeit, genauer gesagt, die Achsen-Myopie (Abb. 6). Unser Augapfel wächst nach der Geburt noch beträchtlich weiter, ebenso wie die Linse. Das Ausmaß dieses Wachstums ist streng kontrolliert, um Normalsichtigkeit ("Emmetropie") zu gewährleisten: Sobald das Bild auf der Netzhaut unscharf wird, erkennen dies bestimmte amakrine Neuronen der Retina und hemmen eine weitere Zunahme der Augenlänge, bis das Bild wieder scharf ist. Dabei spielt das Protein "ZENK" eine wichtige Rolle: Transgene Mäuse mit ZENK-Mangel haben große Augen und sind kurzsichtig.

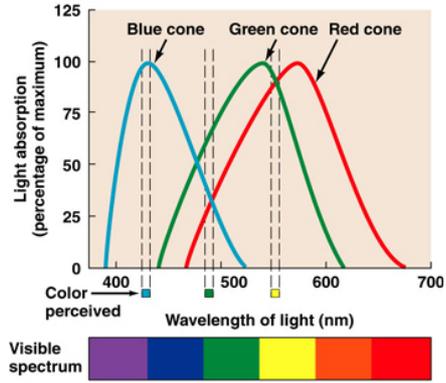


Abb. 1. Farbsehen des Menschen und der höheren Primaten. Unsere Vorfahren haben das trichromatische Sehen "wieder-erfunden", um z.B. reife von unreifen Früchten besser unterscheiden zu können (links). Dazu mußte das Gen für die grün- bzw. rot empfindlichen Zapfen modifiziert werden (rechts). Etwa 10% aller Männer haben einen Gendefekt in diesem Bereich und damit eine "Rot-Grün-Schwäche" bzw. -Blindheit.

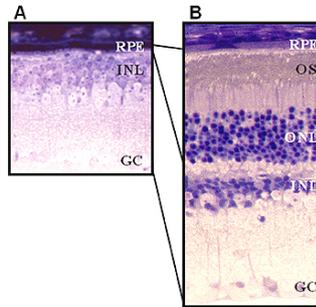
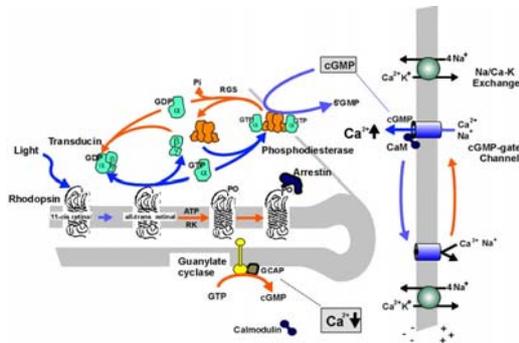


Abb. 2. Molekulare Signalkette vom Sehpigment Rhodopsin zu den Ionenkanälen in der Membran der Stäbchen.

Abb. 3. Gendefekte in diesen Proteinen verursachen das Absterben der Stäbchen-Lichtsinnzellen ("Retinitis pigmentosa").



Abb. 4. Ein Defekt im "Master-Gen" Pax6 führt zum Fehlen der Fovea centralis der Netzhaut und der Iris ("Aniridie" →).

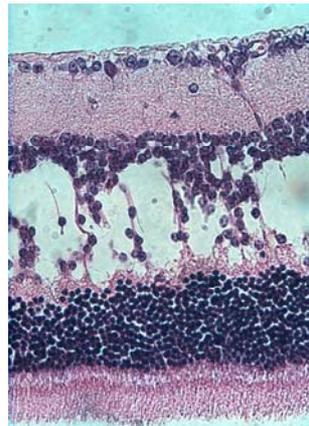


Abb. 5. Ein Defekt im Gen für das Protein Retinoschisin verursacht eine Netzhautspaltung ("Retinoschisis").

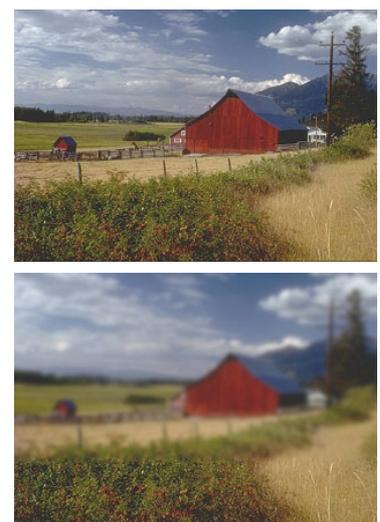


Abb.6. Achsen-Kurzsichtigkeit („Myopie“): Weiter entfernte Gegenstände werden unscharf. Das kann durch Modifikation des ZENK-Gens bei der Maus nachgeahmt werden