

Dank transgener Mäuse zu einem neuen Ansatz in der Alzheimer Therapie

Die Alzheimer-Krankheit ist eine Erkrankung, die vorwiegend bei älteren Menschen auftritt. Mit zunehmendem Alter der Bevölkerung steigt die Prävalenz der Erkrankung fast exponentiell an. Betroffene Patienten verlieren ihr Gedächtnis, ihre Persönlichkeit und die Fähigkeit, sich selbst zu versorgen und soziale Kontakte zu pflegen. Neben der persönlichen Tragödie stellt der schleichende geistige Verfall auch eine wachsende finanzielle Herausforderung für die Kranken- und Pflegekassen auf der ganzen Welt dar. So musste beispielsweise Medicare, eine US-amerikanische Krankenversicherung, 2008 für die Versorgung von Alzheimer-Patienten 94 Milliarden US-Dollar aufbringen – ein Drittel ihres Gesamtbudgets. Derzeit gibt es noch kein Arzneimittel auf dem Markt, mit dem das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamt oder gestoppt werden könnte. Die verfügbaren Medikamente lindern die Symptome, und das auch nur vorübergehend.

Die pharmazeutische Industrie unternimmt große Anstrengungen, um ein krankheitsmodifizierendes Arzneimittel zu entwickeln. Das letzte Jahrzehnt hat jedoch eine Reihe von Misserfolgen in den späten Phase 3-Studien gebracht. Die Gründe für diese Rückschläge sind vielfältig – möglicherweise hat man bislang auch an der falschen, vermeintlich ursächlichen molekularen Stelle angesetzt.

Ein großer Teil der Forschungsaktivitäten konzentriert sich nach wie vor auf Amyloidansammlungen (typischerweise in sogenannten neuritischen Plaques), aber inzwischen wird auch ein weiterer neuartiger Ansatz verfolgt, der auf den zweiten zentralen Pathomechanismus abzielt, die Neurofibrillenbündel. Auch diese wurden schon 1906 von Dr. Alois Alzheimer beschrieben. Es sollte jedoch bis in die 60er-Jahre dauern, bis Sir Martin Roth und dessen Mitarbeiter einen Zusammenhang zwischen der Belastung mit Fibrillenbündeln und dem Aus-

mass der klinischen Demenz erkannten. Nachdem es Claude Wischik in den 80er-Jahren gelungen war, diese Knäuel zu isolieren und aufzureinigen, wurde die Beschaffenheit und der Aufbau dieses neurofibrillären Gewirrs ermittelt: Sie bestehen aus Tau-Protein, einem Protein das essentiell für die Struktur von Neuronen (Nervenzellen) und für die Weiterleitung von Molekülen über die Axone (Nervenfortsätze) verantwortlich ist, über welche die Nervenzellen im Gehirn miteinander vernetzt sind. Jegliche abnorme Ansammlung von Tau-Protein in den Neuronen steht in engem Zusammenhang sowohl mit dem Untergang von Nervenzellen als auch mit klinischen Zeichen einer Demenz.

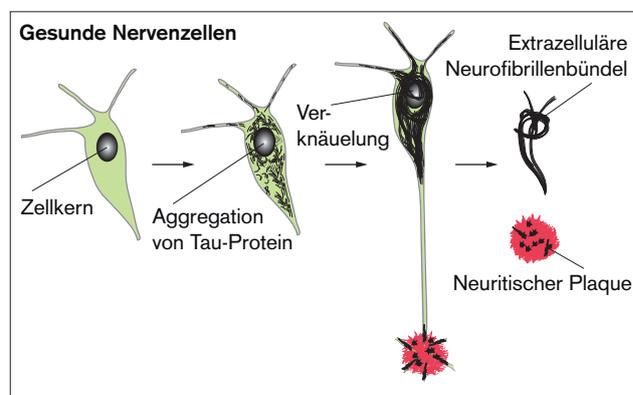


Fig. 1: Schematische Darstellung der neuronalen tauopathischen Veränderungen im zeitlichen Verlauf

Die deutschen Neuropathologen Heiko und Eva Braak entdeckten im Jahr 1991, wie sich die tauopathische Veränderungen ausbreiten, und beschrieben das charakteristische Muster des zeitlichen Verlaufs (Braak-Staging /Stadieneinteilung nach Braak und Braak). Die tauopathischen Veränderungen nehmen ihren Anfang mit Tau-Oligomeren im Hippocampus und dem entorhinalen Kortex - Gehirnregionen, die bei Mäusen und beim Menschen für kognitive Funktionen (Gedächtnis und Lernen) entscheidend sind. Je weiter die Er-

«Jede abnorme Ansammlung von Tau-Protein in den Neuronen steht in engem Zusammenhang sowohl mit dem Untergang von Nervenzellen als auch mit klinischen Zeichen einer Demenz»

krankung fortschreitet, desto mehr breiten sich die Neurofibrillenknäuel regelmässig weiter über den Schläfen-, den Scheitel- und den Frontallappen des Gehirns aus.

Postmortal kann die charakteristische Ausbreitung der tauopathologischen Veränderungen nachgewiesen werden und zeigt sich nahezu deckungsgleich mit dem regionalen Muster der zerebralen Defizite, die sich beim lebenden Patienten durch Gehirncans (Kernspin-Tomografien) nachweisen lassen. Hier lassen sich eine verminderte Durchblutung oder eine eingeschränkte Glukoseverwertung messen (SPECT oder PET). Die Muster dieser Defizite entsprechen wiederum dem klinischen Fortschreiten der Alzheimer-Krankheit, die durch verschiedene neuropsychologische Testbatterien nachverfolgt werden.

Im Jahr 1995 berichtete das Forscherteam um John Hardy in London, dass bei einem Patienten mit positiver Familienanamnese eine genetische Mutation für die Alzheimer-Krankheit verantwortlich sei. Die Mutation betreffe ein Protein, von dem Fragmente (Proteinuntereinheiten) zu unlöslichen Amyloid-Plaques außerhalb der Nervenzellen im Gehirn verklumpen. Dies war zuvor bereits von Alois Alzheimer als zweite unübersehbare pathologische Veränderung beschrieben worden und gab nun Anlass zur sogenannten Amyloid-Kaskaden-Hypothese, die besagt, die Grundvoraussetzung für die Entstehung der Erkrankung sei die Amyloid-Verklumpung zu Plaques.

Braak und Braak konnten im Gegensatz zu tauopathischen Veränderungen zeigen, dass diese Verklumpungen Teil des generellen Alterungsprozesses im Gesunden wie im Kranken zu sein scheinen, jedoch keinem klaren Progressions- oder Ausbreitungsmuster folgen. Über den Zusammenhang zwischen Amyloid-Ablagerungen und den Erschei-

nungsformen von kognitiven Funktionsverlusten bestehen unterschiedliche Auffassungen. Interessanterweise enthalten die von Alzheimer beschriebenen neuritischen Plaques nicht nur Amyloid, sondern auch Nervenendigungen, die eine große Zahl der gleichen Tau-Fibrillen aufweisen, wie sie auch in den Knäueln zu finden sind.

Die Aggregation von Tau-Protein

Um Arzneimittel zu entwickeln, die den Prozess der Tau-Aggregation und neurofibrilläre Knäuelbildung stoppen können, braucht es ein Modell, das den Aggregationsprozess abbildet, sodass Arzneimittelkandidaten getestet werden können. Sowohl im Zell- als auch im Maus-Modell konnte dieser Prozess der Tau-Aggregation ausgelöst werden. Ausgehend von wenigen abnormen Tau-Proteinen, lagert sich dabei weiteres Tau-Protein fortlaufend an. Dies führt zu einem stabilen, unlöslichen Komplex von Tau-Aggregaten. Unverstanden ist, was diesen Prozess im menschlichen Gehirn in Gang setzt, es scheint aber wahrscheinlich, dass er durch verschiedene Ereignisse ausgelöst wird. Zum einen wird abnormes Amyloid diskutiert, zum anderen die Ansammlung von abnormen Proteinen oder vom «Alters-Pigment». Einmal ausgelöst, breiten sich die tauopathischen Veränderungen auf Kosten des normalen Tau-Proteins weiter aus, wie unlängst in verschiedenen Studien gezeigt wurde. Neurofibrilläre Tau-Aggregate können von Zellen aufgenommen werden, die nicht-fragmentiertes Tau-Protein enthalten und an benachbarte Zellen weitergegeben werden, so dass sich die Aggregation ausbreitet. Ebenso kann die Übertragung und Ausbreitung von tauopathischen Veränderungen in Maus-Modellen induziert werden.

Sobald der Anstoß erfolgt ist, kann sich die Kaskade der Tau-Protein-Aggregation selbständig

fortsetzen, was sich in zweierlei Hinsicht negativ auswirkt. Zum einen wird dadurch das im Neuron normal funktionierende Tau-Protein in eine gebündelte Form wie in den Knäueln umgewandelt. Zum anderen aber sind die Tau-Aggregate direkt neurotoxisch und führen zum Untergang der Nervenzelle. In den von Wischik und seinem Team entwickelten Modellen konnte gezeigt werden, dass eine bestimmte Substanzklasse die Aggregation von Tau-Protein im Reagenzglas, in einer isolierten Zelle und dann in einem Maus-Modell hemmen kann.

Inhibitoren der Tau-Aggregation

Methylthioniniumchlorid (MT), gemeinhin auch als Methylenblau bezeichnet, erlangte als erster Tau-Aggregationshemmer Bekanntheit. Die MT-Konzentrationen, welche die Knäuel in vitro und in Zellmodellen wirksam auflösen können, entsprechen etwa den Konzentrationen, die sich beim Menschen ohne Sicherheitsbedenken erreichen lassen. Dies warf die Frage auf, ob sich MT als sicher und wirksam in der Behandlung der Alzheimer-Krankheit erweisen könnte.

Daher wurden zwei Mäusemodelle entwickelt, die zum einen belegen, dass die Tau-Aggregationen Defizite bei der kognitiven und motorischen Lernfähigkeit hervorrufen, und dass sich zum anderen innerhalb der Neuronen tauopathologische Veränderungen in einem abgestuften Prozess abspielen, der den neurodegenerativen Ausfallserscheinungen beim Menschen entspricht.

Diese Mäusemodelle bestätigten, dass MT: (a) die Blut-Hirn-Schranke passiert; (b) eine Veränderung des klinischen Phänotyps (kognitive Funktionen und motorische Lernfähigkeit) bewirkt und (c) die oligomere Tau-Belastung in für das Gedächtnis wichtigen Gehirnregionen vermindert.

Bereitstellung transgener Mäuse

Aus vier Wochen alten weiblichen Mäusen wurden befruchtete Eizellen entnommen. Der Vektor, der die Tau-codierende Sequenz (tau cDNA) unter der Kontrolle eines neuronalen Thy-1-Promoters enthält, wurde in die männlichen Pronuclei der befruchteten Eizellen mikroinjiziert. Nach der Mikroinjektion wurden die Eizellen in den Eileiter einer 8-10 Wochen alten pseudoträchtigen weiblichen NMRI-Maus eingesetzt. Die Überprüfung der transgenen Mäuse auf das Vorliegen einer human-spezifischen

eingesetzten Tau-DNA hin erfolgte durch Genotypisierung mittels PCR (Polymerasekettenreaktion). Die Anzahl der eingesetzten DNA-Kopien wurde mittels Southern Blot-Test ermittelt. Die Expression von tau-mRNA durch Northern Blot und Tau-Protein wurden dann mittels Immunoblots und eine immunhistochemische Untersuchung von Hirngewebe bestimmt.

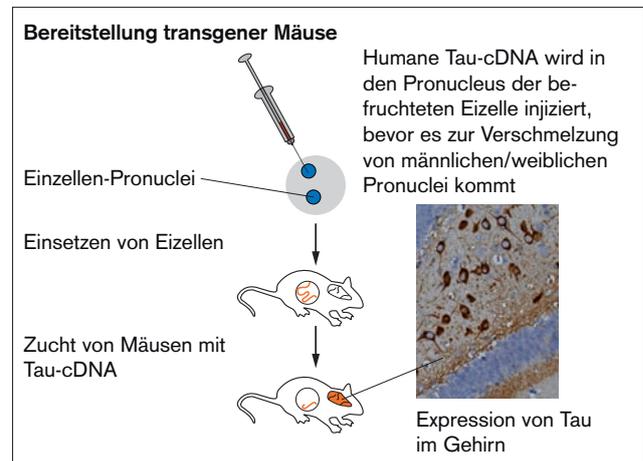


Fig. 2: Foto: braun angefärbte Tau-Knäuel in Neuronen

Im ersten transgenen Modell exprimieren Linie 1-Mäuse ein Tau-Fragment, das die zentrale Einheit in den einzelnen Filamenten der Alzheimer-Knäuel bildet. Das Protein ist so verändert, dass es sich gegen eine bestimmte Membranstelle richtet, wodurch abnormes Tau-Protein entstehen kann, was dann einer weiteren Tau-Aggregation Vorschub leistet. An diesen Mäusen lassen sich die wesentlichen phänotypischen Ausprägungen der Stadieneinteilung nach Braak nachvollziehen. Für Mäuse unter 12 Monaten finden sich die tauopathologischen Veränderungen vorwiegend im Hippocampus und entorhinalen Kortex. Mit zunehmendem Alter der Mäuse gehen die tauopathologischen Veränderungen auch auf andere kortikale Hirnregionen über.

Diese Linie 1-Mäuse entwickeln ab einem Alter von etwa 7 Monaten eine Einschränkung ihrer Lernfähigkeit, wie in einem Wasserlabyrinth-Test gezeigt werden konnte. Die Linie 1-Mäuse benötigen etwa doppelt so viele Versuche, um ein bestimmtes Lernziel zu erreichen, aber die orale Gabe von MT wirkt diesem Lerndefizit entgegen, während gleichzeitig die oligomere Tau-Belastung, d.h. die Menge der giftigen Verklumpungen, vermindert wird. In einem zweiten Mausmodell (Linie 66) wurde humanes Tau mit Mutationen verändert, welche die Tau-Aggregation beschleunigen. Diese Mutationen

finden sich tatsächlich auch bei einer anderen Art der Demenz, der frontotemporalen Demenz, bei der die Primärsymptome meist Verhaltensauffälligkeiten und nicht Veränderungen in der Gedächtnisleistung beinhalten. Auch im zweiten Mausmodell zeigte MT positive Wirkungen. Während die Linie 1-Maus nur sehr moderate tauopathologische Veränderungen zeigt, ist die Linie 66-Maus mit schweren tauopathologischen Veränderungen belastet. Die Tau-Knäuel bei Linie 66-Mäusen sind filamentös und im Hippocampus, dem entorhinalen Kortex sowie in anderen kortikalen Regionen zu finden.

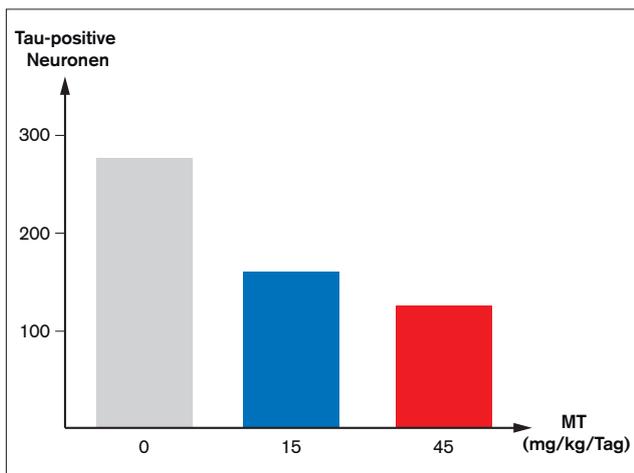


Fig. 3: Dosis-abhängige Reduktion der neuronalen Tau-Last bei transgene Mäusen nach der Gabe von MT

Demnach kann MT den pathologischen Veränderungen und den Symptomen in zwei transgenen Tau-Maus-Modellen entgegenwirken: in einem Phänotyp-Modell für kognitive Defizite mit vorwiegend Tau-Oligomeren (Linie 1) und in einem frontotemporal-artigen Modell für den motorischen Phänotyp mit zahlreichem filamentösem Tau (Linie 66). Die Wirkungen von MT bei transgenen Tau-Mäusen waren somit ausschlaggebend für das Vorantreiben der klinischen Forschung mit diesem Ansatz.

Translationsforschung bei der Alzheimer-Krankheit

Das Konzept der Tau-Aggregationshemmung wurde durch die Ergebnisse einer kontrollierten klinischen Studie bei 321 Alzheimer-Patienten bestätigt. MT reduzierte die Rate des klinisch relevanten Abbaus kognitiver Funktionen signifikant um 84% über 50 Wochen, wobei die Messung mittels der ADAS-cog Skala erfolgte, einem validierten und akzeptierten Instrument zur Erfassung kognitiver Veränderungen bei der Alzheimer-Krankheit. Der co-primäre

globale klinische Endpunkt und auch die Ergebnisse aus einer SPECT-Substudie fielen signifikant positiv aus. Diese Resultate lassen vermuten, dass MT das Potential besitzt, das Fortschreiten der Alzheimer-Krankheit hinauszuzögern. Die Gabe von MT könnte daher besonders in den Frühstadien der Erkrankung nutzbringend sein. Eine optimierte Form von MT soll schon bald in Phase 3-Studien geprüft werden. Eine Bestätigung dieser ersten aus Klinik und Bildgebung gezogenen Erkenntnisse wird sehnlichst erwartet, um zu sehen, ob die Rationale für die auf das Tau-Protein abzielende Therapie neue Hoffnung zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit geben kann.

Ideal wäre es, wenn wir ein Verständnis der komplizierten Abläufe in einem Organismus auch ohne belastende Tierversuche gewinnen könnten. Leider ist dies jedoch bis heute nicht möglich, obwohl Wissenschaftler lange Zeit zahlreiche Versuche mit Zellen und Geweben durchgeführt haben und im Zeitalter der Systembiologie unser Wissen auch mittels Computersimulation erweitern können.

Das Dilemma wird uns aber noch lange Zeit begleiten: Grundlagenforschung ohne Tierversuche würde den Verzicht auf medizinischen Fortschritt bedeuten. Mausclick will über die Hintergründe aufklären und berichtet daher über Erfolgsgeschichten in der Medizin, die nur Dank Tierversuchen möglich waren.

Mausclick wird in Zusammenarbeit mit der Basel-Deklaration herausgegeben. www.basel-declaration.org

IMPRESSUM

Herausgeberin in Cooperation:



www.basel-declaration.org

Forschung für Leben

Münchhaldenstrasse 10

Postfach

8034 Zürich

info@forschung-leben.ch

www.forschung-leben.ch

www.recherche-vie.ch

Autor:

Hans J. Moebius, MD, PhD, ECPM

Redaktion:

Astrid Kugler «Forschung für Leben»

Barbara Moebius «Forschung für Leben»