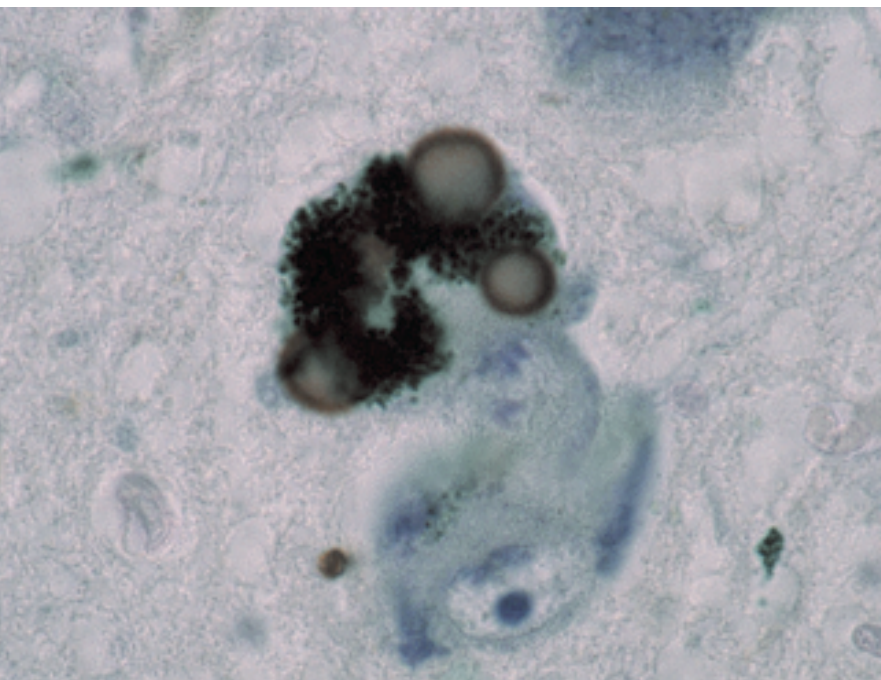


# Rost, Müll oder Staus?

## Parkinson aus der Sicht der molekularen Neurogenetik

von Georg Auburger



**1** Mikroskopische Aufnahme einer Nervenzelle des Mittelhirns mit deutlich sichtbarem Zellkern und Nucleolus (blau gefärbt), mit dem diese Nervenzellen charakterisierenden Pigment Neuromelanin (grün gefärbt) und mit mehreren kreisrunden Lewy-Körpern mit dichtem Außenrand und blassem Zentrum (braun gefärbt durch alpha-Synuklein Immunhistochemie).

Blutproben und Gewebe von Familien mit erblich bedingten degenerativen Erkrankungen wie Parkinson sind ein zentrales Forschungsobjekt der neu eingerichteten Forschungsprofessur »Molekulare Neurogenetik« innerhalb der Neurologischen Klinik der Universität Frankfurt. Sind die verantwortlichen Mutationen identifiziert, werden sie im Hirngewebe von Mäusen künstlich erzeugt. Aus der Untersuchung der krankhaften Veränderungen lassen sich Diagnostik und Therapie weiter entwickeln. Als bisherigen Höhepunkt unserer Forschungstätigkeit haben wir in einigen Parkinson-Familien als Krankheitsursache den Funktionsverlust eines Eiweißes namens PINK1 in den Mitochondrien nachgewiesen. Aufgrund dieser Beobachtung lässt sich oxidativer Stress als auslösender Schritt im Krankheitsgeschehen interpretieren. Experimentelle Therapien mit anti-oxidativen Medikamenten sind in Zellkultur getestet worden und sollen künftig auch im Mausmodell zum Einsatz kommen.

Unser wissenschaftliches Verständnis degenerativer Erkrankungen ist nach wie vor bruchstückhaft: Manche Forscher sehen die Ursache im gestörten Transport innerhalb der Zellen (»Staus«), manche in der Ablagerung verklumpeter Eiweiße, den aggregierten Einschlusskörpern (»Müll«), manche in den Nebenwirkungen der Sauerstoffnutzung, dem oxidativen Stress (»Rost«). Wenn in manchen Patienten solche Altersbeschwerden schon nach 30 Lebensjahren auftreten und auch bei anderen Familienangehörigen beobachtbar sind, dann können erbliche Faktoren im Spiel sein. Für Wissenschaftler stellen solche Familien eine einmalige Gelegenheit dar, die verantwortlichen Krankheitsgene zu identifizieren und durch Analysen ihrer biologischen Funktion eines Tages die Mechanismen des Alterns zu verstehen. Unsere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass oxidativer Stress bei Parkinson eine wichtige Rolle spielt. Es stellt sich die Frage, ob Aggregate und Transportstörung nicht eher Folgen und Begleiterscheinungen der Krankheit sind als ihre Ursache.

### Traditionsreiche Frankfurter Forschung

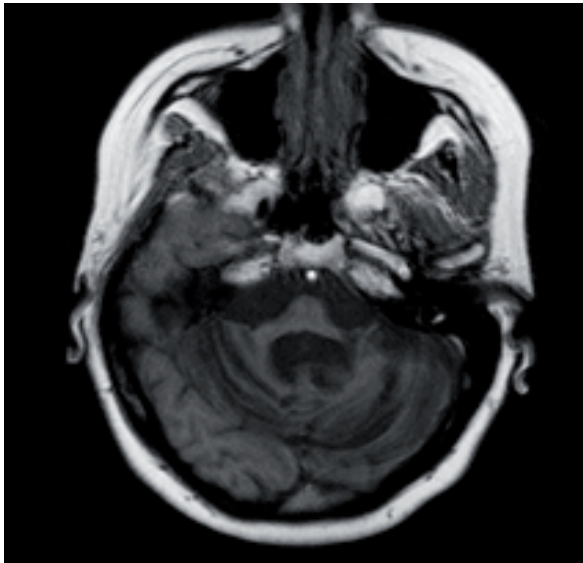
An der Universität Frankfurt hat die Erforschung degenerativer Erkrankungen eine lange Tradition. Schon als das eben erfundene Mikroskop seinen Siegeszug durch

die damalige Wissenschaftswelt hielt, haben klinische Wissenschaftler in Frankfurt die Leiden ihrer Patienten sorgfältig aufgezeichnet und später im Körper dieser Patienten nach den Krankheitsursachen gesucht. Alois Alzheimer (1864–1915) hat als Erster mit Farbstoffen, die ansonsten mit Stärke (Amyloid) reagieren, im Gehirn verstorbener Patienten zwischen den Nervenzellen besondere Ablagerungen sichtbar gemacht, die zusammen mit Gedächtnisverlust und Schwachsinn auftreten. Ebenfalls in Frankfurt fand Friedrich-Heinrich Lewy (1885–1950) innerhalb der Nervenzellen im Gehirn von Patienten mit Bewegungsarmut (Parkinson) auffällige Einschlusskörperchen, die mit Farbstoffen ähnlich reagieren wie Eiweiße (eosinophil).

Spätere Forschung zeigte, dass diese »Lewy-Körper« **1** einen wertvollen Hinweis darstellen, welche Arten von Nervenzellen vom fortschreitenden Parkinson-Krankheitsprozess in den Untergang getrieben werden, und dass insbesondere im Mittelhirn sitzende Nervenzellen (dopaminerge Neuronen der Substantia nigra) untergehen und das Fehlen ihres Signalstoffs Dopamin die Bewegungsarmut auslöst. Noch in unserer Generation hat der Frankfurter Neuropathologe Prof. Dr. Heiko Braak mit mikroskopischen Untersuchungen gezeigt, dass bei Parkinson vor dem Auftreten der Mittelhirn-Degeneration und vor der Bewegungsstörung schon

Nervenzellen im Hirnstamm (Nucleus vagus dorsalis), in den Riechkolben und im Darm betroffen sind. Also sollte eine Frühdiagnostik der Parkinson-Patienten vor Auftreten der typischen Krankheitssymptome möglich sein.

Vor wenigen Jahren wurde durch die Neurologische Klinik der Frankfurter Universität und das Max-Planck-Institut für Hirnforschung ein besonders aufwändig ausgestattetes Zentrum für bildgebende Verfahren (Brain



2 Magnet-Resonanz-Tomografie eines Patienten mit der SCA2-Variante des Parkinson zeigt eine deutliche Erweiterung der Zisterne rund um die Arteria basilaris (weißer Fleck in der Mitte), darunter einen stark verschmälerten Hirnstamm und einen massiv erweiterten 4. Ventrikel.

dem Zieleiweiß ist sehr kurzlebig. Aufgrund von Aufnahmen mithilfe der Immunogold-Elektronenmikroskopie ist aber gesichert, dass PINK1 an den Cristae der Mitochondrien lokalisiert ist, also genau dort, wo die Atmungskette arbeitet.

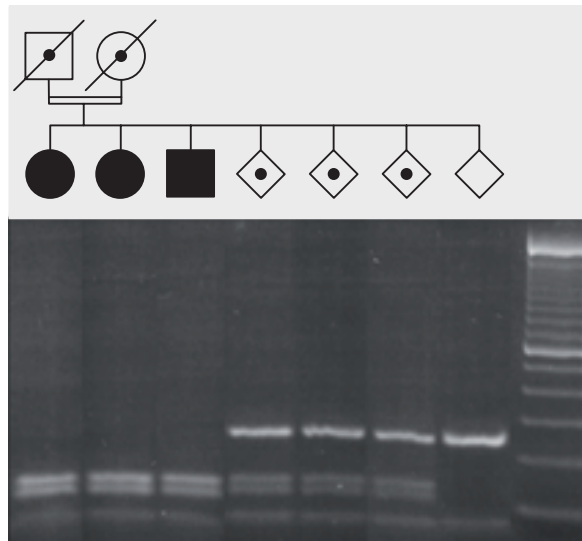
PINK1 bekam seinen Namen (»Pten-induced kinase 1«), weil sein Auftreten eng an die Phosphatase Pten gekoppelt ist. Pten übermittelt extrazelluläre Wachstumssignale oder Stressfaktoren über den Akt-Kinase-Weg zum intrazellulären Mitochondrium und ist an der Apoptose-Regulation beteiligt. Auch andere Genmutationen, die zu erblichem Parkinson führen, scheinen in diesen Signalweg einzugreifen 3. Mutationen von alpha-Synuklein sind für die autosomal-dominante PARK1-Variante verantwortlich, und alpha-Synuklein scheint eine modulierende Wirkung auf die Akt-Kinase zu haben. Mutationen von DJ-1 führen zu PARK7, und DJ-1

Imaging Center, siehe auch Johannes Pantel und Peter Uhlhaas »Sehen, was Alzheimer nicht sah«, Seite 29) in Betrieb genommen, an dem mit extrem hoher Auflösung die degenerativen Veränderungen in der hinteren Schädelgrube untersucht werden können. Bei einzelnen Patienten können nach Manifestation der typischen Parkinson-Symptome deutlich sichtbare Erweiterungen der Hohlräume des Gehirns dokumentiert werden 2.

### Mutation schaltet das Enzym PINK1 aus

Um den Effekt der genetischen Abweichungen studieren zu können, die Parkinson verursachen, untersuchen wir ausschließlich Familien, in denen die Krankheit erblich bedingt ist. Da Familien in Deutschland für ausgedehnte molekulargenetische Forschung meistens zu klein sind, haben wir eine Familie in Granada, Spanien, untersucht. Dort wurde der Autor auf sieben Geschwister aufmerksam, von denen drei im Alter von 30 bis 40 Jahren an Parkinson erkrankt waren und deren verstorbene Eltern miteinander verwandt gewesen waren 3. Die Ursache wurde durch eine Zusammenarbeit zwischen der »Molekularen Neurogenetik« Frankfurt und Instituten in Rom und London als G309D-Mutation mit folgendem Funktionsverlust des Eiweißes PINK1 identifiziert. PINK1 ist in praktisch allen Körperteilen und -zellen aktiv und erfüllt seine Funktion in den Mitochondrien, aber niemand kennt die Details seiner Aufgaben.

Vergleicht man die Aminosäure-Bausteine von PINK1 mit anderen Eiweißen und stellt sich das Enzym dreidimensional vor 4, dann scheint PINK1 eine Serin-Threonin-Kinase zu sein. Solche Kinasen nehmen che-



3 Oben: Stammbaum einer spanischen Familie, in der drei von sieben Geschwistern bereits im Alter zwischen 30 und 40 Jahren an Parkinson erkrankt sind (schwarze Symbole). Diese Patienten haben zwei Kopien der Mutation G309D-PINK1, die wir als Ursache für die erblich bedingte Parkinson-Erkrankung identifiziert haben. Schwarze Punkte stellen bisher klinisch gesunde Träger mit nur einer Kopie der Mutation dar. Unten: Experimentell lässt sich das genetische Risiko mit der Agarose-Gel-Elektrophorese-Analyse der Erbmasse jedes Familienmitglieds darstellen. Bei den früh erkrankten Geschwistern fehlt die gesunde Genkopie (obere Bande in vier Gel-Spuren rechts). Die drei Geschwister mit nur einer mutierten Kopie des Gens (Doppelbande) haben ein erhöhtes Risiko, an Parkinson zu erkranken.

## Die Maus als Modell

Eine biochemische Analyse der krankhaften Prozesse setzt voraus, dass man Zugang zu betroffenem Hirngewebe hat. Da dies beim erkrankten Menschen aber ethisch nicht vertretbar ist, haben wir sowohl die G309D-Mutation in das PINK1-Gen einer Maus eingeführt («knock-in«-Strategie) als auch eine Störung der PINK1-Synthese in einer anderen Maus verursacht («knock-out«-Strategie). Diese Mausmutante zeigt im Alter von 18 Monaten die typische Bewegungsarmut der Parkinson-Patienten, dazu einen ebenfalls typischen Buckel **B** und eine Störung der dopaminergen Nervenzellen im Mittelhirn sowie der Vagus-Nervenzellen im Hirnstamm. Ob diese Mäuse im höheren Alter auch Lewy-Körper entwickeln, bleibt abzuwarten.

Um ein hypothesenfreies molekulares Verständnis dieser krankhaften Vorgänge zu bekommen, untersuchen wir vergleichend für jedes Gen aus der Erbmasse des untersuchten Organismus (Mensch oder Maus) die Expression. Das ist die Zahl der vom Gen kopierten mRNA- oder Eiweiß-Moleküle, die die Aktivität eines Gens darstellen. Die Messung der Genaktivität dient dabei als Biomarker, der den Krankheitsprozess quantifizierbar macht. Für diese sehr aufwändige Messung nutzen wir die in den letzten Jahren entwickelte Technik der Oligonukleotid-microarray-chips. **A**uf diese Biochips wird die DNA aus der Sequenz jedes Gens an einer bestimmten Koordinate auf einem Glas-Objekträger aufgebracht, und jede Koordinate sendet ein mit der Aktivität des Gens korreliertes Fluoreszenzsignal aus, wenn man Gewebe-Extrakte von Patient oder Mausmutante aufbringt. Beim Menschen untersuchen wir zu diagnostischen Zwecken Hautzellen, Muskelgewebe, Speichelprobe und Blut. Bei der Mausmutante analysierten wir zusätzlich Gehirnzellen, denn nur so können wir überprüfen, ob die vermuteten molekularen Zusammenhänge wirklich für die Degeneration der Gehirnzellen bei Parkinson verantwortlich sind. Weil im Gehirn unterschiedlichste Zellen ständig wechselnde Funktionen erfüllen und wir herausfinden wollten, welchen Einfluss die Genmutationen auf die einzelnen Zelltypen und Hirnregionen haben, mussten wir mehr als 50 solcher Analysen in verschiedenen Hirnregionen und zu verschiedenen Altersstufen durchführen. Zudem haben wir mehrere unabhängige Linien von Mausmutanten verglichen, um Klarheit über die krankheitsbedingten Veränderungen zu gewinnen. 30 Gene waren bei diesen Untersuchungen auffällig, letztlich korrelieren aber nur sechs mit der klinischen Erkrankung. Die Veränderungen waren in allen untersuchten Körpergeweben konsistent. Da alle diese Gene für Funktionen an den Kontakt- und Verschaltungsstellen der Nervenzellen (Synapsen) stehen, können wir vermuten, dass die synaptische Signalübertragung frühzeitig im neurodegenerativen Prozess gestört ist.

## Auf der Suche nach Biomarkern

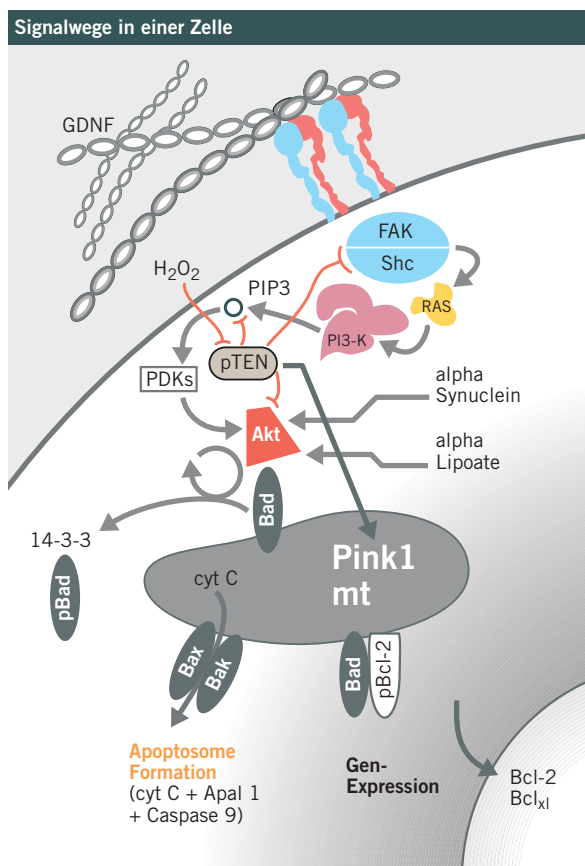
PINK1 ist nicht nur in Mitochondrien des Gehirns aktiv, sondern in vielen Geweben wie zum Beispiel den Fibroblasten-(Bindegewebs-)Zellen der Haut. Solche Haut-Fibroblasten könnten sich ideal für diagnostische Zwecke eignen: Sie sind leicht dem Patienten entnehmbar und in Kultur züchtbar, und ähnlich wie Nervenzellen ha-



**4** Dreidimensionales Modell der PINK1-Kinase-Domäne, in dem die mutierte Aminosäureposition 309 innerhalb einer Schleife ganz links herausgedreht ist und der Einfluss der Schleifengeometrie auf die ATP-Bindungsstelle in der Mitte evident wird.

interagiert mit Pten. Mutationen von Parkin führen zu PARK2, und sowohl Parkin als auch DJ-1 können in Mitochondrien importiert werden, wo sie sich wie PINK 1 an den Cristae konzentrieren. Zudem ist ein Toxin namens MPTP bekannt (das bei der unvollständigen Synthese von Heroin entsteht), dessen Injektion bei Menschen Parkinson auslöst, nachdem es in dopaminergen Nervenzellen aufgenommen und in Mitochondrien an den Cristae den Komplex I der Atmungskette stört.

**5** Schematische Darstellung einer Zelle (extrazellulärer Raum mit trophischem Signal-Rezeptor beziehungsweise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress links oben), dem cytosolischen PI3K/ Akt-Kinase-Weg, der mitochondrialen Organelle mit PINK1, dem Cytochrom-C/Bax-Weg zum programmierten Zelltod (Apoptose) und den Änderungen der Gen-Expression im Zellkern (rechts unten).





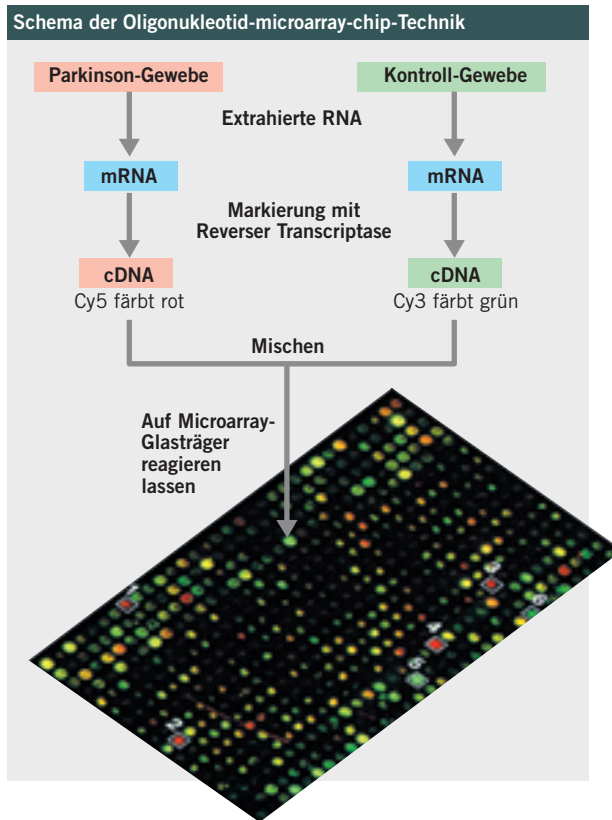
**6** Foto einer PINK1-knock-out Maus im Alter von 18 Monaten. Diese Mäuse sind charakterisiert durch eine mitochondriale Dysfunktion, die sich in verzögerter Gewichtszunahme und verminderter Spontanmotorik (bei erhaltener Kraft und Koordination, wie bei Parkinson-Patienten) äußert, und im fortgeschrittenen Alter zur Ausbildung eines Buckels wie bei Patienten und zu Störungen der dopaminergen Nervenzellen führt.

ben sie dynamische Fortsätze, die den Kontakt mit anderen Zellen plastisch optimieren können (sogenannte Podozyten mit einem plastischen Aktin-Zytoskelett). Die von PINK1-Mutationen im Gehirn ausgelösten Störungen der Zellkontakte ließen sich mit der quantitativen RT-PCR Methode **6** auch in Fibroblasten nachweisen. Wir hoffen, mit diesem Ansatz Biomarker zu iden-

**7** Die Messung der Genaktivität mit Oligonukleotid-microarray-chips dient als Biomarker, der den Krankheitsprozess quantifizierbar macht. A) Nach Aufbringen eines RNA-Extrakts von mutantern (rote Fluoreszenz) und normalem Gewebe (grüne Fluoreszenz), konkurrieren die Oligonukleotide um Bindungsstellen an jeder Koordinate des Chips. B) Während die Mischfarbe Gelb ein ausgewogenes Verhältnis darstellt, repräsentiert das Überwiegen von grüner Fluoreszenz (zum Beispiel Koordinaten 5,6) eine verminderte Kopienzahl von mRNAs im mutanten Gewebe. Einzelne Gene/Koordinaten mit roter Farbe (Koordinaten 1, 2, 3, 4) stellen offenbar stark erhöhte Aktivität dieser Gene im mutierten Gewebe dar.

tifizieren. Diese sollten erstens das Auftreten der Krankheit vorhersagen und sich zweitens dynamisch mit der Krankheitsstadien objektiv darstellen und neuroprotektive Therapieversuche evaluieren können. Drittens könnten diese Marker dazu beitragen, verschiedene Varianten von Parkinson diagnostisch sicher von anderen Neurodegenerationskrankheiten wie Alzheimer zu unterscheiden und somit die Beratung der Patienten zu ihrer Prognose zu verbessern.

Welche Auswirkungen hat nun die Ausschaltung von PINK1 aufgrund der Genmutation? Bei der Untersuchung von Fibroblasten beobachteten wir eine Dysfunktion der Mitochondrien-Cristae, die zu einer verminderten Aktivität des Komplexes I der Atmungskette führte. Zudem wurden vermehrt Sauerstoff-Radikale freigesetzt, was zu einer Peroxidation zellulärer Lipide (»Verrostung«) führte. Die verminderte Zellatmung mit erniedrigtem ATP-Energie-Spiegel einerseits und die erhöhte Oxidation (»Rostung«) von Zellbestandteilen andererseits sind offenbar die Ursache für die Störung der



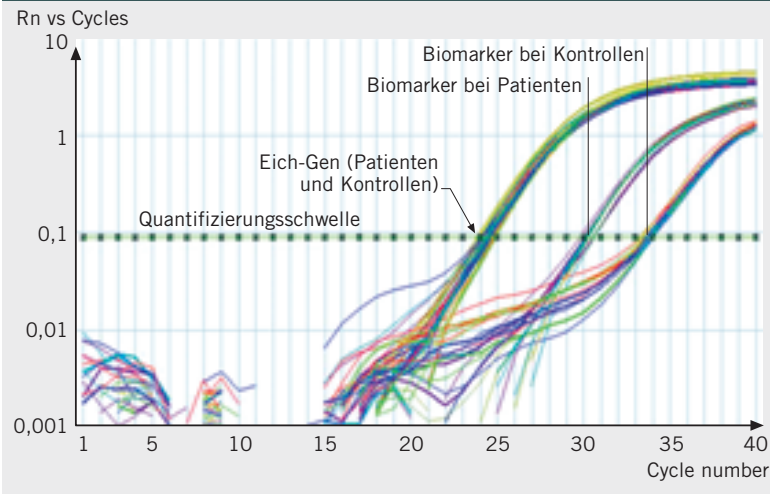
## Der Autor



**Prof. Dr. Georg Auburger**, 46, wählte die biologische Programmierung von Alterung und Tod bereits zum Thema, als er in der Auswahl für die Studienstiftung einen Vortrag halten sollte. Er studierte Medizin an der Technischen Universität München und promovierte am Max-Planck-Institut Martinsried zum Thema Nervenwachstumsfaktor. Als DAAD-Stipendiat lernte er in London molekulargenetische Techniken zur Identifikation von Krankheitsgenen. Nach seiner Facharztausbildung zum Neurologen und der Habilitation in Düsseldorf ging er als DFG-Heisenberg-Stipendiat an das Nationale Gesundheitsinstitut in Bethesda,

USA. Dort arbeitete er zu Transkriptom-Analysen und Mausmutanten. Im Jahr 2000 nahm Auburger den Ruf auf die Forschungsprofessur »Molekulare Neurogenetik« innerhalb der Neurologischen Klinik der Universität Frankfurt an. Der Autor war beteiligt an der Identifikation der neurologischen Krankheitsgene SCA2, OPA1, PNKD, PARK5, PARK6, an der Charakterisierung von Parkinson-Mausmodellen (MPTP, PARK1, PARK6, SCA2). Forschungsschwerpunkte seiner Arbeitsgruppe sind die Mechanismen der Parkinson'schen Alterskrankheit. Diese Arbeit wird derzeit vom Bundesministerium für Forschung (Nationales Genomforschungsnetzwerk) und vom 6. EU-Rahmenprogramm in Netzwerken sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft in Einzelvorhaben gefördert.

Expressionsanalyse eines Kandidaten-Gens



8 Mithilfe eines kürzlich identifizierten Biomarkers können wir die Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein Mensch an Parkinson erkranken wird, angeben. Die Grafik zeigt die Vervielfältigung verschiedener Genbruchstücke mithilfe der quantitativen RT-PCR. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge des Ausgangsmaterials. Die linke Kurve zeigt das Gen GAPDH, das wir als internen Standard verwenden (Zyklus 30, mittlere Kurve) vermehrt sich der verwendete Biomarker, der in Haut-Fibroblasten der Patienten durch die Krankheit induziert wird. Ist der Patient hingegen gesund, wird der Biomarker in geringeren Mengen exprimiert. Eine signifikante Vermehrung tritt erst bei Zyklus 34–35 auf (rechte Kurve).

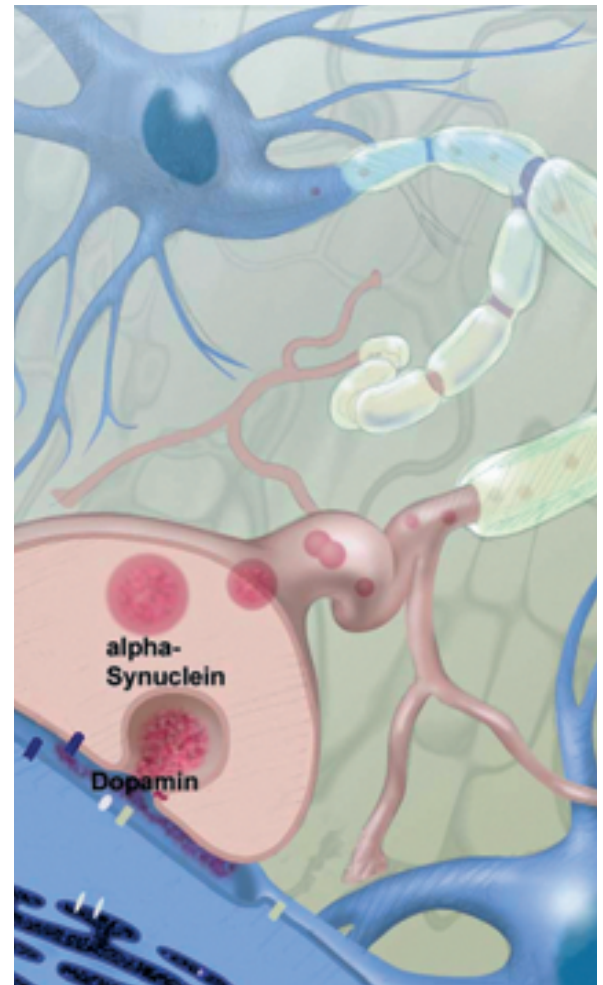
Zellkontakte, die Störung der Synapsen und die Störung der Dopamin-Signalübertragung zwischen Nervenzellen. 9 In Zellkultur-Experimenten konnten wir Sauerstoffradikale zu gesunden Fibroblasten zumischen und die gleiche Induktion des Biomarkers/Steigerung der Genaktivität beobachten.

Das nährt unsere Hoffnung, mit bereits existierenden Medikamenten die Sauerstoffradikale abzufangen, die Zellen vor Oxidation zu schützen und so ein Fortschreiten der Krankheit zu verhindern. Zumindest für eine andere mitochondrial ausgelöste neurodegenerative Krankheit, die in Würzburg erstmals beschriebene Friedreich-Ataxie, konnte mit dem antioxidativ wirksamen Coenzym-Q10-Analog »Idebenone« eine signifikante Besserung sowohl der kardialen als auch der zentralnervösen Symptome bereits erreicht werden (wie vorab bekannte gegebene Daten des Nationalen Gesundheits-Instituts der USA belegen). Somit ist die Rolle von

9 Darstellung eines synaptischen Zellkontakts zwischen Nervenzellen, wo Dopamin als Signalstoff aus Speicher-Bläschen ausgeschüttet wird, und wo das bei PARK1 mutierte alpha-Synuclein eine bisher unbekannte Funktion ausübt.

Oxidation bei der Auslösung von PARK6 nunmehr gut belegt. Gelten diese Ergebnisse auch für andere Parkinson-Formen? Und wie kommt es zu Aggregaten wie Lewy-Körpern und zur gut dokumentierten Störung des zellulären Transports? Handelt es sich um Folgeerscheinungen der Oxidation, die bei erfolgreicher antioxidativer Therapie verschwinden oder um unabhängige Probleme?

Die neurologische und bildgebende Analyse einzelner Familien mit erblichem Parkinson, die anatomische, biochemische und molekulargenetische Analyse ihrer Körpergewebe und der dazu passenden Mausmutanten sind jedenfalls ein potentes Instrumentarium, den Mechanismus von Krankheiten zu verstehen, Diagnostik zu etablieren und präventive Therapien zu entwickeln. Insbesondere bei der Parkinson-Krankheit war der Fortschritt in den letzten Jahren ungewöhnlich rasch, und für die Vielzahl neurowissenschaftlich orientierter Forschungsgruppen am Uniklinikum Frankfurt stellt Parkinson sicherlich eine lohnende Bewährungsprobe dar. ♦



Referenzen

Gispert S., Del Turco D., Garrett L., Chen A., Bernard D., Hamm-Clement J., Korf H. W., Deller T., Braak H., Auburger G., Nussbaum R. L. (2003), Transgenic mice expressing mutant A53T human alpha	synuclein show neuronal dysfunction in the absence of aggregate formation, Mol. Cell Neurosci, 24: S. 419–429.	Valente E.M., Abou-Sleiman P. M., Caputo V.,	Muqit M. M. K., Harvey K., Gispert S., Ali Z., Del Turco D., Bentivoglio A. R., Healy D. G., Albanese A., Nussbaum R., Gonzalez-Maldonado R., Deller T., Salvi S., Cortelli P., Gilks W. P., Latchman D. S.,	Harvey R. J., Dallapiccola B., Auburger G., Wood N. W. (2004), Hereditary early-onset Parkinson's disease is caused by mutations in PINK1, Science, 304(5674): S. 1158–1160.	Hoepken H.H., Gispert S., Morales B., Wingerter O., Del Turco D., Mülsch A., Nussbaum R. L., Muller K., Drose S., Brandt U., Deller T., Wirth B., Kudin A. P., Kunz W. S., Auburger G. (2007), Mitochon-	drial dysfunction, peroxidation damage and changes in glutathione metabolism in PARK6, Neurobiol. Dis., 25: S. 401–411.
---	--	--	--	--	--	---