Molekulare Mechanismen der Neurodegeneration und Gentherapie für die Parkinson-Krankheit

Hansruedi Büeler
Institut für Molekularbiologie, Universität Zürich-Irchel

Einleitung

Die Parkinson-Krankheit (PK) betrifft 1 bis 2% der über 65jährigen Bevölkerung. Sie wird durch ein fortschreitendes Absterben der dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra (Mittelhirn) und dem damit einhergehenden Verlust des Neurotransmitters Dopamin im Striatum verursacht. Der Dopaminmangel führt schliesslich über einen komplexen Regelkreis zu den für die PK typischen Symptome wie Verlangsamung der Bewegungen, Zittern im Ruhezustand, Muskelsteife und instabile Körperhaltung. Die PK wird vor allem durch Verabreichung von L-Dopa behandelt, einem chemischen Dopaminvorläufer, der im Hirn zu Dopamin umgewandelt wird. Obwohl L-Dopa anfänglich gut wirkt, kann es den eigentlichen Neuronentod nicht stoppen und führt im fortgeschrittenen Stadium der PK oft zu unerwünschten Nebenwirkungen (On/off-Syndrom). Auch andere Medikamente (z.B. Dopaminrezeptor-Agonisten) und chirurgische Methoden wie die elektrische Stimulation und Läsion spezifischer Hirnregionen («deep brain stimulation») stellen ausschliesslich symptomatische Behandlungen dar.

Genetik der Parkinson-Krankheit

Erstaunlicherweise manifestiert sich die PK klinisch erst, wenn bereits 70 bis 80% der dopaminergen Neuronen abgestorben sind. Das bedeutet, dass die PK vielleicht verhindert werden könnte, wenn wir den Neuronentod bereits in seinen Anfängen hemmen könnten. Aber genau hier liegt das Problem: Weil bisher nur wenig über die dem Zelltod zugrunde liegenden Mechanismen bekannt ist, können wir auch nicht gezielt eingreifen, um diese zu blockieren. Deshalb ist es sehr wichtig, dass wir mehr über die molekularen Ursachen der PK lernen. Aber wie? Während die PK lange vor allem als sporadisch auftretende Krankheit wahrgenommen wurde, hat sich in den letzten fünf Jahren klar gezeigt, dass sie auch genetische Ursachen haben kann (die genetisch bedingten Formen sind allerdings viel seltener). Bis heute sind mindestens 10 Regionen (Loci) auf verschiedenen Chromosomen bekannt, die mit dem Auftreten vererbter PK korrelieren [1]. Für vier dieser Regionen wurden die Gene (Erbanlagen, die Proteine kodieren) charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass Mutationen (Veränderungen) in der Struktur dieser Gene die PK direkt verursachen, wobei die Symptome (je nach Gen) bereits zwischen 25 und 50 Jahren auftreten (early-onset familial Parkinson's disease). Es sind dies die Gene für *α-synuclein* (dominant) [2], *parkin* (rezessiv) [3], *DJ-1* (rezessiv) [4] und *UCH-L1* (dominant) [5]. Parkin und UCH-L1 sind Proteine, die für den geordneten Abbau anderer Proteine in (Nerven-)Zellen notwendig sind. Parkin gehört zu der Familie der Ubiquitinligasen (E3) [6]. Ubiquitinligasen beschleunigen den Abbau bestimmter Proteine, indem sie an diese (Substrate) binden und sie kovalent mit Ubiquitin (ein 76 Aminosäuren langes zelluläres Polypeptid) modifizieren. Ubiquitin-modifizierte Proteine werden selektiv vom Proteasom erkannt und in kleine Bruchstücke gespalten. Das Proteasom ist quasi ein zellulärer «Protein-Shredder», der bestimmte Proteine nach Erfüllung ihrer Funktion zerstückelt, weil sie die Zelle sonst schädigen würden. UCH-L1 spaltet Poly-Ubiquitin-Ketten zu einzelnen Ubiquitin-Molekülen, die der Zelle dann wieder für die Markierung von abzubauenden Proteinen zur Verfügung stehen. Dieser so genannte «Ubiquitin-Proteasome-Pathway» (UPP) ist woanders noch genauer beschrieben und abgebildet [7]. Die Tatsache, dass Mutationen in wichtigen Genen des UPP familiäre PK verursachen, lässt vermuten, dass Defekte im UPP und erhöhte Mengen oder Ablagerungen bestimmter Proteine schliesslich zum Absterben der dopaminergen Neuronen führen [7]. Diese These wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass Mutationen im *α-synuclein*-Gen bei einer dominant vererbten Form der PK zur Bildung von Lewy-Körpern (Aggregaten von α-synuclein und anderen Proteinen) im Zytoplasma von dopaminergen Neuronen führen. Interessanterweise findet man Lewy-Körper und eine verringerte Proteasomen-Aktivität auch bei der sporadischen PK [8]. Man glaubt deshalb, dass bei der sporadischen und den genetischen Formen der PK dieselben oder zumindest ähnliche zelluläre Mechanismen gestört sind. Die Funktion von DJ-1 ist noch unbekannt, aber es wird aufgrund seiner Struktur spekuliert, dass DJ-1 die Zellen gegen oxidativen Stress (Sauerstoffradikale) schützt [4]. Da Sauerstoffradikale in dopaminergen Neuronen über

den normalen Dopaminabbau entstehen, wären diese Neuronen besonders anfällig auf einen Ausfall der normalen DJ-1-Funktion.

Genetische Tiermodelle der Parkinson-Krankheit

Die Identifizierung von *α-synuclein* und *parkin* hat es ermöglicht, Tiermodelle für genetische Formen der PK zu entwickeln. Überexpression von *α-synuclein* in Mäusen [9], Taufliegen [10], Ratten [11] und Primaten [12] führt zu degenerativen Veränderungen des dopaminergen Systems und damit verbundenen motorischen Störungen. Hingegen verursachte die Deletion des *parkin*-Gens in Mäusen [13] und Fliegen [14] keinen Verlust der dopaminergen Neuronen. Es ist möglich, dass grundlegende physiologische Unterschiede zwischen Mäusen und Menschen die verschiedenen Konsequenzen einer *parkin*-Inaktivierung erklären. Andererseits leben Mäuse vielleicht einfach nicht lange genug, um den Phänotyp zu entwickeln (immerhin dauert es bei Menschen mit *parkin*-Mutationen im Durchschnitt etwa 30 Jahre, bevor die dopaminergen Neuronen absterben und sich die PK manifestiert).

Forschung

Virales Gentransfersystem

In den vergangenen Jahren entwickelten wir ein virales Gentransfersystem, mit dessen Hilfe beliebige Gene (≤5 kb) im dopaminergen System von Mäusen und Ratten langfristig exprimiert werden können [15–17]. Vereinfacht gesagt verwenden wir einen nicht pathogenen Virus (Adeno-assoziierter Virus, AAV), dessen eigene Gene wir entfernen und durch ein für uns interessantes Gen ersetzen können. Diese genetisch modifizierten AAV (rAAV) können in kultivierten Zellen produziert, anschliessend aufgereinigt und quasi als «Genfähren» (in einem chirurgischen Eingriff) direkt in bestimmte Hirnregionen verabreicht werden. Dort infizieren die rAAV die Neuronen, die das vom Virus eingeführte Gen schliesslich exprimieren (Abb. 1 📷). Die rAAV können sich jedoch nicht vermehren, weshalb keine replikative Infektion, sondern lediglich ein Gentransfer stattfindet. Wir haben uns dieses virale Gentransfersystem zu Nutze gemacht, um die Funktion von Parkinson-Genen und deren Substrate in Tieren zu erforschen, und um neuartige Gentherapien für die PK in bestehenden Tiermodellen zu entwickeln. Zwei dieser Projekte sind im folgenden beschrieben.

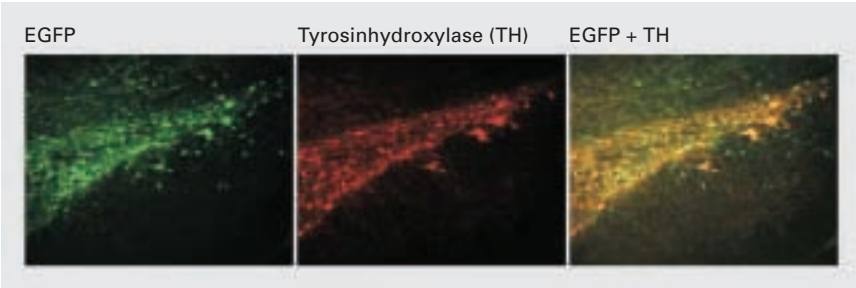

Abbildung 1.
Expression von EGFP (grün) in dopaminergen (TH-positiven) Neuronen (rot) der Substantia nigra nach viralem (rAAV) Gentransfer. In der Computerüberlagerung (EGFP + TH) erscheinen EGFP-exprimierende dopaminerge Neuronen gelb.

Molekulare Mechanismen der rezessiv vererbten Parkinson-Krankheit (AR-JP)

Mutationen im *parkin*-Gen verursachen eine autosomal-rezessive Form der PK (AR-JP). Weil Parkin normalerweise den Abbau verschiedener neuronaler Proteine (Parkin-Substrate) stimuliert, wird vermutet, dass diese Substrate bei der AR-JP aufgrund des fehlenden Abbaus akkumulieren und dadurch die Neuronen schädigen und schliesslich zu deren Verlust führen [18]. Eines der Parkin-Substrate ist CDCrel-1, ein präsynaptisches Protein, für welches eine hemmende Wirkung bei der zellulären vesikelabhängigen Sekretion beschrieben wurde [19]. Um zu testen, ob CDCrel-1 für dopaminerge Neuronen toxisch wirkt, schleusten wir das *CDCrel-1*-Gen mittels eines rAAV in dopaminerge Neuronen von Ratten ein. Tatsächlich führte die rAAV-vermittelte Expression von CDCrel-1 zu einem schnellen Absterben der dopaminergen Neuronen in der virusbehandelten Seite der Substantia nigra (Abb. 2D und E 📷), und einem entsprechend starken Abfall der Dopaminkonzentration im Striatum (Abb. 2F). Hingegen zeigte die Überexpression eines Kontrollproteins (EGFP: enhanced green fluorescent protein) keinen Einfluss auf das Überleben dopaminerger Neuronen (Abb. 2B und E) und die Dopaminmenge im Striatum (Abb. 2F). Als nächstes untersuchten wir, ob CDCrel-1 selektiv toxisch ist für dopaminerge Neuronen, indem wir den rAAV-CDCrel-1-Virus in eine andere Hirnregion einspritzten, die bei der PK nicht betroffen ist. Obwohl CDCrel-1 auch in dieser Hirnregion exprimiert wurde, überlebten die Neuronen dort unbeschädigt. Schliesslich untersuchten wir, ob die Toxizität von CDCrel-1 von Dopamin abhängt, weil wir aufgrund von Zellkulturversuchen wussten, dass CDCrel-1 die vesikuläre Dopaminsekretion hemmt und es zudem bekannt war, dass ein erhöhter *intra*zelullärer Dopaminspiegel über die Produktion von Sauerstoffradikalen neurotoxisch wirken kann. Dazu behandelten wir die Ratten mit AMPT (ein pharmakologischer Hemmer der Tyrosinhydroxylase), wodurch wir die Dopaminproduktion der Ratten auf einen Drittel der normalen Menge reduzieren konnten. Interessanterweise war CDCrel-1 unter diesen Bedingungen für dopaminerge Neuronen nicht toxisch. Die Versuche zeigen also, dass CDCrel-1 eine dopaminabhängige Neurotoxizität aufweist und lassen vermuten, dass eine Hemmung der

Dopaminsekretion (durch CDCrel-1) bei der Entstehung der rezessiven PK (AR-JP) eine Rolle spielen könnte [20].

Gentherapie für die Parkinson-Krankheit

Die korrekte räumliche Faltung von Proteinen im Zytoplasma von Zellen ist ein komplexer Prozess, der massgeblich von so genannten «Chaperones» kontrolliert wird. «Chaperones» ermöglichen die richtige dreidimensionale Proteinfaltung, indem sie an neu synthetisierte Proteine binden und dadurch aberrante Faltungswege aktiv verhindern. Bestimmte «Chaperones» werden induziert, wenn Zellen unter Stress leiden, der zu erhöhter Proteinaggregierung führt, zum Beispiel Hitzeschock oder oxidativer Stress. Interessanterweise kann das «Chaperone» Hsp70 bei verschiedenen Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen den neuronalen Zelltod hemmen [21, 22]. Um herauszufinden, ob Hsp70 auch bei einem Mausmodell der PK eine Schutzwirkung zeigt, exprimierten wir Hsp70 in dopaminergen Neuronen von Mäusen mit Hilfe eines rAAV und behandelten die Mäuse anschliessend mit MPTP. MPTP wird im Organismus zu MPP^+ abgebaut, welches über den Dopamintransporter selektiv in dopaminerge Neuronen aufgenommen wird, und diese durch oxidativen Stress und Hemmung der mitochondrialen Atmungskette abtötet. Tatsächlich fanden wir, dass in der rAAV-Hsp70 behandelten Substantia nigra signifikant mehr Neuronen überlebten als in der nicht behandelten Hirnseite der gleichen Mäuse.

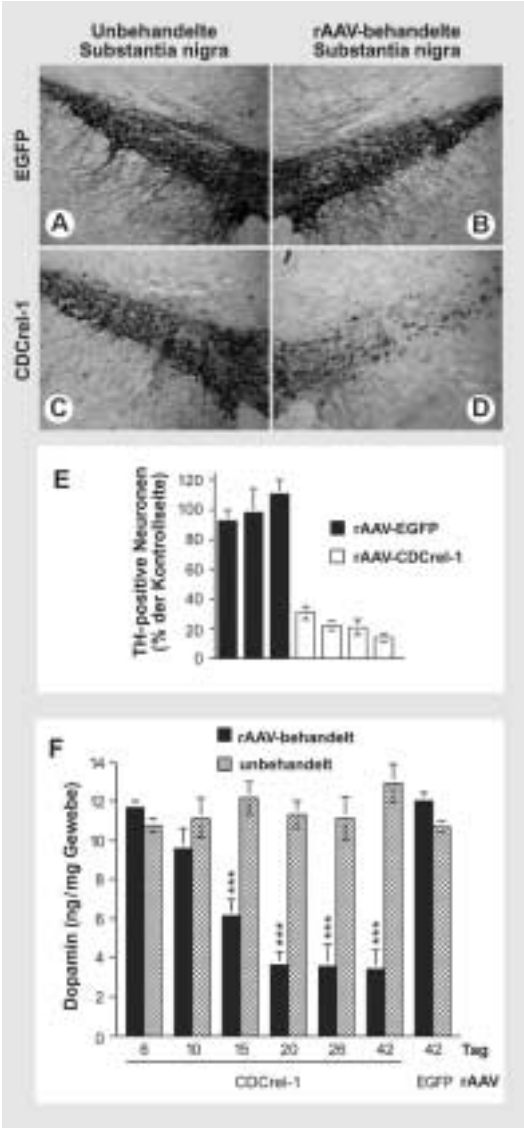

Abbildung 2.
rAAV-vermittelte Expression von CDCrel-1 führt zum Verlust dopaminerger Neuronen in der Substantia nigra und einer fortschreitenden Verringerung des Dopaminspiegels im Striatum. (A) DAB-gefärbte dopaminerge Neuronen in der normalen (A und C) und virusbehandelten (B und D) Substantia nigra nach Gentransfer mit rAAV-EGFP (Kontrollvirus, A-B) oder rAAV-CDCrel-1 (C-D). (E) Quantitative Bestimmung der überlebenden Neuronen relativ zur unbehandelten Substantia nigra (derselben Ratten). (F) Quantitative Dopaminbestimmung im Striatum von rAAV-CDCrel-1 und rAAV-EGFP behandelten Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Virusinjektion. Während CDCrel-1 einen progressiven Abfall des Dopaminspiegels in der behandelten Hirnseite (schwarze Balken) verursacht, beeinträchtigt EGFP die striatale Dopaminmenge nicht.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Identifizierung und Charakterisierung von Parkinson-Genen und deren Substraten lieferte klare Hinweise darauf, dass Fehler beim Abbau bestimmter Proteine im UPP (bei *parkin*-Mutationen), Proteinaggregierung *(α-synuclein)* und Veränderungen in der dopaminabhängigen Neurotransmission bei der Pathogenese der PK eine zentrale Rolle spielen. Neue genetische Tiermodelle der PK konnten geschaffen werden. Diese Modelle werden für die weitere Erforschung der molekularen Ursachen der PK und hoffentlich bei der Suche nach neuen «drug targets» für die Behandlung der PK nützlich sein. Ausserdem lassen sich anhand dieser Modelle neuartige Therapien für die PK testen, die es in Zukunft vielleicht einmal ermöglichen, den dopaminergen Neuronentod schon früh zu hemmen und damit die PK zu verhindern. In diesem Zusammenhang stellen «Chaperones» eine interessante Familie von Proteinen dar, weil sie die korrekte Proteinfaltung fördern und damit der Proteinaggregierung entgegenwirken [23]. Virale Vektoren wie die hier beschriebenen rAAV, die vom Organismus gut toleriert werden [15, 16], könnten sich als «Genfähren» für die Therapie der PK, und vielleicht anderen neurodegenerativen Krankheiten, als nützlich erweisen.

Danksagung

Ich danke meinen Mitarbeitern und Kollegen Dr. med. Zhizhong Dong, Dr. Jean-Charles Paterna, Dr. Boris Ferger, Dr. Joram Feldon, Denise Vogel, Sven Furler und Maribel Osinde für ihre wichtigen Beiträge zu den im Bericht beschriebenen oder zitierten Arbeiten. Die Projekte wurden vom Schweizerischen Nationalfonds und dem NCCR «Neural Plasticity and Repair» unterstützt.

Literatur

1 Dawson TM, Dawson VL. Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. J Clin Invest 2003;111:145–51.
2 Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. Nat Genet 1998;18:106–8.
3 Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature 1998;392:605–8.
4 Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. Science 2003;299: 256–9.
5 Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease [letter]. Nature 1998;395:451–2.
6 Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. Nat Genet 2000;25:302–5.
7 Giasson BI, Lee VM. Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? Cell 2003;114:1–8.
8 McNaught KS, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW. Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. Exp Neurol 2003;179:38–46.
9 Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. Science 2000;287:1265–9.
10 Feany MB, Bender WW. A Drosophila model of Parkinson's disease. Nature 2000;404:394–8.
11 Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, et al. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. J Neurosci 2002;22:2780–91.
12 Kirik D, Annett LE, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A. Nigrostriatal [alpha]-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human [alpha]-synuclein: A new primate model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci. USA 2003;24:24.
13 Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, Cepeda C, Lam HA, et al. (2003). Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. J Biol Chem 20, 20.
14 Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:4078–83.
15 Büeler H. Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. Biol Chem 1999;380:613–22.
16 Paterna JC, Büeler H. Recombinant adeno-associated virus vector design and gene expression in the mammalian brain. Methods 2002;28:208–18.
17 Paterna JC, Moccetti T, Mura A, Feldon J, Büeler H. Influence of promoter and WHV post-transcriptional regulatory element on AAV-mediated transgene expression in the rat brain. Gene Ther 2000;7:1304–11.
18 Giasson BI, Lee VM. Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. Neuron 2001;31:885–8.
19 Beites CL, Xie H, Bowser R, Trimble WS. The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. Nat Neurosci 1999; 2:434–9.
20 Dong Z, Ferger B, Paterna JC, Vogel D, Furler S, Osinde M, Feldon J, Büeler H. Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein CDCrel-1. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:12438–43.
21 Auluck P, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. Science 2002; 295:865–8.
22 Cummings CJ, Sun Y, Opal P, Antalffy B, Mestril R, Orr HT, Dillmann WH, Zoghbi HY. Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. Hum Mol Genet 2001;10:1511–8.
23 Bonini NM. Chaperoning brain degeneration. Proc Natl Acad Sci USA 2002;29:29.
24 Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science 1997;276: 2045–7.

Korrespondenz:
Dr. Hansruedi Büeler
Institut für Molekularbiologie
Universität Zürich-Irchel
Winterthurerstrasse 190
CH-8057 Zürich
hbueler@molbio.unizh.ch