

Erster Zwischenbericht

„Testung der Wirksamkeit eines Mikrotubuli-modifizierenden Wirkstoffs“

Prof. Dr. med. Beate Winner,

Dr. Tania Rizo

Klara Metzner M.Sc.

Stammzellbiologische Abteilung, Universitätsklinikum Erlangen,
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 91054 Erlangen

Die Hereditäre Spastische Paraplegie (kurz HSP) beschreibt eine Gruppe von Motoneuronerkrankungen, die durch verschiedene Veränderungen in der DNA der betroffenen PatientInnen entstehen. Ungefähr 40% der HSP-Fälle in Europa werden durch Mutationen in dem Gen *SPAST* verursacht, aus dem das Protein Spastin produziert wird. Unsere ersten Ergebnisse zeigten, dass Veränderungen von Spastin, wie sie in dieser Form von HSP auftreten, zu einer gestörten Calciumregulation in Neuronen führen. Diese möchten wir mit der Hilfe von Mikrotubuli-modifizierenden Wirkstoffen wiederherstellen. Aus unseren Vorergebnissen wissen wir, dass besonders eine Substanz, „Substanz B“, in der Lage ist, die gestörte Calciumregulation in Neuronen, die von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) stammen, wiederherzustellen.

Ein gemeinsames Merkmal vieler Motoneuronerkrankungen ist der gestörte Transport von Proteinen und Zellorganellen entlang des Axons der Neurone. Gerade in Motoneuronen, die eine Länge von über einem Meter aufweisen können, ist ein geregelter axonaler Transport sehr wichtig für das Aufrechterhalten der Funktionen der Neurone. Aus diesem Grund haben wir uns gefragt, ob der axonale Transport in von iPSZ stammenden Neuronen mit genetischem Hintergrund der HSP Typ 4 gestört ist. Dazu haben wir die Neurone in Mikrofluidikkammern beobachtet und die Mitochondrien angefärbt, um die Bewegung der Mitochondrien mit dem Mikroskop zu analysieren. Tatsächlich sind sowohl die Geschwindigkeit als auch der Anteil der beweglichen an der totalen Zahl der Mitochondrien in den HSP Neuronen im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Diese Reduktion wurde durch Gabe von Substanz B auf das Niveau der Kontrollen normalisiert (**Abb. 1**).

Um Substanz B in der Zukunft in klinischen Studien an HSP-PatientInnen zu testen, werden zunächst unterstützende Ergebnisse aus prä-klinischen Studien an unterschiedlichen Tiermodellen benötigt. Dazu haben wir uns zunächst für den Zebrafisch (*Danio rerio*) als Modell für HSP-Typ 4 entschieden, da sich dieser schnell entwickelt und aufgrund seiner geringen Größe einfach zu halten ist. Das HSP-Modell des Fisches haben wir in Kollaboration mit Dr. Daniel Wehner vom Max-Planck-Institut für die Physik des Lichts, Erlangen, erzeugt. Bei diesem Modell wird die Genexpression von *SPAST* spezifisch unterdrückt, sodass die Fische eine geringere Menge an Spastin produzieren. Wir werden den Fischen die Substanz B im Schwimmwasser verabreichen und prüfen, ob Substanz B zu einer Verbesserung der Schwimmfähigkeit führt. Die Experimente hierzu werden noch durchgeführt.

Zudem möchten wir unsere Untersuchungen an Tiermodellen ausweiten. *Drosophila melanogaster*, oder wie die meisten Menschen sie kennen, die Fruchtfliege wird, seit mehr als

einem Jahrhundert erfolgreich als Modellorganismus in der Wissenschaft eingesetzt, um eine Reihe unterschiedlicher biologischer Prozesse zu untersuchen. Besonders im Feld der Neurobiologie und Neurodegeneration ist sie ein wichtiges und weit verbreitetes Model. In Kollaboration mit Dr. Cinzia Rinaldo vom Institut für Molekularbiologie und Pathologie Rom, haben wir nun ein HSP Typ 4 Modell entwickelt, um die Auswirkung von Substanz B auf Fruchtfliegen zu testen. Hierzu wird Substanz B über das Futter verabreicht. Eine Besonderheit dieser speziellen Fruchtfliegenlinie ist, dass sie keine oder nur sehr kleine Augen ausbildet, wenn die Spastinmenge in den Augen reduziert wird. Somit dient die Größe des Auges als Marker für die Wirkung Substanz B. Unsere ersten Ergebnisse zeigen eine deutliche Verbesserung bei der Augenentwicklung der Fliegen, die mit Substanz B behandelt worden sind. (**Abb. 2**).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen möchten wir nun die motorischen Fähigkeiten der Fliegen testen und ob sich mit Substanz B eine Verbesserung einstellt. So möchten wir die Krabbelfähigkeit der Larven sowie die Kletter- und Flugfähigkeit der ausgewachsenen Fliegen untersuchen. Positive Ergebnisse in den prä-klinischen Tiermodellen stellen einen wichtigen Schritt zur Testung von Substanz B in klinischen Studien an HSP-PatientInnen dar.

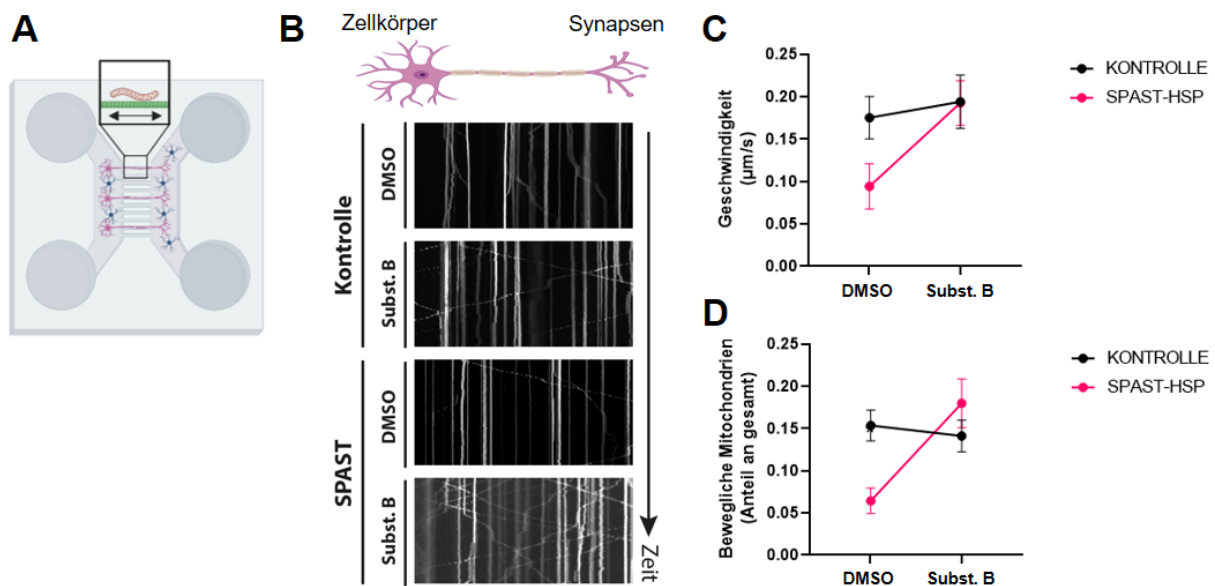


Abb. 1: Substanz B führt zu einer Verbesserung des Transports von Mitochondrien entlang der Axone von iPSZ-Neuronen.

(A) Die Neurone werden in die Mikrofluidikkammern ausgesät, sodass ihre Neurite durch die Mikrorillen wachsen. Die Mitochondrien werden spezifisch angefärbt und ihr Transport über Zeit aufgenommen. **(B)** Mithilfe des Bearbeitungsprogramms ImageJ können aus den Videos Kymogramme erstellt werden, die die Bewegung der einzelnen Mitochondrien über Zeit darstellen. Dabei entspricht eine Linie einem Mitochondrion. Aus den Kymogrammen können Parameter wie die Richtung des Transports und die Geschwindigkeit ausgelesen werden. **(C)** Sowohl die Geschwindigkeit der Mitochondrien als auch **(D)** der Anteil der beweglichen Mitochondrien ist in den HSP-Neuronen (magenta) reduziert im Vergleich zu den Kontrollneuronen (schwarz). Dieser Unterschied wird durch Gabe von Substanz B normalisiert.

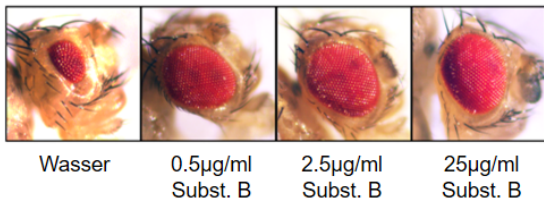
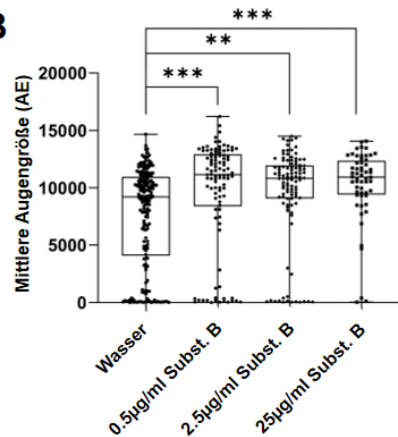
A**B**

Abb. 2: Substanz B verbessert die Augenentwicklung im HSP-Modell der Fruchtfliege.

(A) Die HSP-Fruchtfliegen zeigen eine reduzierte Augenentwicklung (linkes Bild). Diese kann durch Gabe von Substanz B in unterschiedlichen Konzentrationen im Futter verbessert werden. **(B)** Die Unterschiede zwischen den Augengrößen der unbehandelten und der mit Substanz B behandelten HSP-Fruchtfliegen sind statistisch signifikant.

Video: Die angefärbten Mitochondrien in den Neuriten bewegen sich entlang der Mikrorillen in den Mikrofluidikkammern. [Video per Klick ins Bild öffnen.](#)



Alternativ: [Videolink per Klick](#)