

# Zweiter Zwischenbericht



*Prof. Dr. med. Beate Winner*



*Klara Metzner M.Sc.*

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

---

## Testung der Wirksamkeit eines Mikrotubuli-modifizierenden Wirkstoffs

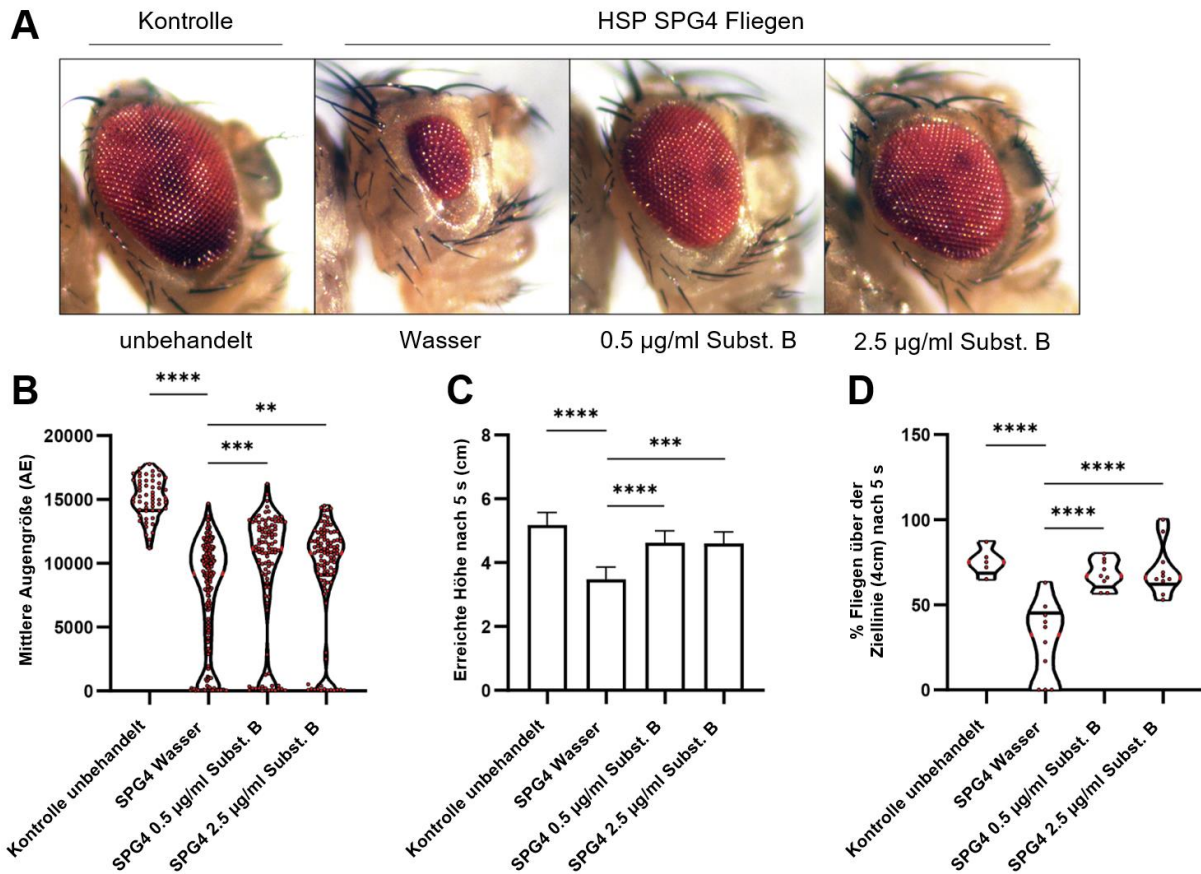
Patienten, die an Hereditärer Spastischer Paraplegie (kurz HSP) Typ 4 (SPG4) leiden, zeigen symptomatisch vor allem Bewegungseinschränkungen, die sich durch fortschreitende Steifheit und Kraftverlust der Beinmuskulatur äußern. Ein möglicher Wirkstoff zur Behandlung von SPG4 sollte daher in erster Linie darauf abzielen, diesen Rückgang der motorischen Fähigkeiten zu verlangsamen und im Idealfall ganz aufzuhalten.

Aufbauend auf unseren früheren Erkenntnissen, dass induzierte pluripotente Stammzellen (iPSZs), die aus Hautzellen von SPG4-Patienten stammen, eine gestörte Calciumregulierung aufweisen, haben wir einen Mikrotubuli-modifizierenden Wirkstoff, „Substanz B“, identifiziert, der diese Calciumdysregulierung umkehren konnte. Analysen des axonalen Transports in iPSZ-Neuronen von SPG4-Patienten und Kontrollpersonen haben diese positive Wirkung von Substanz B bestätigt (sh. 1. Zwischenbericht).

Nachdem wir einige unterstützende Daten zu Substanz B in Zellkulturen mit iPSZ-Neuronen erhalten hatten, weiteten wir unsere Studien auf Tiermodelle aus, um die Wirkung von Substanz B im lebenden Organismus zu bewerten. In Zusammenarbeit mit Dr. Cinzia Rinaldo vom Institut für Molekularbiologie und Pathologie in Rom entwickelten wir ein SPG4-Modell der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, die ein beliebtes Werkzeug für viele Fragen im Bereich der Neurobiologie ist. Die Substanz B wurde den Fruchtfliegen über das Futter verabreicht. Es wurden zwei verschiedene SPG4-Fruchtfliegenmodelle entwickelt, die sich darin unterschieden, in welchen Geweben das Protein Spastin, das in den Zellen von SPG4-Patienten reduziert ist, vermindert war. Im ersten Modell war die Menge an Spastin ausschließlich in den Augen reduziert, da die Augen von Fruchtfliegen ein gutes Modell für Neurobiologen sind, um Anomalien zu beobachten. Das zweite Fliegenmodell war durch eine Verringerung des Spastinspiegels in allen Neuronen gekennzeichnet. Dieses Modell konnte daher zur Analyse der motorischen Fähigkeiten verwendet werden.

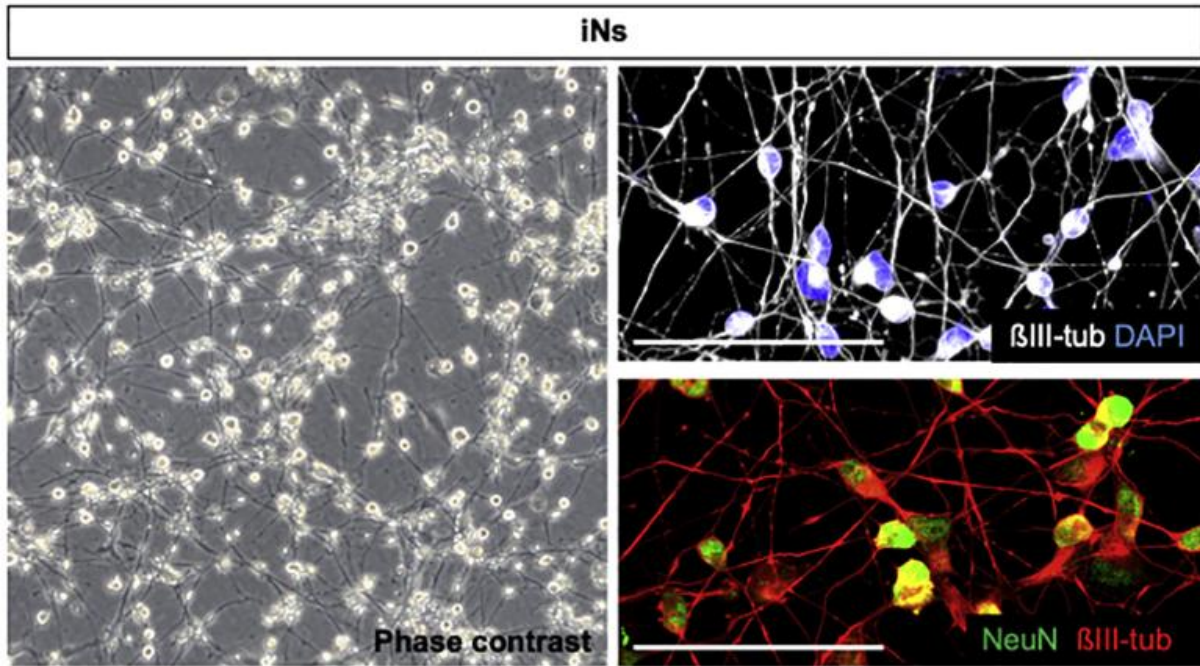
Die Fruchtfliegen mit Spastin-Reduktion in den Augen zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine reduzierte oder gar fehlende Augenentwicklung (**Abb. 1A**). Die Verabreichung von Substanz B führte zu einer signifikanten Verbesserung der Augenentwicklung in den SPG4-Fruchtfliegen (**Abb. 1B**). Zur Analyse der Beweglichkeit wurde das neuronenenweite Spastin-Reduktionsmodell verwendet. Die Fliegen wurden einem Klettertest unterzogen, indem sie zunächst in einem Glasröhrchen geschüttelt wurden, sodass sich alle Fliegen zu Beginn des Experiments am Boden des Röhrchens befanden. Aufgrund ihrer Lichtaffinität kletterten die Fliegen das Röhrchen hinauf, und die nach 5 Sekunden erreichte Höhe (**Abb. 1C**) sowie der Anteil der Fliegen, die nach 5 Sekunden eine Zielhöhe von 4 Zentimetern erreichten (**Abb. 1D**), wurden gemessen. Beide Tests zeigten zunächst eine starke Einschränkung bei den SPG4-Fliegen im Vergleich zu den Kontrollen, die sich jedoch nach Verabreichung der Substanz B verbesserte und auf das Kontrollniveau normalisierte.

Nach diesen positiven Ergebnissen in einem präklinischen Tiermodell möchten wir unsere Untersuchungen in einem weiteren Zellkulturmodell fortsetzen (**Abb. 2**). Induzierte Neuronen werden direkt aus menschlichen Hautzellen gewonnen, ohne den Zwischenschritt über iPSZs, was ihnen ein verbessertes Alterungsbild verleihen soll. Die Analyse induzierter Neuronen von SPG4-Patienten und Kontrollpersonen mit und ohne Substanz B könnte ein tieferes Verständnis der Wirkungsweise von Substanz B ermöglichen.



**Abb. 1:** Substanz B fördert die Entwicklung der Augen und verbessert Bewegungsdefizite im HSP SPG4-Modell der Fruchtfliege.

- (A)** Die SPG4-Fruchtfliegen mit Spastin-Reduktion in den Augen zeigen eine beeinträchtigte Augenentwicklung (2. Bild von links) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollfliegen (1. Bild). Dies kann durch die Verabreichung von Substanz B in verschiedenen Konzentrationen verbessert werden (3. und 4. Bild).
- (B)** Die Unterschiede zwischen den Augengrößen von unbehandelten und mit Substanz B behandelten SPG4-Fruchtfliegen sind statistisch signifikant.
- (C)** Kontroll- und SPG4-Fliegen wurden einem motorischen Test unterzogen, um ihre Kletterfähigkeit zu bestimmen. Die Fliegen wurden in Glasröhrchen geschüttelt und anschließend wurden die Zeit und die Höhe des Kletterns gemessen. Die SPG4-Fliegen wiesen eine geringere Kletterhöhe nach 5 Sekunden auf, und ein geringerer Anteil der Fliegen erreichte nach 5 Sekunden die Ziellinie in einer Höhe von 4 Zentimetern im Vergleich zu den Kontrollen. Eine Verabreichung der Substanz B in zwei Konzentrationen konnte die Beweglichkeit der SPG4-Fliegen auf das Niveau der Kontrollfliegen steigern.



**Abb. 2:** Beispielbilder für induzierte Neurone (iNs) als weiteres Zellkulturmodell für die Erforschung der SPG4. (aus: Mertens et al., 2021, Cell Stem Cell)