Wissenschaftliche Durchbrüche

Durchbruch an der Forschungsfront

Vom Zebrafisch zum Menschen

Unser Körper funktioniert durch Proteine, die von den Genen synthetisiert werden. Genmutationen hindern das entsprechende Protein daran, seine Funktion zu erfüllen, was dann zu Erkrankungen führen kann. Das ist so im Fall der monogenetischen Hereditären Spastischen Spinalparalyse, einer Gruppe von neuro-degenerativen Erkrankungen.

SPG3A ist eines der häufigsten mutierten Gene bei autosomal dominant vererbter HSP (und die Hauptform des frühen Beginns): 10% der Fälle.

Dr. Jamilé HAZAN's Team hat gezeigt, dass beim Zebrafisch-Atlastin, dem Protein des SPG3A-Gens, welches den Aufbau der spinalen Motoneuronen kontrolliert und damit auch die Beweglichkeit der Larve während der embryonalen Entwicklung dieses kleinen Fisches.

Veröffentlicht in der renommierten Zeitung *Nature Neuroscience*, enthält dieser Artikel grundlegende Informationen über die Pathophysiologie auf der molekularen Ebene durch die HSP.

Fassier C et al. Nature Science 2010

Coralie Fassier, die erste Autorin dieses Artikels, bekam 2009 den Forschungspreis der A.SL-HSP France, für die Entwicklung und der Schaffung des ersten Mausmodells, liiert an Mutationen im Spastin-Gen (SPG4), welches das häufigste veränderte Gen bei unseren Erkrankungen ist. Unser Verein hat auch Jamilé Hazan's Gruppe mit Geldmitteln ausgestattet um es leisten zu können, dieses Projekt 2009 und 2010 veröffentlichen zu können.

*ASL France ist stolz und glücklich zu diesem Werk, höchster Qualität, beigetragen zu haben. ASL= Association Strümpell Lorrain. Die Mitgliederzeitschrift der ASL heißt: Spastic

Die Arbeit des Jamilé Hazan Teams

Wenn ein Gen als verantwortlich für eine genetische Erkrankung identifiziert ist, ist es grundlegend wichtig, die biologische Funktion seines von ihm erzeugten Proteins zu verstehen.

21 für die HSP verantwortliche Gene sind identifiziert worden, SPG3A/Atlastin, SPG4/Spastin, SPG11... usw. Für unsere Zwecke ist es wichtig, die den Körper beeinflussende Rolle, die diese HSP-Proteine spielen, zu entdecken.

Diese Fragestellung wird helfen :

- 1) die mit unseren Krankheiten verbundenen molekularen Mechanismen zu verstehen.
- 2) Eine therapeutische Strategie zu entwickeln, um die Funktion dieser Proteine wieder zu restrukturieren.

Während der Embrionalgenese, beim Menschen, wie auch bei Versuchstieren, folgt die Bildung des Nervensystems einem speziellen Programm, Proteine zu nutzen, die bei den unterschiedlichen Arten gleich sind.

Im Embryo entstehen Nerven und entwickeln sich durch das Wirken spezieller Moleküle, die ein Kommunikationsnetzwerk innerhalb der Zelle benutzen und die „signalisierende oder molekulare Bahnen“ (pathways) genannt werden. Mehrere Forschungsprogramme fokussieren sich auf die in diesen Prozess (pathways) einbezogenen Proteine, besonders auf jene, die beteiligt sind beim Auftreten von neurodegenerativen Störungen.

Bei der HSP - die Rolle eines Proteins in einem einfachen Organismus (Zebrafisch) zu studieren, damit sollte man die Funktion klären, welches das gegebene Protein bei der Entwicklung und dem Erhalt der cortospinalen Wegestrecken beim Menschen hat.

Wenn das Experimentiermodell und das Gen ausgewählt sind, können die Forscher eine der zwei folgenden Herangehensweisen ins Auge fassen.

Erste Herangehensweise

Einen transgenetischen Organismus (Wurm, Fliege, Fisch, Maus) zu schaffen, mit einem speziell verändertem Gen ausstatten, zur Produktion eines nicht normalen Proteins, oder dem Fehlen dieses Proteins, und welches auch auf die folgenden Generationen übertragen wird.

Die sich ergebenden Defekte in der Biologie dieser Modellorganismen können dann studiert werden und mit gesunden verglichen werden.

Zweite Herangehensweise

Einen normalen Organismus zu manipulieren, einen spezifizierten Wirkstoff auf das ins Visier genommene Gen anzusetzen, um damit das Verhalten und die Biologie des abgewandelten Organismus zu studieren.

Wie auch die Herangehensweise ist, die angewendete Strategie ist die von „umgekehrter Genetik“, die zu einem Gewinn oder einem Verlust von Funktionen des untersuchten Gens führen sollen; seine Wirkungsweise zu behindern, oder im Gegensatz eine Überwirksamkeit zu erzeugen.

Verfahren des Studiums zur Rolle des SPG3A-Gens beim Zebrafisch.

Dr. Jamilé Hazan´s Team hat als erstes das Atlastin-Protein ausgewählt, erzeugt vom SPG3A, welches das Hauptgen für den frühen Krankheitsbeginn der puren HSP ist, deren erste Symptome schon in der frühen Kindheit erscheinen. (siehe Zusammenfassung der Informationen). SPG3A-Mutationen sind verantwortlich für zehn Prozent der autosomal dominant vererbten HSP Fälle.

Sie haben sich dafür entschieden die Funktion des Atlastins beim Zebrafisch zu studieren, weil dieser kleine Fisch viele Vorteile zeigt, einschließlich der Tatsache, dass er ein Wirbeltier ist, dessen Embryo/Larve während der Entwicklung durchsichtig ist. Der Zebrafisch entwickelt sich in fünf Tagen, Embryonen werden in großer Menge von einem Fischpärchen produziert, und ihr Nervensystem ist leichter auf morphologischer Ebene zu charakterisieren, als bei Säugetieren.

Coralie Fassier und Jamilé Hazan gingen in zwei Schritten vor.

***erster Schritt : Injektion einer Reagenz in Zebrafischembryos, was einmal zu einer Minderung (Verlust) oder einem Überschuss (Gewinn) an Atlastin führte.**

***zweiter Schritt : Das Bewegungsverhalten des Babyfisches, oder der Larve zu beobachten, die mit dem zweiten Tag nach der Befruchtung anfängt zu schwimmen, um dabei die zellulären und nervlichen Veränderungen zu studieren.**

SPG3 und der BMP pathway: ein starkes Verbindungsglied, die Ergebnisse sprechen für sich selbst.

Während der Entwicklung des Zebrafisches, wenn kein Atlastin ausgeschüttet wird, verliert die Larve ihre Beweglichkeit. Dieser Effekt geht aus einer nicht normalen Bauweise der Motoneuronen hervor und ist von einer Aktivierung des BMP (Bone Morphogenetic Protein) begleitet.

Der Gegensatz führt dazu, dass der Überschuss von Atlastin zu einer Störung des BMP führt.

Auf dem Feld ihrer Entdeckung , haben die Forscherinnen eine starke Wirkverbindung zwischen Atlastin und dem BMP Rezeptor (BMPR1) bei den Motorneuronen des Zebrafisches enthüllt. Durch Invitro-Kultivierung von Zebrafisch Rückenmarksnerven, zeigten sie, dass Atlastin mit dem BMPR1 örtlich zusammen wirkt, in Bläschen entlang der Nervenfasern. (Axone)

Schließlich, der letzte Beweis einer funktionalen Interaktion zwischen Atlastin und dem BMP pathway am lebendigen Modell, genügt es, dabei durch die Hemmung des BMP pathways bei Atlastin unterversorgten Zebrafischen, ihre Mobilität wieder herzustellen , so wie auch den normalen Bau ihrer Motorneuronen.

Diese bewunderungswürdige Studie enthüllt, dass während der Wirbeltierentwicklung, das Atlastin die Beweglichkeit der Larve, wie auch die Architektur der spinalen Motorneuronen, durch die Hemmung der BMP pathways, kontrolliert.

Bevor diese Analyse den Wirkmechanismus zwischen einem HSP-Protein und dem BMP pathway bei einem Wirbeltier aufgezeigt hat, haben andere Teams, die Nervenzellen *in vitro studierten herausgefunden, dass auch Proteine, die bei anderen HSPs involviert sind (Spastin/SPG4, NIPA1/SPG6 und Spartin/SPG20), das BMP pathway hemmen können. Die gleiche Wirkverbindung wird bei anderen neurodegenerativen Krankheiten vermutet, wie Amyotrophische Lateralsklerose oder Spinale Muskelatrophie. * In vitro = im Reagenzglas.

Eine fehlerhafte Regulierung des BMP pathway, eben geringer, könnte ein gemeinschaftlicher Mechanismus, bei verschiedenen neurologischen Störungen sein und besonders bei verschiedenen Formen der HSP.

Ein kürzlich an Ratten ausgeführtes Experiment, die einen Rückenmarksschnitt erdulden mussten, untermauert dieses Konzept, als dann eine *intrathekale Injektion von einem BMP-Antagonisten, sich die Fortbewegungseffizienz bei den operierten Tieren verbesserte, wie auch ebenso die Regeneration ihrer corticospinalen Nervenstränge.

* in den Rückenmarkskanal injiziertes BMP Gegenmittel

Unzweifelhaft bringt diese Arbeit wichtige Informationen über die Mechanismen, die zu den Krankheiten führen, die für uns von Interesse sind. Die Dämpfung des BMP pathway in der menschlichen Wirbelsäule ist noch nicht machbar und die Forscher sind jetzt dabei die Regulierung der BMP pathway Aktivitäten zu verstehen, was eine neue therapeutische Annäherungen an die HSP ermöglichen könnte.

Wie auch immer der Fall, das BMP pathway hat ein ernst zu nehmendes Potential.

- 1) Fassier C et al. Das Zebrafisch Atlantin kontrolliert die Beweglichkeit und die spinale Struktur der Motoneuronen vermittelt der Hemmung von BMP pathway. *Nature Neuroscience* 2010; 13: 1380-7
- 2) Physiopathologie: Studium der Mechanismen, die für die Symptome einer Krankheit verantwortlich sind.
- 3) Tsang HAT et al. Die erbliche hereditäre spastische Paraplegie NIPA1, Spastin und Spartin sind Hemmstoffe des Säugetier BMP pathway. *Hum/Mol. Genet.* 2009; 18; 3805-21.
- 4) Matsuura I et al. BMP Hemmstoffe fördern das Wachstum und die funktionelle Erholung nach Rückenmarksverletzungen. *J. Neurochem.* 2008; 105: 1471-79.

Jean Benard

Wissenschaftlicher Berater der ASL-HSP France

Mitglied der EURO HSP BoD, wissenschaftlicher Berater.

Interview mit Dr. Jamilé Hazan & Dr. Coralie Fassier

Spastic an Jamilé Hazan (JH):

Das erste Mal bei Wirbeltieren haben sie am lebenden Modell die Rolle eines Proteins demonstriert, was bei HSP Patienten unzureichend vorhanden ist. Seit Sie das SPG4/Spastin entdeckt haben, das häufiger mutiert ist als das SPG3A/Atlantin, warum begannen sie mit SPG4, vor dem SPG3?

JH:

Ich möchte sie auch noch daran erinnern, dass ich auch den Genplatz des SPG3 gefunden habe. So gesagt, das SPG3 ist das zweit häufigste mutierte Gen bei der HSP. Wichtiger noch, dass SPG3 Mutationen im jugendlichen Alter beginnen, was eine

potentielle Einwirkung bei der unzureichenden Entwicklung des Kindes vermuten lässt, und das ist nicht so im Fall von SPG4, welches hauptsächlich auf Erkrankungsformen bei Erwachsenen bezogen ist. Außerdem ist es so, dass SPG3A sich schon in der embryonalen Entwicklung zeigt, und so war das der vorrangig heiße Kandidat, die Wirkung seiner Veränderung bei der Zebrafischentwicklung zu studieren.

Spastic:

Können Sie uns bitte erklären, warum Sie daran interessiert waren, die Rolle vom SPG3/Atlastin bei Zebrafisch Embryonen, ich meine, während der embryonalen Entwicklung, zu studieren und nicht beim erwachsenen Zebrafisch?

JH:

Die Idee ist einfach. Wenn ein fehlerhaftes oder ein abnormales Protein zum Nervenfasernabbau der Motoneuronen beim Menschen führt, ist es von Interesse zu sehen, ob das Protein entscheidend wichtig ist für die Bildung dieser Neuronen, und ob die Veränderung während ihrer Entwicklung eine Schwächung bestimmter Nerventypen verursacht, und noch spezifischer zur Verwundbarkeit bestimmter synaptischer Verbindungen führt, und zu ihrer Degeneration später im Leben führt und als potentielle Ursache für die Krankheit dasteht.

Folgerichtig, das Studieren der Rolle eines Proteins während der Bildung des Nervensystems, kann uns dazu bringen zu verstehen, wie die Veränderung dieses Proteins eine neuronale Degeneration verursachen kann, denn mehrere molekulare Mechanismen, die in die Entwicklung des Nervensystems involviert sind, sind gleicher Weise auch in seine Degeneration einbezogen.

Weiterhin ist der Zebrafisch ein sehr gutes Modell das Nervensystem zu studieren, denn er ist äußerst geeignet für Bildtechniken gewesen (aufgrund der Durchsichtigkeit bei den Zebrafischembryonen) und dem Gebrauch großer Zusammenstellungen von Mutanten, die verschiedene Bereiche des Gehirns und des Rückenmarks und auch verschiedener Nervenpopulationen befallen.

Spastic:

Aber wird das Spastin im Erwachsenenalter ausgeschüttet?

Und können wir unsere Krankheiten als Unordnungen betrachten, die sich als Ergebnis aus einem Mangel in der vorgeburtlichen Bildung des pyramidalen Systems ergibt?

JH %Coralie Fassier

Erste Frage: ja das Protein wird abgegeben in Erwachsenen-Neuronen. Jedoch wissen wir noch nicht ob das Niveau variiert, abhängig von Zeit und Ort, in den verschiedenen Nervenpopulationen. Wir wissen auch nicht wann und wie potentielle Veränderungen im Niveau von verändertem Atlastin eine spezielle Degeneration verschiedener Nerventypen verursachen können.

Zweite Frage: Für Mutationen beim SPG3/Atlastin, der Zusammenhang mit der Embryobildung ist offensichtlich, denn es ist einbezogen in den frühen jugendlichen Beginnzeitpunkt der HSP, das ist die Kindheit. Und noch Mal, ein potentielles Defizit während der Entwicklung zu studieren, hilft voraus zu sehen, was für eine Einschränkung, Liaison bei Erwachsenen eintreten kann.

Spastic:

Eingehend auf die Wechselwirkung zwischen Atlastin und BMP pathway, die Ihre Arbeit ja gezeigt hat. Denn Atlastin hemmt ganz klar das BMP pathway; heißt das, dass BMP pathway möglicherweise zu hoch bei Patienten mit SPG3 ist, und ist es somit möglich eine Therapie ins Auge zu fassen, die das Niveau des BMP pathway im Rückenmark reduziert?

JH & Coralie Fassier:

Theoretisch ja, das BMP pathway ist viel zu wichtig, in vielen verschiedenen Graden um es einfach abzuschalten. Es grob gesagt, diese Manipulation würde giftiger sein als dass sie Vorteile bringen würde. Im Moment ist es für uns nötig die spezielle Regulation des BMP pathway zu verstehen, seine Zielpunkte und sein Ausströmen und seine Mechanismen beim Zebrafisch, genauso wie bei höheren Wirbeltieren, bevor man an Therapien denkt.

Im Auftrag der ASL France und der EURO-HSP, ein Dankeschön, dass Sie an unserer Krankheit arbeiten, mit so viel standhaftem Einsatz. Einen besonderen Dank für das was Sie herausgefunden haben!

Eure Entdeckungen geben uns Hoffnung.

Signalisierende Pfade oder „Landkarten“ für den zellulären Verkehr

Motoneuronen die Impulse vom Gehirn durch die Länge des Rückenmarks führen, folgen einem präzisen Muster der Abgrenzung und richten ausgezeichnete Verbindungen ein, während der Embryoentwicklung. Nachdem sich die Zelle in ein Neuron ausdifferenziert, soll sie ihre Nervenfasern auf das genaue Ziel ausbringen, so wie andere Neuronen oder spezielle Muskeln in äußerst präziser Art. Diese Führungsschritte der Nervenfasern werden ausgeführt in genauer räumlich-zeitlicher Ordnung durch eine integrierte Information durch das umgebene Gewebe. Diese Information wird an die Nervenzelle über die „signalisierenden pathways“ übertragen. Diese molekularen Pathways werden während der embryonalen Entwicklung (pränatale Periode) etabliert. Nach der Geburt werden diese Pathways noch weiter durch verschiedene Zelltypen genutzt, um sich mit ihren Nachbarzellen in Verbindung zu setzen.

Im Allgemeinen, verbindet ein Pathway die Zelloberfläche (das ist die Zellmembran) mit dem Zellkern. Wenn ein Signalmolekül sich an seinen Empfänger anbindet, der auf einer Zellmembran liegt, dann startet ein molekularer Pathway, der eine nachfolgende Aktivierung von einer großen Anzahl von Molekülen innerhalb der Zelle in Gang setzt. Dieser Pathway findet seinen Weg durch das Zytoplasma um den Zellkern zu informieren, das angemessene Ansprechen zu diesem Ereignis anzuregen, mit der Aktivierung oder der Beruhigung eines Gegensatzes der gegebenen Gene. Für jedes der Signalmoleküle ist da ein Empfänger und ein dazu gehöriger Pathway. Während ihres ganzen Lebens muss jede Zelle auf vielfache äußere Anregungen reagieren, durch das Auslösen eines bestimmten Pathways. Einige dieser Pathways sind bei verschiedenen

Zellen identisch, während andere spezifischer sind für einen Zelltyp, (Blutzellen, Zellen des Epithels, Muskel, Knochen, Nerven) in der Zusammenfassung sollte jede Zelle ihr Verhalten an verschiedene Reizungen anpassen durch den Gebrauch eines komplexen Netzwerkes von Pathways, zu vergleichen mit der Londoner U-Bahn.

Zum Beispiel, das Bone Morphogenetic Protein (BMP) Pathway ist aktiviert, wenn ein BMP-Molekül an einen speziellen Empfänger (Rezeptor) anbindet, genannt BMPR.

Text unter dem ersten Bild : eines unserer Versuchskarnickel, der Zebrafisch

The English « guinea pig », animal for medical tests, is in German “Versuchskarnickel”.
Versuch = le test; Karnickel = mot ordinaire pour le lapereau
Guinea pig = cochon d'Inde