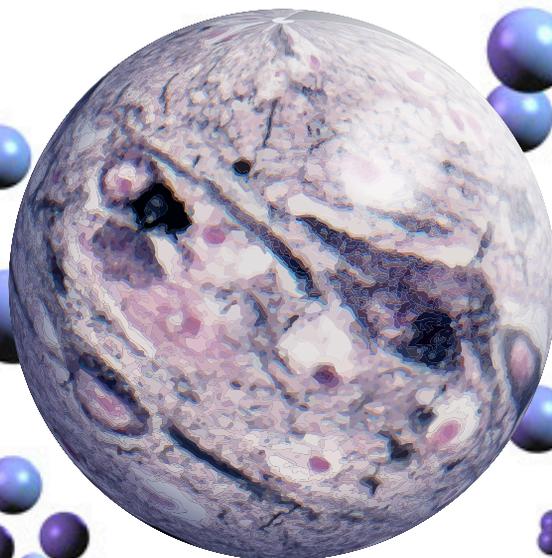


Alzheimer: die Suche nach einem Ausweg

Chemische Synthese des Tau-Proteins zur Entwicklung neuer Wirkstoffe

Kristina Siebertz, Oliver Reimann und Prof. Dr. Christian Hackenberger
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, Deutschland



Obwohl die Krankheit Alzheimer bereits vor mehr als 100 Jahren entdeckt wurde, sind die essenziellen Ereignisse, die den Verlauf der Krankheit maßgeblich beeinflussen, weitestgehend unbekannt. Seit einiger Zeit rückt nun das Tau-Protein, eine schon länger bekannte Komponente von Ablagerungen in Gehirnen von Alzheimerpatienten, verstärkt in den Fokus der Forschung.

Alzheimer ist die häufigste Form von Demenz und ist eine progressive, irreversible neurodegenerative Erkrankung, die zumeist bei Personen ab einem Alter von 65 Jahren auftritt. Patienten leiden meist an Gedächtnisverlust und einer starken Beeinträchtigung des Denkvermögens, was ihnen oft die Ausführung einfacher und alltäglicher Dinge wie Laufen und Schlucken erschwert. In Deutschland leiden 1,2 Mio. Menschen an Demenz – mit steigender Tendenz. Auch der damit einhergehende Kostenfaktor für den Staat und Angehörige ist enorm. Seit vielen Jahren warten Patienten nun vergeblich auf helfende Therapien, neue Arzneimittel oder auch einen wirksamen

Impfstoff gegen Alzheimer – trotz vielversprechender Studien. Einer anfänglichen Euphorie ist mittlerweile die ernüchternde Einsicht gewichen, dass man die Komplexität der Krankheit unterschätzt und essenzielle Aspekte außer Acht gelassen hat.

Fehlfaltete Proteine prägen das Krankheitsbild

Gehirne von Alzheimerpatienten weisen insbesondere zwei ungewöhnliche Strukturen auf, die aus fehlgefalteten

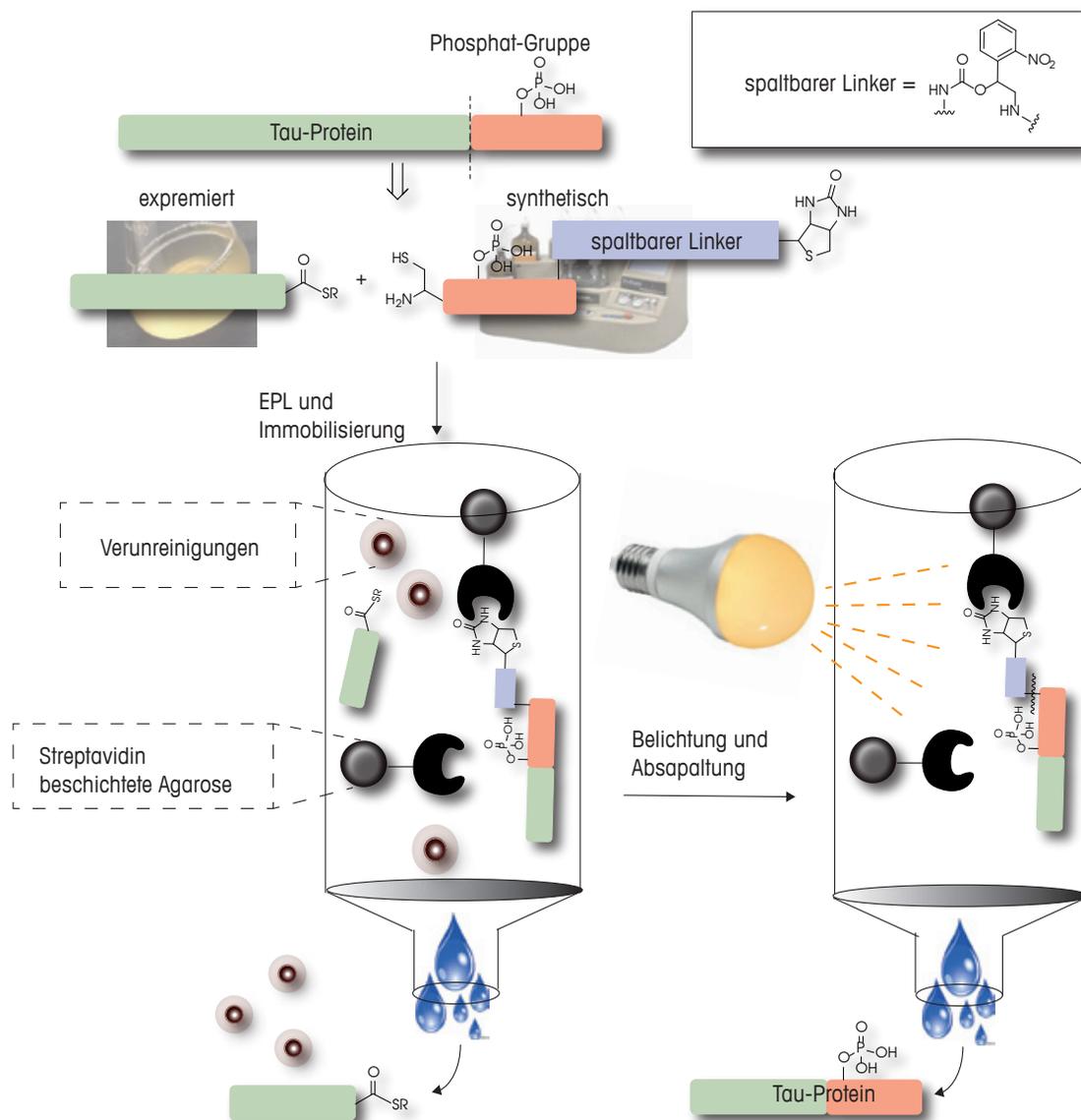


Abb. 1 Eine schematische Darstellung der Semisynthese von Tau und die anschließende Reinigung über einen lichtspaltbaren Biotin-Tag

Proteinen bestehen und stark in Regionen des Gehirns auftreten, die für das Gedächtnis von Bedeutung sind. Bei einer dieser demenzassoziierten Erscheinungen handelt es sich um senile Plaques, bestehend aus extrazellulären Ablagerungen von Proteinfragmenten, die man β -Amyloide nennt. Diese Fragmente spielen eine wesentliche Rolle bei der Informationsverarbeitung im Gehirn und haben zudem eine antimikrobielle Funktion. Sie liegen jedoch bei Alzheimerpatienten in großen Mengen vor und als im Jahr 1991 eine direkte Verbindung zwischen einer Mutation des Amyloid-Precursor-Proteins (APP), einer metabolischen Vorstufe von β -Amyloid, und Alzheimer aufgezeigt werden konnte, rückte die sogenannte Amyloid-Kaskaden-Theorie in den Vordergrund der Forschung [1–4]. Diese stützt sich auf die Vermutung, dass Amyloid- β -Fehlfunktionen das kausale Fundament der Krankheit ausmachen. Entsprechend intensiv wurde an Medikamenten geforscht, die den Abbau von Amyloid- β ermöglichen, von denen einige klinisch getestet wurden. Doch zunächst äußerst vielversprechende Verbindungen wie die Antikörper Solanezumab (Eli Lilly), Bapineuzumab (Pfizer) und Crenezumab (Genentec) konnten sich nicht bewähren und führten zu erheblichen, teils fatalen Nebenwirkungen bei Testpersonen. Daraus resultierte bis heute keine effektive Behandlung von Alzheimer durch Medikamente, die sich gegen β -Amyloid alleine richten. Wissenschaftler mussten also erkennen, dass Alzheimer und andere Demenzen sehr komplexe Krankheiten sind und nicht nur durch die Beseitigung seniler Plaques behandelt werden können. Dieses Bild wird gar durch die Beobachtung gestärkt, dass etwa 30 % der älteren, nicht an Alzheimer leidenden Menschen mehr oder weniger stark ausgebildete senile Plaques aufweisen. Obwohl sicherlich keine Beschreibung der Alzheimerkrankheit ohne Erwähnung von β -Amyloid-Pathologie vollständig wäre, fokussiert sich die Forschung heute verstärkt auf die zweite Schlüsselverbindung fehlgefalteter Proteine, das Tau-Protein.

Tau-Ablagerungen werden durch Phosphatreste modifiziert

Das zweite Merkmal von Alzheimer sind Ablagerungen in Form neurofibrillärer Bündel im Gehirn, hauptsächlich bestehend aus Tau-Proteinen. Wie auf dem Titelbild [5] gezeigt, können die neurofibrillären Bündel mithilfe von speziellen Anfärbemethoden, in diesem Fall dem Gallyas-Braak-Farbstoff, sichtbar gemacht werden. Normalerweise übt Tau eine stabilisierende Wirkung auf das neuronale Netzwerk aus. Es hilft dabei, sogenannte Mikrotubuli zu bilden und zu stabilisieren, die für die Weiterleitung essenzieller Nährstoffe und Neurotransmitter vom Zellkörper entlang des Axons verantwortlich sind. Eine zentrale Aufgabe der Wissenschaftler ist also die Identifizierung besonders toxischer Formen des Tau-Proteins. So konnte beispielsweise die pathologische Mutation P301L in Tau identifiziert werden, die zwangsläufig zur Bildung neurofibrillärer Bündel und Demenzercheinungen führt. Ein Behandlungsansatz für solche Aggregate bietet das Medikament LMT-X (TauRX Therapeutics), ein Methylen-Blau-Derivat, das sich zurzeit in der klinischen Testphase 3 befindet und in der Lage ist, Tau-Aggregation einzudämmen oder gar aufzulösen.

Eine zentrale Beobachtung bei den fehlgefalteten Tau-Proteinen in neurofibrillären Bündeln war, dass diese durch eine unnormal hohe Menge an Phosphatresten modifiziert sind, wodurch Tau in seiner natürlichen Funktion kompromittiert wird. Es wird angenommen, dass sich Tau durch Mutationen oder den Zustand der „Hyperphosphorylierung“ von den Mikrotubuli löst, diese somit nicht mehr stabilisieren kann und sich mit anderen ungebundenen Tau-Molekülen zusammenlagert. Dadurch kommt es zum Zerfall des neuronalen Transportsystems und die Neuronen verlieren ihre Eigenschaft, miteinander kommunizieren zu können [6]. Ein alternativer Ansatz zur Aggregatauflösung für die Entwicklung neuer

Alzheimermedikamente, die sich gegen Tau-Fehlfaltung und -Aggregation richten, ist die Identifikation pathologischer Phosphorylierungsmuster an diesem Protein und deren Beseitigung.

Die Chemie vermag, was die Biologie hier nicht leisten kann

Will man das Tau-Protein nun in Bezug auf ganz bestimmte Phosphorylierungsstellen untersuchen, so versagen klassische enzymatische Ansätze, die in der Biologie üblich sind, um Proteine mit Phosphatresten ortsspezifisch zu dekorieren. Denn was man erhält, sind im Endeffekt heterogene Gemische unterschiedlich modifizierter Tau-Proteine. Eine Methode, die eine ortsspezifische Phosphorylierung an Tau erlaubt, ist die sogenannte Ligation an exprimierten Proteinen („expressed protein ligation“, EPL) [7–10]. Diese Methode wird auch Protein-Semi-Synthese genannt, wobei ein Teil des Proteins in Bakterien erzeugt und ein anderer Teil synthetisch im Labor generiert wird. Beide Teile werden

anschließend durch eine chemische Reaktion miteinander verknüpft, die man Native Chemische Ligation (NCL) nennt. Um hochreine, spezifisch phosphorylierte Tau-Proteine zu erhalten, können lichtspaltbare Linker mit Biotin für die Reinigung des Tau-Proteins verwendet werden, die keine chemischen Rückstände oder Nebenprodukte zurücklassen (s. Abb. 1). Dafür wird die Proteinmischung mithilfe der starken Biotin-Streptavidin-Interaktion auf Agarose immobilisiert und alle anderen Verunreinigungen entfernt. Anschließend wird die Agarose mit einer starken Lichtquelle (s. Abb. 2) beleuchtet, was zur Abspaltung des Biotins und der Befreiung des gewünschten ligierten Proteins führt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass der lichtspaltbare Linker keine Spuren hinterlässt – man hat am Ende daher das natürliche Protein, das lediglich durch eine Phosphorylierung modifiziert ist. Dieses Verfahren wurde kürzlich in der Arbeitsgruppe um den Chemiker Prof. Dr. Christian Hackenberger am Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) und der Humboldt-Universität zu Berlin etabliert [11]. Mit diesem Durchbruch in der Herstellung modifizierter Tau-Proteine können die Wissenschaftler nun den Einfluss spezifischer Phosphorylierungsmuster im Tau-Protein noch genauer untersuchen und ihren Einfluss auf Struktur, Funktionalität und das Aggregationsverhalten analysieren. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Identifikation und Erforschung krankheitsrelevanter Phosphorylierungen, die bei Alzheimerpatienten post mortem festgestellt werden. Die chemische Synthese des Tau-Proteins spielt hierbei die entscheidende Rolle, und die Wissenschaftler erhoffen sich von diesen Untersuchungen die Entwicklung neuer Wirkstoffe und diagnostischer Verfahren und somit einen wertvollen Beitrag zur Bekämpfung der Alzheimerkrankheit mithilfe der Chemie.

- hackenbe@fmp-berlin.de
- reimann@fmp-berlin.de
- siebertz@fmp-berlin.de

Literatur

- [1] Chartier-Harlin, M.C. et al. (1991) *Nature* 353, 844–846
- [2] Goate, A. et al. (1991) *Nature* 349, 704–706
- [3] Murrel, J.M. et al. (1991), *Science* 254, 97–99
- [4] Dodart, J. C. et al. (2002) *Nat. Neurosci.* 5, 452–457
- [5] J. K. Chambers et al. (2012) *PLoS* 7, e46452
- [6] Alzheimer's disease – unraveling the mystery, NIH and National Institute of Aging, 2011
- [7] Dawson, P.E. et al. (1994) *Science* 266, 776–779
- [8] Muir, T.W. et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6705–6710
- [9] Hackenberger, C.P. & Schwarzer, D. (2008) *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 10030–10074
- [10] M. Broncel et al. (2010) *Chem. Eur. J.* 16, 7881–7888
- [11] O. Reimann et al. (2015) *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 306–310

Titelbild: © J. K. Chambers et al. (2012) *PLoS* 7, e46452; istockphoto.com, Ralwel/Rocky89



Den Beitrag finden Sie auch online im q&more-Portal

■ www.bit.ly/qmore-1502-1

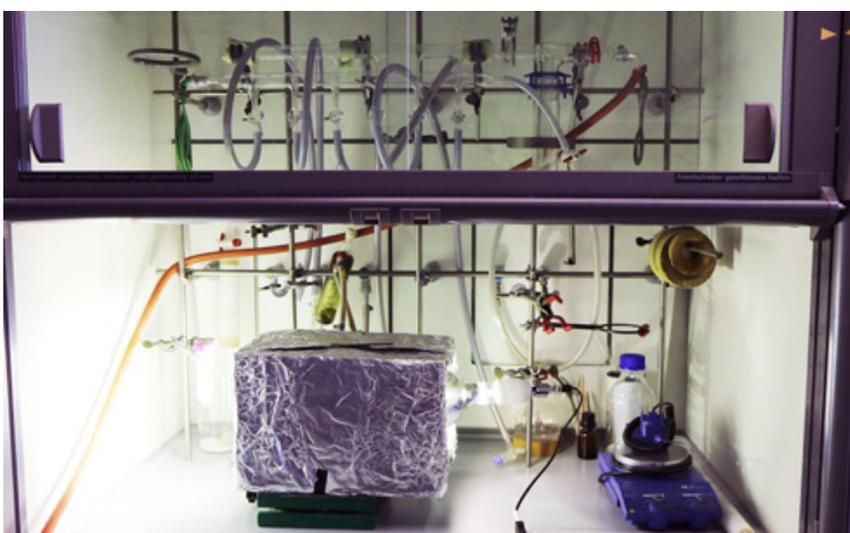
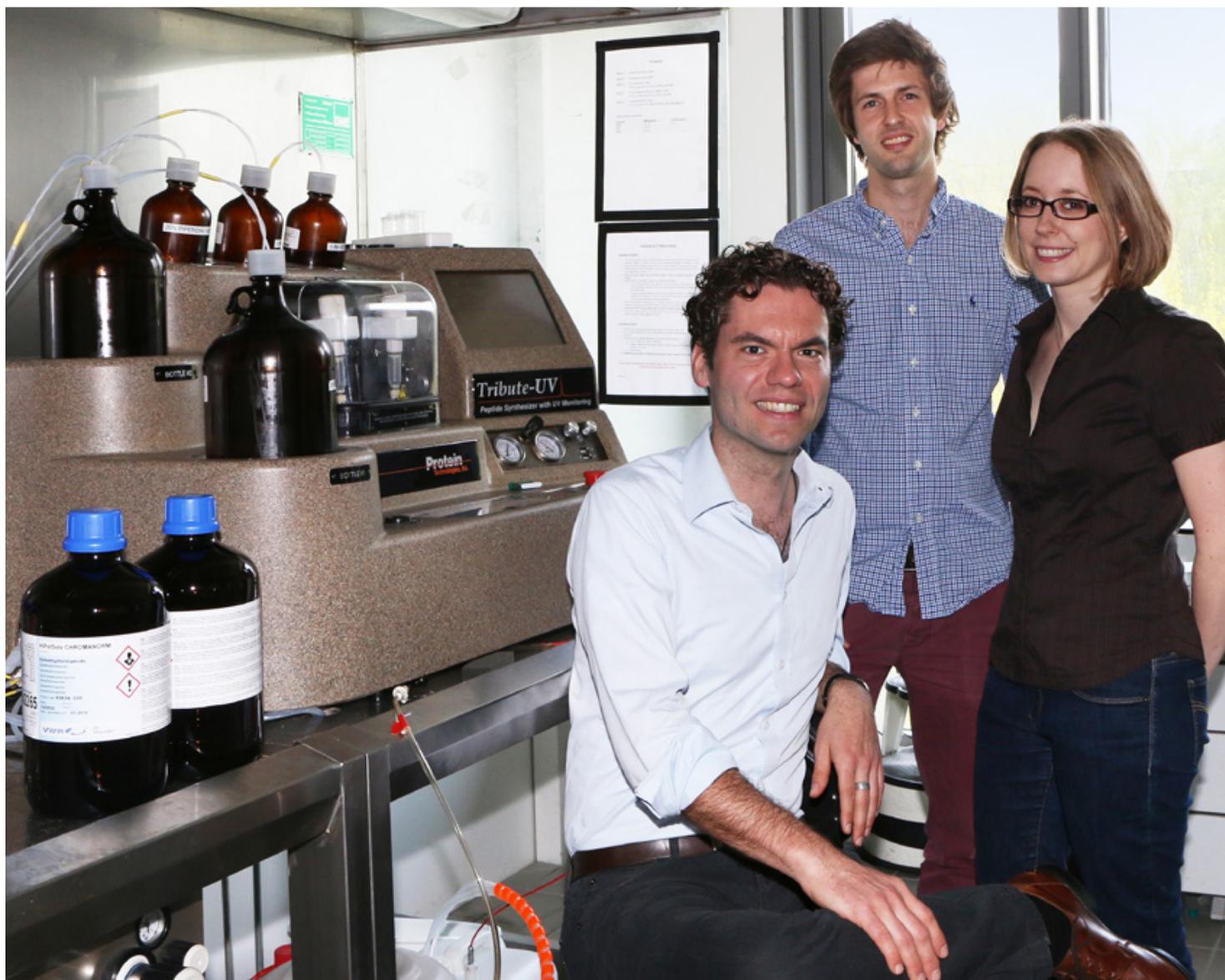


Abb. 2 Im finalen Aufreinigungsschritt wird eine starke Lichtquelle benötigt.



Mit seiner Arbeitsgruppe am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin-Buch, beschäftigt sich Prof. Dr. Christian Hackenberger mit der Entwicklung von neuen chemischen Methoden für die Synthese funktionaler

Proteine, der Herstellung von pharmakologisch relevanten Antikörper- und Proteinkonjugaten und der Untersuchung von posttranslationalen Modifikationen (PTMs).

Christian P. R. Hackenberger, Jg. 1976, Heinz Maier Leibnitz-Preisträger 2011, studierte Chemie an den Universitäten Freiburg und Madison (USA). Nach seiner Promotion an der RWTH Aachen und einem Postdoc-Aufenthalt am MIT begann er seine eigenen Arbeiten als Liebig-Stipendiat und Emmy-Noether Nachwuchsgruppenleiter (DFG) an der Freien Universität Berlin. Im Jahr 2011 erhielt er dort eine Professur für Bioorganische Chemie gestiftet von der Boehringer-Ingelheim Stiftung. 2012 erhielt er einen Ruf an die Humboldt-Universität zu Berlin und das Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie.

Oliver Reimann, Jg. 1984, erhielt seinen Master in Chemie an der Freien Universität Berlin. Seit Oktober 2011 fertigt er seine Promotion im Arbeitskreis von Prof. Christian Hackenberger am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin Buch und der Freien Universität Berlin an, wobei er über einen Zeitraum von zwei Jahren durch ein Stipendium des Fonds der Chemischen Industrie (FCI) gefördert wurde. Sein Forschungsschwerpunkt liegt auf der Erforschung des Einflusses posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierung oder Glykosylierung auf die Pathologie des Tau-Proteins.

Kristina Siebertz, Jg. 1990, studierte Chemie an der Universität Zürich und fertigte dort ihre Masterarbeit im Arbeitskreis von Prof. John Robinson an. Für ihre Doktorarbeit zog sie im Februar 2013 nach Berlin, wo sie nun in der Gruppe von Prof. Christian Hackenberger am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie und der Humboldt-Universität zu Berlin forscht. Sie beschäftigt sich mit der Semisynthese von neuartigen, homogenen phosphorylierten Tau-Proteinen und deren Einfluss auf die Bildung von neurofibrillären Bündeln.