

„Geht der Wettlauf gegen das Vergessen bald durch die Nase?“

Tanja Mang und Xenia Wagner

Anne sitzt weinend und machtlos vor dem behandelnden Arzt ihres 78 jährigen Vaters. Die Diagnose lautet zu 90 %iger Wahrscheinlichkeit Alzheimer-Demenz. Sie erinnert sich an die immer stärker werdende Vergesslichkeit ihres Vaters, die vor ungefähr drei Jahren begann. Ständig verlegte er wichtige Gegenstände, die an unüblichen Plätzen, wie zum Beispiel im Kühlschrank, wiedergefunden wurden. Er war oft launisch und interesselos. Als er vor zwei Monaten das dritte Mal den Nachhauseweg nicht mehr fand, ließ sie ihn untersuchen. Sie macht sich Vorwürfe: „Wäre die Krankheit nur früher erkannt worden!“

Wie Annes Vater geht es rund 1,2 Millionen Menschen in Deutschland mit stark steigender Tendenz.[1] Benannt ist diese Form der Demenz nach Alois Alzheimer, der 1906 Ablagerungen von Eiweißstoffen im Gehirngewebe einer verstorbenen Patientin entdeckte.[2] Bei diesen Ablagerungen handelte es sich um das Amyloid- β -Protein ($A\beta$) und das Tau-Protein (Abb. 1 und 2C).

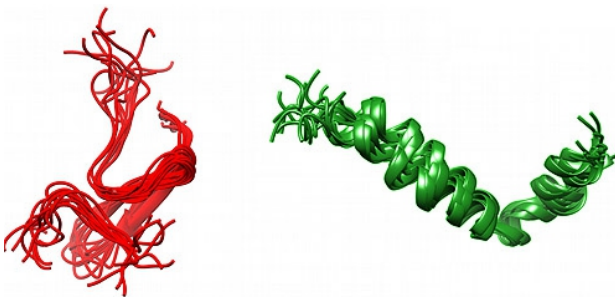


Abbildung 1: Proteinstruktur des $A\beta$ - und Tau-Proteins.

A) Das $A\beta$ -Protein hat eine Länge von 42 Aminosäuren.

B) Das Tau-Protein ist mit einem Microtubuli-Fragment assoziiert. (Erstellt mit Chimaera).

Das Amyloid Vorläuferprotein in der Zellmembran wird durch zwei verschiedene Sekretasen zum $A\beta$ -Protein geschnitten. Dieses lagert sich anschließend außerhalb der Zelle in Zusammenschlüssen, den Amyloid-Plaques, ab. Das $A\beta$ -Protein hat eine Länge von 40 oder 42 Aminosäuren und bildet β -Faltblatt-Bereiche aus (Abb. 1A). [3]

Das Tau-Protein dagegen, das normalerweise Mikrotubuli, Bestandteile des Zytoskeletts, stabilisiert, verliert durch Hyperphosphorylierung seine Funktion. Dies resultiert in einer Beeinträchtigung des intrazellulären Transports von Zellsubstanzen und der gestörten Ausbildung von

Dendriten. Das Tau-Protein lagert sich daraufhin innerhalb der Zelle als faserartige Bündel, sogenannten Tangles, ab, welche aus gepaarten α -helikalen Tau-Filamenten bestehen (Abb. 1B). [3]

In beiden Fällen findet eine Schädigung der Nervenzellen statt, die bis zu deren Absterben führen kann. Außerdem sind die Proteinablagerungen im finalen Krankheitsbild nach dem Tod des Patienten in Gewebeschnitten nachweisbar. [2]

Zurzeit kann die Alzheimer-Demenz (AD) nicht geheilt, sondern lediglich verzögert werden. [4] Dies liegt zum einen daran, dass die Ursache der AD nicht endgültig geklärt ist, und zum anderen, dass es keine anwendbaren frühzeitigen Diagnoseverfahren gibt, da die bisherigen Methoden die Krankheit erst zu spät detektieren.

Neben der mikroskopischen Untersuchung von Gehirngewebe nach dem Tod existieren momentan verschiedene radiologische Methoden, die am lebenden Menschen durchführbar sind. Zu diesen gehören die Computer-(CT), Magnetresonanz-(MRT), Einzelphotonen-Emissionscomputer-(SPECT) und Positronen-Emissions-Tomographie

(PET). [2] Ein typisches Merkmal des fortgeschrittenen Krankheitsstadiums ist eine durch Zellschädigung hervorgerufene Volumenabnahme des Gehirns. [2] Die CT ist in der Lage, diese nachzuweisen. Über die MRT hingegen ist eine genauere und quantitative Analyse der Volumenabnahme möglich, welche mit dem Verlust an geistigen Fähigkeiten korreliert werden kann.

PET und SPECT detektieren die für die AD charakteristischen Tau- und A β -Ablagerungen im Gehirn über radioaktive Bindemoleküle. Beide Methoden können im Vergleich zur CT und MRT bereits frühere Alzheimer-Stadien anzeigen. In den vergangenen Jahren wurden mehrere Agenzien zur PET- und SPECT-Detektion der A β -Ablagerungen untersucht, und von diesen wurde das Amyvid zur Anwendung am Patienten zugelassen. [5] Amyvid ist der Handelsname des Radiodiagnostikums Florbetapir, welches das Radioisotop 18-Fluor enthält und an die A β -Plaques bindet. Die emittierte Strahlung wird im PET-Scan sichtbar. Somit können mit Amyvid A β -Plaques nachgewiesen und dadurch AD diagnostiziert werden. Zur Visualisierung von Tau existieren, im Gegensatz zu A β , nur wenige radioaktive Bindemoleküle. Diese sind außerdem nicht für das Tau-Protein spezifisch, sondern binden ebenfalls an A β -Ablagerungen. Zusätzlich zeigen sie unerwünschte pharmakokinetische Eigenschaften, wodurch eine Anwendung beim Menschen erschwert wird und somit bisher keine Zulassung für klinische Zwecke durchgesetzt werden konnte. [5]

Allen genannten Methoden ist gemeinsam, dass eine Diagnose erst ab einem mehr oder weniger vorangeschrittenen Krankheitsbild möglich ist und somit schon ein erheblicher Schaden am Gehirn entstanden ist. Um rechtzeitig den Krankheitsverlauf zu verzögern oder eine wirksame Therapie zu ermöglichen, ist jedoch eine frühzeitige Diagnose notwendig. [5*,2]

Dazu erforscht die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Boris Schmidt (TU Darmstadt) fluoreszierende Farbstoffe, die eine nicht-radioaktive Visualisierung der Tau-Ablagerungen in Echtzeit frühzeitig ermöglichen sollen.[5] Die Fokussierung auf Tau als Biomarker begründet sich durch frühere Untersuchungen, die nahelegen, dass Tau-Ablagerungen im Vergleich zu den A β -Ablagerungen besser mit dem Fortschritt der AD korrelieren. Über pathologische Veränderungen in der Netzhaut und des Riechsystems bei AD-Patienten könnte nichtinvasiv beispielsweise mit Farbstoffen ein Rückschluss auf die Ablagerungen im Gehirn gezogen werden. In der menschlichen Netzhaut konnte die Anwesenheit von Tau-Ablagerungen bereits nachgewiesen werden.[1] Beim Riechsystem lässt die erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zwischen Nase und Gehirn vermuten, dass Farbstoffe und Medikamente durch bestimmte Bereiche der Nasenschleimhaut zum Gehirn gelangen könnten. [5] Die genannte Arbeitsgruppe verfolgt das Ziel, über die Etablierung von an Tau bindende, fluoreszierende Agenzien letztendlich die Tau-Ablagerungen im Riechsystem nachzuweisen. Hierfür eignen sich hervorragend fluoreszierende Farbstoffe, welche die bisherigen PET-Agenzien zur A β -Detektion ergänzen. Solche Farbstoffe dürfen nicht toxisch oder durch Licht in Struktur und Funktion veränderbar sein und müssen eine ausreichende Fluoreszenzquantenausbeute, Affinität und Selektivität zu Tau besitzen. Zudem ermöglicht ein großer Stokes-Shift eine farbliche Unterscheidung zwischen der Hintergrundfluoreszenz der Zelle und der Tau-Ablagerung. Darüber hinaus müssen die Agenzien die Zielstruktur gut erreichen und nach der Untersuchung in absehbarer Zeit wieder abgebaut werden können.

Als fluoreszierende Farbstoffe wurden Trimethincyanin-Derivate eingesetzt, welche bevorzugt an α -helikale Strukturen und somit an Tau-Ablagerungen binden. A β -Ablagerungen werden dagegen aufgrund ihrer β -Faltblatt-Struktur nicht gebunden und angefärbt. Als Kandidaten für die Detektion von Tau wurden Derivate des gleichen

Grundgerüsts mit verschiedenen Substitutionsmustern synthetisiert (Abb. 2A).

Diese Reste, Alkyl- oder Polyethylenglycolketten (PEG) unterschiedlicher Länge, verleihen den Derivaten eine unterschiedliche Lipophilie. Etablierte Referenzproben, wie Methoxy-X04, liegen im gleichen oder einem niedrigeren Lipophiliebereich wie die Cyanine. Die Lipophilie wird in Log P angegeben, welcher die Verteilung einer Substanz zwischen einer hydrophilen und lipophilen Phase beschreibt. Dabei überqueren lipophile Substanzen mit einem Log P zwischen 0 und 3 die BHS am leichtesten. Übereinstimmend damit passierten Cyanine, vor allem die Polyethylenglycol (PEG)-substituierten Derivate, mit einem Log P von 0,1 bis 3,5 die BHS.



Abbildung 2: Mögliche Anwendung der Trimethincyanine als Nasenspray. A) Strukturformel der Trimethincyanin-Derivate (R = Rest, X = I, Br oder Cl). B) In vitro histologische Färbung der Tau-Ablagerungen in der Bowman'schen Drüse eines AD-Erkrankten. C) Schematische Darstellung der Aβ- und Tau-Ablagerungen im Gehirn und der Nase. (A und B mit freundlicher Genehmigung von Jiamin Gu, AK Prof. Schmidt, [6])

Zur Überprüfung des Fluoreszenz- und Bindungsverhaltens der Trimethincyanine wurden verschiedene Tests durchgeführt. Zuerst wurden über eine immunhistologische Färbung in Hippocampus-Bereichen von verstorbenen AD-Patienten signifikante Mengen an Aβ- und Tau-Ablagerungen über entsprechende Antikörper detektiert und damit deren Anwesenheit im untersuchten Gehirngewebe nachgewiesen. Die spezifische Bindung der Cyanine konnte in Proben des gleichen Gewebes durch Fluoreszenz-Mikroskopie bestätigt werden. Alle Derivate zeigten dabei eine starke Färbung der intrazellulären Tau-Ablagerungen mit einem guten Kontrast zum Hintergrund, Aβ-Ablagerungen wurden dagegen nicht angefärbt. Dies bestätigt, dass Cyanine, wie bereits erwähnt, nicht an amyloide β-Faltblatt-Strukturen binden können. Im Thiazinrot R Verdrängungstest wurde die Affinität der Derivate gegen Tau-Ablagerungen ermittelt, da diese den gebundenen Farbstoff Thiazinrot R kompetitiv von Tau entfernen. Die Versuche ergaben eine gute Affinität der Derivate für Tau-Ablagerungen *in vitro*. Das legte nahe, dass sich die eingesetzten Trimethincyanine für die Detektion von Tau-Ablagerungen im Riechsystem und im Gehirn der AD-Patienten eignen.

Darüber hinaus sollten die Cyanine für den Einsatz in der Diagnostik möglichst keine Zytotoxizität aufweisen. Um diese zu testen, wurden Zebrafische als *in vivo*- und humane Leberzellen als *in vitro*-Modellsysteme eingesetzt. Zebrafische sind embryonale Modelle für klassische Krankheiten und Entwicklungsdefekte. Sie bieten zahlreiche Vorteile für biomedizinische und verhaltensgenetische Studien, wie die Durchlässigkeit für kleine Moleküle und Transparenz im frühen Embryonalstadium. Toxizitätstests an Leberzellen, die im Körper für die Entgiftung verantwortlich sind, helfen zytotoxische Substanzen

frühzeitig aus der Studie zu eliminieren und unschädliche Verbindungen für weitere Untersuchungen zu bevorzugen. Es zeigte sich, dass die Tau-selektiven Derivate nicht oder nur geringfügig zytotoxisch gegenüber Zebrafischen als Vollorganismen und Leberzellen als *in vitro* Modell sind. Dabei wiesen die PEG-substituierten Derivate eine geringere Toxizität als die alkylierten Cyanine auf.

Um abschließend nun neben den cerebralen Tau-Ablagerungen zusätzlich die nasalen Tau-Proteine nachzuweisen, wurden Gewebeproben von 20 AD-Patienten mit 5 gesunden Spendern verglichen. Dazu wurde eine immunhistologische Färbung des Riechsystems mit spezifischen Antikörpern an Gewebeschnitten durchgeführt. Mithilfe der vier eingesetzten Cyaninderivate konnte das Tau-Protein in der Nase der AD-Patienten nachgewiesen werden, vor allem in der Bowman'schen Drüse (Abb. 2B) und dem Riechepithelium. Dadurch erwiesen sich diese Cyanine als wirksame Fluoreszenzagenzien zur Detektion der Tau-Ablagerungen im Gewebe des Riechsystems. Damit bestätigt sich das Potential für die nichtinvasive Diagnostik von AD über die Veränderungen im Riechepithel im frühen Krankheitsstadium.

Zusammenfassend wurde also eine Serie von nicht oder gering zytotoxischen, Tau-selektiven Trimethincyaninen mit geeigneter Löslichkeit entwickelt. Diese können als sensitive und biokompatible Fluoreszenzfarbstoffe für die Visualisierung von Tau-Aggregaten im Riechsystem eingesetzt werden. Aufgrund der Durchlässigkeit der BHS im Bereich der Nasenschleimhaut und das Auftreten von Tau-Ablagerungen in diesem Bereich könnten durch den Einsatz der Cyanine für die Diagnose frühzeitig AD-Erkrankungen festgestellt werden. Als mögliche Anwendung könnten die Farbstoffe in Form eines Nasensprays verabreicht werden (Abb. 2).[1] Durch eine dadurch mögliche frühzeitig Diagnose könnten die derzeitigen Therapiemöglichkeiten früher zum Greifen kommen. Eine derzeit weitverbreitete, medikamentöse Therapie ist die Verabreichung eines Acetylcholinesterase-Hemmers.[4] Dieser sorgt dafür, dass [Acetylcholin](#) im Gehirn langsamer abgebaut wird. Dadurch wird der Verringerung des Acetylcholin-Spiegels, die durch das Absterben von Nervenzellen verursacht wird, entgegengewirkt und somit die Lebensqualität verbessert.[4] Auch die Wirksamkeit neuer Behandlungsansätze könnte mithilfe des neuen Diagnoseverfahrens leichter getestet werden.

Die Resultate dieser Studie könnten schließlich als Grundlage für eine Vorsorgeuntersuchung in Verbindung mit einer krankheitsverlangsamenden Therapie oder Vorbeugungsmaßnahme dienen. Damit würde Betroffenen wie Annes Vater ein Stück Lebensqualität geschenkt werden.

Take-Home-Messages:

- Die Alzheimersche Erkrankung ist durch den fortschreitenden Verlust von Nervenzellen im Gehirn gekennzeichnet und führt damit zur Demenz.
- Tau-Ablagerungen, sogenannte Tangles, in der Nasenschleimhaut sind mit denen im Gehirn eines Alzheimer-Patienten korrelierbar und eignen sich deshalb als Biomarker.
- Trimethincyanine sind nicht bzw. kaum zytotoxische Fluoreszenzfarbstoffe, die selektiv an Tau-Ablagerungen binden und diese detektierbar machen können.
- Die Färbung der Ablagerungen könnte nichtinvasiv über die Nase erfolgen, möglicherweise über ein Nasenspray und anschließende Detektion der Tangles mit einem Fluoreszenz-Endoskop. Auf diese Weise könnte die Alzheimersche Erkrankung frühzeitig diagnostiziert werden.

Kontakt:



Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt verfasst (s. [Woche 2](#)).

Die Autorinnen, Tanja Mang und Xenia Wagner, sind Studierende des Masterstudiengangs Technische Biologie an der TU Darmstadt

(E-Mail: tanja.mang@web.de und xeniawag@yahoo.de).

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Katja Schmitz (E-Mail: schmitz@biochemie-tud.de).

Schlauer Fuchs

Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:

Welche radiologischen Methoden eignen sich, um Alzheimer-Demenz am lebenden Menschen nachzuweisen?

Literatur:

[1] Schmidt, P. D. B. (2011). "Alzheimer früher erkennen - Ablagerungen in der Nase weisen Jahre vor ersten Symptomen auf Alzheimer-Erkrankung hin." Pressemeldung vom 15.11.2011, TU Darmstadt (http://www.chemie.tu-darmstadt.de/aktuelles_5/archiv_1/aktuellesdetailansicht_8640.de.jsp)

[2] Schmidt, P. D. B. (2010). "Alzheimer Diagnose - Diagnose von Alzheimer-Demenz als Schlüsselschritt zur Bekämpfung der Krankheit." *labor&more* 1 (10): 47-49.

[3] Jakob-Roetne, R. and H. Jacobsen (2009). "Alzheimer's Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches." *Angewandte Chemie International Edition* 48(17): 3030-3059.

[4] <http://www.alzheimer.de>

[5] Gu, J., et al. (2013). "Design, Synthesis and Biological Evaluation of Trimethine Cyanine Dyes as Fluorescent Probes for the Detection of Tau Fibrils in Alzheimer's Disease Brain and Olfactory Epithelium." *ChemMedChem* 8(6): 891-897.

[6] Gu, J. (2013). "Design, synthesis and evaluation of fluorescent probes for the diagnosis of Alzheimer's disease and Parkinson's disease." *Department of Chemistry: Clemens Schöpf-Institute of Organic Chemistry and Biochemistry*, Dissertation, TU Darmstadt.