

## ZUSAMMENFASSUNG



www.inter-uni.net > Forschung

### **Vom Agens zur Krankheit – Vom Makrozyklischen Lakton zur Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathie?**

Autor: *Andreas Becker*

Betreuer: *Jens Türp*

#### **Einleitung**

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) oder Prionerkrankungen sind tödlich verlaufende, mit schwammartiger Degeneration von Nervenzellen einhergehende genetisch bedingte Erkrankungen bei Mensch (z.B. Creutzfeldt-Jakob-Krankheit) und Tier (Traberkrankheit der Schafe bzw. Scrapie und Bovine Spongiforme Enzephalopathie [BSE]). Im Jahre 1982 entdeckte der amerikanische Biochemiker und Mediziner Stanley B. Prusiner den Pathogenitätsmechanismus eines in der Zellmembran vorkommenden Proteins: Sein „Prion“ (Prionprotein Scrapie, PrP<sup>Sc</sup>, Sc für Scrapie) genannter „infektiöser“ Partikel reproduziert sich in einer Art Kettenreaktion aus zellulärem Prionprotein (Prionprotein *cellular*, PrP<sup>c</sup>, c für *cellular* = zellulär) allein durch Konformationswechsel, d.h. Änderung der räumlichen Struktur von einer  $\alpha$ -Helixstruktur in eine  $\beta$ -Faltblattstruktur. Experimentell können durch Injizieren von Prionen ins Gehirn oder durch orale Übertragung von Prionen TSE ausgelöst bzw. angeregt werden, d.h. der „Erreger“ besteht nur aus einem Protein und enthält keine Nukleinsäuren, wie Viren oder Bakterien (Prusiner, 1982).

Diese zunächst umstrittene „*Protein only*“-Hypothese wurde nicht zuletzt durch die Verleihung des Nobelpreises 1997 an Prusiner zur mittlerweile anerkannten wissenschaftlichen Ausgangsbasis für weitere Forschungen. Der Frage, ob der Konformationswechsel auch ohne Anwesenheit von Prionen ausgelöst werden könnte, wurde nicht nachgegangen. Daran änderten auch zwei Außenseitertheorien nichts: Zum einen die des englischen Biolandwirtes Mark Purdey, der als Ursache die seit 1985 zweimal jährlich angeordnete staatliche Dasselliegenbekämpfung bei Rindern mit dem Pestizid Phosmet sieht und darüber hinaus glaubt, dass Kupfermangel bzw. Manganvergiftung den Konformationswechsel zum Prion beschleunigt (Purdey, 1996a, b), zum anderen eine Vererbungshypothese, bei der ein genetischer Defekt oder eine Mutation in dem Gen vorliegt, welches das BSE-disponierende Membranprotein kodiert (Scholz, 2002, Scholz and Lorenzen, 2005).

Anfang des Jahres 2001, als die ersten BSE-Fälle in Deutschland aufkamen, wies ich als praktischer Tierarzt ebenfalls darauf hin, dass BSE nicht von Rind zu Rind übertragbar sei, es sei denn, infektiöses Material werde direkt ins Gehirn injiziert (Becker, 2001b, a, c, 2002). Als Ursache hatte ich ebenso wie Purdey (Purdey, 1996a, b) ein Antiparasitenmittel in Verdacht, aber kein Organophosphat, wie von ihm postuliert, sondern ein Avermectin. Die antiparasitäre Wirkung von Avermectinen beruht auf chloridioneneinstrombedingter Hyperpolarisation über die nur bei Wirbellosen vorkommenden Glutamat-aktivierten Chloridkanäle (Jagannathan et al., 1999, Kane et al., 2000, Wolstenholme and Rogers, 2005). Bei Konzentrationen oberhalb der chemotherapeutisch relevanten findet zusätzlich eine Bindung an GABA(Gamma-Amino-Buttersäure)-abhängigen Rezeptoren statt. An GABA-

vermittelten Chloridkanälen kommt es durch die Avermectine zur Potenzierung der Wirkung der Gamma-Amino-Buttersäure (GABA). GABA spielt eine wichtige Rolle als inhibitorischer Neurotransmitter in peripheren Unterneuronen von Nematoden und in den neuromuskulären Synapsen von Arthropoden, aber auch im Gehirn von Säugern (Pong et al., 1980). GABA ist für die Übermittlung inhibitorischer Signale von den Interneuronen zu den Motoneuronen in Nematoden und von den Motoneuronen zu den Muskelzellen in Arthropoden verantwortlich. Als inhibitorischer Neurotransmitter reguliert GABA den Chlorid-Ionen Einstrom in die Zelle (Campbell et al., 1983). Avermectine stimulieren die präsynaptische Freisetzung von GABA und erhöhen die Affinität der postsynaptischen GABA-Rezeptoren für GABA. Durch diese prä- und postsynaptische Wirkung auf das GABA-System kommt es zu einer längerfristigen Öffnung der Chloridkanäle der Membranen der Nervenzellen und somit zur Blockierung der Erregungsüberleitung (Tranquilli et al., 1987, Sutherland and Campbell, 1990). Da GABA auch im Gehirn von Säugern vorkommt, wird die Bindung an GABA-Rezeptoren auch als Ursache für die toxischen Wirkungen der Avermectine angesehen (Kane et al., 2000).

Da auch die biologische Funktion der Prione damals nicht geklärt war und bis heute nicht geklärt ist, entwickelte ich eine Hypothese, die besagt, dass in der Evolution Prione bei der zielgerichteten Zerstörung einzelner Zellen zur Optimierung eines räumlich begrenzten Gewebes eine entscheidende Rolle spielen. Dabei entstehen Prione allein durch erhöhten Druck auf die Zellmembran infolge Einstroms von Chlorid-Ionen.

Daraus leitet sich dann wie von allein die Forschungsfrage ab: Kann der Konformationswechsel und damit die Bildung von Prionen durch Intoxikation mit hyperpolarisierenden Stoffen ausgelöst werden? Wenn ja, warum ist dieser Zusammenhang nicht längst erkannt worden?

Im Jahr 1982 wurde Ivermectin, ein Avermectingemisch aus der Gruppe der Makrozyklischen Laktone (ML), europaweit eingeführt. ML sind heute die am häufigsten eingesetzten antiparasitären Mittel, obwohl ihre Rückstandsproblematik äußerst bedenklich ist. Bei der Zulassung durch die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) wurde nur auf Rückstände in Muskulatur, Fett, Niere und Leber untersucht. Das Vorliegen eventueller Rückstände im Nervengewebe wurde nicht überprüft, da Nervengewebe nicht als essbares Gewebe betrachtet wurde. Außerdem lag der Schwerpunkt der Untersuchungen von Nebenwirkungen auf der durch Überdosierung verursachten akuten Vergiftung. Die beim einzigen Langzeitversuch (53 Wochen) bei drei von acht Hunden aus der Gruppe mit der höchsten Dosierung aufgetretene fokale Degeneration im Areal der Pons (Stammhirnbrücke) und in Kerngebieten des Kleinhirns wurde nicht weiter verfolgt (Kloss et al., 1994). Dabei ist die Vergiftung von Hunderassen mit MDR1-Defekt (Avermectine können die Blut-Hirn-Schranke auf Grund eines genetischen Defektes passieren) die bekannteste akute Form der Ivermectin-Intoxikation; BSE und atypische Scrapie wären zwei Beispiele für chronisch verlaufende Formen. Ivermectin gelangt aufgrund seiner extremen Fettlöslichkeit in die Nahrungskette. Laut der Bayerischen Risikoanalyse zu BSE aus dem Jahr 2004 erreichen Milchaustauscher die höchste Wertigkeit der gemeinsamen Eigenschaften aller BSE-Betriebe in Deutschland. Nicht die Reduzierung der Prozesstemperatur von 135°C auf 85°C bei der Herstellung von Tiermehl in Großbritannien war entscheidend für das seuchenhafte Auftreten von BSE, sondern der aus Kostengründen durchgeführte Verzicht auf den Restfettentzug mit Hilfe von Lösungsmitteln. Dadurch erhöhte sich die Möglichkeit der Toxinaufnahme über Ivermectin-haltiges Tiermehl in Mischfuttermitteln für die gesamte Rinderpopulation entscheidend. Mit aus Schlachtbetrieben und Tiermehlfabriken stammenden tierischen Fetten gelangte Ivermectin auch in Milchaustauscher.

Die im Jahr 1985 in Großbritannien staatlich angeordnete Dasselfliegenbekämpfung mit organischen Phosphaten (Phosmet) könnte dann über den zusätzlichen oxidativen Stress zu gehäuftem Auftreten von BSE geführt haben. Die kritiklose Übernahme der entwickelten BSE-Tests und ihre fehlerhafte Interpretation – Betrachtung der nachgewiesenen Prione als Erreger und damit „Beweis“ für das Vorliegen von BSE anstatt Bewertung der Prionbildung als Folge einer chronischen Vergiftung mit ML - führten zur BSE-Krise in Europa. Die Potenzierung der Wirkung von Avermectinen durch das im Jahr 1989 zugelassene Benzodiazepin Brotizolam stellt eine zusätzliche Möglichkeit dar für die Entstehung von klinischen BSE-Fällen.

## Methodik

Um zu Überprüfen, ob bereits in wissenschaftlichen Publikationen der Zusammenhang zwischen Ivermectin und BSE (direkter Zusammenhang) bzw. GABA-Rezeptor und BSE (indirekter Zusammenhang) beschrieben wurde, erfolgte eine Suche in den Datenbanken PubMed, Medpilot und PLoSone. Die Recherche fand letztmalig am 6.Juni 2010 statt. Wenn immer möglich wurden die Begriffe als MeSH(*Medical Subject Headings*)-Begriffe gesucht.

Suchstrategie:

1. Schritt: Suchbegriffe >BSE< und >Ivermectin< ,
2. Schritt: Suchbegriffe >BSE< und >GABA-Rezeptor< und
3. Schritt: Suchbegriffe >Prion< und >GABA-Rezeptor<

## Ergebnisse

Das Suchergebnis in Treffern wird in den Tabellen 1, 2 und 3 im Einzelnen dargestellt

Tabelle 1

Datenbank	Treffer	Relevante Treffer	Kumulativ rel. Treffer
Pubmed	0	0	0
Medpilot	0	0	0
PLoS.ONE	1	0	0

*Treffer je Datenbank mit Suchwörter und –Kombination „BSE und Ivermectin“*

Es wurden keine relevanten Treffer gefunden.

Tabelle 2

Datenbank	Treffer	Relevante Treffer	Kumulativ rel. Treffer
Pubmed	1	1	1
Medpilot	5	4	4
PLoS.ONE	1	1	4

*Treffer je Datenbank mit Suchwörter und –Kombination „BSE und GABA-Rezeptor“*

Vier kumulativ relevante Treffer: Eine abgeschwächte GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte schnelle Hemmung bei Fehlen von PrPc (Collinge et al., 1994), keine Beteiligung von PrPc an der GABA- und Glutamat-Rezeptor-vermittelten synaptischen Funktion (Herms et al., 1995), therapeutischer Einsatz von GABA-Agonisten zur Milderung von Krankheitssymptomen (Vamvakides, 1998) und Zerstörung des Neurotransmitter-Systems GABA durch TSE (Ledoux, 2005).

Tabelle 3

Datenbank	Treffer	Relevante Treffer	Kumulativ rel. Treffer
Pubmed	8	4	4

Medpilot	28	8	8
PLoS.ONE	10	1	8

Treffer je Datenbank mit Suchwörter und –Kombination „Prion und GABA-Rezeptor“

Acht kumulativ relevante Treffer: Keine intermolekulare Verbindung zwischen GABA<sub>A</sub> und PrPc (Kannenberget al., 1995), Verlust des GABA-ergen Systems beim Vorliegen von PrPSc (Bouzamondo-Bernstein et al., 2004), Co-Regulation des PrPc-transkribierenden Gens mit GABA<sub>A</sub>-Untereinheiten (Rangel et al., 2009), Beteiligung der GABA<sub>A</sub>-Untereinheit beta1 in Prion-infizierten Neuroblastom-Zellen (Kimura et al., 2010) und die vier Treffer aus dem 2. Suchschritt.

## Diskussion

Das Ergebnis ist eindeutig: Mit der durchgeführten Suchmethode konnte keine wissenschaftliche Veröffentlichung, die einen direkten Zusammenhang zwischen Ivermectin und dem Auftreten von BSE beschreibt, gefunden werden, d.h. BSE könnte von Ivermectin verursacht worden sein bzw. ML müssten als Verursacher von TSE in Betracht gezogen werden.

Der indirekte Zusammenhang über die Ivermectin-Wirkung am GABA-Rezeptor wurde in acht Publikation nicht entdeckt, wohl aber ein Zusammenhang zwischen GABA-Rezeptor und PrPc bzw. PrPSc. Die gefundenen Ergebnisse stellen insgesamt eine indirekte Bestätigung der Intoxikationshypothese dar. Die Veränderung der Suche von >BSE< auf >Prion< im 3. Schritt ergab zusätzlich vier relevante Veröffentlichungen, ein weiteres Indiz für eine erregorientierte Sicht. GABA-Rezeptoren werden in die Untergruppen A, B und C aufgegliedert. In den neueren Veröffentlichungen erscheint deshalb die genauere Bezeichnung GABA<sub>A</sub>.

Die wissenschaftliche Erforschung von TSE mit der Gewichtung auf eine infektiöse Genese, die Nichtbeachtung alternativer Lösungsansätze sowie das vollständige Übersehen eines Neurotoxins in der Nahrungskette haben zu einer völligen Fehleinschätzung der tatsächlichen Situation geführt. Es wird daher vorgeschlagen, die dargestellten Ergebnisse unverzüglich wissenschaftlich zu überprüfen. Dies bietet die Chance, wertvolle Erkenntnisse auch für andere neurodegenerative Erkrankungen zu gewinnen. Zur Klärung genügt vorerst ein einfach durchzuführender chronischer Intoxikationsversuch mit ML an transgenen Mäusen (MDR1<sup>-/-</sup>). Oder wird die Aufdeckung eines Pharma-Skandals befürchtet, der den Contergan-Skandal bei weitem übertreffen könnte?

Im Buch „Prionen und Prionerkrankungen“ setzten die Herausgeber noch vor die Vorworte und das Geleitwort des damaligen Gesundheitsministers Horst Seehofer folgende Weisheit von Henri David Thoreau: „Was hinter uns liegt und was vor uns liegt sind Kleinigkeiten im Vergleich zu dem, was in uns liegt. Wenn wir das, was in uns liegt, nach außen in die Welt tragen, geschehen Wunder“ (Hörnlimann et al., 2001). Nach außen gebracht habe ich die Intoxikationshypothese vor fast zehn Jahren; warten wir weiter, dass ein Wunder geschieht.

## Literatur

Becker, A., 2001a. Apocalypse Cow, Die „Geheime Offenbarung“. CoMed 7, 42-44.

Becker, A., 2001b. BSE-Ein Pharma-GAU? Die schleichende Vergiftung von Rindern und Menschen. raum&zeit 19, 52-57.

Becker, A., 2001c. Festrede auf dem 101.ZÄN-Kongress: Ganzheitliche BSE-Bewältigung bringt Paradigmenwechsel in der Medizin. Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren 42, 770-773.

Becker, A., 2002. Entsteht BSE durch Arzneimittel-Wechselwirkungen? raum&zeit 20, 99-102.

- Bouzamondo-Bernstein, E., Hopkins, S.D., Spilman, P., Uyehara-Lock, J., Deering, C., Safar, J., Prusiner, S.B., Ralston, H.J., DeArmond, S.J., 2004. The neurodegeneration sequence in prion diseases: evidence from functional, morphological and ultrastructural studies of the GABAergic system. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 882-899.
- Campbell, W.C., Fisher, M.H., Stapley, E.O., Albers-Schonberg, G., Jacob, T.A., 1983. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* 221, 823-828.
- Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R., Jefferys, J.G., 1994. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370, 295-297.
- Herms, J.W., Kretzschmar, H.A., Titz, S., Keller, B.U., 1995. Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar purkinje cells of prion protein knockout mice. *Eur J Neurosci* 7, 2508-2512.
- Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H., 2001. Prionen und Prionkrankheiten. Walter de Gruyter, Berlin
- Jagannathan, S., Laughton, D.L., Critten, C.L., Skinner, T.M., Horoszok, L., Wolstenholme, A.J., 1999. Ligand-gated chloride channel subunits encoded by the *Haemonchus contortus* and *Ascaris suum* orthologues of the *Caenorhabditis elegans* *gbr-2* (*avr-14*) gene. *Mol Biochem Parasitol* 103, 129-140.
- Kane, N.S., Hirschberg, B., Qian, S., Hunt, D., Thomas, B., Brochu, R., Ludmerer, S.W., Zheng, Y., Smith, M., Arena, J.P., Cohen, C.J., Schmatz, D., Warmke, J., Cully, D.F., 2000. Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13949-13954.
- Kannenbergh, K., Groschup, M.H., Sigel, E., 1995. Cellular prion protein and GABA<sub>A</sub> receptors: no physical association? *Neuroreport* 7, 77-80.
- Kimura, T., Ishikawa, K., Sakasegawa, Y., Teruya, K., Sata, T., Schatzl, H., Doh-ura, K., 2010. GABA<sub>A</sub> receptor subunit beta1 is involved in the formation of protease-resistant prion protein in prion-infected neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 584, 1193-1198.
- Kloss, M.W., Bagdon, W.J., Gordon, L.R., 1994. L-653,648: Fifty-three-week oral toxicity study in dogs. In: Merck Research Laboratories, West Point, Pennsylvania, USA, City.
- Ledoux, J.M., 2005. Effects on the serotonergic system in sub-acute transmissible spongiform encephalopathies: current data, hypotheses, suggestions for experimentation. *Med Hypotheses* 64, 910-918.
- Pong, S.S., Wang, C.C., Fritz, L.C., 1980. Studies on the mechanism of action of avermectin B1a: stimulation of release of gamma-aminobutyric acid from brain synaptosomes. *J Neurochem* 34, 351-358.
- Prusiner, S.B., 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.
- Purdey, M., 1996a. The UK epidemic of BSE: slow virus or chronic pesticide-initiated modification of the prion protein? Part 1: Mechanisms for a chemically induced pathogenesis/transmissibility. *Med Hypotheses* 46, 429-443.
- Purdey, M., 1996b. The UK epidemic of BSE: slow virus or chronic pesticide-initiated modification of the prion protein? Part 2: An epidemiological perspective. *Med Hypotheses* 46, 445-454.
- Rangel, A., Madroñal, N., Massó, A.G.i., Gavín, R., Llorens, F., Sumoy, L., Torres, J.M., Delgado-García, J.M., Río, J.A.D., 2009. Regulation of GABA<sub>A</sub> and Glutamate Receptor Expression, Synaptic

Facilitation and Long-Term Potentiation in the Hippocampus of Prion Mutant Mice. PLoS ONE 4, e7592.

Scholz, R., 2002. 25 Thesen gegen die Behauptung, BSE und vCJK seien oral übertragbare Infektionskrankheiten und BSE gefährde die menschliche Gesundheit. Dtsch Med Wochenschr 127, 341-343.

Scholz, R., Lorenzen, S., 2005. Phantom BSE-Gefahr. Berenkamp.

Sutherland, I.H., Campbell, W.C., 1990. Development, pharmacokinetics and mode of action of ivermectin. Acta Leiden 59, 161-168.

Tranquilli, W.J., Paul, A.J., Seward, R.L., Todd, K.S., Dipietro, J.A., 1987. Response to physostigmine administration in collie dogs exhibiting ivermectin toxicosis. J Vet Pharmacol Ther 10, 96-100.

Vamvakides, A., 1998. Encephalopathies spongiformes: une deuxième chance pour les agonistes GABAergiques? Ann Pharm Fr 56, 26-30.

Wolstenholme, A.J., Rogers, A.T., 2005. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. Parasitology 131 Suppl, S85-95.