

Muismodellen tonen effectiviteit aan van toekomstige behandelmethoden

Downsyndroom als stofwisselingsziekte (2)

Muismodellen van Downsyndroom⁽²⁾

Het is hier al vaak beschreven⁽³⁾: de eigenschappen die behoren bij Downsyndroom zijn een gevolg van 'over-expressie', het doorwerken van de betreffende genen op het extra chromosoom 21. Zoals bekend komt bij Downsyndroom in veruit de meeste gevallen het hele chromosoom 21 in drievoud voor. Drie genen in plaats van de normale twee betekent in principe een overmaat van 50 procent in de productie van de stoffen, bijvoorbeeld eiwitten, waarvoor die genen coderen. Nu is die overmaat ook afhankelijk van factoren als bijvoorbeeld de beschikbaarheid van voor die productie benodigde 'grondstoffen'. Maar in de praktijk is de overmaat in ieder geval voor een aantal eiwitten duidelijk aangetoond. De syndroom-specifieke afwijkingen van de lichaamsstructuren en -functies kunnen daarbij in de eerste plaats een gevolg zijn van onjuiste onderlinge signalen van de zich ontwikkelende cellen, die vervolgens steeds weer overgedragen worden op de afstammelingen van de cellen die daar als eerste mee te maken kregen. Kort: het ontstaan van de weefsels. In de tweede plaats is er de als gevolg van de trisomie toegenomen rol van de op chromosoom 21 aanwezige genen in de stofwisseling van de cellen en de weefsels van zich ontwikkelende en volwassen mensen. Kort: de werking van die weefsels.

Het centrale zenuwstelsel begint zich al heel vroeg in het ontstaan van het embryo te ontwikkelen. Ook in de jaren kort na de geboorte vinden daarbinnen nog

In 2006 en 2007 werden drie nieuwe en onderling nogal verschillende methodes gepubliceerd ter vermijding of vermindering van de effecten van Downsyndroom op de hersenen en de cognitie. We presenteren hier de onderzoeksresultaten hiervan in een zo leesbaar mogelijke vorm.⁽¹⁾ Zoals in dit blad bij herhaling is gesteld, komt de dag steeds dichterbij dat in ieder geval het cognitieve functioneren van mensen met Downsyndroom met meer of minder succes zal kunnen worden behandeld. • Erik de Graaf

allerlei structurele en functionele veranderingen plaats. In zekere zin gebeurt dat zelfs het hele leven lang. Dat maakt dat met name de hersenen uiterst gevoelig zijn voor verstoringen door minieme veranderingen in gen-expressie. Zo kunnen die resulteren in een aanzienlijke verstoring van het functioneren op het niveau van de afzonderlijke neuronen! Als gevolg daarvan kunnen ook de complexe netwerken die betrokken zijn bij de cognitieve functies worden beïnvloed.

Momenteel kunnen dergelijke processen alleen goed worden bestudeerd met behulp van diermodellen. Daarbij worden al jaren vrijwel uitsluitend speciaal ontwikkelde muizen gebruikt: muizen met een kunstmatige trisomie van - in hun geval - chromosoom 16. Ze worden meestal aangeduid met de categoriserende naam Ts65Dn. Intussen is wetenschappelijk bewezen dat ontwikkelingsprocessen bij mensen onder invloed van trisomie 21 via dergelijke muismodellen kunnen en mogen worden bestudeerd. Argumenten daarvoor zijn o. a.:

- De direct met elkaar vergelijkbare afwijkingen in bouw van de hersenschedel.
- Een patroon van celverlies tijdens de ontwikkeling dat op grond van (microscopische) beoordeling van weefselmonsters

van de kleine hersenen (het 'cerebellum') van zulke muizen werd voorspeld en dat vervolgens ook kon worden aangetoond bij mensen met Downsyndroom.

- De leeftijdsafhankelijke uitval van cholinerge neuronen in de voorhoofdkwabben van Ts65Dn-muizen, maar ook van mensen met Downsyndroom en mensen met de ziekte van Alzheimer.

- Tekorten in het terugtransport van zenuwgroefactor ('neural growth factor'; kort: NGF) die verantwoordelijk zijn voor dit verlies bij muizen en die een therapeutische mogelijkheid voor dit probleem suggereren bij mensen.

- De in muismodellen gevonden verstoorde synaptische functie die wijst op specifieke neuronale afwijkingen bij Downsyndroom.

Modellen van muizen met trisomie leveren ook een goede voorstelling van belangrijke aspecten van het verminderde cognitieve functioneren van mensen met Downsyndroom. Aangetoond is dat bepaalde functies van de hippocampus het sterkst beïnvloed zijn bij Downsyndroom. Bij onderzoek van het functioneren van de hippocampus bij de bedoelde muizen kon ook daar een groot leer- en geheugenprobleem worden aangetoond. Zo zijn muizen met trisomie een essentiële hulp

geworden bij het onderzoek naar de basale mechanismen van gen-dosiseffecten bij Downsyndroom.⁽²⁾

De drie onderzoeken die hierna worden besproken, zijn gebaseerd op muismodelen. Elk daarvan leidt tot een mogelijke therapeutische wijze van aanpak.

De bijdrage van 'kritieke gebieden' op het menselijke chromosoom 21 aan het fenotype van Downsyndroom

Eerst moet hier nog duidelijk onderscheid worden gemaakt tussen enerzijds de erfelijke eigenschappen van een organisme, het *genotype*, en anderzijds het totaal van alle waarneembare eigenschappen of kenmerken van datzelfde organisme, het *fenotype*. Al vele jaren wordt geprobeerd om bepaalde gebieden op het menselijk chromosoom 21 te identificeren die genen bevatten welke met name bijdragen aan specifieke aspecten van het fenotype van Downsyndroom. Daarbij heeft men zich vooral gebaseerd op mensen met translocaties, incomplete chromosomen nr. 21 die 'vastgeplakt' zitten aan andere chromosomen. Het gevolg daarvan is dan een trisomie van slechts een gedeelte van alle genen van een volledig chromosoom 21. Zo konden hele fenotype-'kaarten' worden ontwikkeld, en een afwijkend aantal genen in bepaalde gebieden in verband worden gebracht met specifieke eigenschappen van mensen met Downsyndroom. Uiteindelijk meende men een heel segment van chromosoom 21 te kunnen aanwijzen met genen die specifieke 'ontwikkelingsbanen' verstoren en die nodig en voldoende waren om Downsyndroom te veroorzaken, aangeduid als Down Syndrome Critical Region (DSCR). Dat was althans de gangbare gedachte. De afbakening en de interpretatie van dergelijke 'kritieke gebieden' worden echter ernstig beperkt door verschillende factoren. In de eerste plaats bestaat er geen pool van mensen met een trisomie voor alleen maar die 'kritieke gebieden', terwijl de beoordeling van al die verschillende menselijke fenotypen nader onderzoek van heel veel personen vergt. Om hier direct op in te kunnen springen is er zelfs een soort 'chromosomale technologie' gebruikt om van muizen met de aanduiding Mmu16 een muis te kunnen maken met een in tweevoud voorkomen of juist een ontbreken van dat zogenaamde 'kritieke gebied'. Daarbij stelden de onderzoekers zich de vraag of de op dat kritieke gebied aanwezige 33 genen inderdaad wel noodzakelijk en voldoende waren om de kenmerken van Downsyndroom te laten ontstaan. Voor verschillende kenmerken die behoren bij die genen zijn pendanten beschreven in Ts65D-muizen, zoals:

- een geringe lichaamslengte,
- afwijkingen van de gezichtsschedel die resulteren in vlakke gezichten met een

kort achterhoofd en een uitstekende tong (als gevolg van een kleine onderkaak),

- - met het nodige voorbehoud - 'een verstandelijke belemmering, zoals bij Downsyndroom' en met name dan een verstoorde functie van de hippocampus. (Laboratorium)muizen van het type Ts1Rhr, die een trisomie hebben van uitsluitend de genen uit het 'kritieke gebied', vertoonden echter geen enkele van de kenmerken van de gezichtsschedel die juist toegeschreven worden aan genen op dat kritieke gebied. Vervolgens werden Ts65Dn-muizen gekruist met Ms1Rhr-muizen, met als resultaat een normaal tweetal genen van het kritieke gebied bij muizen die verder wel drie exemplaren hadden van alle anderen genen waarvoor de Ts65Dn trisomie vertoont. Het resultaat is muizen met de aanduiding Ms1Rhr/Ts65Dn. Die vertonen schedelkenmerken die juist wél overeenkomen met die van de Ts65Dn muizen. Daaruit volgt dat trisomie van het kritieke gebied niet voldoende is en grotendeels zelfs niet noodzakelijk om te resulteren in deze kenmerken van trisomie.

Het beeld wordt nog complexer wanneer we kijken naar de vraag waarom mensen met Downsyndroom een verstandelijke belemmering hebben. Ontwrichting van de werking van de hippocampus bij Downsyndroom kan in modelvorm worden onderzocht via de prestaties van Ts65Dn-muizen in de Morris Water Maze test (MWM). Daarbij wordt aan muizen in een bak met ondoorzichtig water geleerd zich te oriënteren op basis van herkenningspunten in de ruimte rondom die bak. Ze moeten dan ontdekken waar onder water zich een soort platform bevindt. Muizen kunnen weliswaar goed zwemmen, maar doen dat niet graag. Daarom zullen ze meteen een ontsnappingsmogelijkheid zoeken. Zodra ze het platform ontdekken zullen ze daar op klimmen. Dit is een visueel-ruimtelijke herkenningstaak, afhankelijk van de werking van de hippocampus. Ts65Dn-muizen (met dus een zo compleet mogelijke trisomie) doen het veel minder goed in een MWM-test dan Ts1Rhr-muizen, die slechts drie exemplaren hebben van de genen op het kritieke gebied. Die presteerden even goed als muizen met een normaal aantal chromosomen. Daaruit volgt dat trisomie van het kritieke gebied op zich niet leidt tot een verstoring van de functie van de hippocampus, zoals te zien bij Ts65Dn-muizen en bij Downsyndroom, wat eerder wel werd verondersteld. De Ms1Rhr/Ts65Dn-muizen, met de normale twee genen van het kritieke gebied en verder wel drie exemplaren van alle anderen genen waarvoor de Ts65Dn-muis trisomie vertoont, gedroegen zich als normale muizen! Dat toont aan dat een gen (of genen) van dit segment weliswaar *noodzakelijk* is (zijn) om deze specifieke tekortkoming van de hippocampus

te veroorzaken, maar dat dat alleen maar gebeurt in combinatie met andere genen van muizen met trisomie 16 (en mensen met trisomie 21).

Onderzoek 1. GABA_A-antagonisten en het herstel van leren en geheugen op de lange termijn

De hiervoor besproken experimenten beschrijven functionele testen op het niveau van het organisme waarmee de effecten van trisomie zijn waar te nemen. De minder goede prestaties van Ts65Dn-muizen in de MWM-test gaan gepaard met een verandering in de manier waarop neuronen met elkaar communiceren via de contactpunten ertussen, de 'synapsen'. Dergelijke veranderingen in synaptische plasticiteit kunnen worden gemeten met elektrofysiologische testen, zoals veranderingen in langetermijnpotentiatie (LTP) en langetermijndepessie (LTD), begrippen uit de neurofysiologie. LTP staat voor een langdurige verhoging van de doeltreffendheid van een synaps. LTD staat voor de vermindering van de effectiviteit van een synaps die uren of zelfs dagen kan duren. LTP en LTD zijn het gevolg van hetzij sterke of juist zwakke stimulatie. Bij Ts65Dn-muizen blijken op dit punt duidelijke effecten te meten: afremmende effecten komen wat vaker voor en zijn actiever in vergelijking met gewone muizen. De daarvoor verantwoordelijke neuronen worden gekarakteriseerd door het gebruik van de neurotransmitter GABA (voluit: gamma-aminoboterzuur). De toediening van GABA_A-receptorantagonist tijdens in vitro onderzoeken resulteerde in een toename van het optreden van LTP in preparaten van bepaalde delen van hersenen van Ts65Dn muizen.

Die waarneming bracht de tweede auteur van het hier bewerkte artikel, dr. Craig Garner, ertoe de mogelijkheid te onderzoeken of de toediening van niet-competitieve GABA_A-receptorantagonisten een positief effect zou hebben bij muizen. Zo werden drie antagonisten van GABA onderzocht, allemaal stoffen die het effect van deze neurotransmitter tegenwerken door de receptor ervan te blokkeren. De eerste stof, picrotoxine (PTX) wordt veel gebruikt in experimentele situaties om toevallen op te wekken. (Alle drie hier te behandelen stoffen kunnen toevallen uitlokken, zoals verderop besproken wordt.) PTX heeft maar een heel kleine marge tussen de hoeveelheid die nodig is om een positief effect op te wekken in LTP-experimenten en de hoeveelheid die nodig is om toevallen uit te lokken. Daarom is het geen geschikt kandidaat-geneesmiddel. De effecten ervan en de manier waarop het werkt zijn echter goed onderzocht en daarom kunnen de resultaten hier in verband worden gebracht met een schat aan aanvullende bevindingen. De tweede stof is bilobalide (BB), te winnen uit de Ginkgo Biloba-boom. Voor deze stof is een

reeks aan effecten, waarvan sommige elkaar tegenwerken, beschreven. De meest opmerkelijke is die van niet-competitieve antagonist van GABA_A-receptoren. De derde stof is pentyletetratozol (PTZ), ook zo'n niet-competitieve GABA_A-receptorantagonist.

PTZ is jarenlang toegediend aan patiënten bij wijze van stimulus voor bloedsomloop en ademhaling. In hogere doses is het ook gebruikt ter behandeling van psychiatrische problemen, zoals schizofrenie, maar die veroorzaakten epileptische aanvallen. In lage doses, die nog geen epilepsie uitlokten, is het middel toegepast om de cognitie te verbeteren van dementerende geriatrische patiënten. Omdat het middel niet effectief bleek voor de behandeling van beide problemen en daarbij ook potentieel schadelijk is in hoge doses, trok de Amerikaanse FDA de toestemming voor het gebruik van PTZ in 1982 in. Feit blijft dat heel veel mensen jaren achtereenvolgend behandeld zijn met dit middel, waarbij de lage doses ook weinig bijverschijnselen te zien gaven. Tegen deze achtergrond lijkt PTZ de meest belovende van de drie hier genoemde stoffen om het gebruik ervan als medicijn, maar dan bij Downsyndroom, te (her)overwegen.

Om de mogelijkheden van deze stoffen na te gaan, grepen de onderzoekers terug op de Ts65Dn-muis omdat de verstoringen in de werking van de hippocampus daarbij lijken op die van mensen met Downsyndroom. Ze gebruikten twee stressvrije testen voor het functioneren van de hippocampus. De eerste heet 'herkenning van voorwerpen'. Daarbij wordt de muis een kwartier in een kooi gezet samen met twee voorwerpen. Het dier zal pakweg de helft van die tijd besteden aan het nader onderzoeken van elk van die voorwerpen. De volgende dag wordt dezelfde muis weer in de kooi gezet met één van de twee zelfde voorwerpen, plus een ander voorwerp. Normale muizen herinneren zich dan het bekende voorwerp en spenderen de meeste tijd aan het onderzoeken van het nieuwe. Muizen met trisomie daarentegen geven er op geen enkele manier blijk van dat ze het eerste voorwerp herkennen. De tweede test is een 'T-splitsingstest', waarbij een langwerpige platform met twee armen wordt gebruikt. Tijdens herhaalde onderzoeken komt een muis met een normaal werkende hippocampus binnen op de 'T', herinnert zich de arm die hij de vorige keer al heeft onderzocht en gaat vervolgens naar de andere arm. Maar Ts65Dn-muizen met een minder goed werkende hippocampus onderzoeken de armen volkomen willekeurig. Dat wijst erop dat ze zich de voorafgaande proef niet herinneren.

Bij de eerste serie proeven vertoonden Ts65Dn-muizen die BB of PTX toegediend hadden gekregen, in doses ver beneden die waarbij toevallen worden opgewekt, duidelijke verbetering in vergelijking met

controle-muizen met trisomie die slechts een zoutoplossing hadden gekregen. Sterker nog: ze presteerden net zo goed als de andere muizen uit dezelfde worp met het normale aantal chromosomen, bij zowel de herkennings- als de T-splitsingstest. Verder presteerden de dieren net zo goed als muizen die net hun medicijnbehandeling achter de rug hadden, wanneer ze in plaats daarvan gedurende twee weken geïnjecteerd waren met PTX en gedurende de volgende twee met een zoutoplossing. Op basis van die resultaten werd een hele reeks van blootstellingen aan PTZ ontworpen. Dit medicijn kan ook via de mond worden toegediend en zo werd aan gewone muizen zowel als muizen met trisomie geleerd om gedurende drie weken chocolademelk te drinken met of zonder het medicijn. Twee à drie maanden nadat de dieren gestopt waren met het innemen van het medicijn werden ze onderzocht met behulp van de herkenningstest. Daarbij presteerden muizen die daarvoor PTZ hadden gehad even goed als dieren met een normaal aantal chromosomen. Dit langetermijneffect bleek daarna ook uit een gevoelig elektrofysiologisch onderzoek van LTP in bepaalde delen van de hersenen als maat voor synaptische plasticiteit, die normaal ontbreekt bij Ts65Dn-muizen. Muizen met trisomie die PTZ hadden gehad, vertoonden een significant verbeterde LTP in vergelijking met Ts65Dn-muizen die slechts een zoutoplossing hadden gehad.

Voordat er nu ook klinische onderzoeken bij mensen kunnen worden uitgevoerd moet echter nog wel een aantal belangrijke vragen worden beantwoord. In de eerste plaats is er het verschijnsel dat bekend staat als 'kindling', het uitlokken van sterke epileptische toevallen door geringe, maar wel herhaalde elektrische of chemische stimulatie van de hersenen. De toediening van middelmatig gedoseerde stoffen, zoals de drie hiervoor genoemde, zou dieren dus gevoeliger kunnen maken voor toevallen. Verder is het de vraag of de hier gebruikte lagere doses - die geen toevallen opwekten bij muizen met het normale aantal chromosomen - niet toch de kans daarop vergroten wanneer die dieren trisomie hebben. Een vraag die daarmee verband houdt is of er een soort van genetische predispositie voor toevallen bestaat die het gebruik van deze middelen bij bepaalde mensen gevaarlijker maakt dan bij andere - en of jonge kinderen gevoeliger voor de stoffen zijn dan (jong)volwassenen. Een tweede belangrijke doelstelling is het uitzoeken volgens welke mechanismen een kortdurende behandeling met een niet-competitieve GABA_A-receptorantagonist kan leiden tot een verbetering van het functioneren op de lange termijn. Dat is niet alleen van belang voor een beschouwing van de veiligheid van deze middelen nu, maar ook om in later veiligere en effectievere

behandelmethodieken te kunnen ontwikkelen. Maar zelfs met deze bedenkingen levert dit onderzoek een buitengewoon interessante doorbraak op waarop allerlei nieuw onderzoek gebaseerd kan worden.

De conclusie van het eerste onderzoek

De verminderde prestaties van de hippocampus in muismodellen met Downsyndroom zijn in verband gebracht met een onbalans in de fijnregeling van de activerende en afremmende verbindingen tussen neuronen. Op dit moment is niet bekend welke etiologie daaraan ten grondslag ligt. Het toedienen van lage, niet-epileptische doses van niet-competitieve GABA_A-antagonisten blijkt in staat om het normale cognitief functioneren van Ts65Dn-muizen te herstellen. Die bevinding suggereert een nieuwe, belangwekkende mogelijkheid voor de behandeling van met name het cognitief minder goed functioneren van mensen met Downsyndroom. Voor het zover is moeten echter nog wel enkele vragen worden beantwoord. Of PTZ nu wel of niet het middel zal gaan worden is nog niet duidelijk. Maar intussen geven deze onderzoeken wel aan dat medicijnen die gericht zijn op GABA-banen die vermoedelijk afremmende stimuli in de hippocampus met trisomie verlagen, een grote belofte inhouden voor de verbetering van de cognitie bij Downsyndroom.

Onderzoek 2. Degeneratie van cholinerge neuronen in de basale voorhoofdskwabben

De tweede belangrijke doorbraak van het afgelopen jaar werd bereikt door de groep van dr. William Mobley op Stanford University. Over de aanzet daartoe berichtten we al in nummer 75 van dit blad in 'Weer een stukje van de puzzel ontrafeld'. Hier volgt een kort overzicht om een vergelijking te kunnen maken met beide andere onderzoeken. Mobley's groep maakte intensief gebruik van muismodellen om te zien hoe trisomie veranderingen veroorzaakt in structuur en werking van neuronale synapsen, met inbegrip van een aantal sleutelwaarnemingen met betrekking tot afremmende stimuli in de hippocampus, zoals hiervoor al aan de orde is geweest. De groep maakte ook studie van een specifieke populatie neuronen die de communicatie verzorgt tussen de basale voorhoofdskwabben en de hippocampus. Deze cholinerge neuronen ('basal forebrain cholinergic neurons'; kort: BFCN) gebruiken acetylcholine als neurotransmitter (vandaar hun naam) en er is van aangetoond dat ze degenereren bij de ziekte van Alzheimer, bij Downsyndroom en bij Ts65Dn-muizen. (In feite levert dit onderzoek bewijs voor de opvatting dat het daarbij niet zozeer gaat om degeneratie, maar veel meer om een soort 'stilvallen'. Ze schakelen de marker uit met behulp waarvan ze gewoonlijk

worden geïdentificeerd.) Men veronderstelt dat stilvallen van deze cholinerge neuronen in de basale voorhoofdskwabben bijdraagt aan de leeftijdgerelateerde achteruitgang van de cognitie die we bij veel mensen met Downsyndroom zien.

Net als veel andere neuronen hebben deze cholinerge neuronen specifieke signalen nodig om actief en in leven te blijven. Een paar jaar geleden gebruikte Mobley muizen met trisomie van het type Ts65Dn om te laten zien dat neuronen niet goed een belangrijk signaal, zenuwgroeifactor (NGF), overdragen van de zenuwuiteinden in de hippocampus terug naar het cellichaam van het neuron. Het was al bekend dat dit terugtransport een signaal is om cholinerge neuronen in de basale voorhoofdskwabben te onderhouden. Daarom is uitblijven van dit transport bij neuronen met trisomie waarschijnlijk een oorzaak van hun afsterven.

Op dit punt speelde de incomplete maar wel krachtige verzameling van muismodellen voor Downsyndroom en ook voor de ziekte van Alzheimer een prominente rol. Muizen met de aanduiding Ts1Cje vertonen trisomie voor zo'n 80 procent van de genen die in drievoud voorkomen bij Ts65Dn-muizen. Toen Mobley's groep een vergelijking maakte met betrekking tot de neuropathologie van cholinerge neuronen in de basale voorhoofdskwabben bij muizen met het normale aantal chromosomen alsmede met Ts65Dn- en Ts1Cje-muizen, vond men dat het terugtransport van zenuwgroeifactor bij Ts1Cje-muizen veel dichterbij de buurt kwam van dat van normale muizen. Zo lag het voor de hand om de aandacht te richten op de genen die in drievoud voorkomen bij Ts65Dn-, maar in de normale tweevoud bij Ts1Cje-muizen. Van een aantal daarvan is de functie in het centrale zenuwstelsel bekend, zoals met name van *Gabpa*, *Grik1*, *App*, en *Sod1*. *App* speelt een hoofdrol bij ziekte van Alzheimer, omdat een splijtingsproduct van het *App*-eiwit een hoofdcomponent is van de neuritische plaques die de histopathologie van deze ziekte karakteriseren. Bovendien bestaan er verbanden tussen mutaties in *App* en erfelijke vormen van ziekte van Alzheimer die al heel vroeg beginnen.

Om vast te kunnen stellen of de dosis (drie exemplaren tegenover twee) van *App* bijdraagt aan het tekort aan terugtransport van zenuwgroeifactor bij Ts65Dn-muizen, werd een genetische kruising gemaakt tussen Ts65Dn met drie exemplaren van *App* (aangeduid met Ts65Dn:App+/+/+) en muizen met één exemplaar van *App* (Ts65Dn:App+/-). Vervolgens werden hun nakomelingen onderzocht. De aanzienlijke vermindering in het transport van Ts65Dn-muizen was al aanzienlijk verbeterd in de muizen met trisomie en twee in plaats van drie exemplaren van *App* (Ts65Dn:App+/+/+). Bovendien bleken muizen met overal

het normale aantal genen maar met wel een extra exemplaar van het *App*-gen wel aangedaan. Vastgesteld kon worden dat een afbraakproduct van *App* van het eiwituiteinde met de COOH-groep verantwoordelijk was voor het tekort in het terugtransport, mogelijk door interactie op het niveau van de vroege endosomen (organellen die kunnen worden gezien als de 'maag' van de cel) die de zenuwgroeifactor vervoeren.

De conclusie van het tweede onderzoek In zekere mate zou herstel van het transport van zenuwgroeifactor en het overleven van de cholinerge neuronen in de basale voorhoofdskwabben de leeftijdgerelateerde cognitieve achteruitgang, zoals die vaak gezien wordt bij Downsyndroom, ongedaan kunnen maken. Maar waarschijnlijk zal de farmaceutische industrie geen grote investeringen willen doen ten behoeve van Downsyndroom alleen, omdat het aantal mensen dat het heeft te klein is om eraan te kunnen verdienen. Tegen die achtergrond is het verband met *App*-fragmenten, met een pathologie die gedeeld wordt door Downsyndroom en ziekte van Alzheimer, een gelukkige omstandigheid. Er wordt immers al veel werk gedaan met betrekking tot *App* als mogelijkheid voor interventie bij ziekte van Alzheimer. De aanwijzingen uit dit onderzoek ter zake van de interferentie van *App* met het terugtransport via vroege endosomen suggereert dat het omlaagbrengen van de *App*-spiegels een positief effect zou kunnen hebben op de degeneratie van cholinerge neuronen in de basale voorhoofdskwabben, met gunstige gevolgen voor Downsyndroom zowel als de ziekte van Alzheimer.

Onderzoek 3. Het terugdraaien van een tekort aan respons op een groeifactor die van invloed is op de ontwikkeling van de hersenen

Het derde baanbrekende onderzoek is afkomstig uit het laboratorium van de eerste auteur van het hier bewerkte artikel, dr. Reeves. Het is waarschijnlijk verder verwijderd van potentiële klinische toepassingen dan de andere twee, maar het zou daarentegen wel een verder reikend effect kunnen hebben met betrekking tot het brede scala aan kenmerken waardoor Downsyndroom wordt gekarakteriseerd. Dit onderzoek laat bovendien zien hoe een heel specifiek aspect van het fenotype bij gebruik van een potentieel middel kan worden teruggedraaid. Met behulp van fundamenteel onderzoek naar de ontwikkeling van de hersenen van individuen met trisomie is er een tekort waargenomen in de respons op een groeifactor die van invloed is op verschillende weefsels in verschillende stadia van de ontwikkeling. Vervolgens is aangetoond dat de toediening van een experimentele stof een bepaald aspect van het ontwikkelingsproces

in het cerebellum (kleine hersenen) weer kon normaliseren. Ook deze bevindingen zijn gebaseerd op genetische muismodellen van Downsyndroom.

De experimenten begonnen een paar jaar geleden met pogingen om de ontwikkeling van de hersenen bij Ts65Dn-muizen te vergelijken met die bij mensen met Downsyndroom. Het cerebellum is bij Downsyndroom significant kleiner, zelfs in relatie tot de als geheel al kleinere hersenen. In tegenstelling tot sommige kenmerken van Downsyndroom die bij bepaalde mensen juist wel of juist niet voorkomen, lijkt zo'n kleiner cerebellum zich bij iedereen met Downsyndroom voor te doen. Daarom werden bij muizen met een vergelijkbare genetische constitutie overeenkomstige effecten op de ontwikkeling van het cerebellum verwacht.

Alhoewel de totale omvang van de hersenen van muizen met trisomie identiek is aan die van muizen met het normale aantal chromosomen, was al eerder aangetoond dat het cerebellum bij de eersten onevenredig veel kleiner was. (Het feit dat de hersenen van Ts65Dn-muizen als geheel niet kleiner waren kwam niet echt als een verrassing omdat veel van dat 'kleiner zijn' bij Downsyndroom met name zit in de hersenschors. Bij mensen maakt die een veel groter deel van de hersenen uit dan bij andere zoogdieren.) Uitgaande van het kleinere Ts65Dn-cerebellum werd met behulp van histologische onderzoeken vastgesteld waar die reductie hem dan in zat. De schors van het cerebellum bestaat van buiten naar binnen uit drie lagen: eerste de moleculaire laag, die maar weinig cellen bevat, dan de laag met 'Purkinje-cellen' en tenslotte een laag met 'korrelcellen'. Het bleek dat zowel de korrelaag als de moleculaire laag aangetast waren. Tegen de verwachting in bleek verder dat niet alleen het volume dat werd ingenomen door korrel- en Purkinje-cellen kleiner was, maar dat zich ook een vermindering van de celdichtheid van beide typen neuronen voordeed. Als gevolg daarvan nam het totale aantal neuronen in het cerebellum verder af. Dat verschijnsel was nooit eerder gerapporteerd bij Downsyndroom. Onder gebruikmaking van naar leeftijd gematchte hersenpreparaten van mensen met respectievelijk twee en drie exemplaren van chromosoom 21 kon daarna dezelfde reductie in korrelcellen worden aangetoond voor Downsyndroom.

Het aan de hand van een muismodel correct voorspellen van een nieuw verschijnsel bij de mens is natuurlijk een sterke aanwijzing voor de overeenkomst tussen de ontwikkelingsprocessen bij beide soorten. Vervolgens vroegen de onderzoekers zich af op welk punt van de ontwikkeling het patroon bij normale muizen en bij muizen met trisomie uit elkaar begon te lopen. Op basis van histologisch onderzoek werd vastgesteld dat

iedere grootheid die één week na de geboorte kon worden gemeten, lagere waarden liet zien bij Ts65Dn-muizen. Maar de verschillen waren nog niet duidelijk meteen na de geboorte. Verder onderzoek richtte zich op de cellen waaruit de korrelcel-neuronen zich ontwikkelen: de korrelcel-precursors ('granule cell precursors'; kort: GCP). Terwijl de aantallen daarvan bij Ts65Dn-muizen en bij normale muizen uit dezelfde worpen identiek waren, bleek op basis van nauwkeurig statisch gevalideerde cerebellum-preparaten dat het aantal korrelcel-precursors dat zich daadwerkelijk ging delen bij muizen met trisomie significant kleiner te zijn.

Alles bij elkaar legden deze bevindingen een specifiek effect van trisomie op hersenontwikkeling bloot en gaven zo bovendien het tijdstip in de ontwikkeling (vanaf de geboorte), het type cel waar het om ging (korrelcel-precursors dus), en het verstoorde proces (de celdeling daarvan) aan. De ontwikkeling van de hersenen vereist een goede coördinatie van de betrokken delende cellen. Daartoe gebruikt het lichaam meerdere genen die via de eiwitten waarvoor zij coderen de uitgroei en differentiatie van de cellen reguleren. Eén zo'n eiwit dat een belangrijke rol speelt bij de vorming van een groot aantal structuren in het lichaam wordt 'sonic hedgehog' (SHH) genoemd. Het is een lid van de eiwitgroep die als hedgehog-familie bekend staat. Met elkaar vormen ze een ingewikkeld netwerk van eiwitten dat cellen gebruikt om te communiceren en dat een belangrijke rol speelt bij de groei en ontwikkeling van nagenoeg alle organen, met name in het embryonale stadium. Hedgehog-eiwitten werken als een soort moleculaire schakelaar. Ze kunnen ze de vermenigvuldiging van cellen stimuleren, maar ook stopzetten. Eerdere onderzoeken hadden al aangetoond dat sonic hedgehog ook het primaire signaal levert om celdeling in korrelcel-precursors te induceren. Kruisingen tussen Ts65Dn-muizen en muizen met een reporter van sonic hedgehog pathway-activiteit suggereerden dat deze pathway minder goed werkte bij Ts65Dn-muizen. Dus werden er korrelcel-precursors geïsoleerd en in cultuur gebracht in de aanwezigheid van toenemende hoeveelheden sonic hedgehog. Deze analyse leverde twee belangrijke resultaten op. Ten eerste bleken korrelcel-precursors met trisomie consequent minder te reageren dan reguliere korrelcel-precursors. Dat was zo bij elke toegepaste concentratie van sonic hedgehog. Dat wijst dus op een op zichzelf staand tekort in respons van de cel op deze belangrijke groeifactor. Ten tweede bleken korrelcel-precursors met trisomie wel degelijk te reageren, hetgeen suggereert dat een geringe verhoging van sonic hedgehog de snelheid van delen van korrelcel-precursors met trisomie omhoog zou kunnen brengen tot normale waar-

den. Om dit verder te onderzoeken kregen muisjes op de dag van hun geboorte injecties met een klein molecuul dat de sonic hedgehog pathway activeert (SHH agonist, SAG). Zes dagen daarna werd het aantal cellen in hun cerebellum bepaald. Zelfs die eenmalige toediening bleek het aantal korrelcel-precursors te herstellen en het volume van het cerebellum tot normale niveaus op te voeren. Bovendien bleek het aantal zich delende korrelcel-precursors omhooggebracht tot een normaal niveau, hetgeen suggereert dat het corrigerende effect van deze eenmalige behandeling zich voortzet tijdens de ontwikkeling van het cerebellum.

De conclusie van het derde onderzoek

Sonic hedgehog (SHH) is vanaf het eerste moment belangrijk voor de hersenontwikkeling. Bovendien heeft dit als potent boodschappereiwit en als groeifactor invloed op de deling, migratie, differentiatie en het overleven van allerlei celpopulaties, zoals die tijdens de vroege ontwikkeling ontstaan en zich een leven lang verder ontwikkelen. Daarom moet iedere vorm van stimulatie van deze pathway heel nauwkeurig worden afgemeten, zowel voor wat betreft welke cellen eraan blootgesteld worden, maar ook wanneer in de ontwikkeling deze stimulatie plaats moet vinden. Aan de andere kant kunnen alleen de cellen met de juiste receptoren en ontvangers van het sonic hedgehog-signaal reageren; cellen zonder zo'n receptor zijn er ongevoelig voor. Wanneer alle cellen met trisomie dezelfde verzwakte reactie op sonic hedgehog vertonen, zou een medicijn dat gemaakt is om deze specifieke reactie op te wekken, vergaande verbeteringen kunnen bewerkstelligen. Sonic hedgehog is belangrijk bij het ontstaan van een aanzienlijk deel van de hersenen. Bovendien heeft het invloed op alle structuren die afgeleid zijn van de embryonale zenuwlijst, met inbegrip van de schedel, het darmzenuwstelsel en delen van het uitstroom-traject van het hart. Dit boodschappereiwit is verder de hoofdverantwoordelijke voor de ontwikkeling van de voorkant-achterkant polariteit van de hand. In die zin zou een verzwakte reactie op sonic hedgehog bij kunnen dragen aan allerlei aspecten van het fenotype van Downsyndroom. Er zal echter nog veel aanvullend fundamenteel werk moeten worden verricht om vast te kunnen stellen of sonic hedgehog ook op de lange termijn gunstig werkt en welke aspecten van de ontwikkeling met name baat hebben bij deze aanpak.

Algehele conclusies

Het binnen één jaar gerapporteerd worden van drie baanbrekende onderzoeken is een voorbode van grote toekomstige ontwikkelingen op het gebied van Downsyndroom. Het betekent tevens een oproep aan de wetenschap om na

te gaan welke onderzoeksgebieden er nog meer zouden kunnen profiteren van de gezichtspunten die geleverd worden door goed gedefinieerde genetische effecten bij trisomie. Alles bij elkaar staan deze onderzoeken voor een synthese van benaderingen die hun oorsprong vinden in ontwikkeling, structuur, functie en leeftijdsgerelateerde veranderingen die de basis moet vormen voor verdere onderzoek van deze complexe aandoening. Dergelijk onderzoek, met alle facetten ervan, kan slechts worden uitgevoerd met gebruikmaking van muismodellen die de ontwikkelings- en fysiologische processen, zoals die beïnvloed worden door Downsyndroom, representeren. Die kunnen zo handvatten bieden die essentieel zijn voor het begrijpen van de genetische basis van de divergentie tussen individuen met trisomie enerzijds en met het normale aantal chromosomen anderzijds. Een gemeenschappelijk element van deze benaderingswijzen is dat ze allemaal ontwikkeld zijn tegen een achtergrond van mogelijke farmaceutische (of andersoortige) verbetering. Samen met elders lopende klinische onderzoeken, bijvoorbeeld van anti-oxidanten en cholinesterase-inhibitoren zijn de vooruitzichten op verbetering van de cognitieve functie van mensen met Downsyndroom in de te voorziene toekomst uitermate positief.

Noten /literatuur

¹ Dit is een zeer vrije en sterk aangepaste bewerking van Reeves, R. H. & Garner, C. C. (2007), 'A year of unprecedented progress in Down syndrome basic Research', *Mental Retardation And Developmental Disabilities Research Reviews* 13, pags. 215-220. Omwille van de leesbaarheid is de veelheid aan referenties grotendeels weggelaten. Daarvoor wordt verwezen naar de originele publicatie.

² Als er ergens een type onderzoek bestaat waarbij we helaas niet om het gebruik van proefdieren heenkomen is het dit wel. Het gaat hier immers om een afweging van de inzet van proefdieren tegenover het op grote schaal afbreken van zwangerschappen bij mensen.

³ Zie o.a. 'Multivitamines en multimineralen' in de Update van D+U 29 (lente 1995) en 'Zoeken naar het wondermiddel' in D+U 31 (herfst 1995). In de Updates van D+U 32 en 33 (resp. winter 1995 en lente 1996) ging het over de suggestie dat een gerichte toediening van antioxidanten zinvol zou kunnen zijn. In de Update van D+U 50 (zomer 2000) publiceerden we een uitvoerig literatuuronderzoek naar de huidige situatie, waarbij het hiervoor genoemde punt uitgebreid aan de orde kwam. In 'Een pil tegen Downsyndroom?' in nr. 69 van dit blad (lente 2005) zetten we die discussie voort. In het vorige nummer, D+U 82, bespraken we een recent Brits onderzoek waarin werd geconcludeerd dat toediening van verantwoorde doses antioxidanten geen effect had op de ontwikkeling van kinderen met Downsyndroom.