

Gisela Jacobasch

Hochspezialisierte Diagnostik, Prävention und Therapie bei Patienten mit hämolytischen Anämien verursacht durch genetische Defekte

Der Begriff personalisierte Medizin hat in den letzten Jahren sowohl auf Grund wissenschaftlicher Erkenntnisse als auch merkantiler Interessen von Pharmafirmen an Aktualität gewonnen. Dass eine gleiche Grunderkrankung bei Patienten zu unterschiedlich schwerer klinischer Symptomatik führen kann, lässt sich am anschaulichsten bei monogenetisch bedingten Erkrankungen veranschaulichen, die von Mutationen in unterschiedlichen Abschnitten eines Gens hervorgerufen werden. An zwei Beispielen aus der eigenen Arbeit möchte ich aufzeigen, wie wichtig es ist, familienspezifische Charakteristika von genetischen Erkrankungen zu erkennen und die erhaltenen Befunde zielgerichtet bei präventiven und therapeutischen Maßnahmen zu berücksichtigen. In dieser Arbeit möchte ich das Problem am Beispiel von zwei Enzymopathien, der Glukose-6-phosphatdehydrogenase (G6PD) und der Pyruvatkinase (PK) erläutern (**Abb. 1**). Die G6PD katalysiert die Schlüsselreaktion im oxidativen Pentosephosphatweg. Bei der biologischen Oxidation von G6P wird NADP zu NADPH + H⁺ reduziert. NADPH kann mit Hilfe des Glutathionsystems oxidativen Schäden in den Zellen vorbeugen, ist erforderlich für die Synthese von Fettsäuren und Steroiden sowie für Abwehrmechanismen wie z. B. den oxidativen Burst der Granulozyten, bei dem Wasserstoffperoxid gebildet wird. Außerdem entstehen über den nicht oxidativen Teil des Pentosephosphatweges Ribosephosphate, die ebenfalls für Synthesen genutzt werden. Über die Produkte Fruktose-6-phosphat und Glyzerinaldehyd-3-phosphat gewinnt der Pentosephosphatweg wieder Anschluss an die Glykolysesequenz. Die Pyruvatkinase katalysiert dagegen im Glukosestoffwechsel die irreversible Umwandlung von Phosphoenolphosphat (PEP) zu Pyruvat un-

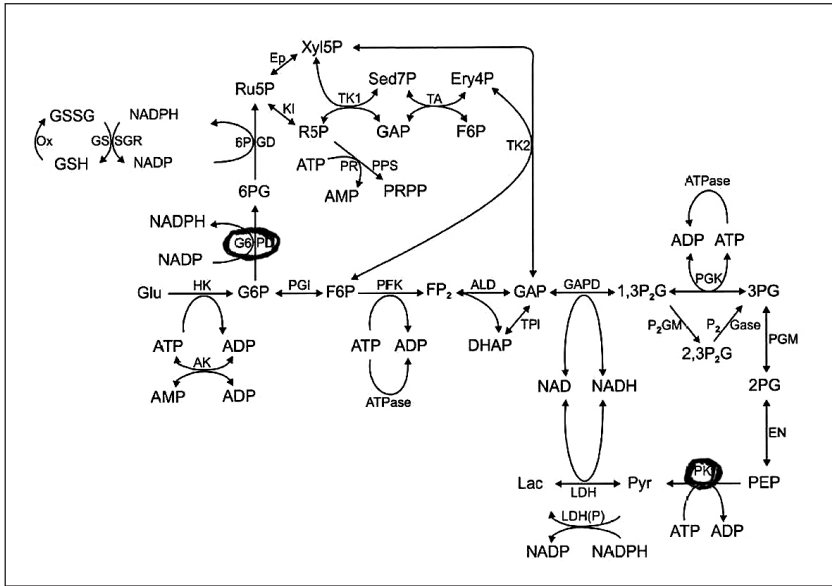


Abb. 1: Stoffwechsel der Erythrozyten

Irreversible Reaktionen sind mit einem Pfeil, reversible mit einem Doppelpfeil gekennzeichnet

ter gleichzeitiger Substratphosphorylierung von ADP zu ATP. Das ist möglich, da das Enolphosphat eine energiereiche Bindung enthält. Außerdem nimmt das Enzym Einfluss auf die Höhe des 2,3-Bisphosphoglyceratspiegels, wodurch die Sauerstoffabgabe aus Oxy-Hämoglobin an die Gewebe variiert werden kann. Beide Enzyme benötigen aber zur Substratbereitstellung dasselbe Schlüsselenzym am Beginn beider Stoffwechselwege, die Hexokinase, die Glukose zu G6P phosphoryliert. Die Kontrollstärke dieses Enzyms bestimmt unter normalen Bedingungen die Geschwindigkeit der G6P-Bildung. Dadurch können Störungen in einem der Wege sich auch auf den Substratumsatz in der nicht direkt von einem Defekt betroffenen Sequenz auswirken.

G6PD-Enzymopathien

Das G6PD-Gen ist auf dem X-Chromosom im q28 Bereich lokalisiert. Es umfasst 18,5kb und enthält 13 Exons. Isoenzyme existieren für das Enzym nicht. Prinzipiell sind deshalb von einem genetischen Defekt die Zellen aller Gewebe betroffen. Ob dieser jedoch zu Stoffwechselstörungen führt, hängt zum einen davon ab, in wie weit durch eine Neubildung des Enzyms der Defekt kompensiert werden kann und zum anderen davon, wie hoch der NADPH-Bedarf der Zellen ist.

Hemizygoter Merkmalsträger einer G6PD-Enzymopathie sind auf Grund der X-chromosomalen Lokalisation des Enzyms immer männliche Probanden. Weibliche weisen dagegen ein Zellmosaik auf, da nur eines der zwei X-Chromosome in den Zellen aktiv bleibt. Da die Abschaltung des 2. X-Chromosoms in den Zellklonen stochastisch erfolgt, kann der Anteil der defekten Zellen unterschiedlich groß sein. Schwarzafrikaner weisen generell einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin im Nukleotid 376 auf, was jedoch keine funktionellen Konsequenzen hat. Diese Form wird als GdA bezeichnet, die der Weißen als GdB (1).

Identifiziert und charakterisiert wurden von uns G6PD-Varianten von Defekträgern aus der DDR, Polen, der CSSR, der UdSSR, dem Libanon, Vietnam und Uganda. Die Reinigung der G6PD-Varianten erfolgte aus roten Blutzellen durch eine Affinitätschromatographie unter Verwendung von 3`5`ADP-Sepharose 4B und spezifischer Elution mit NADP (2). Genomische DNA wurde aus gefrorenem EDTA-Blut mit dem DNA-Extraktions-Kit „Nucleon“ von Scotlab gewonnen. Die komplette kodierende Sequenz und Teile aller Introns des G6PD-Gens wurden in 5 Segmenten mittels PCR amplifiziert. Die Sequenz, Mutationen und Polymorphismen wurden durch die Standard Dioxysenzierung der PCR-Fragmente erfasst (3). Die Analyse von Haplotypen erlaubte Aussagen über die gemeinsame Herkunft, die Drift und Selektion von Mutationen. Von den 6 bekannten stillen polymorphen Mutationen der G6PD waren bei den von uns untersuchten G6PD-Defekträgern nur 1311 C-T Austausche nachweisbar. In der **Tab. 1** sind einige hämatologische Daten, kinetische Parameter, die Basenaustausche im G6PD-Gen und die daraus resultierenden Veränderungen in der Aminosäuresequenz der G6PD-Varianten sowie der Schweregrad der hämolytischen Anämie von Patienten aus verschiedenen Ländern

Tab. 1: Hämolytische Befunde bei Trägern unterschiedlicher G6PD-Varianten verschiedener Länder

Patient	Vmax nkat/ml Zellen	Km G6P μmol/l	Ery 10 ¹² /l	Reti %	MCV fl	Variante	Exon	SG
DDR								
Berlin	1	249	3,0	13,0	112	n.b.		I
Ohrdruf	0,2	152	3,1	32,0	119	1139T → A, 380Ile → Asn	10	I
Forst	0,4	40	2,9	30,0	117	1006A → T, 936Th3 → Ala	9	I
Roßlau	0,4	155	2,6	17,0	111	del CAT102-104, de Ile35	2	I
Rostock	0,8	115	3,5	3,6	99	1010T → C, 337Phe → Ser	9	I
Ribnitz	0,7	121	3,7	7,3	108	1385 G → C, 462Trp → Ser	12	I
Brandenburg	1,0	73	3,6	9,9	102	1246G → A, 416Glu → Lys	10	I
Sachsen1	0,8	64	3,8	5,9	106	496C → T, 166Arg → Cys	5	I
Bad Kösen	0,7	60	4,2	6,8	99	1356C → A, 452Phe → Leu	11	II
Lichtenberg*	0,8	17	4,3	2,0	92	1003G → A, 335Ala → Thr	9	II
CSSR								
Bratislava	<1	480	2,8	18,9	118	1160G → A, 387Arg → His	10	I
Proch.	1	56	4,3	2,5	90	1343G → C, 448Ser → Thr	11	II
Pet.	5	85	4,1	3,2	97	463C → G, 155His → Arg	4	II
Zaz.**	<1	63	3,8	2,1	97	1003G → A, 335Ala → Thr	11	II
UdSSR								
Georgien1**	<1	28	4,5	2,0	91	563C → T, 188Ser → Phe	6	II
Georgien2*	<1	43	4,7	1,9	90	1003G → A 335Ala → Thr	11	II
Russ/Kasach	<1	15	4,1	2,7	90	563C → T, 188Ser → Phe	2	II
Libanon								
Libanon1**	2	25	4,5	4,3	91	563 C → T, 188Ser → Phe	6	II
Libanon2**	1	15	4,6	3,8	90	563 C → T, 188Ser → Phe	6	II
Vietnam								
Ho***	1	54	4,5	2,0	90	1388 G → A, 463Arg → His	12	
Ha***	1	69	4,3	2,1	89	1388 G → A, 463Arg → His	12	II
Hay***	<1	60	4,5	2,0	70	1388 G → A, 463Arg → His	12	II
Schwarzafrika								
Mosambique1	2,5	46	2,2	2,0	73	G6PD-defekt + Fe-Mangel		
Uganda22	3,6	145	5,2	3,6	79	968 T → C, 323Leu → Pro	9	II
Uganda5	3,6	129	4,5	3,7	91	968 T → C, 323Leu → Pro	9	III
Uganda11	4,1	99	3,9	7,0	84	202 G → A, 68Val → Met	4	III
Uganda20	4,4	81	4,7	2,6	88	680 G → T, 273Arg → Leu	9	III
Uganda24	5,2	87	4,9	2,2	86	202 G → A, 68Val → Met	4	III
Uganda4	5,0	33	4,0	2,6	88	Mittelmeer-ähnliche Var.		
Kontrolle	39,8 ±2,3	66,7 ±7,8	5,2	<1	87 ±3,1			

SG-Schweregrad; *Chatham, **entspricht der Variante Mittelmeer, ***Anant

zusammengefasst. Die Halbwertszeiten für die roten Blutzellen belegen dem unterschiedlichen Schweregrad der Anämie bei den Patienten. Parallel dazu verhalten sich der Anteil der Retikulozyten und die Größe der Blutzellen (MCV-Wert). Auch die Bilirubinkonzentration im Blutplasma korreliert erwartungsgemäß mit dem Schweregrad der Erkrankung. Diese Befunde führten zu der Vermutung, dass der Anteil an familienspezifischen Mutationen groß ist, was experimentell bestätigt wurde. Bei der Mehrzahl der deutschen Defektträger wurden bis dahin unbekannte familienspezifische G6PD-Mutationen nachgewiesen.

Nach der WHO-Klassifikation von 1967 wird der entsprechende Schweregrad der Erkrankung in 4 Klassen unterteilt (1). Träger von G6PD-Varianten der Klasse I zeigen die schwerste chronische nicht-sphärozytäre hämolytische Anämie (NSHA), hohe Retikulozytenwerte und häufig auch Funktionseinschränkungen in anderen Geweben. Der Schweregrad I resultiert hauptsächlich aus Punktmutationen, die in den Exons 9, 10, und 11 auftreten. Der Schweregrad I bei der Variante Roßlau ergibt sich dagegen aus der Deletion einer Aminosäure. In der CSSR und UdSSR sowie bei Patienten aus dem Libanon wurden u.a. die bereits in der Literatur beschriebenen G6PD-Varianten Mittelmeer und Chatham nachgewiesen, bei den drei Vietnamesen lag die Anant-Variante vor. GdB-Varianten, die mit einer schweren klinischen Symptomatik einhergehen, sind nicht nur durch eine geringe Restaktivität des Enzyms sondern auch durch Veränderungen in den kinetischen Parametern charakterisiert. So resultieren z. B. aus Mutationen im Exon 10 immer Varianten mit stark verminderter G6P-Affinität und z. T. auch verstärkter Hemmbarkeit durch NADPH. Das erklärt sich daraus, dass bestimmte Domänen im Exon 10 hoch konserviert sind, da sich hier die Bindungsregionen für G6P und NADP befinden.

Für die G6PD-Varianten der Klasse II lässt sich keine bevorzugte Exonlokalisation von Punktmutationen nachweisen. Zu dieser Gruppe gehört u. a. die bekannte Mittelmeervariante mit einem Basenaustausch im Nukleotid 563 C – T im Exon 6, der zu einem Ersatz von Serin durch Phenylalanin in Position 188 der Polypeptidkette führt. Diese G6PD-Variante dominiert bei Patienten in Italien, Griechenland, Mittel- und Südamerika. Sie wurde von uns auch bei Defektträgern aus Polen, der CSSR und Georgien nachgewiesen. Diese Mutation im G6PD-Gen ist typisch bei Völkern entlang der Seidenstraße und anderen früheren

Handelswegen. Die Dominanz dieser Mutation im Mittelmeergebiet steht im Zusammenhang damit, dass sich in diesen roten Blutzellen keine Malariaparasiten entwickeln können, wodurch sich ein Selektionsvorteil ergab. Trotz sehr geringer Restaktivität zeigen diese Defekttäger keine chronische NSHA. Das erklärt sich daraus, dass der K_m G6P stark verringert ist. Die erhöhte G6P-Affinität erlaubt einen relativ hohen G6P-Sättigungsgrad der Variante; oxidative Belastungen können die roten Blutzellen allerdings nicht tolerieren, da sie den G6P-Umsatz über den oxidativen Pentosephosphatweg nicht weiter steigern können. Dadurch treten unter solchen Bedingungen hämolytische Krisen auf. Am bekanntesten sind die nach dem Genuss von Favabohnen, die schon Lukian vor Jahrhunderten beschrieb. Ähnliche Eigenschaften zeigt auch die GdB-Variante Anant, die typisch für den süd- und südostasiatischen Raum ist. Auch bei der Variante Chatham, die bei Chinesen häufig vorkommt, liegt ein ähnlicher Selektionsvorteil vor. Typisch für G6PD-Defekttäger aus Schwarzafrika sind Varianten mit relativ hohen Enzymaktivitäten zwischen 10–60% der Norm. Ihre Krankheitsbilder entsprachen der Klasse 3, d. h. keine chronische hämolytische Anämie, aber hämolytische Krisen bei oxidativen Belastungen z. B. bei Malaria oder Aids. G6PD-Varianten der Klasse III sind häufig auf Mutationen im Exon 4 zurück zu führen. Unbekannte Mutationen wurden bei den Patienten aus Uganda nicht festgestellt.

Hervorzuheben ist weiterhin, dass im G6PD-Gen auch Mehrfachmutationen identifiziert wurden; ein Beispiel dafür ist die G6PD-Variante Vancouver, bei der 3 separate Punktmutationen mit entsprechenden Aminosäureaustauschen vorliegen (1). Träger dieser Variante zeigen neben einer NSHA auch eine neutrophile Dysfunktion.

Bisher wurden insgesamt 70 verschiedene Mutationen im G6PD-Gen des Menschen identifiziert; sie kommen in allen Exons einschließlich der Promotorregion vor (1, 3). Familienspezifische Mutationen wurden jedoch bisher nur so zahlreich in der DDR und Böhmen nachgewiesen.

Stoffwechsel G6PD-defekter Erythrozyten

Um Aussagen über den Umfang qualitativer und quantitativer Stoffwechseleränderungen in Erythrozyten von Trägern unterschiedlicher G6PD-Varianten machen zu können, nutzten wir die mathematische

Modellierung. Berücksichtigt wurden in den Modellen die Reaktionen des Pentosephosphatweges, der Glykolyse und des ATP-Verbrauches. Für Reaktionen, die nahe dem thermodynamischen Gleichgewichtes ablaufen, wurden Massenwirkungsquotienten eingesetzt. Für alle Reaktionen, die weit entfernt vom thermodynamischen Gleichgewicht sich befinden, wurden die an gereinigten Enzympräparaten ermittelten kinetischen Konstanten einschließlich der für positive und negative Effektoren der entsprechenden Enzyme und Enzymvarianten für die Aufstellung der Differentialgleichungen verwendet (4). **Abb. 2** zeigt die Steigerungsmöglichkeit des Glukosefluxes über den oxidativen Pentosephosphatweg in Erythrozyten einer Kontrolle und in roten Blutzellen von drei verschiedenen G6PD-Defekttägern der Klasse 1.

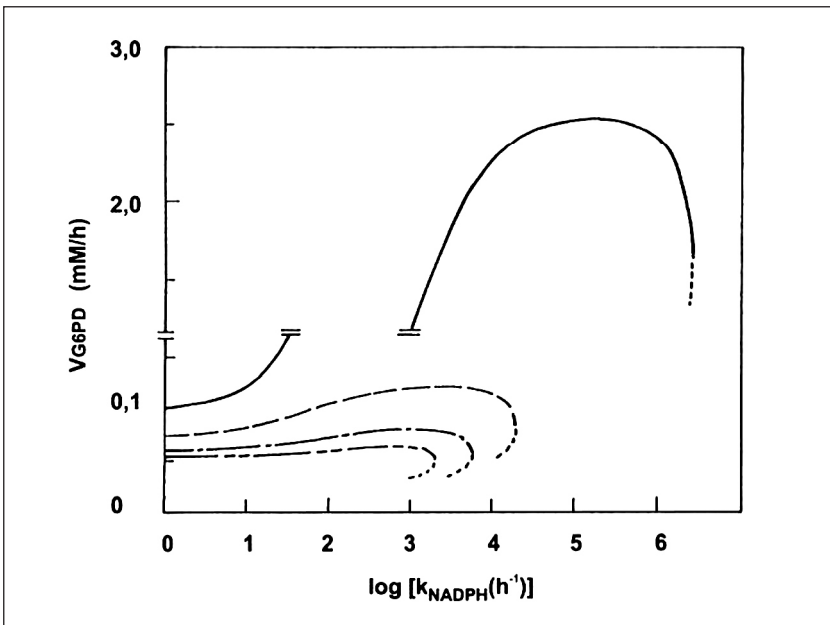


Abb. 2: Mathematische Modellierung des Methylenblau-stimulierten Glukosefluxes durch den oxidativen Pentosephosphatweg

Das Verhalten der Erythrozyten von Kontrollen entspricht der durchgezogenen Linie, das von G6PD defekten Zellen (Schweregrad 1) den durchbrochenen Linien. Die punktierten Linien kennzeichnen instabile Zustände

Es ist deutlich zu erkennen, je weniger die G6P-Oxidation zu steigern ist, desto früher bricht der Stoffwechsel der Zellen zusammen. Das bedeutet, dass diese defekten Zellen schon bei geringer oxidativer Belastung intravasal hämolysieren. Die Struktur der Doppellipidschicht der Erythrozytenmembran wird destabilisiert, da Phosphatidylserinreste von der Innerseite der Membran auf die Außenseite verlagert und dann abgespaltet werden (5). Dieser Prozess kann durch hohe Gaben von Vitamin E etwas verzögert werden. Die Ergebnisse der mathematischen Modellierung sind in guter Übereinstimmung mit experimentellen Befunden, bei denen die $1\text{-}^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung aus roten Blutzellen von Kontrollpersonen und von G6PD-Defekträgern bei Zusatz von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose in Gegenwart und Abwesenheit von Methylenblau bestimmt wurde (**Tab. 2**). Erythrozyten von G6PD-Defekträgern reagieren im Gegensatz zu Zellen von Kontrollpersonen aber auch bei einer energie-

Tab. 2: Oxidativer Burst mit G6PD-Aktivität weißer Blutzellen bei G6PD-Defekträgern.

G6PD	RLU (%)	Leukozyten (nkat/ml Zellen)	Granulozyten (IE/10^8 Zellen)
Bad Kösen	1	5	0,7
Ohrdruf	2	10	0,7
Roßlau	2	7	0,4
Forst	10	5	0,6
Rostock	16	331	1,5
Brandenburg	8	105	1,0
Uganda	100	68	3,5
Kontrolle	100	575 ± 40	6,6 ± 0,5

Die Chemilumineszenz wurde mit 106 PMN gemessen und durch 120 nM PMA stimuliert.

tischen Belastung mit einem Anstieg der Konzentration des oxidierten Glutathions (GSSG) und hämolysieren rasch (**Abb. 3**). Diese Befunde wurden sowohl bei der Prävention als auch in der Therapie der Patienten berücksichtigt. Das bedeutet u. a., dass für G6PD-Defekträger Pharmaka und Chemikalien mit oxidativer Wirkung kontraindiziert sind und sie auch beruflich nicht mit ihnen in Kontakt kommen dür-

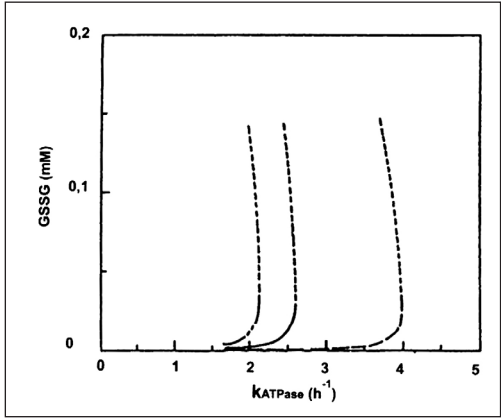


Abb. 3: Verhalten der GSSG-Konzentration von G6PD-defekten Zellen bei energetischer Belastung (k_{ATPase})

Die Kurven entsprechen G6PD-Varianten mit unterschiedlicher G6P-Affinität; von links nach rechts $K_m G6P \uparrow$, $K_m G6P \downarrow$, $K_m G6P$ unverändert

fen (1). Patienten mit dem Schweregrad 1 können auch keinen hohen körperlichen Belastungen ausgesetzt werden und sind deshalb nicht geeignet für einen Schichtdienst. Zu beachten ist weiterhin, dass bei Patienten mit schwerer klinischer Symptomatik auch die Immunabwehr auf Grund der verminderten G6PD-Aktivität in den weißen Blutzellen geschwächt sein kann (**Tab. 3**). Bei einem Patienten mit einem besonders schwer ausgeprägten Krankheitsbild trat auch eine Kataraktbildung

Tab. 3: $1-^{14}CO_2$ -Bildung roter Blutzellen aus $1-^{14}C$ -glukose mit und ohne Zusatz von Methylenblau bei pH 7,4 und 37°C.

G6PD-Variante	$\mu\text{Mol } 1-^{14}CO_2/\text{ml Zellen x h}$	
	Ohne Mb	Mit MB
Ohrdruf	0,08	0,10
Roßblau	0,04	0,28
Bad Kösen	0,11	0,28
Brandenburg	0,10	0,10
Forst	0,08	1,10
Kontrolle	0,150 ± 0,025	2,890 ± 0,716

auf, die zur Erblindung führte. Im Stoffwechsel der Augenlinse spielt zur Aufrechterhaltung ihrer Transparenz das reduzierte Glutathion eine entscheidende Rolle. Die verkürzte Halbwertszeit der G6PD-defekten Zellen geht außerdem mit einer hohen Freisetzung von Purinbasen einher, die zu Harnsäure abgebaut werden. Im Erwachsenenalter leiden die Patienten der Klasse 1 deshalb häufig an schmerzhaften Gichtanfällen. Die größte Gefahr für die Lebenserwartung der Patienten der Klasse 1 ist im Erwachsenenalter aber die Akkumulation von Eisen in lebenswichtigen Organen, die konsequent behandelt werden muss!

Pyruvatkinaseenzymopathien

Im Gegensatz zur G6PD existieren für die Pyruvatkinase gewebsspezifisch und differenzierungsabhängig 4 Isoenzyme, die von 2 verschiedenen Genen codiert werden (6). Enzymdefekte sind nur für das Gen bekannt, das die DNA-Sequenz für das Leber- und Erythrozytenenzym (PK-L/R) enthält. Dieses Gen befindet sich auf dem langen Arm in Position q21 des Chromosoms 1 (**Abb. 4**). Die PK-L ist außer in Hepatozyten, in den proximalen Tubulizellen der Niere und in den Epithelzellen des Dünndarms vorhanden. Die PK-R tritt nur in den roten Blutzellen auf. Ihr primäres Transkript ist um 34 Aminosäuren länger als das für die PK-L. Auch das PK-M-Gen bildet 2 Isoenzyme. PK-M1 ist typisch für den Skelett- und Herzmuskel und Gehirnzellen. PK-M2, das evolutionär älteste PK-Isoenzym, wird in allen embryonalen Zellen, Tumorgewebe, Leukozyten, Lungen- und Fettgewebe, sowie in den Zellen des distalen Nierenabschnittes und der Plazenta gebildet. Obwohl Leukozyten und Erythrozyten im Knochenmark aus identischen multipotenten hämatopoetischen Stammzellen entstehen, tritt während der Differenzierung im Stadium der Erythroblasten für die roten Blutzellen ein Isoenzymwechsel vom PK-M2 zu PK-R auf. Diese Umschaltung ist in PK-defekten Zellen gestört.

Die PK-L/R ist ein tetrameres Enzym, zusammengesetzt aus 4 identischen Untereinheiten und verfügt über allosterische Eigenschaften. Positive Effektoren, die den aktiven R-Zustand des Enzyms stabilisieren, sind Fru1,6-P₂, Fru2,6-P₂ und Phosphoglukonat. Negative Effektoren, die den inaktiven T-Zustand des Enzyms begünstigen, sind ATP und Alanin.

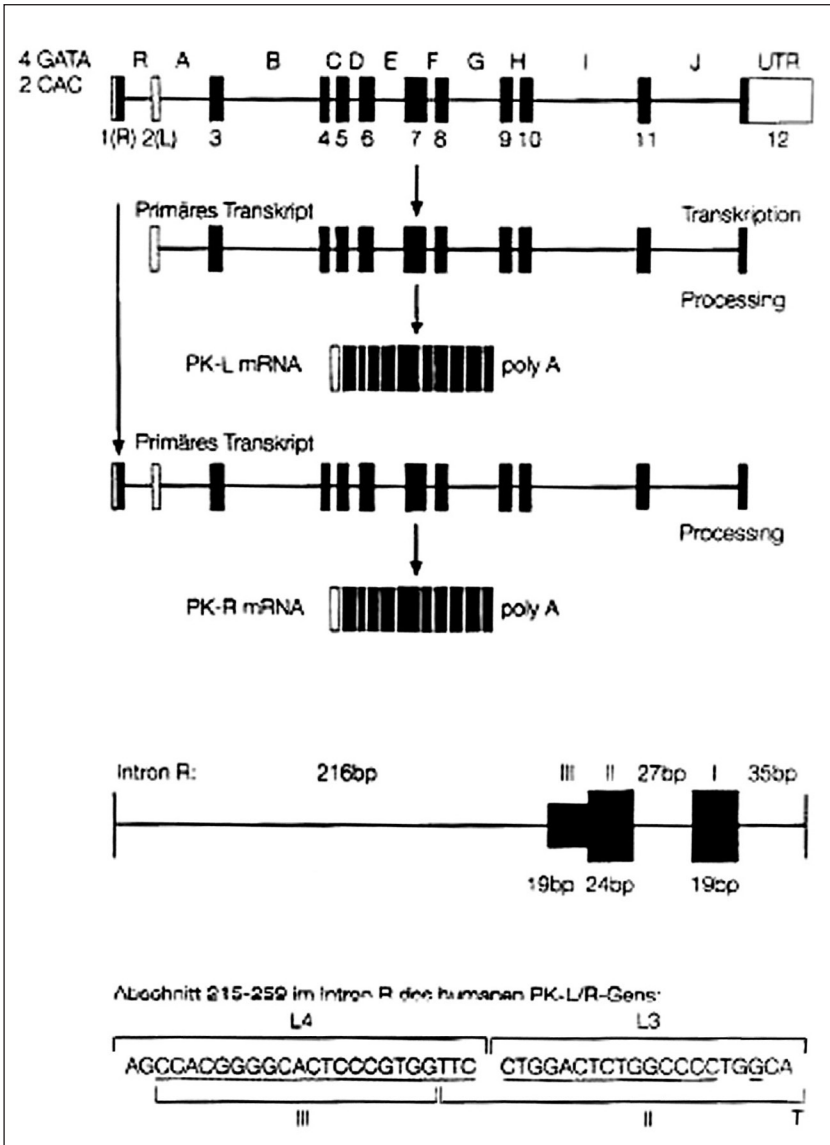


Abb. 4: Schematische Darstellung der Expression des Pyruvatkinase L/R Gens und von Regulationselementen (nach Naguchi et al.; 6)

Defekte im PK-L/R-Gen traten wahrscheinlich sehr viel später als G6PD-Mutationen auf. Die erste PK-Enzymopathie als Ursache einer hämolytischen Anämie wurde 1961 beschrieben (7). Inzwischen sind zahlreiche Fälle aus vielen Ländern in Europa, Amerika, Asien und Afrika bekannt (1, 3). Da keine Mutationen im Exon 1 und 2 identifiziert wurden, betreffen alle Defekte der PK sowohl das Leberenzym als auch das der roten Blutzellen. Der Erbgang ist autosomal rezessiv. Im Gegensatz zum G6PD-Defekt treten PK-Varianten relativ selten auf, nämlich nur dann, wenn die heterozygoten Eltern dieselbe Mutation in einem Allel aufweisen und dieses auf die Nachkommen übertragen. In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich bei den Patienten um compound heterozygote Merkmalsträger. In der **Abb. 5** ist die Häufigkeitsverteilung

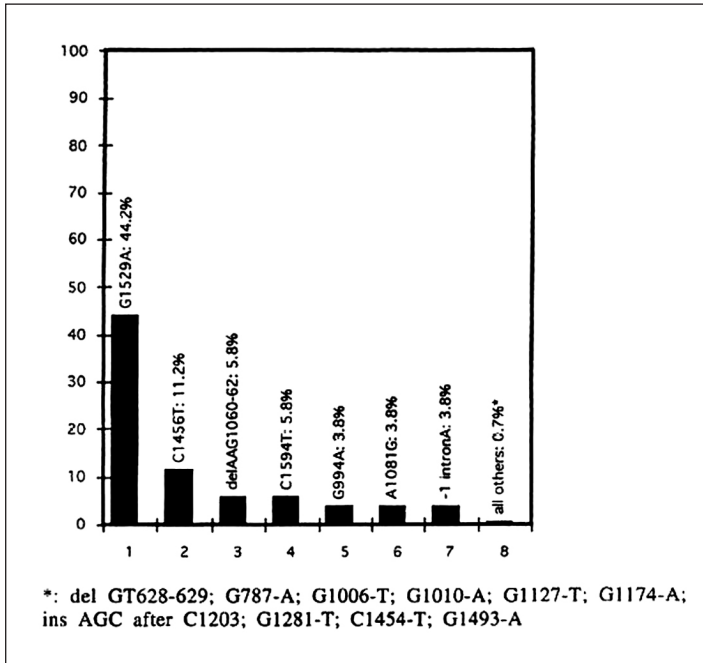


Abb. 5: Häufigkeitsverteilung von PK-L/R-Gen Mutationen bei Defekträgern aus Deutschland, England und Amerikanern europäischer Abstammung

lung von PK-L/R-Mutationen bei den von uns untersuchten Defekträgern aus Deutschland, England und von Amerikaner europäischer Abstammung zusammengefasst. Hervorzuheben ist, dass sich die in Asien vorkommenden PK-Mutationen von denen in Europa unterscheiden (1, 3). Insgesamt kann aber festgestellt werden, dass Mutationen im PK-L/R-Gen fast immer zu einem distinkten Aminosäureaustausch in der Polypeptidkette führen. Selten wurden Deletionen, Insertionen, der Einbau eines Stoppcodons oder Splice Site Mutationen festgestellt. 44 verschiedene Mutationen wurden bisher im PK-L/R-Gen identifiziert, 35 davon durch meine Arbeitsgruppe. Am häufigsten sind 7 verschiedene Mutationen im Exon 11, 5 im Exon 8, 4 im Exon 9 und 3 im Exon 6. In den Exons 10 und 13 sowie im Intron A und F sind jeweils nur eine Mutation bekannt (1, 8, 9). Am häufigsten wurde mit 65% bei Patienten in der DDR und England eine Mutation im Nukleotid 1529 mit einem Basenaustausch von Guanin gegen Adenin gefunden, durch den in Position 510 der Polypeptidkette, einem konservativen Bereich, Arginin durch Glutamin ersetzt wird. Der dadurch bedingte Ladungswechsel führt zu einer Instabilität des Enzyms und zu einem Verlust seiner allosterischen Eigenschaften. Überraschenderweise wurde diese Mutation nur in 18% der Fälle in der CSSR (**Tab. 4**) und auch seltener in Ländern südlich der Alpen nachgewiesen. Überwiegend wurde die 1529 Mutation bei compound heterozygoten Patienten festgestellt. Die Kombination von zwei unterschiedlich mutierten PK-Allelen modifizieren die Enzymeigenschaften meistens stark. Zwei Beispiele möchte ich dafür anführen: 1. Die Kombination der 1529 G-A-Mutation mit einem zweiten PK-Allel, in dem im Nukleotid 1281 G-T (Exon 9) mit ausgetauscht war, woraus ein Aminosäurewechsel von Glutamat zu Aspartat in Position 427 des Proteins resultierte. Das bewirkte überraschenderweise keinen Aktivitätsverlust des Enzyms. Diese Mutante war jedoch durch eine um eine Größenordnung verminderte PEP-Affinität charakterisiert und verstärkte allosterische Eigenschaften. Im zweiten Beispiel handelt es sich um die Kombination der 1529 G-A-Mutation in einem Allel mit der Mutation 1456 C-T (Exon 8) im zweiten Allel, wodurch in Position 486 Alanin durch Valin in der Polypeptidkette ersetzt wurde. Diese Mutante zeigte eine geringe Verminderung der katalytischen Aktivität und eine Abnahme der PEP-Affinität auf $\frac{1}{4}$ der Norm, die ebenfalls mit einer Zunahme der allosterischen Enzymeigenschaften

Tab. 4: Charakterisierung von PK-Mutationen der CSSR

Patient	V _{max}	S 0,5 PEP µM	Ery 1012/l	Reti %	MCV	Mutation/Allel 1	Mutation/Allel 2	AS-Aust./Allel 1	AS-Aust./Allel 2
Kur.	72	387	2,3	67	122	IntronA3' term g [≥] a	1493G → A	Splice Mut	498Arg → His
Skö.	73	100	2,6	88	119	994G → A	1591C → T	332 Gly → Ser	531Arg → Cys
Sim.	37	206	1,9	40	115	1594C → T	994G → A	532 Arg → Trp	332Gly → Ser
Tum.	30	62	2,8	80	111	del 1060-62AAG	1594C → T	del 354Lys	532Arg → Trp
Serf.	45	54	2,1	70	113	del 1060-62AAG	388A → T	del 354Lys	130 Thr → Ser
Pru.	76	70	1,9	53	112	del 1060-62AAG	?	del 354Lys	?
Olz.	146	1270	4,0	15	100	1174G → A	?	392Ala → Trp	?
Sek.	76	259	3,3	8	98	1529G → A	1529G → A	510Arg → Glu	510Arg → Glu
Rep.	60	242	3,3	9	99	Del1060-62AAG	1472C → A	del354Lys	491Ala → Glu
Sze	58	281	4,5	4	102	1081A → G	1456C → T	361Asn → Asp	486Arg → Trp
Mes.	52	295	4,3	6	100	388A → T	1167G → C	130Thr → Ser	356Arg → Ala
Kontrolle	342 ±31	654 ±99	4,6-5,2	<1	87,0 ±3,1				

AS-Aust.-Aminosäureaustausch

verbunden war. Diese Befunde sind darauf zurückzuführen, dass sowohl der Aminosäureaustausch in Position 427 als auch der in 468 des jeweils zweiten Allels der PEP-Bindungsregion entspricht. Das Krankheitsbild beider Patienten ist durch eine schwere chronische hämolytische Anämie gekennzeichnet mit Halbwertszeiten der roten Blutzellen von 1,6–1,8 Tagen, Retikulozyten von 50–60% und MCV-Werten von 110fl, was für eine extrem junge erythroide Zellpopulation spricht. Ich erwähne diese zwei Fälle, weil sie bei einem normalen Screening, das bei hohen PEP-Konzentrationen durchgeführt wird, auf Grund der dann normalen PK-Aktivität gar nicht als PK-Defekte erkannt würden. In unserem Diagnostikprogramm wurden deshalb die Enzymaktivitäten aller Probanden außer im Substratsättigungsbereich auch bei zwei geringeren PEP-Konzentrationen bestimmt, wodurch solche Mutanten zu identifizieren waren. Diese zwei Beispiele zeigen darüber hinaus, wie schwierig es ist, Enzymeigenschaften von compound heterozygoten Merkmalsträgern vorherzusagen. Sie wurden deshalb für alle Mutanten experimentell ermittelt.

Insgesamt ist einzuschätzen, dass in der Mehrzahl der Fälle die klinische Manifestation von PK-Enzymopathien schwerer als die von G6PD-Defekten ist (1, 9). Auf Grund des hohen 2,3-P₂G-Spiegels, der durch den Anstieg der PEP-Konzentration bei PK-Defekträgern zustande kommt, tolerieren die Patienten jedoch relativ gut sogar Erythrozytenwerte von 2,5–3,0 Millionen Zellen pro Mikroliter Blut, so dass man mit Bluttransfusionen zurückhaltend agieren kann. Zu berücksichtigen ist aber gleichzeitig, dass bei energetischen Belastungen oder Infektionskrankheiten rasch kritische Situationen eintreten können, auf die reagiert werden muss.

Ebenso wie bei G6PD-Enzymopathien wurden die Auswirkungen von PK-Defekten auf den Energiestoffwechsel des Erythrozyten mittels mathematischer Modellierung überprüft (10). Das Verhalten der Glykolyserate von drei Defekträgern bei energetischer Belastung ist im Vergleich zu einer Kontrolle in **Abb. 6** dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass parallel zum Schweregrad der Erkrankung die Glykolyserate abnimmt und der Energiestoffwechsel der roten Blutzellen oft bereits bei geringen energetischen Belastungen zusammenbricht, da die Kontrollstärke der PK bestimmend wird. Der ATP-Spiegel kann unter diesen Bedingungen nicht mehr stabilisiert werden

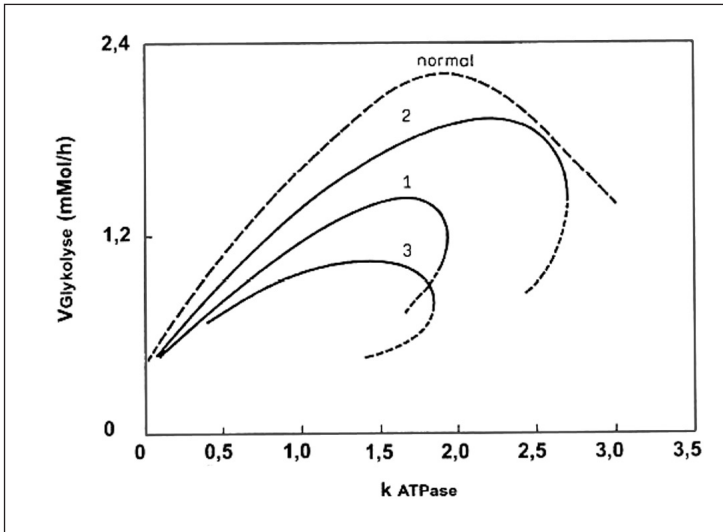


Abb. 6: Einfluss des ATP Verbrauchs (k_{ATPase}) auf die Glykolyserate von Kontrollen und von PK-Defekttägern

Kinetische Parameter für die jeweils verwendete Differenzialgleichung der PK-Reaktion bei der Modellierung

μM	Kontrolle	PK-Mutationen		
		1	2	3
K_{ADP}	0,474	0,474	0,474	0,474
K_{PEP}	0,225	0,250	0,144	2,600
$K_{F1,6P2}$	0,005	$6,5 \times 10^{-4}$	2×10^{-4}	7×10^{-4}
K_{ATP}	19	1515	320	1,3
V_{max}	250	70	45	25

(**Abb. 7**), was sich negativ auf alle energieabhängigen Reaktionen auswirkt, vor allem auf die Zellmembran. Die Konzentration von Kalzium steigt intrazellulär an, wodurch die Zellen rigider werden und aus dem Blutkreislauf entfernt werden. Dieser Prozess ist nicht, wie bei einer Kugelzellanämie, durch eine Milzextirpation abzuschwächen.

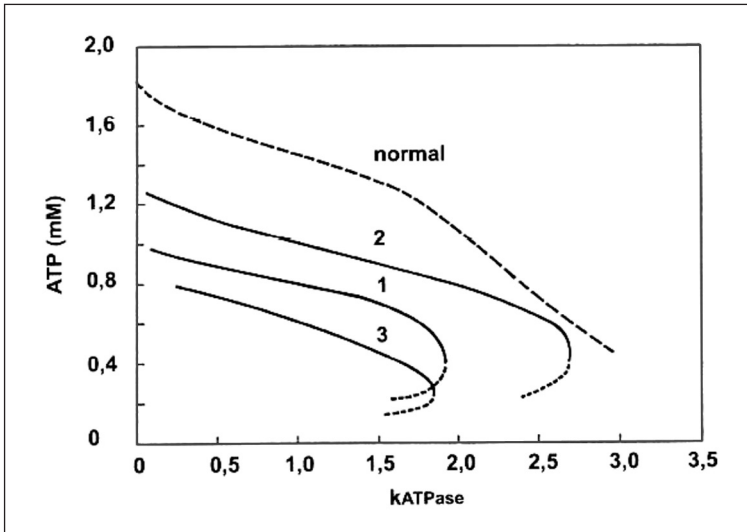


Abb. 7: Einfluss der ATP-verbrauchenden Prozesse (k_{ATPase}) auf den ATP-Spiegel der Erythrozyten von Kontrollen und von PK-Defekttägern

Die kinetischen Parameter der PK und PK-Mutanten entsprechen den Angaben in Abb. 6

Perspektive für eine Genkorrektur des PK-Defektes

Unsere wissenschaftliche Zielstellung schloss auch eine Strategie zur Korrektur von PK-Defekten mit ein. Wenn es gelänge, die Mutation 1529 G-A, die am häufigsten bei homozygoten und compound heterozygoten PK-Defekttägern in Deutschland und England nachgewiesen wurde in einem Allel der Patienten zu beheben, würden einfach heterozygote Merkmalsträger resultieren, die klinisch gesund sind. Die Voraussetzungen sind für ein solches Vorhaben mit den proliferierenden erythroiden Stammzellen, die aus dem Knochenmark gewonnen werden können, günstig; denn die Gentherapie kann *in vitro* vorgenommen werden, und die behandelten Zellen können anschließend über die Blutbahn dem Organismus wieder zugeführt werden. Als Vorversuch dazu sequenzierten wir das gesamte PK-L/R-Gen des Menschen

(11). In Japan versuchte man bei einem Mausmodell eine Genkorrektur der PK vorzunehmen, konnte sie jedoch nicht über eine längere Zeit stabilisieren (12). Die methodischen Schwierigkeiten ließen sich auch für uns in dieser Zeit nicht überwinden. In den letzten Jahrzehnten wurden jedoch nicht nur international enorme Fortschritte auf dem Gebiet der DNA und RNA-Sequenzierung erreicht, sondern auch bei der Entwicklung maßgeschneiderter Designer Nukleasen. So wurden z. B. Zinkfingernukleasen (ZFNs) erfolgreich bei einem Hämophilie-Mausmodell eingesetzt, um das defekte Gen, das den Faktor IX codiert, zu korrigieren (13). Designer Nukleasen sind derzeit weiterhin in der klinischen Erprobung zur genetischen Korrektur des Globin-Locus bei der β -Thalassämie und der Sichelzellanämie (14). Die heutige Wissenschaftlergeneration sollte deshalb auch die Zielsetzung der Korrektur von PK-Defekten im Rahmen der personalisierten Medizin zum Erfolg bringen können.

Sekundäre Hämochromatose als Spätfolge von PK- und G6PD-Enzymopathien

Das hohe Niveau in der Diagnostik und Betreuung von Patienten mit Enzymopathien war nur durch ein gemeinsames, abgestimmtes Engagement von Pädiatern, Hämatologen und Biochemikern und der Mitwirkung der betroffenen Familien zu erreichen. Als vorteilhaft erwies sich dabei die Bildung von entsprechenden Zentren in der DDR, der CSSR, Polen und der UdSSR. In ihnen wurden die Verdachtsdiagnosen von Patienten nach einheitlichen Kriterien erhoben, die dann durch nachfolgende Untersuchungen in meinem Labor verifiziert und ergänzt wurden. Für die Patienten waren diese Zentren stets ihre Kontaktstellen. Vor jeder klinischen Behandlung eines Patienten auf Grund einer anderen Erkrankung erfolgte eine Abstimmung. Ebenso wurden auch die Abschlussberichte gemeinsam ausgewertet. Das Gleiche galt für die Berufsberatung der Jugendlichen, damit die Patienten nach abgeschlossener Ausbildung ihren Beruf auch ausüben konnten. Der kontinuierliche Kontakt zu jedem Patienten erleichterte aber auch die rechtzeitige Einschätzung der Spätfolgen der Erkrankung und die Einleitung der notwendigen Therapie. Das zentrale Problem für die Lebenserwartung der Patienten im Erwachsenenalter ist die Entwicklung einer sekundären Hämochromatose. Leider

wird diese Aufgabe von vielen Ärzten unterschätzt. Die Durchführung einer effektiven Eisenelutionstherapie erfordert aber auch von den Patienten Einsicht in das Krankheitsgeschehen der Eisenakkumulation, Disziplin und Eigeninitiative; denn die Behandlung muss begonnen werden, bevor irreversible Schäden in Herz, Leber und Pankreas auftreten, d. h. zu einem Zeitpunkt, wo noch keine Beschwerden empfunden werden. Liegt dagegen bereits eine Herzdilatation, eine Leberzirrhose oder ein Diabetes auf Grund der Eiseneinlagerungen in den Organen vor, kann durch eine Eisenelutionstherapie keine Verbesserung der Organfunktionen mehr erreicht werden (1, 15). Eisen wird im Organismus immer an Protein gebunden transportiert, um die Initiierung einer ungewollten Radikalbildung zu verhindern. Es muss deshalb erst in eine wasserlösliche komplexe Form überführt werden, damit es über die Niere ausgeschieden werden kann. Der beste Parameter zur Einschätzung einer Eisenüberladung ist der Ferritinspiegel im Blutplasma. Er korreliert mit dem Schweregrad der chronischen hämolytischen Anämie. Angestrebt wurde von uns, durch eine Eisenelution einen Ferritinspiegel von $<100\text{ng/ml}$ zu erreichen (die Normwerte liegen $<50\text{ng/ml}$). Das war in den meisten Fällen nur durch eine tägliche subcutane Zuführung von Desferal oder Exjade zu ermöglichen. Damit die Patienten täglich abends zu Hause selbständig die Therapie durchführen konnten, entwarf einer der Patienten eine entsprechende Pumpe und setzte auch deren Bau in einem Industriebetrieb der DDR in der erforderlichen Stückzahl durch. Dadurch konnten alle von uns betreuten Patienten die Therapie durchführen. So erreichten wir einen internationalen Erfolg auf dem Gebiet der Diagnostik und Therapie bei Patienten, die an enzymopenisch bedingten hämolytischen Anämien litten. Zu einem tiefen Einschnitt kam es allerdings, vor allem im Leben der Patienten der DDR, durch die politische Wende. Die Zentren wurden abgeschafft und die danach niedergelassenen Ärzte vernachlässigten die Behandlung der sekundären Hämochromatose, obwohl sie aufgeklärt waren und über alle Unterlagen zu den von ihnen betreuten Patienten verfügten. Zum Teil begründeten sie ihr Verhalten damit, dass ihr Budget die Ausgaben für die Durchführung der Eisenelutionstherapie nicht zuließe. Hinzu kam, dass die meisten Patienten ihren Arbeitsplatz verloren und Tätigkeiten in Ost und West aufnahmen, denen sie körperlich nicht gewachsen waren. Die Ferritinspiegel erreichten deshalb bei vielen der Patienten mit schwerer klinischen Symptomatik Werte von $>2800\text{ng/ml}$.

Dadurch verstarben sie in den 90er Jahren und im ersten Jahrzehnt dieses Jahrhunderts entweder an Herzversagen und Leberkarzinomen oder verbluteten aus Ösophagusvarizen als Lastkraftwagenfernfahrer auf der Autobahn.

Ausblick

Natürlich gibt es auch außerhalb der monogenetischen Defekte Erkrankungen, bei denen Verfahren der personalisierten Medizin anzustreben sind zumal die DNA-Sequenzen, die den Code für Proteine verschlüsseln, nur 1,5% des humanen Genoms umfassen. Trotzdem haben bereits jetzt rekombinante Proteine als Arzneimittel (Antikörper, Hormone, Enzyme, Cytokine u. a.) in der Medizin eine große Bedeutung erlangt. 2013 entfielen auf sie bereits 25% der neuen Zulassungen mit einem Umsatz von 140 Milliarden Dollar (16). Eine wichtige Aufgabe für die personalisierte Medizin wird aber auch die Erarbeitung neuer Strategien sein, um die Ansprechbarkeit von Patienten, insbesondere auch der von Kindern, auf Medikamente exakter als bisher bestimmen und negative Nebeneffekte ausschließen zu können. Andere aktuelle Herausforderung auf diesem Gebiet sind die regenerative Medizin und die Erweiterung der Kenntnisse über das humane Mikrobiom und über seine Bedeutung für die Gesunderhaltung des Menschen, um sie in der Prävention und Therapie von Volkskrankheiten (Adipositas, Diabetes, Herzkreislauferkrankungen, Karzinome, neurodegenerative Störungen u. a.) nutzen zu können. Viele weit gespannte Ziele werden aber erst zu lösen sein, wenn wir den Bereich der Epigenetik mit seinen Wechselwirkungen besser verstehen, d. h. den Wissenschaftszweig, dessen Schwerpunkt es ist, die Vererbung von Eigenschaften aufzuklären, die nicht an die primäre Sequenz der DNA fixiert sind. Wie immens diese Aufgabe ist, wird vorstellbar, wenn man bedenkt, dass der größte Anteil der DNA-Sequenzen in RNAs umgeschrieben werden kann und insbesondere die zahlreichen kleinen RNAs riesige regulative Netzwerke bilden können, die über die Destabilisierung von mRNAs die Expressionsprofile verändern können. Sie spielen damit für die biologische Funktion von Organismen und ihre Anpassungsfähigkeit an Umweltbedingungen eine ebenso große Rolle wie Histonmodifikationen (Azetylierung, Methylierung, Phosphorylierung). Inzwischen wis-

sen wir weiterhin, dass auch die Methylierung von Cytosinresten, die eine Repression der Genexpression bewirkt, kein irreversibler Prozess ist; denn über eine Hydroxymethylierung kann auch wieder eine Demethylierung und damit eine Aktivierung der Genexpression erreicht werden. Die personalisierte Medizin bietet somit für die Zukunft ein weites wissenschaftliches Feld. Eine wichtige gesellschaftliche Aufgabe besteht darin, dass die zu erwartenden Fortschritte auf diesem Gebiet allen Bedürftigen in der Prävention und Therapie auch zugänglich gemacht werden.

Literatur

- 1 Jacobasch, G.: Hereditäre Membrandefekte und Enzymopathien roter Blutzellen. Handbuch der Molekularen Medizin Bd. 6, S. 393–441, Springer Verlag 2000
- 2 De Flora A., Morelli A, Benatti V. et al.: An improved procedure for rapid isolation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 169, 362–366 (1975)
- 3 Beutler E., Kühn W., Gelbert T. et al.: DNA-sequence abnormalities of human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. J. Biol. Chem. 266, 4145–4150 (1991)
- 4 Schuster R., Jacobasch G., Holzhütter H.G.: Mathematical modelling of metabolic pathways affected by an enzyme deficiency energy and redox metabolism of glucose-6-phosphate-deficient erythrocytes. Eur. J. Biochem. 182, 605–612 (1989)
- 5 Bleiber R., Jacobasch G., Freimann G. et al.: Deviations of the concentration of phospholipids and of phospholipid fatty acids in G6PD deficient red blood cells. Clin. Chim. Acta (Manuskript eingereicht)
- 6 Noguchi T., Yamada K., Inoue H. et al.: The L- and R-type isoenzyme of pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. J Biol. Chem. 26, 14366–14371 (1987)
- 7 Valentine W. N., Tanaka K. R., Miwa S.: A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect (pyruvate kinase) in three subjects with congenital nonspherocytic hemolytic anemia. Trans. Assoc. An. Physicians 74, 100–110 (1961)
- 8 Lenzner, C., Nürnberg P., Jacobasch G. et al.: Molecular analysis of pyruvate kinase deficient patients from Central Europe with hereditary hemolytic anemia. Blood 88, 1793–1799 (1997)

- 9 Jacobasch G., Rapoport S.: Hemolytic anemias due to enzyme deficiencies. *Mol. Aspects Med.* 17, 143–170 (1994)
- 10 Holzhütter H.G., Jacobasch G., Bisdorf A.: Mathematical modelling of metabolic pathways affected by an enzyme deficiency. A mathematical model of glycolysis in normal and pyruvate-kinase-deficient red blood cells. *Eur. J. Biochem.* 149,101–111 (1985)
- 11 Lenzner C., Nürnberg P., Jacobasch G. et al.: Complete genomic sequence of the human PK-L/R-gene includes four intragenic polymorphisms defining different haplotype backgrounds of normal and mutant PK-genes. *DNA Seq. J. Mapping* 8, 45–53 (1997)
- 12 Tani K., Yoshikubo T., Ikebuchi K. et al.: Retrovirus-mediated gene transfer of human pyruvate kinase (PK) cDNA into murine hamster hematopoietic cells: implications for gene therapy of human PK deficiency. *Blood* 83, 2305–2310 (1994)
- 13 Li H., Haurigot V., Doyon Y. et al. In vivo genome editing restore haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 475, 217–221 (2011)
- 14 Genovese P., Schirolli G., Escobar G. et al.: Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature* 510, 235–240 (2014)
- 15 Jacobasch G., Bauer-Marinovic: Eisen, ein Januskopf-Element. *Ernährungsumschau* 51, 172–176, 231–234, 272–277 (2004)
- 16 Schürle K., Skera A.: Rekombinante therapeutische Proteine – eine Erfolgsgeschichte. *BIOSpektrum* 21. 36–38 (2015)