

Abbildung 2: Die „Fabrik“ Zelle und ihre „Werkstätten“

Mukopolysaccharidosen sind eine Gruppe von 11 verschiedenen erblichen Erkrankungen. Komplex aufgebaute Zuckerketten, die Mukopolysaccharide, können nicht richtig abgebaut werden (Abbildung 1).

Dieser Abbau findet in den Lysosomen, den „Werkstätten für Verdauung und Wiederverwertung“ in der Zelle, mit Hilfe spezifischer „Schraubenschlüssel“, den lysosomalen Enzymen, statt. Für jeden der Zucker aus der Kette ist ein spezielles Enzym erforderlich, sodass der Abbau der Ketten nur in festgelegter Reihenfolge erfolgen kann. Wenn ein Enzym defekt ist, können die anderen nicht arbeiten und die halb abgebauten Ketten sammeln sich an.

Neben den Lysosomen hat die „Fabrik“ Zelle noch viele andere „Werkstätten“ (Abbildung 2). Im Zellkern liegen etwa 30.000 Baupläne („Gene“) für die Eiweißstoffe der Zelle. Diese Baupläne werden kopiert und

zu den Eiweißfabriken, den Ribosomen gebracht, die ihre Eiweißprodukte zum „Golgiapparat“, der Verpackungsabteilung in der Zellfabrik, dirigieren. Dort werden kleine Zuckermoleküle an den Enzymen angebracht, um festzulegen, in welchem Teil der Zelle sie arbeiten sollen. Auch die Mukopolysaccharide werden in diesem Zellbereich produziert und an Eiweißstoffen befestigt. So entstehen komplexe Moleküle, die Proteoglykane, mit zahlreichen Funktionen in der Zelle, z.B. als Gerüstbausteine der „extrazellulären Matrix“, der Kittmasse zwischen den einzelnen Zellen eines Gewebes.

Nach erfolgreicher Funktion werden die Proteoglykane wieder in die Zelle aufgenommen und abgebaut. Dazu müssen sie den Gartenzaun der Zellfabrik, die „Zellmembran“, passieren. In der Zellmembran befinden sich „Tore“ mit sehr spezifischen Rezeptoren, die die Proteoglykane erkennen und in die Zelle eintreten lassen, sodass sie in die Lysosomen transportiert und abgebaut werden können.

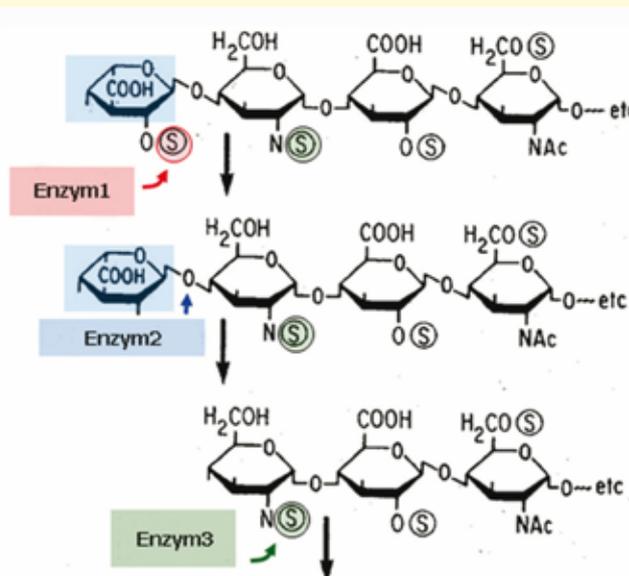


Abbildung 1 USW.

Auch die lysosomalen Enzyme werden nach Bauplänen aus dem Zellkern zusammgebaut und im Golgiapparat mit spezifischen Zuckermolekülen als Adressen versehen. Rezeptoren dafür kommen auch im Golgiapparat vor, sie binden die lysosomalen Enzyme und sorgen für ihren Transport ins Lysosom.

Somit braucht man für einen funktionierenden Abbau sowohl den ausreichenden Einstrom von Enzymen als auch die Anlieferung von „Substraten“ für den lysosomalen Abbau (z.B. Mukopolysacchariden, Membranbausteine, Eiweiß-

stoffe, etc.) in die Lysosomen (Abbildung 3). Wenn bei Mukopolysaccharidosen die Anlieferung funktionstüchtiger Enzyme ausfällt, sammeln sich die halb abgebauten Mukopolysaccharide an, schädigen die Zellen und verursachen die Krankheit.

In den letzten 20 Jahren ist es bisher gelungen für vier Mukopolysaccharidosen und drei andere lysosomale Speichererkrankungen spezifische Enzyme auf gentechnischen Weg zu erzeugen, die man durch Infusion an Patienten verabreichen kann und die so aufgebaut sind, dass sie von den richtigen Rezeptoren erkannt und korrekt in die Lysosomen transportiert werden. Diese Enzymersatztherapie zeigte bisher zum Teil sehr beeindruckende Ergebnisse, z.B. beim Morbus Gaucher, und anderen Krankheitsformen, wo es vorwiegend um eine Behandlung von inneren Organen (Herz, Leber Niere) oder des Bindegewebes geht. Wenig Wirkung zeigte sich bisher im Skelettsystem und unwirksam ist diese Therapie im Gehirn. Dies liegt an der sogenannten Blut-Hirnschranke, die die Aufgabe hat, Nervenzellen vor Schädigungen durch Viren oder fremde Eiweißstoffe zu schützen (Abbildung 4):

Nervenzellen (Neuronen) sind von verschiedenen Hilfszellen, den Gliazellen, umgeben, die sie ernähren und für die Nerventätigkeit wichtige Strukturen, z.B. die sogenannten Myelinscheiden, bilden. Die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff erfolgt über die Kapillargefäße des Blutkreislaufes, die im Gehirn von sogenannten Kapillarendothelzellen fest und lückenlos verschlossen sind. Leider wird im Gehirn bereits in der Neugeborenenperiode die Bildung spezifischer Rezeptoren für lysosomale Enzyme in Endothelzellen abgeschaltet, sodass die therapeutisch verabreichten Enzyme nicht bis zu den kranken Neuronen vordringen können.

Kleine Moleküle, z.B. Zucker, werden von der Blut-Hirnschranke nicht zurückgehalten. Man versuchte daher, die lysosomale Speicherung zu verringern, indem man die Anlieferung von Substraten in die Lysosomen drosselt (Substratreduktionstherapie; Abbildung 3). Ein erfolgreiches Beispiel ist hier das Miglustat (N-Butyldeoxyjirimycin) in der Therapie von Störungen des lysosomalen Abbaus von Membranbausteinen (M. Gaucher, M. Niemann-Pick Typ C) (Abbildung 5): Ein solcher Membranbaustein, Glucosylceramid, wird aus einer Vorstufe, Ceramid, mit Hilfe des Enzyms „UDP-Glucose-N-acylsphingosine-Glucosyltransferase“ durch Einbau eines Glucosemoleküls gebildet. Er dient seinerseits wiederum als Grundstoff für zahlreiche andere, komplexer aufgebaute Substanzen (Lactosylceramid, Ganglioside und Neutrale Glykosphingolipide). Miglustat hemmt spezifisch die Bildung von Glucosylceramid und kann so eine verringerte Speicherung bei M. Gaucher bewirken. Außerdem hoffte man, dass auch andere Erkrankungen, die durch eine Speicherung der Ganglioside oder Neutrale Glykosphingolipide entstehen, durch Miglustat wären. Da sich diese aus bisher nicht völlig geklärten Gründen auch bei Mukopolysaccharidosen

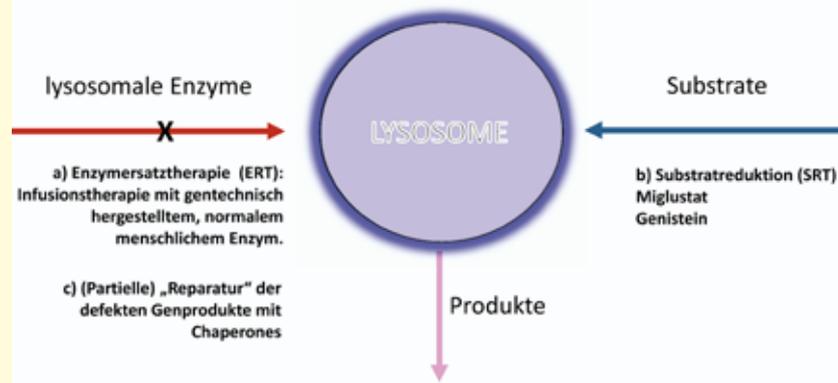


Abbildung 3: Therapiemethoden zur Behandlung lysosomaler Speichererkrankungen

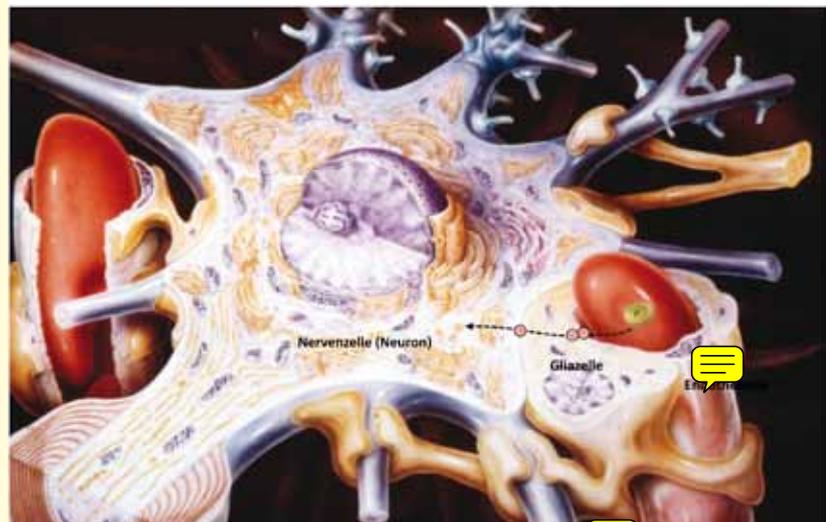


Abbildung 4: Die Blut-Hirnschranke verhindert im im Zentralnervensystem den das bei einer Enzymersatztherapie Protein P kann nicht in die Neuronen gelangen da es keine spezifischen Rezeptoren in Endothelzellen gibt.

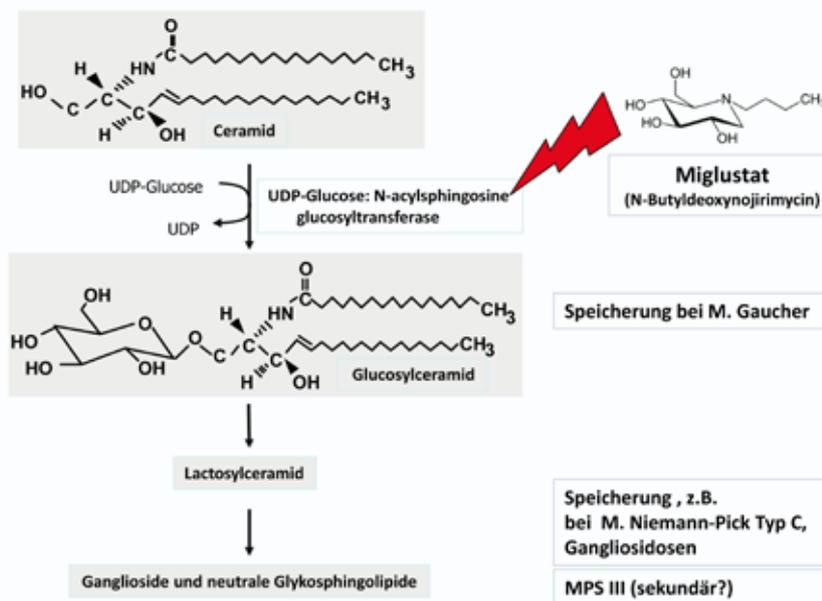


Abbildung 5: Wirkungsweise der Substratreduktionstherapie

als „Begleitstoffe“ ansammeln und möglicherweise Anteil am Krankheitsgeschehen haben, hätte Miglustat vielleicht auch hier einen positiven Effekt.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Miglustat bei Behandlung von M. Gaucher mit mildem oder mittelschwerem Verlauf eine Abnahme der Größe von Leber und Milz und/oder eine verbesserte Funktion des Knochenmarks bewirkt. Es wurde deshalb im Jahre 2002 unter dem Handelsnamen „Zavesca“ als Ergänzung zur Enzymersatztherapie zugelassen. Weiters können Patienten mit M. Niemann-Pick Typ C, einer lysosomalen Speichererkrankung mit komplexen neurologischen Störungen, mit Zavesca behandelt werden (Zulassung 2009). Ein Beweis für eine Besserung der neurologischen Symptome bei MPS III war allerdings nicht zu erbringen (Guffon et al: J. Pediatr., Juni 2011; Epub)

Zahlreiche, zum Teil widersprüchliche Resultate wurden bisher für auch für eine Therapie von MPS III mit Genistein, einem Inhaltsstoff der Sojabohne, veröffentlicht. Im Unterschied zu Zavesca hemmt Genistein allerdings nicht spezifisch ein bestimmtes Enzym, sondern generell den gesamten Stoffwechselweg der Mukopolysaccharid-Synthese. Bisher konnten verschiedene Forschergruppen an kultivierten Hautzellen von Patienten oder bei Versuchstieren mit MPS III eine Verminderung der lysosomalen Speicherung bzw. eine Besserung pathologischer Prozesse im Gehirn nachweisen. Die Ergebnisse aus klinischen Anwendungen am Menschen sind allerdings widersprüchlich. Auch in den allerletzten Arbeiten kommt eine Forschergruppe (Piotrowska et al. (2011)) zum Schluß, dass Genistein die Funktion des Zentralnervensystems bei Patienten mit MPS III verbessert oder zumindest stabilisiert, eine andere (Delgadillo et al. (2011)) findet keinen Hinweis auf positive Effekte.

Schließlich gibt es noch eine weitere, aktuelle Strategie bei der Suche nach einer Therapie von Mukopolysaccharidosen mit kleinen Molekülen. Sie versucht nicht, durch Gabe von intaktem Enzym oder niedermolekularen Stoffwechselhemmern, sondern mit Hilfe von „Chaperonen“ die durch die Genmutationen fehlerhafte Enzyme zu reparieren und den Abbau zu verbessern (Abbildung 3c). Um diese Ansätze zu verstehen muss man näher auf die Funktion von Zellkern und Ribosomen

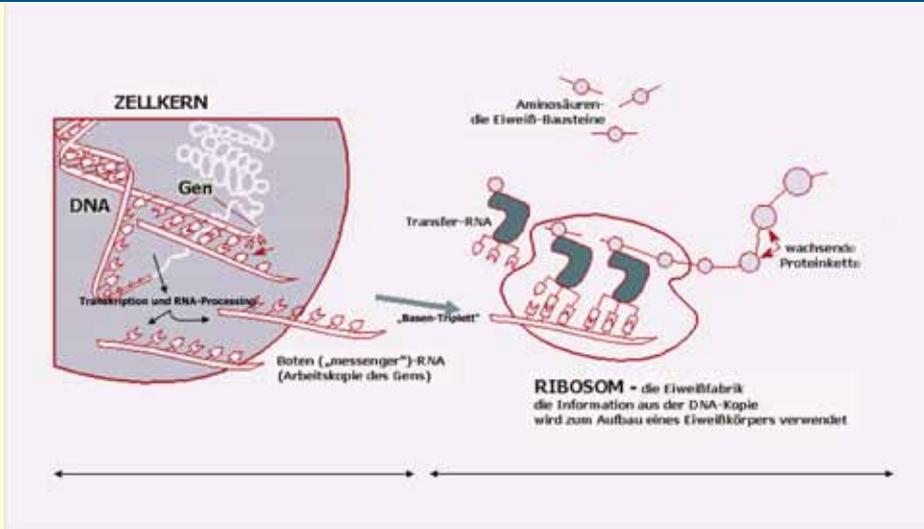
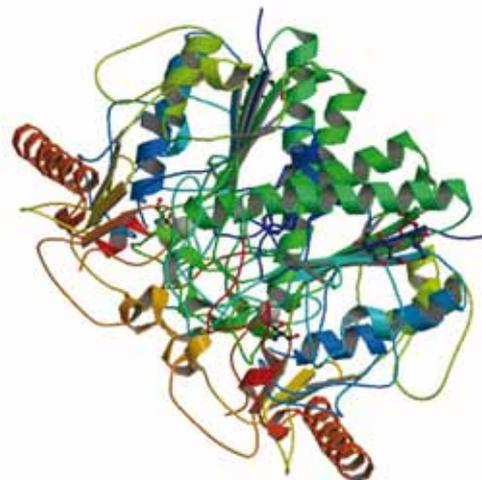


Abbildung 6 : Wie wird die Erbinformation in Protein übersetzt?



Modell der Arylsulfatase A

Abbildung 7: Was bewirken Gen-Mutationen?

Die Abfolge („Sequenz“) der Basen auf der DNA bestimmt die Sequenz der Aminosäuren im Protein. Die Sequenz der Aminosäuren bestimmt die Faltung der Proteinkette

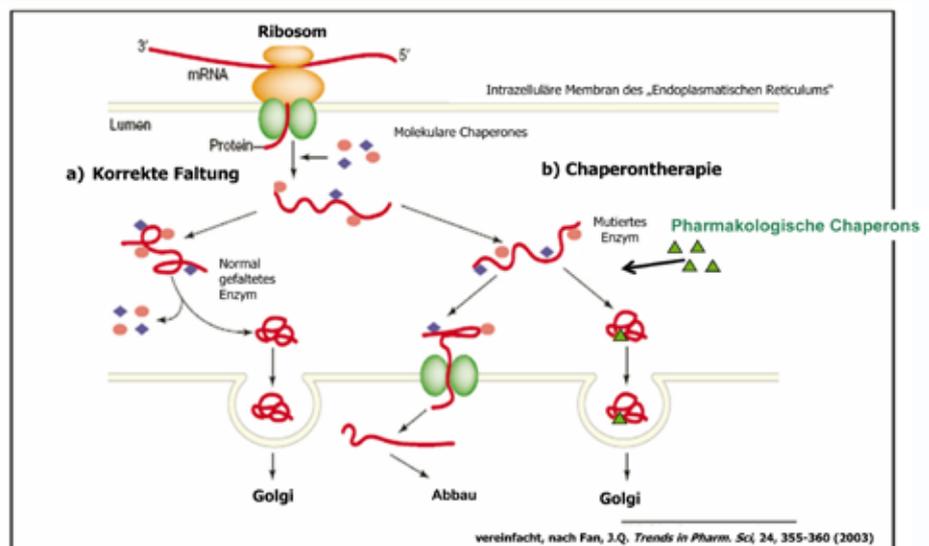


Abbildung 8: Das Prinzip der Chaperontherapie

bzw. die Arbeitsweise der Enzyme eingehen (Abbildung 6):

Im Zellkern sind in den Genen die Baupläne für alle Eiweißstoffe der Zelle aufbewahrt. Wenn in den Ribosomen ein Enzym gebildet werden soll, müssen die Baupläne im Zellkern

kopiert und für die Produktion lesbar gemacht werden (Transkription und RNA-processing) Diese Arbeitskopien (Boten-RNA; englisch „messenger-RNA; m-RNA) werden dann zu den Ribosomen gebracht und für die Eiweißproduktion eingesetzt.

Eiweißkörper sind lange Ketten aus 21 verschiedenen Aminosäuren. Die Reihenfolge, mit der diese Bauelemente im Protein angeordnet sind (die „Aminosäuresequenz“), bestimmt seine Funktion. Sie ist in der Boten-RNA mit Hilfe eines „Alphabets“ von 4 verschiedenen Code-Buchstaben (den „Basen“) festgelegt, wobei je 3 Buchstaben ein Code-„Wort“ für eine Aminosäure ergeben. Diese „Worte“ werden im Ribosom abgelesen. Hilfsmoleküle (Transfer-RNA) suchen die Aminosäure aus, die dem richtigen Codewort entspricht und knüpfen sie an die wachsende Proteinkette im Ribosom an, bis ein Code für das Ende der Kette im Bauplan steht. Die Abbildung 7 zeigt das Modell eines lysosomalen Enzyms als Ergebnis dieses Vorgangs, eine lange Kette von Aminosäuren die zu einem anscheinend wirren Knäuel zusammengefaltet ist. Diese Faltung ist allerdings nicht zufällig, sondern genau festgelegt. Somit bestimmt die Abfolge der Basen in der DNA die Sequenz der Aminosäuren im Protein. Die Sequenz der Aminosäuren bestimmt seine Faltung und damit seine Funktion. Abbildung 8 zeigt wie an einem Ribosom aus einer m-RNA ein Protein produziert wird. Seine richtige Faltung wird dadurch erzeugt dass sich kleine Moleküle, die molekularen Chaperones, an die Kette anlegen und sie so in die richtige Form bringen. Danach setzt das fertig gefaltete Protein sie wieder frei und wird vom Golgi-Apparat für den Versand verpackt. In Abbildung

9b) kann sich ein Enzym, wegen eines Fehlers in der Abfolge der Basen in der DNA nicht richtig falten. Im Normalfall werden derartige fehlerhafte Produkte sofort abgebaut. Pharmakologische Chaperone können eingesetzt werden, um falsch gefaltete Enzyme „gerade zu biegen“ d.h. zu erreichen, dass sich die durch Mutationen fehlerhaft aufgebauten Enzyme so falten, dass sie ihre Funktion zumindest teilweise wiedererlangen und dem vorzeitigen Abbau entgehen.

Tabelle 1 gibt einen vereinfachten Überblick über derzeit laufende Versuche zur Entwicklung von pharmakologischen Chaperones für Lysosomale Speichererkrankungen. Für vier Erkrankungen (M.Gaucher, M. Fabry, GM2-Gangliosidose und M. Pompe) laufen derzeit Zulassungsverfahren der Stufe 2 und 3. Für zahlreiche andere Substanzen gibt es Daten für ihre Wirksamkeit aus Experimenten an kultivierten Zellen und Versuchstieren., wie z.B. einem Präparat für Mukopolysaccharidose IIIC von einer Arbeitsgruppe aus Kanada.

Mit Unterstützung der Forschungsgesellschaft für MPS und Verwandte Erkrankungen und dem Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung wurden an der Grazer Kinderklinik, in den letzten Jahren gemeinsam mit dem Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Graz Versuche zur Entwicklung von Chaperones

für GM1-Gangliosidose und MPS IVB durchgeführt. Insgesamt drei neue, wirksame Substanzen konnten beschrieben werden, mit denen für einzelne Mutationen des betroffenen  $\beta$ -Galaktosidase-Gens in kultivierten Zellen bis zu 10-fache Steigerungen der Aktivität und eine Normalisierung ihres Transports in die Lysosomen möglich ist. Somit scheint es aussichtsreich, diese Substanzen an Tiermodellen zu erproben. Zuvor sind allerdings noch offene Fragen zu ihrem Stoffwechsels in der Zelle und ihren Auswirkungen auf die Funktion lysosomaler Enzyme zu klären.

**Kontakt:**

**Ao.Univ.Prof.Dr. Eduard Paschke**  
**Medizinische Universität Graz**  
**Biochemische und Molekulargenetische Diagnostik**  
 Eduard.Paschke@klinikum-graz.at  
 ++43-316-385-14035  
 A – 8036 Graz



**Tabelle 1: Zugelassene Therapien und Pharmakologische Chaperones für Lysosomale Speichererkrankungen\*)**

Krankheit	Enzym	Zugelassenes Präparat	Pharmakologische Chaperones	
			Name	Status
Fabry	$\alpha$ -Galactosidase A	Fabrazyme (agalsidase beta) Replagal (agalsidase alfa)	DGJ (AT1001; Amigal™) Galaktose	Phase 3 Präklinisch
Gaucher	Saure $\beta$ -Glucosidase	Cerenzyme (imiglucerase) VPRIV (velaglucerase alfa) Zavesca (Miglustat; NB-DNJ)	Isofagomine Ambroxol + 17 Substanzen	Phase 2 Pilotstudie Präklinisch
GM2 Gangliosidose	Saure $\beta$ -Hexosaminidase	Keines	Pyrimethamine + 6 Substanzen	Phase 2 Präklinisch
Pompe	Saure $\alpha$ -Glucosidase	Myozyme (alglucosidase alfa) Lumizyme	Desoxynojirimycin (DNJ; AT2220) NB-DNJ (Miglustat) NO-DNJ	Phase 2 Präklinisch
MPS IIIC	Heparansulfat-AcetylCoA: GINAc-Transferase	Keines	Glucosamin	Präklinisch
<b>GM1 Gangliosidose Morquio B</b>	<b>Saure <math>\beta</math>-Galaktosidase</b>	<b>Keines</b>	<b>3 Substanzen, davon 3 aus unserer Gruppe</b>	<b>Präklinisch</b>

\*) Vereinfacht nach: Valenzano et al (2011) *Assay and Drug Development Technologies*, 9/3, 213-235