

Silvana Opp
Dr. sc. hum

Der zerebrale Lysinmetabolismus, dessen angeborene Störung und therapeutische Modulation bei der Glutarazidurie Typ I

Promotionsfach: Kinderheilkunde
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. phil.nat. Jürgen Okun

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Pathophysiologie von angeborenen Defekten im Lysinstoffwechsel mit dem Fokus auf die Glutarazidurie Typ I (GA I). Für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ist ein umfassendes Verständnis des gesamten Abbauweges von L-Lysin notwendig. Das defiziente Enzym bei der GA I ist die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH), welches im Abbau von L-Lysin die Umwandlung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA katalysiert. Bei einem Defekt dieses Proteins akkumulieren die neurotoxischen Metabolite Glutarsäure (GA), 3-Hydroxyglutarsäure (3-OH-GA) und Glutaryl-CoA in Körperflüssigkeiten und Organen von Patienten. Als Folge entwickeln Patienten irreversible, neurologische Schäden der Basalganglien.

Der Lysinstoffwechsel setzt sich aus zwei Abbauwegen zusammen. Zuerst sollte der mitochondriale Saccharopinweg, Hauptabbauweg von L-Lysin und der alternative peroxisomale Pipecolatabbauweg von L-Lysin im Mausmodell beschrieben werden. Dafür wurden anhand von Aktivitätsmessungen die Enzyme des mitochondrialen Abbauweges α -Aminoadipatsemialdehyd-Synthase (AASS), α -Aminoadipatsemialdehyd-Dehydrogenase (AASDH) und α -Aminoadipat-Transaminase (AADAT) in Leber, Niere und Gehirn charakterisiert werden. Durch subzelluläre Fraktionierung konnte die intrazelluläre Lokalisation der Enzyme des mitochondrialen Abbauwegs geklärt werden. Das bifunktionelle Schlüsselenzym AASS des Hauptabbauweges von L-Lysin konnte enzymatisch in Leber und Niere, aber nicht im Gehirn von Mäusen nachgewiesen werden. Zusammen mit einer Analyse der AASS-mRNA, die eine Expression in Leber, nicht aber im Gehirn ergab, deuten diese Ergebnisse auf ein alternatives Enzym für den Abbau von L-Lysin im Zentralnervensystem hin. Ein besonderes Augenmerk lag daher auf der Untersuchung des zweiten beschriebenen Abbauweges, dem sog. Pipecolatstoffwechselweg. Hierbei konnte über den Nachweis von Intermediaten dieses Stoffwechselweges in Metabolomstudien und über den enzymatischen Nachweis des Schlüsselenzyms L-Pipecolatoxidase in peroxisomalen angereicherten Fraktionen aus dem Gehirn von Mäusen gezeigt werden, dass neben dem Hauptabbauweg auch ein zerebraler alternativer Abbauweg existiert.

Als weiteres Ziel sollte die Neuropathogenese der GA I, der schwersten Form eines Defektes im Lysinstoffwechselweg, biochemisch, bioenergetisch und histologisch im Gcdh-defizienten Mausmodell charakterisiert werden. Hierfür wurde ein klinischer Phänotyp durch eine lysinreiche Diät in diesen Mäusen induziert (Zinnanti et al., 2006 und 2007), der zum Versterben der Tiere führte. Die Überlebensdauer der Tiere war neben der Diät auch vom Alter der Gcdh-defizienten Mäuse abhängig. Jungtiere zeigten eine Gewichtsreduktion und eine verminderte Nahrungsaufnahme und verstarben schließlich unter der Diät, während adulte Tiere überlebten. Biochemisch waren die erkrankten Gcdh-defizienten Jungtiere gekennzeichnet durch erhöhte Harnstoffkonzentrationen und erhöhtes Citrullin und Ornitin, die zusammen mit der Gewichtsreduktion die Induktion einer katabolen Stoffwechsellage unter Lysingabe nahelegt. Auch die metabolischen Marker GA, 3-OH-GA und Glutaryl-carnitin der GA I waren in erkrankten Gcdh-defizienten Tieren im Vergleich zu Gcdh-defizienten Tieren ohne klinischen Phänotyp erhöht. Hinweise, die auf ein Lebersversagen hindeuten könnten, wie zum Beispiel erhöhte Ammoniakkonzentrationen im Serum, wurden nicht gefunden. Histologisch konnte keine eindeutige neurologische Ursache für das Versterben und den akuten klinischen Phänotyp der Gcdh-defizienten Mäuse festgestellt werden. Jedoch zeigten alle Gcdh-defizienten Mäuse, unabhängig von der Diät, eine selektive Spongiose in hippocampalen Arealen. Diese Schädigungen könnten durch neurotoxische Langzeiteffekte (z.B. Exzitotoxizität) in Folge einer chronischen GA, 3-OH-GA und Glutaryl-CoA Exposition während der prä- und postnatalen Entwicklung entstanden sein.

Um die Energiehomoöostase nach Induktion eines klinischen Phänotyps im Mausmodell zu untersuchen, wurden Einzelenzyme von Glykolyse, Zitratzyklus und oxidativer Phosphorylierung untersucht. Bioenergetisch ließ sich eine leichte Störung der Glykolyse in Leber und Gehirn von Mäusen mit klinischem Phänotyp zeigen. Eine funktionelle Schädigung der Einzelenzyme der oxidativen Phosphorylierung war nicht vorhanden. Am ausgeprägtesten war die funktionelle Beeinträchtigung des Zitratzyklus. Bereits bekannt ist eine Hemmung des OGDHc durch Glutaryl-CoA (Sauer et. al., 2005), erstmals konnte aber auch eine funktionelle Schädigung des OGDHc und der Aconitase in Leber und Gehirn nach Induktion eines klinischen Phänotyps durch eine lysinreiche Diät in Gcdh-defizienten Mäusen gezeigt werden. Die Befunde aus den bioenergetischen Untersuchungen lassen sich möglicherweise auf Schädigungen durch z.B. oxidativen Stress zurückführen. Zusammenfassend konnte der dem Menschen ähnliche klinische Phänotyp in Gcdh-defizienten Mäusen nicht abgebildet werden. Die histologischen, biochemischen und bioenergetischen Studien im Gcdh-defizienten

Mausmodell bestätigen aber das für die GA I bestehende pathomechanistische Konzept eines synergistischen Schädigungsmodelles durch Dysfunktion des Energiestoffwechsels sowie durch oxidativen Stress, welches durch katabole Stoffwechsellagen *getriggert* wird.

Besonders gut eignete sich das Gcdh-defiziente Mausmodell für die Prüfung bestehender diätetischer Therapien und Empfehlungen für GA I. Eine lysinarme Diät senkte die Spiegel von GA in Leber und Gehirn in Gcdh-defizienten Mäusen, dagegen wirkte eine L-Carnitinsupplementation protektiv durch Detoxifikation von toxischen Glutaryl-CoA über Bildung von Glutarylcarnitin. Der therapeutische Effekt einer lysinarmen Diät wurde durch eine zusätzliche L-Argininsupplementation erhöht. Dieser Effekt beruht auf der Kompetition von L-Lysin und L-Arginin am γ^+ Transportsystem der Bluthirnschranke und an den mitochondrialen Ornitrintransportern. Zusätzlich konnten durch eine pharmakologische Stimulation des alternativen peroxisomalen Abbauwegs von L-Lysin mit Clofibrat die GA Konzentrationen sowohl in Leber als auch im Gehirn von Gcdh-defizienten Mäusen gesenkt und somit ein neuer Ansatzpunkt in der Therapie für die GA I eröffnet werden.