

# Porphyrien im Wandel der Zeit

## Von der Biochemie zur Gentherapie

Elisabeth I. Minder, X. Schneider-Yin, B. Schäfer & U. Rüfenacht, Zürich

### Zusammenfassung

Porphyrien sind eine Gruppe von angeborenen Stoffwechselstörungen. Hauptsymptome der Porphyrien sind anfallsweise auftretende Bauchschmerzen und psychische Veränderungen einerseits oder aber eine Überempfindlichkeit auf Sonnenlicht andererseits. Berühmte Persönlichkeiten, die möglicherweise an einer Porphyrie litten, sind Vincent van Gogh und König Georg III. von England. Die Diagnose einer Porphyrie basiert auf dem Nachweis erhöhter Stoffwechselprodukte in verschiedenen Körperflüssigkeiten. Die Ursache der Porphyrien liegt in vererbten Defekten einzelner Enzyme der Biosynthesekette von Häm. Verschiedene molekulargenetischen Defekte dieser Enzyme sind heute bekannt, die zu einer Reduktion der Enzymaktivität führen. Durch gezielte, künstlich eingeführte Veränderungen in der Gensequenz können solche veränderten Enzyme *in vitro* hergestellt, die Reduktion der Enzymaktivität gemessen und mit dem Schweregrad des klinischen Bildes korreliert werden.

Da bei den meisten dieser Porphyrien keine effektive Therapie existiert, setzt man heute die Hoffnungen in die somatische Gentherapie, die erlauben soll, das defekte Gen durch ein gesundes Gen zu ersetzen. Bei zwei Porphyrie-Formen sind bereits *in vitro*-Versuche erfolgreich verlaufen. Jedoch sind bis zur Anwendung am Patienten noch einige wesentliche Hindernisse zu überwinden.

### *Porphyrias in changing times – from biochemistry to gene therapy*

*Porphyrias are a group of inherited disorders of porphyrin metabolism. The main symptoms of porphyrias can be either repeated attacks of abdominal pain and psychotic symptoms, or a hypersensitivity to the sunlight. Well-known dignitaries, who might have suffered from porphyrias, were Vincent van Gogh and King George III of England. The diagnosis of porphyrias can be established by increased levels of porphyrines in various body fluids. Defects in the enzymes of the heme-biosynthetic pathway are the causes of porphyrias. Many of these defects have been identified in the respective genes. In vitro substitution of the normal gene sequence by a defect one allows the study of the effect of this particular defect on the enzyme activity and the correlation with clinical expression. Since there is no effective therapy for most of the porphyrias, people focus their attention on the gene therapy research, i.e. replacing the defect genes by normal ones that might bring a correction of the disorders and in turn cure the patients. Successful in vitro gene therapy experiments have shown promising results in two forms of porphyrias. However, there are still some obstacles to be overcome before applying gene therapy to patients.*

### 1 EINLEITUNG

Zum Auftakt eine Quizfrage: Was haben Seine Majestät, König Georg III. von England, Vincent Van Gogh, der Werwolf und Garfield gemeinsam?

Um die Antwort zu vereinfachen, werden die Krankengeschichten der vier Personen in einer kurzen Fassung vorgestellt:

- **König Georg III. von England** (1738–1820) erlitt fünf grössere *Attacken* einer Krankheit, und zwar im Alter von 26 Jahren sowie von 50, 62, 66 und 82 Jahren (MACALPINE & HUNTER, 1966). Die letzte Attacke führte zum Tode. Dazwischen traten diverse kürzere *Attacken* auf. *Seine Symptome waren:* Bauchkoliken mit Verstopfung, schneller Puls, Störung der Berührungsempfindung der Haut. Zudem litt er unter psychischen Symptomen, die als Verrücktheit diagno-

stiziert wurden. Seine Urinfarbe wurde als «gallehaltig» oder als «blutiges Wasser» beschrieben. Die Erkrankung ging als «the Royal Malady» in die Geschichte ein und führte seinerzeit zu heftigen Diskussionen über die weitere Existenzberechtigung der Monarchie in England. Die amerikanischen Kolonien erkämpften sich unter seiner Regentschaft die Unabhängigkeit, wobei nicht auszuschliessen ist, dass die königliche Schwäche dieses Unabhängigkeitsbestrebens erleichterte.

- **Vincent van Goghs** Krankengeschichte ist derjenigen von König Georg in vieler Hinsicht recht ähnlich (LOFTUS & ARNOLD, 1991). Der Beginn der Erkrankung fiel ins junge Erwachsenenalter. Vorherrschend waren episodisch auftretende gastrointestinale Störungen, neurologische und psychische Symptome, die – wie bekannt – zu psychiatrischer Internierung führten. Die Krankheit verschlimmerte sich durch Überarbeitung, ungenügende Ernährung und Alkoholmissbrauch. Van Goghs Familienangehörige litten unter ähnlichen Symptomen.

- **Der Werwolf** weist völlig andere Symptome auf. Sie sind in einem französischen Spezialwerk folgendermassen beschrieben: «Der Werwolf zeigt sich nur nachts, speziell in Vollmondnächten. Er ist eigentlich ein Mensch, der sich in einen Wolf verwandelt... Diese Verwandlung kann auch nur partiell erfolgen. Er bewahrt auch nach seiner Rückverwandlung gewisse Eigenschaften seiner Wolfsnatur in seinem menschlichen Erscheinungsbild wie Haare auf den Händen, Kratzspuren und Verletzungen.»

- **Garfield**, der antiheldische Comics-Kater und letzter der vier Protagonisten, ist sicher eine sehr bekannte Persönlichkeit; weniger bekannt dürfte seine Krankengeschichte sein: Bekannt ist zwar sein ungewohntes, häufig bizarres Verhalten ... das gemäss den neuesten Erkenntnissen höchst wahrscheinlich durch eine spezifische Krankheit verursacht wird, wie die Abb. 1 zeigt. Auf die freundliche Einladung, das schöne Wetter zu geniessen ... reagiert er kurz angebunden ... und völlig unverständlich, ja hysterisch!

Sicher werden Sie in Anbetracht des Titels dieser Arbeit die Antwort auf die anfängliche Quizfrage bereit haben. Ich vermute allerdings, dass Ihre Antwort nicht ganz korrekt ist. Denn Sie denken wahrscheinlich, die angesprochenen Persönlichkeiten leiden an einer Porphyrie. Genauer ist jedoch, dass bei ihnen die **Verdachtsdiagnose** Porphyrie besteht, denn der endgültige Beweis steht aus. Die klinischen Symptome allein erlauben nicht die endgültige Diagnose einer Porphyrie zu stellen! Den Beweis brächte allein die Laboruntersuchung. Wir werden weiter unten darauf eingehen.



Abb. 1. Garfields Krankheit.

Fig. 1. Garfield's illness.

## 2 BIOCHEMIE DER HÄM-BIOSYNTHESE

Zuerst aber soll erklärt werden, was Porphyrien sind. Es handelt sich bei diesen Krankheiten um vererbte Störungen der Häm-Synthese (KAPPAS et al., 1989). Häm ist, wie sein Name andeutet, ein Bestandteil des roten Blutfarbstoffes Hämoglobin.

Häm ist eine sehr wichtige Verbindung im Stoffwechsel. Kein Organismus kann ohne Häm existieren. Das zeigt sich z. B. dadurch, dass fast alle Organismen, von den Einzellern bis hin zu den Körbchenblütlern und zum Menschen, die gesamte Häm-Synthesekette aufweisen. Ausgehend von einfachsten chemischen Verbindungen des Intermediärstoffwechsels, dem Glycin und dem Succinyl-Coenzym A synthetisiert der Organismus über viele Zwischenstufen das Endprodukt Häm. Auch Vitamin B 12 und Chlorophyll – beide chemisch nahe verwandt mit Häm – weisen einen weitgehend identischen Syntheseweg auf.

Beim Menschen findet die Hämsynthese zum überwiegenden Anteil im Knochenmark statt. Dieses Häm wird für den Einbau in das Hämoglobin verwendet. Etwa achtmal weniger Häm wird in der Leber synthetisiert. Es wird für Enzyme benötigt, die u. a. beim Arzneimittel-Abbau beteiligt sind. Im weiteren wird ein geringer Anteil des Häms in jeder Zelle hergestellt, wo es in den Zytochromen am Energiestoffwechsel bzw. der Zellatmung beteiligt ist.

Wir werden weiter unten sehen, dass bei einigen Porphyrien die **Störung** der Häm-Synthese vorwiegend im Knochenmark liegt, bei anderen überwiegend in der Leber. Dieser Umstand ist nicht nur für die biochemischen Untersuchungen wichtig, auch die Ansätze der Gentherapie müssen sich mit diesen Fakten auseinandersetzen.

Das ganze komplexe Porphyrin-Molekül wird aus dem einfachen Molekül Aminolävulinsäure synthetisiert (Abb. 2). Zuerst werden zwei Moleküle Aminolävulinsäure zusammengefügt, die zusammen Porphobilinogen ergeben. Vier dieser Moleküle werden zur linearen Verbindung Hydroxy-Methylbilan aneinandergelagert. Im nächsten Schritt wird der letzte der vier Pyrrolringe umgedreht und das vorher

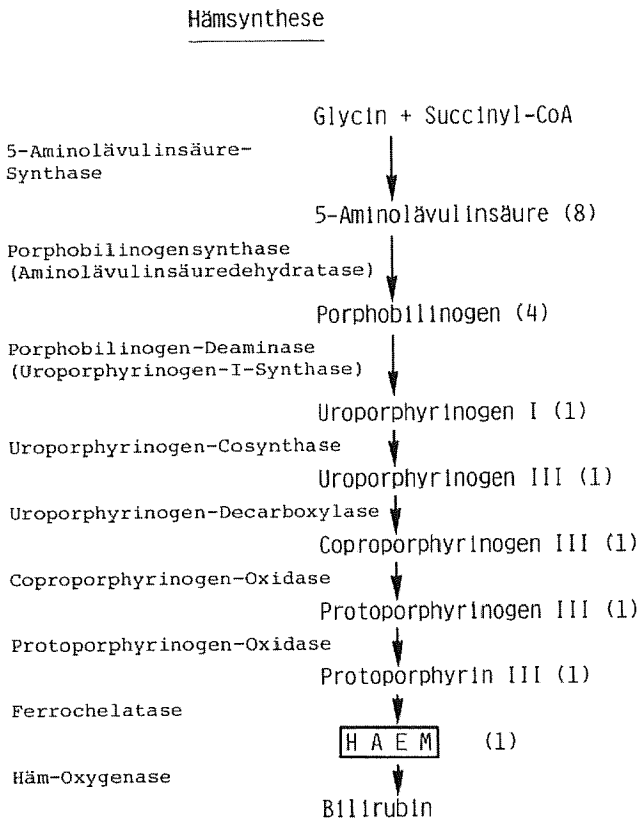


Abb. 2. Die einzelnen Schritte der Häm-Biosynthese.

Fig. 2. Heme biosynthetic pathway.

lineare Molekül zu einem planaren Ringsystem geschlossen. Die Seitenketten des ersten Porphyrin-Rings, des Uroporphyrins, werden verkürzt, das Molekül wird oxidiert und zuletzt wird ein Eisenatom in das Zentrum eingesetzt. Insgesamt sind sieben Enzyme an der Synthese beteiligt. Vererbte Defekte sind heute von jedem dieser Enzyme bekannt, die je zu einem typischen Krankheitsbild führen. Wie bereits erwähnt, wird die ganze Gruppe dieser angeborenen Krankheitsbilder unter dem Namen *Porphyrien* zusammengefasst.

### 3 DIE PORPHYRIEN ALS SYNTHSESTÖRUNGEN DES HÄMS

Wenn wir uns nun mit den vier anfänglich erwähnten Kranken beschäftigen, finden wir zwei Hauptsymptom-Gruppen: einerseits die *akuten Formen* mit den Bauchsymptomen, neurologischen Ausfällen und psychiatrischen Abnormitäten. Prototypen davon sind der als «verrückt» in die Geschichte eingegangene König Georg III. von England und Vincent Van Gogh. Andererseits sehen wir die Formen mit

*Licht- und Sonnenüberempfindlichkeit*. Dieses Krankheits-symptom führt zu Hautschäden. Als Prototypen dieser zweiten Krankheitsgruppe wurden Garfield und der Werwolf aufgeführt. – Patienten beider Gruppen zeigen oft scheinbar hysteriformes Verhalten, das besonders schön durch den Sketch von Garfield illustriert wird.

Ein wichtiges Symptom, das auch Laien auffällt, wurde bisher nur am Rande erwähnt: die rotbraune Verfärbung des Urins, die die meisten Patienten mindestens in bestimmten Krankheitsphasen zeigen. Die erste medizinische Dokumentation dieser Urin-Verfärbung stammt von STOKVIS (1889), einem damals bekannten niederländischen Professor. Diese Verfärbung ist so auffällig, dass verwunderlich ist, dass nicht schon weit früher davon berichtet wurde. Die Rotverfärbung des Urins gab den Porphyrien den Namen, von Griechisch *porphyros*, gleich Purpur.

Der Zusammenhang dieser Urinfarbstoffe mit dem Häm war schon bald offensichtlich. Zuerst wurde er jedoch als Abbauprodukt des Häms gedeutet. Erst später wurde klar, dass es sich um eine Synthesestörung des Häms handelt. Um uns ein Bild von einer Stoffwechselstörung zu machen, können wir die Biosynthese von Häm mit einer Autobahn vergleichen. Beim Gesunden ist die Autobahn durchgehend 3spurig. Bei einer angeborenen Stoffwechsel-Störung hat es an einer gewissen Stelle eine Einengung; es entsteht ein Stau. Die Untersuchung, **wo** der Stau **lokalisiert** ist, entspricht der Messung der Stoffwechselprodukte. Die Laboruntersuchung zeigt, welche davon im Übermass auftreten, also Stau anzeigen. Damit lässt sich lokalisieren, wo im Syntheseweg ein Engpass besteht, was seinerseits die genaue Diagnose ermöglicht.

Die Porphyrine machen dem Labormediziner ein Geschenk: Sie haben eine sehr intensive, purpurrote Fluoreszenz, eine Lichtemission bei 620 nm, d. h. in *dem* sichtbaren Bereich, wo kaum noch etwas anderes die Analyse stören könnte. Darauf basiert denn auch der quantitative Nachweis. Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie ist die Methode der Wahl zur Trennung der verschiedenen Stoffwechselprodukte. Die entstehenden chromatographischen Muster (Abb. 3) können nach einiger Erfahrung im Detail interpretiert werden. Aber auch ohne diese Erfahrung ist es offensichtlich, dass das linke Chromatogramm mit den kleinen «Peaks» einer Normalprobe entspricht, während rechts die vielen Peaks die im erwähnten Übermass auftretenden Stoffwechselprodukte bei einem Porphyrie-Patienten zeigen.

Die Enzyme der Hämsynthese sind weit weniger stabil als die Stoffwechselprodukte. Deswegen werden teilweise lebende Zellen des Patienten als Ausgangsmaterial benötigt.

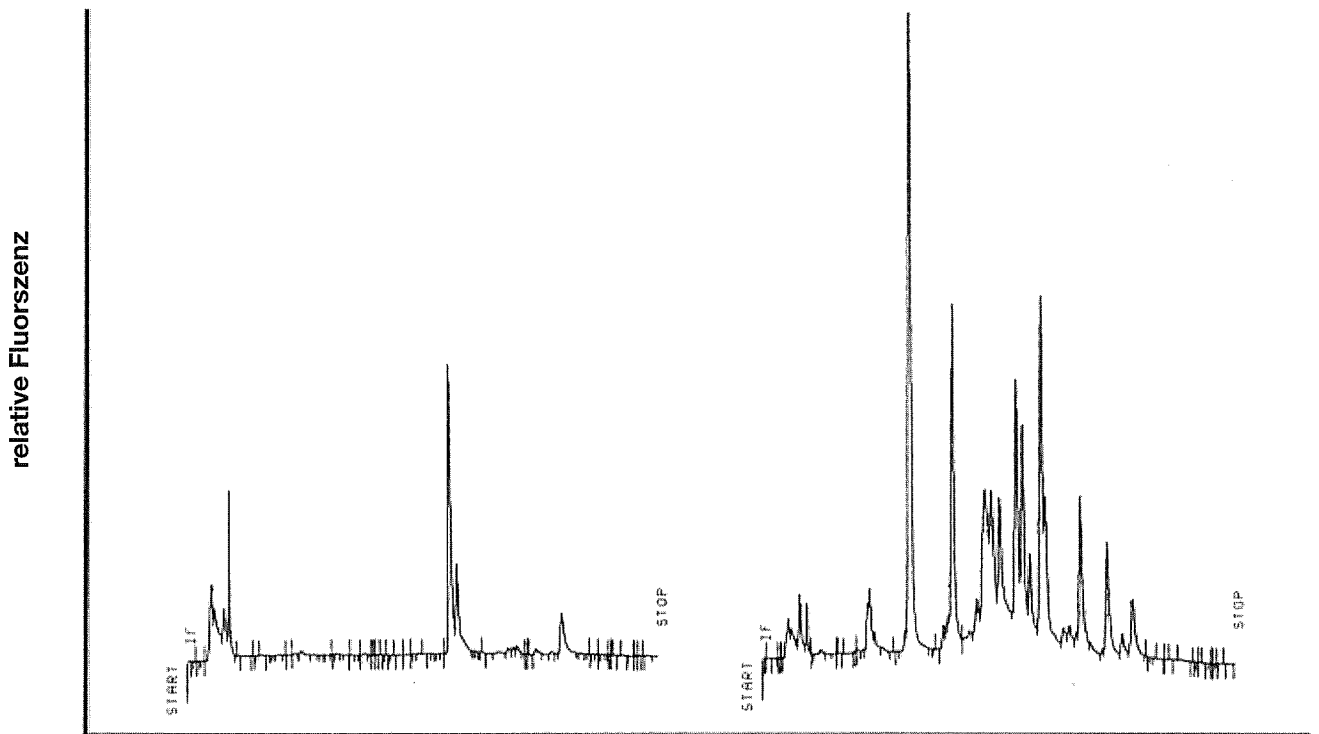


Abb. 3. Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC) von zwei Stuhlproben (Trennbedingungen in E.I. MINDER et al., 1992. Clin. Chem. 38, 516): links von einem normalen Probanden, rechts von einem Patienten mit *Porphyria cutanea tarda*. Der Patient scheidet nicht nur vermehrt Porphyrine aus, was durch höhere «Peaks» angezeigt wird. Es sind auch zusätzliche Peaks nachweisbar, die weiteren, beim Gesunden nicht nachweisbaren Porphyrinen entsprechen.

Fig. 3. Measurement of two stool samples by HPLC. The chromatogram from a patient with porphyria cutanea tarda (right) shows a mixture of increased porphyrines and their metabolites comparing to that of a normal individual (left).

Für die Diagnostik im Alltag sind solche Untersuchungen aber wenig gebräuchlich. Sie sind jedoch wichtig im Zusammenhang mit molekularbiologischen Methoden.

#### 4 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Molekularbiologische Methoden ermöglichen die Herstellung der Enzyme der Hämsynthese in grösseren Mengen, falls die genaue Genstruktur bekannt ist. Zu ihrer Identifizierung wird meist von der Struktur des Enzyms ausgegangen. Die Aminosäuresequenz des Enzymproteins wird mindestens stückweise in den genetischen Code übersetzt und die entsprechenden DNA-Bruchstücke, hier als spezifische Oligonucleotide bezeichnet, werden synthetisiert. Diese Bruchstücke werden eingesetzt, um grössere DNA-Sequenzen «herauszufischen», die spezifisch für das gesuchte Enzymmolekül sind. Eine Voraussetzung für dieses «Herausfischen» ist die berühmte Doppelhelix-Struktur der DNA. Diese wird chemisch in die zwei komplementären Stränge

aufgebrochen und das synthetische DNA-Bruchstück zugegeben. Dieses lagert sich anstelle des originalen DNA-Stranges an den Komplementärstrang, der so identifiziert werden kann. Er wird isoliert und auf seine DNA-Sequenz untersucht.

Ist das Gen bekannt, so kann es in ein Bakterium eingebracht und dort in das zugehörige Eiweissmolekül übersetzt werden (Abb. 4). Dazu wird dieses Gen in einen Vektor eingebaut. Häufig wird dafür ein Plasmid gebraucht, ein Bestandteil eines Bakteriums aus genetischem Material. Nach Vorbehandlung nimmt das Bakterium den Vektor auf. Wenn sich das Bakterium vermehrt, vermehrt sich auch der Vektor mit dem eingefügten Gen. Durch geeignete Behandlung wird der Stoffwechsel des Bakteriums so verändert, dass nun vorwiegend das uns interessierende Genprodukt anstelle der Bakterien-Eiweisse hergestellt wird. Nach kurzer Zeit bringen solche Bakterienkulturen grössere Mengen des gewünschten Eiweissmoleküls. Nach weiterer Aufreinigung lässt es sich gezielt untersuchen. Das Enzym der Hämsynthe-

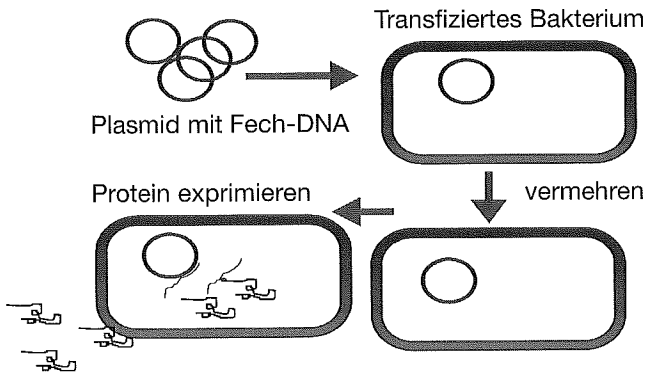


Abb. 4. Herstellung von menschlichem Protein in Bakterien. Das zu synthetisierende Gen wird in ein Plasmid eingebracht. Dieses wird in ein Bakterium eingeschleust, das dann vermehrt wird. Hat die Bakterien-Population eine gewisse Dichte erreicht, wird durch die Zugabe einer Substanz der Bakterien-Stoffwechsel auf Eiweiss-Synthese umprogrammiert. Je nach der Grösse des Ansatzes können mit dieser Methode mg- bis g-Quantitäten relativ reinen Eiweisses gewonnen werden.

Fig. 4. The production of a human protein in a bacterium. A plasmid is used to carry the synthetic gene into a bacterium. As it multiplies, large quantities of the nearly pure enzyme are produced.

se, das in dieser Art am umfassendsten untersucht wurde, ist die PBG-Deaminase.

Die PBG-Deaminase oder Urosynthase ist das Enzym, das bei der akut-intermittierenden Porphyrie betroffen ist. Der Prototyp mit dieser Erkrankung ist Vincent Van Gogh, dessen Symptome oben erwähnt wurden. Bei solchen Patienten mit angeborenen Enzym-Defekten kann gezielt die Mutation, genauer gesagt die Veränderung der DNA-Sequenz, gesucht werden (DEYBACH & PUY, 1995). Solche Untersuchungen interessieren, weil bei den Porphyrien fast jede betroffene Familie ihre ganz spezielle Mutation aufweist. Dies ist bei anderen angeborenen Störungen oft nicht der Fall. Bei der Zystischen Fibrose z. B. sind 70% der Mutationen identisch.

Durch gezielte Mutationen, ein Verfahren, das durch die Gruppe von Professor Weissmann hier in Zürich entwickelt wurde, lassen sich einzelne Bausteine des Eiweissmoleküls verändern. Das veränderte Molekül kann wiederum durch Bakterien synthetisiert werden. Die veränderten Enzyme können nun auf ihre verbliebene Funktionsfähigkeit untersucht werden. Daraus können Rückschlüsse gezogen werden, welche Mutationen das Enzym in welchem Ausmass schädigen. Die Stärke der Funktionsbeeinträchtigung kann mit dem klinischen Bild eines Patienten mit der entsprechenden Mutation korreliert werden. Auf Patienten angewandt kann damit gezeigt werden, warum angeborene Defekte desselben Enzyms unterschiedlich schwere Krankheitsbilder

hervorrufen können. Für die PBG-Deaminase gibt es hier bereits erste Resultate (SHOOLINGIN-JORDAN, 1995).

Die bisher besprochene PBG-Deaminase ist, wie gesagt, das Enzym, das bei der akut-intermittierenden Porphyrie gestört ist. Unsere Arbeitsgruppe hat sich mit der Ferrochelatase beschäftigt, dem Enzym, das bei der erythropoietischen Protoporphyrin (EPP) einen angeborenen Defekt aufweist. Der Prototyp der EPP ist Garfield. Er vermeidet, sich der Sonne auszusetzen. Der Grund dafür sind massivste Schmerzen, die in den belichteten Hautarealen auftreten. Die Patienten beschreiben den Schmerz «als ob die Hand über eine offene Flamme gehalten werde» (RUFENER, 1992). Einige wenige EPP-Patienten entwickeln eine Komplikation. Dabei wird Protoporphyrin in der Leber abgelagert, was zu einem cholestatischen Leberversagen führt (BLOOMER, 1988; DOSS & FRANK, 1989; SCHLEIFFENBAUM et al., 1992).

Auch bei der EPP wurde fast für jede Familie eine neue, einzigartige Mutation nachgewiesen. Drei davon wurden von unserer Gruppe identifiziert (SCHNEIDER-YIN et al., 1994, 1995a, 1995b). Die Abb. 5 zeigt die Untersuchung an einer Familie, bei der mehrere Mitglieder einen Ferrochelatase-Defekt haben. Je untersuchtes Individuum wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Gesunde Familienmitglieder weisen bei der Untersuchung a eine, bei der Untersuchung b zwei Banden auf. Solche mit der Mutation haben bei diesen Untersuchungen je doppelt so viele Banden. Der aus dieser Untersuchung rekonstruierte Stammbaum der Familie ist oben in Abb. 5 abgebildet. Die beiden Indexpatienten sind mit einem Pfeil markiert, die anderen Mitglieder, die den Defekt aufweisen, mit halb gefüllten Symbolen.

Heute sind insgesamt rund 20 verschiedene Mutationen der Ferrochelatase bekannt. Es fragt sich deshalb, ob die Suche nach weiteren Mutationen eher akademischen Charakter hat oder ob auch der Patient davon profitiert. Der Patient könnte davon profitieren, falls der Typ der Mutation die Prognose beeinflusst, wie dies oben für die PBG-Deaminase beschrieben wurde. Um einen Zusammenhang zwischen Mutationstyp und Prognose zu finden, müssen vorerst möglichst viele Patienten untersucht und ihre Mutation mit dem klinischen Bild korreliert werden. Ein zweiter Grund für molekulargenetische Untersuchungen ist die zukünftige Entwicklung. Falls je eine somatische Gentherapie verfügbar sein sollte, muss der molekulare Defekt eines betroffenen Patienten vorher eindeutig identifiziert sein.

Grundsätzlich sind die konventionellen Therapie-Möglichkeiten bei den Porphyrien wie bei anderen angeborenen Stoffwechselstörungen sehr beschränkt. Bei der uns speziell interessierenden EPP - Typus Garfield - wurde beschrieben,

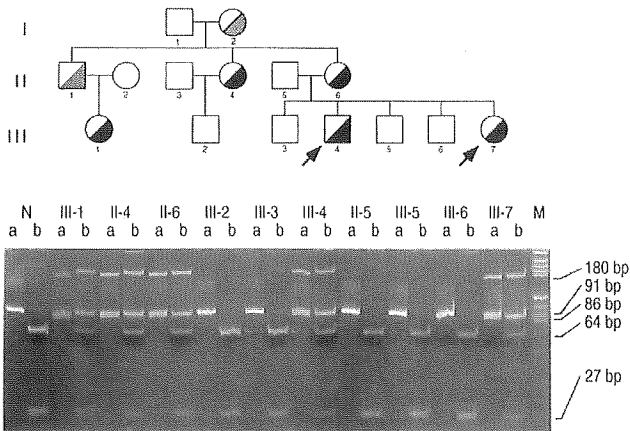


Abb. 5. Familienuntersuchung bei EPP. Oben ist der Stammbaum der Familie aufgezeichnet: die einzelnen Individuen sind nach den Generationen in römischen Zahlen, innerhalb der Generationen mit arabischen Zahlen numeriert. Die beiden Index-Fälle (III-4 und III-7) sind mit einem Pfeil markiert. Individuen mit einem Gen-Defekt sind mit halb-ausgefülltem Symbol repräsentiert. Männliche Mitglieder sind durch ein Quadrat, weibliche durch einen Kreis dargestellt. Der Nachweis des molekularen Defektes wird auf der unteren Hälfte gezeigt: Ein 91 Basen-Paare (BP) umfassendes Stück des Ferrochelatase-Gens wurde amplifiziert und jeweils auf Spur a aufgetragen. Das Amplifikationsprodukt wurde mit einem Restriktionsenzym verdaut. Bei Vorliegen eines nicht-mutierten Gens wird die Bande von 91 BP in zwei Fragmente von 64 und 27 BP gespalten. Bei den betroffenen Individuen ist das mutierte Gen-Fragment jedoch kürzer - nämlich 86 BP lang - und wird nicht gespalten. Entsprechend bleibt eine Bande bei 86 BP auf Spur b bestehen. Da es sich um einen heterozygoten Gendefekt handelt, ist jeweils zusätzlich zum mutierten Genfragment auch der Wildtyp nachweisbar, der durch das Restriktionsenzym gespalten wird.

Fig. 5. Family study of EPP. The two index patients (III-4 and III-7) are indicated by arrows in the family pedigree. Gene-carriers are indicated by half-filled symbols. In the lower part of the Fig., patients, i.e. gene carriers, exhibit different patterns of DNA fragments (pieces of the ferrochelatase gene), as compared to normal individuals.

dass Beta-Carotin günstig wirkt. Die Patienten müssen diese Substanz jedoch in so hoher Dosis nehmen, dass sie davon eine rötlich-gelbe Hautfarbe bekommen. Von manchen Patienten wird diese Verfärbung nicht geschätzt, umso mehr als sie oft wenig Besserung durch Beta-Carotin verspüren. Sie setzen die Therapie aus diesen Gründen häufig aus.

Noch weniger Möglichkeiten gibt es zur Behandlung der Leberkomplika-tion, die durch eine Ablagerung von Protoporphyrin in den Leberzellen entsteht. Man versucht zwar, das Protoporphyrin mit Gaben von Gallensalzen auszu-schwemmen und hat damit einen gewissen, jedoch keinen durchschlagenden Erfolg (BLOOMER, pers. Mitt.). Eine Le-bertransplantation ist dann die einzige Behandlungsmöglich-keit des protoporphyrinbedingten Leberversagens. Jedoch

wird dadurch nur die akute Komplikation korrigiert, nicht aber die Krankheit selbst geheilt. Der Grund dafür liegt darin, dass die Störung der Hämsynthese bei dieser Porphyrieform im Knochenmark liegt, nicht in der Leber selbst. Die trans-plantierten Patienten sind weiterhin auf Sonne empfindlich und zeigen weiterhin erhöhte Protoporphyrinwerte im Blut. Sogar ein erneuter Leberbefall wurde bei einzelnen glückli-cherweise nur wenigen Patienten beschrieben. Bei diesen Patienten wünscht man sich eine effektivere Therapiemög-lichkeit. Die oben bereits angesprochene somatische Gen-therapie öffnet hier eine Hoffnung.

Eine andere Porphyrieform, die Congenitale erythroipo-etische Porphyrie (CEP), zeigt ebenfalls einen sehr schweren Verlauf. Prototyp dieser schwersten Porphyrieform ist der lichtscheue Werwolf. Diese Porphyrie, die meist, aber nicht immer, im Kindesalter beginnt, zeigt eine äusserst schwer-wiegende Sonnenüberempfindlichkeit, die zu progredienter Photomutilation, zu fortschreitender Verstümmelung an den belichteten Stellen führt. Wie schwerwiegend die Folgen dieser Porphyrie sind, zeigt eine Aufnahme der Hand eines Patienten mit CEP (Abb. 6). Auch diese Form der Porphyrie zeigt die hauptsächliche Synthese-Störung im Knochenmark. Da keine effektvolle Therapie existiert, trotz gegenteiliger Berichte in der Literatur (MINDER et al., 1994), liegt zurzeit die Hoffnung für diese Patienten in der Entwicklung einer somatischen Genthherapie.

## 5 SOMATISCHE GENTHERAPIE DER PORPHYRIEN

Wo stehen wir heute mit dieser zwar vielversprechenden, aber leider erst theoretischen Möglichkeit? Um die Zellen

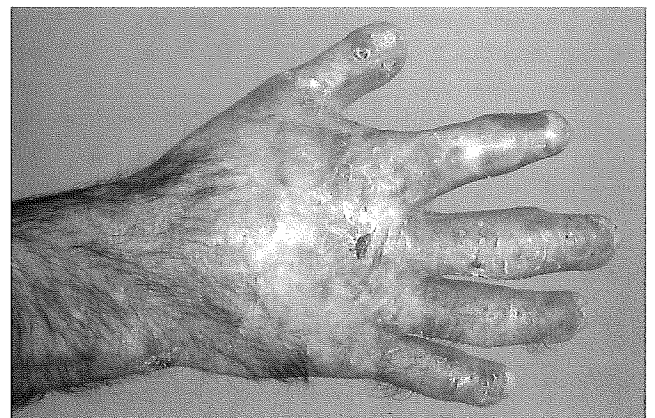


Abb. 6. Verstümmelte Finger durch schwere chronische Lichtschä-den bei congenitaler erythropoietischer Porphyrie.

Fig. 6. Mutilated fingers as a result of severe chronic light damage from a patient with congenital erythropoietic porphyria.

genetisch zu verändern, damit das fehlende Enzym ersetzt werden kann, müssen Vorkehrungen getroffen werden.

Einmal muss das Gen in seiner voll funktionstüchtigen Form vorhanden sein. Wir haben bereits oben gesehen, wie ein solches Gen identifiziert wird. Für die EPP (Typ Garfield) heisst dieses Gen «Ferrochelatase». Unsere Gruppe hat zwei verschiedene Formen von Ferrochelatase-DNA zur Verfügung. Eine davon wurde von uns erstmals isoliert (SCHNEIDER-YIN et al., 1995). Die Charakterisierung dieser zweiten Form zeigt Abb. 7. Auf dem oberen Gelelektropherogramm (A) sind Proben von verschiedenen Individuen bzw. Zelllinien aufgetragen. Bei der ersten Spur (Kontrolle) ist nur eine Bande sichtbar, d. h. es findet sich nur eine Form der Ferrochelatase. Dagegen weisen die Banden II-IV je zwei Banden auf: die bekannte Form von Spur I und die schwächere Bande eines Isoenzym. Dieses wurde in reiner Form auf Spur V laufen gelassen. Nachdem die schwache Bande mit einer radioaktiven Sonde spezifisch angefärbt war, ergab sich das

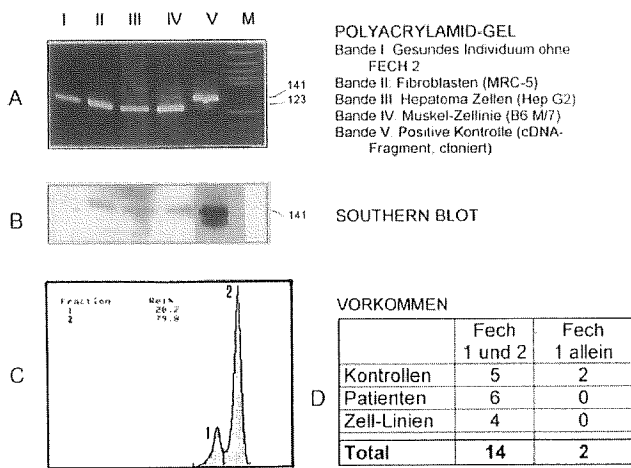


Abb. 7. Ferrochelatase-Isoenzyme Fech-1 und Fech-2: Identifizierung und Quantifizierung. *Diagramm A*: Spur I zeigt eine normale Kontrolle ohne Isoenzym 2. Die Spuren II bis IV zeigen Doppel-Banden, Spur V zeigt die reine Form des Isoenzym 2. M = Vergleichs-DNS zur Bestimmung des Molekulargewichtes. *Diagramm B* zeigt die spezifische Anfärbung der schwächeren Bande mit einem radioaktiv markierten Oligonucleotid. *Diagramm C* zeigt die relativen Anteile der beiden Banden nach densitometrischer Auswertung. *Diagramm D* zeigt, dass bei Patienten, in Zelllinien und bei normalen Kontrollen mit 2 Ausnahmen das Isoenzym 2 nachweisbar war.

*Fig. 7. Identification and quantification of the ferrochelatase isoenzymes Fech-1 and Fech-2. Diagram A: The fine upper band and the thick lower band represent Fech-2 and Fech-1, respectively. Diagram B shows the radioactive staining of the isoenzyme 2. Diagram C indicates the densitometrically determined ratio between the two isoenzymes. Diagram D lists the patients and normal controls as well as cell lines that have been tested for the isoenzyme 2.*

Autoradiogramm B. Auf der ersten Spur ist keine Bande sichtbar, während auf den folgenden deutlich eine Bande nachweisbar ist. Das Mengenverhältnis der beiden Banden ist auf dem unteren Diagramm dargestellt: Nr. 1 ist die neue Ferrochelatase: Sie macht etwa 20% der Gesamtmenge aus.

Nach unseren neuesten Messungen von rekombinantem, d. h. in Bakterien hergestelltem menschlichen Enzym hat dieses eine ca. 50% höhere Aktivität als das bereits bekannte Enzym. Eine möglichst hohe spezifische Aktivität ist für die Genthherapie wünschenswert, da ja ein fehlendes Enzym ersetzt werden soll.

Wie vorher für die Herstellung von spezifischen Eiweiss-Molekülen in Bakterien beschrieben, muss das uns interessierende Gen in einen **Vektor** eingebaut werden, um es in die Zellen einzuschleusen (Abb. 8). Als Vektoren für Säugetierzellen einschliesslich dem Menschen kommen z. Zt. vor allem veränderte Retroviren in Frage. Retroviren haben die Eigenschaft, sich in das Genom der Wirtszelle einzubauen und dort ihre Funktion wie ein quasi körpereigenes Gen aufzunehmen. Zu den Retroviren gehören auch das Aids-Virus und mehrere Viren, die mit Krebsbildung in Zusammenhang gebracht werden. Diese Vektoren müssen deswegen sehr genau kontrolliert werden und dürfen sich im Organismus nicht vermehren können.

Deshalb werden die Viren dergestalt abgeändert, dass sie ihre Hüllenproteine nicht mehr bilden können, die bei der Infektion neuer Zellen notwendig wären. Aber ohne Hüllenproteine können sie auch nicht in diejenigen Zellen eindringen, in die wir sie aus therapeutischen Gründen einschleusen möchten. In unserem Beispiel wären das die erythropoietischen Stammzellen. Der Trick ist nun so, dass die retroviralen Vektoren erst einmal in einem Zellsystem vermehrt werden, das mit einem weiteren Virus infiziert ist, das die Hüllenproteine liefert. Zusammen mit den Hüllenproteinen bilden sich nun vollständige Viruspartikeln, mit denen wir die Stammzellen behandeln oder genauer gesagt transduzieren können. Hier ist nun das erste grosse Problem: die heute vorhandenen Vektoren zeigen eine zu niedrige Transduktionsrate, insbesondere was die Stammzellen betrifft. Die derzeitigen Anstrengungen gehen deshalb dahin, bessere Vektoren zu finden.

Soweit gehen die Anstrengungen aller, die sich mit somatischer Genthherapie beschäftigen, sei es nun für Krebsbehandlung, Aids oder angeborene Stoffwechselstörungen. Was ist nun speziell bei den Porphyrinen bekannt und schon vorhanden?

De Verneuil, in Bordeaux, hat sich auf die CEP konzentriert (MOREAU-GAUDRY et al., 1995). Als Prototyp dieser

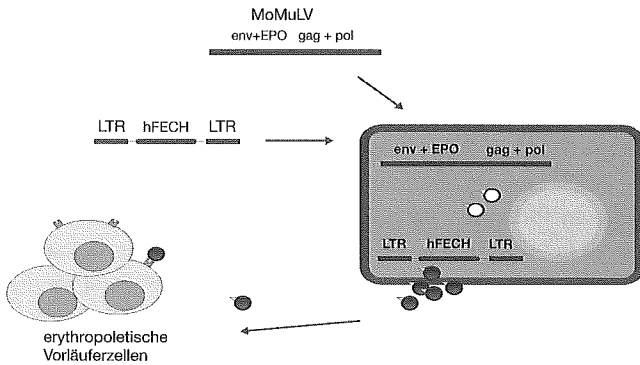


Abb. 8. Gentherapie von erythropoietischen Stammzellen. Das Gen wird in einen retroviralen Vektor (LTR-hFECH-LTR) eingebracht, der keine Hüllproteine synthetisieren kann und deswegen nicht vermehrungsfähig ist. Dieser wird dann in einem spezifischen Zellsystem vermehrt, das mit einem zweiten defekten Virus (MoMuLV) infiziert ist, das seinerseits die Hüllproteine liefert. Zusammen entstehen vollständige Viruspartikeln, die jedoch unfähig sind, sich in den transduzierten Zellen zu vollständigen Viruspartikeln zu vermehren. Um die Spezifität der Transduktion zu erhöhen, können spezifische Rezeptor-Ligand-Interaktionen verwendet werden. Bei den erythropoietischen Zellen bietet sich der Erythropoietin-Rezeptor für diesen Zweck an.

Fig. 8. Gene therapy of erythropoietic stem cells. Specific gene transfer by erythropoietin receptor-ligand interaction. The normal ferrochelatase gene is delivered to the stem cells by a modified retrovirus via the erythropoietin receptors.

Form wurde oben der Werwolf aufgeführt. Die Abb. 6 zeigt die schwer veränderte Hand eines unserer Patienten mit CEP. Diese Porphyrie ist bedingt durch einen homozygoten Defekt der Uro-III-Synthase (Abb. 2). De Verneuil hat das normale humane Gen der Uro-III-Synthase in einen retroviralen Vektor gepackt und damit Fibroblasten (Bindegewebszellen) von CEP-Patienten behandelt (transduziert). Der Vektor wurde in die Zellen aufgenommen. Die erniedrigte Enzymaktivität liess sich in diesen Bindegewebszellen korrigieren und stieg sogar auf übernormale Werte (Abb. 9).

Um eine wirksame Therapie zu erreichen, müsste jedoch der Stoffwechsel in denjenigen Zellen korrigiert werden, in denen die Überproduktion der Porphyrine stattfindet. Wie wir gesehen haben, hängt es von der Art der Porphyrie ab, ob die Überproduktion im Knochenmark oder in der Leber geschieht. Bei der CEP sind es die Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen. Entsprechend müsste die Korrektur in den erythropoietischen Stammzellen stattfinden, die dann in den Körper retransfundiert würden, damit sie dort in korrigierter Form ihre Funktion aufnehmen.

Ein analoger Versuch wurde auch für die erythropoietische Protoporphyrinurie (Typus Garfield) bereits durchgeführt. Ein Vektor mit dem entsprechenden Gen wurde in Fibrobla-

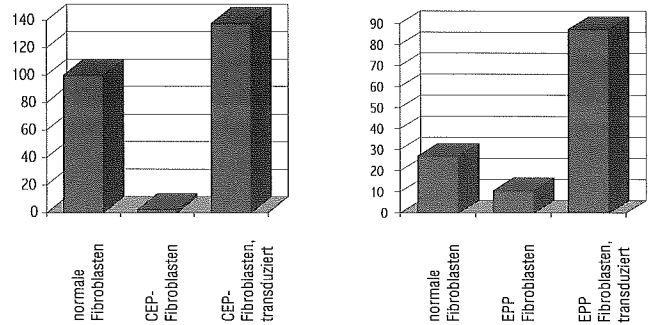


Abb. 9. Effekt von Gen-Therapie *in vitro* auf die Enzym-Aktivität in Bindegewebszellen von Porphyrie-Patienten. Links: Korrektur der Aktivität (in %) der Uroporphyrinogen-III-Synthase bei Congenitaler erythropoietischer Porphyrie (CEP). Rechts: Korrektur der Ferrochelatase-Aktivität bei Porphyrie mit Leberinsuffizienz (EPP) in nMol/mg/h.

Fig. 9. Effectiveness of *in vitro* gene therapy on the enzyme activities in fibroblasts from porphyria patients, uroporphyrinogen III synthase in a CEP on the left; ferrochelatase in an EPP on the right.

sten von EPP-Patienten eingebracht und danach der Zellstoffwechsel untersucht (MATHEWS-ROTH et al., 1995). Eine Korrektur des vorher gestörten Stoffwechsels konnte ebenfalls dokumentiert werden (Abb. 9).

Wie bereits erwähnt, liegt bei beiden Porphyrieformen die Hauptstörung im Knochenmark, und zwar in der Bildung der roten Blutkörperchen. Deswegen ist das Ziel, die Vorläuferzellen der Erythrozyten gezielt genetisch zu verändern. Dazu werden spezifische Marker auf diesen Vorläuferzellen benötigt, damit die Vektoren selektiv in diese Zellen aufgenommen werden. Bei den Erythrozyten-Vorläuferzellen könnte sich der Erythropoietin-Rezeptor zu diesem Zweck eignen, der spezifisch nur auf dieser Zelllinie ausgebildet wird. Eine Arbeitsgruppe in Amerika konnte zeigen, dass sich damit eine höhere Transduktionsrate erreichen liess (KASAHARA et al., 1994). Allerdings betrafen diese Untersuchungen nicht die Porphyrien.

Wie geht es nun weiter:

Ein korrigierter Stoffwechsel in einer Einzelzelle bedeutet noch nicht, dass der Stoffwechsel im Gesamtorganismus korrigiert ist. Selbst eine hohe Transduktionsrate bei isolierten Knochenmarkstammzellen kann nicht Gewähr dafür bieten, dass die Porphyrie damit geheilt werden kann. Denn neben den korrigierten sind weiterhin defekte Knochenmarkszellen vorhanden, die Porphyrine im Überschuss produzieren.

Theoretisch jedoch sind zwei Mechanismen denkbar, die einen Therapieerfolg ermöglichen können:

Einerseits könnten die genetisch veränderten Knochenmarkszellen – dank dem korrigierten Stoffwechsel – nach der



Rücktransfusion im Organismus eine bessere Überlebenschance haben als die nicht korrigierten; sie hätten also einen *Selektionsvorteil*. Man könnte also hoffen, dass zunehmend mehr Zellen im Knochenmark die genetische Korrektur aufweisen.

Andererseits ist zu hoffen, dass die Zellen mit korrigiertem Stoffwechsel die *überschüssigen Stoffwechsel-Produkte* von den anderen defekten Zellen weiter *verwerten* und dadurch die schädigenden Substanzen aus dem Körper eliminieren können. Durch *in vitro*-Experimente bei CEP konnte diese zweite Hypothese bisher allerdings nicht gestützt werden. Aber zu einer schlüssigen Antwort käme man nur durch einen Versuch in einem Gesamtorganismus.

Aus diesem Grund werden wir primär an einem Tiermodell, einer Maus mit einer angeborenen Form von EPP (TUTOIS et al., 1991), diese beiden Hypothesen austesten. Und erst wenn diese Untersuchungen erfolgreich abgeschlossen sind, kann daran gedacht werden, an einem Patienten eine entsprechende Behandlung durchzuführen.

## 6 DANK

Die Untersuchungen wurden ermöglicht durch folgende Unterstützungsbeiträge:

Schweizerischer Nationalfonds, Kredit Nummern: 32-34015.92, 32-40544.94, durch die Ciba-Geigy-Stiftung, durch die Julius-Klaus-Stiftung und durch die Hartmann-Müller-Stiftung.

## 7 LITERATUR

BLOOMER, J.R. 1988. The liver in protoporphyria. – *Hepatology* 8, 402–407.

DEYBACH, J.C. & PUY, H. 1995. Porphobilinogen deaminase gene structure and molecular defects. – *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 197–205.

DOSS, M. & FRANK, M. 1989. Hepatobiliary implications and complications in protoporphyria, a 20 year study. – *Clin. Biochem.* 22, 223–229.

KAPPAS, A., SASSA, S., GALBRAIGH, R.A. & NORMANN, Y. 1989. The Porphyrias. In: «The metabolic basis of inherited disease», C.R. SCRIVER et al. (Hrsg.), pp. 1305–1366 – MCGRAW HILL, New York, 6th ed., 3006 pp.

KASAHARA, N., DOZY, A. & KAN, Y. 1994. Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. – *Science* 266, 1373–1376.

LOFTUS, L.S. & ARNOLD, W.N. 1991. Vincent van Gogh's illness: acute intermittent porphyria? – *Br. Med. J.* 303, 1589–1591.

MACALPINE, I. & HUNTER, R. 1966. The insanity of King George III: A classic case of porphyria. – *Br. Med. J.* I, 65–71.

MATHEWS-ROTH, M., MICHEL, J. & WISE, R. 1995. Amelioration of the metabolic defect in erythropoietic protoporphyria by expression of human ferrochelatase in cultured cells. – *J. Invest. Dermatol.* 104, 497–499.

MINDER, E.I., SCHNEIDER-YIN, X. & MÖLL, F. 1994. Lack of effect of oral charcoal in congenital erythropoietic porphyria. – *New Engl. J.* 330, 1092–1094.

MOREAU-GAUDRY, F., BARBOT, C., MAZURIER, F., BOIRON, J., BENSIDHOUM, J. & DE VERNEUIL, X. 1995. Correction of the enzyme defect in cultured congenital erythropoietic porphyria disease cells by retrovirus-mediated gene transfer. – *Hum. Gene Therapy* 6, 13–20.

RUFENER, E. 1992. «... und fände nirgends Schatten.» Copingprozesse bei Menschen mit einer erythropoietischen Protoporphyrin (EPP). – *Psychother. Psychosom. med. Psychol.* 42, 339–348.

SCHLEIFFENBAUM, B., MINDER, E.I., MÖHR, P., DECURTINS, M. & SCHAFFNER, A. 1992. Cytofluorometry as a diagnosis of protoporphyria. – *Gastroenterology* 102, 1044–1048.

SCHNEIDER-YIN, X., SCHÄFER, B., MÖHR, P., BURG, G. & MINDER, E.I. 1994. Molecular defect in erythropoietic protoporphyria with terminal liver failure. – *Hum. Genet.* 93, 711–713.

SCHNEIDER-YIN, X., SCHÄFER, B., TÖNZ, O. & MINDER, E.I. 1995a. Human ferrochelatase: a novel mutation in patients with erythropoietic protoporphyria and an isoform caused by alternative splicing. – *Hum. Genet.* 95, 391–396.

SCHNEIDER-YIN, X., TAKETANI, S., SCHÄFER, B. & MINDER, E.I. 1995b. Recessive inheritance of erythropoietic protoporphyria with liver failure. – (letter) *The Lancet*, 344, 337.

SHOOLINGIN-JORDAN, P.M. 1995. Porphobilinogen deaminase and uroporphyrin III synthase: Structure, molecular biology, and mechanism. – *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 1181–1195.

STOKVIS, B.J. 1889. Over twee zeldsame kleurstoffen in urine van zieken. – *Nederl. Tijdsch. voor Geneesk.* 25, 409–417.

TUTOIS, S., MONTAGUTELLI, X., DA SILVA, V., JOUAULT, H., ROUYER-FESSARD, P., LEROY-VIARD, K., GUENET, J., NORDMANN, Y., BEUZARD, Y. & DEYBACH, J. 1991. Erythropoietic protoporphyria in the house mouse. – *J. Clin. Invest.* 88, 1730–1736.

PD Dr. Elisabeth Irène Minder, Dr. Xiaoye Schneider-Yin & Urszula Rüfenacht, Stadtspital Triemli, Zentrallabor, CH-8063 Zürich.

Dr. Beat Schäfer, Universitäts-Kinderspital, Abteilung für klinische Chemie, CH-8032 Zürich.