

Labordiagnose von Mukopolysaccharidosen

Ao.Univ.-Prof.Priv.Doiz.Mag.Dr.rer.nat. Werner Windischhofer und Dr. Marion Tschernutter

Die klinische Diagnostik angeborener lysosomaler Stoffwechselerkrankungen ist ein sehr komplexer Prozess, da Symptomatik und Verlaufsformen der meisten Erkrankungen sehr heterogen sind. Eine zuverlässige Aussage über den spezifischen Stoffwechseldefekt nur auf Basis des klinischen Erscheinungsbildes ist deshalb bei vielen Erkrankungen schwer möglich. Daher werden im Laborbereich zahlreiche biochemische, zellbiologische und molekulargenetische Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, möglichst frühzeitig aussagekräftige Labordaten für eine zutreffende klinische Diagnose zur Verfügung zu stellen, damit auch rasch adäquate Therapien eingeleitet werden können.

Screening-Methoden

Anhand von wenig spezifischen Screening-Verfahren wird vorerst der grundsätzliche Verdacht auf eine lysosomale Erkrankung auf bestimmte Krankheitsgruppen eingeschränkt. Meist werden **Harn- oder Serumproben** auf das Vorhandensein von Stoffwechselmetaboliten, welche für diese Krankheitsgruppen charakteristisch sind, mit verschiedenen Methoden qualitativ und quantitativ untersucht.

So werden bei Mukopolysaccharidosen (MPS) Glykosaminoglykane (GAG = Mukopolysaccharide) quantitativ mittels einer **Färbereaktion** fotometrisch vermessen. Eine deutlich erhöhte Ausscheidung von GAG ist ein erster Hinweis, dass eine MPS vorliegen könnte, wobei zu beachten ist, dass innerhalb der ersten drei Lebensmonate eine erhöhte GAG-Ausscheidung ohne pathologischen Hintergrund vorkommen kann. In einem zweiten, qualitativen Screening-Verfahren werden die GAG-Subtypen (Chondroitinsulfat, Heparansulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat) im Harn **elektrophoretisch analysiert**. Das Ausscheidungsmuster der unterschiedlichen GAG-Typen liefert den ersten biochemischen Hinweis über den vorliegenden MPS-Subtyp, jedoch ist eine definitive Einteilung noch nicht möglich. So kann die Ausscheidung von Dermatansulfat bei MPS Typ I, II, VI und VII beobachtet werden, während eine Ausscheidung von Keratansulfat bei MPS Typ IVA und IVB (Morquio A bzw. B) nachweisbar ist. Findet man im Ausscheidungsmuster der GAG einen deutlich erhöhten Anteil an Heparansulfat, deutet das auf MPS III (Sanfilippo) hin, wobei es auf Basis der Elektrophorese-Ergebnisse nicht möglich ist, zwischen den MPS III Typen A-D zu differenzieren.

Neuere methodische Entwicklungen ermöglichen die qualitative und quantitative Bestimmung von GAG auch aus „**dried blood spots**“ (= DBS, Trockenblut auf Filterpapier) und Harn mit Hilfe der **Massenspektrometrie**, die vor allem für Screening-Verfahren mit großem Probandendurchsatz geeignet ist (z. B. Neugeborenen-Screening; klinische Studien). Anhand dieser Analysetechnik können in kurzer Zeit simultan viele Biomoleküle mit sehr hoher Spezifität und Sensitivität detektiert werden. Allerdings gibt es große apparative und technische Unterschiede im Aufbau von Massenspektrometern, weshalb die veröffentlichten Methoden nicht unmittelbar vergleichbar bzw. im eigenen Labor einfach reproduzierbar sind.

Eine weitere Möglichkeit zum Harnscreening stellt die **Dünnschichtchromatographie** dar. Dabei werden Biomoleküle – im Fall der lysosomalen Stoffwechselerkrankungen sind es komplexe Zuckerverbindungen (Oligosaccharide) - aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften (z. B. Polarität) aufgetrennt und anhand einer Färbereaktion sichtbar gemacht. Eine Aussage über die genaue Struktur und Zusammensetzung der Oligosaccharide bzw. eine quantitative Bestimmung ist mit dieser Methode nicht möglich.

Dieses Verfahren wird vor allem für ein erstes Screening von Glykoproteinosen (z. B. Fucosidose, α -Mannosidose, Gangliosidosen, Sialidose, M. Sandhoff, Aspartylglucosaminurie etc.) verwendet. Durch den technologischen Fortschritt und die damit gesteigerte Sensitivität der Massenspektrometrie wurde in den letzten Jahren die Detektion von Biomolekülen in Serum oder Harn auch bei sehr geringen Konzentrationen und Probenvolumen mit dieser Methode möglich. So werden mittlerweile Globotriaosylsphingosin (Lyso-Gb3; M. Fabry), Glucosylsphingosin (Lyso-Gb1; M. Gaucher), Sulfatide (Metachromatische Leukodystrophie und Multiple Sulfatasedefizienz) und Sialinsäure (Sialinsäurespeichererkrankungen und Sialidose) routinemäßig sowohl im Screening als auch bei Verlaufskontrollen zur Überprüfung der Krankheitsentwicklung oder während der Behandlung von Patienten als Indikator für den Therapieerfolg zuverlässig und mit hoher Spezifität gemessen.

Die **Messung der Enzymaktivität** der Chitotriosidase im Serum stellt einen weiteren nicht spezifischen Test zur ersten Abklärung auf das Vorhandensein einer lysosomalen Erkrankung dar. Dieses Enzym wird in Makrophagen synthetisiert, wobei die genaue biologische Funktion noch nicht bekannt ist. Allerdings konnte man nachweisen, dass die Aktivität der Chitotriosidase bei bestimmten lysosomalen Erkrankungen deutlich erhöht ist, weshalb man diesen Assay als Screening-Verfahren einsetzen kann. Besonders bei M. Gaucher wird eine dramatische Erhöhung um den Faktor 50-100 im Vergleich zu Normalwerten beobachtet, sodass dieses Enzym auch bei Verlaufskontrollen als Indikator eingesetzt wird. Bei M. Krabbe, GM1-Gangliosidose, M. Niemann-Pick Typ A/B und Typ C ist die Aktivität deutlich (ca. Faktor 3-5), aber moderat vorhanden.

Spezifische Tests

Nachdem es aufgrund der Ergebnisse der wenig spezifischen Screening-Methoden meist nicht möglich ist, den genauen Stoffwechseldefekt zu definieren, sind **spezifische Enzymtests** notwendig, um die vorliegende Erkrankung biochemisch zu definieren (Tabelle 1). Für die Bestimmung der Enzymaktivität werden **synthetische Substrate** verwendet, welche in den meisten Fällen **mit einem Fluorophor** (eine Substanz, welche nach Anregung durch Licht, selbst Licht einer bestimmten Wellenlänge abstrahlt) gekoppelt sind. Wird das Substrat durch das Enzym abgebaut, wird der Fluorophor freigesetzt. Die Intensität der Fluoreszenz wird in einem Fluoreszenzfotometer ermittelt und gibt Auskunft über die Aktivität des Enzyms.

Diese Tests können an unterschiedlichen Probenmaterialien durchgeführt werden. Meist wird die Aktivität der Enzyme, welche aus Vollblut isoliert werden, ermittelt. Für einige Enzymtests kann auch Trockenblut verwendet werden (DBS). Dafür werden einige Tropfen Vollblut auf Filterpapier aufgebracht, getrocknet und an ein Labor zur weiteren Verarbeitung verschickt. Der Vorteil im Vergleich zu frischem Vollblut liegt dabei im geringen Probenvolumen und der längeren Haltbarkeit bei entsprechender Lagerung.

Enzymtests an Bindegewebszellen der Haut (Fibroblasten) sind ebenfalls gut etabliert und bieten den Vorteil, dass man diese Zellen dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei -195°C lagern kann.

Bei Bedarf (z. B. unklare Befunde) können diese Zellen aufgetaut und für weitere Studien langfristig kultiviert werden. Für pränatale Diagnosen können Zellen aus der Fruchtblase (Chorionzellen) isoliert, kultiviert und für enzymatische sowie molekulargenetische Untersuchungen verwendet werden.

Der Bedarf an einem möglichst hohen Probendurchsatz, vor allem bei wissenschaftlichen Studien und im Bereich des Neugeborenen-Screenings, führte in den letzten Jahren zur Entwicklung des **sogenannten „Lab on a Chip“**. Es handelt sich bei diesem vorgefertigten System um eine Miniaturisierung der „klassischen“ Enzymtests, sodass mit sehr wenig Probenvolumen (im Mikroliter Bereich = millionstel Liter) und geringen Reagenzvolumen gearbeitet wird. Es kann so die Aktivität von fünf verschiedenen Enzymen simultan in kurzer Zeit gemessen werden. Die Reagenzien werden bei dieser Technik in einem elektrischen Feld bewegt und verarbeitet („microfluids technology“). Die Messung der Versuchsdaten erfolgt wie bei den klassischen Enzymsätzen mit einem Fluoreszenzfotometer.

Auch im Bereich der Enzymdiagnostik sind durch Entwicklung neuer synthetischer Substrate massenspektrometrische Methoden möglich geworden, welche simultan eine Aktivitätsbestimmung von bis zu neun Enzymen aus einer Probe ermöglichen. Mit dieser Methode können unter anderem MPS I, II, IVA, VI, sowie M. Krabbe, M. Pompe, M. Fabry, M. Niemann-Pick A/B und M. Gaucher bestimmt werden. Besonders für das Neugeborenen-Screening und sehr hohe Probenzahlen bei klinischen Studien sind die beiden zuletzt beschriebenen Methoden ideal.

Molekulargenetische Tests

Wurde ein Enzymdefekt biochemisch nachgewiesen, so ist die anschließende **molekulargenetische Charakterisierung** des betroffenen Gens unerlässlich. Vor allem für nachfolgende Überträgerdiagnostik und für pränatale Diagnosen – die in Zusammenarbeit mit Humangenetikern durchgeführt werden - ist es wichtig, die für den Enzymdefekt verantwortlichen, pathogenen Mutationen zu kennen. In einigen Fällen ist es anhand der vorliegenden Mutationen auch möglich, eine Vorhersage über die Verlaufsform der Erkrankung zu treffen.

Die genetische Analyse beginnt mit der **DNA-Isolierung** aus Vollblut, DBS, Fibroblasten oder Chorionzellen. Danach werden die für ein Protein codierenden Sequenzen des betroffenen Gens (= Exons) anhand der sogenannten **Polymerase Kettenreaktion** vervielfältigt und die Basenabfolge der Exons mittels eines Sequenzierverfahrens ermittelt. Die bei der **Sequenzierung** erhaltene Basenabfolge wird anhand von **Datenbanken** mit der Basensequenz des **unveränderten Gens (Wildtyp)** abgeglichen und auf Änderungen untersucht. Handelt es sich bei einer gefundenen Basenabweichung um eine bekannte, in der Fachliteratur bereits als pathogen beschriebene Mutation, ist die genetische Analyse abgeschlossen. Bei unbekanntem Sequenzabweichungen müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um festzustellen, ob die gefundene Änderung tatsächlich pathogen ist oder ob es sich lediglich um eine nicht pathogene Variante handelt, welche keinen Einfluss auf die Funktionalität des Enzyms hat. Dafür wird die neu gefundene Sequenzänderung zuerst in 112 Wildtypproben (= gesunde Probanden) gesucht. Ist sie in mehr als 1% der Wildtypproben vorhanden, so handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um keine pathogene Mutation. Zusätzlich werden die neu gefundenen Sequenzvarianten in-silico mittels Computerprogrammen analysiert. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit errechnet, mit der eine Variante zu einer pathologischen Veränderung der Proteinfunktion (bzw. der Enzymaktivität) führt.

Je nach Krankheitsgruppe kann die Mutationsanalyse mit der klassischen **Sanger Sequenziertechnik** sehr aufwändig sein, da alle Exons in Einzelreaktionen vervielfältigt und sequenziert werden müssen. Daher kann es einige Monate dauern, bis ein endgültiger Laborbefund erstellt werden kann. **Neue Sequenziertechniken („next generation sequencing“; NGS)**, welche in den letzten Jahren entwickelt wurden, ermöglichen einen sehr hohen Probendurchsatz („**high-throughput“ DNA-Sequenzierung**), sowie rasche, zuverlässige und auch kostengünstige Mutationsanalysen. Es werden dabei alle für Proteine codierenden DNA-Sequenzen (ca. 1% des gesamten Genoms) in nur einer Reaktion vervielfältigt und sequenziert (**whole exome sequencing; WES**). Mit Hilfe der Bioinformatik können die enormen Datenmengen ausgewertet und auf krankheitsverursachende Mutationen untersucht werden. Es ist auch möglich, nur ganz spezifisch jene Gene, welche für bestimmte Krankheitsgruppen interessant sind, mit dieser Methode zu analysieren. Diese „**Gene-panels**“ werden in Zukunft auch innerhalb des selektiven Screenings auf lysosomale Erkrankungen zum Einsatz kommen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt Ergebnisse eines speziell für den lysosomalen Stoffwechsel etablierten „Gene-panels“, welches die Analyse von 891 Genen in einem Versuchsansatz ermöglicht (Di Fruscio et al. 2015; Autophagy, 11(6):928-38).

Für Patienten und Mediziner bedeuten diese neuen Techniken eine wesentlich raschere klinische Diagnose, die einen schnellen Behandlungsbeginn ermöglicht, der wiederum für einen bestmöglichen Therapieerfolg essentiell ist.