

# Pyruvatkinase- und Glukose 6-Phosphat- Dehydrogenase Mangel

Prof. Dr. med. Stefan Eber  
Praxis für Kinder- u. Jugendmedizin  
Schwerpunktpraxis für Neonatologie und Pädiatrische Hämatologie/Onkologie/  
Hämostaseologie  
und  
Universitäts-Kinderklinik der Technischen Universität,  
München  
Dr med. O. Andres  
Erythrozyten Speziallabor  
Universitätskinderklinik Würzburg

# Fall I: Schwere hämolytische Anämie bei Pyruvatkinasemangel oder

## Wie kommt das Eisen wieder raus?

- 25-Jährige Patientin mit bekanntem PK-Mangel
- Z. n. Splenektomie im Alter von 3J
- Z. n. Cholezystektomie bei Pigmentsteinen (10J)
- Z. n. akuter biliärer Pankreatitis (Cholestase, 10J)
- sekundäre Hämochromatose
- Seit 2 Jahren Deferasirox-Therapie (Maximaldosis von 4x500 mg)

->Vorstellung in unserer Schwerpunktpraxis

•

•

# Fall I: Untersuchung

- Urin rotbraun gefärbt
- MRT: massive Hepatomegalie
- Quantifizierung des Eisengehalts im MRT:  
19977mg/kg Leber!

# Fall I: Labor

- Hb: 6,7 g/dl, Htk 21,5%
- Im Differentialblutbild: Anisozytose der Thrombozyten und Erythrozyten, Targetzellen, Polychromasie und Poikilozytose
- Retikulozyten in 2 Laboren erhöht (bis 993‰)
- Leber: GOT (112 U/l) und GPT (39 U/l) erhöht
- Ferritin 2920 ng/ml
- Transferrin/turbid. 159mg/dl
- Transferrin 113%
- Eisen 253 µg/dl



# Fall I: Speziallabor

- Osmotische Resistenz (AGLT & EMA) unauffällig
- Chromatographie:
  - HbF 2,3%
  - HbA (mit HbA1a-c) 94,4%
  - HbA2 2,1%
- Enzymdiagnostik:
  - Pyruvatkinase 2197 U/l Ec (Norm: 3100-5500) -> ca. 51% der Normaktivität
  - G6PD 6434 U/l Ec (Norm 1600-2900)
- Molekulargenetik: keine genetisch bedingte Hämochromatose

# Fall I: Empfohlenes Therapieschema

- Kombinierte Therapie
  - Deferasirox 30 mg/kg
  - Deferipron 75 mg/kg

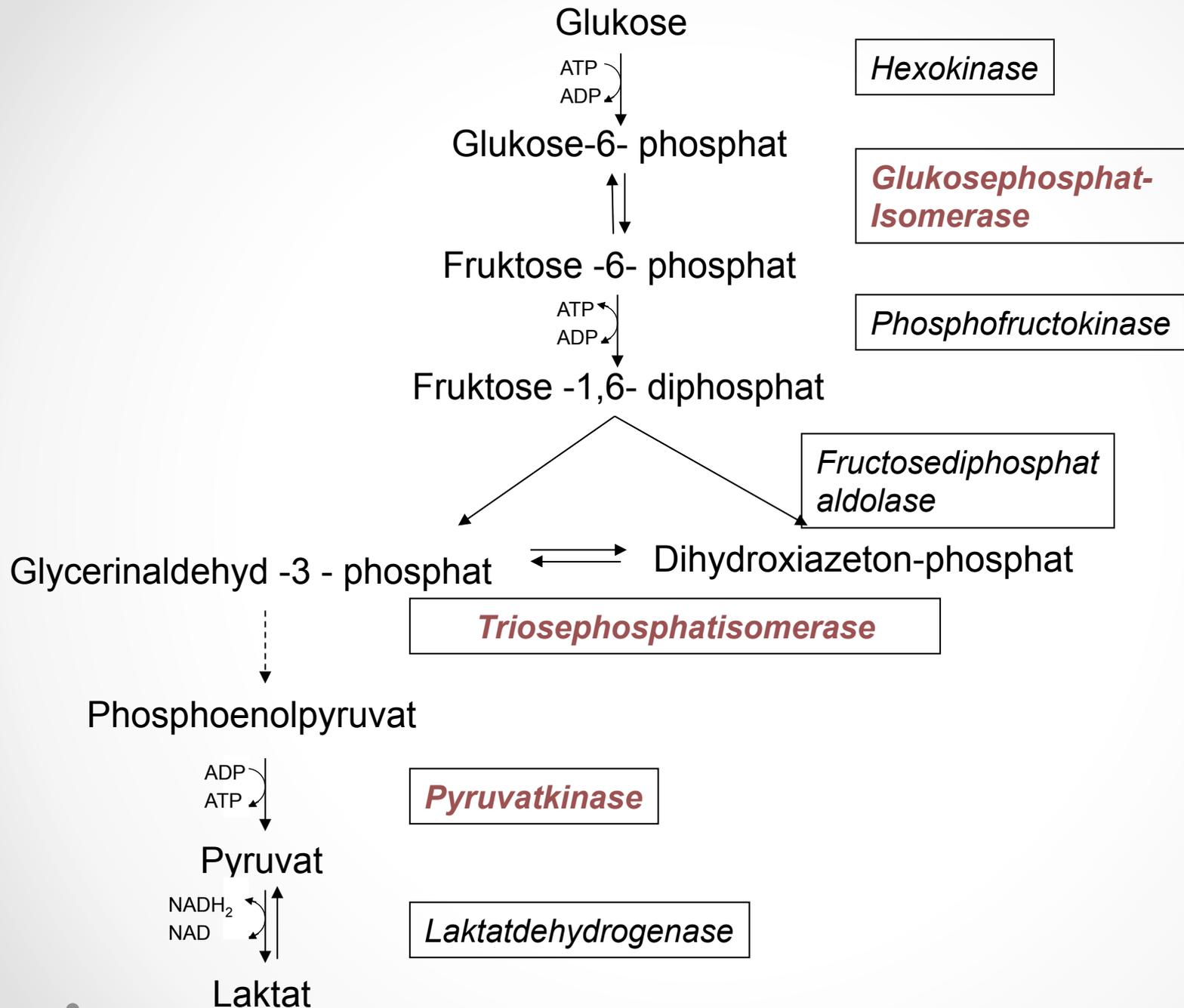
# Schwerer PK-Mangel mit Eisenüberladung: Weiterer Krankheitsverlauf

- 1 Woche nach Kombinationstherapie:
  - Flankenschmerzen
  - Cephalgien
  - Abgeschlagenheit
    - >Vorstellung in der Notaufnahme wegen hämolyt. Krise!

## **Hämolyseparameter:**

- LDH: 558 U/l
- Bilirubin Gesamt: 13,08 mg/dl
- Hb: 5,0 g/dl

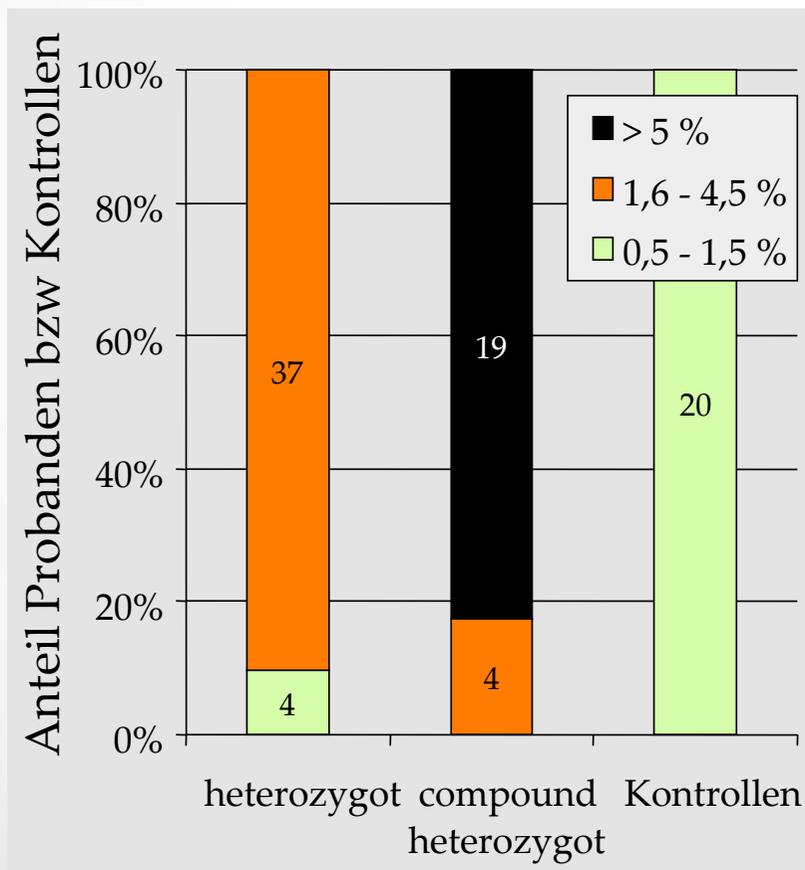
Nach Absetzen des Deferipron Normalisierung der Parameter  
sowie Besserung des AZ innerhalb 1 Woche



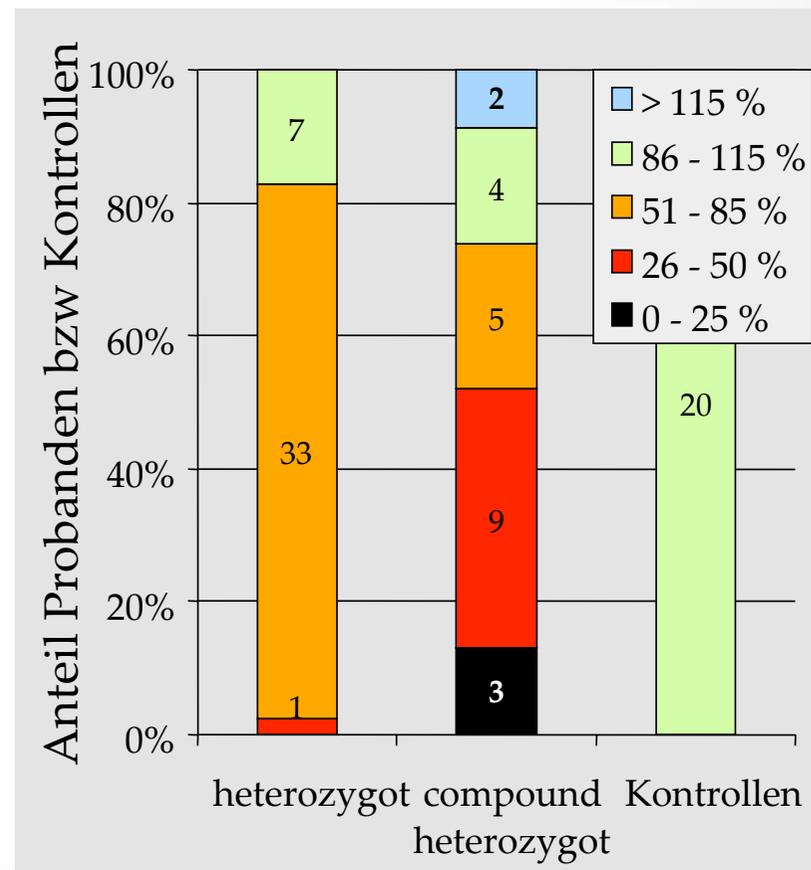
# Biochemische Daten

Klassifizierung von Probanden und Kontrollen nach

## Retikulozytenzahl



## PK - Aktivität (% der normalen Aktivität)



# Fall II: Mittelschwererer PK-Mangel oder Die Anämie fängt früher an, die Diagnose kommt spät

- 8-jähriger Patient
  - Vorstellung wegen pränataler Anämie mit 3x intrauterinen Transfusionen
  - Persistierendes Foramen ovale
  - Z.n. Hydrops fetalis
  - Schnell erschöpft
- >wg. Hämolyt. Anämie unklarer Genese 2013  
Vorstellung beim Schwerpunktpädiater

# Fall II: Labor

- Hb 12.0 g/dl
- Retikulozyten 85 ‰ (maschinell)
- Normales Differentialblutbild
- Haptoglobin 13.0 mg/dl
- Osmotische Resistenz: AGLT >30 min, EMA 106 %
- Enzymdiagnostik:
  - G6PD 4657 U/l Ec (Norm 1600-2900 U/l Ec)
  - PK 1864 U/l Ec (Norm 3100--5500 U/l Ec)
- Chromatographie:
  - HbF 10,4 %
  - HbA (mit HbA1a-c) 83,7 %
  - HbA2 4,6 %.

# Fall II: Kontrolle bei V. a. PK-Mangel

- Hb 11,7 g/dl
- Retikulozyten 34 ‰ (maschinell)
- Hämolysezeichen:
  - Bilirubin 1,1 mg/dl (vowiegend indirekt)
  - Haptoglobin auf 0 vermindert.
  - Eisen 141 mmg/dl

Untersuchung der Eltern:

Vater: Heterozygot für Pk-Mangel

Mutter: Heterozygot für PK-Mangel

# Differentialdiagnose bei Erythrozytenenzymdefekten

**Verdacht auf hämolytische Anämie aufgrund von RBC-Indizes**

(Hb↓, Retikulozyten↑, Bilirubin ↑)

Morphologie der Erythrozyten

normal oder unspezifisch

periodische hämolytische Krisen

G6PDH-Mangel

Hämolyse

chronisch hämolytische Anämie

neurologische Komponente

ja

nein

Mangel an

GPI PFK Aldolase TPI PGK

abnormal

osmot. Fragilität

Sphärozytose

PK-Mangel u.a. Glykolyse Enzymdefekte

Eber In:Blood: Principles Hematology Lippincott, 2003: 1887-

# Häufige Mutationen bei Pyruvatkinase- Mangel

- G1529A (Arg510Gln); 41 % der Mutationen in  
USA und Nordeuropa
- C1456T (Arg484Trp); 29 –32 % in Südeuropa
- C1468T (Arg490Trp); vorwiegend in der  
östlichen Hemisphäre

# Fall III: Mittelschwererer PK-Mangel

oder

## Stress stört die Zellproliferation

- 11-jähriger Patient aus Russland, vorgestellt in Schwerpunktpraxis 2013
- Angegebene Diagnose:
  - angeborene dyserythropoetische Anämie
- Starker Ikterus
- Leichte Anzeichen einer Knochenmarkhyperplasie in Form vorspringender Wangenknochen
- Z. n . Parvovirus-Infektion
-

# Fall III-Dyserythropoese bei PK-Mangel: Labor

- Hb 11.2 g/dl
- Hämatokrit 32.6%
- Normales Differentialblutbild
- Retikulozytenzahl: 51.1‰.
- Erythrozytenmorphologie:
  - Anisozytose +, Polychromasie +, Poikilozytose (+), Targetzellen (+)
- Gesamtbilirubin 7.1 mg/dl (direkt: 0.30 mg/dl, indirekt: 6.80 mg/dl)
- LDH 957 U/l
- Ferritin 35ng/ml, Transferrin / turbid. (S) 231 mg/dl
- Urobilinogenurie & Hämoglobinurie



# Fall III- Dyserythropoese bei PK-Mangel: Speziallabor

- Enzymdiagnostik (Erythrozytenlabor Würzburg
  - PK 1049 U/l Ec (Norm 3100-5500 U/l Ec)
    - Verminderung der Enzymaktivität auf 0 innerhalb weniger Minuten (Diagnostik durch Prof. Kohne, Universitätskinderklinikum Ulm)
    - mittlere Aktivität 16.4 micromol Substratumsatz/10<sup>11</sup> Ery/Minute (Norm 41 +/-10) (Prof. Kohne, Universitätskinderklinikum Ulm)
- Missense- Mutation: PK LR c.1529 G -> A  
Codon 510 Arg -> Gln(CGA > CAA)  
homozygot  
(Prof. Kohne, Universitätskinderklinik Ulm)
- Die resultierende Enzymvariante ist instabil

# Die Isoenzyme der Pyruvatkinase

- Pyruvatkinase = Schlüsselenzym der Glykolyse!
- 4 Isoformen: PKM1, M2, L, R auf zwei Genen (PK LR und M2)
- PK M1  
○ PKLR  
Muskel, Herz, Gehirn  
Nur im Erythrozyten
- PK M2 alle schnell wachsenden Gewebe (Fibroblasten, embryonal adulte Stammz. Tumor)
- Nach der Fetalperiode erfolgt ein **Isoenzym-Switch vom fetalen PKM2 zu PKM1**, erst dann kommt es durch die dysfunktionelle PK LR in den Erys zu Symptomen

# Wie Tumorzellen den Switch für sich nutzen

- PK M2 in tetramer (energieliefernder ) und dimerer (substratliefernder) Form
- in Tumorzellen erfolgt der Switch zur dimeren embryonalen Form (Tumor M2 PK)
  - bewirkt einen Konzentrationsanstieg der Stoffwechselzwischenprodukte der Glykolyse
  - Erhöhte Syntheseleistung durch ↑ Synthese v. Nukleins. Aminos. , Phospholipide,
  - Umstellung auf aerobe Glykolyse der Tumorzellen unter Sauerstoff (Warburg-Effekt)
  - Ein Rückswitch der embryonalen M2 zur M1 Isoform verhindert den Warburg-Effekt und vermindert das Tumorstadium

# Erythrozyten-Speziallabor Würzburg

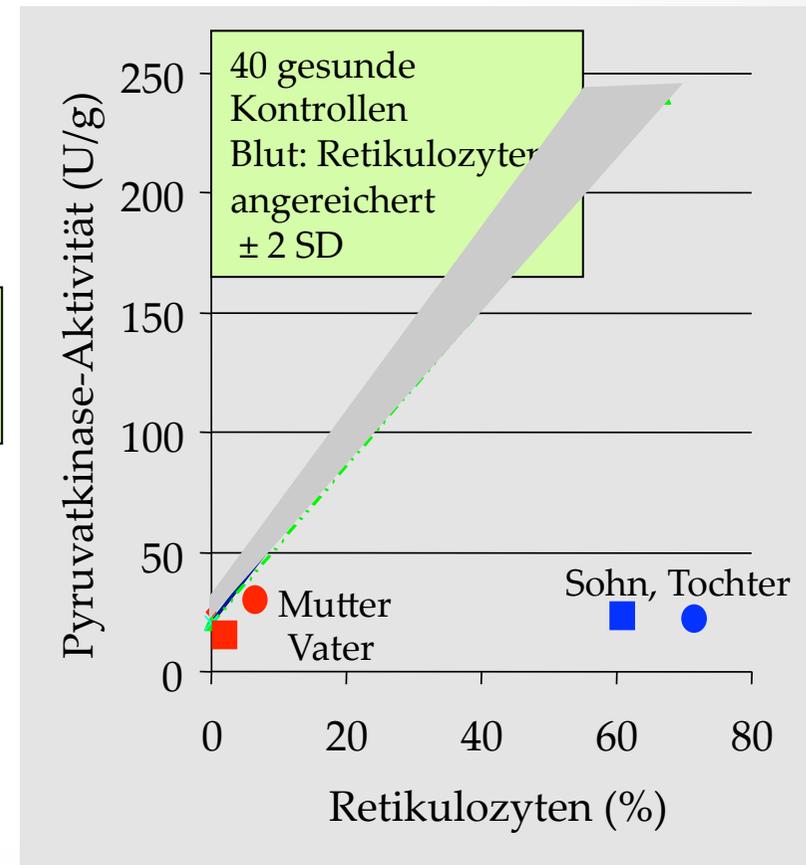
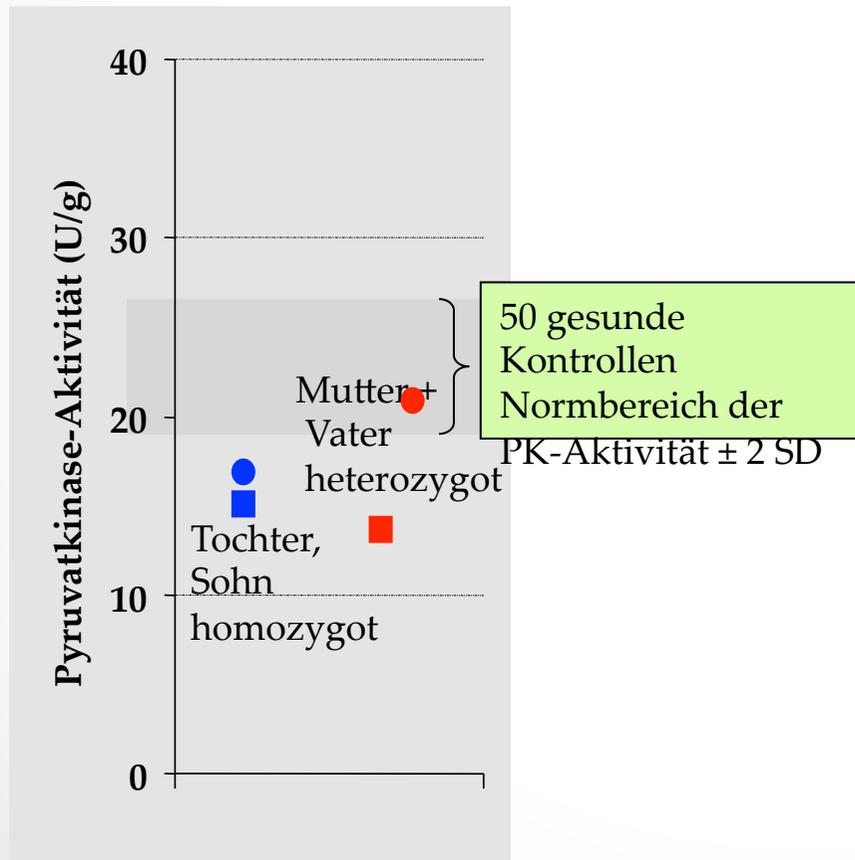
1160 Probeneinsendungen, davon  
417 Erythrozytenenzymmessungen

Neudiagnosen: 18x G6PD-Mangel  
12x PK-Mangel

Verdachtsdiagnose (v. a. Störung durch Transfusion):  
4x G6PD-Mangel  
26x PK-Mangel



# F V: Diagnostik des Pyruvatkinase-Mangels



# Studie:

## Pyruvate Kinase Deficiency (PKD) Natural History Study

- **Primäre Ziele:**
  - Erfassung **retrospektiver & prospektiver** klinischer Daten
  - jährliche Erhebung der **Lebensqualität** betroffener Patienten
  - **genetische Diagnostik:** genotypische und phänotypische Varianten Beschreiben
  - Abschätzung der Komplikationen infolge von **Transfusionen:** Vergleich von splenektomierten und nicht-splenektomierten Patienten mit PKD

# Studie:

## Pyruvate Kinase Deficiency (PKD) Natural History Study

### Weitere Ziele:

- Beurteilung, ob die vom Patienten berichteten Beschwerden von den bisher bekannten klinischen Parametern der PKD abweichen
- Veränderungen des **Hämoglobins** und von **Hämolyseparametern** über einen längeren Zeitraum
- Inzidenz der **Splenektomie** als Therapie der PKD
- Prävalenz und Therapie einer **Eisenüberladung**
- Abschätzung der Prävalenz von **Komorbiditäten**, die mit einer chronischen Hämolyse einhergehen.
- Erfolg und Komplikation von **Schwangerschaften** bei Patienten mit PKD

.



# Studie: Überblick

- **Studiendesign:** Beobachtungsstudie durch multizentrische, longitudinale retrospektive und prospektive Verlaufsbeobachtung von PKD Patienten
- **Zielpopulation:** Alle Studienteilnehmer mit Pyruvatkinase-Mangel (Pyruvate Kinase Deficiency = PKD) ohne Alterseinschränkung
- **Patientenzahl:** Circa 100 Teilnehmer.
- **Studiendauer:** Beobachtung der Studienteilnehmer über circa zwei Jahre

# Geeignete Populationen für die Studie?

- Südostasien (ehemaliges Abessinien)
- Somalien

Studie von Kohn, Fumi (2008) mit 25 Patienten:

- Lethargie
- Diarrhoe
- Ikterus
- Schlechte Fellqualität????

- 

-

# PK-Mangel in Abyssiner- & Somalikatzen



Auch bei den Vierbeinern finden sich Anämie, erhöhte Retis, erhöhte Lebertransaminasen etc.....

# Was gewinnt der Patient?

- besseres Verständnis der Beziehung zw. Genotyp/Phänotyp sowie der Vielfalt der Symptome und Komplikationen des Pyruvatkinase Mangels. ->**bessere Versorgung zukünftiger Patienten**
- **Keine Offenlegung besonderer persönlicher Daten**
- Sobald die Mutation gefunden wurde wird der Test anhand der CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) verifiziert
  - >**erleichterte Diagnostik**
  - > **Sicherung der Diagnose für den Patienten**

# Folgestudie

- **Erhofftes Ergebnis:**  
Entwicklung einer molekularen Therapie des PK-Mangels
- Pyruvatkinase = Tetramer mit allosterischer Regulation  
->Missense-Mutationen können die Allosterie destabilisieren und dadurch die Krankheit verursachen

Teilnehmer der Natural History Study, bei denen eine Mutation gefunden wurde, haben die Chance an der **Folgestudie zur Entwicklung einer molekularen Therapie zur Stabilisierung der PK-Tetramere teilzunehmen.**

(Teilnehmer ohne Mutation werden aus der Studie ausgeschlossen)

# Studienzentren (Stand 12.4.14)

- München - Würzburg (Eber, Andres)
  - 36 Patienten (12 x gesichert, 24 x V.a. PK Mangel)
  - Aufbau eines Registers für chronische angeborene hämolytische Anämien
  - Zentraler Ethik-Kommission- Antrag für die Studie eingereicht
- Kassel (Fr. Dr. Kollmar)
  - 228 Patienten mit gesichert. od. mögl. PK- Mangel
    - bis zum 14. LJ wurden 44% aller PK Patienten diagnostiziert
    - 24% mit Hb >8 g/dl bei Diagnosestellung
    - 13,5% benötigten Austauschtransfusion, 1/3 benötigen regelmäßig Transfusionen
    - >13% haben >3 aplast/hämolyt. Krisen
    - 46% bis zum Alter von 14 entwickeln Gallensteine
  - Ulm (Kohne, Cario)
  - Heidelberg (Kunze, angefragt)
  - Berlin (Lobitz angefragt)

# Anmeldeformular an Studienzentrale

Prof. Stefan Eber, Waldfriedhofstraße 73,  
81377 München; Tel: +49 89 7140 975

praxis@kid-z.de

**Patientennummer:** \_\_\_\_\_

**Alter:** \_\_\_\_\_

**PK-Restaktivität:** \_\_\_\_\_

(gemessen im Labor: \_\_\_\_\_)

**Ansprechpartner:** \_\_\_\_\_



# Fall VI: Achtung Hämoglobinurie!

- 5-jähriges Mädchen türkischer Abstammung
- Seit 5 Tagen zunehmende Blässe, leichter Sklerenikterus
- Am Vortag dunkler Urin, leichtes Fieber, Bauchschmerzen
- Bei Aufnahme Hb 8,0 g/dl. Reti 69 ‰, Thrombo 503 000/  $\mu$ l, Leuko 14400/  $\mu$ l, MCV 97 fl, Bilirubin 0,7 mg/dl. LDH 260 U/L.
- Dir. Coombs Test neg.
- Sonographie Abdomen unauffällig.



# Fall VI: Diagnostik

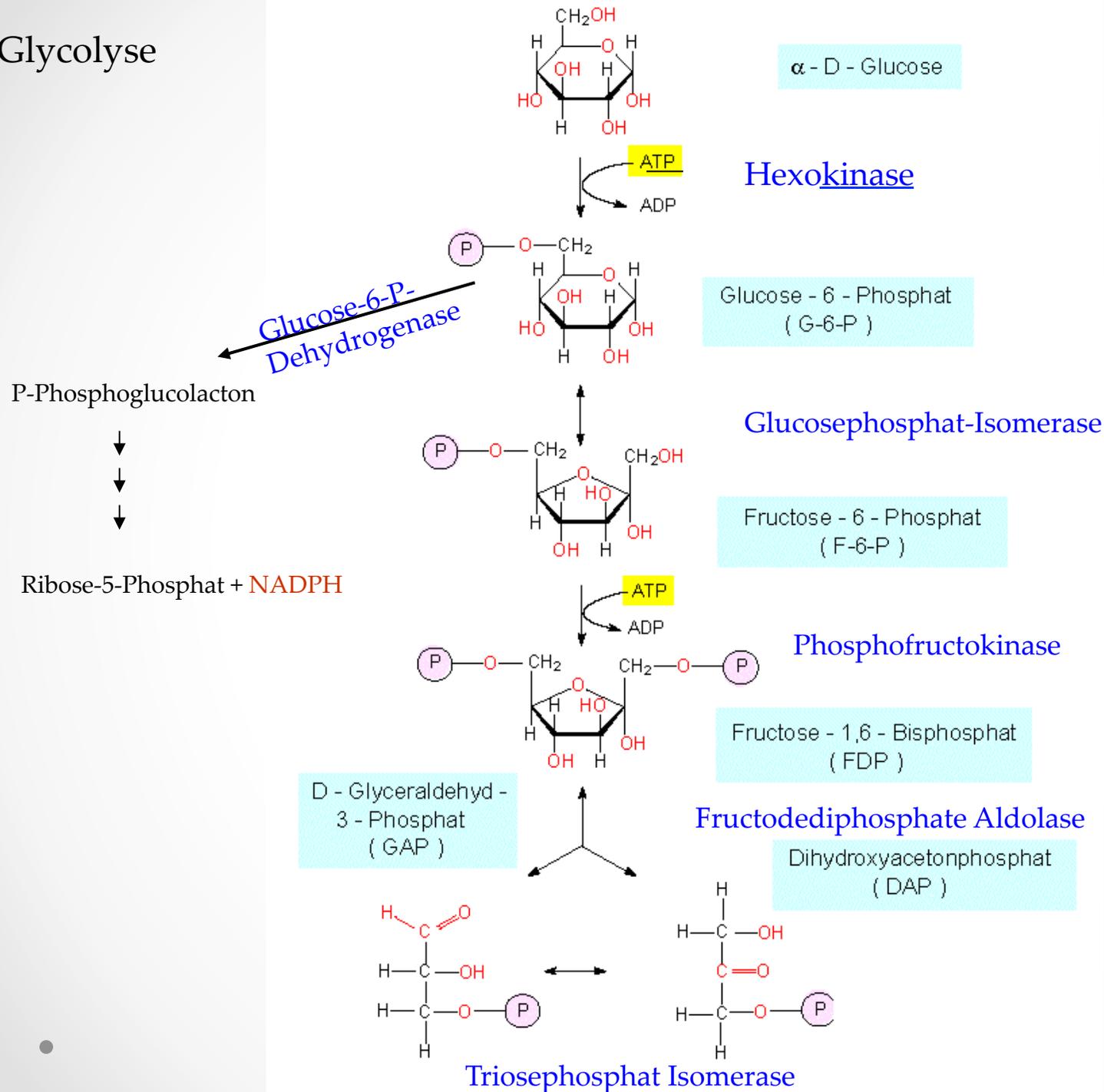
- Glukose- 6 – Phosphat Dehydrogenase 0,5 U/g Hb (Norm: 7-20,5)
- Beide Eltern türkisch konsanguin
- Molekulargenetik: Homozygotie für Favismus
  - häufigste Form im Mittelmeerraum
  - Medikamenten-/Nahrungs- oder Infekt- getriggerte schwere hämolytische Krisen mit Gefahr des Nierenversagens
- Vater hat das gleiche Risiko wie die Tochter



# Klinik des Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G6PDH)-Mangels

- häufigster Enzymdefekt
- **Selektionsvorteil** von Varianten mit hoher G6P-Affinität gegenüber **Malaria**
- **Mehrzahl der Patienten** mit G6PDH-Mangel **asymptomatisch**
- Hämolyse resultiert aus einer gesteigerten Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress („Favismus“)
- Meist keine Vergrößerung der Milz
- Auftreten von Heinz-Körperchen

# Glycolyse



# G6PDH-Mangel: WHO Klassifizierung

- **Klasse I**

sehr geringe Restaktivität an G6PDH, die eine chronisch hämolytische Anämie verursacht

- **Klasse II**

G6PDH Aktivität von 1 - <10 % ; Träger reagieren auf oxidativen Stress mit hämolytischen Krisen

- **Klasse III**

G6PDH Aktivität von 10 - 60 %

- **Klasse IV**

G6PDH Aktivität von 60 - 150 %; asymptomatisch

- **Klasse V**

G6PDH Varianten mit gesteigerter katalytischer Aktivität und hoher elektrophoretischer Mobilität

# Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase- Mangel

- Bevölkerung des Mittelmeerraumes:  
Typ Mediterran (Ser188 ⇒ Phe)
- Schwarzafrikaner: Typ A- (Leu323 ⇒ Pro).

# Hämolyse bei G-6-PD- Mangel

Acetanilid	Primaquin
Dapson	Sulfanilamid
Dimercaprol <sup>1</sup>	Sulfacetamid
Favabohnen	Sulfadimidin
Glibenclamid	Sulfapyridin
Metamizol	Sulfamethoxazol
Methylenblau (Methylthionium)	Sulfasalazin, Mesalazin; (5 ASA) <sup>1</sup>
Nailidixinsäure	Sulfoxon
Naphthalin	Thiazolsulfon
Niridazol	Toluidinblau
Nitrofurantoin (Furadantin)	Trinitrotoluol
Pamaquin	Uratoxidase
Phenylhydrazin	Cappellini, Fiorelli. The Lancet 2008; 371 (9606): 64-74; Scriver, Beaudet, Sly, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th edn. Columbus: McGraw-Hill, 2001: 4517–53
Phenazon (Phenazopyrazol, Phenylbutazon)	

# G-6-PD: Erlaubte Medikamente

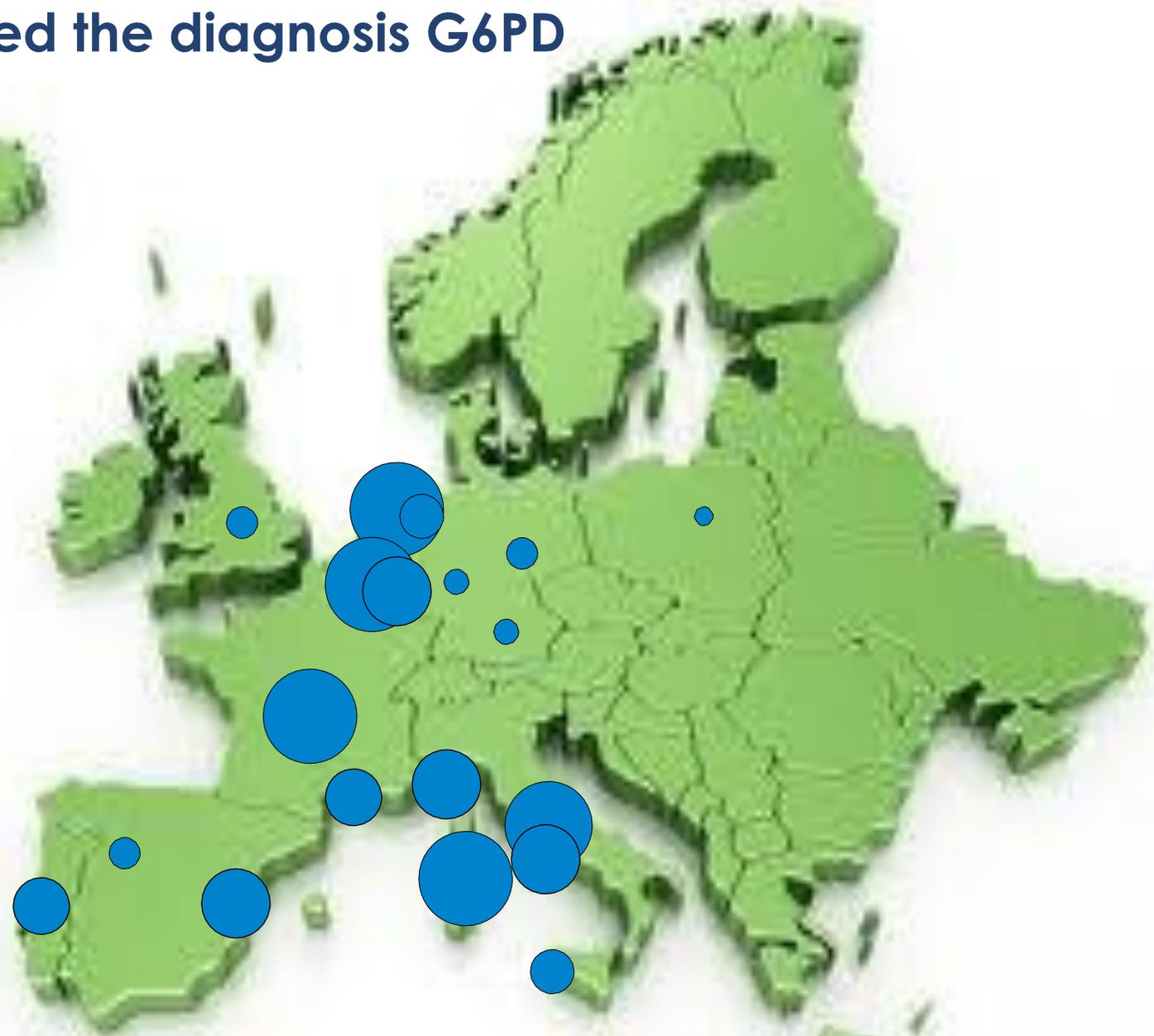
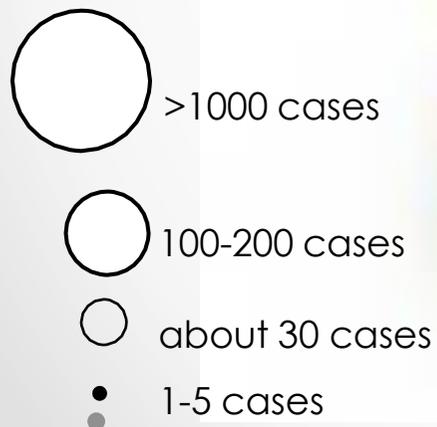
Amidopyrin	Phenytoin
Antazolin	Probenecid
Antipyrin	Procainamidhydrochlorid
	Proguanil
Chinidin	Pyrimethamin
Chinin	Streptomycin
	Sulfadiazin
Chloroquin	Sulfaguanidin
Colchicin	Sulfamerazin
Diphenhydramin	Sulfamethoxypyridazin
Isoniazid	Sulfisoxazol
L-Dopa	Trihexyphenidyl
Menadiolnatriumbisulfit	Tripelennamin
p-Aminobenzoesäure	Vitamin K Analoga <sup>1</sup>
Paracetamol	

# MERKE

- Afrikanische G6PD-Mutation hat nur geringe klinische Bedeutung. Die Restmenge des Enzymes reicht aus.
- Hämolytische Krisen sind selbstlimitierend, da die Retikulozyten eine hohe Aktivität haben.
- Menschen afrikanischer Abstammung dürfen Bohnen essen.
- Hämolytische Krisen bei mediterraner und chinesischer G6PD-Mutation sind nicht selbstlimitierend.
- G6PD ist nicht synonym mit Favismus.
  - separat über 2 Gene vererbt, aber es besteht eine Kosegregation bei mediterranem Typ.

# Centers involved the diagnosis G6PD

● Total number of cases diagnosed



## Centers involved in the diagnosis of rare red cell enzymes defects

● Other RBC enzymes defects

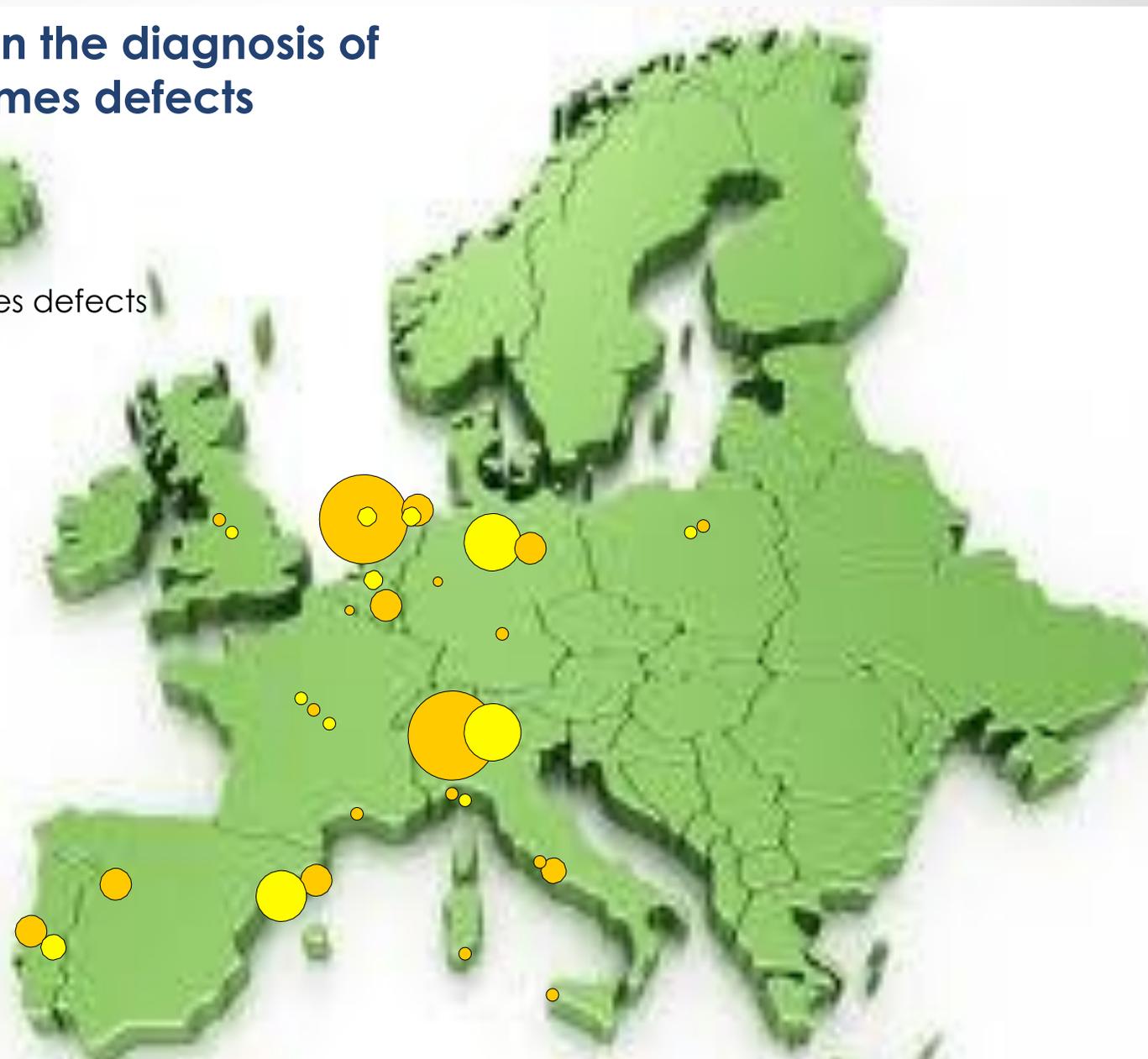
● PK deficiency

○ >80 cases

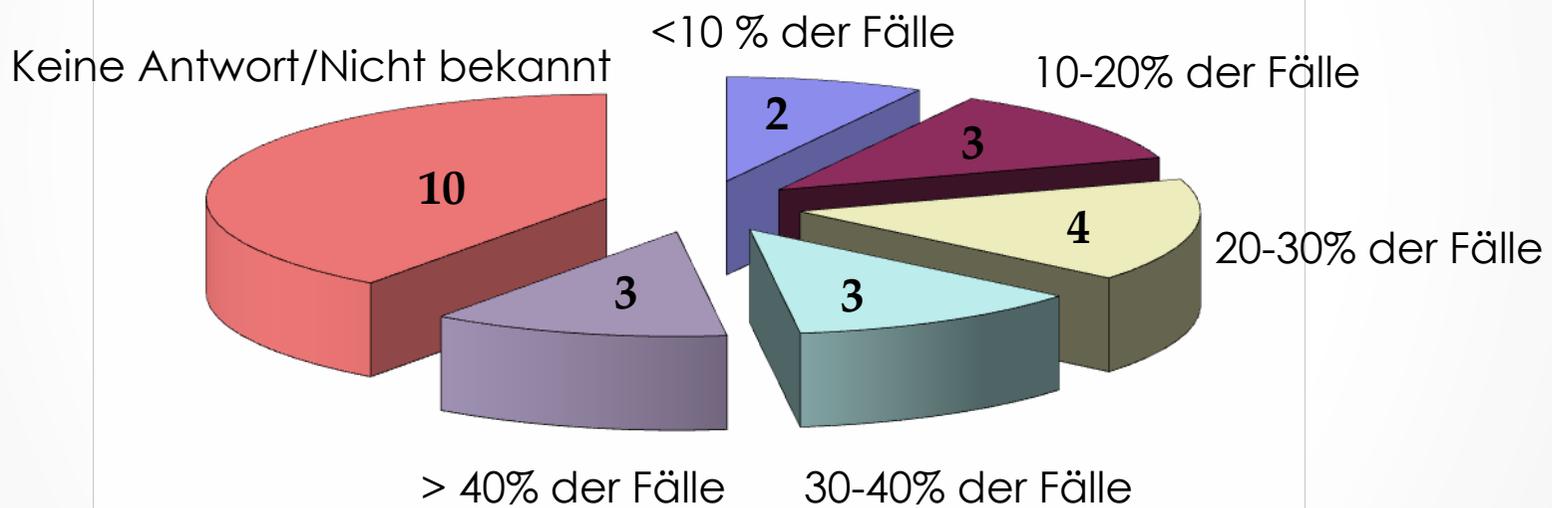
○ about 40 cases

○ about 30 cases

○ 1-5 cases



# Ungelöste Fälle nach Testverfahren und Ausschluss von anderen Anämieursachen



# Anwendung von Livocaps

- bei schwierigen Blutentnahmen oder Splitterentfernungen unbedenklich zu empfehlen.
- Elterninformation: eine harmlose und völlig ungefährliche Lachgas – Sauerstoff – Mischung zur Beruhigung(Sedierung)
- Nach Inhalation dieser Mischung tritt meist ein Wohlgefühl
- Keine/wenig Erinnerung an die die Behandlung.
- Leichter Schwindel möglich
- Information gern über die Praxis erhältlich

# Wichtigstes zum PK Mangel

- Autosomal rezessive Enzymopathie, die durch eine mässig – schwere hämolytische Anämie charakterisiert ist
- Seltene genetische Erkrankung, geschätzte Häufigkeit in Deutschland 500- 1000 Fälle (Heterozygotenfrequenz 1:50 – 1:100)
- Spectrophotometrischer Assay ist Methode der Wahl für die Untersuchung der RBC-Enzymaktivität.
- Eher ungünstige Prognose
  - Beginn unmittelbar postpartal mit mässig - schwerer hämolyt. Anämie, Ikterus gravis, teils intensivpflichtig, Hydrops möglich
  - Häufiger Transfusionsbedarf und erforderliche Splenektomie
  - Lebenslanges Risiko von chronischer Hämolyse und Eisenüberladung
- Prospektive weltweite Beobachtungsstudie
- Therapeutische Option kann in einer Folgestudie evaluiert werden

