

SONDERDRUCK

aus

3 | 2023

VBio

Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland



MIKROBIOLOGIE

Geschichte
der Bierhefe



BIOCHEMIE

Kein Leben
ohne Molybdän!



**MOLEKULARE
ZOOLOGIE**

Multitasking in
Epithelmuskelzellen

BIOLOGIE

IN UNSERER ZEIT



**Evolution
des Neokortex**

Persönlicher Rückblick eines Biochemikers

Warum sterben wir an einem Defekt im Molybdän-Stoffwechsel?

RALF R. MENDEL

1 Atomic Number
H Symbol

1 H																	2 He
3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
55 Cs	56 Ba	*	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
87 Fr	88 Ra	**	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn	113 Nh	114 Fl	115 Mc	116 Lv	117 Ts	118 Og
		*	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu
		**	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr

Das Element Molybdän (Mo) führt in der öffentlichen Wahrnehmung ein Aschenputtel-Dasein. Und dass es von biologischer Bedeutung sein könnte, ist weithin unbekannt. Anders sieht die Wahrnehmung bei den Ingenieuren aus. Sie kennen es als Metall, das als Beimengung den Werkzeugstahl besonders hart macht. Molybdändisulfid ist Bestandteil vieler technischer Schmierstoffe, und ein bekannter deutscher Schmiermittelhersteller trägt die erste Silbe des Wortes sogar in seinem Namen. Jedoch ist Mo in der Biologie von eminenter Bedeutung, angefangen von den einfachsten Bakterien bis hin zum Menschen. Es spielte auch in der Evolution eine große Rolle. Ohne Mo kein höheres Leben!

Im Periodensystem der Elemente ist Mo ein Übergangselement und trägt die Ordnungszahl 42. Sein Name leitet sich vom Altgriechischen *molybdos* = Blei her, weil es historisch lange Zeit mit Bleiglanz verwechselt wurde. 1778 vermutete der deutsche Chemiker Carl Wilhelm Scheele, dass es sich bei seinen Untersuchungen um ein neues Element handeln könnte. Später wurden die nützlichen Eigenschaften von Mo zur Stahlhärtung gefunden. Das Vorkommen von Mo in lebenden Organismen wurde erstmals 1930 beschrieben; in den 1950er Jahren identifizierte man Mo als katalytisch aktives Metall in Enzymen, aber es sind nicht mehr als eine Handvoll Mo-Enzyme, die für das Leben von Eukaryoten (also für Lebewesen, die im Gegensatz zu Bakterien einen Zellkern besitzen) eine Rolle spielen, angefangen von den Algen bis hin zum Menschen [1]:

- Die **Nitratreduktase** ist das Schlüsselenzym der pflanzlichen Stickstoffernährung.
- Die **Sulfitoxidase** oxidiert Sulfit zu Sulfat. Sulfit ist eine Zwischenverbindung im primären Schwefelstoffwechsel und kommt nur in geringsten Mengen im Stoffwechsel vor, da es hochreaktiv ist und Proteine unkontrolliert hemmen kann. Die Sulfitoxidase sitzt im

Intermembranraum der Mitochondrien und entgiftet dort das während des Abbaus schwefelhaltiger Aminosäuren anfallende Sulfid. Erst 2001 entdeckte meine Arbeitsgruppe die Sulfidoxidase auch bei Pflanzen [2], wo sie aber nicht in den Mitochondrien, sondern in den Peroxisomen lokalisiert ist.

- Die **Xanthinoxidase** ist ein weiteres Mo-Enzym und beteiligt sich am Abbau von Purin-Verbindungen. Xanthinoxidase kommt in größeren Mengen in Kuhmilch vor; sie ist auch ein wesentlicher Bestandteil der Muttermilch, da dieses Enzym Bakterieninfektionen entgegenwirkt.
- Die **Aldehydoxidase** spielt eine Rolle bei der generellen Entgiftung von schädlichen Aldehyden im Stoffwechsel.
- Die **mARC** ist das fünfte und bisher letzte Mo-Enzym, das in Eukaryoten gefunden wurde. Die Abkürzung steht für *mitochondrial amidoxime-reducing component* (mARC). Zusammen mit der Gruppe von Bernd Clement (Universität Kiel) haben wir dieses Enzym 2006 entdeckt [3]. mARC spielt eine Rolle bei der Entgiftung von N-hydroxylierten Verbindungen und ist von pharmakologischer Bedeutung.

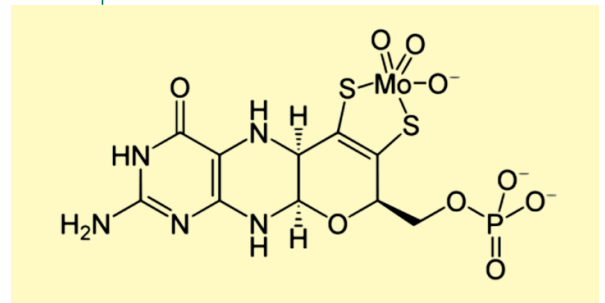
Auch detaillierte Proteom- und Genom-Analysen haben bisher keine weiteren Mo-Enzyme bei Eukaryoten identifiziert. Parallel zur Erforschung der Mo-Enzyme bei Tieren und Pflanzen liefen umfangreiche Untersuchungen bei Bakterien, wo über 50 verschiedene Mo-Enzyme [4] gefunden wurden. Aber nicht in jedem Bakterium kommt diese Vielzahl vor.

Mo ist ein Mikronährstoff (Spurenelement), d. h. der Organismus braucht ihn nur in winzigen Mengen. Die Nichtverfügbarkeit von Mo ist allerdings letal, wie wir später sehen werden. Ein erwachsener Mensch enthält weniger als 10 mg Mo in seinem Körper. Mo kommt im Boden und in den Ozeanen als Oxid- oder Sulfidverbindung vor; selbst in unserem Trinkwasser ist es in ausreichenden Mengen vorhanden, so dass Mo-Mangel in der menschlichen Ernährung keine Rolle spielt. Allerdings ist nur eine der vielen Oxidationsformen des Mo verfügbar für das Leben, und das ist das Molybdat MoO_4^{2-} . Molybdat ist ein Anion und kann deshalb nicht einfach die Zellmembran passieren. Deshalb besitzen alle Organismen in ihrer Zellmembran Molybdat-Transportproteine, die spezifisch und mit hoher Affinität nur Molybdat durch die Membran schleusen [4].

Der Molybdän-Cofaktor Moco

Hat das Molybdat die Zellmembran passiert, befindet es sich im Cytoplasma, aber es kann dort noch nicht in die Mo-Enzyme eingebaut werden. Dazu bedarf es seiner Bindung an das chemische Gerüst Pterin (ein heterozyklisches, ringförmiges Strukturelement mit Stickstoffatomen, das in vielen Biomolekülen wie z. B. Vitaminen und Farbpigmenten auftritt), wodurch es zum Molybdän-Cofaktor (Moco) wird. Nur in dieser Form als Moco (Abbildung 1)

ABB. 1 | DER MOLYBDÄN-COFAKTOR MOCO



Das Mo-Atom zusammen mit seinen aus dem Molybdat stammenden Sauerstoffatomen wird durch zwei Schwefelatome an das Pterin-Grundgerüst gebunden.

ist Mo biologisch aktiv und kann in Mo-Enzyme eingebaut werden. Moco ist evolutionär sehr alt; schon vor Milliarden Jahren besaßen ihn die allerersten Lebensformen auf der Erde. Offensichtlich ist dieses Gerüst nötig, um Mo als katalytisch aktives Metall im aktiven Zentrum von Enzymen korrekt zu positionieren. Kommt es zu einem Defekt in der Biosynthese des Moco-Gerüsts in der Zelle oder in der Bindung von Molybdat an das Gerüst, gibt es keinen aktiven Moco und die Aktivität aller Mo-Enzyme fällt gleichzeitig aus – mit letalen Folgen für die Zelle.

Hier beginnt mein persönlicher Teil in der Betrachtung der biologischen Wirkung von Mo. Ich begann 1974 mit meiner Doktorarbeit zu diesem Thema – und zwar mit pflanzlichen Zellkulturen. Der Moco war zu dieser Zeit noch nicht entdeckt. Aber es gab aus genetischen Arbeiten einer britischen Gruppe beim Pilz *Aspergillus nidulans* erste Hinweise. Diese Gruppe hatte in den 1960er Jahren Nitratreduktase-defiziente Mutanten isoliert, die einen neuen Phänotyp zeigten: den gleichzeitigen Verlust der beiden Mo-abhängigen Enzyme Nitratreduktase und Xanthindehydrogenase. Mo war das einzige Bindeglied zwischen diesen beiden ansonsten sehr unterschiedlichen Enzymen. Daher wurde vorgeschlagen, dass beide Enzyme

IN KÜRZE

- Das **Spurenelement Molybdän (Mo)** ist beim Menschen Bestandteil von vier Enzymen und ist lebensnotwendig.
- Mo wird **an ein chemisches Grundgerüst (Pterin) gebunden**, wodurch es zum Molybdän-Cofaktor (Moco) wird. Nur in dieser Form kann Mo biologisch aktiv werden.
- Ein genetischer Defekt in der Moco-Biosynthese führt zum **Ausfall der Aktivitäten aller Mo-Enzyme**.
- Der Ausfall des Mo-Enzyms Sulfidoxidase führt bei Neugeborenen zu **neurodegenerativen Symptomen** und ist in den meisten Fällen letal.
- Für Patienten mit einer Mutation im ersten Schritt der Moco-Biosynthese gibt es eine Therapie, bei der ihnen **das fehlende Biosynthese-Intermediat injiziert** wird. Das Medikament wurde 2022 in den USA und 2023 in Europa zugelassen.

einen gemeinsamen Cofaktor namens Molybdän-Cofaktor besitzen könnten [5].

Die britische Gruppe beschrieb fünf genetische Loci, deren Defekt jeweils zu diesem neuartigen Phänotyp führte, und bezeichnete sie mit der Abkürzung „*cnx*“ (Cofaktor für Nitratreduktase und Xanthindehydrogenase). Somit wurde deutlich, dass für diesen gemeinsamen Cofaktor fünf Gene verantwortlich sind, während für das Apoenzym der Nitratreduktase nur ein Locus kodiert. In meinen eigenen Arbeiten mit Zellkulturen der Pflanze *Nicotiana tabacum* fand ich unter Nitratreduktase-defizienten Mutanten ebenfalls eine Mutante, die den gleichzeitigen Verlust der beiden Mo-abhängigen Enzyme Nitratreduktase und Xanthindehydrogenase aufwies, und ich benannte sie mit *cnx* [6] (Abbildung 2). In der Forschungshistorie war damit die Existenz des Moco zunächst ein Postulat der Genetiker.

Wie stand es aber um die Biochemie? Die Gruppe des US-Amerikaners Rajagopalan nutzte die Labilität des Moco und überführte ihn in stabile Oxidationsprodukte, die schließlich 1982 zur Aufklärung der chemischen Struktur des Moco als Pterin-Verbindung führte [7] (Abbildung 1). Dieser Pterin-Moco ist Teil von allen bakteriellen und eukaryotischen Mo-Enzymen, jedoch gibt es eine Ausnahme: Die nur bei einer Gruppe von Bakterien vorkommende Nitrogenase, die Luftstickstoff zu Ammonium umwandeln kann, enthält keinen Pterin-Moco, sondern einen sehr komplexen Eisen-Mo-Cofaktor.

Biosynthese des Moco

Nachdem der Moco 1982 als Pterin-Verbindung identifiziert worden war, lag es nahe zu vermuten, dass die zuvor von Genetikern bei Pilzen und Bakterien gefundenen fünf Genloci an der Biosynthese des Moco beteiligt sind. Wir müssen uns vergegenwärtigen, dass zu dieser Zeit die Sequenzierung von Genen aufwändig und nur für Spezialisten zugänglich war, dass es kein Internet mit Datenbanken gab und dass sich ein Genlocus definierte als ein durch Kreuzung bestimmter Ort im Genom, dessen Mutation zu einem Funktionsausfall führt. Mithin konnte man die genetischen Daten und die chemische Identifizierung des Moco als Pterin nicht zur Deckung bringen.

Um dieses Dilemma zu lösen, begann ich nach meiner Promotion damit, unsere pflanzlichen *cnx*-Zellkulturen mit Moco-Defekt näher biochemisch zu untersuchen. Dasselbe machten die Gruppen, die mit Bakterien arbeiteten, und im Jahr 1992 wurden dann zwei erste allgemeine Modelle für die Moco-Biosynthese publiziert: meines für die Pflanze *Nicotiana tabacum* [8] und das der Rajagopalan-Gruppe für Bakterien [9]. Beide Gruppen konnten aber lediglich Vorschläge machen für die biochemische Funktion der Gene, denn die Produkte dieser Moco-Biosynthesegene waren noch unbekannt. Dann ging es Schlag auf Schlag.

Die molekularbiologischen Techniken von Genklonierung und DNA-Sequenzierung waren in den 1990er Jahren etabliert, und so haben wir in den Folgejahren alle Gene

ABB. 2 | MUTANTEN DER PFLANZE *NICOTIANA TABACUM*



Die Pflanze *Nicotiana tabacum* war in den 1970er und 1980er Jahren ein hervorragendes Modellobjekt für genetische und zellbiologische Arbeiten unter definierten Laborbedingungen: links im Bild die nichtmutierte Wildtyp-Pflanze (WT), in der Mitte eine Pflanze mit einer Mutation im Nitratreduktase-Gen (*Nia*⁻), rechts Pflanzen mit einer Mutation in der Moco-Biosynthese (*Cnx*⁻). Der Verlust der Nitratreduktase-Aktivität wurde durch Anzucht auf Ammoniumsuccinat als Stickstoffquelle im Nährmedium kompensiert.

der Moco-Biosynthese isoliert und molekular charakterisiert, nun aber nicht mehr bei der Pflanze *Nicotiana tabacum*, sondern bei der international als Modell etablierten Pflanze *Arabidopsis thaliana*. Durch Kombination von Genetik, Biochemie und Molekularbiologie konnte jedem der an der Moco-Biosynthese beteiligten Proteine eine genaue Funktion zugeschrieben werden [10]. Abbildung 3 zeigt die Zusammenfassung der biochemischen und zellbiologischen Details der Moco-Biosynthese am Beispiel der Pflanzen. Damit waren die Pflanzen die ersten Eukaryoten, bei denen die Moco-Biosynthese aufgeklärt worden war. Da die Biosynthese des Moco ein evolutionär sehr alter Stoffwechselweg ist, konnten wir annehmen, dass er auch beim Menschen ähnlich abläuft. Wir nutzten daher unsere biochemischen und genetischen Daten, isolierten die korrespondierenden Gene aus dem menschlichen Genom und beschrieben die Funktion der von ihnen kodierten Proteine.

Moco-Defizienz ist bei Menschen letal

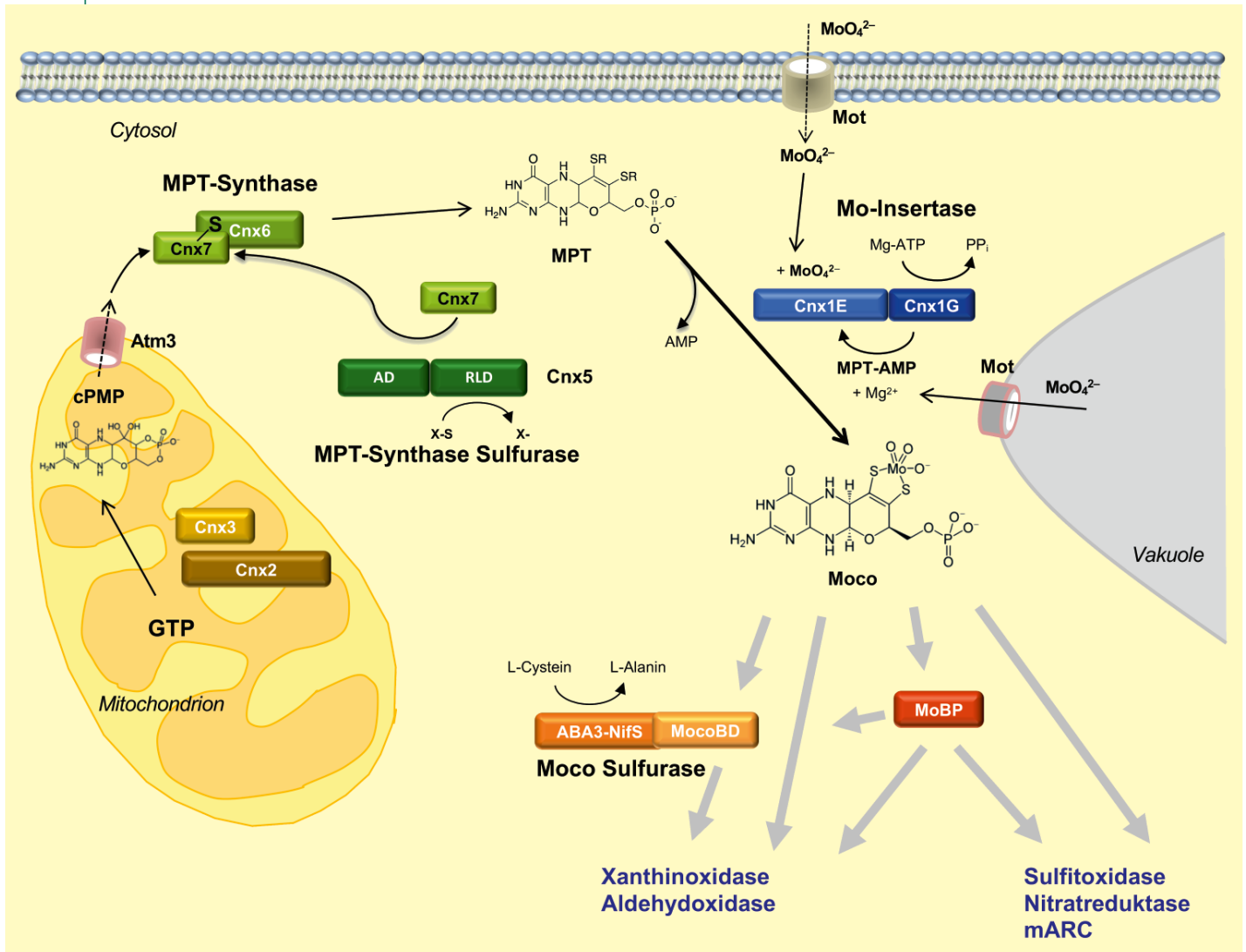
Als ich meine Doktorarbeit beendet hatte, wurde 1978 von einer niederländischen Gruppe eine Arbeit publiziert, die eine neue Stoffwechselkrankheit beschrieb: Bei einem Säugling, der nach seiner Geburt starke neurologische Defekte entwickelte, wurde der gleichzeitige Ausfall der zwei Mo-Enzyme Xanthinoxidase und Sulfitoxidase gemessen [12]. Die Autoren vermuteten einen Defekt im Mo-Zentrum der beiden Enzyme oder einen Defekt bei der Aufnahme von Mo in die Zelle (Letzteres wurde schnell ausgeschlossen). Dieser biochemische Phänotyp erinnerte mich stark an unsere pflanzlichen *cnx*-Mutanten mit einem Defekt in der Moco-Biosynthese. In den 1980er Jah-

ren kamen immer neue Medizin-Publikationen hinzu, die kleine Patienten mit diesem genetischen Defekt beschreiben, was in fast allen Fällen letal für die Säuglinge war. Es handelt sich um eine seltene rezessive angeborene Stoffwechselstörung, die den Namen „Molybdän-Cofaktor-Defizienz“ erhielt. Bis jetzt sind mehr als 100 Fälle wissen-

schaftlich beschrieben und publiziert. Die Inzidenz liegt bei ca. 1:100.000 [13]. Allen kleinen Patienten mit Molybdän-Cofaktor-Defizienz sind folgende Krankheitssymptome gemeinsam:

- wenige Tage nach der Geburt treten spastische Anfälle auf,

ABB. 3 | BIOSYNTHESEWEG DES MOCO BEI EUKARYOTEN



Der Moco-Syntheseweg lässt sich in mehrere Schritte unterteilen und ist hier für die Pflanze *Arabidopsis thaliana* dargestellt. Im Mitochondrion wird zunächst GTP durch zwei Proteine rezirkularisiert, und es entsteht das erste Intermediat, das wir cyclisches Pyranopterin-Monophosphat (cPMP) nennen. Dieses Intermediat wird über den Transporter Atm3 aus dem Mitochondrion ins Cytosol ausgeschleust. Im zweiten Schritt werden zwei Schwefelatome in cPMP eingebaut; daran sind zwei Proteine beteiligt und es entsteht das zweite Intermediat Molybdopterin (MPT). Der Schwefeldonor (X-S) ist sehr wahrscheinlich die Aminosäure Cystein. Jetzt ist das Pterin-Grundgerüst fertig für den Einbau des Mo. Diese beiden letzten Schritte werden durch ein einziges multifunktionales Protein katalysiert. Die Mo-Insertase adenyliert zunächst MPT; es entsteht das Zwischenprodukt MPT-AMP, das in einer sehr komplexen Reaktion aus Molybdät ein Sauerstoffatom abspaltet und an die beiden Schwefelatome koppelt, gleichzeitig wird AMP wieder abgespalten und der Moco ist fertig. Das Molybdät gelangt in die Zelle über einen Molybdät-spezifischen Transporter in der Zellmembran. Zusätzlich wird bei Pflanzen Molybdät in der Vakuole gespeichert und über einen weiteren Molybdät-spezifischen Transporter ins Cytosol geschleust, wo es für die Mo-Insertase zur Verfügung steht. Hier nicht dargestellt ist unsere Beobachtung, dass die Mo-Insertase am Aktin-Cytoskelett der Zelle verankert ist und zudem engen Proteinkontakt hat zu den in der Abbildung grün markierten Enzymen des zweiten Biosyntheseschrittes. Wir haben es daher mit einem am Cytoskelett verankerten Moco-Biosynthesekomplex zu tun. Der fertige Moco kann entweder an ein Moco-Bindeprotein (MoBP) gebunden werden oder direkt zu den Mo-Enzymen gelangen. Für die Xanthinoxidase und die Aldehydoxidase ist noch ein letzter Reifungsschritt nötig, den die Moco-Sulfurase katalysiert. Abb. modifiziert nach Mendel und Kruse 2012 [11].

- Ernährungsschwierigkeiten (kein Saugen, deshalb nasogastrale Ernährung über einen Schlauch),
- schwere Störungen der Gehirnentwicklung (die graue und weiße Masse löst sich teilweise auf),
- Hypotonie,
- wiederkehrende Anfälle von schweren Spasmen,
- hohe Mortalität,
- die weniger schweren Fälle haben eine Überlebensrate von drei Jahren.

Was ist die Ursache für diese verheerenden Symptome, die meist den Tod zur Folge haben? Es wurde schnell klar, dass dieselben Symptome bei einer anderen schweren Stoffwechselkrankheit beobachtet wurden, die ebenfalls angeboren ist und kurz nach der Geburt zu wirken beginnt, nämlich bei der Sulfitoxidase-Defizienz. Die Sulfitoxidase ist eines der vier Mo-Enzyme des Menschen, und ihr seltener genetisch bedingter Ausfall führt bei den Neugeborenen zu denselben Symptomen wie bei der Moco-Defizienz [14]. Sulfitoxidase-Defizienz kann also zwei Ursachen haben: eine Mutation im Sulfitoxidase-Gen oder eine Mutation im Moco-Biosyntheseweg. In beiden Fällen ist der beobachtete Effekt sehr ähnlich. Daraus wurde geschlossen, dass die Sulfitoxidase das wichtigste der vier Mo-Enzyme des Menschen ist. Patienten mit einem Defekt in der Xanthinoxidase haben milde oder überhaupt keine Symptome, und Menschen mit einem Ausfall der Aldehydoxidase oder des Mo-Enzyms mARC wurden bisher weltweit nicht beschrieben.

Wie können die dramatischen Folgen des Ausfalls der Sulfitoxidase erklärt werden? Dazu müssen wir uns die Einbindung dieses Mo-Enzyms in den menschlichen Stoffwechsel genauer ansehen. Die Sulfitoxidase ist im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert. Diese Zellorganellen sind mit ihrer ATP-Produktion nicht nur die Energielieferanten der Zelle, sondern sie beteiligen sich auch an der Biosynthese und am Abbau wichtiger anderer Stoffwechselprodukte. Der Abbau der beiden schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin endet in den Mitochondrien; dort wird ihr Schwefelatom oxidiert, und es entsteht Sulfit (SO_3^{2-}), das zu Sulfat (SO_4^{2-}) weiter oxidiert wird. Sulfat wird als finales Abbauprodukt aus der Zelle ausgeschieden und geht in den Urin über [14]. Im Unterschied zu Sulfat ist Sulfit ein gefährliches Anion. Es ist hochreaktiv und kann an Proteine und Metabolite binden und sie irreversibel schädigen [15]. Deshalb muss es am Ort seiner Entstehung durch die Sulfitoxidase sofort zu Sulfat oxidiert werden, das völlig unschädlich ist. Fällt dieses Mo-Enzym aus, akkumuliert Sulfit in der Zelle und verändert deren Stoffwechsel. Am empfindlichsten reagieren neuronale Zellen auf eine Sulfit-Akkumulation, was die früh auftretenden neuronalen Symptome (Krämpfe, Störung der Gehirnentwicklung) erklärt.

Warum treten die Symptome der Moco-Defizienz oder der Sulfitoxidase-Defizienz erst nach der Geburt auf? Die Erklärung ist einfach: Der Fötus ist durch die Nabelschnur mit der Mutter verbunden und deren Stoffwechsel entgif-

tet das Sulfit aus dem Blut des Kindes. Nach der Geburt ist der Stoffwechsel des Neugeborenen auf sich allein gestellt und das Sulfit beginnt zu akkumulieren und entfaltet seine schädigenden Effekte.

Entwicklung einer Therapie

Zur Behandlung der Sulfitoxidase-Defizienz und der Moco-Defizienz wurde seit den 1970er Jahren von den Medizinern viel versucht. An erster Stelle stand eine schwefelarme Ernährung, die tatsächlich auch etwas Linderung der schweren Symptome bewirkte. Oder es wurden Molybdat oder andere Mo-Verbindungen oral oder durch Injektion verabreicht, jedoch ohne Erfolg. Nach der molekularen Klonierung aller menschlichen Moco-Biosynthesegene beschlossen im Jahr 2000 mein Habilitand Günter Schwarz und ich, eine Moco-Ersatztherapie für diese verheerende Krankheit zu entwickeln. Sie bestand darin, den fehlenden Moco oder ein fehlendes Intermediat seiner Biosynthese dem Neugeborenen zu spritzen. Moco selbst und sein Vorläufer MPT (vgl. Abbildung 3) sind außerordentlich instabil, aber das erste Biosynthese-Intermediat cPMP zeigt ausreichende Stabilität. Jedoch war cPMP von Pharmafirmen nicht verfügbar, und es gab auch keine chemische Synthese von cPMP. Deshalb entwickelten wir ein biotechnologisches Verfahren für seine Synthese, indem wir eine *E. coli*-Mutante erzeugten, die einen genetischen Defekt im zweiten Moco-Biosyntheseschritt hatte, so dass cPMP im Bakterium auflief und wir es in ausreichenden Mengen reinigen konnten. Als nächsten Schritt mussten wir die Wirksamkeit der geplanten Ersatztherapie im Tiermodell testen. Dazu wurde eine sogenannte *knock-out*-Maus erzeugt, die einen genetischen Defekt im ersten Moco-Biosyntheseschritt hatte und kein cPMP mehr synthetisieren konnte. Sie war kleiner als ihre gesunden Geschwister, alle Mo-Enzyme waren gleichzeitig ausgefallen, und sie starb in den ersten 10 Lebenstagen. Wurde sie jedoch einen Tag nach der Geburt mit cPMP gespritzt (und das alle zwei Tage wiederholt), entwickelte sie sich normal, war genauso groß wie ihre nichtmutierten Geschwister und war fertil. Die Enzymmessungen zeigten, dass ihre Mo-Enzyme aktiv waren. Damit war im Tiermodell der Beweis für die Wirksamkeit der cPMP-Ersatztherapie erbracht und wir publizierten das Ergebnis im Jahr 2004. Im selben Jahr erhielten wir auch das Patent für dieses Therapieverfahren.

Unsere cPMP-Ersatztherapie kann nur für Patienten, bei denen der erste Schritt der Moco-Synthese gestört ist, eingesetzt werden. Günter Schwarz habilitierte sich 2004 und erhielt den Ruf auf eine Biochemie-Professur an die Universität Köln. Wir hielten weiter engen Kontakt und diskutierten das Für und Wider, was wir tun sollten, wenn ein neuer Patient mit Mutation im *mocs-1*-Gen bekannt werden würde. Wir waren fest überzeugt, dass die cPMP-Ersatztherapie Erfolg haben würde, aber das würde auch bedeuten, dass wir ein Leben lang die Verantwortung zu

tragen hätten für die Herstellung von cPMP. Günter Schwarz gründete deshalb eine kleine Start-up-Firma.

Im Jahr 2007 wurde in Australien ein Mädchen kurz nach dessen Geburt mit einer Mutation im ersten Schritt der Moco-Biosynthese gemeldet. Da es sich bei cPMP um ein sogenanntes *orphan drug*-Medikament handelt – also um ein Medikament für eine tödliche Krankheit, für die es noch keine andere Therapie gibt, das im Tierversuch erfolgreich war, aber noch nicht am Menschen getestet wurde – darf ein solches Medikament mit Zustimmung der Eltern am kleinen Patienten eingesetzt werden. Die cPMP-Ersatztherapie verlief sehr erfolgreich, die Stoffwechselwerte des Mädchens normalisierten sich schnell und alle Mo-Enzyme waren aktiv. Die kleine Patientin musste allerdings jeden Tag eine cPMP-Injektion erhalten. Nach vier Wochen konnte sie aus der Klinik entlassen werden. In den folgenden Jahren wuchs die Zahl der behandelten Kinder, bis das Start-up von Günter Schwarz die cPMP-Herstellung nicht mehr bewältigen konnte. Deshalb ging die cPMP-Produktion an eine US-Firma über, die sehr schnell die chemische Synthese von cPMP auf den Weg brachte und die notwendigen klinischen Testungen für die behördliche Zulassung der cPMP-Therapie in Gang brachte. Im Jahr 2016 wurde die erste Kohortenanalyse der weltweit behandelten Patienten publiziert, und endlich im Jahr 2021 kam die offizielle Genehmigung für das Medikament Nulibry durch die US-amerikanische Zulassungsbehörde FDA und im Herbst 2022 durch die europäische Zulassungsbehörde EMA in Brüssel. Das war ein langer Weg zwischen der Erstpublikation unseres Tiermodells im Jahr 2004 und den behördlichen Zulassungen.

Die Forschung geht weiter

Im April 2021 wurde ich mit 69 Jahren pensioniert, durfte aber meine Forschungen weiterführen. Wie könnte man Patienten mit einer Mutation im zweiten oder dritten Schritt der Moco-Biosynthese therapieren? Die Injektion von MPT oder Moco ist wegen der hohen Instabilität der beiden Verbindungen nicht praktikabel. Hier knüpft mein Emeritus-Projekt an. Vor wenigen Jahren hatte ich auf einer internationalen Konferenz einen jungen Postdoc der Harvard University (USA) getroffen, der bei der Nematode *Caenorhabditis elegans* eine bahnbrechende Beobachtung gemacht hatte. *C. elegans* ist ein 1 mm kleiner Fadenwurm, der im Erdreich lebt, sich von Bakterien ernährt und weltweit ein Modellobjekt der Entwicklungsbiologie ist. Diese Nematode kann selbst Moco synthetisieren, und auch wenn sie eine Mutation in ihrem Moco-Biosyntheseweg hat, lebt sie normal weiter, weil sie aus ihrer Nahrung den Moco extrahieren kann und in ihren eigenen Stoffwechsel einbaut. Füttert man diese Moco-defekten Nematoden aber mit Bakterien, die ebenfalls einen Moco-Defekt haben, so sterben die Würmer. Der junge Postdoc Kurt Warnhoff und ich begannen eine enge Zusammenarbeit, um folgende Fragen zu klären: (1) Wie kann *C. elegans* den Moco aus seiner Nahrung herauslösen, ohne dass er

Schaden nimmt? Welche Mechanismen stecken hinter der Stabilisierung und Verteilung des aufgenommenen Moco im Körper der Nematode? Wie wird der aufgenommene Moco schließlich in die Zielenzyme des Fadenwurms eingebaut? Wenn wir einst diese grundlegenden Fragen beantworten können, dann wäre nicht nur der Weg frei für eine orale Therapie der humanen Moco-Defizienz, sondern möglicherweise auch für eine Therapie von Patienten mit einer Mutation in Schritt zwei oder drei der Moco-Biosynthese.

Ein Blick in die Zukunft

Im kommenden Jahr werden es 50 Jahre sein, in denen ich mich mit dem Moco beschäftige. Es begann mit der biochemischen Analyse pflanzlicher Zellkulturen, gefolgt von der Klonierung der Gene des pflanzlichen Moco-Biosyntheseweges und der Funktionsaufklärung der von ihnen kodierten Proteine. Es war erkenntnisgetriebene Grundlagenforschung. Die Arbeiten bei Pflanzen dienten uns als Blaupause für die Aufklärung der humanen Moco-Biosynthese, und damit war das Tor offen zur Entwicklung einer Therapie für humane Patienten. Ich betone hier die Reihenfolge: Niemand hat uns anfänglich beauftragt, eine Therapie zu entwickeln. Nur durch unsere jahrzehntelange Grundlagenforschung, getrieben von der Neugier, einen bisher nicht erforschten Stoffwechselweg detailliert aufzuklären, eröffnete sich zu einem späteren Zeitpunkt die Möglichkeit, an eine Therapie als Anwendung zu denken. Ich gebe zu, dass es sehr befriedigend ist und mich glücklich macht, dass unsere Forschungen dazu geführt haben, das Leben von Kindern zu retten. Jetzt am Abend meiner Karriere blicke ich zurück auf glückliche Forschungszeiten und auf Mitarbeiter, die ihre eigenen Professuren haben – aber ich blicke vor allem enthusiastisch nach vorn, um zusammen mit Kurt Warnhoff völlig ungeahnte Mechanismen der Moco-Biochemie bei *C. elegans* zu entschlüsseln und diese eines Tages für neue Therapien zu nutzen. Forschungsneugier endet nie.

Zusammenfassung

Das Spurenelement Molybdän (Mo) ist lebensnotwendig für den Menschen, bei dem es als katalytisch aktives Metall Bestandteil von vier Enzymen ist. Oxidiertes Mo wird als Molybdat aus der Nahrung aufgenommen und an ein chemisches Grundgerüst (Pterin) gebunden, wodurch es zum Molybdän-Cofaktor (Moco) wird. Nur in dieser Form kann Mo biologisch aktiv werden. Die Biosynthese des Moco ist ein Mehrschrittprozess, der in den Mitochondrien beginnt und im Cytoplasma abgeschlossen wird. Ein genetischer Defekt in der Moco-Biosynthese führt zum Ausfall der Aktivitäten aller vier Mo-Enzyme des Menschen, wobei der Ausfall der Sulfioxidase dramatische Folgen hat. Das hochreaktive Sulfid akkumuliert und schädigt irreversibel Proteine und Metabolite, worauf neuronale Zellen in Neugeborenen am empfindlichsten reagieren. Die neurodegenerativen Symptome (Krämpfe, Störung der Gehirnentwicklung) füh-

ren in den meisten Fällen zum Tod der kleinen Patienten. Isolierter Moco ist zu instabil, um ihn den betroffenen Neugeborenen als Ersatz zu spritzen, aber für Patienten mit einer Mutation im ersten Schritt der Moco-Biosynthese gibt es eine Therapie. Ihnen wird das fehlende Biosynthese-Intermediat cPMP injiziert, was den genetischen Ausfall kompensiert und eine normale Kindesentwicklung ermöglicht. Das Medikament wurde 2021 in den USA und 2022 in Europa zugelassen.

Summary

Why do we die of a defect in molybdenum metabolism?

The trace element molybdenum (Mo) is vital for humans. As catalytically active metal it is part of four enzymes. Oxidized Mo is taken up from our food as molybdate and bound to a chemical scaffold (pterin) thus becoming the molybdenum cofactor (Moco). Only in this form Mo can become biologically active. The biosynthesis of Moco is a multi-step process starting in the mitochondria and completed in the cytoplasm. A genetic defect in Moco biosynthesis leads to the activity loss of all four Mo-enzymes in humans with most dramatic effects through the loss of sulfite oxidase. The highly reactive sulfite accumulates and damages proteins and metabolites irreversibly. In newborns, neuronal cells react most sensitively to sulfite, and in most cases neurodegenerative symptoms (spasms, impairment of brain development) lead to the death of the little patients. Moco in its isolated form is too unstable to be injected into the newborns as therapeutic medication, but there is a therapy for patients with a mutation in the first step of Moco-biosynthesis. Those patients receive the missing biosynthesis intermediate cPMP by injection thus compensating for the genetic loss and permitting a normal child development. The medication was approved in 2021 in the USA and in 2022 in Europe.

Schlagnworte:

Molybdän, Molybdän-Cofaktor, Xanthinoxidase, Sulfitoxidase, Nitratreduktase, Aldehydoxidase, Molybdän-Cofaktor-Defizienz beim Menschen

Literatur

- [1] R. R. Mendel (2022). The History of the Molybdenum Cofactor – A Personal View. *Molecules* 27, <https://doi.org/10.3390/molecules27154934>
- [2] T. Eilers et al. (2001). Identification and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase. A new player in plant sulfur metabolism. *J. Biol. Chem.* 276, 46989–46994.
- [3] A. Havemeyer et al. (2006). Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem* 281, 34796–34802.
- [4] R. R. Mendel et al. (2015). The biosynthesis of the molybdenum cofactors. *J Biol Inorg Chem* 20, 337–347.
- [5] D. J. Cove et al. (1963). Independently segregating genetic loci concerned with nitrate reductase activity in *Aspergillus nidulans*. *Nature* 198, 262–263.
- [6] R. R. Mendel et al. (1976). A common genetic determinant of xanthine dehydrogenase and nitrate reductase in *Nicotiana tabacum*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 170, 538–541.
- [7] J. L. Johnson et al. (1982). Structural and metabolic relationship between the molybdenum cofactor and urothione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 6856–6860.
- [8] R. R. Mendel (1992). The plant molybdenum cofactor (MoCo) – its biochemical and molecular genetics, in: *Plant Biotechnology and Development - Current Topics in Plant Molecular Biology* (Hrsg. P. M. Gresshoff), CRC Press, Boca Raton and London, 1, 11–16.
- [9] K. V. Rajagopalan et al. (1992). The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.* 267, 10199–10202.
- [10] G. Schwarz et al. (2006). Molybdenum Cofactor Biosynthesis and Molybdenum Enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 623–647.
- [11] R. R. Mendel et al. (2012). Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochim Biophys Acta* 1823, 1568–1579.
- [12] M. Duran et al (1978). Combined deficiency of xanthine oxidase and sulphite oxidase: a defect of molybdenum metabolism or transport? *J. Inherit. Metab. Dis.* 1, 175–178.
- [13] L. Johannes et al. (2022) Molybdenum Cofactor Deficiency in Humans. *Molecules* 27, <https://doi.org/10.3390/molecules27206896>
- [14] A. T. Kaczmarek et al. (2022). A defect in molybdenum cofactor binding causes an attenuated form of sulfite oxidase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 45, 169–182.
- [15] D. B. Menzel et al. (1986). Covalent reactions in the toxicity of SO₂ and sulfite. *Adv Exp Med Biol* 197, 477–492.

Verfasst von:



Ralf R. Mendel studierte Biochemie an der Humboldt Universität Berlin, promovierte 1979 und habilitierte 1990 an der Martin-Luther-Universität Halle. Er arbeitete am Institut für Genetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, wurde 1991 Adjunct Research Professor an der University Tennessee (USA) und wurde 1992 zum Universitätsprofessor an die TU Braunschweig berufen, wo er von 1993 – 2021 das Institut für Pflanzenbiologie leitete. Sein Arbeitsgebiet ist die molekulare Biochemie und Zellbiologie des Molybdän-Stoffwechsels bei Pflanzen, Säugetieren und Pilzen. In seinem Emeritus-Projekt arbeitet er in Braunschweig und den USA über den Molybdän-Stoffwechsel bei der Nematode *C. elegans*.

Korrespondenz

Prof. i. R. Dr. Ralf R. Mendel
Institut für Pflanzenbiologie
TU Braunschweig
38106 Braunschweig
E-Mail: r.mendel@tu-bs.de



Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**GEMEINSAM
FÜR DIE**

BIEWISSENSCHAFTEN

Gute Gründe, dem VBIO beizutreten:

- Werden Sie Teil des größten Netzwerks von Biowissenschaftlern in Deutschland
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf
- Bleiben Sie auf dem Laufenden – mit dem VBIO-Newsletter und dem Verbandsjournal „Biologie in unserer Zeit“
- Treten Sie ein für die Zukunft der Biologie



www.vbio.de

Jetzt beitreten!

