

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor der Klinik: Univ.- Prof. Dr. E. Mayatepek

**Molekulargenetische Charakterisierung
türkisch-stämmiger Patienten mit Ahornsirupkrankheit (MSUD)
und geografische Verteilung der Mutationssequenzen
in der Türkei**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Kerstin Stefanie Gorzelany

2009

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor der Klinik: Univ.- Prof. Dr. E. Mayatepek

**Molekulargenetische Charakterisierung
türkisch-stämmiger Patienten mit Ahornsirupkrankheit (MSUD)
und geografische Verteilung der Mutationssequenzen
in der Türkei**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Kerstin Stefanie Gorzelany

2009

Gedruckt mit der Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. J. Windolf (amtierender Dekan)

Referent: Prof. Dr. U. Wendel

Korreferent: Frau Prof. Dr. B. Royer-Pokora

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2009

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Historischer Überblick.....	1
1.2 Genetische Grundlagen und populationsspezifische Inzidenzen	2
1.3 Pathomechanismus	3
1.4 Aufbau und Regulation des Multienzymkomplexes der BCKDH	6
1.5 Klinik der Ahornsirupkrankheit	8
1.5.1 Klinische Phänotypen	8
1.5.2 Diagnostik	10
1.5.3 Therapie	12
1.6 Molekulargenetik	13
1.7 Ziele der Arbeit	15
2 Patienten, Material und Methoden.....	16
2.1 Klinische Analyse und Methoden	16
2.1.1 Patienten	16
2.1.2 Ermittlung von klinischen und biochemischen Daten.....	17
2.2 Molekulargenetische Untersuchung	19
2.2.1 Patienten zur Genotypisierung	19
2.2.2 Material.....	19
2.2.3 Methoden	20
3 Ergebnisse.....	26
3.1 Genotypen der analysierten Patienten	26
3.1.1 Mutationen im <i>BCKDHA</i> -Gen	26
3.1.2 Mutationen im <i>BCKDHB</i> -Gen	32
3.1.3 Mutationen im <i>DBT</i> -Gen	36
3.1.4 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse.....	38
3.2 Darstellung aller türkisch-stämmigen Patienten mit jeweils 2 mutierten Allelen an einem Genlocus für MSUD	39
3.3 Geografische Zuordnung der Mutationen in der Türkei hinsichtlich der Familienherkunft	42

4	Diskussion	43
4.1	Mögliche Konsequenzen der gefundenen Mutationen auf die Sekundär-/Tertiärstruktur der Untereinheiten E1(E1 α +E1 β) und E2 des BCKDH-Multienzymkomplexes	43
4.1.1	Mutationen im <i>BCKDHA</i> -Gen	44
4.1.2	Mutationen im <i>BCKDHB</i> -Gen	48
4.1.3	Mutationen im <i>DBT</i> -Gen	52
4.2	Geografische Zuordnung	54
4.3	Bedeutung der Molekulargenetik in der Pränataldiagnostik.....	56
4.4	Methodische Reflexion.....	57
5	Zusammenfassung	59
	Anhang A: Tabellen	64
A.1	Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des <i>BCKDHA</i> -Gens	64
A.2	Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des <i>BCKDHB</i> -Gens	64
A.3	Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des <i>DBT</i> -Gens	65
	Anhang B: Patientenfragebogen	66
	Literaturverzeichnis	68
	Lebenslauf.....	76
	Veröffentlichungen	77
	Danksagung	78
	Abstract	79
	Erklärung.....	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Globale Prävalenz konsanguiner Eheschließungen..	11
Abbildung 2: Abbauege der verzweigtkettigen Aminosäuren.	13
Abbildung 3: Dreidimensionalen Struktur und Anordnungen der fünf katalytischen Untereinheiten innerhalb des Multienzymkomplexes..	15
Abbildung 4: Flussdiagramm der Patientenauswahl.....	24
Abbildung 5: Nukleotidsequenz der p.Gln69Stop-Mutation.	34
Abbildung 6: Nukleotidsequenz der p.Cys258Stop-Mutation.....	34
Abbildung 7: Nukleotidsequenz der p.Arg363Trp-Mutation.	35
Abbildung 8: Nukleotidsequenz der IVS6 -1 (E1 α)-Mutation.	36
Abbildung 9: Nukleotidsequenz der p.Ala91Val-Mutation.	39
Abbildung 10: Nukleotidsequenz der p.Cys188Stop-Mutation.....	39
Abbildung 11: Nukleotidsequenz der p.Glu230Stop-Mutation.	40
Abbildung 12: Nukleotidsequenz der p.Ser339Leu-Mutation.....	34
Abbildung 13: Nukleotidsequenz der p.Tyr383Stop-Mutation.	42
Abbildung 14: Geografische Zuordnung der verschiedenen Mutationen in der Türkei.....	48
Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der Proteinsequenzen der E1 α - Untereinheit des Menschen und <i>Pseudomonas putida</i>	50
Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der Proteinsequenzen der E1 β - Untereinheit des Menschen und <i>Pseudomonas putida</i>	48
Abbildung 17: Darstellung der Zusammenlagerung des $\alpha_2\beta_2$ Heteroteramer E1.....	51
Abbildung 18: Interaktion zwischen $\alpha_2\beta_2$ Heteroteramer E1 und und der E2- Bindungsdomäne.	52
Abbildung 19: Vergleichende Darstellung der Proteinprimärsequenzen der bovinen E2b(CD)-Untereinheit, der E2o(CD) von <i>E. Coli</i> und E2p(CD) von <i>A. vinelandii</i>	53
Abbildung 20: geografische Zuordnung der verschiedenen Mutationen in der Türkei.....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der klinischen Phänotypen	18
Tabelle 2: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit molekulargenetisch untersuchten Patienten mit MSUD.	25
Tabelle 3: Mutationen im <i>BCKDHA</i> -Gen.....	36
Tabelle 4: Polymorphismen im <i>BCKDHA</i> -Gen	37
Tabelle 5: Mutationen im <i>BCKDHB</i> -Gen.....	41
Tabelle 6: Mutationen im <i>DBT</i> -Gen.....	37
Tabelle 7: Polymorphismen im <i>DBT</i> -Gen	43
Tabelle 8: Ergebnisse der molekulargenetischen Charakterisierung von untersuchten 15 Patienten.....	44
Tabelle 9: Patienten mit Mutationen im <i>BCKDHA</i> -Gen	40
Tabelle 10: Patienten mit Mutationen im <i>BCKDHB</i> -Gen	40
Tabelle 11: Patienten mit Mutationen im <i>DBT</i> -Gen	41

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
BCAA	branched-chain-amino-acid
BCKA	branched-chain-ketoacid
BCKDH	branched-chain α -ketoacid dehydrogenase
BCKDHA	branched-chain-ketoacid dehydrogenase E1, alpha Polypeptide
BCKDHB	branched-chain-ketoacid dehydrogenase E1, beta Polypeptide
C	Cytosin
CD	core [catalytic] domain
c.DNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DBT	dihydrolipoamide branched chain transacylase E2
DH	Dehydrogenase
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KGDH	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase
KIC	α -Ketoisocaproinsäure
KIV	α -Ketoisovaleriansäure
KMV	α -Keto- β -Methylvaleriansäure
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
NAD	Nikotinamidadeninidinnucleotid
p	Piko
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDH	Pyruvatdehydrogenase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SNP	single nucleotid polymorphism
SBD	subunit-binding domain
T	Thymin
TMS	Tandem-Massenspektrometrie
TPP	Thiaminpyrophosphat
μ	Mikro
U	Unit

1 Einleitung

1.1 Historischer Überblick

Als klinischer Erstbeschreiber der Ahornsirupkrankheit berichtet Menkes im Jahr 1954 über vier von sechs Kindern einer Familie, die alle noch in der Neugeborenen-Phase nach progredient verlaufender metabolischer Enzephalopathie im Koma verstarben (Menkes et al., 1954). Zusätzlich zu dem in der histopathologischen Aufarbeitung gefundenem Mangel an Myelin und der ausgeprägten spongiösen Degeneration der weißen Hirnsubstanz fielen alle gestorbenen Kinder durch einen charakteristischen süßlichen Uringeruch auf. Dieser erinnerte an den Geruch von Ahornsirup und diente später als Namensgeber für die Erkrankung, die im Englischen als MSUD (Maple Syrup Urine Disease) bezeichnet wird (Menkes et al., 1959). Mittels enantioselectiver multidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie (enantio-MDGC-MS) konnte, knapp 40 Jahre später, die im Isoleucinintermediärstoffwechsel vorkommende Substanz Sotolone, welche auch in Ahornsirup enthalten ist, für diesen charakteristischen Geruch des Urins der betroffenen Patienten identifiziert werden (Podebrad et al., 1999). Neben diesem somit treffenden Namen Ahornsirupkrankheit beschreibt der weniger gebräuchliche Name Leucinose gleichermaßen eine weitere grundlegende Eigenschaft der Erkrankung, den Konzentrationsanstieg der Aminosäure Leucin im Blut (Langenbeck et al., 1984).

Der Nachweis stark erhöhter Konzentrationen der verzweigtkettigen α -Ketosäuren (branched-chain α -ketoacids, BCKA) und der zugehörigen Aminosäuren (branched-chain aminoacids, BCAA) sowohl im Blut als auch im Gewebe der betroffenen Patienten (Westall et al., 1957; Menkes et al., 1959) lieferte erste Hinweise auf einen Enzymdefekt als zugrunde liegenden Pathomechanismus. Dieser konnte 1960 in Form einer Aktivitätsminderung der verzweigtkettigen α -Ketosäuren-Dehydrogenase (branched-chain α -ketoacid dehydrogenase, BCKDH) sowohl in Lymphozyten als auch in Fibroblasten nachgewiesen werden (Dancis et al., 1960; Skaper et al., 1975). Durch Untersuchungen weiterer Familienanamnesen konnte ein autosomal rezessiver Vererbungsmodus gezeigt werden (Peinemann et al., 1994).

Neben der eben beschriebenen klassischen Form der MSUD mit typischem Erkrankungsbeginn in den ersten 4-7 Lebenstagen, berichteten Morris et al. 1961 erstmals über eine variante Form der MSUD mit phasenweise auftretender metabolischer Dekompensation, welche später als intermittierende Form bezeichnet wird (Chuang et Shih, 2001). 1979 beschreiben Schulman et al. eine andere variante Form der MSUD ohne episodische Krisen. Die Patientin fiel durch eine verzögerte psychomotorische Entwicklung auf. Diese Form wird danach als intermediäre Variante bezeichnet (Chuang et Shih, 2001). Heute werden weitere variante Formen diskutiert (siehe Kapitel 1.5).

1.2 Genetische Grundlagen und populationsspezifische Inzidenzen

Die Ahornsirupkrankheit ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung. Voraussetzung für das Auftreten von Krankheitsmerkmalen ist das Vorliegen zweier krankheitsverursachender Allele an einem Genlocus entweder in Form einer homozygoten Mutation oder bei zusammengesetzt („compound“) Heterozygotie in Form zweier verschiedener Mutationen. Mutationen, die die E1 α - (BCKA-Decarboxylase, alpha Polypeptid), E1 β - (BCKA-Decarboxylase, beta Polypeptid) oder E2- (dihydrolipoamide branched-chain transacylase, DBT) Untereinheiten des BCKDH-Komplexes betreffen, können in einer klassischen oder varianten Form der MSUD resultieren (Nellis et al., 2001).

Mit einer geschätzten Inzidenz von 1:185.000 Lebendgeborener über alle ethnischen Gruppen weltweit gemittelt (Chuang et Shih, 2001) gehört die MSUD zu den seltenen angeborenen Stoffwechselerkrankungen. In nordöstlichen Regionen der USA ist die Inzidenz mit 1:300.000 noch geringer (Chuang et al., 2008). In verschiedenen ethnischen Populationen liegen die Manifestationsfrequenzen jedoch deutlich höher (Marshall et al., 1981). Die Gemeinschaft der Mennoniten in Pennsylvanien weist aufgrund der gefundenen Foundermutation Y393N- α eine Inzidenz von 1:176 Neugeborene auf (DiGeorge et al., 1982). Gleichmaßen hohe Inzidenzen aufgrund eines Foundereffekts (1:113 Neugeborene) zeigten sich in der Gemeinschaft der aschkenasischen Juden (Edelmann et al., 2001). Auch für philipinische MSUD-Patienten und den taiwanesischen Paiwan Ureinwohnerstamm sind Foundermutationen beschrieben (Silao et al., 2004; Chi et al., 2003). In der Türkei und anderen Ländern (siehe Abbildung 1) mit ho-

hem Anteil traditioneller konsanguiner Eheschließungen werden erhöhte Inzidenzen von etwa 1:50.000 (Türkei) festgestellt, womit die MSUD eine der häufigsten Aminoazidopathien in der Türkei zu sein scheint (Dursun et al., 2002). In manchen östlichen Gegenden der Türkei beträgt dieser Anteil der Ehen bis zu 40 % (Tunçbilek, 2001). Auch im Ausland lebende türkisch-stämmige Populationen weisen ähnliche eheliche Konsanguinitätsraten auf (Esvelde et al., 1995). Bisher konnte keine Foundermutation, außer einer hypothetischen (p.Cys258Tyr- α) in der Bevölkerung von Çamlidere (Dursun et al., 2002), im türkisch-stämmigen Patientenkollektiv nachgewiesen werden.

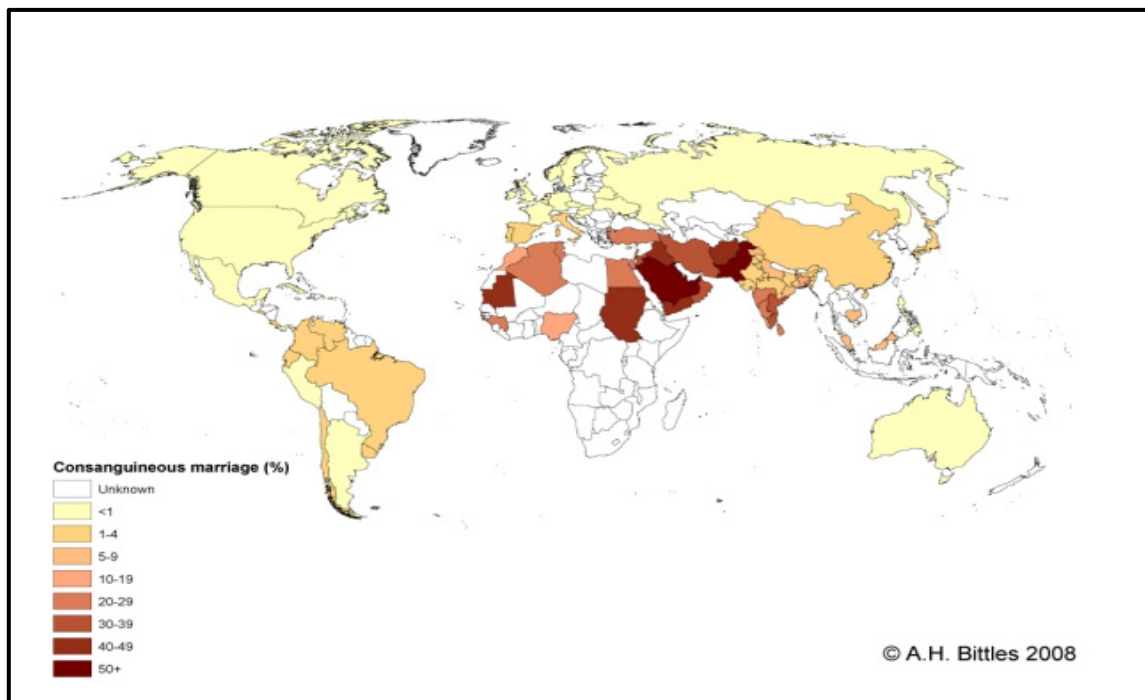


Abbildung 1: Globale Prävalenz konsanguiner Eheschließungen. Gesamtprävalenz in der Türkei 20-29 % (Daten aus 2008).

1.3 Pathomechanismus

Der Ahornsirupkrankheit (MSUD; MIM #248600; McKusick, 1995) liegen verschiedene autosomal-rezessiv vererbte Defekte innerhalb des Multienzymkomplexes der verzweigtkettigen α -Ketosäuren-Dehydrogenase (BCKDH) zugrunde. Die daraus resultierende Reduktion der enzymatischen BCKDH-Aktivität bewirkt eine deutliche Einschränkung oder fast vollständige Blockade des Abbaus der verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA) Leucin, Valin und Isoleucin auf der Stufe ihrer korrespondierenden α -Ketosäuren (BCKA) α -Ketoisocaproinsäure (KIC), α -Ketoisovaleriansäure (KIV) und α -Keto- β -Methylvaleriansäure (KMV). Diese entstehen nach reversibler Transaminierung im zweiten Schritt auf dem Abbauweg der aus Nahrungs- und Gewebsproteinen anfal-

lenden BCAA (siehe Abbildung 2). Infolge des gestörten Stoffwechselschritts kommt es zur Akkumulation dieser Metabolite und der endogen aus Isoleucin entstehenden, nicht proteinogenen Aminosäure L-Alloisoleucin (Schadewaldt et al., 1999). Aufgrund der Reversibilität der Transaminierung in den Geweben und den kortikalen Synaptosomen durch die BCAA-Aminotransferase kommt es sekundär zum Konzentrationsanstieg sowohl der BCKA als auch der BCAA (Yudkoff et al., 1996; Chuang et Shih, 2001).

Aufgrund des höheren Gehalts in Eiweiß verglichen mit den verzweigtkettigen Aminosäuren Valin und Isoleucin und der am stärksten verzögerten Elimination aus dem Körper bei gestörtem Abbau der BCAA, ist Leucin die am stärksten im Plasma erhöhte Aminosäure (Langenbeck et al., 1984). Diese besitzt, gleichzeitig zusammen mit KIC, die in äquimolaren Plasmakonzentrationen bei der klassischen Form der MSUD vorkommt, die stärkste Neurotoxizität. Somit können temporär oder permanent stark erhöhte BCKA- und BCAA-Spiegel zu schwerwiegenden Schäden am zentralen Nervensystem führen (Snyderman et al., 1988).

Gemessen am Ausmaß des Enzymaktivitätsmangels werden verschiedene Schweregrade der MSUD unterschieden. Eine nahezu vollständig fehlende Enzymaktivität ($<2\%$ Restaktivität in Fibroblastenkulturen; Dancis et al., 1972; Schadewaldt et al., 1989) wird bei der klassischen (schwersten) Form gefunden. Eine Enzymaktivität der BCKDH von 2 bis 30 % der Norm ist charakteristisch bei den verschiedenen, leichter verlaufenden varianten Formen der MSUD (Dancis et al., 1972; Schadewaldt et al., 1989).

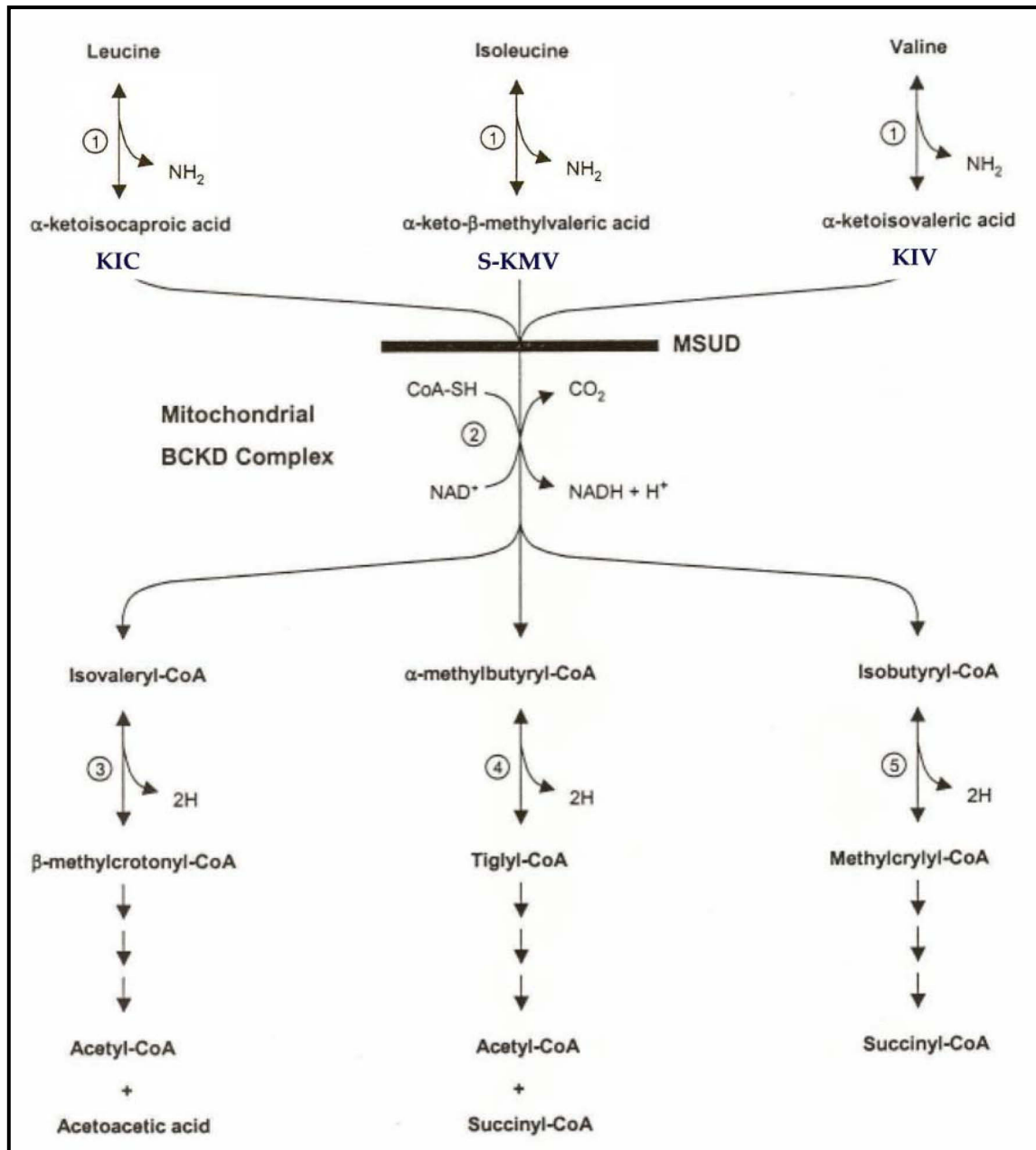


Abbildung 2: (1) Reversible Transaminierung durch die BCAA-Aminotransferase; (2) irreversible oxidative Dekarboxylierung durch die BCKDH; (3) Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase; (4) verzweigt-kettige Acyl-CoA Dehydrogenase; der weitere Abbau erfolgt stufenweise auf dem Niveau verschiedener Acyl-CoA-Verbindungen. Der defekte Stoffwechselschritt im Abbau der drei essentiellen BCAA Leucin, Valin und Isoleucin ist mit einem schwarzen Balken dargestellt. Bei der MSUD ist der Abbau dieser drei Aminosäuren auf der Stufe der α -Ketosäuren (KIC, KIV, S-KMV, R-KMV) betroffen. Primär stauen sich deshalb im Körper die α -Ketosäuren an, die aber aufgrund einer reversiblen Transaminierung in den Geweben durch die BCAA-Aminotransferase in die entsprechenden Aminosäuren überführt werden. Somit akkumulieren sowohl die verschiedenen BCKA, als auch die BCAA. (Modifiziert aus Chuang et Shih, 2001).

1.4 Aufbau und Regulation des Multienzymkomplexes der BCKDH

Der aus fünf katalytischen Untereinheiten zusammengesetzte Multienzymkomplex der verzweigtkettigen α -Ketosäuren-Dehydrogenase (BCKDH) gehört neben der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDH) zu einer Familie dreier hoch konservierter Enzyme mit ähnlicher Struktur und Funktion (Yeaman, 1989; Perham, 2000). Die BCKDH befindet sich an der inneren Mitochondrienmembran aller Gewebe, wobei der Skelettmuskel, die Leber und die Nieren die zentralen Organe im oxidativen Abbau der BCAA sind (Suryavan et al., 1998), und ist mit einer molekularen Masse von 4×10^6 Dalton ein Makromolekül.

Die zum Abbau der BCAA nötigen drei katalytischen Untereinheiten dieses Komplexes sind die

1. Thiaminpyrophosphat-abhängige BCKA-Decarboxylase (E1-Untereinheit), ein Heterotetramer ($\alpha_2\beta_2$) mit einer molekularen Masse von 170 kDa (E1 α : 91 kDa (Wynn et al., 1998); E1 β 75,6 kDa (Nobukuni et al., 1990))
2. Dihydrolipoyl-Transacylase (E2-Untereinheit), ein Homopolymer (α_{24}) mit einer molekularen Masse von 46,7 kDa (Nobukuni et al., 1989)
3. Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3-Untereinheit), ein Homodimer (α_2) mit einer molekularen Masse von 110 kDa (Pons et al., 1988).

Darüberhinaus gehören dem Komplex zwei spezifische aktivitätsregulierende Enzyme an (Reed et al., 1985):

1. eine inaktivierende Kinase (molekulare Masse 43 kDa) und
2. eine aktivierende Phosphatase (molekulare Masse 460 kDa).

Als Substrat für diese Phosphorylierungs-/ Dephosphorylierungsreaktion dienen zwei Serinreste innerhalb der E1 α -Untereinheit (Paxton et al., 1986). Die Aktivität des BCKDH Komplexes wird neben der reversiblen Phosphorylierungs-/ Dephosphorylierungsreaktion über eine Regulation der Genexpression (Chuang et al., 1994; Chinsky et al., 1993) und durch Produkte und Substrate bzw. Substratanaloga des Enzyms (Williamson et al., 1979; Danner et al., 1982) reguliert.

Der zentrale Kern des Komplexes wird von 24 kubisch angeordneten Kopien der E2-Untereinheit gebildet, die von zwölf Kopien der E1-Untereinheit und sechs Kopien der E3-Untereinheit umgeben sind (Aevansson et al., 2000). Über Ionenbindungen mit der E1-Untereinheit sind die Phosphatase und die Kinase mit dem Komplex verbunden (Chuang et Shih, 2001) (siehe Abbildung 3).

Während die E3-Untereinheit eine gemeinsame Komponente der oben genannten Enzymfamilie der α -Ketosäuren-Dehydrogenasen (PDH, KGDH und BCKDH) ist, sind die E1- und E2-Untereinheiten spezifisch für die BCKDH. Dies erklärt die zusätzliche Erhöhung von Pyruvat und Laktat sowie α -Ketoglutarat neben den verzweigtkettigen Amino- und α -Ketosäuren in den Körperflüssigkeiten bei einem genetischen Defekt, der die E3-Untereinheit betrifft (Chuang et Shih, 2001). Der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3)-Mangel als eigenständiges Krankheitsbild wird in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

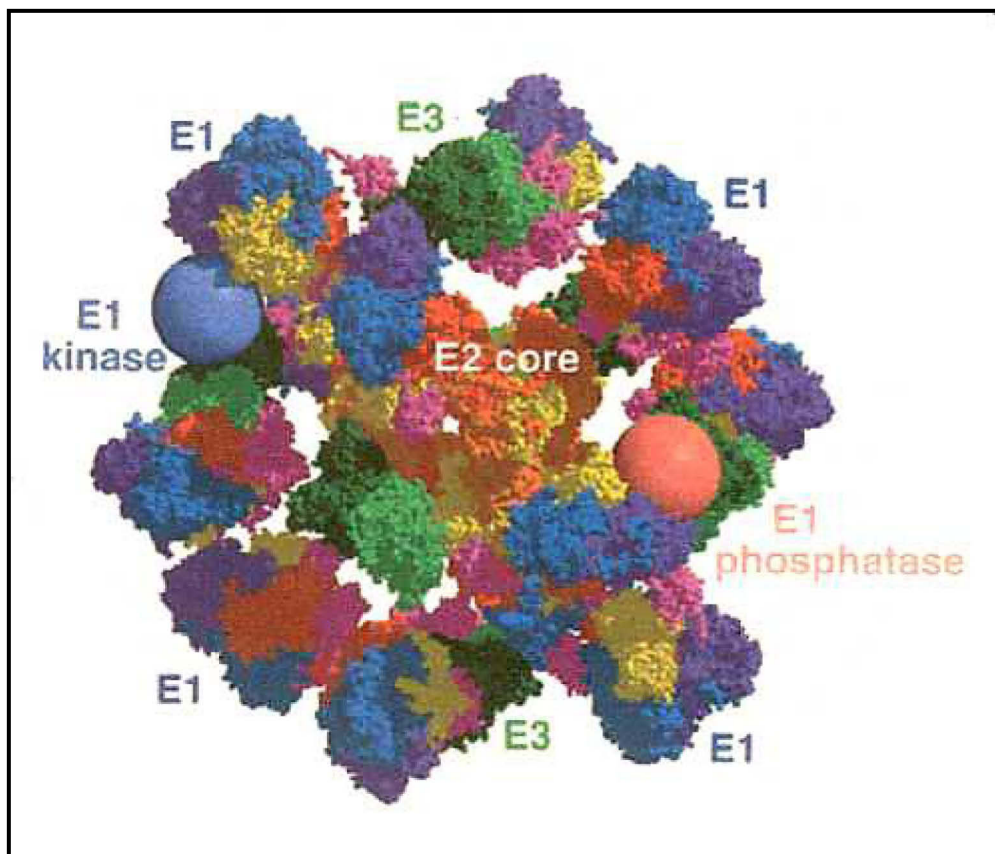


Abbildung 3: Darstellung der dreidimensionalen Struktur und Anordnungen der fünf katalytischen Untereinheiten innerhalb des Multienzymkomplexes. (Entnommen aus Aevansson et al., 2000).

1.5 Klinik der Ahornsirupkrankheit

Anhand des klinischen Verlaufs, der Art und Ausprägung der Symptomatik und der erforderlichen Therapie sowie einiger biochemischer Parameter werden derzeit hinsichtlich klinischer Phänotypen eine klassische Form (ca. 75 %) und mehrere variante Formen (ca. 25 %) unterschieden (Chuang et Shih, 2001; Simon et al., 2006).

1.5.1 Klinische Phänotypen

Die **klassische Form** der Ahornsirupkrankheit stellt die schwerste und zugleich häufigste Verlaufsform dar. Aufgrund des kritischen Anstiegs der BCAA und BCKA in Blut und Geweben, durch postnatalen Abbau von Nahrungs- und Gewebsproteinen ausgelöst, wird das Neugeborene ab dem vierten bis siebten Lebenstag lethargisch, zeigt Trinkschwäche und entwickelt eine progrediente neurologische Symptomatik. Im Sinne einer metabolischen Enzephalopathie entwickeln die Patienten eine Symptomatik mit Hypo- und Areflexie, Rumpfhypotonie bei gleichzeitiger Hypertonie der Extremitätenmuskulatur, eine als Zeichen des Hirnödems vorgewölbte Fontanelle, zerebrale Krampfanfälle und respiratorische Insuffizienz, die in einem tiefen Koma endet, das unbehandelt in den Tod mündet. Mit Beginn der neurologischen Symptomatik wird der ahornsirupartige Geruch des Neugeborenen wahrnehmbar und das Hirnödem in der cerebralen Bildgebung (Computertomografie, CT; Magnetresonanztomografie, MRT) sichtbar (Brismar et al., 1990). Je nach Höhe und Dauer der Konzentrationen der neurotoxischen Metaboliten sind diese Symptome unter adäquater Therapie mit rascher Senkung der Metabolite reversibel oder gehen in neurologische Defektsyndrome über, die von einer Intelligenzminderung bis hin zur spastischen Zerebralparese reichen können (Snyderman, 1988; Kaplan et al., 1991; Hilliges et al., 1993).

Die starke Erhöhung der Plasmakonzentrationen der BCAA in der Aminosäurenanalyse, besonders ein Leucinspiegel von mehr als 2500 $\mu\text{mol/l}$ (Normbereich $<140 \mu\text{mol/l}$), sprechen für eine klassische MSUD. Die Spiegel für Valin und Isoleucin sowie für das als pathognomonisch geltende Alloisoleucin sind ebenfalls deutlich über der Norm erhöht, bleiben aber meist $<900 \mu\text{mol/l}$. Auch im Urin sind die entsprechenden Amino- und Ketosäuren stark erhöht. Die Restaktivität der BCKDH in kultivierten Hautfibroblasten oder Lymphozyten beträgt bei der klassischen MSUD $\leq 2 \%$ der Norm (Dancis et al., 1972; Schadewaldt et al., 1989).

Die selteneren (ca. 25 %) **varianten Formen** der MSUD verlaufen aufgrund einer höheren Restaktivität der BCKDH meist milder.

Bei der **intermediären Form**, auch als *schwere Variante* beschrieben, fallen die meisten Patienten (wenn nicht im seit 2002 durchgeführten Neugeborenen Screening mittels TMS (Tandem-Massenspektrometrie) aufgedeckt) erst in den ersten Lebensjahren aufgrund des fehlenden episodischen Krankheitsverlaufs mit einer verzögerten psychomotorischen Entwicklung auf. Akute metabolische Dekompensationen mit enzephalopathischen Episoden wurden selten berichtet. Bei diesen Patienten lagen wahrscheinlich unbemerkt langfristig unkontrolliert hohe BCAA- und BCKA-Konzentrationen im Blut und Gewebe vor. Die Restaktivität der BCKDH in Fibroblasten wird im Bereich von 3-30 % der Norm angegeben (Chuang et Shih, 2001).

Die an einer **intermittierenden Form**, auch als *milde Variante* beschrieben, erkrankten Kinder entwickeln sich in der Regel ohne körperliche, geistige und neurologische Defizite. Sie reagieren erst bei außergewöhnlichen Stoffwechselbelastungen, wie Infekten, Impfungen, Operationen oder übermäßiger Proteinzufuhr, mit einem neurotoxischen BCAA- und BCKA-Konzentrationsanstieg bei sonst nur leicht erhöhten Metabolitenspiegeln. Während dieser akuten metabolischen Krisen entwickeln die Patienten neurologische Symptome wie Ataxie, Somnolenz und Koma sowie eine Ketoazidose. Es sind auch Todesfälle beschrieben. Oft wird die richtige Diagnose erst nach mehreren Episoden gestellt. Die Restaktivität der BCKDH in Fibroblasten beträgt 5-20 % der Norm (Chuang et Shih, 2001).

Eine weitere **asymptomatische Form** wird beschrieben (Ensenauer et al., 2004; Simon et al., 2006). Diese Patienten wurden alle im Neugeborenen Screening aufgedeckt und blieben bis ins junge Erwachsenenalter auch während interkurrenter Erkrankungen ohne enzephalopathische Episoden und ohne psychomotorische oder neurologische Defizite. Die Leucinspiegel waren bei einer Restaktivität der BCKDH von 13-20 % der Norm nur leicht erhöht (durchschnittlich $<350 \mu\text{mol/l}$).

Das wiederholt postulierte Vorkommen von **Thiamin-abhängigen MSUD-Varianten**, die auf pharmakologische Dosen von Thiamin (Cofaktor im Enzymkomplex) mit einem drastischen Abfall des Plasmaleucin reagieren, wurde nur einmal bestätigt (Scriver et al., 1971; Chuang und Shih, 2001).

Tabelle 1: Übersicht der klinischen Phänotypen

Klinischer Phänotyp	Manifestationsalter	Symptomatik / klinischer Verlauf	Biochemische Parameter	Restaktivität BCKDH (% der Norm)
Klassisch	Neonatal (4.-7. Lebensstag)	Trinkschwäche, Lethargie, Muskelhypo-/hyertonie, Ketoazidose, zerebrale Krampfanfälle	Stark erhöhte BCAA und BCKA	0-2
Intermediär (schwere Variante)	0,5-2 Jahre	Psychomotorische Entwicklungsverzögerung, weniger akute enzephalopatische Episoden, bleibende neurologische Defizite	Permanent erhöhte BCAA und BCKA	3-30
Intermittierend (leichte Variante)	0,5-7 Jahre	Episodische Ataxie/ Ketoazidose während Infektion oder Stress, normale Entwicklung	Während asymptomatischer Phasen keine BCAA und BCKA Erhöhung	5-20
Asymptomatisch	--	--	Mittels TMS im Neugeborenen-Screening aufgedeckt	13-20

1.5.2 Diagnostik

Mit Aufnahme der MSUD ins Neugeborenen-Screening zur Erkennung angeborener metabolischer und endokriner Störungen 2002 ist es mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie möglich, betroffene Neugeborene bereits ab dem 5. Lebensstag zu identifizieren. Dazu wird am 3. Lebensstag (frühestens nach 36 Lebensstunden) eine Trockenblutprobe des Neugeborenen hergestellt und umgehend in das zuständige Screeninglabor gesandt (Simon et al., 2005). Dadurch können betroffene Neugeborene mit klassischen und varianten MSUD-Formen heute bereits präsymptomatisch oder mit erst leichten Symptomen erkannt werden und können so von einer frühen Therapie hinsichtlich des späteren Outcomes profitieren (Heldt et al., 2005; Simon et al., 2006). Eine

sichere Differenzierung zwischen der klassischen und einer varianten MSUD ist mittels Neugeborenencreening nicht möglich (Fingerhut et al., 2008).

Bei entsprechendem klinischen Verdacht erfolgt die Analyse der Plasmaamino-säuren mittels HPLC (high performance liquid chromatography), in der sich typischerweise je nach Erkrankungsform unterschiedlich stark erhöhte Plasma-Leucinkonzentrationen (500-5000 $\mu\text{mol/l}$) mit deutlich geringer erhöhten Konzentrationen der Aminosäuren Valin, Isoleucin und Alloisoleucin zeigen (Schadewaldt et al., 1999; Chuang et Shih, 2001). Der differentialdiagnostisch spezifischste und sensitivste Parameter zur Abgrenzung von anderen durch Katabolismus ausgelösten ketoazidotischen Zuständen ist Alloisoleucin (Held et al., 1976).

Im Urin zeigt ein stark positiver Dinitrophenylhydrazin (DNPH)-Test eine massive 2-Ketosäureausscheidung an.

Zur Abschätzung des Schweregrades der MSUD können eine Reihe von Zusatz- und Spezialuntersuchungen herangezogen werden:

- Bestimmung des Konzentrationsverhältnisses von Alloisoleucin zu Isoleucin im Plasma unter steady-state-Bedingungen des Organismus (Wendel et al., 1989; Schadewaldt et al., 1989).
- Bestimmung der Restaktivität in kultivierten Hautfibroblasten (Wendel et al., 1981).
- Messung der Eliminationskonstante K_e nach oraler Alloisoleucinbelastung (Schadewaldt et al., 1991)
- Messung der in-vivo Ganzkörper-Leucinoxidation mittels stabiler Isotope (Schadewaldt et al., 2001)

Enzymaktivitätsmessungen oder molekulargenetische Untersuchungen aus Chorionzotten im Sinne einer Pränataldiagnostik sind bei Risikoschwangerschaft mit bereits an MSUD erkrankten Kindern in der Familie ab der 8. SSW möglich. Dabei weisen molekulargenetische Untersuchungen die höhere Sensitivität und Genauigkeit auf (Mitsubuchi et al., 1992; Chuang et Cuang, 2000). Die Kenntnis über Foundermutationen in bestimmten Populationen kann die molekulargenetische Pränataldiagnostik vereinfachen (Edelmann et al., 2001; Silao et al., 2004).

1.5.3 Therapie

Die zwei Säulen in der Therapie der Ahornsirupkrankheit sind zum einen die lebenslange proteinrestriktive Diät, insbesondere bei der klassischen Form der MSUD, und zum anderen die Akutversorgung während metabolischer Krisen.

Ziel der Langzeittherapie ist es, die Plasmakonzentrationen der BCAA und ihrer Metaboliten möglichst in den Normbereich abzusenken. Währenddessen muss in Abhängigkeit von Alter und Wachstumsraten eine ausreichende Zufuhr der drei essentiellen verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Valin und Isoleucin über natürliches Protein zur Gewährleistung eines normalen Wachstums und einer normalen Entwicklung des Kindes sichergestellt werden (Snyderman et al., 1964; Chuang et Shih, 2001). Dabei ist, aufgrund des geringeren Anteils in natürlichem Protein und der guten Tolerierbarkeit hinsichtlich neuronaler Defekte bei Erhöhung der Plasmakonzentration, eine zu strenge Restriktion der Aminosäuren Valin und Isoleucin zu vermeiden (Morton et al., 2002). Zusätzlich zur proteinarmen Diät müssen zum Ausgleich der nicht-verzweigtkettigen Aminosäuren spezielle Leucin-, Valin- und Isoleucin-freie Aminosäuregemische angereichert mit Mineralien und Vitaminen substituiert werden.

Die schnelle Beseitigung der stark erhöhten, potentiell toxischen BCAA- und Metabolitenspiegel im Plasma und Gewebe sowie die Aufhebung der katabolen Stoffwechsellaage sind die beiden Ziele der Akutversorgung. Die oft durch Infektionen ausgelösten akuten metabolischen Krisen erfordern die weitere Reduktion der Proteinzufuhr mit der Nahrung. Bei Ineffizienz dieser Maßnahmen sind in Einzelfällen auch extrakorporale Maßnahmen (Peritonealdialyse, Hämodialyse u.a.) zur Entfernung hoher BCAA- und BCKA-Spiegel erforderlich (Jouvet et al., 1997). Außerdem kann der Katabolie durch die Gabe von Glukose (i.v.) und Insulin (i.v.) in schweren Fällen entgegen gewirkt werden (Wendel et al., 1982).

Die Therapie der varianten Verlaufsformen der MSUD wird dem Schweregrad individuell angepasst. Sie kann von einer Diät, wie oben beschrieben, bis zu einer moderaten proteinreduzierten Ernährung mit Vermeidung von Proteinexzessen reichen (Chuang et Shih, 2001).

Wenige Fälle einer erfolgreichen Lebertransplantation bei Patienten mit klassischer MSUD, die postoperativ eine klinisch sehr milde variante Verlaufsform präsentieren, wurden berichtet (Kaplan et al., 1997; Strauss et al., 2006). Eine im Proteingehalt einge-

schränkte Diät ist aber nach Lebertransplantation nicht mehr erforderlich (Strauss et al., 2006).

Im Sinne eines kausalen Therapieansatzes scheint die MSUD nach zahlreichen in-vitro Untersuchungen einer somatischen Gentherapie zugänglich (Koyata et al., 1993; Müller et al., 1995). Die Entwicklung dieser Therapieoption befindet sich zurzeit noch in tier-experimentellen Stadien (Homancis et al., 2006).

1.6 Molekulargenetik

Die in dieser Arbeit durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen umfassen die bereits beschriebenen Untereinheiten E1, zusammengesetzt aus E1 α und E1 β , sowie die E2-Untereinheit (s. Kap. 1.4).

Die sechs für die jeweiligen Untereinheiten nukleär kodierenden Gene sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert:

- Das *BCKDHA*-Gen, welches für die E1 α -Untereinheit kodiert, liegt auf Chromosom 19 und ist kartiert unter 19q13.1-q13.2 (Crabb et al., 1989; Fekete et al., 1989).
- Das *BCKDHB*-Gen, welches für die E1 β -Untereinheit kodiert, liegt auf Chromosom 6 und ist kartiert unter 6q14 (Edelmann et al., 2001) und wurde früher unter 6q21-p22 beschrieben (Mitsubuchi et al., 1991; Zneimer et al., 1991).
- Das *DBT*-Gen, welches für die E2-Untereinheit kodiert, liegt auf Chromosom 1 und ist kartiert unter 1p31 (Herring et al., 1991; Lau et al., 1991; Zneimer et al., 1991).
- Das hier nicht berücksichtigte *DLD*-Gen, welches für die E3-Untereinheit kodiert, liegt auf Chromosom 7 und ist kartiert unter 7q31-q32 (Scherer et al., 1991).
- Das *BCKDK*-Gen, welches für die BCKDH-Kinase kodiert, liegt auf Chromosom 16 und ist kartiert unter 16p11.2 (Chuang et al., 2002).
- Das Gen, welches für die BCKDH-Phosphatase kodiert, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt keiner chromosomalen Lokalisation zugeordnet.

Die Genom-Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI Blast Search) umfasst zurzeit unter den Zugangsnummern NM_000709 (*BCKDHA*-Gen,

Contig NT_011109), NM_000056 (*BCKDHB*-Gen, Contig NT_007299) und NM_001918 (*DBT*-Gen, Contig NT_028050) die Referenzsequenzen der genomischen DNA und cDNA für die hier betrachteten Gene *BCKDHA*, *BCKDHB* und *DBT*. Das humane *BCKDHA*-Gen besteht bei einer Länge von mehr als 55 kb aus 9 Exons (Dariush et al., 1991; Chuang et al., 1993). Das *BCKDHB*-Gen setzt sich aus 10 Exons zusammen und ist über 100 kb lang (Mitsubuchi et al., 1991), während das 68 kb lange *DBT*-Gen 11 Exons besitzt (Lau et al., 1992). Das *DLD*-Gen (ca. 20 kb) besteht aus 14 Exons (Feigenbaum et Robinson, 1993).

Es werden je nach betroffener Untereinheit sechs molekulargenetische Formen der MSUD unterschieden. Liegt der genetische Defekt im *BCKDHA*-Gen, entspricht dies dem Typ IA (MIM#608348). Es handelt sich um den Typ IB (MIM#248611) bei zugrundeliegender Mutation im *BCKDHB*-Gen., um den Typ II (MIM#248610) bei *DBT*-Gen Defekten und um den Typ III (MIM#238331) bei *DLD*-Gen Defekten. Die Typen IV und V sind für bislang noch nicht beschriebene Mutationen im *BCKDK*-Gen und im für die BCKDH-Phosphatase kodierenden Gen vorgesehen.

In der Literatur sind für die verschiedenen Formen der MSUD derzeit 166 krankheitsverursachende Mutationen beschrieben. Der größte Anteil ist mit dem klassischen Phänotyp assoziiert (Chuang et al., 2008).

Alle beschriebenen Patienten zeichnen sich entweder durch eine Homozygotie der gefundenen Mutation, besonders häufig im Falle konsanguiner Eltern, oder eine „compound“-Heterozygotie für mutierte Allele an jeweils einem Genlocus aus. Die hohe Zahl an Kombinationsmöglichkeiten der unterschiedlichen Allele kann die hohe Variabilität des klinischen Phänotyps der MSUD erklären.

1.7 Ziele der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit beinhaltet folgende Aspekte:

1. Molekulargenetische Charakterisierung hinsichtlich möglicher Defekte im *BCKDHA*-, *BCKDHB*- oder *DBT*-Gen von 15 türkisch-stämmigen Patienten mit klassischen und varianten Formen der Ahornsirupkrankheit (MSUD).
2. Geografische Zuordnung der Mutationen innerhalb der Türkei aufgrund der erfragten Herkunft der Eltern/ Familie der Patienten.
3. Diskussion der Konsequenzen der gefundenen Mutationen auf der Tertiärstruktur der Untereinheiten E1 α , E1 β und E2 des BCKDH-Multienzymkomplexes.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Klinische Analyse und Methoden

2.1.1 Patienten

In die Betrachtungen dieser Arbeit wurden 32 klinisch an der Ahornsirupkrankheit (MSUD) erkrankte Patienten mit Eltern türkischer Abstammung aufgenommen. Davon wurden 15 Patienten molekulargenetisch untersucht. Die restlichen 24 Patienten sind der Literatur entnommen. In 12 von 18 Fällen bestand anamnestisch Konsanguinität der Eltern (für die restlichen Fälle liegen keine Daten vor). Betreut wurden die Patienten in verschiedenen pädiatrisch-metabolischen Zentren in Deutschland, Österreich, den Niederlanden und der Türkei.

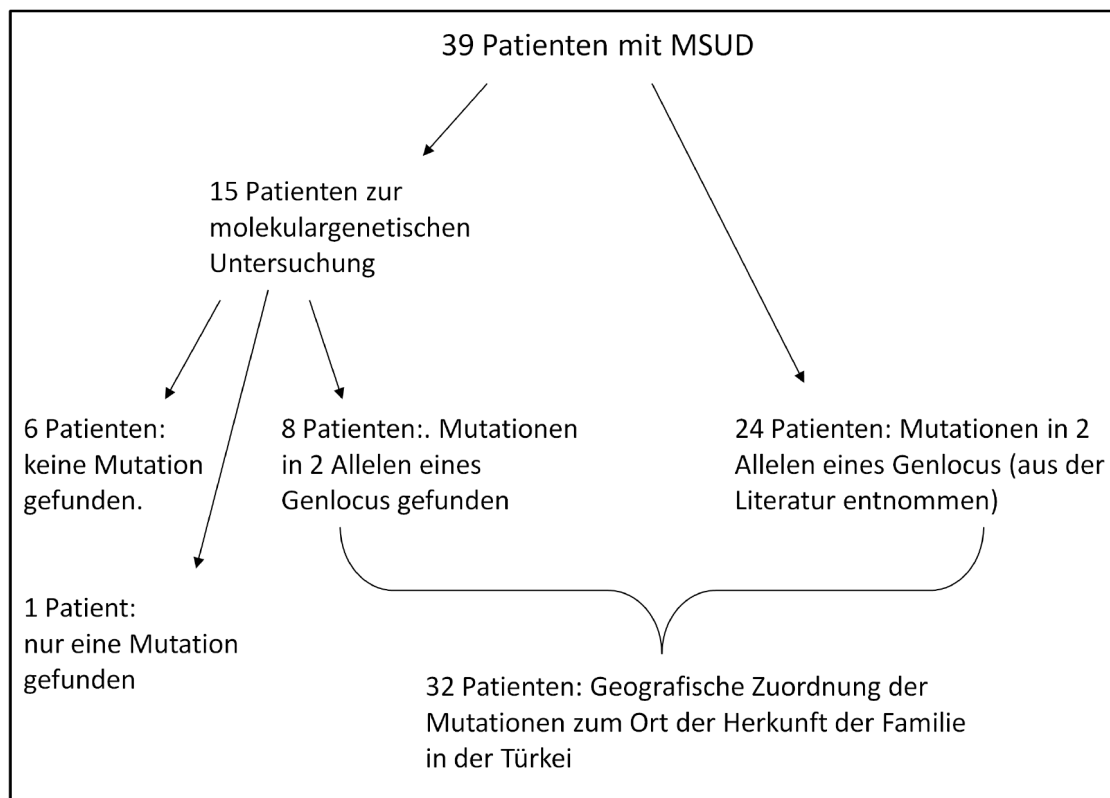


Abbildung 4: Flussdiagramm der Patientenauswahl

2.1.2 Ermittlung von klinischen und biochemischen Daten

Mittels eines einheitlichen Fragebogens (siehe Anhang B) wurden von jedem Patienten Daten zu Laborbefunden und dem klinischen Verlauf der Erkrankung sowie der Herkunft der beiden Elternteile erhoben. Die Fragebögen wurden jeweils von dem behandelnden Arzt ausgefüllt. Zuvor wurde von den Patienten bzw. den Eltern oder Erziehungsberechtigten die Einwilligung zu diesem Vorgehen eingeholt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität genehmigt.

Es wurden Daten zu Art und Alter bei der klinischen Manifestation (Symptomatik, Spiegel der BCAA im Plasma), außerdem Details zur Behandlung (Umfang der Einschränkung der BCAA und ggf. Leucintoleranz in der Diät, ggf. Plasmaleucinkonzentration unter der Behandlung), sowie zum Verwandtschaftsgrad der Eltern und deren Interesse an einer Pränataldiagnostik erhoben. Darüberhinaus wurden, allerdings nur grobe Angaben zur psychomotorischen Entwicklung und zum intellektuellen und psychosozialen „Outcome“ (IQ, Schul- und Berufskarriere, Lebensweise) erfragt.

Die 15 hier molekulargenetisch untersuchten Patienten wurden aufgrund der Angaben der behandelnden Ärzte und der Analyse der erfragten Daten einem Schweregrad der MSUD -schwere klassische Form oder variante Form mit schwerem oder mildem Verlauf- zugeteilt. Für die restlichen 24 Patienten wurden sowohl der Schweregrad der MSUD als auch die jeweils beiden mutierten Allele auf einem der drei für die MSUD infrage kommenden Genloci (*BCKDHA*, *BCKDHB*, *DBT*) aus der Literatur entnommen.

Die folgende Tabelle fasst die in der vorliegenden Arbeit molekulargenetisch untersuchten Patienten mit MSUD und ihre klinischen Herkunftsdaten zusammen.

Tabelle 2: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit molekulargenetisch untersuchten Patienten mit MSUD.

Pat.	Identifikation	Phänotyp	Herkunft des Untersuchungsmaterials	Ort der Behandlung	Herkunft der Familie in der Türkei
1	AE	Klassisch	Hacettepe Universität Ankara	Ankara	Ankara
2	AB	MSUD nicht sicher	Hacettepe Universität Ankara	Ankara	Ankara
3	ABi	Klassisch	Hacettepe Universität Ankara	Ankara	Denizli
9	CB	Fraglich Klassisch; Keine klinischen Angaben, Tod im Neugeborenenalter	Hacettepe Universität Ankara	Black Sea Technical University Hospital	Trabzon
10	CY	Klassisch	Hacettepe Universität Ankara	Ankara	Erzurum
11	CA	Klassisch	Hacettepe Universität Ankara	Ankara	Gaziantep
13	D	Klassisch	Niederlande	Niederlande	Keine Angaben
14	DB	Schwere Variante	Hacettepe Universität Ankara	Ankara	Ankara
20	KA	Klassisch	Hacettepe Universität Ankara	Ankara	Ankara
23	PB	Klassisch	Hacettepe Universität Ankara	Ankara	Samsun
25	SB	Klassisch	Hacettepe Universität Ankara	Ankara	Çorum
28	SBe	Fraglich Klassisch	Hacettepe Universität Ankara	Ankara	Giresun
30	TS	Klassisch	Hacettepe Universität Ankara	Ankara	Adana
32	YK	Klassisch	Hacettepe Universität Ankara	Ankara	Trabzon
AD	AD	Fraglich Klassisch	Niederlande	Niederlande	Keine Angaben

2.2 Molekulargenetische Untersuchung

2.2.1 Patienten zur Genotypisierung

Die hier durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen der 15 Patienten umfassten die Sequenzierung der drei Gene *BCKDHA*, *BCKDHB* und *DBT* für die E1 α -, E1 β - und E2-Untereinheit des BCKDH-Enzymkomplexes mit ihren jeweils 9 (*BCKDHA*-Gen), 10 (*BCKDHB*-Gen) bzw. 11 (*DBT*-Gen) Exons. Nach Identifikation der Mutationen und bei fehlender Replizierbarkeit von Exons bei den Patienten wurde der entsprechende Sequenztyp der elterlichen Allele bestimmt (siehe stellvertretend Abbildung 13).

2.2.2 Material

Die Chemikalien wurden, wenn nicht als versuchsspezifische Materialien gesondert aufgeführt, von den folgenden Firmen in höchstmöglicher Reinheit bezogen:

- Merck (Darmstadt)
- Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen)

Die Elektrophoresegeräte und deren Zubehör wurden verwendet von der Firma

- OWI-Separations System Biorad (München).

Für photometrische Messungen wurden das Beckmann-Coulter DU 600 Spectrophotometer, sowie Präzisionsküvetten der Firma Hellma GmbH & Co. KG (Mühlheim) eingesetzt.

Die Zentrifugation wurde durchgeführt mit der

- Biofuge fresco der Firma Heraeus (Hanau)

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

2.2.3 Methoden

2.2.3.1 Isolierung genomischer DNA

Die in dieser Arbeit analysierten Proben wurden als genomische DNA, die aus Vollblut der Patienten in Istanbul und Ankara sowie in Nijmegen und Utrecht isoliert wurde, zur Verfügung gestellt. Die Isolierung der DNA wurde in den Laboratorien der Metabolischen Abteilungen der Kinderkliniken der Hacettepe-Universität Ankara und der Capa-Universität Istanbul sowie der Universitäts-Kinderkliniken Nijmegen und Utrecht durchgeführt.

2.2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA wurde über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Eine Absorption von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm wurde einer Konzentration von 50 µg/ml DNA gleichgesetzt. Der Proteinindex (Absorption bei 260 nm/Absorption bei 280 nm) diente als Qualitätsmerkmal. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung sollte theoretisch einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 aufweisen.

2.2.3.3 DNA- Amplifikation

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).

Materialien: DyNazyme™DNA-Polymerase Kit, FINNZYMES, (Espoo)

Taq-Polymerase™, Qiagen, (Hilden)

REDTaq®Ready Mix, Sigma, (Deisenhofen)

Primer (10 pmol/µl), MWG-Biotech, (Ebersberg)

Nuclease-Free Water, Promega Corporation (Mannheim)

Die Amplifikation der genomischen DNA wurde mittels spezifischer Oligonukleotide mit einer Länge von 18-25 bp durchgeführt. Die Gene *BCKDHA*, *BCKDHB* und *DBT* wurden dabei durch jeweils 9-11 Primerpaare in Fragmentlängen von 133-353 bp aufgeteilt. Die Nukleotidsequenzen und spezifischen Anlagerungstemperaturen der ver-

wendeten Primer für die genomische DNA sind im Anhang in den Tabellen A1-3 dargestellt.

Reaktionsansatz mit Taq-Polymerase:

4 µl Puffer (10 mM Tris-HCL, 50 mM KCL, 0,1 % Triton X-100, 1,5 mM MgCL₂)

1,5 µl dNTP's

1 µl Taq-Polymerase

X µl DNA (benötigte Menge 100 ng)

je 1,5 µl (10 pmol/µl) des spezifischen 5'-und 3'-Oligonukleotids

Der Reaktionsansatz wurde bis zu einer Endmenge von 40 µl mit Nuklease-freiem H₂O aufgefüllt.

Reaktionsansatz mit REDTaq Ready Mix:

20 µl REDTaq®Ready Mix

X µl DNA (benötigte Menge 100 ng)

je 1,5 µl (10 pmol/µl) des spezifischen 5'-und 3'-Oligonukleotids

ad 40 µl Nuklease-freies H₂O

Die Reaktionsansätze waren für die *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*- Gene identisch. Für die einzelnen Oligonukleotid-Paare wurden individuell optimale Anlagerungstemperaturen ermittelt (siehe Tabelle A1-3 im Anhang).

Der spezifische Schmelzpunkt wird als TM-Wert angegeben und nach folgender Formel berechnet: $TM = (G + C) \times 4 \text{ °C} + (A + T) \times 2 \text{ °C}$

Die spezifische Anlagerungstemperatur wird als TA-Wert angegeben und nach folgender Formel berechnet: $TA = TM - 4 \text{ °C}$

Die Ansätze wurden im Trio-Thermoblock der Firma Biometra (Göttingen) wie folgt inkubiert:

1 Zyklus	96 °C	5 Minuten
30 Zyklen	94 °C	45 Sekunden (Denaturierung)
	X °C	1 Minuten (Primer-Anlagerung)
	72 °C	45 Sekunden (Elongation)
1 Zyklus	72 °C	3 Minuten
	4 °C	∞

Der Heizdeckel hatte eine Temperatur von 95 °C. X steht stellvertretend für den spezifischen TM-Wert der Oligonukleotide.

Nach Inkubation wurden die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.3.4 Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese

Materialien: Agarose, Bio-Budget Technologies GmbH, (Krefeld)

100 bp Leiter, Invitrogen GmbH, (Karlsruhe)

Nach Herstellung eines 2 % igen Agarosegels (2g Agarose in 100 ml TBE-Puffer) wurden 7 µl farbiger Auftragspuffer (30 % Glycerin, 0,25 % Xylencyanol, 0,25 % Bromphenolblau) mit 40 µl amplifizierter DNA-Fragmente vermischt. Die gesamte Menge wurde auf das Agarosegel gegeben. Die Elektrophorese wurde bei 200 mA (mit nicht mehr als 120 V) in 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris-HCL, 89 mM Borsäure, 2 mM Na-EDTA) für ca. 90-180 Minuten durchgeführt. Als DNA-Längenstandard wurde die 100 bp Leiter zugegeben.

Das Agarosegel wurde für 10-15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml inkubiert. Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgt durch Anregung des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids bei 365 nm unter UV-Licht. (UV-Transluminator GE-FLX-20L, Firma AGS, Heidelberg). Das spezifische Bandenmuster wurde photographisch dokumentiert. (Biometra Bio Doc Analyze System, Whatman Biometra GmbH (Göttingen)) und die einzelnen Fragmentbanden wurden unter UV-Licht ausgeschnitten.

2.2.3.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten durch Säulenchromatographie

Materialien: QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, (Hilden)

Nuclease-Free Water, Promega Corporation (Mannheim)

Die aus dem Agarosegel isolierten, spezifischen PCR-Produkte wurden gewogen und mit der dreifachen Menge ihres Gewichtes mit QG-Puffer (pH <7,5) für 15 Minuten bei

50 °C inkubiert. Nach Hinzugabe des 1-fachen Gelvolumenanteils an Isopropanol wurde der gesamte Ansatz über die QIAquick-Säulen gegeben. Das Prinzip beruht dabei auf der Adsorption der DNA an Silicagelmembranen. Über mehrere im Protokoll vorgesehene Waschschrte, inklusive aller optionalen Reinigungsschrte, wurde das PCR-Produkt, welches sich im Filter der QIAquick-Säule befand, aufgereinigt. Für die Elution der DNA wurden 30 µl Nuklease-freies H₂O verwendet. Bei allen Zwischenschritten erfolgte eine einminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm.

2.2.3.6 Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel

Zur groben Abschätzung geringer Mengen von DNA wurde die Intensität der Bande auf dem Agarosegel mit der Intensität der Banden des Grössenmarkers verglichen, dessen Mengenverhältnis der Banden vom Hersteller angeben ist.

2.2.3.7 Sequenzier-Polymerasekettenreaktion (Cycle-Sequencing)

Materialien: Big Dye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem, (Weiterstadt)

Das Big Dye Terminator Kit enthielt verschiedene Nukleotide, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehen waren. Mit Hilfe der "Cycle"-Sequenzierreaktion wurden die markierten Nukleotide in das aufgereinigte DNA-Fragment eingebaut.

Der Gesamtansatz einer Sequenzier-Probe (20 µl) setzte sich zusammen aus:

1-10 µl isoliertem DNA-Fragment (je nach Konzentration des Amplifikates)

2 µl Big Dye Reagenz

1 µl Primer (10 pmol/µl)

3 µl Sequenzier-Puffer

Der Ansatz wurde mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt.

Die Sequenzierreaktion wurde in einem Trio-Thermalblock, Biometra Göttingen, mit folgenden Reaktionsschritten durchgeführt:

1 Zyklus	96 °C	40 Sekunden (initiale Denaturierung)
25 Zyklen	{ 96 °C	15 Sekunden (Denaturierung)
	{ 53 °C	5 Sekunden (Primer-Anlagerung)
	{ 60 °C	4 Minuten (Primer-Verlängerung)
	4 °C	∞

Der Heizdeckel hatte eine Temperatur von 95 °C.

2.2.3.8 Elektrophoretische Datenanalyse am ABI 310

Materialien: DyeEx™ 2.0 Spin Kit, Qiagen, (Hilden)

Formamid, Calbiochem® (Darmstadt)

POP-6™, Applied Biosystems, (Weiterstadt)

Die Aufreinigung der Proben wurde mit DyeEx Spin Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 10 µl des Eluates mit 10 µl Formamid versetzt. Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode mittels Didesoxynukleotide. Die Abbruchprodukte wurden mit Hilfe des automatischen Sequenziergerätes, ABI PRISM™ 310 Genetic-Analyzer (Applied Biosystems), aufgetrennt, der die Fluoreszenz der Nukleotide über einen Laserscanner analysiert. Die automatische Analyse der Laufdaten erfolgte unter Verwendung des Programms Genescan Multianalyst, Version 3.1.2. (Applied Biosystems). Zur grafischen Darstellung der Analysedaten wurde der Sequence Scanner v.1.0 (Applied Biosystems) verwendet.

2.2.3.9 Beschreibung der Mutationen

Die analysierten Sequenzen wurden mit den cDNA- und genomischen DNA Sequenzen in GenBank Zugangsnummern NM_000709 (*BCKDHA*-Gen, Contig NT_011109), NM_000056 (*BCKDHB*-Gen, Contig NT_007299) und NM_001918 (*DBT*-Gen, Contig NT_028050) verglichen.

Die Mutationsbeschreibung erfolgt nach den internationalen Konventionen für die Nomenklatur menschlicher Genmutationen (Human Genome Variation Society; <http://www.hgvs.org/mutnomen>). Die cDNA-Numerierung beginnt mit dem ATG Start-codon, wobei dem A die Position +1 zukommt.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypen der analysierten Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 15 Patienten türkischer Abstammung mit MSUD molekulargenetisch untersucht. Zur Charakterisierung der molekularen Veränderungen wurden die *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*-Gene mit den jeweils angrenzenden Intronsequenzen sequenziert. Insgesamt wurden 10 verschiedene wahrscheinlich krankheitsverursachende Mutationen, davon vier im *BCKDHA*-Gen, fünf im *BCKDHB*-Gen und eine im *DBT*-Gen, gefunden. Zu den Bedingungen des autosomal-rezessiven Vererbungsmodus der Ahornsirupkrankheit (MSUD) passend wurden bei 8 der 15 Patienten (Nr. 1, 3, 10, 11, 14, 23, 25 und 32) jeweils 2 mutierte Allele eines Gens gefunden. Bei einem Patienten (Nr. 30) wurde nur ein verändertes Allel für ein Gen mit den genannten Methoden identifiziert. In den übrigen sechs Fällen (Nr. 2, 9, 13, 20, 28 und A.D.) gelang der Mutationsnachweis in keinem Allel der drei Gene. Im *BCKDHA*-Gen zeigten sich drei registrierte SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) und im *DBT*-Gen zeigte sich ein registrierter SNP.

3.1.1 Mutationen im *BCKDHA*-Gen

In insgesamt 5 Allelen wurden Mutationen gefunden. Bei einem Patienten handelt es sich um eine Mutation im Bereich eines Introns, die anderen wiesen Basenaustausche in kodierenden Gensequenzen (Exonmutationen) auf.

3.1.1.1 Exonmutationen

Exon 2:

Das Exon 2 besitzt eine Länge von 180 bp. Zusätzlich zu dem bekannten, als rs 34589432 registrierten, SNP p.Pro39His wurde eine Punktmutation nachgewiesen.

Ein Austausch der Base Cytosin (CAG kodiert für Glutamin) gegen Thymin (TAG = Stopp) an Position 205 der cDNA resultiert in einem Kettenabbruch an Kodonposition 69 (p.Gln69Stop). Ein Patient (Nr. 11) mit nicht-konsanguinen Eltern war für diese

Mutation heterozygot, ebenso wie sein Vater. Die Mutter zeigte an dieser Stelle die Sequenz des Wildtyps. Bei diesem Patienten ließ sich ein weiteres verändertes Allel in Exon 6 des *BCKDHA*-Gens nachweisen.

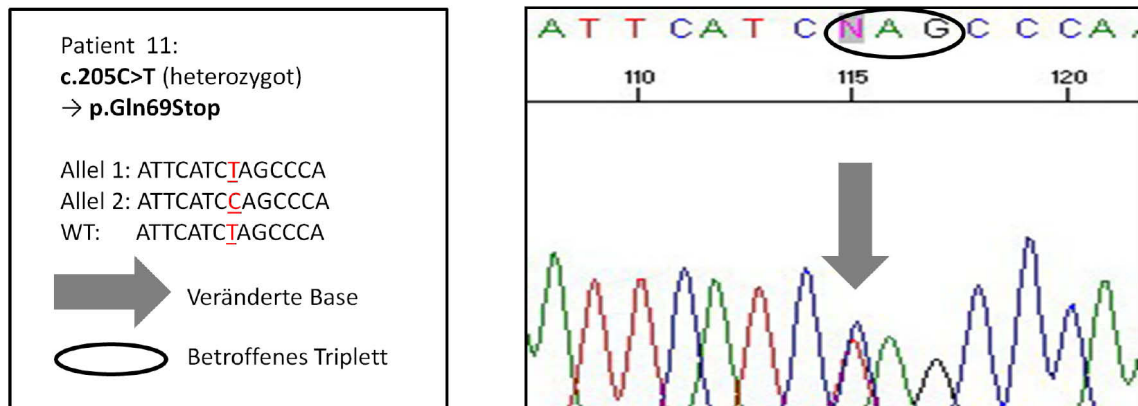


Abbildung 5: Links ist der Unterschied (rot unterstrichene Base) der mutierten Nukleotidsequenz von Patient 11 im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) dargestellt. Rechts ist die Mutation (ein Signal = homozygot, zwei überlappende Signale = heterozygot) im entsprechenden Nukleotid-Elektrophoresesignal (grauer Pfeil) markiert und mit dem zugehörigen Basentriplett (schwarzer Kreis) dargestellt.

Exon 6:

Die Länge von Exon 6 beträgt 207 bp. Neben der soeben genannten heterozygoten p.Gln69Stop-Mutation wurden bei Patient 11 zwei weitere heterozygote Basenaustausche in direkter Nachbarschaft zueinander gefunden. Diese sind Guanin zu Adenin an der Nukleotidposition 773 sowie Cytosin zu Adenin an Position 774 der cDNA. Insgesamt kodiert das veränderte Triplet anstatt für die Aminosäure Cystein (TGC) für ein Stop-Kodon (TAA) an Position 258 (p.Cys258Stop). Diese beiden aufeinander folgenden heterozygoten Basenaustausche ließen sich ebenfalls bei der Mutter nachweisen. Der Vater zeigte an dieser Stelle die Sequenz des Wildtyps.

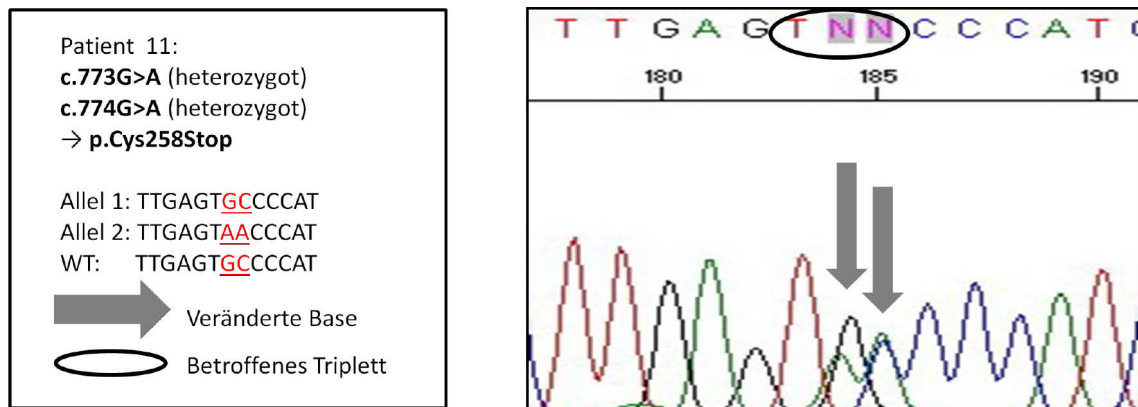


Abbildung 6: Links ist der Unterschied (rot unterstrichene Basen) der mutierten Nukleotidsequenz von Patient 11 im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) dargestellt. Rechts sind die Mutationen (ein Signal = homozygot, zwei überlappende Signale = heterozygot) in den entsprechenden Nukleotid-Elektrophoresesignalen (graue Pfeile) markiert und mit dem entsprechenden Basentriplett (schwarzer Kreis) dargestellt.

Exon 8

Die Länge des Exon 8 beträgt 172 bp. In Exon 8 fand sich bei einer Patientin (Nr. 30) an der Nukleotidposition c.1087 eine Transition von Cytosin in Thymin. Diese Änderung des Triplets von CGG in TGG bewirkt einen Austausch der Aminosäure Arginin gegen Tryptophan an Kodonposition 363. Diese p.Arg363Trp-Mutation war bei der Patientin heterozygot vorhanden. Bei ihrem Vater ließ sich ebenfalls ein mutiertes Allel nachweisen, während die Mutter die Wildtypsequenz an dieser Stelle zeigte.

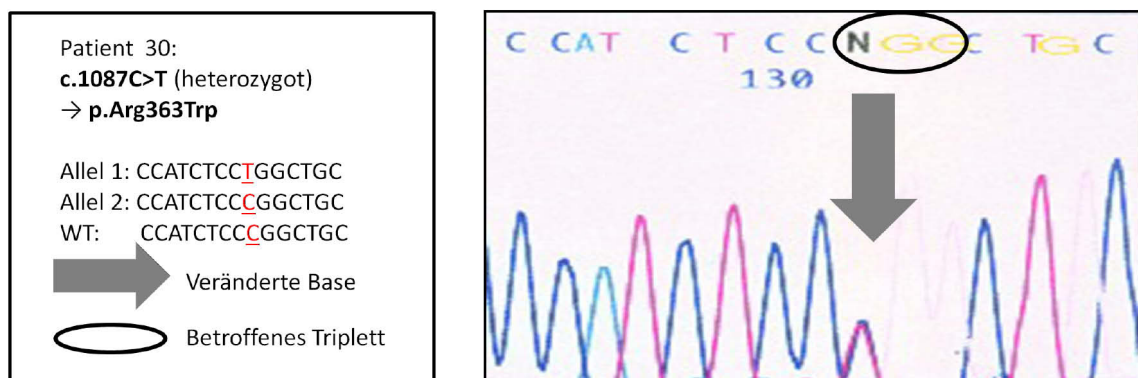


Abbildung 7: Links ist der Unterschied (rot unterstrichene Base) der mutierten Nukleotidsequenz von Patientin 30 im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) dargestellt. Rechts ist die Mutation (ein Signal = homozygot, zwei überlappende Signale = heterozygot) im entsprechenden Nukleotid-Elektrophoresesignal (grauer Pfeil) markiert und mit dem zugehörigen Basentriplett (schwarzer Kreis) dargestellt.

3.1.1.2 Intronmutationen

Intron 5

Im nicht-kodierenden Chromosomenabschnitt zwischen Exon 5 und 6 ließ sich bei einer Patientin (Nr. 25) ein Basenaustausch von Guanin zu Cytosin direkt vor Beginn des Exons 6 (IVS5 -1) nachweisen. Diese Mutation zeigte sich bei der Patientin in beiden Allelen sowie jeweils heterozygot bei ihren konsanguinen Eltern.

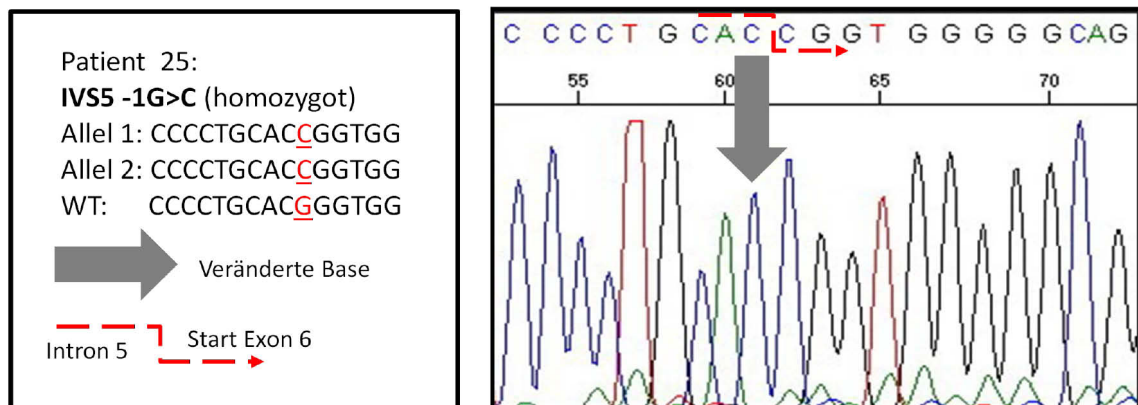


Abbildung 8: Links ist der Unterschied (rot unterstrichene Base) der mutierten Nukleotidsequenz von Patientin 25 im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) dargestellt. Rechts ist die Mutation (ein Signal = homozygot, zwei überlappende Signale = heterozygot) in dem entsprechenden Nukleotid-Elektrophoresesignal (graue Pfeile) markiert und mit dem Start des Exons 6 (roter Pfeil) dargestellt.

Bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv konnten mittels Sequenzierung von genomischer DNA keine weiteren Mutationen in den verbliebenen Exons 1, 3, 4, 5, 7 und 9 und den exon-nahen Intronabschnitten nachgewiesen werden. Alle Mutationen im *BCKDHA*-Gen waren Punktmutationen.

Tabelle 3: Mutationen im *BCKDHA*-Gen

Patient	Exon	Mutation an Nukleotidposition	Mutation an Proteinposition	Anzahl Allele	Vater	Mutter
11	2	c.205C>T	p.Gln69Stop	1	1	wt
	6	c.773G>A	p.Cys258Stop	1	wt	1
		c.774C>A	p.Cys258Stop	1	wt	1
25	IVS5	IVS5-1G>C	Splicing (Exon 6 Deletion)	2	1	1
30.	8	c.1087C>T	p.Arg363Trp	1	1	wt

wt: Wildtyp

Anzahl der Allele: 1=heterozygoter Genotyp

Anzahl der Allele: 2=homozygoter Genotyp

3.1.1.3 Polymorphismen

Bei genetischen Polymorphismen schlagen sich verschiedene Nukleotidabfolgen, d.h. Basenaustausche an einer Stelle eines Gens, aufgrund der Degeneration des genetischen Codes nicht in der kodierte Aminosäuresequenz nieder. Zwei solcher häufig beschriebenen genetischen Polymorphismen im *BCKDHA*-Gen wurden bei insgesamt 13 untersuchten Patienten gefunden. Bei der ebenfalls oftmals vorkommenden Veränderung p.Pro39His kommt es zu einem hinsichtlich der Aktivität der E1- α Untereinheit unwirksamen Basenaustausch.

1. Bei dem ersten Polymorphismus handelt es sich um den Basenaustausch von Cytosin in Adenin in Nukleotidposition 116 der cDNA. Das Triplet CCC (Prolin) kodiert nun aufgrund seiner veränderten Nukleotidsequenz für die Aminosäure Histidin (CAC). Die p.Pro39His-Mutation wurde in der Literatur bereits als stille Variante beschrieben (Henneke et al., 2003) und ist inzwischen als SNP (rs 34589432) registriert. Eine Patientin (Nr. 10) war für diese Mutation in Kodonposition 39 heterozygot.
2. Bei dem zweiten Polymorphismus handelt es sich um den Basenaustausch von Cytosin gegen Thymin in Position 972 der cDNA. Sowohl das Triplet TTC als auch das Triplet TTT kodieren für die Aminosäure Phenylalanin. Der p.Phe324Phe-Polymorphismus, der auch als SNP re 284652 registriert ist, lag bei 9 Patienten vor; davon bei 3 Patienten in heterozygoter und bei 6 Patienten in homozygoter Ausprägung.
3. Bei dem dritten Polymorphismus handelt es sich um den Basenaustausch von Adenin zu Guanin in Nukleotidposition 1221 der cDNA. Beide Triplets (CTA und CTG) kodieren für die Aminosäure Leucin. Der p.Leu407Leu-Polymorphismus, der auch als SNP re 4647 registriert ist, war bei 12 Patienten vorhanden; davon bei 4 Patienten in heterozygoter und 7 Patienten in homozygoter Ausprägung.

Tabelle 4: Polymorphismen im *BCKDHA*-Gen

Patient	Exon	Mutation an Nukleotidposition	Mutation an Proteinposition	Anzahl Allele
1	9	c.1221A>G	p.Leu407Leu	1
2	7	c.972C>T	p.Phe324Phe	2
	9	c.1221A>G	p.Leu407Leu	2
3	7	c.972C>T	p.Phe324Phe	2
	9	c.1221A>G	p.Leu407Leu	2
9	7	c.972C>T	p.Phe324Phe	1
	9	c.1221A>G	p.Leu407Leu	1
10.	2	c.116C>A	p.Pro39His	1
	7	c.972C>T	p.Phe324Phe	2
	9	c.1221A>G	p.Leu407Leu	2
13	9	c.1221A>G	p.Leu407Leu	1
14	9	c.1221A>G	p.Leu407Leu	1
20	7	c.972C>T	p.Phe324Phe	2
	9	c.1221A>G	p.Leu407Leu	2
23	7	c.972C>T	p.Phe324Phe	1
	9	c.1221A>G	p.Leu407Leu	1
25	7	c.972C>T	p.Phe324Phe	2
	9	c.1221A>G	p.Leu407Leu	2
28	7	c.1221A>G	p.Leu407Leu	1
30	9	c.1221A>G	p.Leu407Leu	2
A.D.	7	c.972C>T	p.Phe324Phe	2
	9	c.1221A>G	p.Leu407Leu	2

Anzahl der Allele: 1=heterozygoter Genotyp

Anzahl der Allele: 2=homozygoter Genotyp

3.1.2 Mutationen im *BCKDHB*-Gen

In insgesamt 10 Allelen wurden Mutationen im *BCKDHB*-Gen gefunden. Sämtliche Basenaustausche lagen in Exons.

Exon 2

Exon 2 ist ein 78 bp langes Fragment. In diesem Exon ließ sich bei einem Patienten (Nr. 14) an der Nukleotidposition c.272 eine Transition von Cytosin in Thymin nachweisen. Diese Veränderung des Basentriplets (GCA > GTA) hat einen Austausch der Aminosäure Alanin in Valin an Kodonposition 91 zur Folge. Diese p.Ala91Val-Mutation wurde bei dem Patienten in homozygoter Form gefunden. Beide Eltern zeigten sich für diese Mutation heterozygot.

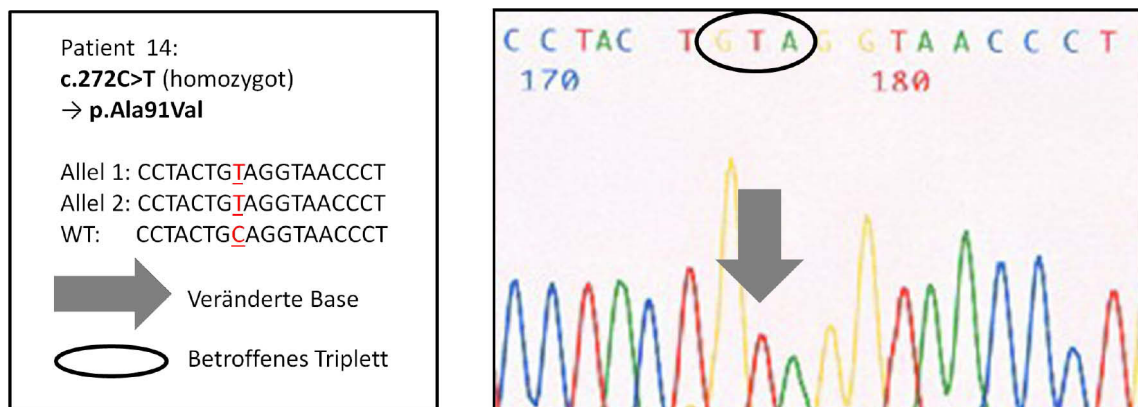


Abbildung 9: Links ist der Unterschied (rot unterstrichene Base) der mutierten Nukleotidsequenz von Patient 14 im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) dargestellt. Rechts ist die Mutation (ein Signal = homozygot, zwei überlappende Signale = heterozygot) in dem entsprechenden Nukleotid-Elektrophoresesignal (graue Pfeile) markiert und mit dem entsprechenden Basentriplett (schwarzer Kreis) dargestellt.

Exon 5

Die Länge von Exon 5 beträgt 156 bp. Hier konnte die Mutation p.Cys188Stop bei einer Patientin (Nr. 10) in homozygoter Form nachgewiesen werden. Die Analyse der Nukleotidsequenz zeigte einen Basenaustausch von Thymin in Adenin an der Position 564 der cDNA. Damit kodiert das neue Basentriplett (TGA) anstatt für Cystein (TGT) für ein Stop-Kodon. Die Eltern waren jeweils heterozygot für diese p.Cys188Stop-Mutation.

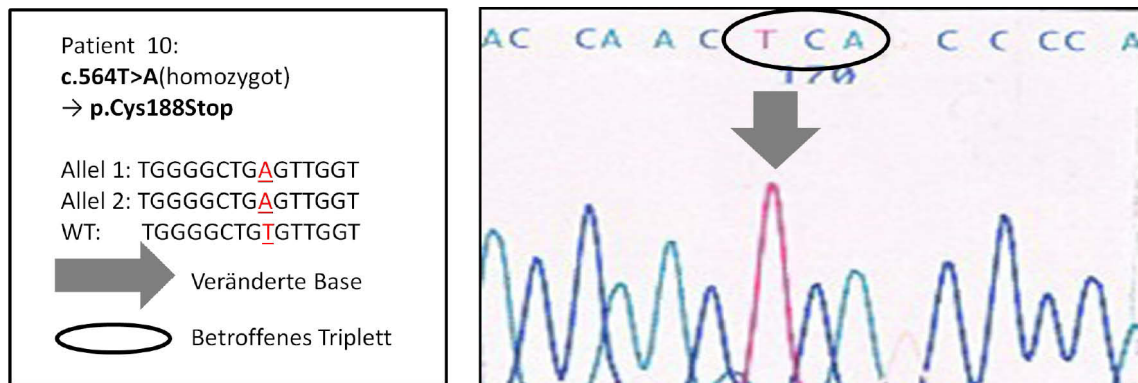


Abbildung 10: Links ist der Unterschied (rot unterstrichene Base) der mutierten Nukleotidsequenz von Patient 10 im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) dargestellt (5'-3' Leserichtung). Rechts ist die Mutation (ein Signal = homozygot, zwei überlappende Signale = heterozygot) in dem entsprechenden Nukleotid-Elektrophoresesignal (graue Pfeile) markiert und mit dem entsprechenden Basentriplett (schwarzer Kreis) dargestellt (3'-5' Leserichtung).

Exon 6

Dieses Exon hat eine Fragmentlänge von 109 bp. Bei einem Patienten (Nr. 1) wurde hier an der Nukleotidposition 688 der cDNA ein Basenaustausch von Guanin zu Thymin nachgewiesen. Die Änderung des Triplets GAG in TAG bewirkt einen Austausch der Aminosäure Glutamat gegen ein Stop-Kodon an Kodonposition 230 (p.Glu230Stop). Die Mutation wurde in homozygoter Form gefunden. Die Eltern waren jeweils heterozygot für diese Mutation.

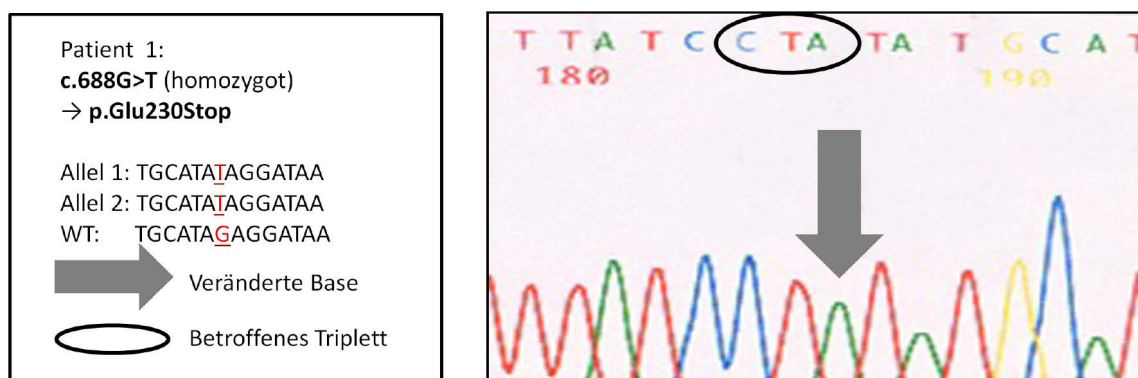


Abbildung 11: Links ist der Unterschied (rot unterstrichene Base) der mutierten Nukleotidsequenz von Patient 1 im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) dargestellt (5'-3' Leserichtung). Rechts ist die Mutation (ein Signal = homozygot, zwei überlappende Signale = heterozygot) in dem entsprechenden Nukleotid-Elektrophoresesignal (graue Pfeile) markiert und mit dem entsprechenden Basentriplett (schwarzer Kreis) dargestellt (3'-5' Leserichtung).

Exon 9

Exon 9 ist 87 bp lang. In diesem Exon wurde eine Mutation gefunden. Diese Mutation befindet sich an der Nukleotidposition 1015 der cDNA. Es handelt sich um eine Transition von Cytosin in Thymin, so dass anstelle der Aminosäure Serin (TCG) für Leucin (TTG) kodiert wird. Es entsteht eine p.Ser339Leu-Mutation, für die der Patient (Nr. 3) homozygot ist. Seine Eltern zeigten diese Mutation jeweils in heterozygoter Ausprägung.

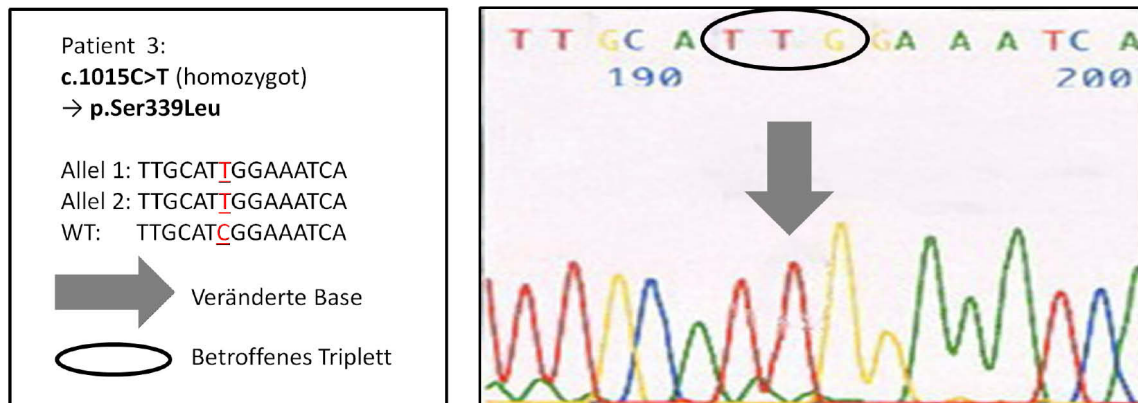


Abbildung 12: Links ist der Unterschied (rot unterstrichene Base) der mutierten Nukleotidsequenz von Patient 3 im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) dargestellt. Rechts ist die Mutation (ein Signal = homozygot, zwei überlappende Signale = heterozygot) in dem entsprechenden Nukleotid-Elektrophoresesignal (graue Pfeile) markiert und mit dem entsprechenden Basentriplett (schwarzer Kreis) dargestellt.

Exon 10

Dieses Exon hat eine Länge von 148 bp. Hier wurde bei einer Patientin (Nr. 23) ein Basenaustausch von Thymin gegen Adenin an der Position 1149 der cDNA nachgewiesen. Dadurch wird das für Tyrosin kodierende Basentriplett (TAT) zu einem Stop-Kodon (TAA). Die Mutation p.Tyr383Stop lag bei der Patientin in homozygoter Form vor. Bei den Eltern war diese Mutation in jeweils heterozygoter Ausprägung vorhanden.

In dem Patientenkollektiv wurden mit dem angewendeten Methodenspektrum in den restlichen Exons 1, 3, 4, 7 und 8 des *BCKDHB*-Gens keine weiteren Mutationen gefunden.

Bei allen im *BCKDHB*-Gen aufgedeckten Mutationen handelt es sich um Punktmutationen. Es wurden keine Polymorphismen gefunden.

Tabelle 5: Mutationen im *BCKDHB*-Gen

Patient	Exon	Mutation an Nukleotidposition	Mutation an Proteinposition	Anzahl Allele	Vater	Mutter
14	2	c.272C>T	p.Ala91Val	2	1	1
10	5	c.564T>A	p.Cys188Stop	2	1	1
1	6	c.688G>T	p.Glu230Stop	2	1	1
3	9	c.1015C>T	p.Ser339Leu	2	1	1
23	10	c.1149T>A	p.Tyr383Stop	2	1	1

Anzahl der Allele: 1=heterozygoter Genotyp

Anzahl der Allele: 2=homozygoter Genotyp

3.1.3 Mutationen im *DBT*-Gen

In insgesamt 2 Allelen wurden Mutationen im *DBT*-Gen gefunden. Es sind Punktmutationen im Bereich von Exons.

Exon 7

Die Länge von Exon 7 beträgt 167 bp. Bei einer Patientin (Nr. 32) wurde in diesem Exon eine homozygote Punktmutation gefunden. Es handelt sich um eine Transition von Thymin zu Guanin an der Nukleotidposition 788 der cDNA. Diese Änderung des Triplets ATG in AGG bewirkt einen Austausch der Aminosäure Methionin zu Arginin an Kodonposition 263 (p.Met263Arg). Diese Mutation ließ sich bei beiden Elternteilen in heterozygoter Form nachweisen.

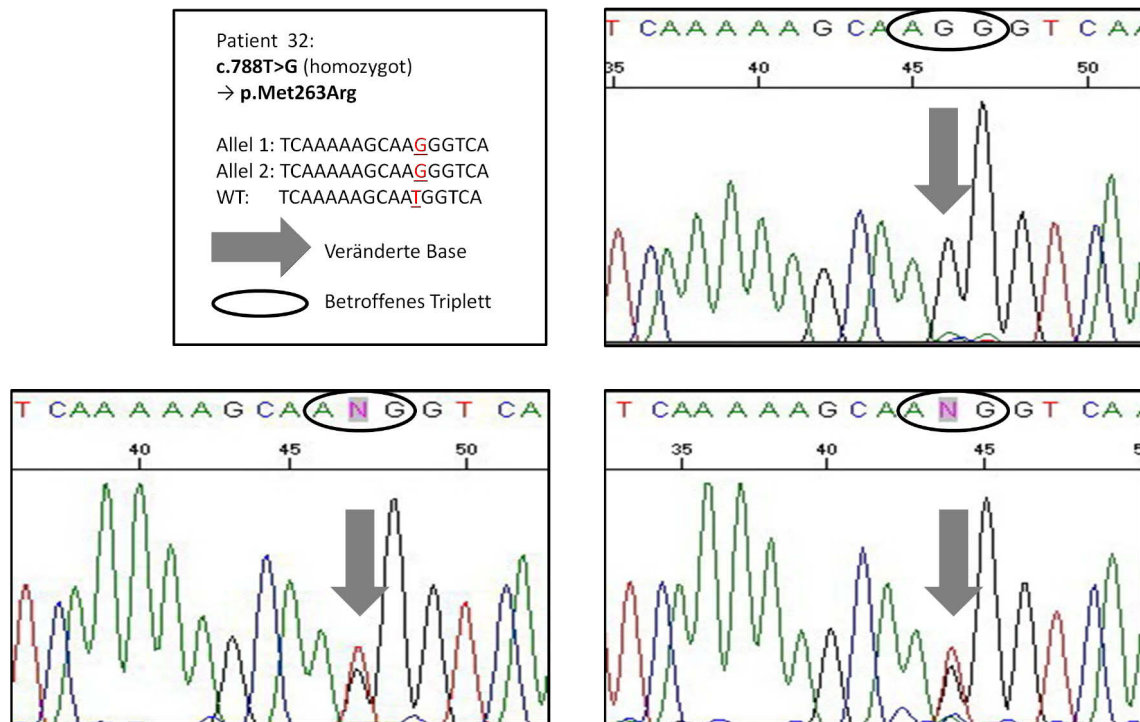


Abbildung 13: Links oben ist der Unterschied (rot unterstrichene Base) der mutierten Nukleotidsequenz von Patientin 32 im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) dargestellt. Rechts oben ist die Mutation (ein Signal = homozygot, zwei überlappende Signale = heterozygot) des Patienten im entsprechenden Nukleotid-Elektrophoresesignal (grauer Pfeil) markiert und mit dem entsprechenden Basentriplett (schwarzer Kreis) dargestellt. Links unten ist die Sequenzanalyse der Mutter, rechts unten die des Vaters des Patienten dargestellt.

In dem vorliegenden Patientenkollektiv wurden mit dem angewendeten Methodenspektrum in den übrigen Exons des *DBT*-Gens 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 und 11 keine weiteren krankheitsverursachenden Mutationen nachgewiesen.

Alle im *DBT*-Gen gefundenen Mutationen sind Punktmutationen. Es wurde ein Polymorphismus gefunden.

Tabelle 6: Mutationen im *DBT*-Gen

Patient	Exon	Mutation an Nukleotidposition	Mutation an Proteinposition	Anzahl Allele	Vater	Mutter
32	7	c.788T>G	p.Met263Arg	2	1	1

Anzahl der Allele: 1=heterozygoter Genotyp

Anzahl der Allele: 2=homozygoter Genotyp

3.1.3.1 Polymorphismen im *DBT*-Gen

Bei der oftmals vorkommenden Veränderung p.Gly384Ser kommt es zu einem hinsichtlich der Aktivität der E2 Untereinheit unwirksamen Basenaustausch in Exon 9.

1. Bei dem Polymorphismus handelt es sich um den Basenaustausch von Guanin in Adenin in Nukleotidposition 1150 der cDNA. Das Triplet GGT (Glycin) kodiert nun aufgrund seiner veränderten Nukleotidsequenz für die Aminosäure Serin (AGT). Diese Mutation ist nicht krankheitsverursachend und als SNP rs 12021720 registriert. Zwei Patienten (Nr. 10 und 28) waren für diese Mutation in Kodonposition 384 heterozygot. Während bei Patient Nr. 10 der Nachweis einer wahrscheinlich krankheitsverursachenden homozygoten Mutation im *BCKDHB*-Gen gelang, wurde bei Patienten Nr. 28 in keinem Gen eine krankheitsverursachende Mutation gefunden.

Tabelle 7: Polymorphismen im *DBT*-Gen

Patient	Exon	Mutation an Nukleotidposition	Mutation an Proteinposition	Anzahl Allele
---------	------	-------------------------------	-----------------------------	---------------

28	9	c.1150G>A	p.Gly384Ser	1
10	9	c.1150G>A	p.Gly384Ser	1

Anzahl der Allele: 1=heterozygoter Genotyp

3.1.4 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse

Von insgesamt 30 möglichen Allelen wurde in 17 Allelen eine wahrscheinlich krankheitsverursachende Mutation gefunden. 30 % (5 Allele) betrafen das *BCKDHA*-Gen, 60 % (10 Allele) das *BCKDHB*-Gen und 10 % (2 Allele) das *DBT*-Gen. In 13 Allelen wurde keine krankheitsverursachende Mutation nachgewiesen. Bei 8 Patienten wurden jeweils 2 mutierte Allele an einem Genlokus gefunden. Diese 8 Patienten wurden in die Darstellung der geographischen Verteilung der Mutationen hinsichtlich der Herkunft der Familien in der Türkei übernommen.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 8: Ergebnisse der molekulargenetischen Charakterisierung von untersuchten 15 Patienten

Patient	Gen/ Exon	Mutation an Nukleotidposition	Mutation an Proteinposition	Anzahl Allele	Vater	Mutter	Phänotyp
1	BCKDHB/6	c.688G>T	p.Glu230Stop	2	1	1	Klassisch
2	x	x	x	x	x	x	Mögl. keine MSUD
3	BCKDHB/9	c.1015C>T	p.Ser339Leu	2	1	1	Klassisch
9	x	x	x	x	x	x	Fraglich Klassisch
10	BCKDHB/5	c.564T>A	p.Cys188Stop	2	1	1	Klassisch
11	BCKDHA/2	c.205C>T	p.Gln69Stop	1	1	wt	Klassisch
	BCKDHA/6	c.773G>A	p.Cys258Stop	1	wt	1	
		c.774C>A	p.Cys258Stop	1	wt	1	
13	x	x	x	x	x	x	Klassisch
14	BCKDHB/2	c.272C>T	p.Ala91Val	2	1	1	Schwere Variante

20	x	x	x	x	x	x	Klassisch
23	BCKDHB/ 10	c.1149T>A	p.Tyr383Stop	2	1	1	Klassisch
25	BCKDHA/ IVS5	IVS5-1G>C	Exon 6 Deletion	2	1	1	Klassisch
28	x	x	x	x	x	x	Fraglich Klassisch
30	BCKDHA/8	c.1087C>T	p.Arg363Trp	1	1	wt	Klassisch
32	DBT/7	c.788T>G	p.Met263Arg	2	1	1	Klassisch
A.D.	x	x	x	x	x	x	Fraglich Klassisch

wt: Wildtyp

Anzahl der Allele: 1=heterozygoter Genotyp

x: kein Nachweis eines mutierten Alleles

Anzahl der Allele: 2=homozygoter Genotyp

3.2 Darstellung aller türkisch-stämmigen Patienten mit jeweils 2 mutierten Allelen an einem Genlocus für MSUD

Zusätzlich zu den in dieser Arbeit analysierten 8 Patienten mit jeweils 2 mutierten Allelen an einem Genlocus wurde von 24 weiteren türkisch-stämmige Patienten die Herkunft der Eltern/Familie erfragt. Bei diesen Patienten waren in früheren Untersuchungen an der Universitäts-Kinderklinik Düsseldorf ebenfalls 2 mutierte Allele an einem Genlocus für MSUD gefunden worden. In einem nächsten Schritt sollte die geographische Verteilung der Mutationen dieser 32 Patienten innerhalb der Türkei analysiert werden. Maßgeblich hierfür war die Herkunft der Familien der MSUD-Patienten.

In dem 32 nicht verwandte Patienten umfassenden Kollektiv kamen insgesamt 27 verschiedene wahrscheinlich krankheitsverursachende Mutationen vor. Von den insgesamt 64 mutierten Allelen war das *BCKDHA*-Gen zu 37 % (24 Allele) von einer Mutation betroffen, das *BCKDHB*-Gen zu 44 % (28 Allele) und das *DBT*-Gen zu 19 % (12 Allele).

Neben 13 missense-Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, wurden 13 nonsense-Mutationen gefunden. Von diesen führen 9 zu einem vorzeitigen Stop-Kodon in den kodierenden cDNA Abschnitten. 4 waren intronisch genomische Mutationen, die zu einer Veränderung der Erkennungsregionen von Spleißstellen führen. In einem Falle

fand sich eine auf der cDNA 78 bp Basenpaare umfassende Deletion verursacht durch eine Intronmutation im *DBT*-Gen.

In den folgenden Tabellen sind alle wahrscheinlich krankheitsverursachenden Mutationen in den drei Genen *BCKDHA*, *BCKDHB* und *DBT*, der klinische Phänotyp sowie die geografische Herkunft der Familien für das Patientenkollektiv zusammengestellt.

Tabelle 9: Patienten mit Mutationen im *BCKDHA*-Gen

Patient	Exon	Mutation an Nukleotid-position	Mutation an Protein-position	Allele	Herkunft der Familie innerhalb der Türkei	MSUD-Phänotyp
11	2	c.205C>T	p.Gln69Stop	1	Gaziantep	Klassisch
	6	c.783G>A	p.Cys258Stop	1		
		c.784C>A	p.Cys258Stop	1		
D¹	3	c.373C>G	p.Gln125Glu	2	Keine Angabe	Klassisch
25.	IVS5	IVS5-1G>C	Exon 6 Deletion	2	Çorum	Klassisch
5^{3,6}	6	c.757G>A	p.Ala253Thr	2	Idil	Schwere Variante
A, B, C¹	6	c.773G>A	p.Cys258Thr	2	Çamlidere	Klassisch
4⁴	7	c.859C>T	p.Arg287Stop	2	Izmir	Klassisch
18⁴	7	c.868G>A	p.Gly290Arg	2	Trabzon/Samsun	Schwere Variante
16^{3,6}	7	c.919G>A	p.Arg297His	2	Çorum/Adana	Schwere Variante
17^{3,6}	7	c.982G>A	p.Ala328Thr	2	Gaziantep	Milde Variante
33	IVS7	IVS7-2A>G	splicing	2	Ankara	Klassisch

Tabelle 10: Patienten mit Mutationen im *BCKDHB*-Gen

Patient	Exon	Mutation an Nukleotid-position	Mutation an Protein-position	Allele	Herkunft der Familie innerhalb der Türkei	MSUD-Phänotyp
14	2	c.272C>T	p.Ala91Val	2	Ankara	Schwere Variante
26	2	c.272C>T	p.Ala91Val	2	Konya	Schwere Variante
24	3	c.331C>T	p.Arg111Stop	2	Sinop	Klassisch

31²	5	c.547C>T	p.Arg183Trp	2	Urfa	Klassisch
10	5	c.564T>A	p.Cys188Stop	2	Erzurum	Klassisch
15^{4,6}	6	c.665A>G	p.Lys222Arg	2	Zonguldak	Klassisch
1	6	c.688G>T	p.Glu230Stop	2	Ankara	Klassisch
21^{4,6}	7	c.752T>C	p.Val251Ala	2	Konya	Klassisch
29^{4,6}	8	c.853C>T	p.Arg285Stop	2	Kütahya	Klassisch
7	8	c.853C>T	p.Arg285Stop	2	Konya	Klassisch
3	9	c.1015C>T	p.Ser339Leu	2	Denizli	Klassisch
19^{4,6}	10	c.1149T>A	p.Tyr383Stop	2	Ordu	Klassisch
22^{4,6}	10	c.1149T>A	p.Tyr383Stop	2	Zonguldak	Klassisch
23	10	c.1149T>A	p.Tyr383Stop	2	Samsun	Klassisch

Tabelle 11: Patienten mit Mutationen im *DBT*-Gen

Patient	Exon	Mutation an Nukleotidposition	Mutation an Proteinposition	Allele	Herkunft der Familie innerhalb der Türkei	MSUD-Phänotyp
E¹	IVS3	IVS3-1G>A	splicing	2	Keine Angabe	Klassisch
8.	7	c.788T>G	p.Met263Arg	2	Trabzon	Klassisch
32	7	c.788T>G	p.Met263Arg	2	Trabzon	Klassisch
12^{4,6}	8(7)	c.940-1G>A	p.Ala314-Lys339del	2	Istanbul	Klassisch
27	IVS8	IVS8-1G>A	Splicing	1	Ankara	Klassisch
	9	c.1202T>C	p.Ile401Thr	1		
31	9	c.1202T>C	p.Ile401Thr	2	Çankırı	Klassisch

¹ publiziert durch Dursun et al (2002)

⁴ publiziert durch Henneke et al (2003)

² gefunden von S.Fend

⁵ publiziert durch Simon et al (2005)

³ publiziert durch Flaschker et al (2007)

⁶ publiziert durch Simon et al (2006)

Anzahl der Allele: 1=heterozygoter Genotyp

Anzahl der Allele: 2=heterozygoter Genotyp

4 Diskussion

4.1 Mögliche Konsequenzen der gefundenen Mutationen auf die Sekundär-/Tertiärstruktur der Untereinheiten E1(E1 α +E1 β) und E2 des BCKDH-Multienzymkomplexes

Von den 32 in die Betrachtung der geografischen Mutationszuordnung aufgenommenen Patienten wurden 15 Patienten im Rahmen dieser Arbeit molekulargenetisch untersucht. Bei 8 dieser Patienten konnten Mutationen in 2 Allelen eines Genlocus nachgewiesen werden. Bei einem Patienten wurde nur ein verändertes Allel identifiziert. Insgesamt wurden 10 verschiedene Mutationen (vier im *BCKDHA*-Gen, fünf im *BCKDHB*-Gen und eine im *DBT*-Gen) gefunden, von denen vier (IVS5-1G>C- α , p.Arg363Trp- α , p.Ser339Leu- β und p.Tyr383Stop- β) bereits in der Literatur beschrieben wurden. Die übrigen 6 Mutationen sind neu und werden im Folgenden in Hinblick auf ihre möglichen Konsequenzen auf die Sekundär-/ Tertiärstruktur der E1- und E2-Untereinheit und damit für die Funktion des BCKDH-Multienzymkomplexes diskutiert. Als Grundlage hierfür dienen die röntgen-kristallografische Strukturanalyse des humanen E1 Heterotetramers ($\alpha_2\beta_2$) von Ævarsson et al. aus dem Jahr 2000 und der Vergleich humaner Primärsequenzen der drei Gene mit denen von Bakterien (*Pseudomonas putida*) (siehe Abbildung 15 und 16) und Tieren (*Bos taurus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*) aus genomischen Datenbanken (Ævarsson et al., 2000; Ono et al., 2001). Auch die Strukturanalysen der humanen E2 Untereinheit (Homopolymer α_{24}) in Lösung mittels Protonen-MRT (Chang et al., 2002; Chang et al., 2006) und die Beschreibung der Kristallstruktur der Rinder E2-Untereinheit (Kato et al., 2006) haben wesentlich zum weiteren Verständnis des strukturellen Pathomechanismus der MSUD beigetragen. Die neu nachgewiesenen Mutationen waren weder als nicht-synonym codierender SNP registriert noch konnten sie in 50 *BCKDHA*-, 45 *BCKDHB*- und 50 *DBT*-Allelen türkisch-stämmiger Kontrollen gefunden werden.

4.1.1 Mutationen im *BCKDHA*-Gen

Die bisher beschriebenen 50 Typ IA Mutationen sind zum großen Teil missense-Mutationen und überwiegend mit dem klassischen Phänotyp assoziiert (Chuang et al., 2008). Bis auf wenige Ausnahmen handelt es sich um einzelne Basenaustausche (Punktmutationen) ohne Clusterbildung in bestimmten Genabschnitten. Sowohl Typ IA als auch Typ IB Mutationen werden im Hinblick auf die gestörte Funktion in drei Gruppen eingeteilt. Es werden Störungen in der Kofaktorbindung, bei der Ausbildung des hydrophoben Kerns oder bei der Assoziation der vier Untereinheiten α , α' , β und β' zum $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer E1 unterschieden. Wie konserviert eine Aminosäure ist, wurde anhand des Vergleichs mit den homologen Sequenzen von Maus, Ratte, Rind und *Pseudomonas putida* (Hu et al., 1988; Zhang et al., 1989; McKean et al., 1992; Chuang et al., 1994; Ævarsson et al., 2000) eruiert.

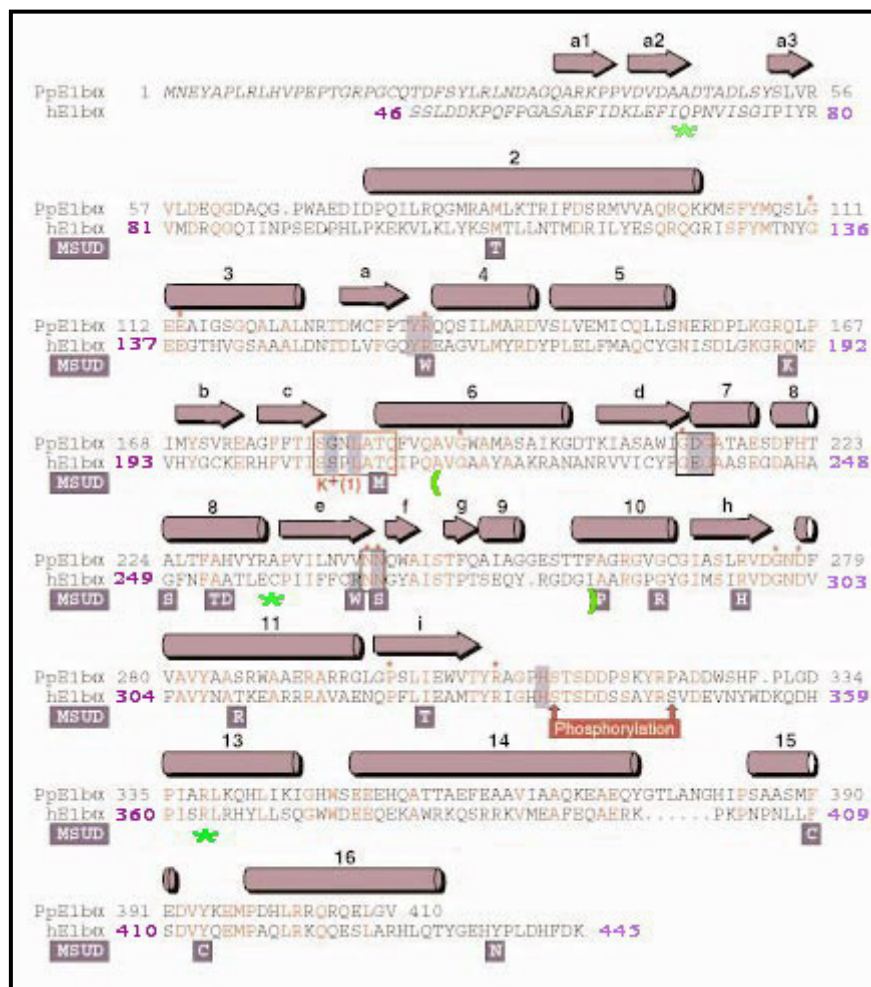


Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der Proteinsequenzen der E1α-Untereinheit des Menschen und *Pseudomonas putida* (rot dargestellte Aminosäuren sind in beiden Sequenzen identisch, schwarz dargestellte sind nicht identisch). Sekundärstrukturelemente sind als Zylinder (α-Helix) und Pfeile (β-Faltblatt) dargestellt.

Faltblatt) dargestellt. An der Kofaktorbindung beteiligte Aminosäurereste sind bläulich schattiert. Aminosäurereste in einem roten Kästchen sind an der Bindung von Kaliumionen beteiligt. Aus der Literatur bekannte Mutationen sind unterhalb der Sequenz blau angezeigt, während die in dieser Arbeit durch Mutationen betroffenen Aminosäuren mittels grüner Kreuze markiert sind. Die von der Deletion des Exons 6 betroffenen Aminosäuren liegen innerhalb der grünen Klammern. (Modifiziert aus Ævarsson et al., 2000).

Die vier im *BCKDHA*-Gen nachgewiesenen Mutationen machen 30 % (5 von 17 Allelen) aller in dieser Arbeit gefundenen Mutationen bei den untersuchten türkischstämmigen Patienten aus und werden im Folgenden ausführlich beschrieben. Zwei von ihnen wurde bisher in der Literatur noch nicht berichtet. Darüberhinaus wurden drei registrierte SNPs gefunden.

p.Gln69Stop

Die p.Gln69Stop-Mutation wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Glutamin 69 liegt im β -Faltblatt α_2 der Sekundärstruktur der α -Untereinheit von E1 des Branched-chain α -ketoacid Dehydrogenase Komplex. Durch diese Mutation wird der Code für die neutrale Aminosäure mit polarer Seitenkette Glutamin zu einem Stopkodon. Dadurch kommt es zu einem verfrühten Abbruch der Translation. Dem daraus resultierenden Protein fehlen somit mehr als 90 % seiner eigentlichen Größe. Außerdem führen mutationsbedingte vorzeitige Stoppsignale, sogenannte nonsense-Mutationen, aufgrund herabgesetzter mRNA-Spiegel zu einer entsprechend herabgesetzten Synthese des verkürzten Proteins (Chuang et al., 1994; Chinsky et al, 1998). Vor diesem Hintergrund werden auch alle weiteren nonsense-Mutationen in diesem Kapitel diskutiert. Aufgrund des annähernd vollständigen Ausfalls der E1 α -Untereinheit kann angenommen werden, dass die p.Gln69Stop-Mutation in homozygoter Form mit einer klassischen Form der MSUD assoziiert ist. Der Patient Nr. 11 ist „compound“-heterozygot für diese Mutation und zusätzlich Träger einer weiteren nonsense-Mutation (siehe p.Cys258Stop).

p.Cys258Stop

Der Austausch des schwefelhaltigen Cystein mit unpolarer Seitenkette gegen ein Stopkodon an Position 258 führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation, der in einem

ca. 50 % kleineren Protein resultiert. Cystein 258 liegt als alleinige Aminosäure genau zwischen α -Helix 8 und β -Faltblatt e der E1 α -Untereinheit und stellt damit ein wichtiges Verbindungselement dieser beiden Sekundärstrukturelemente dar. Die β -Faltblätter d, e, h, und i sind darüberhinaus Teile der E1 α -Hauptdomäne und beteiligen sich dort an der Bildung des hydrophoben Kerns (Ævarsson et al., 2000; Chuang et al., 2008). Hinzukommend fehlen durch das verfrühte Stop-Kodon die für die Regulation der Gesamtaktivität des Multienzymkomplexes notwendigen Serinreste 292 und 302 und die zur Zusammenlagerung des Tetramers unverzichtbare C-(carboxy) terminale Domäne 356-400. Aus oben erläuterten Gründen der verringerten Proteinsynthese des verkürzten Proteins kann auch für diese nonsense-Mutation eine Assoziation mit dem klassischen Phänotyp der MSUD bei homozygoter Ausprägung der Mutation angenommen werden. Diese Annahme wird von drei für eine p.Cys258Tyr-Mutation homozygoten Patienten, die alle einen schweren neonatalen klinischen Verlauf zeigten, unterstützt (Dursun et al., 2002). Der „compound“-heterozygote Patient Nr. 11 (siehe p.Gln69Stop) ließ sich ebenfalls der klassischen Form der MSUD zuordnen.

IVS5-1G>C

Die Transversion der Base Guanin zu Cytosin im Intronbereich 5 an der 5' splice-site des Exons 6 wurde bereits in der Literatur berichtet (Chuang et al., 2000). Die IVS5-1G>C Mutation wurde im Rahmen einer pränataldiagnostischen Untersuchung aus Chorionzottenmaterial aufgedeckt und geht mit dem Verlust des Exons 6 des *BCKDHA*-Gens einher. Das Exon 6 ist an der Kodierung für die α -Helices 6-10 und die β -Faltblätter d-g beteiligt. Die β -Faltblätter d und e sind neben weiteren Sekundärstrukturelementen Teile der E1 α -Hauptdomäne und beteiligen sich dort an der Bildung des hydrophoben Kerns. Desweiteren fehlen dem Protein für die Kofaktorbindung wichtige Seitenketten, die in dieser Region liegen, ebenso wie Teile der für die α - α' -Interaktion essentiellen α -Helix 10 (Ævarsson et al., 2000; Chuang et al., 2008). Insgesamt ist somit anzunehmen, dass die Gesamtfunktion der BCKDH in hohem Maße eingeschränkt ist. Der hier betrachtete Patient (Nr. 25) war homozygot für diese Intronmutation und zeigte ebenso wie der durch Chuang et al. (2000) berichtete Patient übereinstimmend mit den vermuteten Konsequenzen der erheblichen Funktionseinschränkung des Multienzymkomplexes einen klassischen Erkrankungsverlauf.

p.Arg363Trp

Die große, positiv geladene Aminosäure Arginin wird in Folge der p.Arg363Trp-Mutation durch das neutrale Threonin (polarer Seitenkette) ersetzt. Das an Kodonposition 363 in der α -Helix 13 liegende Arginin ist zwischen Mensch und *Pseudomonas putida* konserviert. Dieser Bereich spielt eine wichtige Rolle bei der Zusammenlagerung der Untereinheiten von E1 (Chuang et al., 2008) und hat damit erhebliche Konsequenzen für die Stabilität und Funktion des Enzymkomplexes. Die p.Arg363Trp-Mutation ließ sich bei Patientin Nr. 30, die klinisch einen klassischen Krankheitsverlauf zeigte, und bei ihrem Vater, nur in einem Allel nachweisen. Eine weitere Mutation konnte nicht gefunden werden. Mögliche Gründe hierfür werden in Kapitel 4.3 diskutiert. Diese Mutation wurde bereits durch Danner et al. (1998), allerdings ohne Angabe des klinischen Phänotyps, berichtet.

4.1.2 Mutationen im *BCKDHB*-Gen

Es wurden zum gegenwärtigen Zeitpunkt 52 verschiedene, größtenteils mit einem klassischen Verlauf verbundene Typ IB Mutationen gefunden (Chuang et al., 2008). Analog zu den Typ IA Mutationen können die Typ IB Mutationen zu einer Störung in der Kofaktorbindung, zu anderen Störungen bei der Ausbildung des hydrophoben Kerns und eine gestörte Assoziation der vier Untereinheiten α , β und β zum $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer E1 verursachen. Zur Beurteilung der Konservierung von betroffenen Aminosäuren wurden die Primärsequenzen von Maus, Ratte, Rind, Huhn und *Pseudomonas putida* zu Grunde gelegt (Zhao et al., 1992; Chinsky et al., 1993; Nobukuni et al., 1993; Chuang et al., 1996; Ævarsson et al., 2000; Ono et al., 2001).

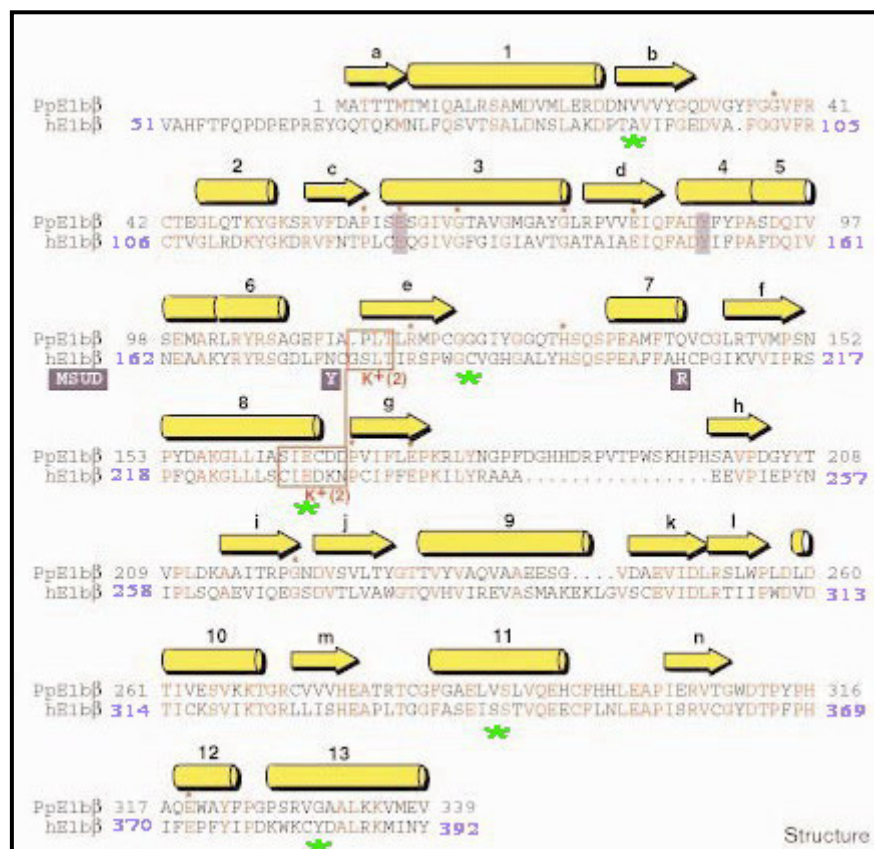


Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der Proteinsequenzen der E1β-Untereinheit des Menschen und *Pseudomonas putida* (rot dargestellte Aminosäuren sind in beiden Sequenzen identisch, schwarz dargestellte sind nicht identisch). Sekundärstrukturelemente sind als Zylinder (α-Helix) und Pfeile (β-Faltblatt) dargestellt. An der Co-Faktorbindung beteiligte Aminosäurereste sind bläulich schattiert. Aminosäurereste in einem roten Kästchen sind an der Bindung von Kaliumionen beteiligt. Aus der Literatur entnommene Mutationen sind unterhalb der Sequenz blau angezeigt, während die in dieser Arbeit durch

Mutationen betroffenen Aminosäuren mittels grüner Kreuze markiert sind. (Modifiziert aus *Ævarsson et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Mutationen, ca. 60 % (10 von 17 Allelen) der nachgewiesenen Mutationen, dem *BCKDHB*-Gen zugeordnet. Drei dieser Mutationen waren neu und werden mit den anderen im Folgenden beschrieben.

p.Ala91Val

Diese erstmals gefundene missense-Mutation beschreibt einen Austausch der unpolaren Aminosäure Alanin in die ebenfalls unpolare und nur gering größere Aminosäure Valin. Das Kodon 91 befindet sich im Bereich des β -Faltblatts b der β -Untereinheit. Aufgrund der durch diese Mutation unveränderten Polarität der Seitenkette und der nur geringen Größenunterschiede zwischen Alanin und Valin sowie der Lage des β -Faltblatts b an der Aussenseite der E1-Untereinheit ist zu vermuten, dass die Zusammenlagerung und Funktion der BCKDH nicht elementar gestört sind. Diese Annahmen, der noch vorhandenen Restaktivität des Enzyms, passen zu den klinischen Daten der beiden, für diese Mutation homozygoten Patienten (Nr. 14 und 26), bei denen im Alter von 4 Monaten bzw. 2 Jahren jeweils eine schwere Variante der MSUD diagnostiziert wurde.

p.Cys188Stop

Der erstmals berichtete Austausch des für Cystein 188 codierenden Triplets gegen ein Stop-kodon resultiert auch hier in einem verkürzten Protein. Das neutrale Cystein 188 liegt konserviert zwischen β -Faltblatt e und α -Helix 7 der E1 β -Untereinheit. Erniedrigte Konzentrationen der beiden E1-Untereinheiten im Rahmen von Untersuchungen zur Auswirkung der benachbarten p.Val189Asp-Mutation (Nellis et al., 2003) legten die Vorstellung nahe, dass diese Region wichtig für die Fähigkeit der Tetramerbildung ist. Abgesehen davon fehlen dem Protein durch den verfrühten Translationsstopp nicht nur ca. 60 % seiner eigentlichen Größe, sondern auch für die Gesamtenzymfunktion unverzichtbare Bereiche. Große Teile der Hauptdomäne fehlen ebenso wie das C-terminale β -Ende, welches zur Bindung der E2-Untereinheit (Interaktion zwischen der E2-Bindungsdomäne (Subunit-Binding Domain; SBD) und dem β/β' -C-Terminus) benötigt wird (siehe Abbildung 18). Ein für die p.Cys188Stop-Mutation homozygoter Patient (Nr. 10) präsentierte damit übereinstimmend klinisch eine klassische Form der MSUD.

p.Glu230Stop

Die p.Glu230Stop-Mutation ist die dritte neue, die E1 β -Untereinheit betreffende nonsense-Mutation. Die Glutaminsäure an Position 230 liegt in α -Helix 8. Diese Region ist nach Vergleichen mit der E1 β Proteinprimärsequenz und Sekundärstruktur von *Pseudomonas putida* (Ævarsson et al., 2000) an der Bindung von K⁺ beteiligt. Diese Ionenbindung ist auch im humanen BCKDH-Komplex wichtig für die Stabilität und somit auch Funktion des Enzyms (Chuang et al., 1999). Darüberhinaus ist das Protein um ca. 50 % seiner eigentlichen Größe verkürzt und enthält wie bei den vorangehend beschriebenen nonsense-Mutationen der E1 β -Untereinheit kein für die Bindung der E2-Untereinheit essentielles C-terminales Ende (siehe Abbildung 18). Es ist davon auszugehen, dass auch diese nonsense-Mutation wie bei Patient Nr. 1, ein homozygoter Allelträger, mit einem schweren neonatalen Verlauf assoziiert ist.

p.Ser339Leu

Bei der p.Ser339Leu-Mutation ist Serin (neutrale Aminosäure mit polarer Seitenkette) gegen Leucin (neutrale Aminosäure mit unpolarer Seitenkette) ausgetauscht. Kodonposition 339 liegt am Beginn der α -Helix 11. Aufgrund der Kontaktaufnahme der jeweiligen Helix 11 der β - und β' -Untereinheit ist diese Region wichtig für die β - β' -Interaktion (siehe Abbildung 17A und B). Durch den Aminosäureaustausch ist die hydrogene Wechselwirkung zwischen Ser339- β und Glu340- β' sowie zwischen Arg359- β und Glu340- β' , welche über die β - β' -Interaktion essentiell für die native Zusammenlagerung des $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramers ist, gestört (siehe Abbildung 17 C). In der Genexpression mutanter E1 (die p.Ser339Leu-Mutation tragenden) *E.Coli*-Stämme wurden $\alpha\beta$ -Heterodimere nachgewiesen. Diese Heterodimere sind energetisch stabil, aber enzymatisch inaktiv. Diese Ergebnisse des strukturellen Pathomechanismus stehen im Einklang mit dem klinischen Verlauf der betroffenen Patienten. Der Patient Nr. 3 (homozygot für p.Ser339Leu) wies einen klassischen Phänotyp auf. Diese Mutation wurde ebenfalls bei vier Patienten aus der Religionsgemeinschaft der Drusen in Israel nachgewiesen (Wynn et al., 2001). Die Mutation wurde hier als S289L bezeichnet. Die drei homozygoten Allelträger zeigten eine klassische Form und ein „compound“-heterozygoter Patient eine milde (intermittierende) Variante der MSUD. Es kann also davon ausge-

gangen werden, dass die p.Ser339Leu-Mutation in homozygoter Ausprägung mit dem klassischen Phänotyp assoziiert ist.

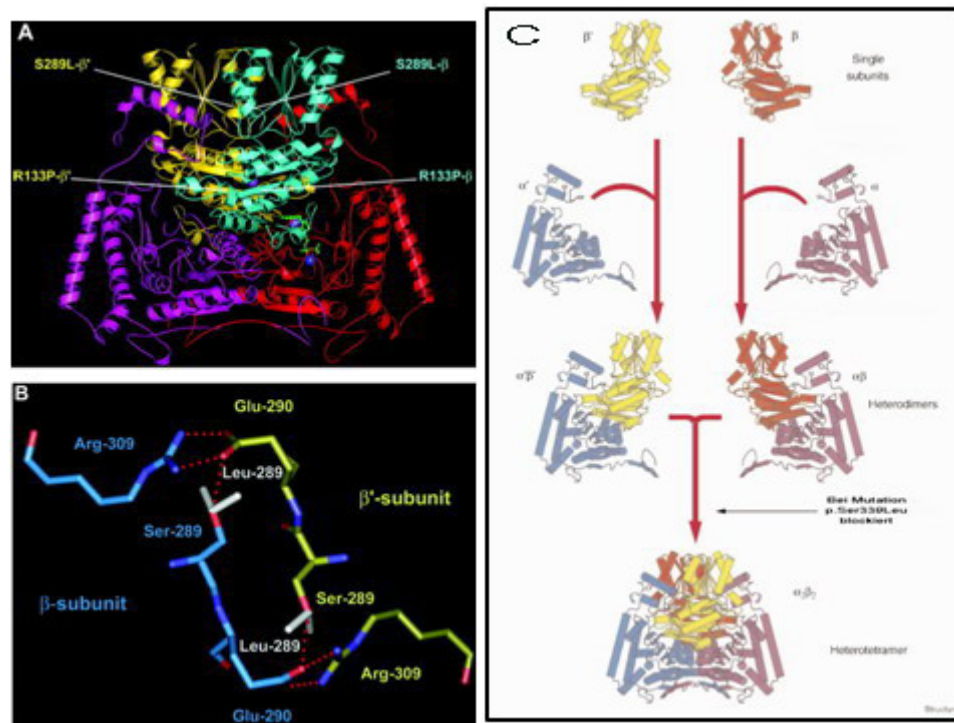


Abbildung 17: A zeigt die dreidimensionale Organisation der α - (lila), α' - (rot), β - (türkis) und β' - (gelb) Untereinheiten im $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer E1. Die p.Ser339Leu-Mutation (in der Abbildung als S289L- β bezeichnet) ist in der Helix 11 an der Verbindungsstelle zwischen der β - und der β' -Untereinheit lokalisiert. B stellt den mutmaßlichen Effekt der p.Ser339Leu-Mutation auf die β - β' -Interaktion dar. Der Serinrest der β -Untereinheit (blau) ist über hydrogene Wechselwirkungen (rot gestrichelt) mit dem Glutaminrest 340 (in der Abbildung als Glu-290 bezeichnet) der β' -Untereinheit (gelb) verbunden. Darüber hinaus bildet Arg-309 (entspricht Arg-359 in der Abbildung) der β -Untereinheit ionische Interaktionen (rot gestrichelt) mit Glu-340- β' . Parallele polare und ionische Interaktionen, die Ser-339 mit einbeziehen, treten in der β -Untereinheit auf. Die p.Ser339Leu-Mutation (Leucin ist weiß dargestellt) hebt die eben beschriebenen β - β' -Interaktion auf und verhindert so die Anlagerung der $\alpha\beta$ - und $\alpha'\beta'$ -Heterodimere zum nativen $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer. (Übernommen aus Wynn et al., 2001). In C sind die einzelnen Schritte der Bildung des $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramers E1 skizziert. Der bei der p.Ser339Leu-Mutation blockierte Schritt ist mit einem schwarzen Pfeil markiert (Modifiziert aus Ævarsson et al., 2000).

p.Tyr383Stop

Diese Stoppmutation wurde bereits mehrfach berichtet (Nellis et al., 2001; Henneke et al., 2003; Simon et al., 2005). Tyrosin 383 liegt in einer hoch konservierten Region der α -Helix 13 am C-terminalen Ende der E1 β -Untereinheit. Durch die nonsense-Mutation

wird das Triplet für die Aminosäure Tyrosin zu einem Stop-Kodon, welches zu einem verfrühten Abbruch der Translation führt. Dem daraus resultierenden Protein fehlen zwar nur 9 von 14 Aminosäuren der α -Helix 13 und der folgende C-Terminus der β/β' -Untereinheit, was allerdings erhebliche Konsequenzen für die Bindung der E1 an die E2-Untereinheit haben dürfte, da hier die Interaktion zwischen der E2-Bindungsdomäne (SBD) und dem β/β' -C-Terminus stattfindet (siehe Abbildung 18). Dieser Zusammenhalt ist elementar wichtig für die Gesamtfunktion des BCKDH-Multienzymkomplexes. Unterstützt wird diese Vermutung durch die hier betrachteten homozygoten Patienten (Nr. 19, 22 und 23), die alle unter einer klassischen Form der MSUD leiden, ebenso wie ein durch Nellis et al. früher beschriebener homozygoter Patient türkischer Abstammung. Die homozygote p.Tyr383Stop-Mutation scheint sicher mit dem klassischen Phänotyp assoziiert zu sein.

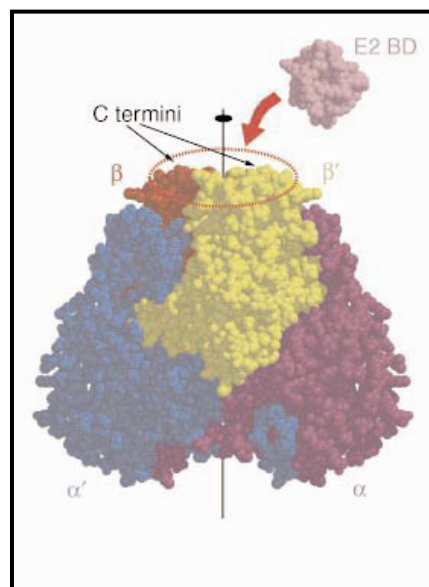


Abbildung 18: Interaktion zwischen $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer E1 und der E2-Bindungsdomäne an der Spitze des Tetramers nahe des C-Terminus der β -Untereinheit. Rekombinate Proteine, die ein His-tag am C-Terminus aufweisen, sind zu dieser Bindung nicht fähig (Modifiziert aus Evarsson et al., 2000).

4.1.3 Mutationen im *DBT*-Gen

In der Literatur wurden 49 Typ II Mutationen beschrieben (Chuang et al., 2008). Die E2-Untereinheit umfasst drei Domänen, eine N-terminale lipoyl-tragende Domäne (Lipoyl-Bearing Domain; LBD), eine interne Untereinheiten-bindende Domäne (Subunit-Binding Domain; SBD) und eine C-terminale katalytische Kerndomäne (Core [Catalytic] Domain; CD). Da die humane E2-Untereinheit der BCKDH bisher noch

nicht röntgenkristallografisch dargestellt wurde, wird im Folgenden Bezug auf die bovine E2 CD-Kristallstruktur genommen (Kato et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Mutation dem DBT-Gen zugeordnet. Dies entspricht bei zwei von 17 Allelen etwa 10 % aller nachgewiesenen wahrscheinlich krankheitsverursachenden Nukleotidveränderungen. Die p.Met263Arg-Mutation wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben und wird nun im Folgenden diskutiert.

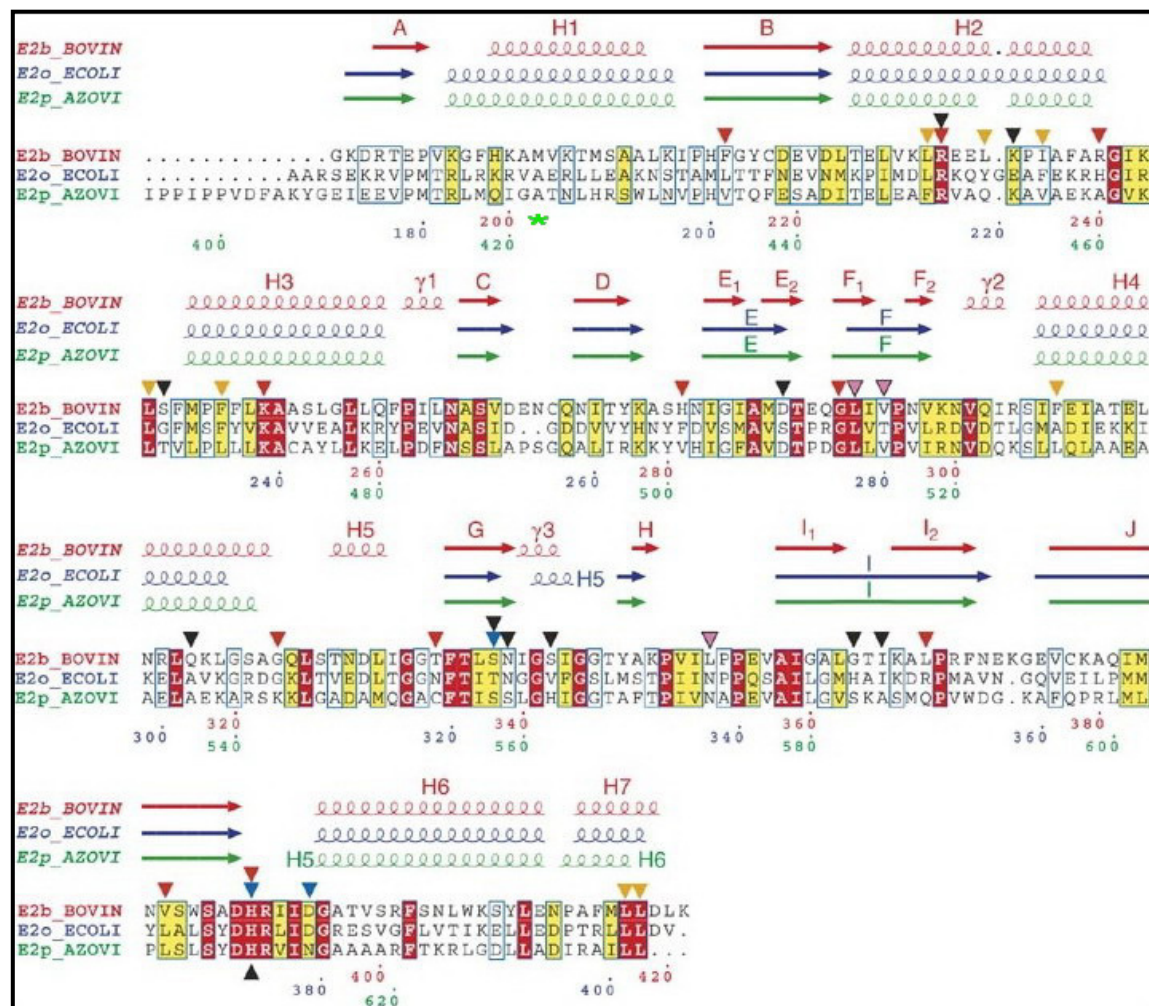


Abbildung 19: Vergleichende Darstellung der Proteinprimärsequenzen der bovinen E2b(CD)-Untereinheit (oberste Zeile), der E2o(CD) von *E.Coli* (mittlere Zeile) und E2p(CD) von *A.vinelandii* (untere Zeile). In roten Boxen dargestellte Aminosäuren sind in allen drei Sequenzen identisch, gelbe Boxen zeigen konservierte und farblose Boxen semi-konservierte Aminosäuren an. Sekundärstrukturelemente sind als Schleifen (α-Helix) und Pfeile (β-Faltblatt) dargestellt. An der Kofaktorbindung beteiligte Aminosäurereste sind mit schwarzen Dreiecken markiert. Blaue Dreiecke markieren Reste im aktiven Zentrum und gelbe die Aminosäurereste, die für die Trimer-Trimer Interaktion wichtig sind. Die lilafarbenen Dreiecke markieren „Pfortner“ der Dihydrolipoamid-bindenden Stelle. Aus der Literatur bekannte Mutationen sind mit roten Dreiecken angezeigt während die in dieser Arbeit durch eine Mutation betroffene Aminosäure mittels eines grünen Sterns markiert ist. (Modifiziert aus Kato et al., 2006).

p.Met263Arg

Der Austausch der großen, schwefelhaltigen Aminosäure Methionin (neutral, unpolare Seitenkette) gegen die noch größere, positiv geladene Aminosäure Arginin an Position 263 betrifft die Domäne des inneren katalytischen Kern der humanen E2-Untereinheit, die bisher noch nicht kristallografisch dargestellt wurde (Quental et al., 2008). Die homologe Aminosäure im bovinen Gen liegt auf der α -Helix 1, die an der Bildung des „Daches“ der Dihydrolipoamid Bindestelle beteiligt ist. Genauere Aussagen über die Auswirkungen der strukturellen Veränderungen dieses Tores, die der Verlust der Schwefelwasserstoffbrückenbildung und die jetzt zur Verfügung stehenden positiv geladenen Bindungskräfte verursachen, setzen weiterführende Kenntnisse über die humane E2-Struktur der BCKDH voraus. Da beide Patienten (Nr. 8 und 32) für die p.Met263Arg-Mutation homozygot sind und klinisch einen schweren, neonatalen Krankheitsverlauf im Sinne einer klassischen MSUD aufweisen, liegt die Vermutung einer schweren Beeinträchtigung des funktionellen Bereichs nahe. Im Gegensatz dazu wurde die an der gleichen Position liegende p.Met263Thr-Mutation in homozygoter Ausprägung als mit schwerer Variante der MSUD assoziiert beschrieben (Rodriguez-Pombo et al., 2006).

4.2 Geografische Zuordnung

Die Befragung der Eltern zur Herkunft mit anschließender geografischer Zuordnung der Mutationen ergab 19 verschiedene Orte/ Regionen, die in der ganzen Türkei verstreut liegen (siehe Abbildung 14 und 20). Die Mehrzahl der Familien stammt dabei aus Zentral- und Südost-Anatolien sowie der Schwarzmeerregion, was die Bevölkerungsstruktur und -dichte des Landes widerspiegelt. Aufgrund des im landesinternen Vergleich höchsten Vorkommens konsanguiner Ehen (bis zu 40 % in Südost-Anatolien und bis zu 30 % in Ostanatolien) würde man allerdings gerade in ostanatolischen Regionen häufigere Manifestationen hereditärer Stoffwechselerkrankungen wie der MSUD erwarten (Tunçbilek et al., 1994; Koc, 2008). Abgesehen von der zufälligen Auswahl der Proben in der Türkei muss der unterschiedliche Zugang der Bevölkerung zum Gesundheitssystem, der vor allem in den östlichen, oft ländlichen Regionen, sehr viel schlechter ist,

einer Mutation in bestimmten Regionen/ Populationen machen zu können, wären neben populationsspezifischen Abstammungsuntersuchungen mittels SNPs auch außerhalb der MSUD Gene die Sammlung weiterer Analysedaten aus DNA-Sequenzierungen von türkisch-stämmigen Patienten und ihre Herkunftsbefragung nötig.

4.3 Bedeutung der Molekulargenetik in der Pränataldiagnostik

Die Diagnostik der MSUD ist mittels Neugeborenencreening (Tandem-Massenspektrometrie), klinischer und biochemischer Parameter unkompliziert möglich. Daher spielen molekulargenetische Untersuchungen in der routinemäßigen primären Diagnostik keine entscheidende Rolle. Im Gegensatz dazu kann der molekulargenetische Nachweis krankheitsverursachender Mutationen in manchen Fällen von großer Bedeutung für die humangenetische Beratung betroffener Familien sein. Bei bekannter Mutation ist nicht nur die gezielte Untersuchung weiterer phänotypisch gesunder Familienmitglieder zur Detektion des Heterozygotenstatus und somit möglicher Überträger relevanter Mutationen möglich, sondern auch eine sichere Pränataldiagnostik. Besonders für Familien, in deren Stammbäumen aufgrund häufiger konsanguiner Ehen wie in der Türkei (Tunçbilek, 2001; Koç, 2008) bereits viele Betroffene vorkommen, ist die genetische Aufklärung im Sinne einer Pränataldiagnostik von großer Relevanz. Der fast ausschließliche Nachweis homozygoter Mutationen im betrachteten Patientenkollektiv in Verbindung mit Bestätigung der jeweiligen elterlichen Heterozygotie lässt eine noch höhere Rate konsanguiner Ehen als die durch die Eltern angegebene vermuten. Die Intention dieser Pränataldiagnostik kann in der Verhinderung der Geburt eines weiteren Kindes mit unsicherem Outcome, das als Ausdruck der Compliance (Korrelation der (Langzeit-) Leucinspiegel im Blut mit dem IQ) bei türkischen verglichen mit deutschen Patienten oftmals schlechter ist (Simon et al., 2006), bestehen und somit der zusätzlichen Belastung der Familie durch ein weiteres krankes Kind entgegenwirken. Die Kenntnis über Foundermutationen in bestimmten Populationen kann die molekulargenetische Pränataldiagnostik in Hinblick auf den Untersuchungsumfang vereinfachen (Edelmann et al., 2001; Silao et al., 2004). Derzeit sind über 25 verschiedene Mutationen in türkisch-stämmigen Patienten bekannt (Dursun et al., 2002; Henneke et al., 2003; Flaschker et al., 2007) und auch in dieser Arbeit konnte bei 32 betrachteten Patienten keine Häufung einer bestimmten Mutation innerhalb der Türkei gezeigt werden, so dass dies nur eine familien-individuelle Pränataldiagnostik zulässt.

4.4 Methodische Reflexion

Von den in dieser Arbeit untersuchten 15 MSUD-Patienten wurde bei 8 Patienten jeweils in beiden Allelen eines der drei sequenzierten Gene eine Mutation nachgewiesen. Bei einem Patienten wurde mit den angewendeten Methoden nur ein verändertes Allel identifiziert, bei weiteren 6 Patienten konnte in keinem der 12 möglichen Allele ein Mutationsereignis aufgedeckt werden. Als Ursachen für die nur 53 prozentige Aufklärungsquote mittels direkter DNA-Sequenzierung, die eine Sensitivität von nahezu 100 % aufweist (Nataraj et al., 1999), bleiben verschiedene Aspekte zu diskutieren:

- Patientenauswahl aus der Türkei

Nach genauer Betrachtung der im Verlauf gesammelten klinischen und biochemischen Patientendaten aus der Türkei erscheint die Diagnose der Ahornsirupkrankheit einer Patientin (Nr. 2) fraglich, was den fehlenden Mutationsnachweis im *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*-Gen erklären könnte. Bei einer Patientin (Nr. 9), die während der Neugeborenenperiode verstarb, waren keine weiteren klinischen Angaben zu eruieren, so dass auch hier die Diagnose nicht sicher erscheint. In zwei Fällen (Nr. 28 und AD) ist das Vorliegen einer klassischen Form der MSUD nicht gesichert. An dieser Stelle wäre eine genauere Erfassung des Krankheitsverlaufes des Patientenkollektivs nötig, um nur diese Patienten in die molekulargenetische Untersuchung aufzunehmen, deren Diagnose retrospektiv zuverlässig nachverfolgt werden kann.

- Nicht untersuchte Genabschnitte

Zu den hier nicht untersuchten Genabschnitten gehören die regulatorischen Promotorregionen der drei Gene (*BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*), die zwischen den kodierenden Exonen liegenden großen Intronbereiche und die für die regulatorischen Kinase und Phosphatase der BCKDH kodierenden Gene. Bisher wurden weder in der Promotorregion noch die Kinase betreffende krankheitsverursachende Mutationen beschrieben. Das Gen der Phosphatase wurde bislang nicht lokalisiert. Um Mutationen in Intronabschnitten und ihre Konsequenzen,

die den Spleißvorgang betreffen, besser zu erfassen, ist die Untersuchung der aus Vollblut isolierten mRNA geeignet. Dieses wurde aber auch auf Anforderung nicht zur Verfügung gestellt.

- Nicht erfasste Mutationen

Das Risiko des methodenbedingten Nicht-Detektierens von Mutationen mittels direkter DNA Sequenzierung ist in aller Regel gering, besonders im Vergleich zu verschiedenen anderen Screeningverfahren (Single Strand Conformation Polymorphism Analysis, SSCP; Temperature-Gradient Gel Electrophoresis, TGGE), die zur Mutationssuche eingesetzt werden (Petersen et al., 1994; Rosenbaum et Riesner, 1987). Somit erscheinen oben aufgeführte Aspekte bezüglich der Patientenauswahl und der nicht untersuchten Gene, eher geeignet die geringe Aufklärungsquote zu erklären. Auf die Validierung der Ergebnisse aus der genomischen DNA Sequenzierung mittels Einzelnukleotid-Polymorphismus-Methode (SNaPshot) sowie reverse Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde verzichtet, da sich der Nachweis mittels DNA Sequenzierung als zuverlässig herausgestellt hat (Flaschker, 2006)

5 Zusammenfassung

Die durch Menkes et al. 1954 erstmals beschriebene Ahornsirupkrankheit (engl. Maple Syrup Urine Disease, MSUD) ist mit einer weltweiten Inzidenz von 1:185.000 Neugeborenen eine seltene angeborene Stoffwechselerkrankung. Der MSUD liegen autosomal-rezessiv vererbte Defekte innerhalb des Multienzymkomplexes der verzweigtkettigen α -Ketosäuren-Dehydrogenase (branched-chain α -ketoacid dehydrogenase, BCKDH) zugrunde, so dass in Ländern mit einem hohen Anteil konsanguiner Eheschließungen diese Inzidenzraten weit höher liegen (in der Türkei ca. 1:50.000 Neugeborene). Die Aktivitätsminderung der BCKDH bewirkt eine deutliche Einschränkung oder fast vollständige Blockade des Abbaus der verzweigtkettigen Aminosäuren (branched-chain aminoacids, BCAA) Leucin, Valin und Isoleucin auf der Stufe ihrer korrespondierenden α -Ketosäuren (branched-chain α -ketoacids, BCKA) α -Ketoisocaproinsäure (KIC), α -Ketoisovaleriansäure (KIV) und α -Keto- β -Methylvaleriansäure (KMV). Diese entstehen nach reversibler Transaminierung im zweiten Schritt auf dem Abbauweg der aus Nahrungs- und Gewebsproteinen anfallenden BCAA. Infolge des gestörten Stoffwechselschritts kommt es zur Akkumulation dieser Metabolite und der endogen aus Isoleucin entstehenden, nicht proteinogenen Aminosäure L-Alloisoleucin. Bei allen Formen der MSUD ist Leucin dabei die am stärksten im Plasma erhöhte Aminosäure. Diese besitzt, gleichzeitig zusammen mit KIC die stärkste Neurotoxizität. Somit können temporär oder permanent stark erhöhte BCKA- und BCAA-Spiegel zu schwerwiegenden Schäden am zentralen Nervensystem führen.

Das 4×10^6 Dalton große Makromolekül der BCKDH befindet sich an der inneren Mitochondrienmembran aller Gewebe, wobei der Skelettmuskel, die Leber und die Nieren die zentralen Organe im oxidativen Abbau der BCAA sind. Der Multienzymkomplex besteht aus fünf katalytischen Untereinheiten: der E1-(Thiaminpyrophosphat-abhängige BCKA-Decarboxylase), E2-(Dihydrolipoyl-Transacylase) und E3-(Dihydrolipoyl-Dehydrogenase) Untereinheit, sowie einer aktivitätsregulierenden Kinase und Phosphatase. Während die E3-Untereinheit eine gemeinsame Komponente einer Enzymfamilie weiterer hochkonservierter α -Ketosäuren-Dehydrogenasen ist, zu der neben der BCKDH noch die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und die α -Ketoglutarat-

Dehydrogenase (KGDH) gehören, sind die E1- und E2-Untereinheiten spezifisch für die BCKDH.

Gemessen am Ausmaß des Enzymaktivitätsmangels sowie an weiteren klinischen und biochemischen Parametern werden verschiedene Schweregrade der MSUD unterschieden. Bei der klassischen (schwersten) Form, von der ca. 75 % aller Patienten betroffen sind, lässt sich eine nahezu vollständig fehlende Enzymaktivität (<2 % Restaktivität in Fibroblastenkulturen) nachweisen. In diesen Fällen erfolgt die Manifestation der Erkrankung in den ersten Lebenstagen. Eine Enzymaktivität der BCKDH von 2 bis 30 % der Norm ist charakteristisch bei den verschiedenen, leichter verlaufenden varianten Formen der MSUD. Das Spektrum der Varianten umfasst die intermediäre Form (schwere Variante), die bedingt durch langfristig unkontrolliert hohe BCAA und BCKA Plasmaspiegel klinisch meist ohne episodische metabolische Krisen aufgrund einer verzögerten psychomotorischen Entwicklung auffällt, die intermittierende Form (milde Variante), die sich durch akute metabolische Krisen während kataboler Stressphasen auszeichnet, sowie eine asymptotische Form und eine Thiamin-abhängige Variante.

Mit Aufnahme der MSUD ins Neugeborenencreening zur Erkennung angeborener metabolischer und endokriner Störungen im Jahr 2002 ist es mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie möglich, betroffene Neugeborene bereits ab dem 3. Lebenstag zu identifizieren. Eine sichere Differenzierung zwischen der klassischen und einer varianten MSUD ist mittels Neugeborenencreening zwar nicht möglich, dennoch können betroffene Neugeborene mit klassischen und varianten MSUD-Formen heute bereits präsymptomatisch oder mit erst leichten Symptomen erkannt werden und können so von einer frühen Therapie mit Vermeidung zu hoher Plasmaleucin-Spiegeln (<300 µmol/l) hinsichtlich des späteren Outcomes profitieren.

Enzymaktivitätsmessungen oder molekulargenetische Untersuchungen aus Chorionzotten im Sinne einer Pränataldiagnostik sind bei Risikoschwangerschaft mit bereits an MSUD erkrankten Kindern in der Familie ab der 8. Schwangerschaftswoche möglich. Die Kenntnis über Foundermutationen in bestimmten Populationen kann die molekulargenetische Prä-nataldiagnostik vereinfachen. Bisher konnte keine Foundermutation, außer einer Hypothetischen (p.Cys258Tyr- α) in der Bevölkerung von Çamlidere, im türkisch-stämmigen Patientenkollektiv nachgewiesen werden.

Um einen Überblick über das Mutationsspektrum in der Türkei zu erlangen wurden im Rahmen dieser Arbeit 15 türkisch-stämmige Patienten molekulargenetisch untersucht.

Zu 8 dieser analysierten Patienten mit jeweils 2 mutierten Allelen an einem Genlocus wurden ergänzend 24 Patienten mit türkischer Abstammung aus der Literatur entnommen, so dass hier ein 32 Patienten umfassendes Kollektiv in die Betrachtungen des Mutationsspektrums und dessen geografischer Zuordnung in diese Arbeit aufgenommen wurde.

Die in dieser Arbeit durchgeführten molekulargenetischen Analysen umfassen die Gene *BCKDHA*, *BCKDHB* und *DBT* der bereits beschriebenen Untereinheiten E1, zusammengesetzt aus E1 α und E1 β , sowie die E2-Untereinheit. Die möglichen Auswirkungen der gefundenen Mutationen auf die Sekundär-/ Tertiärstruktur dieser Untereinheiten des BCKDH-Multienzymkomplexes werden vor dem Hintergrund der röntgenkristallografische Strukturanalyse des humanen E1 Heterotetramers ($\alpha_2\beta_2$) von Ævarsson et al. aus dem Jahr 2000 und des bovinen E2 Homopolymers (α_{24}) von Kato et al. (2006) diskutiert.

Für die molekulargenetische Untersuchung wurde genomische DNA aus Vollblut der Patienten isoliert. Die Amplifikation der genomischen DNA wurde mittels PCR für alle 30 Exons der für die E1 α -, E1 β - und E2-Untereinheit kodierenden Gene durchgeführt. Durch automatisierte, elektrophoretische Datenanalyse wurden die 3 Gene *BCKDHA* (9 Exons), *BCKDHB* (10 Exons) und *DBT* (11 Exons) der 15 Patienten sequenziert. Nach Identifikation der Mutationen und bei fehlender Replizierbarkeit von Exons bei den Patienten wurde der entsprechende Sequenztyp der elterlichen Allele bestimmt.

Es werden je nach betroffener Untereinheit sechs molekulargenetische Formen der MSUD unterschieden. Liegt der genetische Defekt im *BCKDHA*-Gen entspricht dies dem Typ IA (MIM#608348). Es handelt sich um den Typ IB (MIM#248611) bei zugrundeliegender Mutation im *BCKDHB*-Gen., um den Typ II (MIM#248610) bei *DBT*-Gen Defekten und um den Typ III (MIM#238331) bei *DLD*-Gen Defekten. Die Typen IV und V sind für bislang noch nicht beschriebene Mutationen im *BCKDK*-Gen und im für die BCKDH-Phosphatase kodierenden Gen vorgesehen. Derzeit sind 50 Typ IA, 52 Typ IB und 49 Typ II Mutationen in der Literatur beschrieben.

Es wurden vier verschiedene Mutationen in 5 Allelen des *BCKDHA*-Gen in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, wovon zwei nonsense-Mutation (p.Gln69Stop und Cys258Stop) erstmalig beschrieben wurde. Ein Patient mit klassischer MSUD war „compound“-heterozygot für diese Mutationen. Die zwei anderen gefundenen Mutationen (IVS5-1 und p.Arg363Trp) sind bereits aus der Literatur bekannt. Alle gefundenen

Mutationen waren Punktmutationen. Sie sind über das ganze Gen verteilt, wobei eine Mutation im Intronbereich lokalisiert ist. Alle drei im *BCKDHA*-Gen nachgewiesenen SNPs sind bereits registriert (p.Pro39His als rs 34589432; p.Phe324Phe als re 284652; p.Leu 407Leu als re 4647).

In Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Mutationen in 10 Allelen dem *BCKDHB*-Gen zugeordnet. Drei dieser Mutationen (p.Ala91Val, p.Cys188Stop und p.Glu230Stop) sind neu. Während die beiden nonsense-Mutationen bei jeweils einem homozygoten Patienten mit einem klassischen Phänotyp verbunden waren, zeigten zwei für die p.Ala91Val-Mutation homozygote Patienten eine schwere Variante. Die beiden Mutationen p.Ser339Leu und p.Tyr383Stop wurden bereits beschrieben und waren übereinstimmend mit einer klassischen Form der MSUD assoziiert. SNPs und Intronmutationen wurden im *BCKDHB*-Gen nicht gefunden.

Eine Mutation in zwei Allelen war im *DBT*-Gen lokalisiert. Die p.Met263Arg-Mutation wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Der Patient, bei dem diese Mutation in homozygoter Ausprägung nachgewiesen wurde, wies klinisch einen bereits neonatale schweren Krankheitsverlauf auf. Die ebenfalls in zwei Allelen gefundene p.Gly384Ser-Mutation ist nicht krankheitsverursachend und als SNP rs 12021720 registriert.

In der Betrachtung des 32 nicht verwandte Patienten umfassenden Kollektivs kamen insgesamt 27 verschiedene wahrscheinlich krankheitsverursachende Mutationen vor. Von den insgesamt 64 mutierten Allelen war das *BCKDHA*-Gen zu 37 % (24 Allele) von einer Mutation betroffen, das *BCKDHB*-Gen zu 44 % (28 Allele) und das *DBT*-Gen zu 19 % (12 Allele). Neben 13 missense-Mutationen wurden 13 nonsense-Mutationen gefunden. Von diesen führen 9 zu einem vorzeitigen Stop-Kodon in den kodierenden cDNA Abschnitten. Vier waren intronisch genomische Mutationen, die zu einer Veränderung der Erkennungsregionen von Spleißstellen führen. In einem Falle fand sich eine auf der cDNA 78 bp Basenpaare umfassende Deletion verursacht durch eine Intronmutation im *DBT*-Gen. Trotz zweier dreifach und vier zweifach gefundener Mutationen umfasst das Mutationsspektrum alle drei Gene (*BCKDHA*, *BCKDHB* und *DBT*) ohne eine Häufung in bestimmten Genabschnitten.

Der geografischen Zuordnung der Mutationen liegt die Befragung der Eltern mittels Fragebogen zugrunde. Insgesamt kommen die Familien aus 19 verschiedenen Orten/Regionen, die in der ganzen Türkei verstreut liegen. Abgesehen von der p.Cys258Tyr-Mutation (Çamlidere) lässt sich bei Betrachtung der in der Türkei weitverteilten

Herkunftsorte/ -regionen einerseits und des heterogenen Mutationsspektrums andererseits sowie ihrer Verknüpfung, kein Cluster einer einzelnen Mutation erkennen.

Anhang A: Tabellen

A.1 Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des *BCKDHA*-Gens

Exon Nr.	PCR-Produkt-Länge (bp)	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Sense (3'-5')	Annealing-Temperatur (°C)
1	295	CAGATGGTGCTGGAGTTTGC	CCCTGAAGGATATGAAGGAAG	55
2	319	TGCTTCTGATGCAGGTGGTCTC	ACGTCTATCTGTGCCTCCAC	58
3	212	TGCCTGTCTCCTCTCTGGT	CTACCTGTGTTTGGGCCA	58
4	248	TGTCATTGCCCAGCATAA	TTCTTCCAGGAGCAGCATAG	55
5	297	CCACAGGGCTGAACTGTC	GTCCAGGCCTCAGCTCTT	58
6	339	GTGGGTCATGTGAGTGTGAA	ATCATCTCCTTCCCTCCC	55
7	269	CCTCGTGCATGTTCTTATC	ACAGCCACCGTAGCATCTT	55
8	306	ATCCTCCCTCCTGACCC	AGAGCTTGGGAAGGATTTGT	55
9	349	AGGAGGAAGCAGGGTCC	CCCAGTCAGCTCCCTCTAA	58

A.2 Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des *BCKDHB*-Gens

Exon Nr.	PCR-Produkt-Länge (bp)	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Sense (3'-5')	Annealing-Temperatur (°C)
1	260	CTGCATAGCCTGAGAATTCC	CTGGGACTGCCCCTCGG	58
2	295	CAGCAATTTGCATAATATCTTTC	TGTGGAGCTCAATGGTTAAC	55
3	338	AGAAGTTGAGAAACCTTGATCG	CCCATTGTATGGATGAATTCC	55
4	295	TCTCCATCCCATTATTAGTTTACT	TCAAGTATTGCCGCTACCCT	55
5	340	GAGGAAGAACGGAAGGAGAT	AAACAAACAGGATTCTTGGAA	55
6	322	GCAGCGAGTTTACTGGGATA	TTGGTATTAGTTTGTCTCAGG	55
7	249	TTTCTGTCTGTATTAGCGG	AAGTCTGGTCGTACTGATGCT	55
8	249	AATAGTGACATCAGCATTCAACT	GAAATTGTGAGCTATGTGAGCA	55
9	302	CGAGTTGTAACCTATTGGCATAC	ACATGCCAATTCCAGAAGAA	55
10	291	TTGCACTATTTCAATTTCTGTGAG	CCAAGACACAGCAATCATCA	55

A.3 Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des *DBT*-Gens

Exon Nr.	PCR-Produkt-Länge (bp)	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Sense (3'-5')	Annealing-Temperatur (°C)
1	133	CGTTTCCCATCTCCTGATAG	GTGATTGTCCGGAGTCATC	55
2	301	GAGATAAGCCGGTATGGTTG	GACTGTGTATTTCTAGCCGG	52
3	265	CCTCTGCCTGAGAACATTC	GGATAGTGGGAATCCATTT	52
4	329	CTCAGCATGGCATTACATCCT	TCTCTTTTGTTCATTGGGTCCC	55
5	201	TTCAACTGAAGTTAAGTTTACC	TCTGAGATTGTATAGGAAGTGTAC	55
6	353	ACTGTCAGTTGATCAAATTCC	GGCAATAGTTCATTTATTTGG	55
7	260	GGATGAAGAGATTGAGAATTTAA	CAAACAAGGCTTGAGTAGGACA	52
8	210	TTGTTTCAAATTCTCTATCCTTTCT	GGGCAAATGTGCTTGTAGAT	55
9	273	GATGGCAGTGAAGGTTGATC	GTCACCTGGCATTGTTC	52
10	197	GTCACCTGGCATTGTTC	GCAAATTCAGGGACTAAACA	52
11	314	GCTTGAGCTCTGAACAAGTG	TAGCTGTGCCAGCACATG	52

Anhang B: Patientenfragebogen

Classic MSUD: Mutational Analysis in Turkish Patients

Name _____
First Name _____
Date of Birth _____

Male [] Female []

Area and Town, where the Family comes from:

Father _____
Mother _____

Father's Name _____
Mother's Name _____

Consanguinity of the Parents (Degree?) _____

Does the Family want prenatal Diagnosis? Yes [] No []

Siblings Affected [] Not Affected []

Date of Diagnosis _____
Symptoms at Date of Diagnosis _____

Start of acute Treatment _____

(extracorporeal measures?)

First Day with Plasma Leucine below
13 mg/dl (Immol/l) _____
Start of Dietary Treatment _____

Neurological Symptoms (Age?) _____
IQ (Age?) _____

Details of Diet/ Leucine intake/kg
and Day _____

Other _____

please turn over

Are BCAA Values available? Yes [] No []

Frequency of Measurements

Please list (separately)

Valine

Leucine

Isoleucine

Blood Samples for Mutational Analysis (Date)

Patient

Father

Mother

For RNA _____

For DNA _____

Literaturverzeichnis

- Ævarsson, A., J.L. Chuang, R.M. Wynn, S. Turley, D.T. Chuang and W.G. Hol (2000): Crystal structure of human branched-chain α -ketoacid dehydrogenase and the molecular basis of multienzyme complex deficiency branched in maple syrup urine disease. *Structure Fold Des* 8:277-291.
- Brismar, J., A. Aqeel, G. Brismar, R. Coates, G. Gascon and P. Ozand (1990): Maple syrup urine disease: findings on CT and MR scans of the brain in 10 infants. *AJNR Am J Neuroradiol* 11:1219-1228.
- Chang, C.F., H.T. Chou, J.L. Chuang, D.T. Chuang and T.H. Huang (2002): Solution structure and dynamics of the lipoic acid-bearing domain of human mitochondrial branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *J Biol Chem* 277(18):15865-73.
- Chang, C.F., H.T. Chou, Y.J. Lin, S.J. Lee, J.L. Chuang, D.T. Chuang and T.H. Huang (2006): Structure of the subunit binding domain and dynamics of the di-domain region from the core of human branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex. *J Biol Chem* 281(38):28345-53.
- Chi, C.-S., C.-R. Tsai, L.-H. Chen, H.-F. Lee, B.S.-C. Mak, S.-H. Yang, T.-Y. Wang, S.-G. Shu and C.-H. Chen (2003): Maple syrup urine disease in the Austronesian aboriginal tribe Paiwan of Taiwan: A novel *DBT* (E2) gene 4.7kb founder deletion caused by a nonhomologous recombination between LINE-1 and Alu and the carrier-frequency determination. *Eur J Hum Genet* 11(12):931-936.
- Chinsky, J., M. Appel, S. Almashanu, P. Costeas, N. Ambulos, Jr. and R. Carmi (1998): A nonsense mutation (R242X) in the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1alpha subunit gene (BCKDHA) as a cause of maple syrup urine disease. Mutations in brief no. 160. Online. *Hum Mutat* 12:136.
- Chinsky, J.M. and P.A. Costeas (1993): Molecular cloning and analysis of the expression of the E1 beta subunit of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase in mice. *Biochim Biophys Acta* 1216:499-503.
- Chuang, J.L., R.P. Cox and D.T. Chuang (1993): Characterization of the promoter-regulatory region and structural organization of E1 alpha gene (BCKDHA) of human branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *J Biol Chem* 268:8309-8316.
- Chuang, J.L., R.P. Cox and D.T. Chuang (1996): Maple syrup urine disease: the E1beta gene of human branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex has 11 rather than 10 exons, and the 3' UTR in one of the two E1 beta mRNAs arises from intronic sequences. *Am J Hum Genet* 58:1373-1377.
- Chuang, J.L., C.R. Fisher, R.P. Cox and D.T. Chuang (1994): Molecular basis of maple syrup urine disease: novel mutations at the E1 alpha locus that impair E1(alpha 2 beta 2) assembly or decrease steady-state E1 alpha mRNA levels of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *Am J Hum Genet* 55:297-304.
- Chuang, J.L., R.M. Wynn, J.L. Song and D.T. Chuang (1999): GroEL/GroES-dependent reconstitution of $\alpha_2\beta_2$ tetramers of human mitochondrial branched

- chain α -ketoacid decarboxylase-obligatory interaction of chaperonins with an alpha beta dimeric intermediate. *J Biol Chem* 274:10395-10404.
- Chuang, J.L. and D.T. Chuang (2000): Diagnosis and Mutational Analysis of Maple Syrup Urine Disease Using Cell Cultures. *Methods Enzymol* 324:413-423.
- Chuang, D.T. and Shih, V.E. (2001): Maple Syrup Urine Disease (Branched-Chain Ketoaciduria). In: C.R. Scriver, A. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn, Vol II. McGraw-Hill, New York, Chap.87, pp 1971-2005.
- Chuang, J.L., R.M. Wynn and D.T. Chuang (2002): The C-terminal hinge region of lipoic acid-bearing domain of E2b is essential for domain interaction with branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase. *J Biol Chem* 277:36905-36908.
- Chuang, D.T.; R.M. Wynn and V.E. Sih (2008): Maple Syrup Urine Disease (Branched-Chain Ketoaciduria). In: C.R. Scriver, D. Valle, A. Beaudet, B. Vogelstein, K. Kinzler, S. Antonarakis, A. Ballabio (eds.) *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, OMMBID, www.ommbid.com, McGraw-Hill, New York, Chap. 87, revised November 2008.
- Crabb, D.W., L.L. Deaven, M. Luedemann, B. Zhang and R.A. Harris (1989): Assignment of the gene for the E1 alpha subunit of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase to chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 50:40-41.
- Dancis, J., J. Hutzler and M. Levitz (1960): Metabolism of the white blood cells in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 43:342-343.
- Dancis, J., J. Hutzler, S.E. Snyderman and R.P. Cox (1972): Enzyme activity in classical and variant forms of maple syrup urine disease. *J Pediatr* 81:312-320.
- Danner, D.J., E.T. Sewell and L.J. Elsas (1982): Clofibric acid and phenylpyruvic acid as biochemical probes for studying soluble bovine liver branched chain ketoacid dehydrogenase. *J Biol Chem* 257:659-662.
- Danner, D.J. and C.B. Doering (1998): Human mutations affecting branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase. *Front Biosci* 3:d517-524.
- Dariush, N., C.W. Fisher, R.P. Cox and D.T. Chuang (1991): Structure of the gene encoding the entire mature E1 alpha subunit of human branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *FEBS Lett* 284:34-38.
- DiGeorge, A.M., I. Rezvani, L.R. Garibaldi and M. Schwartz (1982): Prospective study of maple-syrup-urine disease for the first four days of life. *N Engl J Med* 307:1492-1495.
- Dursun A., M. Henneke, K. Özgül, J. Gartner, T. Coşkun, A. Tokatli, HS. Kalkanoglu, M. Demirkol, U. Wendel and I. Ozalp (2002): Maple syrup urine disease: mutation analysis in Turkish patients. *J Inherit Metab Dis* 25(2):89-97.
- Edelmann, L., M.P. Wasserstein, R. Kornreich, C. Sansaricq, S.E. Snyderman and G.A. Diaz (2001): Maple syrup urine disease: identification and carrier-frequency determination of a novel founder mutation in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 69(4):863-868.
- Ensenauer, R., J. Vockley, J.M. Willard, J.C. Huey, J.O. Sass, S.D. Edland, B.K. Burton, S.A. Berry, R. Santer, S. Grunert, H.G. Koch, I. Marquardt, P. Rinaldo, S. Hahn and D. Matern (2004): A common mutation is associated with a mild, po-

- tentially asymptomatic phenotype in patients with isovaleric acidemia diagnosed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 75:1136-1142.
- Esveldt I., I. Kulu Glasgow, J. Schoorl and H. van Solinge (1995): Migration motives, migration networks and partner choice among Turks and Moroccans in the Netherlands. *The Hague NIDI Report* no:43.
- Fekete, G., R. Plattner, D.W. Crabb, B. Zhang, R.A. Harris, N. Heerema and C.G. Palmer (1989): Localization of the human gene for the E1 alpha subunit of branched chain keto acid dehydrogenase (BCKDHA) to chromosome 19q13.1-q13.2. *Cytogenet Cell Genet* 50:236-237.
- Feigenbaum, A. S. and B.H. Robinson (1993): The structure of the human dihydrolipoamide dehydrogenase gene (DLD) and its upstream elements. *Genomics* 17:376-381.
- Fingerhut, R., E. Simon, E.M. Maier, J.B. Hennermann and U. Wendel (2008): Maple syrup urine disease: newborn screening fails to discriminate between classic and variant forms. *Clinical chemistry* 54(10):1739-41.
- Flaschker, N., (2006): Klinische, biochemische und molekulargenetische Charakterisierung von Patienten mit nicht-klassischen, varianten Formen der Ahornsirupkrankheit (MSUD). *Univ., Diss., 2006--Düsseldorf*. Vgl. <http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?idn=981573290>.:42 (Abruf am 29.04.2009)
- Flaschker, N., O. Feyen, S. Fend, E. Simon, P. Schadewaldt and U. Wendel (2007): Description of the mutations in 15 subjects with variant forms of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 30:903-909.
- Held, K.R., H.J. Sternowsky, S. Singh, C. Plettner and R. Grüttner (1976): Intermittierende verzweigt-kettige Ketoacidurie bei ketotischer Hypoglykämie: Untersuchung zur Lokalisation des biochemischen Defekts. *Mschr. Kinderklinik* 124:59-65.
- Heldt, K., B. Schwahn, I. Marquardt, M. Grotzke and U. Wendel (2005): Diagnosis of MSUD by newborn screening allows early intervention without extraneous detoxification. *Molecular Genetics and Metabolism* 84:313-316.
- Henneke, M., N. Flaschker, C. Helbling, M. Mueller, P. Schadewaldt, J. Gartner and U. Wendel (2003): Identification of twelve novel mutations in patients with classic and variant forms of maple syrup urine disease. *Hum Mutat* 22:417.
- Herring, W.J., S. Litwer, J.L. Weber and D.J. Danner (1991): Molecular genetic basis of maple syrup urine disease in a family with two defective alleles for branched chain acyltransferase and localization of the gene to human chromosome 1. *Am J Hum Genet* 48:342-350.
- Hilliges, C., D. Awiszus and U. Wendel (1993): Intellectual performance of children with maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 152:144-147.
- Homanics, G.E., K. Skvorak, C. Ferguson, S. Watkin and H.S. Paul (2006): Production and characterization of murine models of classic and intermediate maple syrup urine disease. *BMC Med Genet* 7:33.
- Hu, C.W., K.S. Lau, T.A. Griffin, J.L. Chuang, C.W. Fisher, R.P. Cox and D.T. Chuang (1988): Isolation and sequencing of a cDNA encoding the decarboxylase (E1)alpha precursor of bovine branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase

- complex. Expression of E1 alpha mRNA and subunit in maple-syrup-urine-disease and 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 263:9007-9014.
- Jouvet P., F. Poggi, D. Rabier, J.L. Michel, P. Hubert, M. Sposito, J.M. Saudubray and N.K. Man (1997): Continuous venovenous haemodiafiltration in the acute phase of neonatal maple syrup urine disease. *J. Inherit Metab Dis* 20(4):463-472.
- Kaplan, P., A. Mazur, M. Field, J.A. Berlin, G.T. Berry, R. Heidenreich, M. Yudkoff and S. Segal (1991): Intellectual outcome in children with maple syrup urine disease. *J Pediatr* 119:46-50.
- Kaplan, P., A. Mazur and R. Smith (1997) Transplantation for maple syrup urine disease (MSUD) and methylmalonic acidopathy (MMA). *J Inherit Metab Dis* 20:37.
- Kato, M., R.M. Wynn, J.L. Chuang, C.A. Brautigam, M. Custorio and D.T. Chuang (2006): A synchronized substrate-gating mechanism revealed by cubic-core structure of the bovine branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex. *EMBO J* 25:5983.
- Koç, I. (2008): Prevalence and sociodemographic correlates of consanguineous marriages in Turkey. *Journal of Biosocial Science* 40:137-148.
- Koyata H, Cox RP, Chuang DT (1993) Stable correction of maple syrup urine disease in cells from a Mennonite patient by retroviral-mediated gene transfer. *Biochem J* 295: 635-9.
- Korein, J., C. Sansaricq, M. Kalmijn, J. Honig and B. Lange (1994): Maple syrup urine disease: clinical, EEG, and plasma amino acid correlations with a theoretical mechanism of acute neurotoxicity. *Int J Neurosci* 79:21-45.
- Langenbeck U. (1984): Pathobiochemical and Pathophysiologic Analysis of MSUD Phenotype. Branched Chain Amino and Ketoacids in Health and Disease, pp. 315-334.
- Lau, K.S., R.L. Eddy, T.B. Shows, C.W. Fisher, D.T. Chuang and R.P. Cox (1991): Localization of the dihydrolipoamide branched-chain transacylase gene (DBT) of the human branched-chain keto acid dehydrogenase complex to chromosome 1. *Cytogenet Cell Genet* 56:33-35.
- McKean, M.C., K.A. Winkeler and D.J. Danner (1992): Nucleotide sequence of the 5' end including the initiation codon of cDNA for the E1 alpha subunit of the human branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex. *Biochim Biophys Acta* 1171:109-112.
- McKusick, V.A. (1995): Reviews in molecular medicine. *Medicine (Baltimore)* 74:301-304.
- Marshall, L., A. DiGeorge (1981): Maple syrup urine disease in the Old Order Mennonites. *Am J Hum Genet Suppl* 33:139A.
- Menkes, J.H., P.L. Hurst and J.M. Craig (1954): A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* 14:462-467.
- Menkes, J. H. (1959): Maple syrup urine disease: isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics* 23: 348-353.
- Metz, H.C. (ed) (1995): *Turkey: A Country Study*. GPO for the Library of Congress, Washington. URL: <http://countrystudies.us/turkey/51.htm> (Abruf 29.04.2009).

- Mitsubuchi, H., Y. Nobukuni, F. Endo and I. Matsuda (1991): Structural organization and chromosomal localization of the gene for the E1 beta subunit of human branched chain alpha-keto acid dehydrogenase. *J Biol Chem* 266:14686-14691.
- Mitsubuchi, H., I. Matsuda, Y. Nobukuni, R. Heidenreich, Y. Indo, F. Endo, J. Mallee and S. Segal (1992): Gene analysis of Mennonite maple syrup urine disease kindred using primer-specified restriction map modification. *J Inherit Metab Dis* 15:181-7.
- Morton, D.H., D.L. Robinson, K.A. Strauss, E.G. Pufferberger and R.I. Kelley (2002): Diagnosis and treatment of maple syrup disease: A study of 36 patients. *Pediatrics* 109(6):999-1008.
- Mueller GM, McKenzie LR, Homanics GE, Watkins SC, Robbins PD, Paul HS (1995): Complementation of defective leucine decarboxylation in fibroblasts from a maple syrup urine disease patient by retrovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2: 461-8.
- Nataraj, A.J., I. Olivos-Glander, N. Kusakawa and W.E. Highsmith, Jr. (1999): Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis* 20:1177-1185.
- Nellis, M.M and D.J. Danner (2001): Gene preference in maple syrup urine disease. *Am J Hum Genet* 68(1):232-237.
- Nellis, M.M., A. Kasinski, M. Carlson, R. Allen, A.M. Schaefer, E.M. Schwartz and D.J. Danner (2003): Relationship of causative genetic mutation in maple syrup urine disease with their clinical expression. *Molecular genetics and metabolism* 80(1-2):189-95.
- Nobukuni, Y., H. Mitsubuchi, F. Endo and I. Matsuda (1989): Complete primary structure of the transacylase (E2b) subunit of the human branched chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161:1035-1041.
- Nobukuni, Y., H. Mitsubuchi, F. Endo, I. Akaboshi, J. Asaka and I. Matsuda (1990): Maple syrup urine disease: complete primary structure of the E1-beta subunit of human branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex deduced from the nucleotide sequence and a gene analysis of patients with this disease. *J. Clin. Invest.* 86:242-247.
- Nobukuni, Y., H. Mitsubuchi, Y. Hayashida, K. Ohta, Y. Indo, Y. Ichiba, F. Endo and I. Matsuda (1993): Heterogeneity of mutations in maple syrup urine disease (MSUD): screening and identification of affected E1 alpha and E1 beta subunits of the branched-chain alpha-keto-acid dehydrogenase multienzyme complex. *Biochim Biophys Acta* 1225:64-70.
- Ono, K., M. Hakozaiki, T. Suzuki, T. Mori, H. Hata and H. Kochi (2001): cDNA cloning of the chicken branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. *Eur J Biochem* 268:727-736.
- Paxton, R., M. Kuntz and R.A. Harris (1986): Phosphorylation sites and inactivation of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase isolated from rat heart, bovine kidney, and rabbit liver, kidney, heart, brain, and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 244:187-201.
- Peinemann, F. and D.J. Danner (1994): Maple Sirup Urine Disease 1954 to 1993. *J Inherit Metab Dis* 17:3-15.

- Perham, R.N. (2000): Swinging Arms and Swinging Domains in Multifunctional Enzymes: Catalytic Machines for Multistep Reaktionen. *Annu. Rev. Biochem* 69:961-1004.
- Petersen, I., H. Ohgaki, B. Ludeke and P. Kleihues (1994): Direct DNA sequencing following SSCP analysis. *Analytical Biochemistry* 218:478-479.
- Podebrad, F., M. Heil, S. Reichert, A. Mosandl, A.C. Sewell and H. Bohles (1999): 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2[5H]-furanone (sotolone)--the odour of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 22:107-114.
- Pons, G., C. Raefsky-Estrin, D.J. Carothers, R.A. Pepin, A.A. Javed, B.W. Jesse, M.K. Ganapathi, D. Samols and M.S. Patel (1988): Cloning and cDNA sequence of the dihydrolipoamide dehydrogenase component of human alpha-ketoacid dehydrogenase complexes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85:1422-1426.
- Quental, S., S. Macedo-Ribeiro, R. Matos, L.Vilarinho, E. Martins, E.L. Teles, E. Rodrigues, L. Diogo, P. Garcia, F. Eusebio, A. Gaspar, S. Sequeira, F. Furtado, I. Lanca, A. Amorim and M.J. Prata (2008): Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. *Mol Genet Metab* 94:148-156.
- Reed, L.J., Z. Damuni and M.L. Merryfield (1985): Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation-dephosphorylation. *Curr Top Cell Regul* 27:41-49.
- Rodriguez-Pombo, P, Navarrete, R, Merinero, B, , Gomey-Puertas, P and Ugarte, M (2006): Mutational spectrum of maple syrup urine disease in Spain. Mutation in brief no.899. *Online Hum Mutat* 27:715.
- Rosenbaum, V. and D. Riesner (1987): Temperature-gradient gel electrophoresis. Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys. Chem* 26:235-246.
- Savas,B.S., Ö.Karahan and R.Ö. Saka (2002): Introduction and historical backround. In: S. Thomson and E. Mossialos (eds) *Health care system in Transition*, Turkey, pp 1-21. URL: <http://www.euro.who.int/document/e79838.pdf> (Abruf 29.04.2009).
- Schadewaldt, P., K. Beck and U. Wendel (1989): Analysis of maple syrup urine disease in cell culture: use of substrates. *Clin Chim Acta* 184:47-56.
- Schadewaldt, P., A. Bodner-Leidecker, H.W. Hammen and U. Wendel (1999): Significance of L-alloisoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease. *Clin Chem* 45(10):1734-1740.
- Schadewaldt, P., A. Bodner-Leidecker, H.W. Hammen and U. Wendel (2001): Whole-body L-leucine oxidation in patients with variant form of maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 49(5):627-635.
- Schadewaldt, P., C. Dalle-Feste, U. Langenbeck and U. Wendel (1991): Oral L-alloisoleucine loading studies in healthy subjects and in patients with maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 30:430-434.
- Scherer, S.W., G. Otulakowski, B.H. Robinson and L.C. Tsui (1991): Localization of the human dihydrolipoamide dehydrogenase gene (DLD) to 7q31-q32. *Cytogenet Cell Genet* 56:176-7.

- Schulman, J.D., T.J. Lustberg, J.L. Kennedy, M. Museles and J.E. Seegmiller (1970): A new variant of maple syrup urine disease (branched chain ketoaciduria). Clinical and biochemical evaluation. *Am J Med* 49:118-124.
- Scriber, C.R., S. Mackenzie, C.L. Clow and E. Delvin (1971): Thiamine-responsive maple-syrup-urine disease. *Lancet* 1:310-312.
- Silao, C.L., D.C. Padilla and M. Matsuo (2004): A novel deletion creating a new terminal exon of the dihydrolipoyl transacylase gene is a founder mutation of Filipino maple syrup urine disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 81(2):100-104.
- Simon, E., U. Wendel and P. Schadewaldt (2005): Maple syrup urine disease-treatment and outcome in patients of Turkish descent in Germany. *Turk J Pediatr* 47:8-13.
- Simon, E., N. Flaschker, P. Schadewaldt, U. Langenbeck and U. Wendel (2006): Variant maple syrup urine disease (MSUD)-The entire spectrum. *J Inherit Metab Dis* 29:716-724.
- Simon, E., R. Fingerhut, J. Baumkötter, V. Konstantopoulou, R. Ratschmann and U. Wendel (2006): Maple syrup urine disease: favourable effect of early diagnosis by newborn screening on the neonatal course of the disease. *J Inherit Metab Dis* 29(4):532-537.
- Skaper, S.D., D. P. Molden and J. E. Seegmiller (1975): Maple syrup urine disease: Branched-chain amino acid concentrations and metabolism in cultured human lymphoblasts. *Biochemical Genetics* 14:527-539.
- Snyderman, S.E. (1988): Treatment outcome of maple syrup urine disease. *Acta Paediatr Jpn* 30:417-424.
- Snyderman, S.E., P.M. Norton, E. Roitman and L.E. Holt, Jr. (1964): Maple Syrup Urine Disease, with Particular Reference to Dietotherapy. *Pediatrics* 34:454-472.
- Strauss, K.A., G.V. Mazariegos, R. Sindhi, R. Squires, D.N. Finegold, G. Vockley, D.L. Robinson, C. Hendrickson, M. Virji, L. Cropcho, E.G. Puffenberger, W. McGhee, L.M. Seward and D.H. Morton (2006): Elective liver transplantation for the treatment of classical maple syrup urine disease. *Am J Transplant* 6:557.
- Suryawan, A., J.W. Hawes, R.A. Harris, Y. Shimomura, A.E. Jenkins and S.M. Hutson (1998): A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr* 68:72-81.
- Tunçbilek, E. and I. Koç (1994): Consanguineous marriage in Turkey and its impact on fertility and mortality. *Annals of Human Genetics* 58:321-329.
- Tunçbilek, E. (2001): Clinical outcomes of consanguineous marriages in Turkey. *Turk J Pediatr* 43:277-279.
- Wendel, U., G. Gamm and U. Claussen (1981): Maple syrup urine disease: alpha-ketoisocaproate decarboxylation activity in different types of cultured amniotic fluid cells. *Prenat Diagn* 1:235-240.
- Wendel, U., U. Langenbeck, I. Lombeck and H.J. Bremer (1982): Maple syrup urine disease--therapeutic use of insulin in catabolic states. *Eur J Pediatr* 139:172-175.
- Wendel, U., U. Langenbeck and J.W. Seakins (1989): Interrelation between the metabolism of L-isoleucine and L-allo-isoleucine in patients with maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 25:11-14.

- Westall, R.G. (1955): The amino acids and other ampholytes of urine. 3. Unidentified substances excreted in normal human urine. *Biochem J* 60:247-255.
- Westall, R. G., J. Dancis and S. Miller (1957): Maple syrup urine disease. *Am. J. Dis. Child* 94: 571-572.
- Williamson, J.R., E. Walajtys-Rode and K.E. Coll (1979): Effects of branched chain alpha-ketoacids on the metabolism of isolated rat liver cells. I. Regulation of branched chain alpha-ketoacid metabolism. *J Biol Chem* 254:11511-11520.
- Wynn, R.M., J.R. Davie, J.L. Chuang, C.D. Cote and D.T. Chuang (1998): Impaired assembly of E1 decarboxylase of the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in type IA maple syrup urine disease. *J. Biol. Chem.* 273:13110-13118.
- Wynn, R.M., J.L. Chuang, C. Sansaricq, H. Mandel, and D.T. Chuang (2001): Biochemical Basis of Type IB (E1 β) Mutations in Maple Syrup Urine Disease. A relevant allele in patients from the Druze kindred in Israel. *J Biol Chem* 276(39):36550-36556.
- Yeaman, S.J. (1989): The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem J* 257:625-32.
- Yudkoff, M., Y. Daikhin, D. Nelson, I. Nissim and M. Erecinska (1996): Neuronal metabolism of branched-chain amino acids: Flux through the aminotransferase pathway in synaptosomes. *Journal of neurochemistry* 66:2136-2145.
- Zhang, B., P.J. Healy, Y. Zhao, D.W. Crabb and R.A. Harris (1990): Premature translation termination of the pre-E1 alpha subunit of the branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase as a cause of maple syrup urine disease in Polled Hereford calves. *J Biol Chem* 265:2425-2427.
- Zhang, B., M.J. Kuntz, G.W. Goodwin, H.J. Edenberg, D.W. Crabb and R.A. Harris (1989): cDNA cloning of the E1 alpha subunit of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase and elucidation of a molecular basis for maple syrup urine disease. *Ann N Y Acad Sci* 573:130-136.
- Zhao, Y., M.J. Kuntz, R.A. Harris and D.W. Crabb (1992): Molecular cloning of the E1 beta subunit of the rat branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase. *Biochem Biophys Acta* 1132:207-210.
- Zneimer, S.M., K.S. Lau, R.L. Eddy, T.B. Shows, J.L. Chuang, D.T. Chuang and R.P. Cox (1991): Regional assignment of two genes of the human branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex: the E1 beta gene (BCKDHB) to chromosome 6p21-22 and the E2 gene (DBT) to chromosome 1p31. *Genomics* 10:740-747.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Kerstin Stefanie Gorzelany	Geburtsdatum/-ort	22.11.1982/ Duisburg
Anschrift	Wiesfurthstraße 114a 47506 Neukirchen-Vluyn	Familienstand	Ledig
		Staatsangehörigkeit	Deutsch

Hochschulstudium / Schulausbildung

10/2005-01/2010	Universitätsklinikum Düsseldorf, Pädiatrie , Düsseldorf, Deutschland Promotion in der Stoffwechselabteilung der Kinderklinik; Prof. U. Wendel
10/2002-12/2008	Heinrich-Heine-Universität , Düsseldorf, Deutschland Studium der Humanmedizin
09/2004	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
08/1993-06/2002	Julius-Stursberg Gymnasium , Neukirchen-Vluyn, Deutschland Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Praktische Erfahrungen

Ab 05/2009	Assistenzärztin Chirurgie, GZO Spital, Wetzikon, Schweiz
03/2008-07/2008	Praktisches Jahr, <i>Dermatologie</i> , Katholisches Klinikum Duisburg , St.Barbara Hospital, Deutschland
12/2007-03/2008	Praktisches Jahr, <i>Innere Medizin</i> , Katholisches Klinikum Duisburg , St.Johannes Hospital, Deutschland
08/2007-12/2007	Praktisches Jahr, <i>Chirurgie</i> , GZO-Spital Wetzikon , Wetzikon, Schweiz
09/2006	Famulatur, <i>Dermatologie</i> , Universitätsklinikum Düsseldorf , Düsseldorf, Deutschland
08/2006	Famulatur, <i>Innere Medizin / Kardiologie</i> , Bethanienkrankenhaus Moers , Moers, Deutschland
03/2006	Famulatur, <i>Gynäkologie</i> , Bethesda Krankenhaus Duisburg , Duisburg, Deutschland
09/2005	Famulatur, <i>Orthopädie</i> , Praxis Dr. med. M. Zadeh , Neukirchen-Vluyn, Deutschland

Düsseldorf, 01/2010

Veröffentlichungen

- K Gorzelany, A Dursun, T Coşkun, SH Kalkanoğlu-Sivri, GF Gökçay, M Demirkol, O Feyen and U Wendel
-Molecular genetics of maple syrup urine disease in the Turkish population-
Turkish Journal of Pediatrics 2009 Apr. Vol 51 pp97-102

- K Gorzelany, A Dursun, T Coşkun, G F Gökçay, M Demirkol and U Wendel
-Molecular genetics of maple syrup urine disease in the Turkish patients-
Poster Presentation SSIEM Annual Symposium 2007
Journal of Inherited Metabolic Diseases 2007 Aug. Vol 30 (Supp 1) p47

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt zu allererst Herrn Prof. Dr. Wendel für die Bereitstellung des interessanten Themas, für das entgegengebrachte Vertrauen, für die motivierende Unterstützung und kontinuierliche Betreuung mit stetiger Diskussionsbereitschaft sowie für die zeitnahe Durchsicht des Manuskripts.

Frau Prof. Dr. Royer-Pokora, Institut für Humangenetik und Anthropologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, danke ich für die freundliche Übernahme des Ko-Referates.

Ebenso möchte ich mich bei Martina Müller nicht nur für ihre praktische Hilfe bei der Laborarbeit sondern auch für die unendliche Geduld und stete Bereitschaft Fragen zu beantworten sehr herzlich bedanken. Ihre einzigartige Motivation und Lebensfreude haben besonders in schwierigen Phasen der Arbeit immer wieder meinen Ehrgeiz zur Fertigstellung dieser Arbeit geweckt.

Philipp Lenz danke ich für die unermüdliche außerfachliche Motivation besonders während der letzten Phasen dieser Arbeit und für die Zeit und Geduld, die in Korrekturlesen und Formatierungshilfen geflossen sind. Weiterhin danke ich allen fleißigen Helfern, für die die Buchstaben A, T, G und C eine ganz neue Bedeutung bekommen haben, und die mir in Formatierungsfragen jederzeit hilfreich zur Seite standen. Ihre Geduld und moralische Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein Dank gilt BB, DH, MH, TG, TK und VM.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Laborkollegin und Freundin Sarah Fend für unendlich viele gemeinsame Stunden der Laborarbeit, die durch uneingeschränkte gegenseitige Unterstützung und Hilfestellung nur halb so lang erschienen. Ohne sie wäre ich vermutlich manches Mal verzweifelt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all meinen Verwandten und Freunden bedanken, die mich in den Jahren der Erstellung der Dissertation vor allem emotional unterstützen und somit zum Gelingen beigetragen haben. Mein besonderer Dank gebührt jedoch meinen Eltern. Sie haben mir meinen beruflichen Weg bis zur Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Molekulargenetische Charakterisierung türkisch-stämmiger Patienten mit Ahornsirupkrankheit (MSUD) und geografische Verteilung der Mutationssequenzen in der Türkei

Von Kerstin Gorzelany

Der Stoffwechselstörung Ahornsirupkrankheit (MSUD) liegen unterschiedliche autosomal rezessiv vererbte Defekte in jeweils einer der drei Untereinheiten (E1 α , E1 β , E2) des Multienzymkomplexes der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase (BCKDH) zugrunde. Die Aktivitätsminderung der BCKDH bewirkt eine deutliche Einschränkung (variante MSUD) oder eine nahezu vollständige Blockade (klassische MSUD) des Abbaus der verzweigtkettigen Aminosäuren. Die drei Untereinheiten werden von den Genen *BCKDHA*, *BCKDHB* und *DBT* kodiert. Aufgrund eines hohen Anteils konsanguiner Eheschließungen in der Türkei gehört die MSUD mit einer geschätzten Inzidenz von 1: 50.000 Neugeborenen dort zu einer sehr häufigen Stoffwechselstörung.

Zur Erlangung eines Überblicks über das Mutationsspektrum bei der MSUD in der Türkei wurden 15 türkisch-stämmige Patienten mit MSUD molekulargenetisch durch Sequenzierung der drei Gene *BCKDHA* (9 Exons), *BCKDHB* (10 Exons) und *DBT* (11 Exons) untersucht und die möglichen Auswirkungen der gefundenen Mutationen auf die Sekundär-/ Tertiärstruktur der Untereinheiten des BCKDH-Multienzymkomplexes diskutiert. Bei 8 Patienten lagen jeweils 2 mutierte Allele an einem Genlocus vor. In den insgesamt 16 Allelen wurden 9 Mutationen gefunden, von denen 6 bisher noch nicht beschrieben waren. Außerdem wurden in *BCKDHA* und *DBT* die schon registrierten SNP's gefunden. Zu den 8 Patienten wurden ergänzend die Angaben zu den Mutationen von 24 Patienten mit türkischer Abstammung aus der (im Wesentlichen aus Düsseldorf stammenden) Literatur entnommen und für das 32 Patienten umfassende Kollektiv wurde die geografische Verteilung des Mutationsspektrums innerhalb der Türkei ermittelt. Bei den 32 nicht verwandten Patienten kamen insgesamt 27 verschiedene wahrscheinlich krankheitsverursachende Mutationen vor. Von den insgesamt 64 mutierten Allelen war das *BCKDHA*-Gen zu 37 % (24 Allele) von einer Mutation betroffen, das *BCKDHB*-Gen zu 44 % (28 Allele) und das *DBT*-Gen zu 19 % (12 Allele). Dieses Verteilungsmuster der drei bei der MSUD betroffenen Gene steht mit der weltweiten Verteilung in guter Übereinstimmung. Die hohe Rate von homozygoten Mutationen spiegelt die hohe Konsanguinitätsrate der Ehen in der Türkei wieder. Trotz zwei dreifach und vier zweifach gefundener Mutationen umfasst das Mutationsspektrum alle drei Gene ohne eine Häufung in bestimmten Genabschnitten. Der geografischen Zuordnung der Mutationen liegt die Befragung der Eltern mittels Fragebogen zugrunde. Insgesamt kommen die Familien aus 19 verschiedenen Orten/ Regionen, die in der ganzen Türkei verstreut liegen. Abgesehen von der schon früher beschriebenen p.Cys258Tyr-Mutation (Çamlidere) lässt sich kein Cluster einer einzelnen Mutation erkennen.

Gez: Univ.-Prof.. Dr. med. Udo Wendel

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht. Diese Dissertation ist nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden.

Ort, Datum

Unterschrift