

# Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren bei Ahornsirupkrankheit

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Annette Bodner-Leidecker

aus Hilden

Düsseldorf

2000

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent : Prof. Dr. rer. nat. P. Schadewaldt

Koreferent : Prof. Dr. rer.nat. M.K. Grieshaber

Tag der mündlichen Prüfung : 15. Juni 2000

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Teil I</b>	
<b>Einführung</b>	
<b>Kapitel 1</b>	
Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren und Ahornsirupkrankheit	3
<b>Teil II</b>	
<b>Katabolismus verzweigtkettiger L-Aminosäuren in vivo bei Ahornsirupkrankheit</b>	
<b>Kapitel 2</b>	
Der [ <sup>13</sup> C]Leucin-Bolustest zur Bestimmung der L-Leucin-Oxidation bei klassischer Ahornsirupkrankheit	19
<b>Kapitel 3</b>	
Ganzkörper-L-Leucinoxidation bei Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit	55
<b>Kapitel 4</b>	
Auswirkungen einer Lebertransplantation auf den Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren bei Ahornsirupkrankheit	89
<b>Teil III</b>	
<b>Der metabolische Fluß durch den verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex in situ</b>	
<b>Kapitel 5</b>	
Ganzkörper-Oxidation verzweigtkettiger L-Aminosäuren bei gesunden Erwachsenen	117
<b>Kapitel 6</b>	
Wirkungen verzweigtkettiger Substrate auf den metabolischen Fluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in situ	129

## **Teil IV**

### **Geradkettige Analoga als Alternativ-Substrate zur Untersuchung des metabolischen Flußes durch den verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex**

#### **Kapitel 7**

Übersicht über die bisherigen Befunde zum Stoffwechsel von Nor-Leucin  
und Nor-Valin bei Mammalia 157

#### **Kapitel 8**

Transaminierung und oxidative Decarboxylierung der Nor-Analoga  
verzweigt-kettiger L-Aminosäuren in humanen Hautfibroblasten 169

## **Teil V**

### **L-Alloisoleucin**

#### **Kapitel 9**

Zum Mechanismus der Bildung von L-Alloisoleucin in vivo 189

#### **Kapitel 10**

L-Alloisoleucin als pathognomonischer Parameter  
der Ahornsirupkrankheit 213

## **Teil VI**

### **Auswertung von [<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustests**

#### **Kapitel 11**

Modellierung des L-Leucin-Katabolismus mittels Kompartiment-Analyse 231

## **Teil VII**

### **Synopsis**

#### **Kapitel 12**

Zusammenfassung der Befunde zum Stoffwechsel  
verzweigt-kettiger L-Aminosäuren 249

### **Literatur**

257

# Teil I

## Einführung

Die Grundzüge des Stoffwechsels verzweigtkettiger L-Aminosäuren unter besonderer Berücksichtigung der für Ahornsirupkrankheit relevanten Stoffwechselschritte werden beschrieben und die wesentlichen Aspekte der Ahornsirupkrankheit dargestellt.

---



# 1 Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren und Ahornsirupkrankheit

## 1.1 Katabolismus verzweigtkettiger L-Aminosäuren

Die drei verzweigtkettigen L-Aminosäuren L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin machen etwa 40 % der für den Menschen essentiellen Aminosäuren aus (Abb.1). Diese L-Aminosäuren werden hauptsächlich für die Proteinsynthese genutzt. In Abhängigkeit vom (patho)physiologischen Zustand werden variable Mengen oxidativ abgebaut und dienen somit zur Energiegewinnung (*Harper et al., 1984; Chuang & Shih, 1995*). Darüberhinaus haben die verzweigtkettigen L-Aminosäuren und ihre abgeleiteten 2-Oxosäuren für den Stoffwechsel des gesamten Organismus wichtige regulatorische Funktionen (Übersicht bei *Harper et al., 1984*). So kann z. B. Leucin die Proteinsynthese steigern (*Buse & Reid, 1975; Hong & Layman, 1984*) und seine 2-Oxosäure, 4-Methyl-2-oxopentanoat, die Proteolyse hemmen (*Lundholm et al., 1981; Pöso et al., 1982; Tischler et al., 1982; Mitch & Clark, 1984; Nair et al., 1992*). Ferner konnte gezeigt werden, daß sowohl Leucin als auch die korrespondierende 2-Oxosäure die pankreatische Ausschüttung von Insulin und Somatostatin stimulieren (*Hutton et al., 1980; Lenzen et al., 1982*).

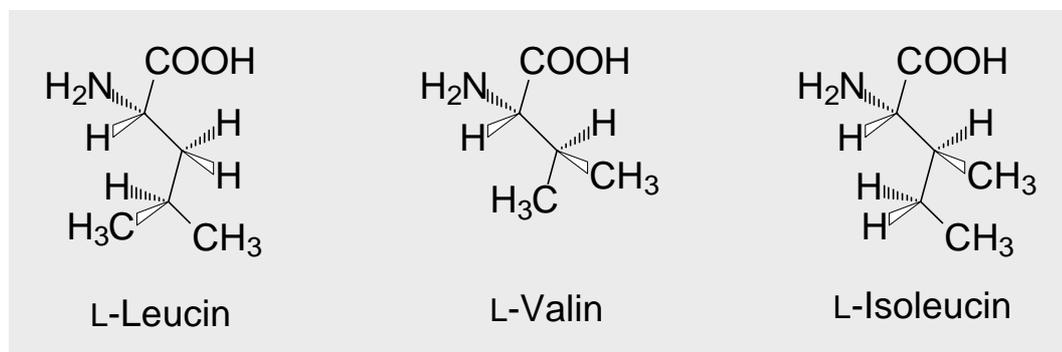


Abb. 1: Strukturformeln der essentiellen verzweigtkettigen L-Aminosäuren.

Der oxidative Abbau der verzweigtkettigen L-Aminosäuren ist prinzipiell in fast allen Geweben möglich. Es wird davon ausgegangen, daß Leber, Skelettmuskulatur und Niere zentrale Organe im oxidativen Abbau darstellen (Tessari et al., 1996; Suryawan et al., 1998; Wendel et al., 1999). Die beiden initialen Schritte im oxidativen Abbau sind für alle verzweigtkettigen L-Aminosäuren identisch (Abb. 2). Zunächst werden L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin in einer reversiblen Transaminierungsreaktion zu den korrespondierenden 2-Oxosäuren 4-Methyl-2-oxopentanoat, 3-Methyl-2-oxobutanoat und S-3-Methyl-2-oxopentanoat abgebaut. Die 2-Oxosäuren werden dann irreversibel oxidativ decarboxyliert, wobei die entsprechenden Acyl-CoA-Ester gebildet werden. Diese werden in Analogie zur  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren weiter abgebaut und letztlich über Acetyl-CoA und Propionyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust (Abb.2).

Die beiden initialen Schritte im Katabolismus verzweigtkettiger L-Aminosäuren sind hinsichtlich der Ahornsirupkrankheit von wesentlicher Bedeutung und werden daher im folgenden näher besprochen. Die Transaminierung der verzweigtkettigen L-Aminosäuren wird durch die Isoenzyme der verzweigtkettige L-Aminosäuren-Aminotransferase (E.C. 2.6.1.42) katalysiert, die die  $\alpha$ -Aminogruppe der verzweigtkettigen L-Aminosäuren auf 2-Oxoglutarat übertragen. In menschlichen Geweben kommen zwei Isoenzyme I (mitochondrial) und III (cytosolisch) vor (Goto et al., 1977), die alle drei verzweigtkettigen L-Aminosäuren zu ihren korrespondierenden 2-Oxosäuren abbauen. Untersuchungen zur subzellulären Kompartimentierung der verzweigtkettige L-Aminosäuren-Aminotransferase in menschlichen Geweben zeigten, daß die Enzymaktivität dort fast vollständig mitochondrial lokalisiert ist (Schadewaldt et al., 1995; Suryawan et al., 1998). Beim Menschen ist in fast allen Geweben mit Ausnahme von Gehirn, Plazenta und Ovarien das mitochondriale Isoenzym I exprimiert (Suryawan et al., 1998). Aufgrund von Untersuchungen an Rattengeweben ist die mitochondriale verzweigtkettige L-Aminosäuren-Aminotransferase wahrscheinlich mit dem mitochondrialen verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Carrier identisch (Hutson & Hall, 1993).

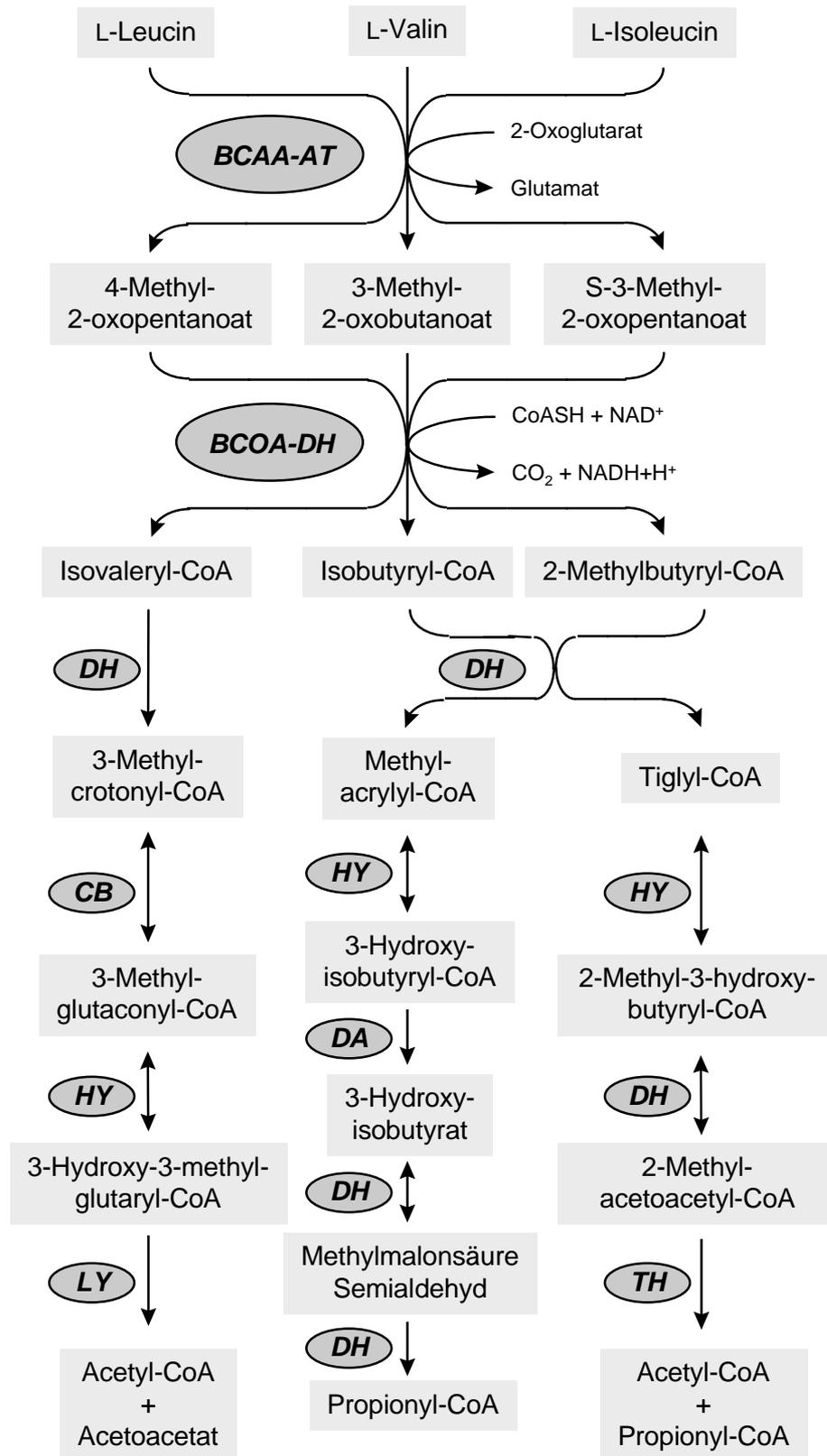


Abb. 2: Oxidativer Abbau der verzweigtkettigen L-Aminosäuren L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin. Abkürzungen: BCAA-AT, verzweigtkettige L-Aminosäuren-Aminotransferase; BCOA-DH, verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase; CB, Carboxylase; DA, Deacylase; DH, Dehydrogenase; HY, Hydratase; LY, Lyase; TH, Thiolase.

Für die oxidative Decarboxylierung aller drei verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren ist die an der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase (E.C. 1.2.4.4) verantwortlich. Diese ist ein Multienzymkomplex und besteht aus drei katalytischen Untereinheiten: einer verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Decarboxylase (E1, ein Heterotetramer  $\alpha_2\beta_2$ ), einer Dihydrolipoyl-Transacylase (E2;  $\alpha_2$ ) und einer Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3;  $\alpha_2$ ). Die durch diese Enzymkomponenten katalysierten Reaktionen sind in Abb. 3 dargestellt. Die E1-Untereinheit katalysiert die Thiaminpyrophosphat-abhängige Decarboxylierung der verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren und die nachfolgende Reduktion des kovalent an die E2-Untereinheit gebundenen Lipoyl-Anteils. Von dem reduzierten Lipoyl-Anteil wird die Acylgruppe von der E1-Untereinheit auf Coenzym A übertragen. Das dabei gebildete Acyl-CoA wird freigesetzt, der Lipoyl-Anteil von der FAD-abhängigen E3-Untereinheit reoxidiert und die Reduktionsäquivalente auf  $\text{NAD}^+$  übertragen (Übersicht bei *Yeaman, 1989*).

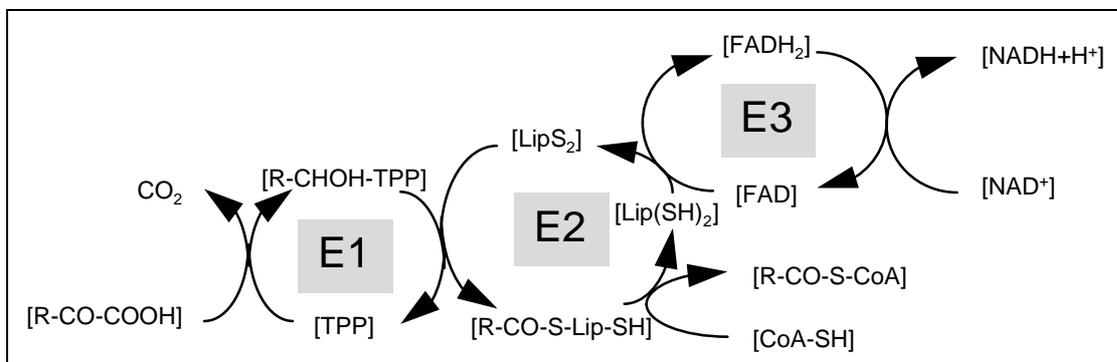


Abb.3: Reaktionsschritte, die durch die Komponenten des verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes (E1, verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Decarboxylase; E2, Dihydrolipoyl-Transacylase; E3, Dihydrolipoyl-Dehydrogenase) katalysiert werden. Abkürzungen: R-CO-COOH, verzweigt-kettige 2-Oxosäuren (4-Methyl-2-oxopentanoat, 3-Methyl-2-oxobutanoat, S-3-Methyl-2-oxopentanoat); TPP, Thiaminpyrophosphat;  $\text{LipS}_2$  und  $\text{Lip(SH)}_2$ , oxidierte und reduzierte Form des Lipoyl-Anteils der E2-Untereinheit.

Die Regulation der Aktivität der verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase erfolgt vor allem über ein Kinase/Phosphatase-System (*Paul & Adibi, 1982; Paxton & Harris, 1982*). Die durch eine spezifische Kinase katalysierte Phosphorylierung zweier Serin-Reste in der E1-Untereinheit führt zu einer

Inaktivierung des Multienzymkomplexes (Harris et al., 1988). Eine Dephosphorylierung derselben Stellen durch die Phosphatase bewirkt eine Aktivierung des Enzyms. In humanen Geweben liegt der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex in fast allen Organen weitgehend in der inaktiven Form vor (Leber: 30 % (Suryawan et al., 1998), Muskel: 10 % (Wagenmakers et al., 1989; van Hall et al., 1995; Rush et al., 1995; Jackman et al., 1997; Bowtell et al., 1998; Suryawan et al., 1998), Niere: 14 % (Suryawan et al., 1998)). Unter physiologischen Bedingungen wird der Aktivitätsstatus der verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase vor allem durch die Aktivität der Kinase bestimmt. So hemmen z.B. die verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren und Thiaminpyrophosphat in hohen Konzentrationen die Kinase und führen damit zu einer Aktivierung der verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase (Yeaman et al., 1989). Außerdem wird die Aktivität des Enzymkomplexes durch Substrate, Produkte und eine Reihe weiterer Faktoren, die in Abb. 4 zusammengestellt sind, reguliert. Zur physiologischen Regulation der Aktivität über Genexpression ist bisher nichts bekannt.

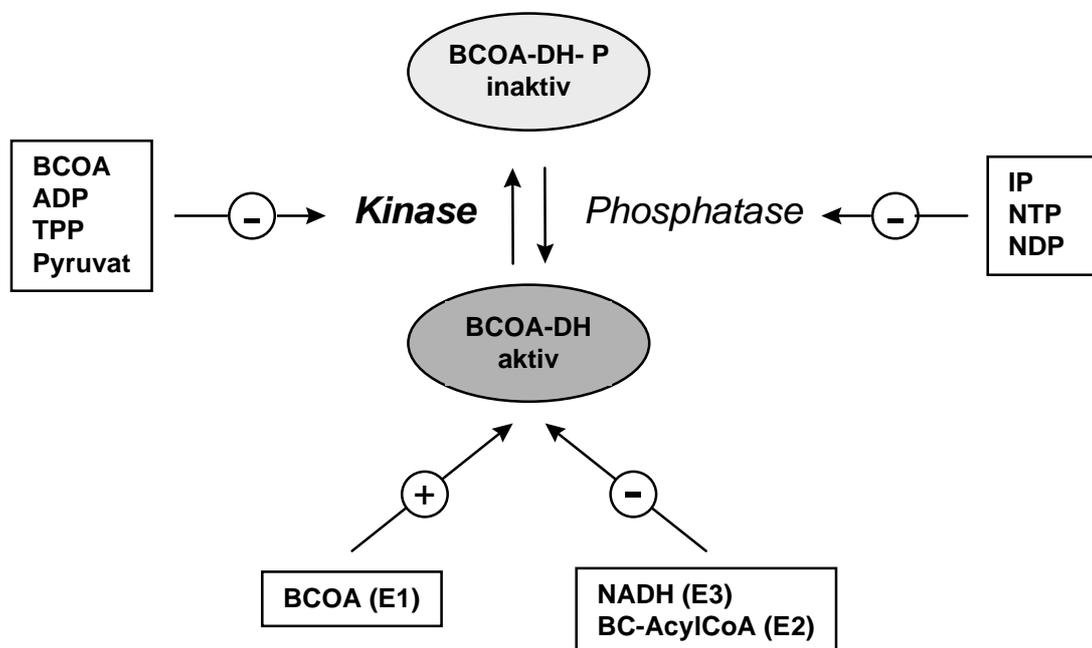


Abb. 4: Modulation der verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase (BCOA-DH)-Aktivität nach Yeaman, 1989, modifiziert. Abkürzungen: BCOA-DH-P, phosphorylierte Form; BCOA, verzweigt-kettige 2-Oxosäuren; ADP, Adenosindiphosphat, TPP, Thiaminpyrophosphat; IP, Inhibitor-Protein; NTP, Nucleosidtriphosphat; NDP, Nucleosiddiphosphat; BC, verzweigt-kettig

## 1.2 Die Ahornsirupkrankheit

Die Ahornsirupkrankheit (McKusick 248600/-10/-11) wurde erstmals von *Menkes et al. (1954)* beschrieben und ist nach dem charakteristischen Geruch des Urins der Patienten benannt. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine angeborene, autosomal rezessiv vererbte, phänotypisch und genotypisch heterogene Stoffwechselstörung, bei der die Funktion des verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes (E.C. 1.2.4.4) und damit der oxidative Abbau der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren ganz oder teilweise beeinträchtigt ist (Übersicht bei *Chuang & Shih, 1995*). Mit einer weltweiten Inzidenz von 1 : 185000 gehört die Ahornsirupkrankheit zu den seltenen Stoffwechselerkrankungen. Als Folge des Enzymdefektes akkumulieren bei den Patienten verzweigt-kettige L-Aminosäuren und die korrespondierenden 2-Oxosäuren im Blut und anderen Körperflüssigkeiten. Diese verzweigt-kettigen Metabolite können in höheren Konzentrationen über bisher noch unbekannte Mechanismen neurotoxisch wirken (*Silberberg, 1969; Korein et al., 1994*).

Pathognomonisch für Ahornsirupkrankheit ist das Vorkommen hoher Konzentrationen einer weiteren verzweigt-kettigen L-Aminosäure, dem L-Alloisoleucin (*Norton et al., 1962; Snyderman et al., 1964*). Diese L-Aminosäure ist ein Diastereomer des L-Isoleucins (Abb. 5). Der Mechanismus der Bildung von L-Alloisoleucin ist bisher nicht aufgeklärt (*Meister, 1951; Schadewaldt et al., 1990; Mamer & Reimer, 1992*). Im Gegensatz zu den anderen verzweigt-kettigen L-Aminosäuren ist L-Alloisoleucin jedoch nicht proteinogen und wirkt auch in höheren Konzentrationen nicht neurotoxisch. Der Abbau von L-Alloisoleucin erfolgt nach Transaminierung zum R-3-Methyl-2-oxopentanoat über den sog. R-pathway des L-Isoleucin-Metabolismus. Dieser Abbau ist unvollständig. Die Hauptprodukte sind 2-Ethylhydracryl- und Ethylmalonsäure und werden letztlich über die Nieren ausgeschieden (*Stalder, 1959; Mamer et al., 1976*).

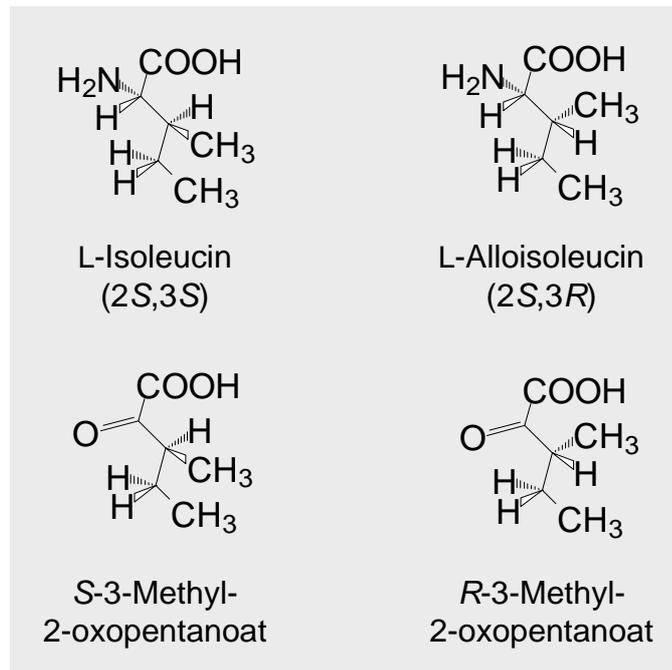


Abb. 5: Strukturformeln der diastereomeren verzweigtkettigen L-Aminosäuren L-Isoleucin und L-Alloisoleucin, sowie der korrespondierenden, enantiomeren verzweigtkettigen 2-Oxosäuren.

Die Therapie der Ahornsirupkrankheit besteht in einer lebenslangen verzweigtkettigen L-Aminosäuren-armen Diät, mit dem Ziel die Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren möglichst in den Normbereich abzusenken und gleichzeitig, abhängig von Alter und Wachstumsrate, noch ausreichende verzweigtkettigen L-Aminosäuren-Mengen für ein normales Wachstum und eine normale Entwicklung zur Verfügung zu stellen (*Snyderman et al., 1964; Chuang & Shih, 1995*).

In akuten metabolischen Krisen, die in Folge kataboler Stoffwechsellagen, z.B. bei Infektionskrankheiten oder auch starken psychischen Belastungen, auftreten können, wird die diätetische Zufuhr von Protein reduziert und der Katabolie durch Gabe von Glucose und erforderlichenfalls unter Zusatz von Insulin entgegengewirkt (*Wendel et al., 1982a*). In lebensbedrohlichen Situationen kann eine Dialyse bzw. Blutaustausch-Transfusion erforderlich werden (*Wendel et al., 1982b*).

### Formen der Ahornsirupkrankheit

Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei Formen der Ahornsirupkrankheit unterschieden: die klassische und die variante Form. Diese Klassifizierung erfolgt anhand von klinischen Parametern, wie dem Zeitpunkt der Manifestation der Erkrankung, der Protein(Leucin)-Toleranz der Patienten, sowie anhand der residualen Aktivität der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in kultivierten Hautfibroblasten der Patienten.

Bei Patienten mit der schwersten, der klassischen Form manifestiert sich die Erkrankung bereits in der Neonatalperiode. Die Protein(Leucin)-Toleranz ist sehr stark reduziert und die Restaktivität der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in kultivierten Hautfibroblasten liegt bei < 2 % der Norm.

Bei varianten Formen ist der Zeitpunkt der Manifestation sehr variabel. Bei schweren varianten Formen treten klinische Zeichen bereits eine Woche nach der Geburt auf. Sehr leichte variante Formen können bis ins 2. Lebensjahrzehnt klinisch unauffällig bleiben. Entsprechend variabel sind die Protein(Leucin)-Toleranz und die residuale Aktivität des Enzymkomplexes in kultivierten Zellen.

In Standardwerken (*Chuang & Shih, 1995; Gibson et al., 1996*) werden üblicherweise noch zwei weitere Formen der Ahornsirupkrankheit aufgeführt: die Thiamin-responsive Ahornsirupkrankheit und der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase(E3)-Mangel (McKusick 246900). Sog. Thiamin-responsive Patienten wurden wiederholt beschrieben (*Scriver et al., 1971; Elsas et al., 1972; Kodama et al., 1976; Duran et al., 1978; Püschel et al., 1979; Elsas & Danner, 1982; Duran & Wadman, 1985; Fernhoff et al., 1985; Scriver et al., 1985; Ellerine et al., 1993; Elsas et al., 1993*), allerdings fehlt bis ein überzeugender Nachweis für die Existenz der Thiamin-responsiven Formen. Der E3-Mangel ist insofern eine spezielle Erkrankung als das nicht nur die Aktivität der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase, sondern auch die Funktion der E3-Untereinheit der beiden anderen mitochondrialen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexe (Pyruvat-Dehydrogenase, E.C. 1.2.4.1, und  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase, E.C. 1.2.4.2) beeinträchtigt ist (*Robinson*

*et al., 1977; Taylor et al., 1978; Robinson et al., 1981; Munnich et al., 1982; Matalon et al., 1984; Matuda et al., 1984; Shany et al., 1999*). Auf diese sehr seltene Form wird im Rahmen der Arbeit nicht weiter eingegangen

#### Molekulargenetik der Ahornsirupkrankheit

Molekulargenetische Untersuchungen zur chromosomalen Lokalisation der humanen verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Gene haben ergeben, daß der aus drei katalytischen Untereinheiten und zwei regulatorischen Enzymen bestehende Multienzymkomplex durch sechs Gen-Loci kodiert wird. Dabei ist das E1 $\alpha$ -Gen auf Chromosom 19 (19q13.1-13.2; *Crabb et al., 1989; Fekete et al., 1989*), das E1 $\beta$ -Gen auf Chromosom 6 (6p21-p22; *Mitsubuchi et al., 1991a; Zneimer et al., 1991*), das E2-Gen auf Chromosom 1 (1p31; *Herring et al., 1991; Lau et al., 1991*) und das E3-Gen auf Chromosom 7 (7q31-q32; *Scherer et al., 1991*) lokalisiert. Die chromosomale Lokalisation für das Kinase- und Phosphatase-Gen ist bisher noch nicht aufgeklärt. Zur strukturellen Organisation ist bekannt, daß das E1 $\alpha$ -Gen (> 55 kb) 9 Exone (*Chuang et al., 1993*), das E1 $\beta$ -Gen (> 100 kb) 10 Exone (*Mitsubuchi et al., 1991a*) und das E2-Gen (68 kb) 11 Exone (*Lau et al., 1992*) enthält. Das E3-Gen (ca. 20 kb) enthält 14 Exone (*Feigenbaum & Robinson, 1993; Johnson et al., 1997*). Mutationen in jedem Gen-Locus können theoretisch zum Phänotyp Ahornsirupkrankheit führen. Bisher wird zwischen den folgenden vier molekulargenetischen Formen der Ahornsirupkrankheit unterschieden: Typ IA (McKusick 248600), IB (McKusick 248611), II (McKusick 248610) und III (McKusick 246900). Dabei erfolgt die Klassifizierung anhand der durch die Mutation betroffenen Untereinheit. Bei Typ III handelt es sich um einen generalisierten E3-Mangel, bei dem, wie bereits erwähnt, die Funktion der E3-Untereinheit aller drei mitochondrialen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexe beeinträchtigt ist. Typ IV und Typ V sind für bisher noch nicht beschriebene Mutationen des Kinase- bzw. Phosphatase-Gens reserviert.

Tab.1: Mutationen bei Ahornsirupkrankheit

Exon(e)/ Intron(i)	Codon	Mutation im Gen	Konsequenz im Peptid/mRNA	Klinischer Phänotyp <sup>#</sup>	Referenz
<b>Phänotyp IA (E1α)</b>					
e9	393	<u>T</u> AC→ <u>A</u> AC	Tyr→Asn	klassisch *	<i>Matsuda et al., 1990</i>
e4	-	<u>C</u> GG→ <u>I</u> GG	Arg→Trp	klassisch §	<i>Nobukuni et al., 1993</i>
e5	-	<u>C</u> AG→ <u>A</u> AG	Glu→Lys	variant §	<i>Nobukuni et al., 1993</i>
e6	-	<u>G</u> CT→ <u>A</u> CT	Ala→Thr	klassisch *	<i>Nobukuni et al., 1993</i>
e7	-	<u>A</u> TC→ <u>A</u> CC	Ile→Thr	variant §	<i>Nobukuni et al., 1993</i>
e7	245	-	Gly→Arg	variant *	<i>Chuang et al., 1995</i>
e7	242	8bp-Deletion	Frameshift	klassisch §	<i>Chuang &amp; Shih, 1995</i>
e9	368	<u>T</u> AT→ <u>T</u> GT	Tyr→Cys	variant §	<i>Chuang &amp; Shih, 1995</i>
e2	4	CAG→ <u>C</u> CAG	Frameshift	variant §	<i>Chuang &amp; Shih, 1995</i>
e6	222	<u>A</u> AT→ <u>A</u> GT	Asn→Ser	klassisch *	<i>Chuang &amp; Shih, 1995</i>
<b>Phänotyp IB (E1β)</b>					
e1	-	-	11bp-Deletion	klassisch oder variant*	<i>Nobukuni et al., 1991</i>
e5	-	<u>C</u> AT→ <u>C</u> GT	His→Arg	klassisch §	<i>Nobukuni et al., 1993</i>
e1	-	1 bp-Insertion	-	klassisch *	<i>Nobukuni et al., 1993</i>
<b>Phänotyp II (E2)</b>					
e2	27	ΔAGA	ΔGlu	klassisch §	<i>Chuang et al., 1991</i>
e4	77	<u>C</u> AT→ <u>I</u> AT	Ile→Tyr	klassisch §	<i>Chuang et al., 1991</i>
e7	215	<u>T</u> IT→ <u>T</u> GT	Phe→Cys)	Thiamin-responsiv <sup>§, †</sup>	<i>Fisher et al., 1991</i>
i4	-	-	17bp-Insertion, Frameshift	Thiamin-responsiv <sup>§, †</sup>	<i>Fisher et al., 1991</i>
e2	-	-	Exon2-Deletion	klassisch §	<i>Herring et al., 1991</i>
i8	-	Δg(AGgt→AGt)	Exon8-Deletion	klassisch *	<i>Mitsubuchi et al, 1991b</i>
e8	-	<u>A</u> Ggt→ <u>A</u> Agt	Exon8-Deletion	klassisch oder Thiamin-responsiv <sup>§, †</sup>	<i>Herring et al., 1992</i>
-	-	15-20 kb-Deletion	-	klassisch oder Thiamin-responsiv <sup>§, †</sup>	<i>Herring et al., 1992</i>
e2	-26	ΔAT( <u>C</u> ATG→ <u>C</u> G)	Frameshift	klassisch *	<i>Fisher et al., 1993</i>
e6	163	<u>G</u> AA→ <u>I</u> AA	Glu→Ter	klassisch *	<i>Fisher et al., 1993</i>
i5	-	Δgt(ATgta→ATa)	Exon5-Deletion	klassisch §	<i>Chuang &amp; Shih, 1995</i>
i4	-	12bp-Deletion	10 bp-Insertion	klassisch §	<i>Chuang et al., 1997</i>
i10	-	10bp-Deletion	21 bp-Insertion	klassisch *	<i>Chuang et al., 1997</i>
i8	-	-	126bp-Insertion	variant *	<i>Tsuruta et al., 1998</i>
e11	422	-	Ter→Leu	variant *	<i>Tsuruta et al., 1998</i>
e4	37	-	Ile→Met	variant §	<i>Tsuruta et al., 1998</i>
<b>Phänotyp III (E3)</b>					
-	37	<u>A</u> AA→ <u>G</u> AA	Lys→Glu	E3-Mangel	<i>Liu et al., 1993</i>
-	453	<u>C</u> CG→ <u>C</u> TG	Pro→Leu	E3-Mangel	<i>Liu et al., 1993</i>
-	479	-	Asp→Val	E3-Mangel	<i>Shany et al., 1999</i>

<sup>#</sup> nach Angabe der Autoren; \* klinischer Phänotyp der Patienten mit homozygoter Mutation; § klinischer Phänotyp von compound Heterozygoten; † vgl. Text

Bisher sind Mutationen für das E1 $\alpha$ -, E1 $\beta$ -, E2- und E3-Gen von Patienten mit Ahornsirupkrankheit beschrieben (vgl. Tab.1). Bei der Mehrzahl handelt es sich um Typ IA bzw. Typ II-Defekte, Typ IB- bzw. Typ III-Mutationen sind seltener. Wie Tab. 1 zeigt, ist jedoch die Beziehung zwischen molekulargenetischem und klinischem Phänotyp nicht eindeutig und darüberhinaus die funktionelle oder biochemische Bedeutung der einzelnen Mutationen nicht bekannt.

Insgesamt ist festzustellen, daß bei Ahornsirupkrankheit häufig nur eine unbefriedigende Übereinstimmung zwischen dem klinischen Schweregrad der Erkrankung und der *in vitro* bestimmten residualen Aktivität der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase gefunden wird. Die Befunde der molekulargenetischen Untersuchungen sind in diesem Zusammenhang nicht hilfreich, da auch die Beziehung zwischen molekularem und klinischem Phänotyp letztlich unklar bleibt. Für eine rationale Klassifizierung der Patienten und vor allem zur Prüfung der Effektivität therapeutischer Interventionen erscheint daher die direkte Bestimmung des *in vivo* Schweregrades bei den Patienten erforderlich.

### 1.3 Zielsetzung

Primäre Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung des *in vivo* Schweregrades bei Patienten mit unterschiedlicher klinischer Form der Ahornsirupkrankheit, d.h. die Bestimmung des *in vivo* Ganzkörperfluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase, unter Anwendung der stabil-Isotopen-Technik.

*In vivo* Untersuchungen zum Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren mit stabil-Isotopen-markierten Verbindungen wurden bisher hauptsächlich an gesunden Probanden durchgeführt. In der Regel wurde bei diesen Untersuchungen die primed continuous infusion-Technik mit L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin als Substrat eingesetzt. Bei Ahornsirupkrankheit sind solche *in vivo*

Stoffwechselumsatzmessungen bisher nur an einer sehr geringen Zahl von Patienten mit klassischer Form der Erkrankung durchgeführt worden. Alle Patienten wiesen übereinstimmend eine residuale *in vitro* Aktivität der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase von < 2% der Norm auf. Die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen erbrachten insofern widersprüchliche Ergebnisse, als bei über der Hälfte der untersuchten Patienten deutliche Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten von 8 bis 42 % der Norm festgestellt wurden. Für die Anwendbarkeit der primed continuous infusion-Technik sind möglichst norm-nahe und während der Dauer des Experimentes konstante Konzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren im Plasma wesentliche Voraussetzungen. Patienten mit Ahornsirupkrankheit weisen jedoch im Vergleich zu Normalpersonen vergrößerte und auch zeitlich variable Pools der verzweigtkettigen L-Aminosäuren auf. Umsatzmessungen mit der primed continuous infusion-Technik erscheinen daher aufgrund der labilen Stoffwechsellage bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit problematisch und könnten für die obigen widersprüchlichen Befunde ursächlich sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene, sich ergänzende experimentelle Strategien zur Etablierung eines Verfahrens zur Bestimmung des Ganzkörperflusses durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase verfolgt: (1) Verwendung von Substraten, deren Poolgrößen weniger variabel sind, da diese nicht vom Proteinmetabolismus beeinflusst werden und  
(2) Anwendung von kompartmentellen Versuchsansätzen (Bolustests).

Zu (1): Als nicht-proteinogene Aminosäuren könnten das physiologische L-Alloisoleucin und prinzipiell auch, die nicht natürlich vorkommenden Nor-Analoga von L-Leucin und L-Valin Substrate für die Stoffwechselumsatzmessungen darstellen. Daher sollten die wesentlichen Grundvoraussetzungen für einen zukünftigen Einsatz dieser Substanzen - in stabil-Isotopen markierter Form- bei der

Bestimmung des Ganzkörperflusses durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase erarbeitet werden.

Für L-Alloisoleucin liegen Befunde zum Katabolismus beim Menschen vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun Untersuchungen zur endogenen Entstehung von L-Alloisoleucin beim Menschen durchgeführt (*Kapitel 9, 10*). Da im Gegensatz zum L-Alloisoleucin über den Stoffwechsel der Nor-Analoga in menschlichen Zellen nichts bekannt ist, wurden hier grundlegende Untersuchungen zum Katabolismus in kultivierten humanen Zellen durchgeführt (*Kapitel 7, 8*).

Zu (2): Von *Elsas et al. (1993)* wurde ein einfacher, nicht-invasiver  $^{13}\text{CO}_2$ -Atemtest mit oraler Gabe von  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertem L-Leucin zur *in vivo* Ganzkörper-Messung der Aktivität der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase bei Probanden und ahornsirupkranken Patienten beschrieben. Bei diesen Untersuchungen wurden jedoch außer der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation keine weiteren experimentellen Daten erhoben und die Ganzkörper-L-Leucinoxidation ausschließlich aus der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation abgeleitet. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob dieser methodische Ansatz tatsächlich zur Bestimmung der *in vivo* L-Leucin-Oxidation geeignet ist. Um die Voraussetzungen für eine Beurteilung der Ganzkörper-Oxidation bei ahornsirupkranken Patienten zu schaffen, wurden zunächst orale L-[ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustests an gesunden Probanden durchgeführt und die Kinetik der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation sowie die Kinetik der Isotopenanreicherung in den Plasmametaboliten sorgfältig untersucht. Anhand der Daten aus diesen invasiven Experimenten wurde zunächst der Normbereich durch Ergebnisse zur inter- und intraindividuellen Variabilität der Ganzkörper-L-Leucinoxidation definiert (*Kapitel 2*) und eine Kompartiment-Analyse als adäquate Methode zur Auswertung etabliert (*Kapitel 11*). Desweiteren wurde

der kompartimentelle Ansatz in einer vergleichenden Untersuchung mittels der konventionellen primed continuous infusion-Technik an gesunden Probanden validiert (*Kapitel 11*).

Im Zusammenhang mit der vorgesehenen Verwendung von L-Leucin als Substrat für *in vivo* Untersuchung wurde in *in vivo* Untersuchungen an gesunden Erwachsenen und in Modelluntersuchungen an humanen Hautfibroblasten *in vitro* zusätzlich der Frage nachgegangen, ob und inwieweit die L-Leucin-Oxidation als repräsentativ für den gesamten Substratfluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase *in situ* angesehen werden kann (*Kapitel 5, 6*).

Schließlich wurde mit dem invasiven L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustest bei einer repräsentativen Anzahl von Patienten mit unterschiedlichem klinischen Schweregrad der Ahornsirupkrankheit die residuale *in vivo* L-Leucinoxidation bestimmt. Mit diesem Verfahren konnte auch bei einer ahornsirupkranken Patientin die Wirkung einer orthotopen Lebertransplantation auf den Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren charakterisiert werden (*Kapitel 2, 3, 4*).

---

#### Hinweis

Die Befunde zu den einzelnen Fragestellungen sind in eigenständigen Kapiteln dargestellt. Daher können sich bei den Einleitungen gewisse Überschneidungen ergeben.

---

## **Teil II**

### Katabolismus verzweigtkettiger L-Aminosäuren in vivo bei Ahornsirupkrankheit

Ziel der Untersuchung war die Bestimmung der residualen Ganzkörper-L-Leucinoxidation bei Patienten mit klassischer und varianter Form der Ahornsirupkrankheit, sowie die Charakterisierung des Stoffwechsels verzweigtkettiger L-Aminosäuren bei klassischer Ahornsirupkrankheit nach orthotoper Lebertransplantation.



## Kapitel 2

# Der [<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustest zur Bestimmung der L-Leucinoxidation bei klassischer Ahornsirupkrankheit\*

**Zusammenfassung.** Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob der von *Elsas et al. (1993)* beschriebene nicht-invasive L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustest zur Bestimmung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit geeignet ist. Dazu wurden orale Bolustests mit L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin ( $38 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) an Patienten mit Ahornsirupkrankheit (klassische Form, n=6), Eltern (obligat Heterozygote, n=6) und gesunden Probanden (n=10) nach Übernachtsfasten durchgeführt und die Kinetik der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation während der 3stündigen Versuchsdauer mit nicht-linearen Regressionsverfahren ausgewertet. In den meisten Fällen wurden zusätzlich Blutproben entnommen und die Kinetik der <sup>13</sup>C-Anreicherung in den Plasmametaboliten bestimmt. Bei Kontrollpersonen wurde die maximale <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation zum Zeitpunkt  $t_{\text{max}} = 55 \pm 18$  min erreicht. Die kumulative <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Abatmung innerhalb von 3 Stunden betrug  $4.7 \pm 0.7 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ . Die berechnete totale <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation lag bei  $7.2 \pm 1.4 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$  ( $19.0 \pm 3.6$  % der Dosis). Die Hälfte dieser Menge wurde nach  $t_{50\%} = 130 \pm 18$  min abgeatmet. Die interindividuelle Variabilität der untersuchten Parameter war beachtlich. In Untersuchungen an

zwei gesunden Probanden wurde ein vergleichbares Maß an intraindividuellem Variabilität gefunden. Obligat Heterozygote unterschieden sich bezüglich der Kinetik der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation ( $t_{\text{max}} = 35 \pm 8$  min;  $t_{50\%} = 95 \pm 16$  min) nicht signifikant vom Normkollektiv. Die totale <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Abatmung ( $5.7 \pm 1.4 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) lag bei den Heterozygoten im unteren Normbereich. Bei keinem der Patienten mit Ahornsirupkrankheit wurde ein signifikanter Anstieg der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation nach Bolusgabe beobachtet. Der maximale Anstieg der Isotopenmarkierung im Plasmametaboliten 4-Methyl-2-oxopentanoat, dem physiologischen Vorläufer des <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, betrug bei Kontrollpersonen  $16.1 \pm 3.5$  MPE. Die Verdünnung der durch den Bolus aufgenommenen <sup>13</sup>C-Markierung war bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit höher als bei Kontrollpersonen und mit den Plasmaspiegeln von Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat korreliert. Die begrenzte Aussagefähigkeit der Bestimmung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation unter Verwendung von nicht-invasiven Verfahren wird unter besonderer Berücksichtigung der generell hohen Variabilität der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation und der instabilen Substratpools bei Ahornsirupkrankheit diskutiert.

---

\* publiziert als: *Assessment of whole body L-leucine oxidation by non-invasive L-[1-<sup>13</sup>C]leucine breath tests: a reappraisal in maple syrup urine disease patients, obligate heterozygotes and healthy subjects*

## 2.1 Einleitung

Die Ahornsirupkrankheit ist eine angeborene, autosomal rezessiv vererbte, phänotypisch und genotypisch heterogene Stoffwechselerkrankung, bei der der oxidative Abbau der verzweigtkettigen L-Aminosäuren auf der Stufe des verzweigtkettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes (E.C. 1.2.4.4) beeinträchtigt ist (*Menkes et al., 1954*). Als Folge des Enzymdefektes akkumulieren bei den Patienten verzweigtkettige L-Aminosäuren und die korrespondierenden 2-Oxosäuren in Blut und anderen Körperflüssigkeiten. Diese verzweigtkettigen Metabolite können in höheren Konzentrationen über bisher noch unbekannte Mechanismen neurotoxisch wirken (*Silberberg, 1969; Korein et al., 1994*).

Der Schweregrad der Erkrankung reicht von schweren klassischen bis zu milden varianten Formen. Diese Klassifizierung erfolgt anhand von indirekten klinischen Parametern, wie dem Zeitpunkt der Manifestation der Erkrankung und der Leucintoleranz der Patienten, sowie über in vitro-Messung der verzweigtkettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Restaktivität in kultivierten Hautfibroblasten oder Leukozyten (Übersicht bei *Chuang & Shih, 1995*).

Allerdings wird bei Ahornsirupkrankheit relativ häufig nur eine unbefriedigende Übereinstimmung zwischen dem klinischen Schweregrad der Erkrankung und der in vitro bestimmten residualen Aktivität der verzweigtkettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase gefunden (*Chuang & Shih, 1995*). Für eine rationale Klassifizierung der Patienten sowie für die Prüfung therapeutischer Maßnahmen, wie z.B. Thiamin-Gabe (*Elsas & Danner, 1982*), erscheint daher die direkte Bestimmung des in vivo-Schweregrades bei den Patienten, d.h. die Bestimmung des Ganzkörperflusses durch die verzweigtkettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase, erforderlich (*Chuang & Shih, 1995; Schadewaldt & Wendel, 1997*).

Untersuchungen zum in vivo-Stoffwechsel der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren wurden bisher hauptsächlich an gesunden Probanden durchgeführt. Im allgemeinen wurde dabei der primed continuous infusion-Ansatz mit L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin als Substrat verwendet (*Bier, 1989*). Zum L-Leucin-Stoffwechsel bei Ahornsirupkrankheit liegen bisher nur wenige in vivo Befunde vor, wobei die Umsatzmessungen ausschließlich an Patienten mit klassischer Form der Erkrankung durchgeführt wurden. Bei über der Hälfte der untersuchten Patienten wurden deutliche Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten von 8 % bis zu 43 % der Norm festgestellt (*Collins et al., 1987; Thompson et al., 1990 a; Thompson et al., 1990b; Thompson et al., 1991*). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den in vitro-Befunden, bei denen die residuale Aktivität der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase bei Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit im allgemeinen bei unter 2 % der Norm liegt. Zur in vivo Ganzkörper-Messung der Aktivität der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase bei Probanden und Patienten mit Ahornsirupkrankheit verwendeten *Elsas et al. (1993)* einen <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Atemtest mit oraler Bolusgabe von L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin. Bei diesen Untersuchungen wurden außer der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation keine weiteren experimentellen Daten erhoben und die Ganzkörper-L-Leucinoxidation aus der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation abgeleitet. Auch hier waren Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten der ahornsirupkranken Patienten variabel und stimmten nur teilweise mit der residualen in vitro Aktivität der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase überein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun untersucht, inwieweit der methodische Ansatz von *Elsas et al. (1993)* tatsächlich zur Bestimmung der in vivo L-Leucin-Oxidation geeignet ist. Dazu wurden orale Bolustests mit L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin als Substrat an Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit, an heterozygoten Eltern und gesunden Probanden durchgeführt. Bei diesen Tests wurde die Kinetik der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation sorgfältig untersucht und, so weit möglich, mit der Kinetik der L-Leucin-Metabolite im Plasma verglichen. Im einzelnen sollten mit diesen Untersuchungen folgende Fragen beantwortet

werden: (1) Kann mit diesem methodischen Ansatz die residuale Ganzkörper-L-Leucinoxidation bei Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit erfaßt werden? (2) Können Heterozygote über die Messung der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation von Normalpersonen differenziert werden? und (3) Können anhand des nicht-invasiven Verfahrens quantitative Aussagen über die residuale Ganzkörper-L-Leucinoxidation getroffen werden?

## 2.2 Material und Methoden

### 2.2.1 Material

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt), Sigma Chemie (München) oder Boehringer (Mannheim) bezogen. L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin (99 % 1- $^{13}\text{C}$ ) stammte von Promochem (Wesel). Reinheit und Isotopengehalt des L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucins wurden mittels automatischer Aminosäureanalyse (s. 2.2.3.2) und GC-MS-Analyse (*Matthiesen & Schadewaldt, 1994*) bestimmt und entsprachen den Spezifikationen des Herstellers.

### 2.2.2 Probanden und Patienten

Sechs Patienten mit Ahornsirupkrankheit (klassische Form), sechs Eltern (obligat heterozygot) und zehn gesunde Probanden (Kontrollen) nahmen an dem L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustest teil.

Bei den Kontrollpersonen und den heterozygoten Eltern wurden bei der körperlichen Untersuchung weder eine akute noch eine chronische Erkrankung festgestellt. Bei den Kontrollpersonen, die mehrfach an den L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustests teilgenommen haben, blieben Körpergewicht und Ernährungsgewohnheiten während des gesamten Untersuchungszeitraumes (3-4 Monate) unverändert. Die Patienten wurden ebenfalls einer körperlichen Untersuchung unterzogen. Außer der oben genannten Erkrankung wurde keine

weitere akute oder chronische Erkrankung festgestellt. Die charakteristischen klinischen Daten der Patienten mit Ahornsirupkrankheit, der Heterozygoten, sowie der Kontrollpersonen sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Das bei diesen Untersuchungen verwendete Versuchsprotokoll wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt.

Tab. 1: Probanden und Patienten

Proband / Patient	Geschlecht  (m/w)	Alter  (Jahre)	Gewicht  (kg)	Größe  (cm)	Plasma-Konzentration †	
					Leucin  (mmol x l <sup>-1</sup> )	KIC
Kontrollpersonen						
MW ± SD (Bereich)	9 m / 1 w	29 ± 6 (24-45)	75.0 ± 7.5 (63-84)	180 ± 9 (160-191)	0.129 ± 0.022 (0.076-0.152)	0.044 ± 0.007 (0.033-0.055)
Obligat Heterozygote						
O.M. ‡	m	38	99	185		
P.S. §	m	36	63	164		
B.S. §	w	33	77	164		n.v.
X.S.	w	45	58	158		
H.Ö. ¶	m	33	83	170		
F.Ö. ¶	w	32	62	169		
MW ± SD		36 ± 5	73.7 ± 15.7	168 ± 9	-	-
Patienten mit Ahornsirupkrankheit *						
J.F.	m	13	42	162	0.430	0.346
D.G.	w	19	62	150	0.450	0.366
A.M. ‡	m	13	51	153	1.046	0.694
D.S. §	m	8	25	131	1.092	n.b.
L.U.	m	17	79	167	0.136	0.059
S.Ö. ¶	m	14	54	150	0.814	0.692
MW ± SD		14 ± 4	52.2 ± 18.2	152 ± 12	0.661 ± 0.382	0.431 ± 0.268

† vor dem L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustest

‡, §, ¶ Eltern der Patienten mit \* klassischer Form der Ahornsirupkrankheit

n.v., nicht vorhanden; n.b., nicht bestimmt; Abkürzungen: KIC, 4-Methyl-2-oxopentanoat

## 2.2.3 Methoden

### 2.2.3.1 In vivo Untersuchungen

Nach 12stündigem Übernachtsfasten wurde den Versuchsteilnehmern zwischen 8:00 und 9:00 Uhr L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin (99% 1-<sup>13</sup>C, 38 μmol x (kg KG)<sup>-1</sup>), gelöst in 150 ml verdünnter Zitronensäure (5 mmol x l<sup>-1</sup>), oral als Bolus verabreicht.

Drei der ahornsirupkranken Patienten und alle Kontrollpersonen gaben die Einwilligung zu einer invasiven Untersuchung, die dann im Zentrum für Kinderheilkunde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt wurde. Diese Versuche fanden unter Ruhebedingungen im Liegen statt. Zur Blutentnahme wurde eine Venenverweilkanüle (Vasofix-Braunüle, 1.2 mm; B. Braun) in die V. basilica gelegt. Um die Venenverweilkanüle während der ca. 4stündigen Versuchsdauer offen zu halten, wurde über einen Drei-Wege-Hahn (B. Braun) eine Tropfinfusion (90-110 ml/h; physiologische NaCl-Lösung, 0.9 %, w:v; B. Braun) an die Kanüle angeschlossen. Zur Entnahme der Blutproben wurde die Tropfinfusion unterbrochen. Um eine Verdünnung der Blutprobe mit NaCl-Lösung zu vermeiden, wurden zunächst 2 ml Blut ungestaut entnommen und verworfen. Anschließend wurden weitere 8 ml Blut innerhalb von ca. 20 Sekunden entnommen und in 9 ml-K-EDTA-Monovetten (1.6 mg EDTA/ml Blut; Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Das Plasma wurde durch Zentrifugation (3000 x g, 10 min, 4 °C) gewonnen und für die weiteren Analysen aufgearbeitet (s. 2.2.3.2).

Blutproben wurden 30 Minuten und unmittelbar vor der Einnahme des oralen Bolus (Kontrollwerte) entnommen. Nach Verabreichung des oralen Bolus erfolgte die Entnahme weiterer Proben im Abstand von 15 Minuten über eine Dauer von 3 Stunden.

Parallel zu den Blutproben wurden Proben der Exhalationsluft bei normaler Atmung in Atembeuteln (1.5 l Tecobag; Tessaurex Container, Bürstadt)

gesammelt. Die Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Exhalation erfolgte kontinuierlich mittels Atemgasanalyse (Deltatrac Metabolic Monitor; Datex Instruments, Helsinki, Finnland). Dabei lag der Versuchsteilnehmer unter einer ventilierten Atemhaube. Die Werte der Atemgasanalyse wurden auf Standard-Temperatur, -Druck und -Luftfeuchtigkeit korrigiert.

Vor Beginn und am Ende des Experimentes wurden Patienten und Probanden gebeten, die Blase zu entleeren. Der Spontanurin wurde gesammelt und für weitere Analysen verwendet (s. 2.2.3.2).

Einige Patienten mit Ahornsirupkrankheit und die heterozygoten Eltern waren nicht mit der Durchführung eines invasiven Bolustests in der Klinik einverstanden und wurden daher, auf ihren Wunsch, zuhause in ihrer gewohnten Umgebung untersucht. Diese nicht-invasiven Versuche fanden unter Ruhebedingungen im Sitzen statt. Die CO<sub>2</sub>-Exhalation wurde, ausgehend von einer endogenen CO<sub>2</sub>-Produktion von 5 mmol x min<sup>-1</sup> x m<sup>-2</sup> Körperoberfläche, berechnet (*Shreeve et al., 1970*). Die Körperoberfläche wurde nach *Haycock et al. (1978)* bestimmt.

#### 2.2.3.2 Analytische Verfahren

##### Isotopenanreicherung im CO<sub>2</sub> der Exhalationsluft

Die Bestimmung der Isotopenanreicherung im CO<sub>2</sub> erfolgte mit einem Isotopenratio-Massenspektrometer (Finnigan MAT 251; Finnigan MAT, Bremen). Dazu wurden Proben der Exhalationsluft aus den Atembeuteln mit Hilfe einer 50 ml-Infusionsspritze (B. Braun; ausgestattet mit einem Drei-Wege-Hahn) in evakuierte 10 ml-Röhrchen (Exetainer; Spectromat, Bremen) überführt. Es wurde ein gegen Pee Dee Belemniten-kalibrierter Standard (PDB; *Wolfe, 1992*) verwendet.

### Konzentrationsbestimmungen

Zur Konzentrationsbestimmung von Amino- und 2-Oxosäuren in Plasma- und Urinproben wurden in der Arbeitsgruppe etablierte Standardverfahren benutzt, die im folgenden kurz dargestellt sind.

Die Proben wurden mit 5-Sulfosalicylsäure extrahiert und die Leucin-Konzentration wurde mittels automatischer Aminosäureanalyse mit kationenaustauschchromatographischer Trennung und nachfolgender Ninhydrin-Detektion quantifiziert (*Schadewaldt et al., 1990*). Die Bestimmung der korrespondierenden 2-Oxosäure 4-Methyl-2-oxopentanoat erfolgte über eine RP-HPLC-Analyse des Chinoxalin-Derivates mit Fluoreszenz-Detektion (*Schadewaldt et al., 1989*).

Zur Bestimmung des Gesamt-Leucingehaltes im Urin wurden die Proben mit dem gleichen Volumen Salzsäure ( $12 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ ) gemischt, für 24 Stunden bei  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  (*Hill, 1965*) hydrolysiert und anschließend zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 5-Sulfosalicylsäure (5%, w:v) aufgenommen und der Leucingehalt wie oben beschrieben quantifiziert.

Die Bestimmung der Creatininkonzentration in Plasma- und Urinproben erfolgte mittels eines enzymatischen Farbtests (Creatinin PAP-Test; Boehringer, Mannheim) auf einem Autoanalyser (Hitachi 704, Boehringer) (*Wahlefeld & Siedel, 1985*).

### Isotopenanreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat

Die Bestimmung der Isotopenanreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat erfolgte ebenfalls nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Standardverfahren (*Schadewaldt et al., 1995*). Hierzu wurde das Chinoxalin-Derivat des 4-Methyl-2-oxopentanoates präpariert und nachfolgend mit Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid derivatisiert. Die dabei entstandenen O-Trimethylsilyl-Chinoxalinol-Derivate wurden dann massenspektrometrisch über chemische Ionisation (CI) mit Ammoniak als Reaktantgas analysiert. Zur Bestimmung der  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Markierung wurde das Intensitätsverhältnis der quasimolekularen Ionen  $[\text{MH}+1]^+$  und  $[\text{MH}]^+$  des Chinoxalinol-Derivates durch selected ion monitoring (SIM) bei  $m/z$  276 und  $m/z$  275 gemessen.

## 2.2.4 Auswertung und Statistik

### 2.2.4.1 Berechnungen

#### Isotopenanreicherung im CO<sub>2</sub> der Exhalationsluft

Die <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C-Ratio im CO<sub>2</sub> der Exhalationsluft (R) wurde anhand der Isotopenanreicherung, bezogen auf den Pee Dee Belemniten-Standard (Faktor 0.011237), wie folgt berechnet (Wolfe, 1992):

$$R = \left( \frac{\delta_{PDB}}{1000} + 1 \right) * 0.011237$$

*R* : Verhältnis der Ionenintensitäten bei m/z 45 (<sup>13</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub>) zu m/z 44 (<sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub>) (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C-Ratio) im CO<sub>2</sub> der Exhalationsluft

*δ<sub>PDB</sub>* : Isotopenanreicherung bezogen auf den Pee Dee Belemniten-Standard, ‰

Die <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation (*V<sub>13CO<sub>2</sub></sub>*) über basal wurde aus der Isotopenanreicherung im CO<sub>2</sub> und der mittleren Rate der kontinuierlich gemessenen CO<sub>2</sub>-Exhalation wie folgt errechnet:

$$V_{13CO_2} = V_{CO_2} \times \left( \frac{R}{R+1} - \frac{R_0}{R_0+1} \right) \times \frac{1000}{22.4} \times \frac{1}{m}$$

*V<sub>13CO<sub>2</sub></sub>* : <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation über basal, μmol x min<sup>-1</sup> x kg<sup>-1</sup>

*V<sub>CO<sub>2</sub></sub>* : mittlere CO<sub>2</sub>-Exhalationsrate, ml x min<sup>-1</sup>

*R* : <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C-Ratio im CO<sub>2</sub> der Proben, die nach der Gabe des oralen Bolus entnommen wurden

*R<sub>0</sub>* : <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C-Ratio im CO<sub>2</sub> aus den vor dem oralen Bolus entnommenen Kontrollproben

*m* : Körpergewicht, kg

In den nicht-invasiven Bolustests wurde die mittlere Rate der CO<sub>2</sub>-Exhalation ausgehend von einer endogenen CO<sub>2</sub>-Produktion von 5 mmol x min x m<sup>2</sup>

Körperoberfläche berechnet (*Shreeve et al., 1970*). Die Körperoberfläche wurde nach *Haycock (1978)* bestimmt.

Aus den Raten der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation über basal zu jedem Entnahmezeitpunkt wurde die kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation (kum.  $^{13}\text{CO}_2$ ) über basal anhand der Trapezoidal-Regel wie folgt berechnet:

$$\text{kum.}^{13}\text{CO}_2(t_i) = \left( V_{^{13}\text{CO}_2}(t_i) \times (t_{i+1} - t_i) + \frac{1}{2} \times (V_{^{13}\text{CO}_2}(t_{i+1}) - V_{^{13}\text{CO}_2}(t_i)) \times (t_{i+1} - t_i) \right) \times \frac{1}{m}$$

$\text{kum.}^{13}\text{CO}_2(t_i)$ : kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation über basal zum Zeitpunkt  $t_i$ ,  $\mu\text{mol} \times \text{kg}^{-1}$

$V_{^{13}\text{CO}_2}(t_i)$ :  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation über basal zum Zeitpunkt  $t_i$ ,  $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$

$t_i$ : Zeitpunkt der Probenentnahme nach Bolusgabe, min

$m$ : Körpergewicht, kg

#### Isotopenanreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat

Die Isotopenanreicherung in „mol percent excess“ (MPE) im 4-Methyl-2-oxo-[1- $^{13}\text{C}$ ]pentanoat wurde aus dem Verhältnis der Ionenintensitäten bei  $m/z$  276 zu  $m/z$  275 in den Plasmaproben, die nach der Gabe des oralen Bolus entnommen wurden ( $R$ ) und dem natürlich vorkommenden Verhältnis in den vor dem oralen Bolus entnommenen Proben ( $R_0$ ), normalisiert auf eine Ionenintensität von 1 bei  $m/z$  275, wie folgt ermittelt (*Wolfe, 1984*):

$$\text{MPE} = \frac{(R - R_0) \times 100}{(R - R_0) + 1}$$

$\text{MPE}$ : Isotopenanreicherung in Molprozent, MPE

$R$ : Verhältnis der Ionenintensitäten bei  $m/z$  276 zu  $m/z$  275 im 4-Methyl-2-oxopentanoat-Chromatographiepeak der Proben, die nach der Gabe des oralen Bolus entnommen wurden

$R_0$ : Verhältnis der Ionenintensitäten bei  $m/z$  276 zu  $m/z$  275 im 4-Methyl-2-oxopentanoat-Chromatographiepeak der vor dem oralen Bolus entnommenen Kontrollproben

### Renale Clearance-Raten

Die renalen Clearance-Raten (Cl) während der 3.5stündigen Versuchsdauer wurden gemäß folgender Formel abgeschätzt und auf eine Körperoberfläche von 1.73 m<sup>2</sup> normiert (*Dubois & Dubois, 1915*):

$$Cl = \frac{c_U}{c_{Pl(mean)}} \times \frac{V_U}{t}$$

- $Cl$ : Renale Clearance-Rate, ml x min<sup>-1</sup>  
 $c_U$ : Konzentration im am Ende des Experimentes gesammelten Spontanurin, μmol x l<sup>-1</sup>  
 $c_{Pl(mean)}$ : mittlere Plasma-Konzentration während des Experimentes, μmol x l<sup>-1</sup>  
 $V_U$ : Volumen des am Ende des Experimentes gesammelten Spontanurines, ml

### 2.2.4.2 Nicht-lineare Regressionsverfahren

Zur Auswertung der L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustests wurden zusätzlich nicht-lineare Regressionsverfahren angewendet. Zur Abschätzung der gesamten <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation wurde anhand von publizierten <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalationsraten aus 6stündigen L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustests (*Elsas et al., 1993*) das im folgenden dargestellte Verfahren etabliert und seine Plausibilität geprüft (Abb. 1).

Zuerst wurden <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalationsraten der initialen 180 Minuten dieser Bolustests unter Anwendung des Marquart-Levenberg-Algorithmus für nicht-lineare Regressionsanalysen (SigmaPlot 2.0, Jandel Scientific) angepaßt. Mit verschiedenen gängigen Modellen (*Ghoos et al., 1993*) war keine befriedigende Beschreibung der Exhalationskinetiken zu erreichen. Die folgende Funktion erlaubte die beste Anpassung der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalationsraten ( $y(t)$ , in μmol x min<sup>-1</sup> x kg<sup>-1</sup>) mit  $q=4$  (vgl. Abb. 1, oben), wobei  $a_i$  und  $k_i$  Konstanten und  $t$  die Zeit in Minuten darstellt:

$$y(t) = \sum_{i=1}^q a_i \times e^{-k_i \times t} \quad (1)$$

In allen getesteten Datensätzen (n=7) ergab sich ein Determinationskoeffizient von  $R^2 > 0.9915$  (MW  $\pm$  SD:  $0.9921 \pm 0.0055$ ).

Anschließend wurden für jedes Experiment die  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsraten ( $y(t)$ ) im Untersuchungszeitraum von 3 bis 6 Stunden vorrausberechnet und mit den experimentellen Befunden von *Elsas et al. (1993)* verglichen (Abb.1, oben). Hierbei ergab sich eine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen den berechneten und den experimentellen  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsraten ( $r > 0.9053$ ; MW  $\pm$  SD:  $0.9702 \pm 0.0325$ ).

Die kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation ( $Y(t)$ , in  $\mu\text{mol} \times \text{kg}^{-1}$ ) zur Zeit  $t$  ergibt sich, da es sich um die Fläche unter der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationskurve handelt, durch Integration von Gleichung (1).

$$Y(t) = \int_0^t \sum_{i=1}^q a_i \times e^{-k_i \times t} \times dt \quad (2)$$

Die Plausibilität dieser Berechnung wurde, wie in Abb. 1 (unten) dargestellt, geprüft. Die kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Menge ( $Y(t)$ ) wurde für die 6stündige Versuchsdauer berechnet und mit den entsprechenden kumulativen Werten verglichen, die ausgehend von den gemessenen  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsraten trapezoidal bestimmt wurden. In allen Datensätzen ergab sich eine hohe Korrelation zwischen den vorrausberechneten und den experimentellen Werten ( $r > 0.9999$ ).

Basierend auf diesen Ergebnissen kann die insgesamt abgeatmete Menge  $^{13}\text{CO}_2$  ( $Y(t_\infty)$ , in  $\mu\text{mol} \times \text{kg}^{-1}$ ) aus Gleichung (2) durch Extrapolation gegen  $t_\infty$  wie folgt bestimmt werden:

$$Y(t_\infty) = \sum_{i=1}^q a_i \times \frac{1}{k_i} \quad (3)$$

Die einzusetzenden Parameter  $a_i$  und  $k_i$  stammen aus der nicht-linearen Anpassung der individuellen  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationskinetik.

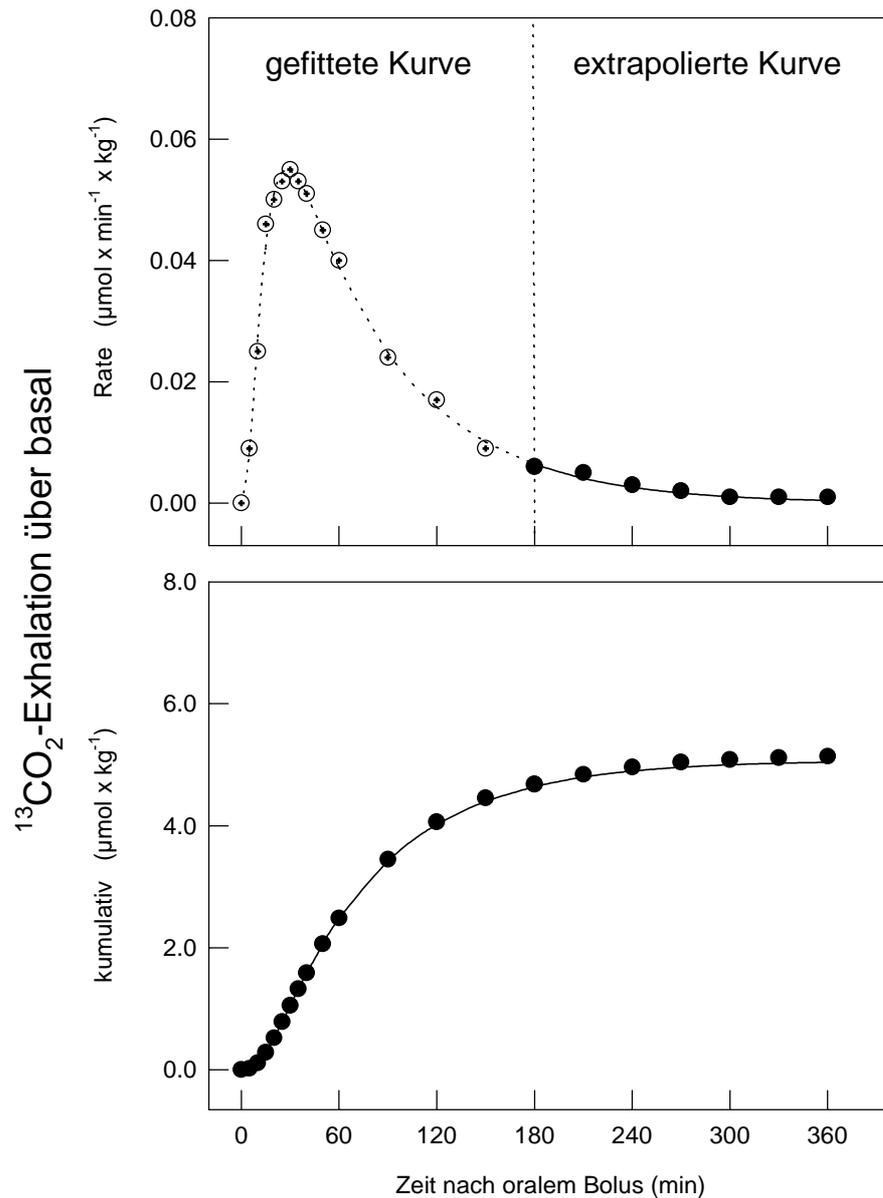


Abb. 1: Evaluierung der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation in L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustest. Experimentelle <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalationsraten (Punkte) für einen 6ständigen Untersuchungszeitraum stammen von *Elsas et al. (1993)*. Oben: <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalationsraten der initialen 3 Stunden wurden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand von Gleichung (1) angepaßt (gepunktete Linie, angepaßte Kurve; Determinationskoeffizient,  $R^2 > 0.995$ ). Zur Plausibilitätsprüfung wurde die Korrelation zwischen den extrapolierten und den experimentell ermittelten <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalationsraten im Untersuchungszeitraum von 3 bis 6 Stunden geprüft (Korrelationskoeffizient  $r > 0.987$ ). Unten: Vergleich der trapezoidal bestimmten kumulativen <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation (Punkte) mit dem berechneten Integral der oben dargestellten angepaßten Kurve (durchgezogene Linie, Korrelation von experimentellen und vorrausberechneten Werten:  $r > 0.999$ ).

Zusätzlich wurden drei weitere Testparameter definiert: der Zeitpunkt an dem die Rate der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation ihr Maximum erreicht ( $t_{max}$ ), sowie der Zeitpunkt zu dem 5 % ( $t_{5\%}$ ) und 50% ( $t_{50\%}$ ) von der gesamten <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation erreicht

werden. Der Parameter  $t_{max}$  wird ermittelt, indem die erste Ableitung von Gleichung (1) gleich Null gesetzt wird. Die Berechnung der Parameter  $t_{5\%}$  und  $t_{50\%}$  erfolgt, indem die integrierte Gleichung (1) gleich  $0.05 \times Y(t_{\infty})$  (für  $t_{5\%}$ ) bzw. gleich  $0.5 \times Y(t_{\infty})$  (für  $t_{50\%}$ ) gesetzt wird. Werte für  $t_{max}$ ,  $t_{5\%}$  und  $t_{50\%}$  wurden mit numerischen Standardverfahren (Solver, Excel 5.0) anhand der Parameter  $a_i$  und  $k_i$  berechnet.

Dieser mathematische Ansatz wurde ebenfalls zur Bestimmung der maximalen  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung im 4-Methyl-2-oxo[1- $^{13}\text{C}$ ]pentanoat ausgehend von den gemessenen Daten der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungskinetik verwendet.

#### 2.2.4.3 Statistik

Im allgemeinen sind die Ergebnisse im Text und in Tabellen als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD), in Abbildungen als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben. Korrelationen wurden mittels linearer Regressionen (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) geprüft.

### 2.3 Ergebnisse

#### Kinetik der $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation

Zur Etablierung von Normalwerten für die Kinetik der  $^{13}\text{C}$ -Markierung im  $\text{CO}_2$  der Exhalationsluft wurden zunächst orale L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustests an zehn gesunden Probanden durchgeführt. Nach oraler Gabe von  $38 \mu\text{mol L-[1-}^{13}\text{C]Leucin} \times (\text{kg KG})^{-1}$  stieg die Rate der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation rasch an (Abb. 2). Die maximale Rate der  $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung betrug im Mittel  $40.9 \pm 9.8 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  und wurde zum Zeitpunkt  $t_{max} = 55 \pm 18 \text{ min}$  erreicht (Abb. 2). Nach dem Erreichen der Maximalwerte nahm die  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation allmählich wieder ab.

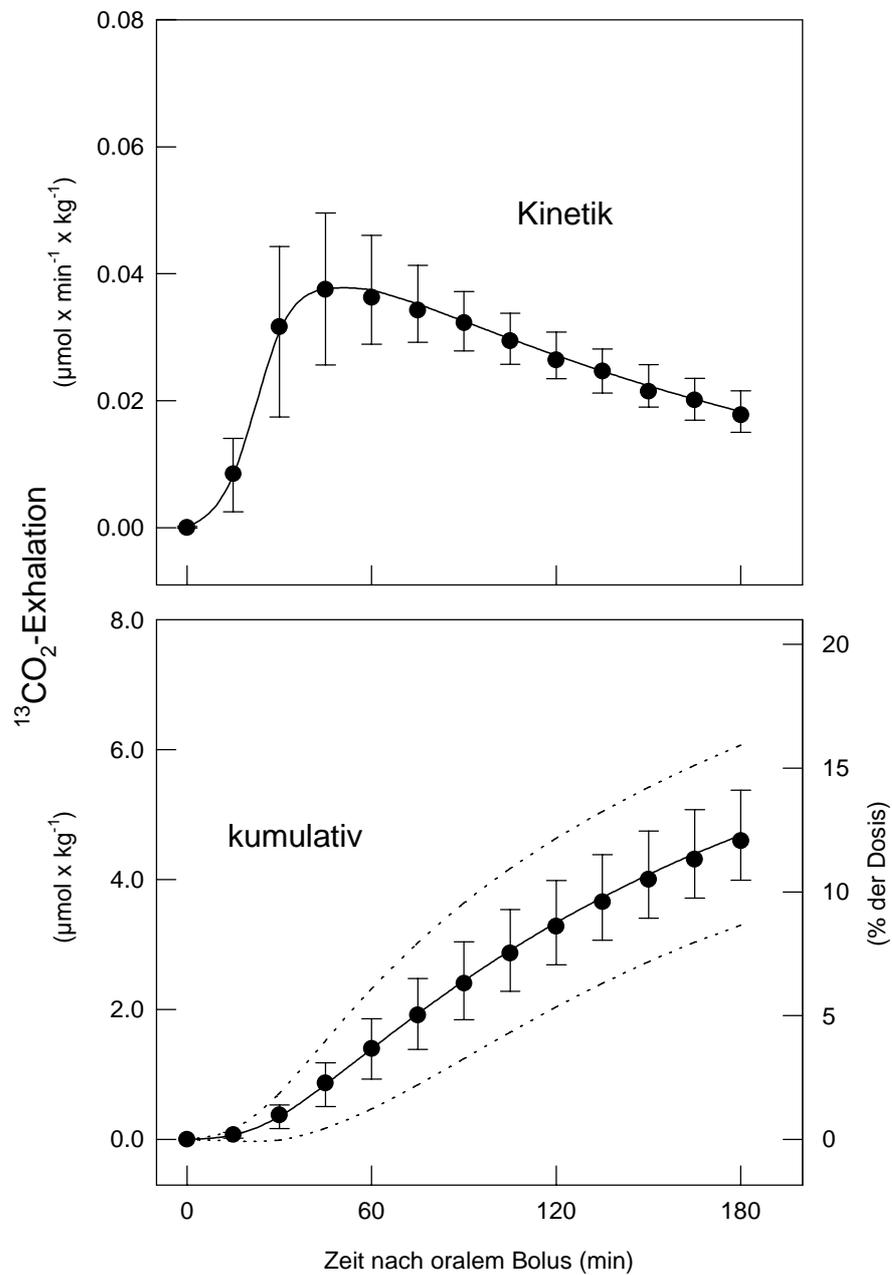


Abb. 2: Kinetik der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Abatmung (oben) und kumulative <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation (unten) gesunder Probanden (MW ± SD, n=10) nach oralem L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolus (38 µmol x (kg KG)<sup>-1</sup>). Der 95.5%-Vertrauensbereich der kumulativen <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation (entspricht ± 2 SD) ist durch die gepunkteten Linien gekennzeichnet.

Die gesamte  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation wurde ausgehend von der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationskinetik mittels nicht-linearer Regressionsverfahren abgeschätzt. Mit dem hier vorgeschlagenen mathematischen Modell war eine befriedigende Anpassung aller  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationskurven möglich ( $R^2 = 0.986 \pm 0.016$ ;  $n = 10$ ).

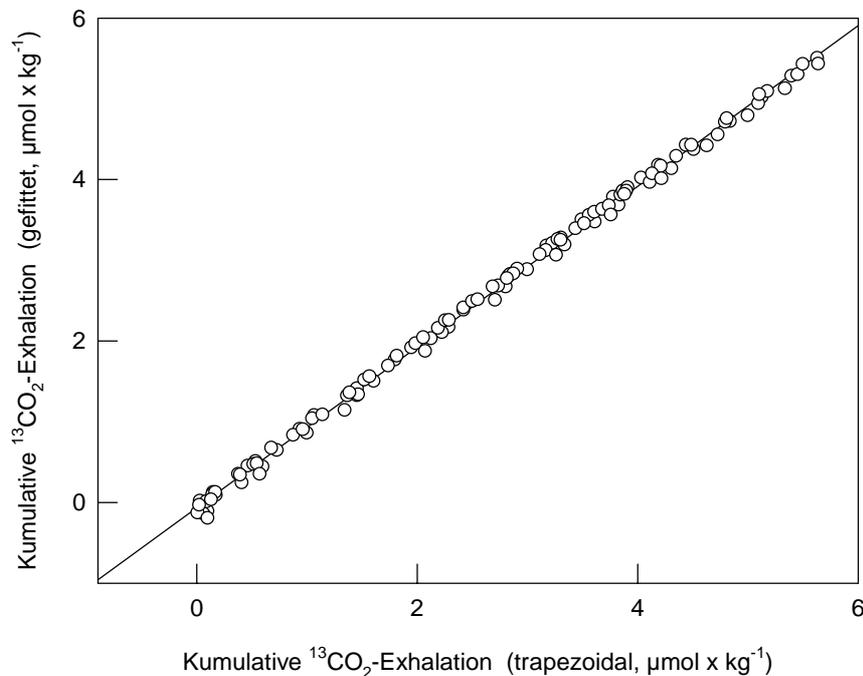


Abb. 3: Vergleich von experimentellen und gefitteten Werten für die kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation gesunder Probanden nach oralem L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolus ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ). Auf der Grundlage der während der 3stündigen Versuchsdauer gemessenen  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsraten wurden Werte für die kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation trapezoidal berechnet. Die entsprechenden gefitteten Werte für die kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation wurden anhand von nicht-linearen Regressionsverfahren berechnet. Durchgezogene Linie: Regressionslinie (Methode der kleinsten Fehlerquadrate;  $y = 1.004(\pm 0.004) x + 0.065(\pm 0.011)$ ,  $s_{y,x}=0.07$ ,  $n=120$ ,  $r > 0.9991$ ). Der Korrelationskoeffizient der individuellen Datensätze lag bei  $< 0.9998$

Zudem ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen den experimentell bestimmten Kumulativen der  $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung und der entsprechenden, anhand der angepaßten Kurve berechneten Werte (Abb. 3). Eine Zusammenstellung der Werte für die kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation ist in Tab. 2 zu finden. Die gesamte  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation lag bei  $7.2 \pm 1.4 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$  und betrug somit 20% der oral verabreichten L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Dosis. 5% und 50% dieser Menge wurden in der Ausatemungsluft innerhalb von  $t_{5\%} = 33 \pm 6$  min bzw. von  $t_{50\%} = 130 \pm 18$  min nach Bolusgabe wiedergefunden.

Tab.2: <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation nach oralem Bolus mit L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin

	1 h	Zeit nach Bolusgabe		6 h <sup>§</sup>	Gesamt <sup>13</sup> CO <sub>2</sub> - Menge <sup>§</sup>
		2 h	3 h		
	Kumulative <sup>13</sup> CO <sub>2</sub> -Exhalation (μmol x (kg KG) <sup>-1</sup> )				
Gesunde Probanden (n = 10)					
MW ± SD	1.46 ± 0.49	3.37 ± 0.68	4.69 ± 0.72	6.47 ± 0.98	7.21 ± 1.36
Bereich	0.68 - 2.29	2.42 - 4.51	3.87 - 5.64	5.20 - 8.04	5.40 - 9.89
(% der Dosis) <sup>§§</sup>	(3.9 ± 1.3)	(8.9 ± 1.8)	(12.4 ± 1.9)	(17.0 ± 2.6)	(19.0 ± 3.6)
Obligat Heterozygote					
B.S.	1.82	3.64	4.61	5.68	5.92
P.S.	1.96	3.35	4.16	5.12	5.33
O.M.	1.54	3.03	3.93	5.00	5.32
X.S.	2.72	5.10	6.46	7.86	8.17
H.Ö.	1.00	2.12	2.87	3.88	4.23
F.Ö.	2.19	3.67	4.32	4.85	4.90
MW ± SD	1.87 ± 0.58	3.49 ± 0.98	4.39 ± 1.18	5.40 ± 1.34	5.65 ± 1.36
(% der Dosis) <sup>§§</sup>	(4.9 ± 1.5)	(9.2 ± 2.6)	(11.6 ± 3.1)	(14.2 ± 3.5)	(14.9 ± 3.6)

<sup>§</sup> berechnet anhand von Gleichung (2) und (3) (s. 2.2.4.2), <sup>§§</sup> L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Dosis: 38 μmol x (kg KG)<sup>-1</sup>

Bei den untersuchten Probanden ergab sich ein hohes Maß an interindividueller Variabilität der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation. Um zu prüfen, inwieweit intraindividuelle Unterschiede zu der hohen interindividuellen Variabilität beitragen können, nahmen zwei der Probanden mehrfach an den L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustests teil. Die kumulative <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation (Abb. 4) in diesen Untersuchungen dokumentiert, daß die intraindividuelle Variabilität sogar größer war als die interindividuellen Unterschiede. Bei Proband P.S. (n = 5) wurden maximale <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalationsraten von 38.3 ± 16.0 nmol x min<sup>-1</sup> x (kg KG)<sup>-1</sup> nach  $t_{max} = 45 \pm 15$  min erreicht. Bei Proband M.H. betrug die maximale <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation 32.1 ± 7.0 nmol x min<sup>-1</sup> x (kg KG)<sup>-1</sup>. Maximalwerte wurden nach  $t_{max} = 93 \pm 26$  min erreicht. Die kumulative <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Abatmung während der 3stündigen Versuchsdauer betrug bei P.S. 4.4 ± 1.0 μmol x (kg KG)<sup>-1</sup> und bei M.H. 3.8 ± 0.7 μmol x (kg KG)<sup>-1</sup>. Die berechnete insgesamt abgeatmete Menge lag bei P.S. mit 6.4 ± 0.9 μmol x (kg KG)<sup>-1</sup> bei 16.8 ± 2.5 % der applizierten L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Dosis. Bei M.H. betrug diese <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Menge 5.9 ± 1.0 μmol x (kg

KG)<sup>-1</sup> und entsprach  $15.4 \pm 2.7$  % der applizierten Dosis. 5% bzw. 50% dieser Menge wurde bei P.S. nach  $t_{5\%} = 27 \pm 6$  min und  $t_{50\%} = 122 \pm 14$  min, bei M.H. nach  $t_{5\%} = 48 \pm 10$  min und  $t_{50\%} = 140 \pm 10$  min wiedergefunden.

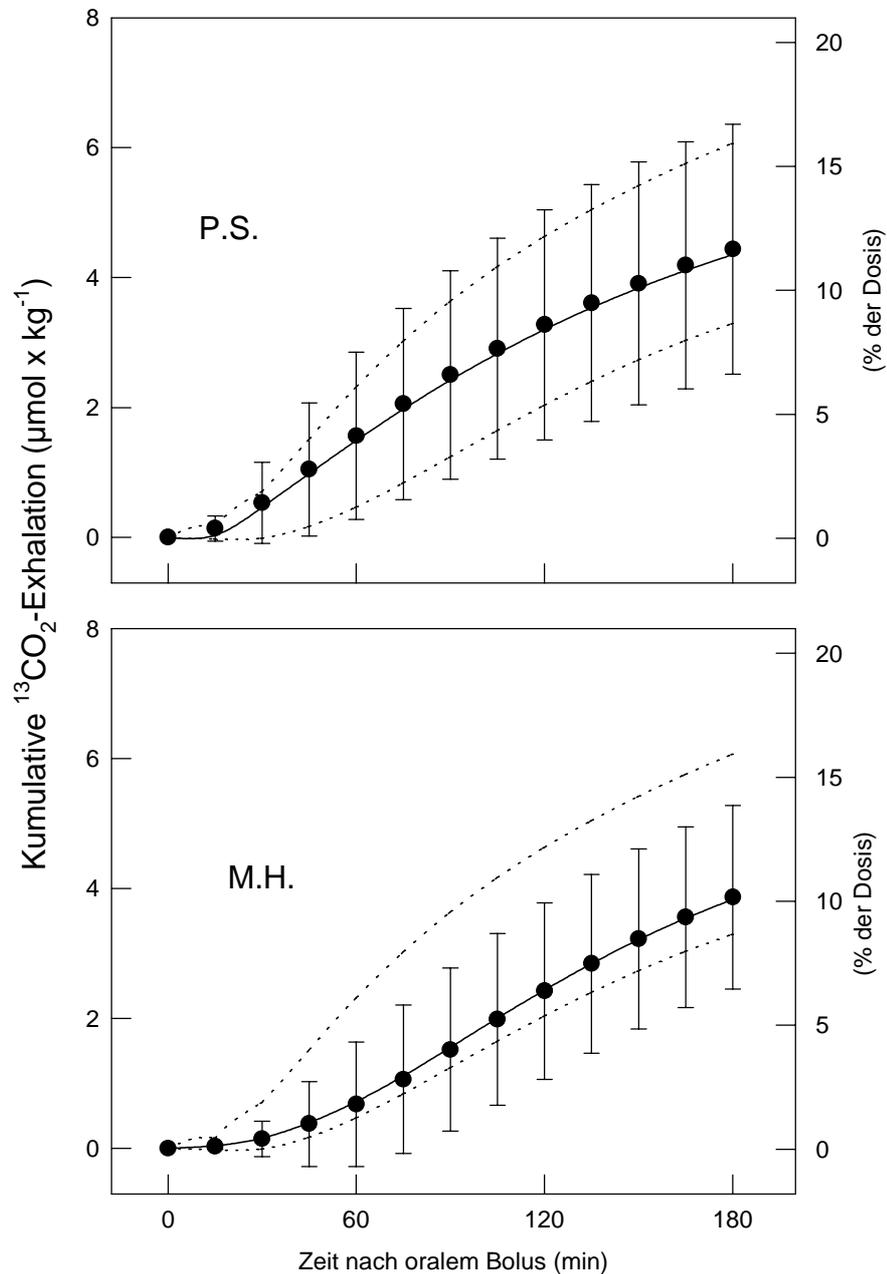


Abb.4: Intraindividuelle Reproduzierbarkeit der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation gesunder Probanden in oralen L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustests. Zwei der Probanden (oben: P.S., n = 5; unten: M.H., n = 4) nahmen mehrfach an den Untersuchungen mit  $38 \mu\text{mol L-[1-}^{13}\text{C]Leucin} \times (\text{kg KG})^{-1}$  teil. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD der kumulativen <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation. Der Kontrollbereich (MW  $\pm$  2 SD) ist zum Vergleich anhand der gepunkteten Linien dargestellt.

Bei obligat heterozygoten Eltern (n = 6) von Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit war die Kinetik der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation mit der von Normalpersonen vergleichbar (Abb. 5). Die maximale <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation wurde zur Zeit  $t_{max} = 35 \pm 8$  min erreicht und betrug  $42 \pm 12 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  (Abb.5). Die in Tabelle 2 dargestellten Befunde zeigen, daß die kumulative <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation der Heterozygoten im unteren Normbereich lag. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Normalpersonen und Heterozygoten wurden nicht festgestellt. 5% und 50% der insgesamt abgeatmete <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Menge von  $5.7 \pm 1.4 \text{ } \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$  wurden nach  $t_{5\%} = 19 \pm 3$  min und  $t_{50\%} = 95 \pm 16$  min wiedergefunden.

Bei keinem der von uns untersuchten Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit konnte ein signifikanter Anstieg der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation nach oralem L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolus festgestellt werden (Abb. 5). Bemerkenswerterweise wurde bei Patient L.U., mit nahezu normalen Leucin-Plasmaspiegeln, ein geringer und zeitlich verzögerter Anstieg der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation gefunden. Die kumulative <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Abatmung während der 3stündigen Versuchsdauer betrug  $0.04 \text{ } \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$  und lag damit bei ca. 1% der kumulative <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation gesunder Probanden. Jedoch wurde bei diesem Patienten eine vergleichbare kumulative <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Abatmung ( $0.08 \text{ } \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) auch bei einem nachfolgenden Kontrollversuch festgestellt, bei dem kein <sup>13</sup>C-markiertes Leucin, sondern nur Zitronensäurelösung verabreicht wurde. Der Anstieg der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation bei Patient L.U. war daher wahrscheinlich nicht auf die Gabe von L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin zurückzuführen, sondern auf eine im katabolen Zustand erhöhte Oxidation natürlich angereicherter Substrate.

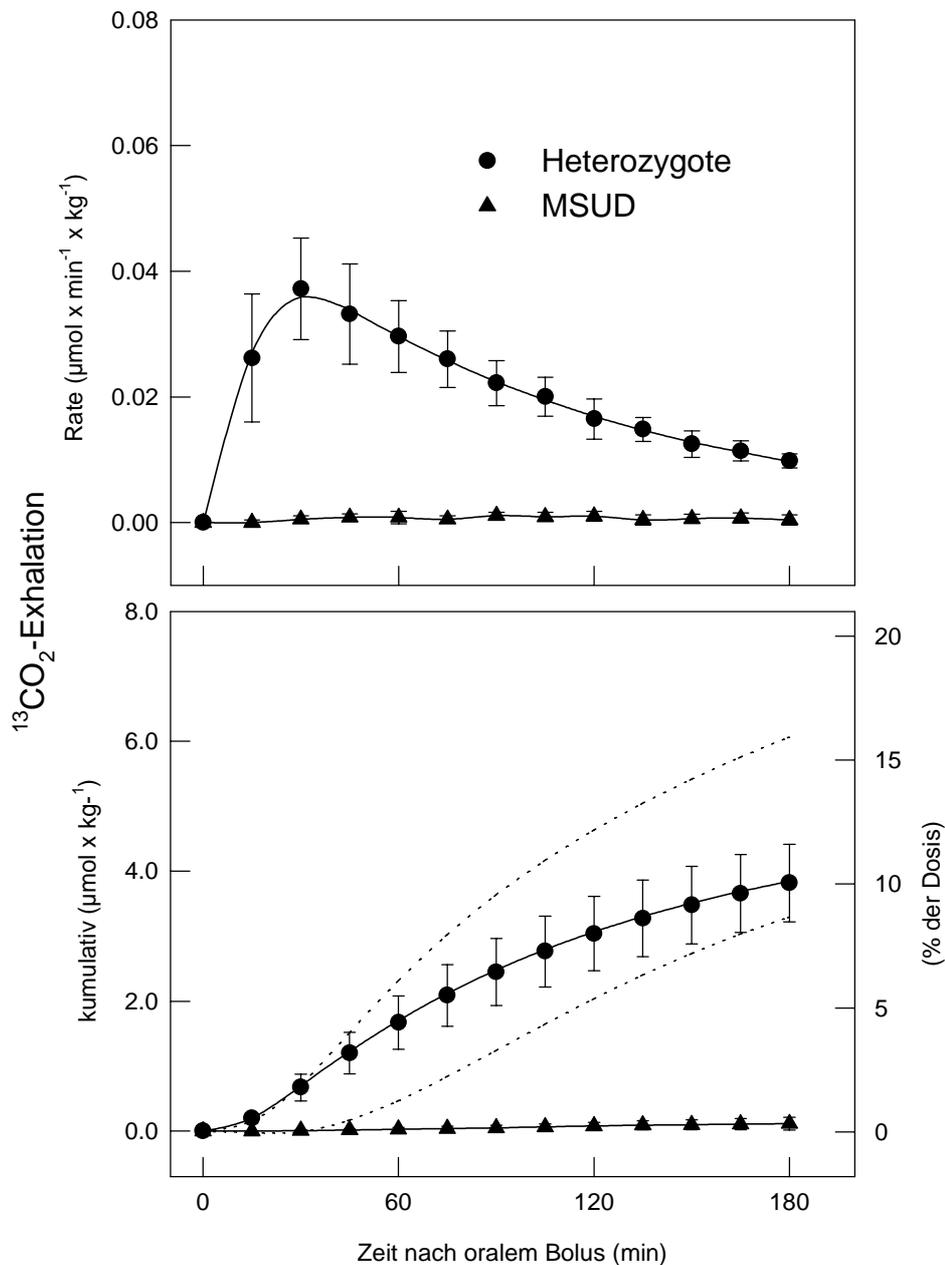


Abb.5: Kinetik der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation (oben) und kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation (unten) bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit (klassische Form,  $n = 6$ ) und obligat heterozygoten Eltern ( $n = 6$ ) nach oralem L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolus. Die applizierte Dosis betrug  $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ . In Patienten konnte kein signifikanter Anstieg der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation festgestellt werden. Ergebnisse der Heterozygoten sind als MW  $\pm$  SD dargestellt. Der Normbereich der kumulativen  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation (MW  $\pm$  2 SD, gepunktete Linie) ist zum Vergleich mit dargestellt.

### Kinetik der Plasmametabolite

Bei den gesunden Probanden und drei ahornsirupkranken Patienten war es möglich Blutproben für die Analyse der Plasmametabolite zu gewinnen. Abb. 6 zeigt den zeitlichen Verlauf der Plasmakonzentrationen der Aminosäure L-Leucin und der korrespondierenden 2-Oxosäure 4-Methyl-2-oxopentanoat bei gesunden Probanden (n=10).

Vor der Applikation des oralen Bolus lag die Leucin-Konzentration im Plasma bei  $129 \pm 23 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Die Konzentration des 4-Methyl-2-oxopentanoates betrug  $44 \pm 8 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Maximale Anstiege der Konzentrationen wurden ca. 45 Minuten nach Bolusgabe erreicht und betragen für Leucin  $+ 51 \pm 10 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  ( $\hat{=}$   $42 \pm 13 \%$ ) und für 4-Methyl-2-oxopentanoat  $+ 10 \pm 3 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  ( $\hat{=}$   $25 \pm 12 \%$ ). Am Ende der 3stündigen Versuchsdauer blieben die Konzentration von Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat gegenüber den jeweiligen Ausgangswerten leicht erhöht.

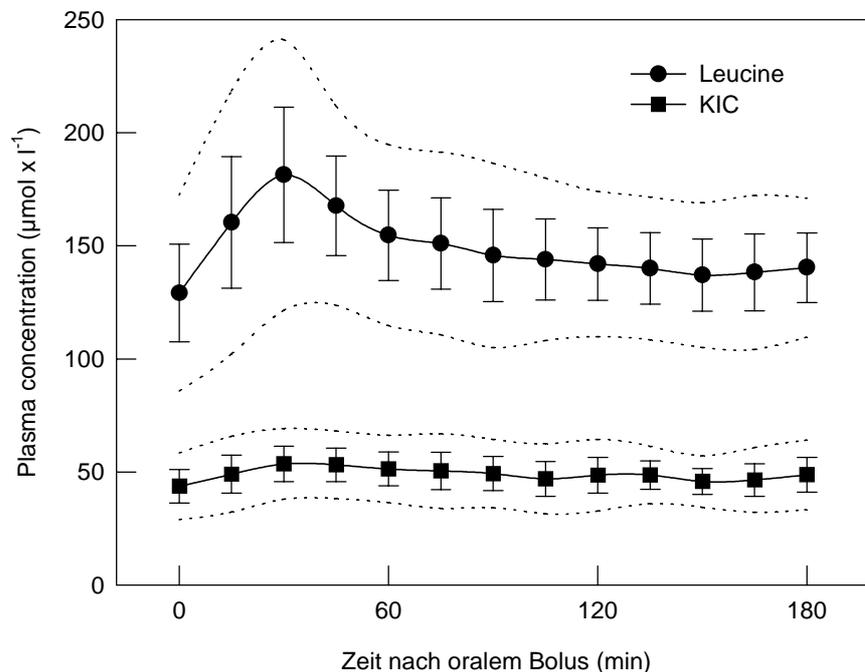


Abb. 6: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Leucin und seiner korrespondierenden 2-Oxosäure 4-Methyl-2-oxopentanoat im Plasma gesunder Probanden nach oraler Gabe von  $38 \mu\text{mol L-[1-}^{13}\text{C]Leucin} \times (\text{kg KG})^{-1}$ . Dargestellt sind MW (Punkte, n=10) mit dem  $\pm 2\text{SD}$ -Bereich (gepunktete Linien).

Die Kinetik der  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Anreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat, dem metabolischen Vorläufer der Markierung im  $^{13}\text{CO}_2$  der Ausatemungsluft, ist in Abb. 7 dargestellt. Die  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Anreicherung verlief weitgehend parallel zu der Konzentration im Plasma. Die Maximalwerte lagen bei  $16.1 \pm 3.5$  MPE, wobei die Maxima nach  $t = 36 \pm 12$  min, also  $19 \pm 11$  min (Bereich: 8 - 43 min) vor den Spitzenwerten der  $^{13}\text{C}$ -Markierung im  $\text{CO}_2$  erreicht wurden ( $p < 0.001$ ).

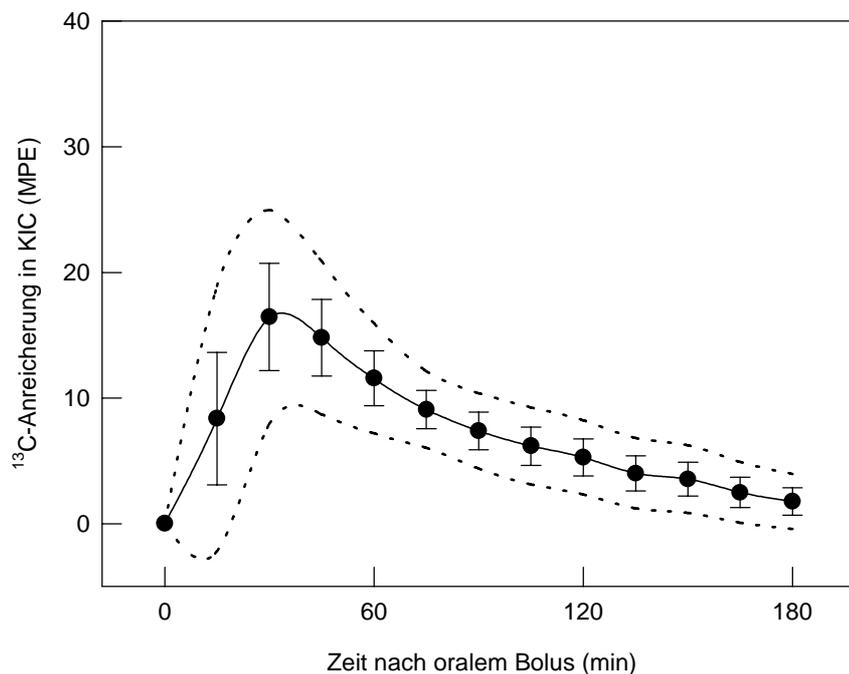


Abb.7: Zeitlicher Verlauf der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung (MPE) im Plasmametabolit 4-Methyl-2-oxopentanoat (KIC) bei gesunden Probanden nach oraler Gabe von  $38 \mu\text{mol L-[1-}^{13}\text{C]Leucin} \times (\text{kg KG})^{-1}$ . Dargestellt sind MW  $\pm$  SD (Punkte,  $n = 10$ ) mit dem 95.5%-Vertrauensbereich (gepunktete Linie).

Die Wiederholungsuntersuchungen bei den Probanden P.S. und M.H. (Abb. 8) ergaben, daß wie bei der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation, das Maß der intraindividuellen Variation bei der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat genauso groß oder größer war als die interindividuellen Unterschiede. In Übereinstimmung mit den Befunden der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation war bei M.H. der Anstieg der Plasmakonzentration von 4-Methyl-2-oxo $^{13}\text{C}$ pentanoat deutlich verzögert und abgeschwächt. Bei Normalpersonen wurde kein statistisch signifikanter

Zusammenhang zwischen der Plasma-Leucinkonzentration oder der maximalen <sup>13</sup>C-Anreicherung in der 2-Oxosäure und den inter- und intraindividuellen maximalen <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalationsraten bzw. der gesamten kumulativen <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Abatmung gefunden.

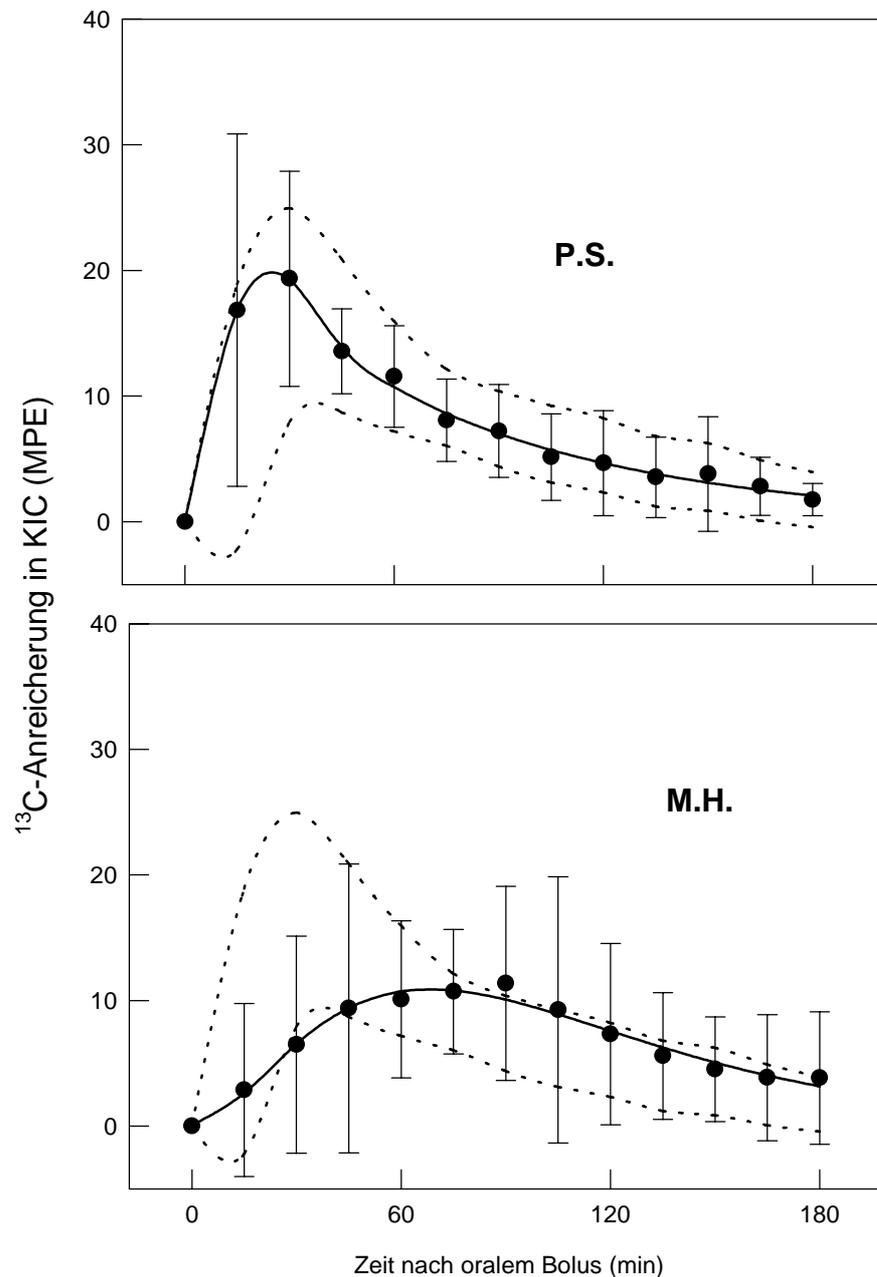


Abb.8: Intraindividuelle Variabilität im zeitlichen Verlauf der <sup>13</sup>C-Anreicherung (MPE) im Plasmametabolit 4-Methyl-2-oxopentanoat (KIC) bei zwei gesunden Probanden nach oraler Gabe von 38 μmol L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin x (kg KG)<sup>-1</sup>. Dargestellt sind MW ± SD (P.S., n = 5; M.H. n = 4). Der Kontrollbereich ist zum Vergleich mitabgebildet (gepunktete Linie).

In Abb. 9 ist die Leucin-Konzentration zusammen mit der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat bei drei Patienten mit Ahornsirupkrankheit nach oralem L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolus dargestellt. Der maximale Konzentrationsanstieg der Plasmametabolite Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat war mit dem von gesunden Probanden vergleichbar und betrug bei Leucin  $+ 54 \pm 19 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  bzw. bei 4-Methyl-2-oxopentanoat  $+ 26 \pm 12 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Die anschließende Abnahme der Leucin-Konzentration im Plasma schien von den initialen Plasmaspiegeln abhängig zu sein. Bei Patient L.U., mit normalen Plasmaspiegeln und ohne meßbare  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation nach Bolusgabe, wurden am Ende der 3stündigen Versuchsdauer annähernd die Kontrollwerte (Werte vor der oralen L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Applikation) wieder erreicht. Bei den anderen beiden Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit waren die Leucin-Plasmaspiegel bereits vor der Bolusgabe deutlich erhöht. Die Plasmaspiegel blieben hier bis zum Ende des Experimentes konstant bei erhöhten Werten (Patient D.G.) oder stiegen im Verlauf des Experimentes weiter an (Patient J.F.). In diesem Zusammenhang erwähnenswert ist, daß die renale Clearance der Leucin-Kohlenstoffkörper bei Kontrollpersonen und Patienten mit Ahornsirupkrankheit sehr gering war (Tab. 3) und daher Verluste über den Urin für die Leucin-Plasmakinetik nicht von Bedeutung sein konnten.

Tab. 3: Renale Ausscheidung nach oraler Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin

Metabolit	Kontrollen	Patienten mit Ahornsirupkrankheit	
	(MW $\pm$ SD, n = 10)	J.F.	L.U.
	Renale Clearance- Rate ( $\text{ml} \times \text{min}^{-1} \times 1.72 \text{ m}^{-2}$ )		
Leucin	$0.27 \pm 0.08$ (0.10 - 0.40) <sup>#</sup>	0.26	0.37
4-Methyl-2-oxopentanoat	$0.27 \pm 0.16$ <sup>##</sup> (0.17 - 0.50) <sup>#</sup>	0.53	0.30
Creatinin	$160 \pm 35$ (113 - 243) <sup>#</sup>	143	163
	Renale Ausscheidung ( $\mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) <sup>§</sup>		
Leucin, frei	$0.10 \pm 0.04$ (0.26 $\pm$ 0.11) <sup>§§</sup>	0.43 (1.12) <sup>§§</sup>	0.06 (0.30) <sup>§§</sup>
Leucin, gebunden <sup>§§§</sup>	$0.30 \pm 0.09$	0.48	0.14
4-Methyl-2-oxopentanoat	$0.02 \pm 0.01$ <sup>##</sup>	0.68	0.05

<sup>#</sup> Bereich; <sup>##</sup> n = 5; <sup>§</sup> während der 3.5stündigen Versuchsdauer; <sup>§§</sup> % der verabreichten Dosis ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ); <sup>§§§</sup> Menge, freigesetzt durch salzsaure Hydrolyse

Die maximale <sup>13</sup>C-Anreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat betrug bei Patient L.U. 16.4 MPE, bei J.F. 6.9 MPE und bei D.G. 6.1 MPE, bei initialen Plasmaspiegeln von 136  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (L.U.), 430  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (J.F.) und 450  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (D.G.) Die in vivo-Verdünnung der verabreichten <sup>13</sup>C-Markierung war somit positiv korreliert mit den Leucin-Plasmaspiegeln.

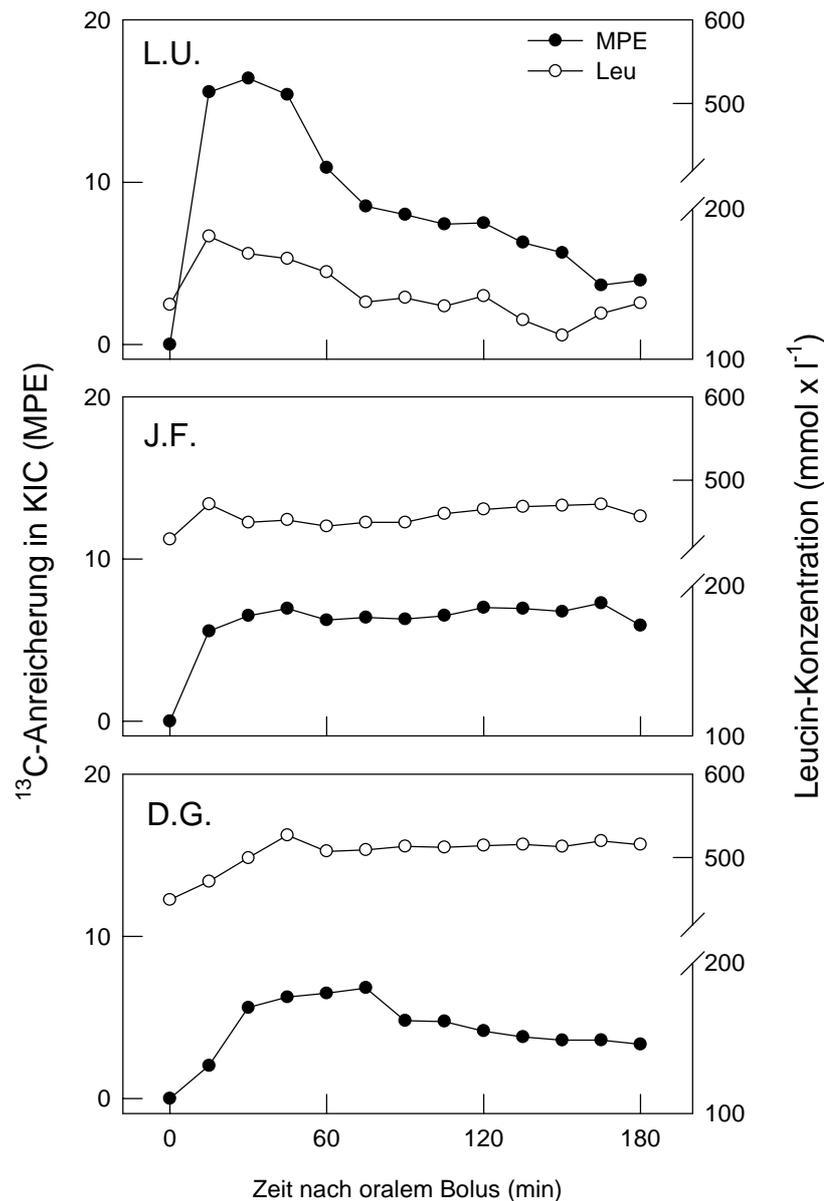


Abb.9: Zeitlicher Verlauf der Leucin-Konzentration und der <sup>13</sup>C-Anreicherung in der korrespondierenden 2-Oxosäure 4-Methyl-2-oxopentanoat (KIC) im Plasma von drei ahornsirupkranken Patienten (klassische Form) nach oraler Gabe von 38  $\mu\text{mol}$  L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin x (kg KG)<sup>-1</sup>.

## 2.4 Diskussion

Bei den vorliegenden Experimenten wurde ein im Vergleich zu *Elsas et al.* (1993) kürzerer Untersuchungszeitraum von 3 Stunden gewählt. Zum einen ist bei den Probanden und Patienten die Bereitschaft zur Teilnahme an einer zeitlich ausgedehnteren Untersuchung sehr gering. Zum anderen wäre es sehr schwierig, wenn nicht unmöglich gewesen, gerade bei den invasiven Untersuchungen der Kinder die experimentellen Bedingungen tatsächlich über einen Zeitraum von 6 Stunden konstant zu halten. Darüber hinaus ist in einem leicht katabolen Zustand, nach Übernachtfasten, der Proteinabbau und damit die Freisetzung von verzweigtkettigen L-Aminosäuren erhöht. Durch den hier verwendeten kürzeren Untersuchungszeitraum wird das Risiko einer zusätzlichen Akkumulation der verzweigtkettigen L-Amino- und 2-Oxosäuren in Blut und anderen Körperflüssigkeiten ahornsirupkranker Patienten vermindert.

Bei allen untersuchten Parametern wurde ein klarer zeitlicher Verlauf beobachtet. Die 3stündige Versuchsdauer war also für die Charakterisierung der Kinetik des  $^{13}\text{C}$ -Einbaus in Plasmametabolite und  $\text{CO}_2$  der Ausatemluft geeignet. Die Evaluierung der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation erfolgte anhand eines mathematischen Modells über nicht-lineare Regressionsverfahren. Die Übereinstimmung zwischen den anhand des Modells berechneten und den gefundenen  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsraten war gut. Darüber hinaus wurde eine hohe Korrelation zwischen den konventionell, mit Trapezoidal-Verfahren berechneten kumulativen  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationswerten und den entsprechenden anhand des Modells vorrausberechneten Ergebnissen gefunden. Das hier dargestellte Verfahren erlaubt also eine zuverlässige Bestimmung der  $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung.

Den Berechnungen zufolge entspricht die kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation bei gesunden Kontrollpersonen während der ersten 6 Stunden nach Bolusgabe ca. 17% der applizierten  $^{13}\text{C}$ -Dosis und betrug damit > 90% der gesamten -Bolus-induzierten -  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation. Vergleichbare Befunde wurden in den 6stündigen Untersuchungen von *Elsas et al.* (1993) gefunden. Insgesamt

werden etwa 20% des verabreichten L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolus oxidativ abgebaut. Das ist vergleichbar mit den Befunden aus primed-continuous infusion Experimenten, bei denen übereinstimmend gefunden wurde, daß die Oxidation ca. 20% des Gesamtkörper-Leucinfluxes im postabsorptiven Zustand ausmacht und der Anteil der Proteinsynthese ca. 80% beträgt (Zusammenstellung der Literatur-Befunde s. Tab. 4).

In Untersuchungen an klinisch gut definierte Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit sollte geprüft werden, ob nach der Gabe des L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolus bei diesen am schwersten betroffenen Patienten ein spezifischer Anstieg der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation festzustellen ist.

Die Befunde anderer Autoren zur in vivo Leucin-Oxidation von Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit sind zum Teil widersprüchlich. In den primed continuous infusion-Experimenten von *Collins et al. (1987)* lag die Ganzkörper-L-Leucinoxidation der drei untersuchten Patienten zwischen 22 und 43% der von Kontrollpersonen. *Thompson et al.* berichteten über meßbare Oxidationsraten (16% der Kontrollen) bei einem von vier (1990a), bei drei (8-24% der Kontrollen) von sieben (1991) und bei einem (5% der Kontrollen) von zwei Patienten (1990b). *Elsas et al. (1993)* haben in nicht-invasiven L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Atemtests variable Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten bei Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit gefunden. Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen bei keinem der sechs untersuchten ahornsirupkranken Patienten ein signifikanter Anstieg der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation festgestellt werden.

Zur Klärung der Frage ob und inwieweit die Sensitivität des experimentellen Ansatzes für eine nicht feststellbaren Anstieg der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation von Bedeutung sein könnte, wurde die Sensitivität des Testverfahrens wie folgt abgeschätzt: Der limitierende Faktor für die Bestimmung der residualen Leucin-Oxidation bei Ahornsirupkrankheit ist die Bestimmung der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation über basal. Die natürliche intraindividuelle Variabilität der basalen <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Abatmung liegt bei ca. ± 0.7 δ-Werten (*Schoeller et al., 1977*). Die untere

Tab.4: Synopsis publizierter Daten zum in vivo Leucin-Metabolismus gesunder Probanden im postabsorptiven Zustand \*

<i>Referenz</i>	<i>OLD **</i>	<i>NOLD §</i>	<i>Flux #</i>	<i>Referenz</i>	<i>OLD **</i>	<i>NOLD §</i>	<i>Flux #</i>	<i>Referenz</i>	<i>OLD **</i>	<i>NOLD §</i>	<i>Flux #</i>
Matthews et al. (1980)	20.0	80.0	100.0	Bennet et al. (1990a)	28.2	114.0	142.2	Feo et al. (1994)	17.4	129.6	147.0
Matthews et al. (1981)	10.6	78.5	89.1	Bennet et al. (1990b)	19.0	100.0	119.0	Fong et al. (1994)	16.0	77.0	93.0
Motil et al. (1981a)	16.1	78.6	94.7	Carli et al. (1990)	20.0	75.0	95.0	Hiramatsu et al. (1994)	16.5	102.9	119.4
Motil et al. (1981b)	22.4	89.3	111.7	Devlin et al. (1990)	19.0	103.0	122.0	Lariviere et al. (1994)	26.4	94.2	126.0
Rennie et al. (1982)	14.0	92.0	106.0	Hartl et al. (1990)	27.0	78.6	105.6	Luzi et al. (1994)	17.0	72.4	89.4
Robert et al. (1982)	24.0	70.0	94.0	Horber et al. (1990)	28.2	89.4	117.6	Petrides et al. (1994)	15.0	90.0	105.0
Wolfe et al. (1982)	22.8	73.2	96.0	Luzi et al. (1990)	11.0	57.0	68.0	Quevedo et al. (1994)	33.5	105.6	132.1
Meguid et al. (1983)	25.0	100.0	125.0	Matthews et al. (1990)	20.9	94.9	115.8	Welle et al. (1994)	30.0	113.0	143.0
Nair et al. (1983a)	13.0	68.0	81.0	Caballero et al. (1991)	13.0	95.0	108.0	Brillon et al. (1995)	20.3	88.1	108.4
Nair et al. (1983b)	15.0	70.0	85.0	Cobelli et al. (1991)	22.4	109.7	132.0	Carbonell et al. (1995)	21.0	87.4	108.4
Staten et al. (1984)	15.9	70.7	86.6	Hoerr et al. (1991)	22.0	108.0	130.0	Cayol et al. (1995)	28.8	57.6	86.4
Wolfe et al. (1984)	22.8	87.0	109.8	Knapik et al. (1991)	20.0	76.8	96.8	Garrel et al. (1995)	21.0	108.0	129.0
Hoffer (1985)	12.8	69.6	82.4	Beaufrière et al. (1992)	22.2	100.2	122.4	Giordano et al. (1995)	18.6	94.2	112.8
Schwenk et al. (1985)	24.6	97.2	121.8	Heslin et al. (1992)	23.0	125.0	148.0	Lamont et al. (1995)	24.2	132.2	156.4
Meguid et al. (1986)	21.0	68.0	89.0	Inchiostro et al. (1992)	10.0	110.0	120.0	Louard et al. (1995)	16.7	103.3	129.3
Tessari et al. (1986)	18.6	88.8	107.4	Klein et al. (1992)	35.4	132.0	167.0	Macallan et al. (1995)	21.0	82.3	103.4
Umpleby et al. (1986)	11.0	98.0	109.0	Lariviere et al. (1992)	9.0	77.0	86.0	Mauras et al. (1995)	21.0	113.4	134.4
Nair et al. (1987a)	16.2	66.6	82.8	McCullough et al. 1992)	20.5	101.5	122.0	Tessari et al. (1995)	32.4	120.6	153.6
Nair et al. (1987b)	16.0	73.0	89.0	Arnold et al. (1993)	13.2	57.1	70.2	Welle et al. (1995)	28.6	95.7	117.0
Cortiella et al. (1988)	14.9	139.0	154.0	Elahi et al. (1993)	8.0	132.4	140.4	Balagopal et al. (1997)	27.6	80.8	108.4
Jensen et al. (1988)	22.8	81.0	103.8	Flakoll et al. (1993)	13.8	75.0	89.4	Hankard et al. (1997)	21.0	96.0	116.4
Beaufrière et al. (1989)	15.0	85.8	100.8	Carlson et al. (1994)	16.2	74.0	90.2	Maroni et al. (1997)	16.3	41.6	55.7
Crowe et al. (1989)	16.3	82.0	98.4	Collin-Vidal et al. (1994)	16.8	67.8	84.6	eigene Befunde	21.7	97.6	119.3
Fukagawa et al. (1989)	22.0	94.0	116.0	Copeland et al. (1994)	35.0	93.0	128.0	<b>Mittelwert</b>	<b>20.0</b>	<b>90.1</b>	<b>110.1</b>

---

Melville et al. (1989)	19.9	71.8	89.5	Darmaun et al. (1994)	25.3	86.0	111.4	<b>SD</b>	<b>± 6.1</b>	<b>± 19.9</b>	<b>± 22.4</b>
------------------------	------	------	------	-----------------------	------	------	-------	-----------	--------------	---------------	---------------

---

\*Angaben in  $\mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ ; \*\* Oxidationsrate (oxidative leucine disposal); <sup>§</sup> Proteinsyntheserate (nonoxidative leucine disposal); <sup>#</sup> proteolytische Leucinfreisetzungsrate

Grenze für eine verlässliche Messung des  $^{13}\text{CO}_2$  ist daher ein Anstieg von mindestens 1 $\delta$ -Wert über basal (DOB) in der Ausatemungsluft. Bei einer mittleren  $\text{CO}_2$ -Produktion unter Ruhebedingungen von  $120 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ , liegt die benötigte  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation bei  $1.3 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ . Da etwa 20% des  $^{13}\text{CO}_2$  nicht mit der Ausatemungsluft freigesetzt werden (*Irving et al., 1983; Saccomani et al., 1995*), ergibt sich eine untere Nachweisgrenze für die endogene  $^{13}\text{CO}_2$ -Produktion von  $1.5 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  über basal.

Dem reciprocal pool-Modell zufolge kann die Ganzkörper-L-Leucinoxidation (WBLO) anhand der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation und der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat ( $^{13}\text{C}$ -KIC) des Plasmas als  $\text{WBLO} = \frac{^{13}\text{CO}_2\text{-Exhalation}}{^{13}\text{C-KIC}}$  bestimmt werden (*Schwenk et al., 1985*). Der mittlere Literatur-Wert für die Ganzkörper-L-Leucinoxidation gesunder Probanden nach Übernachtfasten ( $\text{WBLO}_{\text{Kontrolle}}$ ) liegt bei  $334 \pm 101 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  ( $n=72$ ; s. Tab. 4). Die Sensitivität des Testverfahrens ( $S$ , in % der  $\text{WBLO}_{\text{Kontrolle}}$ ) kann daher näherungsweise anhand des minimal notwendigen Anstiegs der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation wie folgt abgeschätzt werden:

$$S = \left( \frac{1.5}{^{13}\text{C-KIC}} \right) \times \frac{1}{\text{WBLO}_{\text{Kontrolle}}} \times 100$$

Diese analytische Sensitivität kann erreicht werden, wenn die Isotopenanreicherung im  $\text{CO}_2$  und im 4-Methyl-2-oxopentanoat über einen Zeitraum konstant bleibt, der eine multiple Probenentnahme erlaubt, wie dies z.B. bei steady state-Untersuchungen der Fall ist. Bei nicht-steady state-Verfahren wie den Bolustests kann die Sensitivität etwas geringer sein, da sich die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung mehr oder weniger schnell ändert. Aufgrund der im Vergleich zu Erwachsenen höheren  $\text{CO}_2$ -Bildung pro kg, kann die Sensitivität bei Kleinkindern und Kindern weiter vermindert sein.

Bei den Patienten mit Ahornsirupkrankheit betragen die Maximalwerte der Isotopenanreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat 16.1 MPE, Patient L.U., 6.9 MPE, Patient J.F. und 6.1 MPE, Patientin D.G.. Die untere analytische Detektionsgrenze der in vivo L-Leucinoxidation betrug demnach bei Patient

L.U. 5% bzw. bei Patient J.F. und Patientin D.G. 10% der Oxidation gesunder Probanden.

Die experimentellen Daten zur <sup>13</sup>C-Anreicherung in den Plasmametaboliten bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit deuten darauf hin, daß ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Verdünnung des applizierten L-[1-<sup>13</sup>C]Leucins und den Plasma-Leucinkonzentrationen besteht. Die Plasmaspiegel des 4-Methyl-2-oxopentanoats sind offenbar für die Isotopenverdünnung von untergeordneter Bedeutung. Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß die extrazellulären Leucinspiegel nur geringfügig niedriger sind als die intrazellulären Spiegel (*Bergström et al., 1974; Askanazi et al., 1980; Hutson & Harper, 1981*) und die Konzentration der korrespondierenden 2-Oxosäure dagegen wahrscheinlich im Plasma deutlich höher ist als im Cytosol (*Walser et al., 1973; Hutson & Harper, 1981; Livesey & Lund, 1982; Matsuo et al., 1993*). Daher spiegelt die extrazelluläre Leucin-Konzentration den gesamten Körper-Pool besser wieder als 4-Methyl-2-oxopentanoat oder die Summe von beiden.

Daraus kann abgeleitet werden, daß bei ahornsirupkranken Patienten mit einer Plasma-Leucinkonzentration von ungefähr  $1 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$  (s. Tab.1) der durch den Bolus induzierte Anstieg der Markierung im 4-Methyl-2-oxopentanoat bei ca. 3 MPE liegen dürfte. Die untere Detektionsgrenze für die in vivo L-Leucinoxidation wäre somit auf 15 % der Oxidation gesunder Probanden reduziert. Da generell angenommen wird, daß die residuale Ganzkörper-L-Leucinoxidation bei diesen Patienten deutlich unter 5% der von gesunden Probanden liegt (*Chuang & Shih, 1995*), dürfte eine Bestimmung der Restaktivität bei diesen Patienten nicht möglich sein.

Diese Überlegungen weisen darauf hin, daß die Sensitivität der in vivo Leucinoxidationsmessung von der applizierten Menge des markierten Substrates und der Metabolitkonzentration im Plasma entscheidend beeinflusst wird, unabhängig davon, ob der steady state (primed continuous infusion)- oder der Kompartiment (Bolus)-Ansatz angewendet wird.

Der Kontrollversuch (ohne Applikation von L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin) bei Patient L.U. macht deutlich, daß geringe Anstiege der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation nur dann tatsächlich auf eine Oxidation des verabreichten L-[1-<sup>13</sup>C]Leucins zurückzuführen sind, wenn Interferenzen durch den Abbau natürlich angereicherter Substrate aus endogenen Quellen ausgeschlossen sind.

Basierend auf den vorliegenden Untersuchungen läßt sich nicht sagen, daß die untersuchten Patienten tatsächlich keinerlei Restaktivität der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase haben. Es ist lediglich möglich die individuelle Grenze für die Detektion der residualen Ganzkörper-L-Leucinoxidation abzuschätzen. Bevor dieser Versuchsansatz zur Überprüfung therapeutischer Maßnahmen, wie z.B. Thiamin-Gabe, angewendet wird, ist es dringend erforderlich die Wiederholbarkeit der Bestimmung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation zu prüfen.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden nicht-invasive L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Tests bei heterozygoten Eltern von Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit durchgeführt. Bei diesen Eltern wäre, aufgrund der Heterozygotie, gegebenenfalls eine Reduktion der in vivo Leucin-Oxidation zu erwarten gewesen. Obligate Heterozygote unterschieden sich jedoch weder bezüglich der Kinetik <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Abatmung noch hinsichtlich der gesamten <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation vom Kontrollkollektiv (s. Abb. 5)

Bei allen Heterozygoten wurde eine im Vergleich zu den Kontrollpersonen eher beschleunigte <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation gefunden. Es ist jedoch unwahrscheinlich (s. unten), daß eine leichte Einschränkung der L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Oxidation deutliche Effekte auf den zeitlichen Verlauf der Markierung im CO<sub>2</sub> der Exhalationsluft haben kann.

Die Tests bei Heterozygoten fanden zuhause, nicht-invasiv, in sitzender Position statt. Im Gegensatz dazu wurden die Kontrollpersonen invasiv unter Ruhebedingungen im Liegen untersucht. Die leichte Beschleunigung der

<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation bei Heterozygoten dürfte daher auf eine beschleunigte gastrointestinale Passage des markierten Substrates und / oder auf eine gesteigerte CO<sub>2</sub>-Produktion zurückzuführen sein.

Den Befund von *Elsas et al. (1993)*, daß sich sowohl Patienten mit Ahornsirupkrankheit als auch obligat Heterozygote durch einen verzögerten Beginn der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation auszeichnen, konnte nicht bestätigt werden. In den vorliegenden Untersuchungen wurde die deutlichste Verzögerung bei einem gesunden Probanden (M.H.) beobachtet, wohingegen keiner der Heterozygoten eine Verzögerung in der Kinetik der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation aufwies.

Um die Faktoren zu definieren, die zu einer Verzögerung der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Abatmung führen können, wurden anhand eines mathematischen Simulationsmodell physiologisch bedeutsame Parameter variiert (P. S., A.B.-L.). Die Berechnungen zeigen, daß die Form der Exhalationskurve durch folgende Hauptfaktoren bestimmt wird: (1) die Rate der gesamten CO<sub>2</sub>-Exhalation, (2) die Rate der gastrointestinalen Passage, Resorption und Transaminierung, (3) die Proteinsynthese-Rate und (4) die Größe des beteiligten CO<sub>2</sub>-Pools. Die Größe der in vivo Leucin-Oxidationsrate hatte jedoch nur einen geringen Einfluß. Eine verzögerte <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation kann hauptsächlich durch eine verringerte CO<sub>2</sub>-Exhalation, sowie eine verlangsamte gastrointestinale Passage, Resorption und Transaminierung der markierten Substanz verursacht werden. In geringerem Ausmaß können auch eine herabgesetzte Proteinsyntheserate und vergrößerte CO<sub>2</sub>-Pools eine gewisse Rolle spielen.

Im Gegensatz dazu wird die Menge des abgeatmeten <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> beeinflusst durch (1) die Rate der in vivo L-Leucinoxidation, (2) die Größe des Leucin-Pools und in geringerem Ausmaß durch (3) die Rate der Proteinsynthese. Eine Verringerung der maximalen <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalationsrate wird primär durch eine reduzierte Leucin-Oxidation und / oder vergrößerte Leucin-Pools verursacht. In vivo können diese Effekte zumindest teilweise durch ein erhöhtes Substratangebot für die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase und /

oder eine Erhöhung des Aktivitätsstatus des Enzymkomplexes (*Chuang & Shih, 1995*) kompensiert werden.

Es kann davon ausgegangen werden, daß bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit und ihren heterozygoten Eltern mit Ausnahme des defekten Gens und der eventuell erhöhten Plasmaspiegel der verzweigtkettigen L-Aminosäuren (bei Patienten) die Hauptfaktoren, die eine Verzögerung der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation bewirken können, im Normalbereich liegen. Eine Einschränkung der in vivo L-Leucin-Oxidation würde also an einer Verminderung der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation erkannt werden können. Eine solche Verminderung wurde jedoch bei Heterozygoten weder in der vorliegenden Untersuchung, noch von *Elsas et al. (1993)* beobachtet. Daher scheinen Heterozygote eine normale Ganzkörper-L-Leucinoxidation zu haben, die möglicherweise im unteren Normbereich liegt. Ob bei den Eltern der Patienten der funktionelle Ausfall des defekten Gens in vivo z.B. durch eine verstärkte Expression des intakten Gens oder eine Erhöhung des Aktivitätsstatus des intakten verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes kompensiert wird, ist nicht bekannt.

Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, daß eine Verzögerung der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation nach oralem L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolus kein spezifischer Indikator für das Vorliegen einer Ahornsiruperkrankung oder der Heterozygotie ist.

Bei den in vivo Experimenten wurde mit Ausnahme der  $\text{CO}_2$ -Exhalation bei allen analysierten Parametern eine bemerkenswerte interindividuelle Variabilität festgestellt (s. Tab. 2, Abb. 2, 7). Interessanterweise wurde bei den oben zitierten primed-continuous infusion-Experimenten durchgängig ein vergleichbares Maß an interindividueller Variabilität gefunden. Diese hohe Variabilität war nicht völlig unerwartet, da der Leucin-Flux in vivo durch zahlreiche Faktoren beeinflusst wird. So haben z.B. der Ernährungszustand (*Welle et al., 1994; Carbonel et al., 1995; Macallan et al., 1995*), zahlreiche Hormone wie z.B. Insulin (*Collins et al., 1987; Petrides et al., 1994; Welle et al., 1994; Giordano et al., 1995*), Glucagon (*Nair et al., 1987a; Hartl et al., 1990*),

Glucokortikoide (*Beaufriere et al., 1989*) und Wachstumshormone (*Copeland & Nair, 1994*), andere Aminosäuren (*Gelfand et al., 1988*), und körperliche Aktivität (*Copeland & Nair, 1994; Lamont et al., 1995; Welle et al., 1995*) einen Einfluß auf den Leucin-Flux.

Etwas unerwartet war dagegen der Befund, daß die intraindividuelle Variabilität der analysierten Parameter genauso groß bzw. größer war als die interindividuellen Unterschiede (s. Abb. 4, 8). Bei den Untersuchungen zur intraindividuellen Variabilität blieben die Ernährungsgewohnheiten der Probanden während des gesamten Untersuchungszeitraumes (3-4 Monate) konstant. Die Teilnehmer befanden sich in einem guten Gesundheitszustand und wurden jedesmal unter identischen Versuchsbedingungen untersucht. Interessanterweise war bei Proband M.H. die Kinetik der Isotopenanreicherung in den Plasmametaboliten und im CO<sub>2</sub> der Exhalationsluft nach oralem L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolus verzögert. Ursache war höchst wahrscheinlich eine verlangsamte gastrointestinale Passage. Eine verzögerte Absorption ist eher unwahrscheinlich, da die intestinale Kapazität des Carrier-vermittelten Transportes der verzweigtkettigen L-Aminosäuren sehr hoch ist (*Snyderman et al., 1964; Schadewaldt et al., 1990*). Da der Leucin-Metabolismus in vivo durch zahlreiche Faktoren beeinflusst wird, konnten keine weiteren spezifischen Ursachen für die inter-und intraindividuelle Variabilität beider untersuchten Probanden identifiziert werden.

Die hohe intraindividuelle Variabilität des Leucin-Metabolismus ist wahrscheinlich nicht nur auf die Kontrollpersonen beschränkt, sondern dürfte entsprechend auch bei Heterozygoten und ahornsirupkranken Patienten auftreten. Es ist daher erforderlich eingehend zu überprüfen, ob beobachtete Effekte nach therapeutischen Interventionen, wie z.B. Thiamin-Gabe (*Scriver et al., 1971; Scriver et al., 1985; Ellerine et al., 1993*), nicht letztlich auf die normalen interindividuellen Unterschiede des Leucin-Metabolismus zurückzuführen sind.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß der von Elsas et al. (1993) vorgeschlagene nicht-invasive Atemtest mit oraler Gabe von L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin nur begrenzt Informationen zur Ganzkörper-L-Leucinoxidation liefert. Gerade bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit führen die vergrößerten verzweigtkettigen L-Amino- und 2-Oxosäure-Pools zu einer deutlich stärkeren, nicht eindeutig vorausbestimmbaren Isotopenverdünnung und damit zu einer reduzierten Sensitivität des Testverfahrens. Eine Entnahme von Blutproben zur Bestimmung der Isotopenanreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat ist für die Erfassung dieser Isotopenverdünnung und somit für eine zuverlässige Bestimmung der in vivo L-Leucin-Oxidation unerlässlich. Vorläufige Befunde einer Kompartiment-Analyse weisen darauf hin, daß der L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustest in der invasiven Form geeignet sein dürfte, die residuale L-Leucin-Oxidation bei Patienten mit unterschiedlich schwerer Form der Ahornsirupkrankheit zu erfassen (Cobelli et al., 1991; Bodner et al., 1996).



## Kapitel 3

# Ganzkörper-L-Leucinoxidation bei Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit

**Zusammenfassung.** Ziel dieser Untersuchung war die Bestimmung des in vivo Schweregrades bei Patienten mit unterschiedlicher klinischer Form der Ahornsirupkrankheit. Dazu wurde bei einer repräsentativen Anzahl von Patienten mit klassischer (n = 4; weiblich/männlich, 2/2;  $13 \pm 4$  (7-17) Jahre) und erstmals auch mit varianter Form der Erkrankung (n = 8; weiblich/männlich, 4/4;  $14 \pm 9$  (5-34) Jahre) die Ganzkörper-L-Leucinoxidationsrate ermittelt. In oralen Bolus-Tests mit L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg Körpergewicht})^{-1}$ ) wurde die Kinetik der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den Plasmametaboliten L-Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat sowie im  $\text{CO}_2$  der Exhalationsluft bestimmt. Die residuale in vivo L-Leucinoxidationsrate wurde aus der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation unter Berücksichtigung der endogenen Isotopenverdünnung im 4-Methyl-2-oxopentanoat mit einem nicht-kompartmentellen Ansatz berechnet. Bei keinem der Patienten mit klassischer Form der Erkrankung konnte eine meßbare in vivo L-Leucinoxidation gefunden werden. Bei zwei Patientinnen mit sehr schwerer

varianter Form war die in vivo L-Leucinoxidationsrate auf ca. 5% der Oxidationsrate von Normalpersonen reduziert. Bei den 6 untersuchten Patienten mit varianter Form der Erkrankung lag die residuale in vivo L-Leucinoxidationsrate zwischen 20% und 85% ( $59 \pm 21\%$ ) der Norm. Die Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten bei diesen Patienten waren deutlich höher als die jeweiligen in Fibroblasten ermittelten in vitro Restaktivitäten des verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, daß im Gegensatz zu klassischen Formen bei varianter Form der Ahornsirupkrankheit eine Quantifizierung der in vivo L-Leucinoxidation mittels der stabil-Isotopen-Technik und damit eine Bestimmung des in vivo Schweregrades möglich ist. Die vergleichsweise hohe Ganzkörper-L-Leucinoxidationsrate wird vermutlich durch einen gegenüber der Norm gesteigerten Aktivitäts(Dehydrophosphorylierungs)-Status des verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes in vivo erreicht.

### 3.1 Einleitung

Die Ahornsirupkrankheit wurde erstmals von *Menkes et al. (1954)* beschrieben. Es handelt sich dabei um eine angeborene, autosomal rezessiv vererbte, phänotypisch und genotypisch heterogene Stoffwechselerkrankung, bei der die Funktion des verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes (E.C. 1.2.4.4) und damit der oxidative Abbau der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren beeinträchtigt ist. Eine Akkumulation von verzweigt-kettigen Metaboliten führt bei den Patienten über bisher noch unbekannte Mechanismen zu neurotoxischen Effekten (*Silberberg, 1969; Korein et al., 1994*). Die Therapie besteht im wesentlichen in einer lebenslangen verzweigt-kettigen L-Aminosäuren-armen Diät (Übersicht bei *Chuang & Shih, 1995*).

Der klinische Schweregrad der Erkrankung reicht von schweren klassischen bis zu milden varianten Formen. Diese Klassifizierung erfolgt anhand von indirekten Parametern, wie dem Zeitpunkt der Manifestation der Erkrankung und der Leucin-Toleranz, sowie anhand der in isolierten Körperzellen der Patienten bestimmten residualen Aktivität der verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase (Übersicht bei *Chuang & Shih, 1995*). Konventionell werden noch zwei weitere Formen der Ahornsirupkrankheit aufgeführt (vgl. Standardwerke: *Chuang & Shih, 1995; Gibson et al., 1996*): die Thiamin-responsive Ahornsirupkrankheit und der Liponamid-Dehydrogenase(E3)-Mangel. Wiederholt wurden sog. Thiamin-responsive Patienten beschrieben (*Scriver et al., 1971; Elsas et al., 1972; Kodama et al., 1976; Duran et al., 1978; Püschel et al., 1979; Elsas & Danner, 1982; Duran & Wadman, 1985; Fernhoff et al., 1985; Scriver et al., 1985; Ellerine et al., 1993; Elsas et al., 1993*). Allerdings konnte bis heute das Vorkommen der Thiamin-responsiven Formen niemals überzeugend nachgewiesen werden. Der E3-Mangel ist eine spezielle Erkrankung bei der nicht nur die Aktivität der verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase, sondern auch die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase und der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase beeinträchtigt sind (*Haworth et al., 1976*;

*Robinson et al., 1977; Taylor et al., 1978; Robinson et al., 1981; Munnich et al., 1982; Matalon et al., 1984; Matuda et al., 1984; Shany et al., 1999).*

Die Übereinstimmung zwischen klinischem Schweregrad der Erkrankung einerseits und der in vitro ermittelten Restaktivität der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase andererseits ist häufig unbefriedigend (Übersicht bei *Chuang & Shih, 1995*). Für eine rationale Klassifizierung der Patienten und insbesondere für die Prüfung der Effektivität therapeutischer Interventionen, wie z.B. Thiamin-Gabe oder körperliche Aktivität, erscheint die direkte Bestimmung des in vivo Schweregrades der Erkrankung erforderlich.

Zur Bestimmung des in vivo Schweregrades bei Ahornsirupkrankheit sind Stoffwechselumsatzmessungen mit  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertem L-Leucin die Methode der Wahl (*Bier, 1989*). Bisher liegen nur wenige Befunde vor. *Collins et al. (1987)* und *Thompson et al. (1990a; 1990b; 1991)* untersuchten mit der primed continuous infusion Technik eine Anzahl von Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit. Dabei wurden widersprüchliche Befunde erhalten. Bei einigen Patienten war keine L-Leucinoxidation nachweisbar, während bei über der Hälfte der Patienten eine deutlich meßbare Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten von 8 % bis 43 % der Norm gefunden wurde (*Collins et al., 1987; Thompson et al., 1990a; 1990b; 1991*).

*Elsas et al. (1993)* verwendeten zur Untersuchung von Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad der Erkrankung einen nicht-invasiven  $^{13}\text{CO}_2$ -Atemtest mit oraler Gabe von  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertem L-Leucin. Bei diesem experimentellen Ansatz wurde die Verdünnung der  $^{13}\text{C}$ -Markierung in den L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat-Pools des Körpers allerdings nicht berücksichtigt. Eine zuverlässige Bestimmung der in vivo L-Leucinoxidation ist ohne die Erfassung der endogenen Isotopenverdünnung nicht möglich (*Schadewaldt et al., 1998*). Gerade bei ahornsirupkranken Patienten führen die vergrößerten und auch zeitlich variablen verzweigt-kettigen L-Amino- und 2-Oxosäure-Pools zu einer im Vergleich zu Normalpersonen deutlich stärkeren und nicht voraussagbaren Isotopenverdünnung.

Unsere Arbeitsgruppe hat zur Untersuchung der residualen L-Leucinoxidation bei ahornsirupkranken Patienten einen invasiven Bolustest mit oraler Gabe von L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin vorgeschlagen und durch Untersuchungen an Normalpersonen und Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit validiert (*Schadewaldt et al., 1998*). In der vorliegenden Arbeit wurde ein verbesserter experimenteller Ansatz, der insbesondere durch Stabilisierung der Plasmakonzentrationen der Patienten gekennzeichnet ist, zur Erfassung der residualen in vivo L-Leucinoxidation bei Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad, von klassischen bis zu milden varianten Formen, verwendet.

## 3.2 Material und Methoden

### 3.2.1 Material

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt) oder Sigma Chemie (München) bezogen. Glucose-Infusionslösung (10 %, w:v) stammte von B.Braun (Melsungen). L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin (99 % <sup>1-13</sup>C) wurde von Promochem (Wesel) bezogen. Reinheit und Isotopengehalt des L-[1-<sup>13</sup>C]Leucins wurden mittels automatischer Aminosäureanalyse (s. 2.2.3.2) und GC-MS-Analyse (s. 3.2.3.2) bestimmt und entsprachen den Spezifikationen des Herstellers.

### 3.2.2 Probanden und Patienten

An den oralen Bolustests mit L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin nahmen vier Patienten mit klassischer und acht Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit teil. Alle Patienten wurden einer körperlichen Untersuchung unterzogen. Außer der oben genannten Erkrankung wurde keine weitere akute oder chronische Erkrankung festgestellt. Die charakteristischen klinischen Daten der Patienten mit Ahornsirupkrankheit sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Zur Etablierung von Kontrollwerten wurden entsprechende Bolustests bei fünf gesunden Probanden

durchgeführt (eine Frau, vier Männer; Alter (Mittelwert  $\pm$  SD, Bereich)  $30 \pm 11$  (24 - 50) Jahre; Gewicht,  $67 \pm 9$  (58 - 80) kg; Größe,  $175 \pm 6$  (169 - 181) cm). Das bei diesen Untersuchungen verwendete Versuchsprotokoll wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt.

### 3.2.3 Standardisierte Testmahlzeit

Als standardisierte Kohlenhydrat-reiche, Protein(Leucin)-arme Testmahlzeiten wurden Protein(Leucin)-arme Kekse (Waliser Plätzchen) der Firma SHS, Heilbronn verabreicht ( $1\text{g} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ). Laut Hersteller enthielten 100 g Kekse: 2355 kJ, 0.1 g Eiweiß ( $\cong 0.007$  g Leucin), 65.5 g Kohlenhydrate, 33 g Fett. Zusätzlich wurde der Gesamt-Kohlenstoffgehalt und das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis freundlicherweise von Dr. H. Förstel, FZ Jülich, wie folgt bestimmt: C-Gehalt: 46.1 %,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis:  $-22.9 \Delta$  ‰. Der Einfluß dieser standardisierten Mahlzeit auf die  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation wurde bei zwei gesunden, erwachsenen, normalgewichtigen, männlichen Probanden untersucht (vgl. Abb. 4).

### 3.2.4 Methoden

#### 3.2.4.1 In vivo Untersuchungen

Bei der Durchführung der Untersuchung wurde wie in Kapitel 2 beschrieben verfahren. Den Patienten wurden unter Ruhebedingungen im Liegen Proben der Exhalationsluft und venöse Blutproben (Kontrollwerte) entnommen und anschließend zwischen 9:00 und 9:30 Uhr L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ; gelöst in verdünnter Zitronensäure,  $5 \text{mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) oral als Bolus verabreicht. Danach wurden während der 3stündigen Versuchsdauer weitere Blut- und Atemproben gemäß dem in Abb. 1 dargestellten Zeitschema (0-45 Minuten: alle 5 Minuten, 45-60 Minuten: alle 7.5 Minuten, 60-180 Minuten: alle 15 Minuten) entnommen. Den Kontrollpersonen wurden standardisierte Testmahlzeiten gegen 22 Uhr am Vorabend und gegen 7 Uhr am Morgen des Versuchstages verabreicht. Der Ernährungsstatus der Patienten ist im Ergebnis-Teil spezifiziert.

Tab.1: Charakteristische Daten der Patienten mit klassischer und varianter Form der Ahornsirupkrankheit (MSUD)

Patient	Alter bei Diagnosestellung	BCOA-DH- Aktivität † (% der Kontrollen)	Proteinzufuhr ‡ (g x kg <sup>-1</sup> x d <sup>-1</sup> )	Alter § (Jahre)	Gewicht § (kg)	Größe § (cm)	Leucin-Spiegel § (µmol x l <sup>-1</sup> )	Beobachtungs- zeitraum *
<b>klassische MSUD</b>								
G.S. (m, geb. 01/86)	8 d ¶	n.b.	0.3	12	36	150	292±379 (198; 15-4504)	01/86-11/98 (745)
L.G. (w, geb. 08/81)	12 d ¶	n.b.	0.2	17	65	166	346±256 (297; 12-1526)	10/81-03/99 (447)
L.S. (w, geb. 03/91)	3 d	n.b.	0.3	7	24	121	221±186 (176; 8-1145)	03/91-11/98 (421)
M.M. (m, geb. 07/83)	13 d ¶ Bruder Indexfall	n.b.	0.2	16	75	168	469±632 (321; 8-4962)	08/83-03/99 (323)
<b>variante MSUD</b>								
F.U. ¶¶ (w, geb. 07/87)	1 w ¶	n.b.	0.2	11	37	141	260±152 (231; 34-915)	7/87-11/98 (272)
R.R. ¶¶ (w, geb 04/83)	8 d ¶	n.b.	0.3	15	49	151	205±112 (188; 26-1026)	5/83-12/98 (580)
D.N. (m, geb. 10/78)	4 w ¶¶	25	1.5	19	59	181	319±148 (265; 136-646)	11/78-09/98 (37)
H.H. (m, geb. 05/85)	7.5 J ¶	9	0.8 - 1.2	13	43	160	254±73 (239; 178-532)	02/93-09/98 (25)
L.F. (w, geb. 06/90)	3 w ¶¶	n.b.	1.0 - 1.5	8	25	123	293±157 (263; 92-977)	07/90-12/98 (120)
M.S. (w, geb. 10/93)	5.4 J ¶	10	1.5	5	17	108	618±598.7 (272; 115-1623)	03/99-04/99 (7)
P.H. (m, geb.02/90)	3.7 J ¶	20	1.5	8	26	129	290±294 (219; 62-1291)	12/94-07/98 (21)
S.T. (m, geb. 06/64)	3.2 J ¶	15	0.6 - 1.0	34	75	183	375±175 (363; 99-649)	10/73-03/98 (13)

† bestimmt in kultivierten Fibroblasten (s. Methoden); ‡ diätetischer Bedarf; § zum Zeitpunkt der in vivo Untersuchung; § Median und Bereich in Klammern; \* in Klammern: Anzahl der Proben; diagnostiziert über: ¶ Metabolische Krise, ¶¶ Neonatal-Screening; ¶¶ schwere variante Formen; n.b.: nicht bestimmt; Abkürzungen: BCOA-DH, verzweigkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase

#### 3.2.4.2 Analytische Verfahren

Die Quantifizierung der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren und ihrer korrespondierenden 2-Oxosäuren im Plasma erfolgte über automatische Aminosäureanalyse mit kationenaustausch-chromatographischer Trennung und Ninhydrin-Detektion (*Schadewaldt et al., 1990*) bzw. über RP-HPLC der Chinoxalin-Derivate der 2-Oxosäure mit fluorimetrischer Detektion (*Schadewaldt et al., 1989*).

Die Bestimmung der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den Plasmametaboliten erfolgte wie in 4.2.3.2 beschrieben. Für die massenspektrometrischen Analysen wurden die *N,O*-Di-*t*-Butyldimethylsilyl-Derivate der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren und die *O-t*-Butyldimethylsilyl-Derivate der Chinoxalinole der verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren präpariert. Die massenspektrometrische Bestimmung erfolgte im EI-Modus mit einer Temperatur der Ionenquelle von 140 °C und einer Elektronen-Energie von 70 eV. Zur Bestimmung der  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Anreicherung wurde das Verhältnis (*R*) der Ionenintensitäten bei *m/z* 303 zu *m/z* 302 (für die *N,O*-Di-*t*-Butyldimethylsilyl-Derivate der L-Aminosäuren) bzw. bei *m/z* 260 zu *m/z* 259 (für die *O-t*-Butyldimethylsilyl-Derivate der Chinoxalinole) durch selected ion monitoring (SIM) ermittelt. Zur Bestimmung des natürlichen Isotopengehaltes wurde das entsprechende Ionenintensitätsverhältnis (*R*<sub>0</sub>) der verzweigt-kettigen Verbindungen in den Kontrollproben gemessen.

Die Bestimmung der Isotopenanreicherung im CO<sub>2</sub> der Exhalationsluft erfolgte, wie ebenfalls in 2.2.3.2 beschrieben, über Isotopenratio-Massenspektrometrie. Dabei wurde ein gegen Pee Dee Belemniten-kalibrierter Standard (PDB) verwendet (s. 2.2.3.2).

Die CO<sub>2</sub>-Exhalation wurde kontinuierlich mittels Atemgasanalyse (Deltatrac Metabolic Monitor; Datex Instruments, Helsinki, Finnland) bestimmt.

### 3.2.5 Auswertung und Statistik

#### 3.2.5.1 Berechnungen

Die Isotopenanreicherung in „mol percent excess“ ( $MPE = \{R-R_0\} / \{R-R_0+1\} \times 100$ ) in den Plasmametaboliten wurde aus dem Verhältnis der Ionenintensitäten in den Proben, die nach der Applikation der  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierte verzweigtkettigen L-Aminosäure entnommen wurden ( $R$ ) und dem natürlich vorkommenden Verhältnis in den vor dem oralen Bolus entnommenen Proben ( $R_0$ ) berechnet (*Wolfe, 1984*; s. 2.2.4.1).

Die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung im  $\text{CO}_2$  der Exhalationsluft wurde berechnet als Differenz zwischen dem  $^{13}\text{CO}_2$  in den vor dem oralen Bolus entnommenen Atemproben (Kontrollwert) und dem  $^{13}\text{CO}_2$  der Proben, die nach dem oralen Bolus entnommen wurden (s. 2.2.4.1). Die Raten der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation über basal wurden auf der Basis der Isotopenanreicherung im  $\text{CO}_2$  und der  $\text{CO}_2$ -Exhalationsrate berechnet (s. 2.2.4.1).

#### 3.2.5.2 Ganzkörper-L-Leucinoxidation

Die Ganzkörper-L-Leucinoxidation in vivo (*WBLO*) wurde auf der Basis der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsrate und der Isotopenanreicherung in der korrespondierenden verzweigtkettigen 2-Oxo[ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]säure im Plasma berechnet reciprocal-pool Modell, *Schwenk et al., 1985*). Für diese Berechnung wurde ein der Auswertung bei nicht-kompartimentellen Ansätzen (steady state-Ansätzen) analoges Berechnungsverfahren wie folgt abgeleitet:

Prinzipiell ergibt sich die Rate des oxidativen Abbaues von L-Leucin (*WBLO*) als Produkt der Ratenkonstante der oxidativen Decarboxylierung der konjugierten 2-Oxosäure ( $k$ ), 4-Methyl-2-oxopentanoat, und der Menge an 2-Oxosäure ( $KIC$ ) als  $WBLO = k \times KIC$ .

Unter steady state Bedingungen und bei Einsatz von 1-<sup>13</sup>C-markiertem L-Leucin gilt, daß die Decarboxylierungsrate des 4-Methyl-2-oxo[1-<sup>13</sup>C]pentanoat ( $k \times [^{13}\text{C}]KIC$ ) gleich der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Bildungsrate (über basal) ist. Die <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Bildungsrate ergibt sich als Produkt aus der experimentell ermittelten <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalationsrate über basal ( $V_{13\text{CO}_2}$ ) und dem CO<sub>2</sub>-Retentionsfaktor ( $RF$ ) (Frereday et al., 1997). Damit kann die Ratenkonstante  $k$  als Produkt von  $RF$  und dem Quotienten  $V_{13\text{CO}_2} / [^{13}\text{C}]KIC$  ausgedrückt und in die obige Gleichung eingesetzt werden. Experimentell kann  $V_{13\text{CO}_2}$  in der Ausatemungsluft und das Verhältnis  $KIC / [^{13}\text{C}]KIC$  durch Bestimmung der Isotopenanreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat des Plasmas ermittelt werden, so daß eine Berechnung der  $WBLO$  möglich ist (vgl. Tab.2).

Für non-steady state Bedingungen ist die Vorgehensweise prinzipiell die gleiche. Dabei wird angenommen, daß die <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Bildung über basal aus der oxidativen Decarboxylierung des 1-<sup>13</sup>C-markierten 4-Methyl-2-oxopentanoat stammt. Wegen der Zeitabhängigkeit ist es unter non-steady state Bedingungen allerdings nicht möglich, <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Abatmungsraten und <sup>13</sup>C-Markierungsverhältnisse im 4-Methyl-2-oxopentanoat des Plasmas einander zuzuordnen. Um die unterschiedlichen <sup>13</sup>C-Markierungskinetiken zu berücksichtigen wird daher der obige steady state-Ansatz über die Zeit integriert und die Ratenkonstante  $k$ , unter Berücksichtigung des Retentionsfaktors ( $RF$ ), als Quotient der Flächen unter der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalationskinetik ( $V_{13\text{CO}_2}$ ) und der Kinetik des 1-<sup>13</sup>C-markierten 4-Methyl-2-oxopentanoat ( $[^{13}\text{C}]KIC$ ) berechnet und in die Gleichung für die Berechnung der  $WBLO$  eingesetzt. Für die Ermittlung von Oxidationsraten müssen in diese Gleichung eigentlich die Poolgrößen für das Gesamt-4-Methyl-2-oxopentanoat ( $KIC$ ) und das 1-<sup>13</sup>C-markierte 4-Methyl-2-oxopentanoat ( $[^{13}\text{C}]KIC$ ) eingesetzt werden. Dazu sind jedoch in vivo keine ausreichend zuverlässigen Angaben zu ermitteln. Daher wurden statt dessen die Plasmakonzentrationen für die

Berechnungen verwendet. Dies erscheint gerechtfertigt, da sich Verteilungsraum und Metabolismus des  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierten 4-Methyl-2-oxopentanoat nicht von dem der natürlich-markierten Metabolite unterscheiden und daher für beide Metabolite identische Poolverhältnisse und Umsatzraten gegeben sein müssen. Daraus folgt, daß sich durch Einsetzen der Plasmakonzentrationen statt der Poolgrößen ergebende Abweichungen im  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierten 4-Methyl-2-oxopentanoat ( $[^{13}\text{C}]\text{KIC}$ ; im Nenner) durch entsprechende gleichsinnige Abweichungen im Gesamt-4-Methyl-2-oxopentanoat ( $\text{KIC}$ ; im Zähler) in der Gleichung mathematisch aufheben.

Tab.2: Ermittlung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation

Für die Ganzkörper-L-Leucinoxidation (WBLO) gilt:	
<b>(1)</b> $WBLO = k \times KIC$	
Steady state-Ansatz	Non-steady state-Ansatz
bei Verwendung $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertem L-Leucin gilt:	
<b>(2)</b> $V_{13\text{CO}_2} \times RF = k \times [^{13}\text{C}]\text{KIC}$	<b>(2a)</b> $\int_0^{\infty} (V_{13\text{CO}_2}(t) \times RF) dt = \int_0^{\infty} (k \times [^{13}\text{C}]\text{KIC}(t)) dt$
nach Umformung ergibt sich k als:	
<b>(3)</b> $k = RF \times \frac{V_{13\text{CO}_2}}{[^{13}\text{C}]\text{KIC}}$	<b>(3a)</b> $k = RF \times \frac{\int_0^{\infty} V_{13\text{CO}_2}(t) dt}{\int_0^{\infty} [^{13}\text{C}]\text{KIC}(t) dt}$
damit ergibt sich die WBLO als:	
<b>(4)</b> $WBLO = RF \times \frac{V_{13\text{CO}_2}}{[^{13}\text{C}]\text{KIC}} \times KIC$	<b>(4a)</b> $WBLO = RF \times \frac{\int_0^{\infty} V_{13\text{CO}_2}(t) dt}{\int_0^{\infty} [^{13}\text{C}]\text{KIC}(t) dt} \times KIC(t)$

$WBLO$ : Rate der Ganzkörper-L-Leucinoxidation, in  $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$

$k$ : (Ganzkörper)Ratenkonstante für die oxidative Decarboxylierung von KIC,  $\text{min}^{-1}$

$KIC$ : Menge an 4-Methyl-2-oxopentanoat,  $\mu\text{mol}$

$V_{13\text{CO}_2}$ :  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsrate über basal,  $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$

$RF$ : Korrekturfaktor für die  $\text{CO}_2$ -Retention (Faktor 1.1; *Frereday et al., 1997*)

$[^{13}\text{C}]\text{KIC}$ : Menge an 4-Methyl-2-oxo[ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]pentanoat,  $\mu\text{mol}$

Zur Bestimmung der Fläche unter der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationskurve wurde das in Kapitel 2 dargestellte Verfahren verwendet (Kapitel 2; vgl. *Schadewaldt et al., 1998*). Dabei wurde zunächst der zeitliche Verlauf der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsrate ( $V_{^{13}\text{CO}_2}$ ; in  $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ ) an die Funktion

$$V_{^{13}\text{CO}_2} = \sum_{i=1}^4 a_i \times e^{-k_i \times t} \quad (5)$$

unter Verwendung des Marquart-Levenberg-Algorithmus für nicht-lineare Regressionsanalysen (Methode der kleinsten Fehlerquadrate; Sigma Plot 2.0, Jandel Scientific) angepaßt und damit die Parameter  $a_i$  und  $k_i$  abgeschätzt.

Die insgesamt abgeatmete  $^{13}\text{CO}_2$ -Menge ( $\int_0^{\infty} V_{^{13}\text{CO}_2}$ ), in  $\mu\text{mol}$ ) ergibt sich nach Integration von (5) und Extrapolation gegen  $t_{\infty}$  und Verwendung der Schätzwerte für die Parameter  $a_i$  und  $k_i$  wie folgt:

$$\int_0^{\infty} V_{^{13}\text{CO}_2} = \sum_{i=1}^4 a_i \times \frac{1}{k_i} \quad (6)$$

Der zeitliche Verlauf der 4-Methyl-2-oxo[1- $^{13}\text{C}$ ]pentanoat-Konzentration im Plasma ( $[^{13}\text{C}]KIC$ ) wurde anhand der Gesamtkonzentration und der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat berechnet. Dann wurde der Verlauf der Konzentrations-Zeitkurve in Analogie zur  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationskinetik ( $V_{^{13}\text{CO}_2}$ ) mittels nicht-linearer Regressionsverfahren bestimmt und schließlich die Fläche unter der Kurve ( $\int [^{13}\text{C}]KIC$ ) unter Verwendung der Formel (6) berechnet.

Da sich im Plasma bei der Gesamtkonzentration des 4-Methyl-2-oxopentanoat nach Gabe des L-Leucin-Bolus nur relativ geringe Änderungen ergaben, wurde bei der Berechnung der *WBLO* für  $KIC(t)$  der Mittelwert Plasmakonzentration aus der jeweiligen Versuchsserie eingesetzt.

Zusätzlich wurde die maximale Rate der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation und die maximale  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in L-Leucin und 4-Methyl-2oxopentanoat ermittelt. Dazu

wurde die erste Ableitung von (5) gleich Null gesetzt, der Zeitpunkt der Maxima ( $t_{max}$ ) mit numerischen Standardverfahren (Solver, Excel 5.0) anhand der jeweiligen Schätzwerte für die Parameter  $a_i$  und  $k_i$  berechnet und in Gleichung (5) eingesetzt.

Für Vergleichszwecke wurden die Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten (WBLO) auf kg Körpergewicht normiert. Die im Ergebnis-Teil angegebenen residualen Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten varianter ahornsirupkranker Patienten sind auf den Mittelwert der Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten der fünf Kontrollpersonen bezogen (WBLO  $\equiv$  100%).

### 3.2.5.3 Statistik

Im allgemeinen sind die Ergebnisse im Text und in Tabellen als Mittelwerte  $\pm$  SD, in Abbildungen als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Kumulativwerte wurden mit der Trapezoidalmethode ermittelt. Korrelationen wurden mit linearer Regression (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) geprüft.

## 3.3 Ergebnisse

### Stabilisierung der Plasmakonzentrationen verzweigtkettiger L-Aminosäuren

Bei Untersuchungen der Ganzkörper-L-Leucinoxidation bei ahornsirupkranken Patienten mittels (oralen) Gabe von  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertem L-Leucin stellen die im Vergleich zu Normalpersonen vergrößerten und auch zeitlich variablen Pools der verzweigtkettigen L-Aminosäuren und 2-Oxosäuren ein (methodisches) Problem dar. Bei diesen Patienten kann bereits ein Übernachtsfasten zu einer deutlichen Katabolie-bedingten Erhöhung der Plasmakonzentrationen führen (Abb. 1; vgl. *Schadewaldt et al., 1998*; vgl. Kapitel 2). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun nach Maßnahmen gesucht, die geeignet sind die Plasmakonzentrationen bei ahornsirupkranken Patienten für die in vivo Untersuchungen zu stabilisieren.

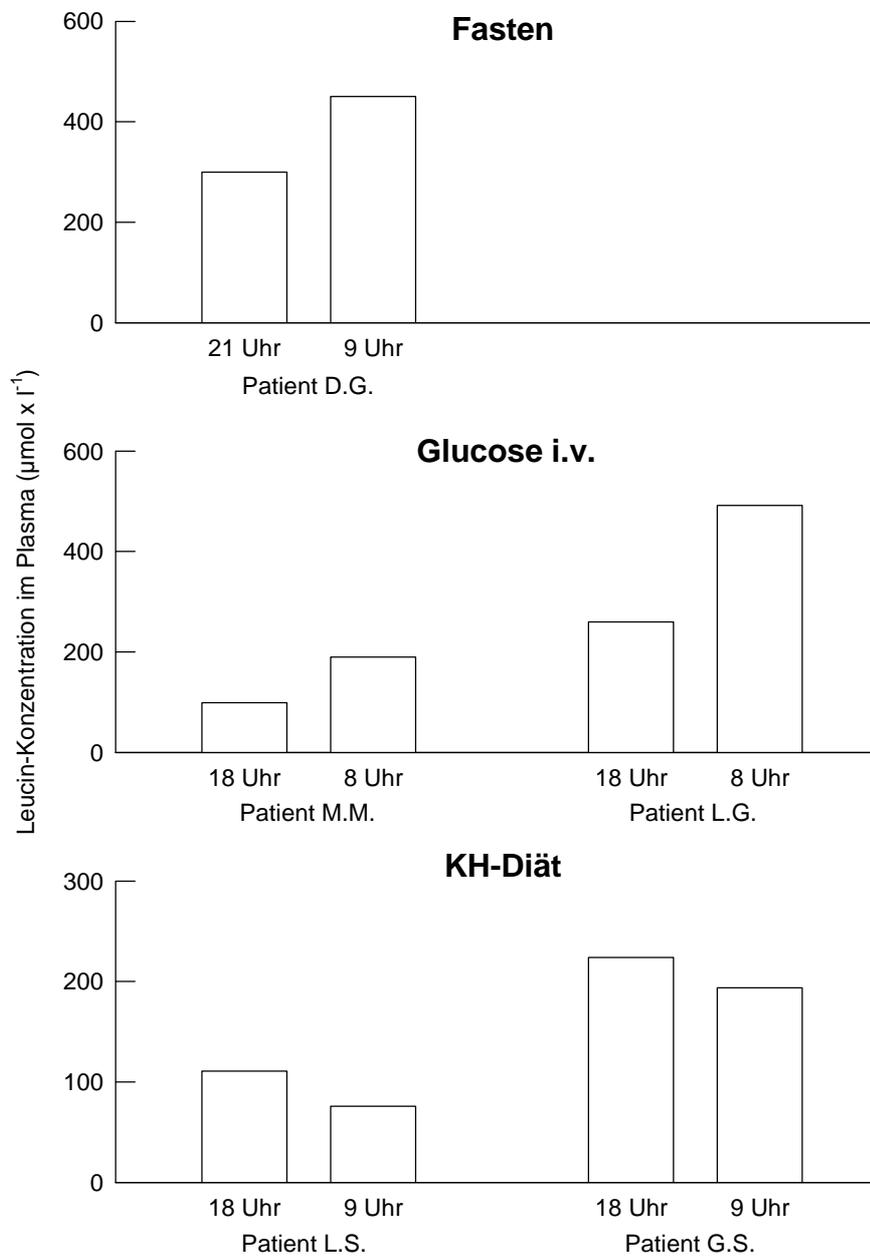


Abb.1: Einfluß des Ernährungsstatus auf die Plasmakonzentration von L-Leucin bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit (klassische Form). Fasten: Übernachtfasten (> 10 h); Glucose i.v.: 3 mg Glucose  $\times$   $(\text{kg KG})^{-1} \times \text{min}^{-1}$  (ab 22 Uhr durchgehend); KH-reiche Diät: Leucin-arme Kekse ( $1 \text{ g} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ; entsprechen  $24 \text{ kJ} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) abends (ca. 22 Uhr) und morgens ca. 2 Stunden vor Versuchsbeginn.

In einem ersten Versuchsansatz wurden zwei Patienten (L.G., M.M.; vgl. Tab.1) stationär aufgenommen. Am Vortag des in vivo Versuches erhielten sie ab 22 Uhr bis zum Ende des Experimentes am Versuchstag (gegen 12 Uhr) eine kontinuierliche Glucose-Infusion ( $3 \text{ mg} \times (\text{kg KG})^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ) um einer postabsorptiven Katabolie entgegenzuwirken. Trotz dieser Maßnahme war, bei deutlich unterschiedlichen Ausgangswerten beider Patienten am Vorabend, ein erheblicher Anstieg der Konzentration der verzweigtkettigen L-Aminosäuren im Plasma festzustellen. Z.B. stieg, wie Abb.1 zeigt, die L-Leucin-Konzentration bei beiden Patienten um etwa das Doppelte an. Primäre Ursache für diesen unerwarteten Befund dürfte die psychische Belastung der Patienten infolge der stationären Aufnahme sein.

Aufgrund dieser Erfahrung wurde im folgenden bei der Durchführung der in vivo Umsatzmessungen auf eine stationäre Aufnahme der Patienten verzichtet. Zur weitgehenden Vermeidung von Streßfaktoren wurden die Untersuchungen in einer dem Patienten vertrauten Umgebung (ggf. zu Hause) und in Anwesenheit der Eltern und des behandelnden Pädiaters durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurde bei zwei weiteren Patienten (L.S., G.S.; vgl. Tab.1) der Einfluß diätetischer Maßnahmen untersucht. Am Abend vor der in vivo Untersuchung erhielten die Patienten gegen 22 Uhr eine zusätzliche Kohlenhydrat-reiche und Protein(Leucin)-arme Mahlzeit (standardisierte Testmahlzeit:  $24 \text{ kJ} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ; Zusammensetzung s. Material und Methoden), die dann auch am Morgen des Versuchstages zwischen 6 und 7 Uhr als Frühstück verabreicht wurde. Tatsächlich verhinderten diese Maßnahmen bei beiden Patienten den nächtlichen Anstieg der Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren und führten so zu der erwünschten Stabilisierung der Plasmaspiegel (Abb.1 unten).

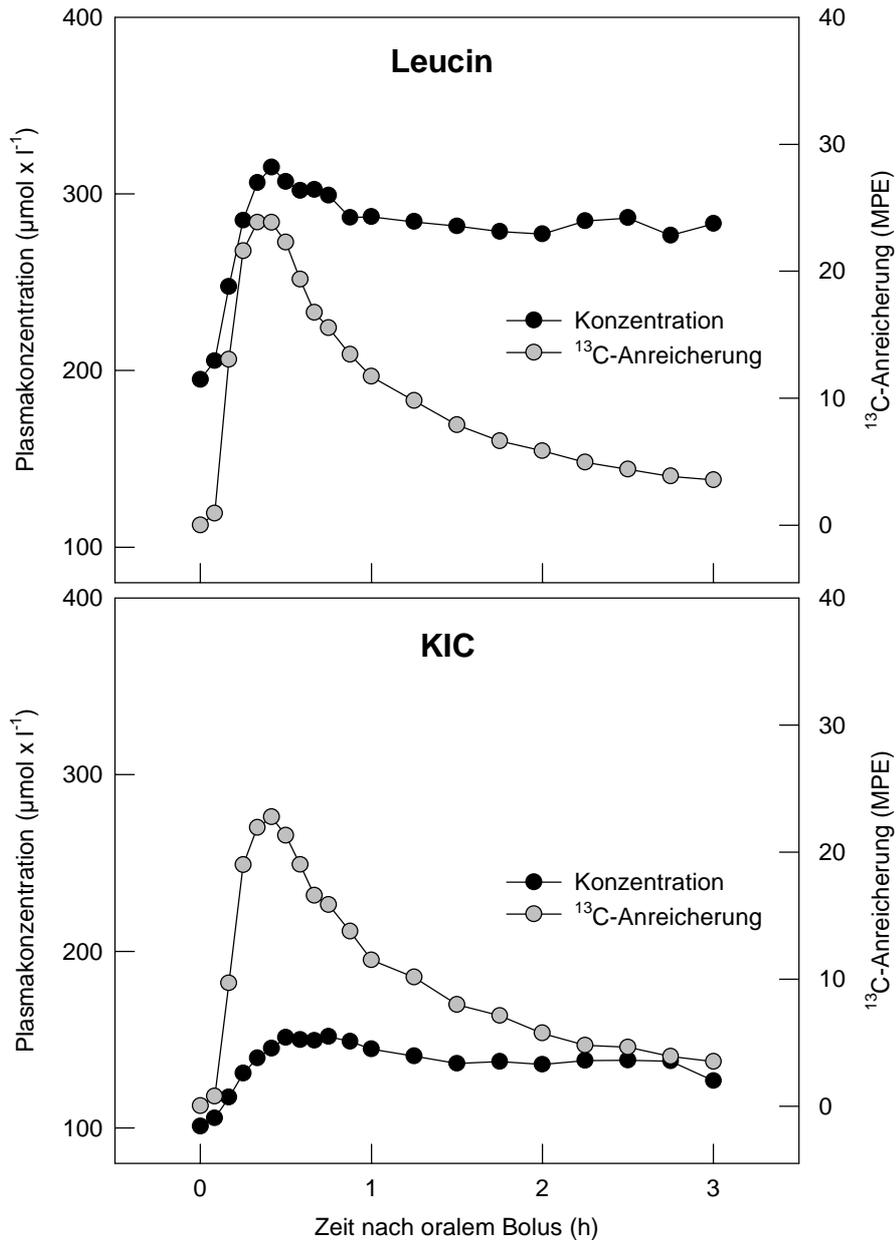


Abb.2: Zeitlicher Verlauf der Konzentration und der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung (MPE) von L-Leucin und der korrespondierenden 2-Oxosäure, 4-Methyl-2-oxopentanoat (KIC), im Plasma eines ahornsirupkranken Patienten (M.M., klassische Form) nach oraler Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg} \text{KG})^{-1}$ ).

Die bei diesen vier Patienten mit klassischer Form der Erkrankung durchgeführten oralen L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustests erbrachten prinzipiell ähnliche Befunde. Ein typischer Verlauf der Konzentration und der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung von L-Leucin und der korrespondierenden 2-Oxosäure des Plasmas nach Bolusgabe ist in Abb. 2 dargestellt. Nach einer initialen Anstiegsphase persistierten konstant erhöhte Plasmakonzentrationen bis zum

Ende des Experimentes. Die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den Plasmametaboliten verlief nur in der Anfangsphase parallel zur Konzentration und nahm nach Überschreiten des Maximums kontinuierlich ab, so daß am Ende des Experimentes die Ausgangswerte nahezu wieder erreicht wurden. Bezüglich der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung im L-Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat war nur in der Initialphase ein Unterschied feststellbar (Abb.3).

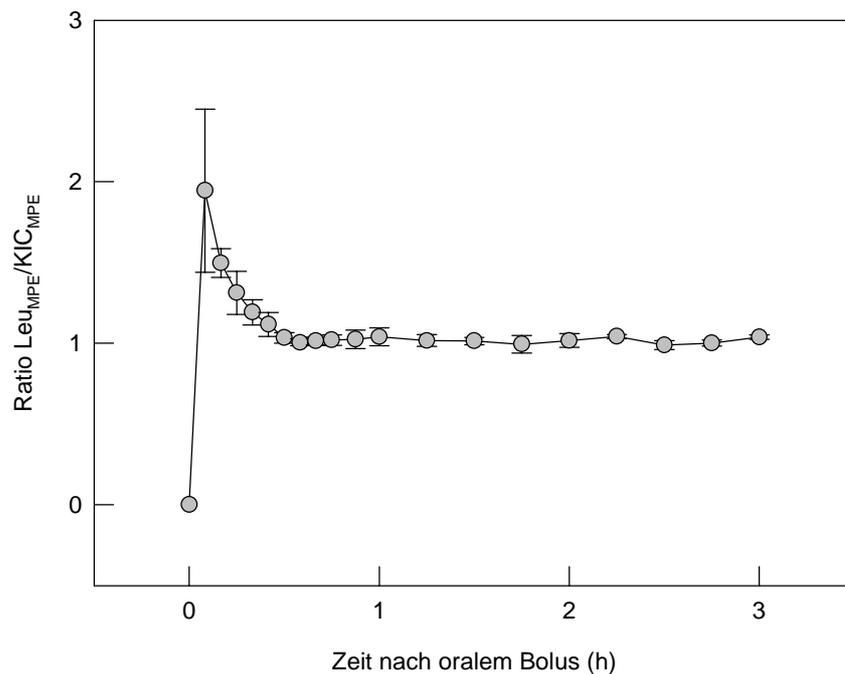


Abb.3: Zeitlicher Verlauf der Relation der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung (MPE) von L-Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat (KIC) im Plasma ahornsirupkranker Patienten (klassische Form) nach oraler Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ). Dargestellt sind MW  $\pm$  SD, n = 4.

Lediglich ein Patient wies bei der Untersuchung deutlich erhöhte L-Leucin-Plasmakonzentrationen auf, bei den drei anderen Patienten lagen norm-nahe L-Leucin-Konzentrationen vor (Tab. 3). Dennoch konnte - in Übereinstimmung mit früheren Befunden (*Schadewaldt et al., 1998*) - bei keinem der vier Patienten ein Anstieg der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation über basal gemessen werden.

Tab.3: Initiale Plasmakonzentrationen bei Patienten mit klassischer und varianter Form der Ahornsirupkrankheit (MSUD)

Patient	Plasmakonzentrationen ( $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) *			
	L-Leucin	L-Valin	L-Isoleucin	L-Alloisoleucin
klassische MSUD				
G.S.	191 (116)	87 (10)	15 (34)	85
L.G.	506 (392)	187 (38)	111 (124)	60
L.S.	76 (29)	98 (9)	21 (17)	37
M.M.	195 (101)	118 (13)	111 (87)	63
variante MSUD				
F.U. ¶	594 (401)	255 (41)	194 (167)	58
R.R. ¶	734 (578)	359 (75)	221 (260)	142
D.N. # 10/97	545 (272)	551 (85)	151 (103)	34
09/98	238 (106)	282 (26)	114 (64)	19
H.H.	174 (103)	257 (32)	79 (56)	11
L.F.	562 (396)	624 (92)	207 (197)	63
M.S.	155 (65)	222 (24)	63 (38)	14
P.H.	196 (146)	230 (38)	85 (82)	24
S.T.	586 (379)	585 (87)	212 (172)	57
Kontrollen †	82 ± 20 (26 ± 6)	171 ± 15 (13 ± 2)	41 ± 4 (17 ± 2)	3.0 ± 1.0

in Klammern: Konzentration der korrespondierenden 2-Oxosäuren 4-Methyl-2-oxopentanoat, 3-Methyl-2-oxobutanoat, Summe von S- und R-3-Methyl-2-oxopentanoat; # angegeben sind Monat/Jahr, in dem die Untersuchung und Wiederholungsuntersuchung durchgeführt wurden; ¶ schwere variante Form; † zum Vergleich angegeben sind MW ± SD aus L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustests ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) an fünf gesunden Probanden.

### Einfluß der Testmahlzeit auf die $^{13}\text{C}$ -Exhalation

Aufgrund der obigen Befunde bei Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit wurde bei allen folgenden Untersuchungen spätabends und frühmorgens vor der in vivo Untersuchung wie oben standardisierte Testmahlzeiten verabreicht. Außerdem wurde bei der Untersuchung von Patienten sichergestellt, daß diese in einer dem Patienten vertrauten Umgebung durchgeführt wurde.

Die standardisierte Testmahlzeit wies einen etwas höheren  $^{13}\text{C}$ -Gehalt (-22.9  $\delta$ -Werte) als normalerweise im  $\text{CO}_2$  der Exhalationsluft gefunden (etwa -26  $\delta$ -Werte) wird. Untersuchungen an zwei gesunden Kontrollpersonen zeigten, daß

diese Testmahlzeit nur einen geringen Einfluß auf die  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation während der Versuchsphase des L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustests hatten (Abb. 4).

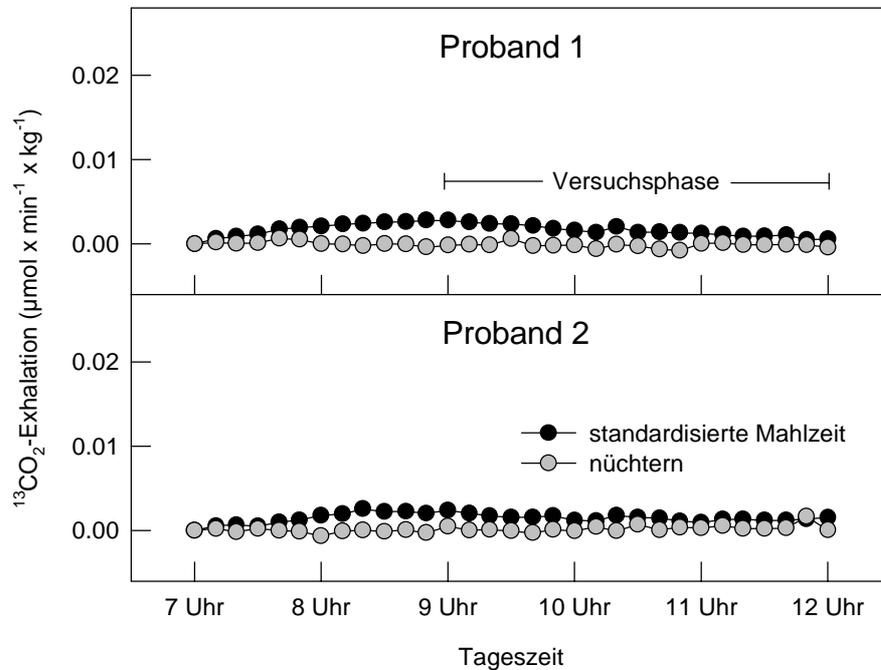


Abb.4: Einfluß einer morgendlichen Kohlenhydrat-reichen, Protein(Leucin)-armen Testmahlzeit (Leucin-arme Kekse:  $1\text{g} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ; entsprechen  $24\text{ kJ} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ); verabreicht um 7.00 Uhr) auf die  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation über basal von zwei gesunden, erwachsenen, normalgewichtigen, männlichen Kontrollpersonen. Kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation über basal in der Zeitspanne der Durchführung von oralen L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustests (Versuchsphase): Probant 1:  $0.27\ \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ , Probant 2:  $0.26\ \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ .

#### In vivo L-Leucinoxidation bei Normalpersonen

Nach oraler Gabe des L-Leucin-Bolus lag die maximale  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in L-Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat im Plasma von gesunden Probanden im postprandialen Zustand bei  $36.2 \pm 3.2$  (Bereich, 32.5 - 41.6) MPE und  $33.3 \pm 3.6$  (28.7 - 38.5) MPE ( $n = 5$ ). Die maximalen  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsraten betragen  $59.3 \pm 18.1$  (45.3 - 94.7)  $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  (vgl. Abb. 5). Innerhalb der 3stündigen Versuchsdauer wurden  $5.48 \pm 1.37$  (4.40 - 8.18)  $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  entsprechend  $14.4 \pm 4.0$  ( $11.6 \pm 21.5$ ) % der applizierten L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Dosis abgeatmet. Die Ganzkörper-L-Leucinoxidation lag bei  $0.40 \pm 0.17$

(Bereich,  $0.31 - 0.70$ )  $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  und war mit Literaturdaten vergleichbar (Frereday et al., 1997).

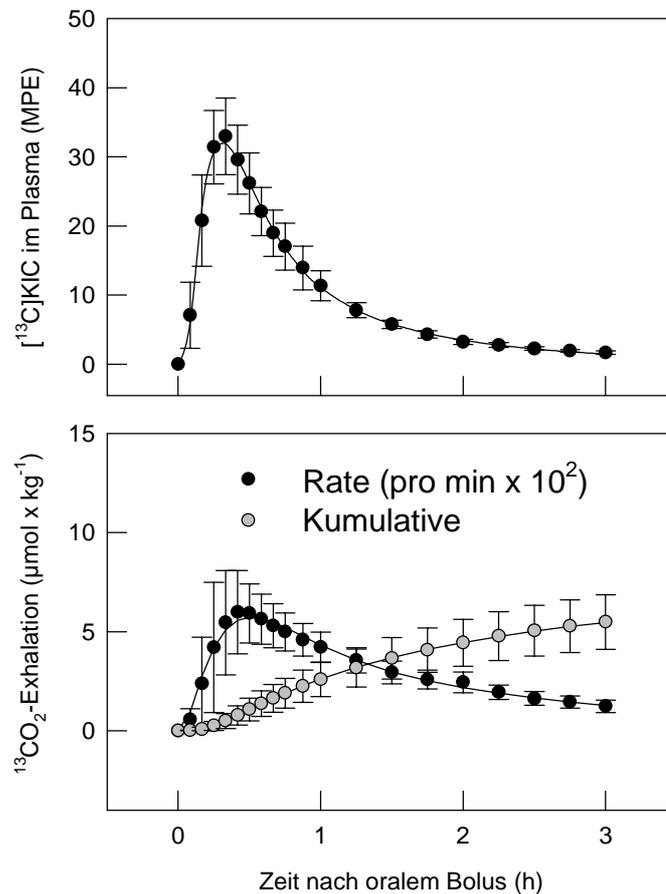


Abb.5: Zeitlicher Verlauf der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung (MPE) im 4-Methyl-2-oxopentanoat (KIC) des Plasmas und  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation bei gesunden Probanden nach oraler Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ). Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 6$ ).

In vivo L-Leucinoxidation bei Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit

Insgesamt wurden neun Untersuchungen an acht Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit durchgeführt. Bei 4 Untersuchungen wiesen die Patienten norm-nahe Plasmakonzentrationen der verzweigkettigen L-Aminosäuren (L-Leucin:  $< 250 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) auf, bei fünf Untersuchungen lagen

deutlich erhöhte Konzentrationen der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren im Plasma vor (L-Leucin > 500  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ; s. Tab. 3). Abb. 6 zeigt beispielhaft die zeitlichen Verläufe der Plasmakonzentration und der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in L-Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat nach oralem L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolus. Der Verlauf der Plasmakonzentrationen war dem bei Patienten mit klassischer Form recht ähnlich (vgl. Abb. 2), mit teilweise etwas ausgeprägterem Konzentrationsabfall nach der initialen Anstiegsphase.

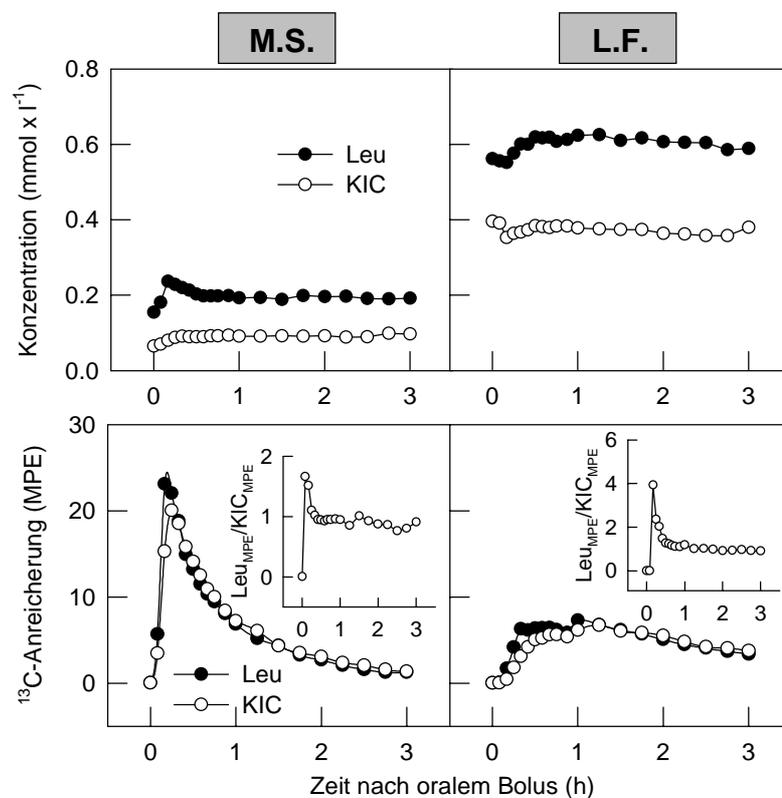


Abb.6: Zeitlicher Verlauf der Konzentration und  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung (MPE) von L-Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat (KIC) des Plasmas bei zwei ahornsirupkranken Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad der Erkrankung (M.S., variante Form; L.F., milde variante Form) nach oraler Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg} \text{KG})^{-1}$ ). Die Nebenbilder zeigen die Relation der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung von L-Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat.

Offensichtlich wurde sowohl die Höhe der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung als auch der zeitliche Verlauf von der (Plasma)Poolgröße beeinflusst. Bei norm-nahen L-Leucin-Konzentrationen ( $n = 4$ ) wurden in L-Leucin und 4-Methyl-2-

oxopentanoat maximale  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen von  $17.3 \pm 4.5$  (Bereich: 10.6 - 20.7) MPE bzw.  $14.7 \pm 4.2$  (Bereich: 9.9 - 19.5) MPE erreicht, bei hohen L-Leucin-Konzentrationen ( $n = 5$ ) lagen die entsprechenden Werte niedriger und betrugen  $7.4 \pm 2.5$  (Bereich: 5.3 - 11.5) MPE bzw.  $6.0 \pm 1.6$  (Bereich: 4.7 - 8.5) MPE. Bei norm-nahen L-Leucin-Plasmakonzentrationen war der Rückgang der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung nahezu normal, bei hohen Konzentrationen war der Rückgang deutlich verzögert (Abb. 6).

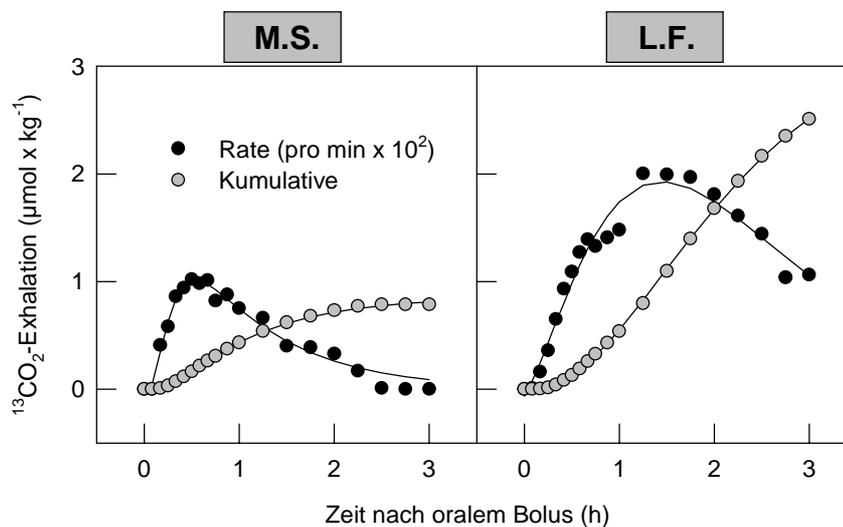


Abb.7: Kinetik der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation und kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation bei ahornsirupkranken Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad der Erkrankung (M.S., schwerere variante Form; L.F., milde variante Form) nach Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ; p.o.).

Im Gegensatz zu den Befunden bei Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit war bei allen Patienten mit varianter Form nach oraler Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin ein signifikanter Anstieg der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation über den Basalwert meßbar (vgl. Abb. 7). Erwartungsgemäß waren die maximalen Raten der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation individuell sehr variabel und lagen zwischen 1.8 und  $20.1 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ . Bezogen auf die applizierte  $^{13}\text{C}$ -Dosis (=100 %), lag bei den schweren Varianten die kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation in der 3stündigen Versuchsperiode (F.U., R.R) bei  $< 0.5 \%$ , bei der Varianten M.S.

bei 2 % und bei den milderen Varianten (D.N., L.F., H.H., P.H., S.T.) zwischen 4 und 7 %.

Tab.4: Parameter für die Ermittlung der residualen L-Leucinoxidation in vivo bei Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit (MSUD)<sup>¶</sup>

Patient	Fläche unter der Kurve *		KIC im Plasma <sup>§</sup>	Residuale L-Leucinoxidation <sup>§</sup>
	V <sub>13CO2</sub>	[1- <sup>13</sup> C]KIC <sup>#</sup>	( $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ )	(% der Norm)
variante MSUD				
F.U. <sup>¶</sup>	0.20 (0.622)	5.609 (0.965)	390 ( $\pm 7$ )	4 (0.015)
R.R. <sup>¶</sup>	0.17 (0.790)	7.430 (0.976)	585 ( $\pm 12$ )	4 (0.015)
D.N. <sup>†</sup> 10/97	3.31 (0.993)	3.468 (0.894)	302 ( $\pm 13$ )	78 (0.317)
09/98	4.25 (0.971)	1.755 (0.994)	115 ( $\pm 5$ )	75 (0.306)
H.H.	3.82 (0.983)	1.033 (0.833)	87 ( $\pm 8$ )	86 (0.354)
L.F.	3.34 (0.966)	5.906 (0.952)	374 ( $\pm 11$ )	57 (0.233)
M.S.	0.86 (0.999)	1.075 (0.925)	85 ( $\pm 8$ )	19 (0.075)
P.H.	2.81 (0.983)	2.264 (0.949)	147 ( $\pm 7$ )	49 (0.201)
S.T.	4.65 (0.959)	7.531 (0.990)	389 ( $\pm 7$ )	65 (0.264)
Kontrollen <sup>‡</sup>	6.77 $\pm$ 1.58 (0.974 $\pm$ 0.028)	0.61 $\pm$ 0.10 (0.942 $\pm$ 0.031)	33 ( $\pm 4$ )	100 (0.40 $\pm$ 0.17)

<sup>¶</sup> mittels oraler L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustests (38  $\mu\text{mol} \times (\text{kg} \text{KG})^{-1}$ ) (vgl. Abb.3/4); \* in Klammern: Determinationskoeffizienten R<sup>2</sup> (Maß für die Güte der Anpassung der experimentellen Daten an die Fit-Funktion; (vgl. 3.2.4.2, Formel (5)); <sup>§</sup> mittlere 4-Methyl-2-oxopentanoat (KIC)-Konzentration ( $\pm$  SD; n = 21); <sup>§</sup> bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen ( $\equiv$  100%); in Klammern angegebene Raten wurden anhand der Fläche unter der V<sub>13CO2</sub>- und der [1-<sup>13</sup>C]KIC-Kurve und der KIC-Konzentration im Plasma nach Formel (4a) ermittelt; <sup>#</sup> angegeben sind: Flächen  $\times 10^{-3}$ ; <sup>¶</sup> schwere variante Form; <sup>†</sup> zwei Bolustests in 10/97 und 09/98; <sup>‡</sup> angegeben sind MW  $\pm$  SD, n=5

Die residualen Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten wurden aus der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation unter Berücksichtigung der Isotopenverdünnung (im Plasma-4-Methyl-2-oxopentanoat) mittels eines nicht-kompartimentellen Ansatzes abgeschätzt (Tab.4). Die Ergebnisse sind in Abb. 8 dargestellt. Bezogen auf das Normkollektiv lagen die residualen Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten

bei den schweren Varianten etwa bei 5 %, bei der Varianten M.S. bei 20 % und bei den milderer Varianten überraschend hoch zwischen 50 und 85 %.

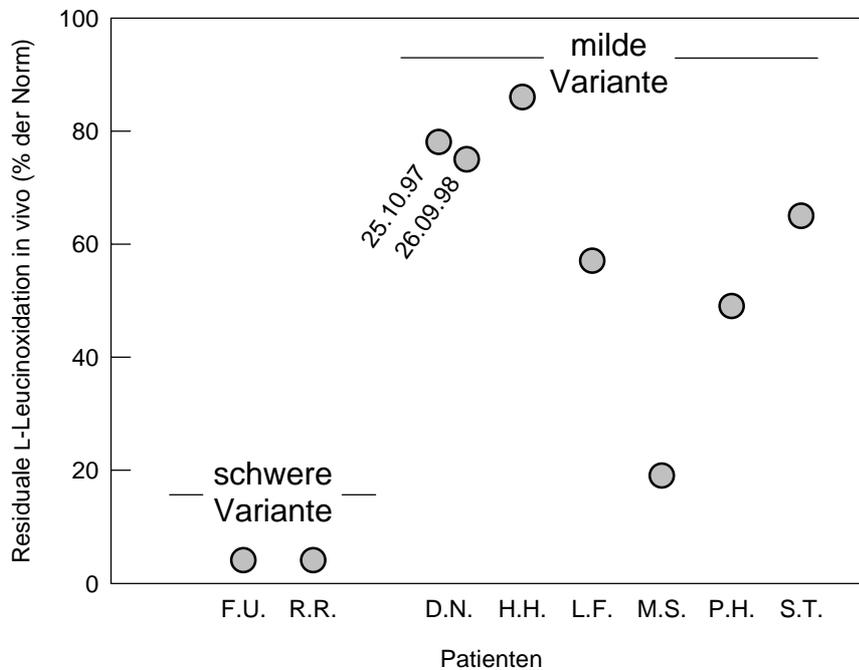


Abb.8: Residuale L-Leucinoxidation bei Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit (Ermittlung siehe Tab.4).

Besonders erwähnenswert sind die Befunde bei einem erwachsenen Patienten mit varianter Form (D.N.), der sich für eine Wiederholungsuntersuchung zur Verfügung stellte. Dieser Patient wies bei der ersten Untersuchung mit  $545 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  hohe, bei der etwa ein Jahr später durchgeführten Wiederholungsuntersuchung norm-nahe initiale L-Leucin-Plasmakonzentrationen ( $238 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) auf. Bei deutlichen Unterschieden in der Kinetik der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den Plasmametaboliten und in der Kinetik des  $^{13}\text{CO}_2$  in der Exhalationsluft (Abb. 9) wurden praktisch identische Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten ermittelt (vgl. Abb. 8, Tab. 4). Dies zeigt, daß, zumindest bei diesem Patienten, eine Bestimmung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation auch bei unterschiedlichen initialen Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren mit dem oralen L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustest möglich ist.

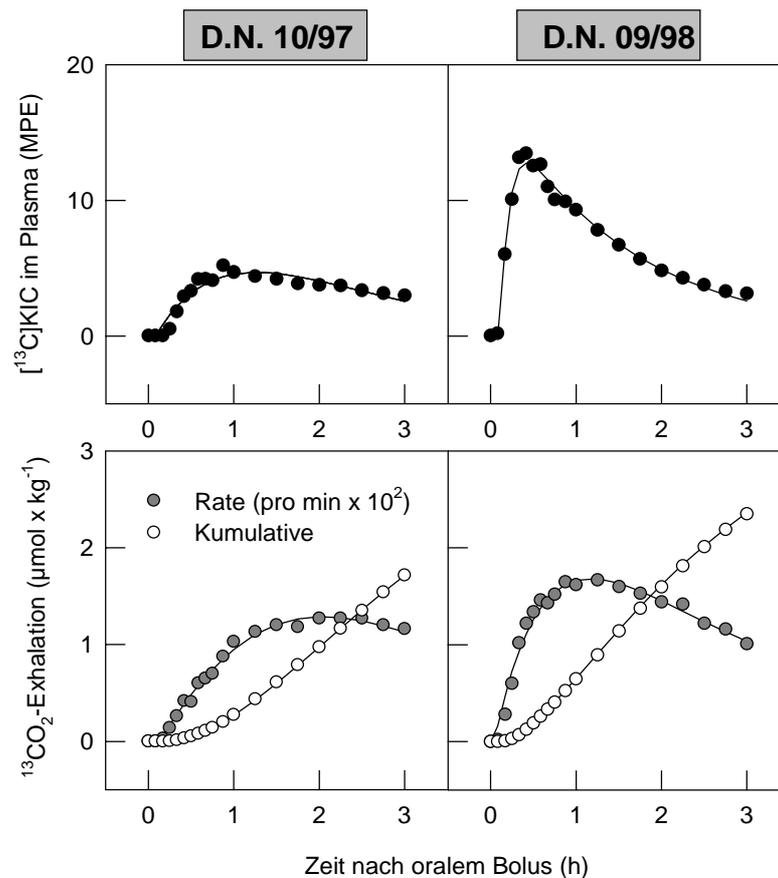


Abb.9: Zeitlicher Verlauf der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung (MPE) im 4-Methyl-2-oxopentanoat (KIC) des Plasmas und Kinetik  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation über basal eines ahornsirupkranken Patienten (milde variante Form) nach Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ; p.o.). Dargestellt sind die Ergebnisse zweier Bolustests bei einem Patienten (D.N.), die in 10/97 und 09/98 durchgeführt wurden.

### 3.4 Diskussion

Für die Durchführung von in vivo Stoffwechseluntersuchungen mit stabil-Isotopen-markierten verzweigtkettigen L-Aminosäuren stellt die Instabilität der Körperpools der verzweigtkettigen L-Aminosäuren und ihrer 2-Oxosäuren ein Problem dar. Zum einen bestimmt die Größe der Pools das Ausmaß der Isotopenverdünnung des applizierten  $^{13}\text{C}$ -markierten Tracers und damit insgesamt die Sensitivität des Untersuchungsansatzes. Zum anderen kann eine zeitliche Variabilität dieser Pools während des Experimentes die Tracerkinetik nicht kontrollierbar beeinflussen, so daß eine quantitative Auswertung erschwert wird. Prinzipiell sollten die Patienten für die Untersuchung daher möglichst norm-nahe Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen L-

Aminosäuren und ihrer 2-Oxosäuren aufweisen. Ganz wesentlich ist, daß die Plasmaspiegel während des Untersuchungszeitraumes weitgehend konstant sind (*Bier, 1989; Schadewaldt & Wendel, 1997; Schadewaldt et al., 1998*).

In praxi ist es allerdings sehr schwierig die Plasmakonzentrationen der Patienten mit diätetischen Maßnahmen sicher norm-nah einzustellen. Dies gelingt in der Regel nur bei einem längeren stationären Aufenthalt unter strenger Stoffwechselkontrolle und auch nur dann, wenn keinerlei Erkrankungen auftreten. Die Probleme in der Stoffwechseleinstellung der Ahornsirupkrankheit ergeben sich zum einen aus der Tatsache, daß die Plasmaspiegel der verzweigtkettigen Verbindungen, sei es durch inadäquate Zufuhr von verzweigtkettigen L-Aminosäuren mit der Nahrung oder durch Freisetzung von verzweigtkettigen L-Aminosäuren aus dem Körperprotein während kataboler Phasen wie Hunger, Streß oder auch leichteren Infekten aufgrund des fehlenden oxidativen Abbaues sehr schnell, innerhalb von Stunden, beträchtlich ansteigen können, während eine Verminderung der so erhöhten Plasmaspiegel im Verlauf von Tagen oder sogar Wochen und selbst bei drastischen therapeutischen Maßnahmen wie z.B. Verabreichung vollständig verzweigtkettigen L-Aminosäuren-freier Nahrung, Glucose- und Insulin-Infusion (*Wendel et al., 1982a; Wendel, 1984; Berry et al., 1991*) oder auch Dialyse (*Sallan & Cottom, 1969; Rey et al., 1969; Shigematsu et al., 1983; Gortner et al., 1989; Hammersen et al., 1978; Rutledge et al., 1990; Wendel et al., 1982b*) nur ganz allmählich erfolgt (*Snyderman et al., 1964*).

Die diätetische Stoffwechseleinstellung ist also ganz wesentlich von der Compliance der Patienten und der Eltern abhängig, so daß, wie unsere eigenen Erfahrungen zeigen, relativ häufig bei den Patienten nicht die gewünschten norm-nahen Plasmakonzentrationen erzielt werden. Aus dem bisher gesagten ergibt sich, daß bei ahornsirupkranken Patienten die Einstellung norm-naher Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren, selbst bei längerer stationärer Aufnahme in einem Stoffwechselzentrum, nicht mit Sicherheit möglich ist. Für die Durchführung von in vivo Stoffwechseluntersuchungen wäre eine solche Maßnahme auch von

keinem der Patienten und dessen Eltern toleriert worden. Letztlich wäre eine solche Maßnahme ethisch nicht vertretbar. Wir haben daher unsere in vivo Untersuchungen an den Patienten durchgeführt, wenn diese eine insgesamt stabile Stoffwechsellage aufwiesen und keine Infekte vorlagen.

Aufgrund der Erfahrungen bei der Durchführung unserer ersten Stoffwechseluntersuchung bei einem ahornsirupkranken Patienten mit klassischer Form (D.G.) wurde nach Maßnahmen gesucht, um akute Anstiege der Plasmakonzentrationen im Rahmen der Untersuchung zu verhindern. Dieser Patient wurde zur Untersuchung stationär aufgenommen und wies trotz diätetischer Kontrolle während der 12stündigen Fastenperiode vor der Untersuchung einen Anstieg der Plasmakonzentration von L-Leucin und seiner korrespondierenden 2-Oxosäure von insgesamt 568 auf 861  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  auf. Dies ist auf die moderat katabole Situation des postabsorptiven Zustandes zurückzuführen. In dieser Situation wird L-Leucin mit einer Rate von ca. 10 - 20  $\mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1} \times \text{h}^{-1}$  aus dem Protein freigesetzt und dann beim Gesunden oxidativ abgebaut. Letzteres ist bei dem ahornsirupkranken Patienten nicht möglich. Das proteolytisch freigesetzte L-Leucin dürfte daher mit ca. 15 - 30  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  im Blut und anderen Körperflüssigkeiten akkumulieren (*Thompson et al., 1991; Schadewaldt & Wendel, 1997*). Mit dieser Abschätzung stimmen die obigen experimentellen Daten gut überein.

Gabe von Kohlenhydrat ggf. in Kombination mit Insulin ist wesentlicher Bestandteil der Standardtherapie der Katabolie-bedingten (drohender) Stoffwechsellage bei Ahornsirupkrankheit (*Wendel et al., 1982a; Wendel, 1984*). Daher war das Ergebnis unseres Versuchs mit einer kontinuierlichen Infusion von Glucose in hoher Dosierung nächtlichen Katabolie-bedingten Anstieg der verzweigtkettigen Verbindungen im Plasma bei zwei Patienten mit klassischer Form der Erkrankung zu verhindern und so die Plasmaspiegel zu stabilisieren, sehr überraschend. Trotz Glucose-Infusion wies der Anstieg der Konzentrationen der verzweigtkettigen Verbindungen auf etwa das Doppelte bei beiden Patienten auf eine insgesamt katabole Stoffwechsellage hin. Dies kann eigentlich nur auf die psychische Belastung

der beiden Patienten durch den stationären Aufenthalt und die damit verbundenen Maßnahmen zurückgeführt werden. Höchstwahrscheinlich haben hier die aufgrund der Streß-Situation vermehrt freigesetzten Hormone, vor allem das Cortisol, der Einstellung einer Insulin-induzierten anabolen Stoffwechsellage entgegengewirkt (*Beaufriere et al., 1989; Brillon et al., 1995; Garrel et al., 1995*).

Aufgrund dieser Erfahrungen schien es sinnvoll sowohl den physischen postabsorptiven Stoffwechselstreß als auch den psychischen Streß der Patienten weitgehend zu vermeiden: (1) Die kontinuierliche Glucose-Infusion wurde durch zusätzliche Kohlenhydrat-reiche, Protein-arme Mahlzeiten spätabends und frühmorgens ersetzt (L-Leucin-Zufuhr  $< 0.5 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ). (2) Die Versuchsmodalitäten wurden am Abend vor dem Versuch mit Patienten und Eltern eingehend besprochen und so weit möglich praktisch geübt. (3) Die Versuchsvorbereitung und die Untersuchung wurden in einer dem Patienten vertrauten Umgebung, auf Wunsch auch zu Hause, durchgeführt. (4) Die Eltern und der behandelnde Pädiateer waren bei der Untersuchung anwesend. Unsere Ergebnisse zeigen, daß mit diesen Maßnahmen tatsächlich die gewünschte Stabilisierung der Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen Verbindungen erreicht wurde.

Da der mittlere  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der standardisierten Testmahlzeit geringfügig höher lag als der normale mittlere  $^{13}\text{C}$ -Gehalt im  $\text{CO}_2$  der Exhalationsluft, wurde an zwei gesunden Probanden geprüft, inwieweit die morgendliche Gabe der Testmahlzeit mit den  $^{13}\text{CO}_2$ -Messungen zur Ermittlung der L-Leucin-Oxidation interferieren könnte. Diese Kontrolluntersuchungen zeigen, daß die Einnahme der Testmahlzeit eine geringe, aber meßbare Erhöhung der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation zum Zeitpunkt des Beginns der L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustests verursachte. Während der Versuchsphase nahm die durch die Testmahlzeit-verursachte  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsrate jedoch ab. Vermutlich führte dies zu einer gewissen Unterschätzung der L-Leucin-bedingten  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation bei den Patienten, da bei der Auswertung ein anfänglich leicht erhöhte  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationswert als Basalwert (Kontrollwert) zugrunde gelegt wurde. Aufgrund der Kontrollversuche

kann abgeschätzt werden, daß die  $^{13}\text{CO}_2$ -Bildung aus dem applizierten L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin um bis zu  $0.3 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$  unterschätzt wurde. Daher ist nicht auszuschließen, daß die residualen L-Leucinoxidationsraten bei den varianten Patienten tatsächlich bis zu ca. 5 % höher liegen als in Tab. 4 angegeben. Wie weiter unten diskutiert wird, dürfte bei einigen Patienten der Effekt der Testmahlzeit auf die Ermittlung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation durch die Wirkung hoher L-Leucin-Plasmakonzentrationen weitgehend kompensiert werden.

Bei keinem der vier Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit war nach der L-Leucin-Gabe ein Anstieg der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation meßbar. Dabei wiesen drei der Patienten norm-nahe Spiegel auf und auch die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat war im Normbereich. Die Sensitivität für die Erfassung einer residualen Ganzkörper-L-Leucinoxidation lag bei diesen Patienten zwischen etwa 3 und 5 % (berechnet nach *Schadewaldt et al., 1998*). Diese Befunde bestätigen unsere früheren Untersuchungen und zeigen, daß die residuale Ganzkörper-L-Leucinoxidation bei klassischer Ahornsirupkrankheit so gering ist, daß sie bei in vivo Umsatzmessungen mit  $^{13}\text{C}$ -markierten L-Leucin, in der hier verwendeten Dosierung, nicht erfaßt werden kann (*Schadewaldt & Wendel, 1997; Schadewaldt et al., 1998*). Denkbar ist, daß nach Applikation (wesentlich) höherer L-[ $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Dosen Änderungen in der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation faßbar werden. Allerdings besteht bei höherer Dosierung das Risiko, daß die L-Leucin-Konzentration im Plasma die (individuell unterschiedliche) toxische Schwelle von ca.  $800 - 1000 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  überschreitet (vgl. Tab.1, Patient R.R. und S.T.), so daß eine Gefährdung der Patienten nicht sicher ausgeschlossen werden kann.

Bei allen klinisch beschriebenen varianten Formen war eine L-[ $^{13}\text{C}$ ]Leucin-abhängige Steigerung der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsrate festzustellen. Der Schweregrad bei diesen Patienten reichte von schweren bis zu milden varianten Formen. Dieses Patientenkollektiv dürfte damit repräsentativ für diese Form der Ahornsirupkrankheit sein (*Chuang & Shih, 1995; vgl. Schadewaldt et al., 1999*). Wie zu erwarten waren die initialen L-Leucin-

Plasmaspiegel der Patienten variabel und nicht mit dem individuellen klinischen Schweregrad korreliert. Besonders deutlich wird dies bei dem Patienten D.N., mit milder varianter Form der Erkrankung, der bei der ersten Untersuchung deutlich erhöhte ( $550 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) und bei der Wiederholungsuntersuchung nahezu norm-nahe Plasma-L-Leucinkonzentration ( $240 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) aufwies. Prinzipiell war die Verdünnung der applizierten  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Markierung bei höheren L-Leucin-Plasmakonzentrationen gesteigert. Die beobachtete hohe interindividuellen Variabilität der Isotopenverdünnung zeigt jedoch, daß es auch bei bekannten initialen L-Leucin-Konzentrationen nicht möglich ist, die Isotopenverdünnung mit ausreichender Genauigkeit vorauszusagen. Insgesamt zeigen diese Befunde, daß wie bei klassischer Ahornsirupkrankheit (*Schadewaldt et al., 1998*) auch bei Patienten mit varianter Form es erforderlich ist zur Bestimmung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation ein invasives Testverfahren zu verwenden.

Bisher liegt zur in vivo L-Leucinoxidation bei Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit nur eine Studie vor. *Elsas et al. (1993)* verwendeten einen nicht-invasiven  $^{13}\text{CO}_2$ -Atemtest mit oraler Gabe von L-[ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Leucin ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) und leiteten aus der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation die Ganzkörper-L-Leucinoxidationsrate ab. Im Lichte der obigen Befunde erscheint die Interpretation der bei diesem Ansatz von *Elsas et al. (1993)* erhobenen Daten im Sinne einer Schweregradsbestimmung, wie bereits früher ausführlich diskutiert (*Schadewaldt et al., 1998*; vergl. Kap. 2), und auch der Effekte von Thiamin mehr als fragwürdig. Zum Beispiel wurde folgender Befund als Wirkung einer einmonatigen Thiamin-Behandlung ( $5 \text{ mg} \times (\text{kg KG})^{-1} \times \text{d}^{-1}$ ) interpretiert: Anstieg der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation von Null auf 3.6 % der applizierten  $^{13}\text{C}$ -Dosis bei initialen L-Leucin-Konzentrationen im Plasma von etwa 1200 bzw.  $400 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Vermutlich jedoch war dieser apparente Thiamineffekt dadurch bedingt, daß im Kontrollversuch eine  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation aufgrund der hohen Verdünnung der applizierten  $^{13}\text{C}$ -Markierung durch die sehr hohen L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat-Körperpools einfach nicht mehr meßbar war.

Für die Abschätzung der residualen Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten wurde ein nicht-kompartmenteller mathematischer Ansatz, in Analogie zu den Berechnungen unter steady state-Bedingungen, entwickelt, bei dem die Verdünnung des applizierten L-[1-<sup>13</sup>C]Leucins in den Metabolitpools berücksichtigt wird. Prinzipiell wäre hier auch an die Anwendung eines kompartimentellen mathematischen Ansatzes, wie er z.B. für die Bestimmung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation bei Normalpersonen verwendet wurde (*Cobelli et al., 1991; Bodner et al., 1996; vgl. Kap. 11*), zu denken. Dieser Ansatz ist sehr komplex und liefert nach unseren bisherigen Erfahrungen bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit wegen der deutlich geringer ausgeprägten Kinetik der Metabolite Ergebnisse mit sehr großen Streubreiten.

Bei den Patienten lag die so berechnete residuale Ganzkörper-L-Leucinoxidationsrate zwischen 4 und 86 % der Norm. Aufgrund der variablen Plasmaspiegel bei Ahornsirupkrankheit muß die Frage gestellt werden, inwieweit in vivo L-Leucinoxidationsraten von Kontrollpersonen und Patienten direkt miteinander verglichen werden können. Aufgrund der Interaktion der verzweigt-kettigen Verbindungen bei Transaminierung und oxidativer Decarboxylierung kann nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden, daß Veränderungen in den Konzentrationsverhältnissen zwischen den Komponenten letztlich auch zu Veränderungen in der Zusammensetzung des Substratflusses durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase führen können (*Schäfer & Schauder, 1988; Schadewaldt et al., 1990; Torres et al., 1995; vgl. Kap. 6*). Z.B. ist denkbar, daß bei (überproportionalem) Anstieg der L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat-Konzentration diese Substrate gegenüber den anderen verzweigt-kettigen Substraten bevorzugt oxidativ abgebaut werden und es so zu einer Veränderung der relativen Zusammensetzung des totalen Substratflusses durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase kommt.

Vier der untersuchten Patienten (H.H., M.S., D.N., P.H.) wiesen norm-nahe L-Leucin-Konzentrationen im Plasma ( $< 250 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) auf und hatten darüber hinaus auch weitgehend normale Konzentrationsverhältnisse für alle

verzweigt-kettigen Verbindungen. In diesen Fällen kann davon ausgegangen werden, daß der Anteil der L-Leucinoxidation am gesamten metabolischen Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in situ mit dem des Kontrollkollektivs weitgehend übereinstimmt und daher ein direkter Vergleich der in vivo L-Leucinoxidationsraten erlaubt ist.

Bei fünf Untersuchungen lagen deutlich erhöhte L-Leucin-Konzentrationen im Plasma ( $> 500 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) vor. Dabei waren auch die Konzentrationsverhältnisse in Richtung L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat verschoben. Das Verhältnis der Substratpaare L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat : L-Valin/3-Methyl-2-oxobutanoat : L-Isoleucin/3-Methyl-2-oxopentanoat lag bei den zwei schweren Varianten (F.U., R.R.) bei 10 : 3 : 4, bei den drei Varianten (D.N., L.F., S.T.) bei 10 : 7 : 4, im Vergleich zu einem Verhältnis von 10 : 17 : 5 bei Kontrollpersonen (*Schadewaldt et al., 1999*). Der relative Anteil von L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat am Gesamt-Substratangebot betrug bei den zwei schweren Varianten ca. 60 %, bei den drei Varianten ca. 45 % und bei Kontrollpersonen 35 %. Es ist daher nicht auszuschließen, daß der Anteil der L-Leucinoxidation am gesamten metabolischen Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in vivo bei diesen Varianten höher lag als bei Normalpersonen.

Aus den Angaben in *Bodner et al. (1997)* zur in vivo Oxidation von L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin bei Normalpersonen kann berechnet werden, daß der Anteil der L-Leucin-Oxidation am metabolischen Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in vivo ca. 50 % beträgt. In Modellexperimenten mit  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierten Substraten konnte an kultivierten humanen Hautfibroblasten von Normalpersonen und ahornsirupkranken Patienten gezeigt werden, daß bei normaler Relation der verzweigt-kettigen Substrate die L-Leucinoxidation ebenfalls etwa 50 % des gesamten metabolischen Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase ausmacht und dies unabhängig davon, ob insgesamt normale oder deutlich erhöhte Konzentrationen der verzweigt-kettigen Verbindungen vorlagen (*Bodner et al., 1998*; vgl. Kap. 6). Eine isolierte Erhöhung des L-Leucin/4-Methyl-2-

oxopentanoat von 35 % auf 60 % des gesamten Substratangebots führte zu einem Anstieg des Anteils der L-Leucinoxidation am gesamten metabolischen Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase auf ca. 70%.

Legt man diese substratabhängige Änderung der L-Leucinoxidationsrate zugrunde, so kann abgeschätzt werden, daß bei den drei Varianten der Anteil der L-Leucinoxidation am metabolischen Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in vivo ca. 60 %, bei den zwei schweren Varianten ca. 70 % ausmachen dürfte. In Bezug auf das Kontrollkollektiv ist der Einfluß einer relativ stärkeren L-Leucinoxidation bei diesen Patienten jedoch gering. Berücksichtigt man eine mögliche substratabhängige Steigerung bei der Abschätzung der residualen L-Leucinoxidation so ergeben sich für die beiden schweren Varianten Werte von 2 statt 4 % der Norm. Bei den drei anderen Varianten ergeben sich lediglich ca. 5 % (gegenüber den in Tab. 4 angegeben) niedrigere residuale L-Leucinoxidationsraten.

Insgesamt lassen die obigen Erörterungen den Schluß zu, daß im untersuchten Patientenkollektiv die in vivo L-Leucinoxidation weitgehend repräsentativ für den Ganzkörper-Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase ist und eine Vergleichbarkeit mit der L-Leucinoxidation von Normalpersonen gegeben ist.

Bis auf die Patienten mit schwerer varianter Form der Ahornsirupkrankheit war die residuale L-Leucinoxidation der Patienten überraschend hoch und lag in der Regel zwischen ein und zwei Drittel der Norm. Damit waren die residualen in vivo Oxidationsraten 2- bis 5-mal höher als die residualen Aktivitäten des verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes in kultivierten humanen Hautfibroblasten der Patienten (9 bis 25 % der Kontrolle; s. Tab. 1). Die Erklärung für diese apparente Diskrepanz zwischen den niedrigen in vitro Restaktivitäten des Enzymkomplexes und den relativ hohen in vivo Oxidationsraten dürfte darin liegen, daß sich in humanen Hautfibroblasten der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex vollständig in der dephosphorylierten, aktiven Form befindet, während in vivo nur ein geringer Teil des Enzymkomplexes aktiviert (dephosphoryliert) ist (*Schadewaldt et al.*,

1989; vgl. Kap. 6). Daher wird bei in vitro Messungen tatsächlich die Gesamtkapazität der Enzymaktivität bestimmt. In vivo dagegen wird nicht die Gesamtkapazität, sondern nur die enzymatisch aktive Form des Enzymkomplexes erfaßt.

Bei Normalpersonen liegt der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex in fast allen Organen weitgehend in der inaktiven Form vor (Leber: 30 % (Suryawan *et al.*, 1998), Muskel: 10 % (Wagenmakers *et al.*, 1989; van Hall *et al.*, 1995; Rush *et al.*, 1995; Jackman *et al.*, 1997; Bowtell *et al.*, 1998; Suryawan *et al.*, 1998), Niere: 14 % (Suryawan *et al.*, 1998). Vermutlich sind beim Menschen insgesamt nur etwa 5 % der gesamten verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Kapazität des Körpers enzymatisch aktiv und für die hier gemessenen in vivo L-Leucin-Oxidationsraten verantwortlich (Wendel *et al.*, 1999; vgl. Kap. 4). Die im Vergleich zu den residualen Enzymkapazitäten relativ hohen in vivo L-Leucinoxidationsraten bei den Patienten könnten prinzipiell auf zwei unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen sein, gegenüber der Norm veränderte kinetische Eigenschaften des Enzymkomplexes (Wendel *et al.*, 1975; Indo *et al.*, 1987) und/oder gegenüber der Norm gesteigerter Aktivitätsstatus des Enzymkomplexes.

Hinsichtlich der kinetischen Eigenschaften zeigen eigene Befunde, daß bei Normalpersonen die aktive Form des Komplexes in situ bereits bei Konzentrationen, wie sie bei Normalpersonen im Plasma vorkommen, mit Substrat gesättigt ist, so daß eine weitere konzentrationsabhängige Steigerung des Substratflusses durch den Enzymkomplex nicht möglich ist (vgl. Kap. 6). Allerdings ist bei keinem der untersuchten Patienten bekannt, ob die jeweilige Mutation zu einer Veränderung der kinetischen Eigenschaften des aktiven Komplexes gegenüber dem Wildtyp führt. Daher ist nicht vollständig auszuschließen, daß die erhöhte Plasmakonzentration der verzweigtkettigen Substrate bei den Patienten zu einer Steigerung des Substratflusses durch die aktiven Form des verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes in situ im Einzelfall mit beigetragen haben könnten. Bei dem Patienten D.N. allerdings ergaben sich bei zwei Untersuchungen, trotz deutlich

unterschiedlicher Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen Verbindungen, keine Hinweise auf eine konzentrationsabhängige Steigerung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation (vgl. Abb. 8, 9).

Andererseits ist davon auszugehen, daß die hohe Konzentration von 4-Methyl-2-oxopentanoat, einem effektiven Inhibitor der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Kinase (*Jones & Yeaman, 1986; Yeaman, 1989*), bei den Patienten zu einem gegenüber Normalpersonen erhöhten Aktivitätsstatus der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in situ geführt hat. Bei dem Patienten D.N. mit einer residualen in vitro Kapazität von ca. 25 % der Kontrolle z.B. würde eine Steigerung des in vivo Aktivitätsstatus auf etwa 15 % ausreichen, um die residuale Ganzkörper-L-Leucinoxidation von ca. 75 % befriedigend zu erklären. Welche Bedeutung diesem Mechanismus bei varianter Form der Ahornsirupkrankheit zukommt, kann durch die Bestimmung des in vivo Aktivitätsstatus des verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes, z. B. in Muskelbiopsien, experimentell geklärt werden.

Die beiden Wiederholungsuntersuchung des Patienten D.N., mit deutlich unterschiedlicher Stoffwechselsituation, zeigen, daß eine Bestimmung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation in Patienten mit varianter Ahornsirupkrankheit mit dem hier angewandten Verfahren reproduzierbar möglich ist. Die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Untersuchungen war erstaunlich, insbesondere unter Berücksichtigung der bei Normalpersonen beobachtbaren hohen intraindividuellen Variabilität. Dies deutet darauf hin, daß bei den Patienten das Ausmaß der intraindividuelle Variabilität geringer als bei Normalpersonen (*Schadewaldt et al., 1994; Schadewaldt et al., 1998*). Dies erscheint letztlich jedoch erklärbar, da die Patienten, bedingt durch den metabolischen Defekt, nur eine gegenüber den Normalpersonen sehr begrenzte metabolische Regulationsfähigkeit aufweisen.

## Kapitel 4

# Auswirkungen einer Lebertransplantation auf den Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren bei Ahornsirupkrankheit \*

**Zusammenfassung.** Bei Ahornsirupkrankheit ist der Abbau verzweigtkettiger L-Aminosäuren auf der Stufe des verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes beeinträchtigt. Daher akkumulieren verzweigtkettige L-Amino- und 2-Oxosäuren, die in höheren Konzentrationen neurotoxisch wirken. Die Behandlung besteht in einer verzweigtkettigen L-Aminosäuren-armen Diät. Bisher wurde bei drei ahornsirupkranken Patienten eine orthotope Lebertransplantation durchgeführt. Bei einem dieser Patienten hatten wir Gelegenheit den Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren nach Lebertransplantation zu untersuchen. Bei der Patientin H.S. mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit wurde die Transplantation im Alter von 7.4 Jahren nach finalem Leberversagen durchgeführt. Trotz postoperativ kataboler Stoffwechsellaage sanken die Konzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren im Plasma innerhalb von Stunden nahezu auf Normalwerte ab. Bei nicht-ingeschränkter Proteinzufuhr sind die Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen Metabolite seither, auf moderat erhöhtem Niveau (2-3fache der Norm), stabil. Im Vergleich zu den proteinogenen verzweigtkettigen L-Aminosäuren persistiert eine auffällig hohe Konzentration von Alloisoleucin im Plasma (> 5fach der Norm). Zur

Charakterisierung von Stoffwechselumsatzraten wurden die metabolische L-Alloisoleucin-Clearance und die Ganzkörper-L-Leucinoxidation im postabsorptiven Zustand bestimmt. Bei oraler Belastung mit  $580 \mu\text{mol L-Alloisoleucin} \times (\text{kg KG})^{-1}$  lag die Eliminationskonstante  $k_e$  mit  $0.067 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$  im Bereich von Normalpersonen ( $k_e=0.069 \pm 0.012 \text{ h}^{-1}$ ,  $n=4$ ). Nach oraler Applikation von  $38 \mu\text{mol L-[1-}^{13}\text{C]Leucin} \times (\text{kg KG})^{-1}$  wurden 19.5 % der applizierten  $^{13}\text{C}$ -Dosis als  $^{13}\text{CO}_2$  in der Ausatemungsluft wiedergefunden. Unter vergleichbaren Bedingungen betrug die  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation bei gesunden Probanden  $19.0 \pm 3.6 \%$  der  $^{13}\text{C}$ -Dosis ( $n=10$ ). Während bei Gesunden zahlreiche Organe, insbesondere Skelettmuskel, Niere und Leber, am Abbau der verzweigtkettigen L-Aminosäuren beteiligt sind, ist bei der Patientin eine Oxidation ausschließlich in der transplantierten Leber möglich. Trotzdem werden hier Stoffwechselumsatzraten erreicht, die mit denen von Normalpersonen vergleichbar waren. Offensichtlich führen bei der Patientin die erhöhten Substratkonzentrationen im Plasma, vermutlich über eine Erhöhung des Aktivitätsstatus der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase, zu einer kompensatorischen Steigerung des Abbaus im funktionell intakten Lebergewebes.

## 4.1 Einleitung

Ahornsirupkrankheit ist eine heterogene angeborene Stoffwechselstörung, bei der der oxidative Abbau der verzweigtkettigen L-Aminosäuren auf der Stufe des mitochondrial lokalisierten verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes (E.C. 1.2.4.4) beeinträchtigt ist. Als Folge des Enzymdefektes akkumulieren in Blut und anderen Körperflüssigkeiten der Patienten die verzweigtkettigen L-Aminosäuren und ihre korrespondierenden 2-Oxosäuren, die über bisher nicht geklärte Mechanismen neurotoxisch wirken können. Die Behandlung erfolgt durch eine lebenslange verzweigtkettige L-Aminosäurearme Diät (Übersicht bei *Chuang & Shih, 1995*).

Der Schweregrad der Erkrankung reicht von schweren klassischen Formen, mit sehr geringer Protein(Leucin)-Toleranz (Aktivität der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in kultivierten Hautfibroblasten < 2 % der Norm), bis zu milden varianten Formen, mit variabler Protein(Leucin)-Toleranz (residuale Enzymaktivitäten in vitro 2–40 % der Norm) (Übersicht bei *Chuang & Shih, 1995*).

Typisch für diese Erkrankung ist das Auftreten höherer Konzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäure L-Alloisoleucin im Plasma ( $> 5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ; *Schadewaldt et al., 1999*). L-Alloisoleucin ist ein Diastereomer des L-Isoleucins und wird bei dessen Transaminierung als Nebenprodukt gebildet (*Schadewaldt et al., 2000*). L-Alloisoleucin ist nicht-proteinogen und wirkt im Gegensatz zu den anderen verzweigtkettigen L-Aminosäuren auch in hohen Konzentrationen nicht-neurotoxisch.

Weltweit wurde bisher an drei Patienten mit Ahornsirupkrankheit (klassische Formen) eine orthotope Lebertransplantation durchgeführt (*Merinero et al., 1994; Netter et al., 1994; Kaplan et al., 1997*). Bei einem 7.4 Jahre alten französischen Mädchen (Transplantation 1991) und einem 8 Jahre alten mennonitischen Mädchen (Transplantation 1997) erfolgte die

Lebertransplantation aufgrund von finalem Leberversagen infolge einer Hepatitis A-Infektion bzw. einer Vitamin A-Intoxikation (*Netter et al., 1994; Kaplan et al., 1994*). Bei einem 2jährigen spanischen Jungen wurde die Transplantation 1993, aufgrund einer verzögerten psychomotorischen Entwicklung und häufigen metabolischen Dekompensationen, auf Wunsch der Eltern durchgeführt (*Merinero et al., 1994*).

Bei der französischen Patientin hatten wir Gelegenheit, die Auswirkungen der Transplantation einer metabolisch intakten Leber auf den Ganzkörper-Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren zu untersuchen. Die Charakterisierung des Stoffwechsels erfolgte über eine Langzeitbeobachtung der Plasmakonzentrationen verzweigtkettiger Verbindungen sowie über in vivo-Umsatzmessungen mit verzweigtkettigen L-Aminosäuren. Zunächst wurde eine Bestimmung der metabolischen L-Alloisoleucin-Clearance nach *Schadewaldt et al. (1991)* durchgeführt. Die Etablierung des L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustests (*Schadewaldt et al., 1998*) ermöglichte dann auch eine direkte Bestimmung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation.

Diese Untersuchungen sollten Aufschluß darüber geben, ob und inwieweit die Transplantation des metabolisch intakten Lebergewebes zu einer Normalisierung des Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren führt und ob darüber hinaus Rückschlüsse auf Interorganbeziehungen im Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren möglich sind.

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 Material

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt), Sigma Chemie (München) oder Boehringer (Mannheim) bezogen. L-Alloisoleucin wurde von Bachem

(Heidelberg) bezogen. L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin (99 % 1-<sup>13</sup>C) stammte von Promochem (Wesel). Reinheit und Isotopengehalt des L-[1-<sup>13</sup>C]Leucins wurden mittels automatischer Aminosäureanalyse und GC-MS-Analyse (s. 4.2.3.2) bestimmt und entsprachen den Spezifikationen des Herstellers.

#### 4.2.2 Patienten und Probanden

Die Patientin H.S. wurde am 28.10.1983 als erstes Kind konsanguiner Eltern geboren. Am 8. Lebenstag wurde die Diagnose klassische Ahornsirupkrankheit gestellt und mit der diätetisch Behandlung begonnen. Infolge von Infektionskrankheiten traten häufig metabolische Krisen auf. Im Alter von 7.4 Jahren wurde bei der Patientin nach finalem Leberversagen aufgrund einer Hepatitis A-Infektion eine orthotope Lebertransplantation durchgeführt. Seither ist die Proteinzufuhr der Patientin altersentsprechend. Stoffwechsellentgleisungen traten nicht mehr auf. Eine detaillierte Fallbeschreibung ist bei *Netter et al. (1994)* zu finden.

Die Charakterisierung des Stoffwechsels der verzweigtkettigen L-Aminosäuren nach Lebertransplantation bei dieser Patientin erfolgte mittels oraler Bolustests mit verzweigtkettigen L-Aminosäuren. Der L-Alloisoleucin-Bolustest (*Schadewaldt et al., 1991*) wurde im Alter von 10.4 Jahren (120 cm, 27 kg) durchgeführt (die experimentellen Daten dieser Untersuchung wurden von Herrn Prof. U. Wendel für diese Arbeit zur Verfügung gestellt). Der L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustest (*Schadewaldt et al., 1998*) fand im Alter von 13.9 Jahren (142 cm, 42 kg) statt. Vor den Tests wurde die Patientin einer körperlichen Untersuchung unterzogen. Außer der oben genannten Erkrankung wurde keine weitere akute oder chronische Erkrankung festgestellt.

Bei der heterozygoten Mutter der Patientin (M.S.; 36 Jahre, 163 cm, 75 kg) wurde ein Bolustest mit L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin durchgeführt. Die Mutter wurde ebenfalls einer körperlichen Untersuchung unterzogen; es lag keine akute oder chronische Erkrankung vor.

Die vorliegenden Versuche wurden von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geprüft und genehmigt. Von den Eltern der Patientin wurden vor der Durchführung der Untersuchungen schriftliche Einverständniserklärungen eingeholt.

#### 4.2.3 Methoden

##### 4.2.3.1 In vivo Untersuchungen

Bolustests mit L-Alloisoleucin (*Schadewaldt et al., 1991*) und L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin (*Schadewaldt et al., 1998*) wurden, wie bereits beschrieben (vgl. Kapitel 2), nach 12stündigem Übernachtsfasten unter Ruhebedingungen im Liegen durchgeführt. Zwischen 8:00 und 9:00 Uhr wurden der Patientin entweder L-Alloisoleucin ( $580 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) oder L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin (99% 1-<sup>13</sup>C,  $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ), gelöst in 150 ml verdünnter Zitronensäure ( $5 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ), oral verabreicht. Venöses EDTA-Blut wurde kurz vor der Applikation des oralen Bolus (Kontrollwerte) und danach entsprechend des in Abb. 1 (L-Alloisoleucin-Bolus) bzw. 2 ([<sup>13</sup>C]Leucin-Bolus) dargestellten Zeitschemas entnommen. Bei der Untersuchung mit [<sup>13</sup>C]Leucin wurden parallel zu den Blutproben auch Proben der Exhalationsluft gesammelt und zusätzlich die CO<sub>2</sub>-Exhalation kontinuierlich mittels Atemgasanalyse (Deltatrac Metabolic Monitor; Datex Instruments, Helsinki, Finnland) bestimmt.

Außerdem wurde bei der heterozygoten Mutter ein L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustest unter Ruhebedingungen im Sitzen durchgeführt. Proben der Ausatemungsluft wurden entsprechend dem Zeitschema in Abb. 2 gesammelt, die totale CO<sub>2</sub>-Exhalation wurde, auf der Basis einer endogenen CO<sub>2</sub>-Produktion von  $5 \text{ mmol} \times \text{min} \times \text{m}^2$  Körperoberfläche (*Shreeve et al., 1970*), berechnet. Die Körperoberfläche wurde nach *Haycock et al. (1978)* ermittelt.

#### 4.2.3.2 Analytische Verfahren

##### Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren und ihrer 2-Oxosäuren in den Plasmaproben der in vivo Umsatzmessungen erfolgte mittels automatische Aminosäureanalyse mit kationenaustausch-chromatographischer Trennung und Ninhydrin-Detektion (*Schadewaldt et al., 1990*) bzw. RP-HPLC-Analyse der Chinoxalin-Derivate der 2-Oxosäure mit fluorimetrischer Detektion (*Schadewaldt et al., 1989*).

##### Bestimmung der Isotopenanreicherung in den Plasmametaboliten

Zur Bestimmung der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den verzweigt-kettigen L-Aminosäuren wurde Plasma (0.5 ml) mit 5-Sulphosalicylsäure (10 %, w:v; 0.5 ml) gemischt. Das ausgefällte Protein wurde durch Zentrifugation entfernt (10 min, 4 °C, 10 000 x g). Der Überstand (0.5 ml) wurde auf eine Dowex 50 WX 8-Säule (200-400 mesh,  $\text{H}^+$ -Form, 0.5 ml) aufgetragen. Die Säule wurde 4 mal mit Wasser gewaschen, um die 5-Sulphosalicylsäure vollständig zu entfernen. Die Elution der L-Aminosäuren erfolgte mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $2.5 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ , 1.2 ml). Das Eluat wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 30  $\mu\text{l}$  N-Methyl-N-(*t*-Butyldimethylsilyl)-trifluoracetamid (MTBSTFA, Pierce Chemicals, Rockford, Illinois, USA) aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die dabei entstandenen N,O-Di-*t*-Butyldimethylsilyl-Derivate wurden für die massenspektrometrische Analyse eingesetzt.

Zur Bestimmung der Isotopenanreicherung in den verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren wurden die Chinoxalin-Derivate der 2-Oxosäuren nach *Schadewaldt et al. (1989)* präpariert, durch Festphasenextraktion an 1 ml-reversed phase  $\text{C}_{18}$ -Säulchen gereinigt und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 30  $\mu\text{l}$  N-Methyl-N-(*t*-Butyldimethylsilyl)-trifluoracetamid (MTBSTFA, Pierce Chemicals, Rockford, Illinois, USA) aufgenommen und die O-*t*-Butyldimethylsilyl-Derivate der Chinoxalinole massenspektrometrisch analysiert werden.

Zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse wurde ein HP 6890 Gaschromatograph, ausgestattet mit einer HP-5 MS-Kapillarsäule (5 % Phenylmethylpolysiloxan; 30 m, 0.25 mm Innendurchmesser, 0.25 µm Filmdicke), mit direkter Kopplung zu einem HP massenselektiven Detektor (Hewlett Packard, Waldbronn) benutzt. Helium diente als Trägergas (0.9 ml x min<sup>-1</sup>). Für die Bestimmung wurde 1 µl Probe, splitlos aufgetragen und im allgemeinen das folgende Zeitprogramm benutzt: Säulentemperatur zu Beginn 100 °C, nach 0.5 Minuten um 10 °C x min<sup>-1</sup> auf 260 °C (für die *N,O*-Di-*t*-Butyldimethylsilyl-Derivate der Aminosäuren) bzw. um 20 °C x min<sup>-1</sup> auf 260 °C (für die *O-t*-Butyldimethylsilyl-Derivate der Chinoxalinole). Die Temperatur von 260 °C wurde für 1 Minute gehalten. Die Temperatur des Injektors und der Verbindung zum Massenspektrometer betrug 250 °C. Die massenspektrometrische Bestimmung erfolgte im EI-Modus mit einer Temperatur der Ionenquelle von 140 °C und einer Elektronen-Energie von 70 eV. Zur Bestimmung der 1-<sup>13</sup>C-Anreicherung wurde das Verhältnis (R) der Ionenintensitäten bei m/z 303 zu m/z 302 (für die *N,O*-Di-*t*-Butyldimethylsilyl-Derivate der L-Aminosäuren) bzw. bei m/z 260 zu m/z 259 (für die *O-t*-Butyldimethylsilyl-Derivate der Chinoxalinole) durch selected ion monitoring (SIM) ermittelt.

#### Bestimmung der <sup>13</sup>C-Anreicherung im CO<sub>2</sub>

Die Bestimmung der Isotopenanreicherung im CO<sub>2</sub> der Exhalationsluft erfolgte, wie in 2.2.3.2 beschrieben, über Isotopenratio-Massenspektrometrie. Es wurde ein gegen Pee Dee Belemniten-kalibrierter Standard (PDB) verwendet (s. 2.2.3.2).

### 4.2.4 Auswertung und Statistik

#### 4.2.4.1 Berechnungen

Die Isotopenanreicherung in „mol percent excess“ (MPE =  $\{R-R_0\} / \{R-R_0+1\} \times 100$ ) in den Plasmametaboliten wurde aus dem Verhältnis der

Ionenintensitäten in den Proben, die nach der Applikation der  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierte verzweigtkettigen L-Aminosäure entnommen wurden (R) und dem natürlich vorkommenden Verhältnis in den vor dem oralen Bolus entnommenen Proben ( $R_0$ ) berechnet (Wolfe, 1984; s. 2.2.4.1).

Die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung (APE) im  $\text{CO}_2$  der Exhalationsluft wurde berechnet als Differenz zwischen dem  $^{13}\text{CO}_2$  in den vor dem oralen Bolus entnommenen Atemproben (Kontrollwert) und dem  $^{13}\text{CO}_2$  der Proben, die nach dem oralen Bolus entnommenen wurden (s. 2.2.4.1). Die Raten der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation über basal wurden auf der Basis der Isotopenanreicherung im  $\text{CO}_2$  (APE) und der  $\text{CO}_2$ -Exhalationsrate berechnet (s. 2.2.4.1).

#### 4.2.4.2 Nicht-lineare Regressionsverfahren

##### Metabolische L-Alloisoleucin-Clearance

Die mathematische Auswertung der Bolustests mit L-Alloisoleucin erfolgte mit Hilfe von nicht-linearen Regressionsverfahren. Dabei wurde die experimentellen Werte des zeitlichen Verlaufes der L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma (korrigiert um die vor L-Alloisoleucin-Gabe bestimmten Basalwerte) an die Bateman-Funktion (Formel 1) unter Verwendung des Marquart-Levenberg-Algorithmus für nicht-lineare Regressionsanalysen (Methode der kleinsten Fehlerquadrate; Sigma Plot 2.0, Jandel Scientific) angepaßt.

$$y(t) = y(0) \times \frac{k_a}{k_e - k_a} \times (e^{-k_a \times t} - e^{-k_e \times t}) \quad (1)$$

$y(t)$ : Plasmakonzentration von L-Alloisoleucin zur Zeit  $t$ , in  $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$

$y(0)$ : fiktive initiale Plasmakonzentration von L-Alloisoleucin nach Bolusgabe, in  $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$

$k_a, k_e$ : Ratenkonstante für die Absorption bzw. Elimination, in  $\text{h}^{-1}$

$t$ : Zeit nach oralem Bolus, in  $\text{h}$

Die mit diesem Verfahren ermittelte Eliminationskonstante  $k_e$  ( $\pm$  asymptotische Standardabweichung) ist ein Maß für die metabolische Clearance von L-

Alloisoleucin in vivo. Die zugehörigen Normbereiche wurden aus den experimentellen Ergebnissen, die aus bereits zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführten L-Alloisoleucin-Bolusversuchen an vier gesunden Probanden (3 männlich, 1 weiblich;  $37 \pm 9$  Jahre) zur Verfügung standen (*Schadewaldt et al., 1991*), berechnet.

#### Gesamte $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation

Zur Bestimmung der insgesamt abgeatmeten  $^{13}\text{CO}_2$ -Menge nach oralem L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolus wurde ein neues, von unserer Arbeitsgruppe etabliertes Verfahren verwendet (Kapitel 2; vgl. *Schadewaldt et al., 1998*).

Dabei wurde zunächst der zeitliche Verlauf der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsrate ( $y(t)$ ) an die in Formel 2 angegebene Funktion unter Verwendung des Marquart-Levenberg-Algorithmus für nicht-lineare Regressionsanalysen (Methode der kleinsten Fehlerquadrate; Sigma Plot 2.0, Jandel Scientific) angepaßt und damit die Parameter  $a_i$  und  $k_i$  abgeschätzt.

$$y(t) = \sum_{i=1}^4 a_i \times e^{-k_i \times t} \quad (2)$$

$y(t)$ :  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsrate, in  $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$

$a_i, k_i$ : Konstanten

$t$ : Zeit nach oralem Bolus, in min

Die insgesamt abgeatmete  $^{13}\text{CO}_2$ -Menge ( $Y(t_\infty)$ , in  $\mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) ergibt sich nach Integration und Extrapolation von Formel 2 gegen  $t_\infty$  und Einsetzen der Schätzwerte für die Parameter  $a_i$  und  $k_i$  nach Formel 3:

$$Y(t_\infty) = \sum_{i=1}^4 a_i \times \frac{1}{k_i} \quad (3)$$

#### 4.2.4.3 Statistik

Im allgemeinen sind die Ergebnisse als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben.

### 4.3 Ergebnisse

Bei der Patientin H.S. wurde von *Netter et al. (1994)* unmittelbar nach der Lebertransplantation der Verlauf der Plasmakonzentrationen der verzweigkettigen L-Aminosäuren untersucht. Die Befunde zeigen, daß bei der Patientin H.S. nach Perfusion des Transplantates die Plasmakonzentrationen, trotz der postoperativ eindeutig katabolen Stoffwechsellage - die bei Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit normalerweise zu einem schnellen und starken Anstieg der verzweigkettigen L-Aminosäuren im Plasma führt - rasch absanken und sich innerhalb von 10 Stunden weitgehend normalisierten. Diese Beobachtung von *Netter et al. (1994)* ist in Abb. 1 am Beispiel des L-Leucins im Plasma exemplarisch dargestellt.

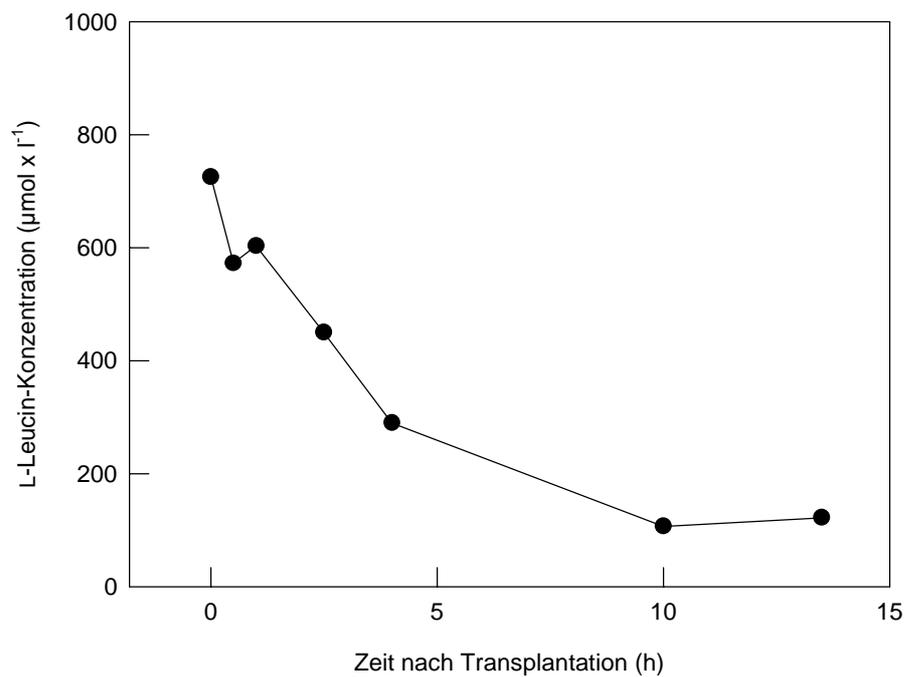


Abb. 1: Verlauf der Plasma-L-Leucinspiegel bei der ahornsirupkranken Patientin H.S. unmittelbar nach Lebertransplantation (verändert nach *Netter et al., 1994*)

## Langfristige Entwicklung der Plasmakonzentrationen

Der von *Netter et al. (1994)* beschriebene Effekt der Lebertransplantation wird durch die Langzeitbeobachtung der Plasma-Leucinkonzentrationen über mehrere Jahre vor und nach Lebertransplantation voll bestätigt. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Vor der Lebertransplantation lagen die L-Leucin-Konzentrationen, trotz einer deutlich eingeschränkten L-Leucin-Zufuhr mit der Nahrung, weit über der Norm. Sie betragen im Mittel  $515 \pm 448 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (MW  $\pm$  SD; n = 39) und waren aufgrund häufiger metabolischer Krisen außerordentlich variabel (Bereich: 44 - 1568  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ). Nach der Lebertransplantation waren die Konzentrationen bei nicht-eingeschränkter und altersentsprechender Zufuhr von L-Leucin dagegen stabil. Allerdings blieben die L-Leucin-Konzentrationen mit einem mittleren Wert von  $241 \pm 35 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (MW  $\pm$  SD; n = 15) konstant ca. 2fach gegenüber der Norm erhöht. Entsprechendes war auch bei den Plasmakonzentrationen von L-Valin ( $406 \pm 51$  (Bereich: 297 - 488)  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) und L-Isoleucin ( $169 \pm 41$  (Bereich: 103 - 232)  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) festzustellen. Besonders auffällig war, daß auch nach der Lebertransplantation deutlich über die Norm erhöhte Konzentrationen von L-Alloisoleucin im Plasma persistierten ( $14 \pm 5$  (Bereich: 6 - 24)  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ; Normbereich nach *Schadewaldt et al., 1999*, vgl. Kapitel 10: bis  $5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ )).

Tab. 1: Zufuhr und Plasmakonzentration von L-Leucin bei der Patientin H.S. mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit vor und nach orthotoper Lebertransplantation (Leber-Tx)

Patientin H.S.	Diätetische Leucin-Zufuhr (mg x d <sup>-1</sup> )	Leucin-Konzentration *	
		( $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ )	n
Vor Leber-Tx §	< 400 †	$515 \pm 448$ (392; 44 - 1568)	39
Nach Leber-Tx #	> 4000 ‡	$241 \pm 35$ (237; 165 - 298)	15
Gesunde Kontrollen	> 4000	$134 \pm 23$	52

§ Beobachtungszeitraum: 7/87-4/91; # Beobachtungszeitraum: 5/91-9/97; † 10-17 kg KG; ‡ 17-25 kg KG; \* MW  $\pm$  SD, Median und Bereich in Klammern

Systematische Messungen der Konzentrationen der verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren im Plasma stehen nicht zur Verfügung. Allerdings konnten anlässlich der beiden in vivo Umsatzmessungen bei der Patientin (s.u.) folgende - ebenfalls deutlich über die Norm erhöhte - Werte ermittelt werden: 4-Methyl-2-oxopentanoat 95 und 104 (Norm:  $40 \pm 10$ ,  $n = 52$ ; eigene nicht publizierte Befunde)  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ , 3-Methyl-2-oxobutanoat 44 und 46 (Norm:  $19 \pm 5$ )  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  und 3-Methyl-2-oxopentanoat 103 und 100 ( $26 \pm 7$ )  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ .

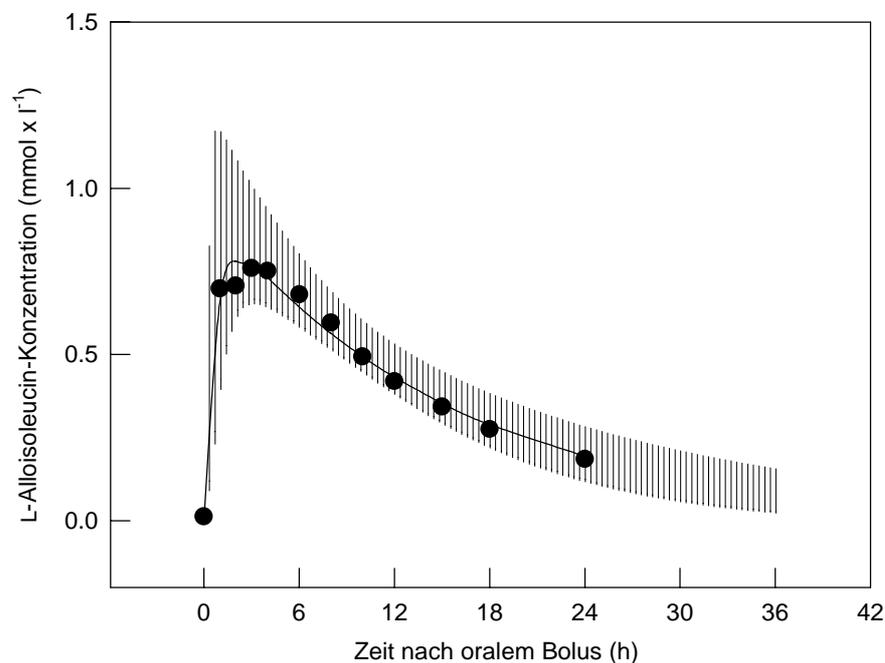


Abb. 2: Plasmakinetik von L-Alloisoleucin bei der lebertransplantierten ahornsirupkranken Patientin H.S. nach L-Alloisoleucin-Bolus ( $580 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ , p.o.) verabreicht. Der Normbereich ( $\text{MW} \pm 2 \text{SD}$ ;  $n = 4$ ; vgl. 4.2.4.2) ist schraffiert dargestellt.

### Metabolische L-Alloisoleucin-Clearance

Eine erste in vivo Charakterisierung des Stoffwechsels verzweigt-kettiger L-Aminosäuren nach Lebertransplantation erfolgte mit dem oralen L-Alloisoleucin-Bolustest. Dazu wurde L-Alloisoleucin oral verabreicht und die Eliminationsgeschwindigkeit aus dem Plasma als Maß für die metabolische L-Alloisoleucin-Clearance bestimmt. In Abb. 2 ist das Ergebnis dieses Tests

dargestellt. Der initiale L-Alloisoleucin-Plasmaspiegel betrug  $13 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Nach Bolusgabe war der zeitliche Verlauf der L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma der Patientin H.S. mit dem von gesunden Kontrollpersonen vergleichbar. Die Eliminationskonstante von L-Alloisoleucin  $k_e$  lag mit  $0.067 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$  im Bereich gesunder Probanden ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ :  $0.069 \pm 0.012 \text{ h}^{-1}$ ;  $n = 4$ ). Die Plasmakonzentrationen der anderen verzweigtkettigen L-Aminosäure (L-Leucin:  $237 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ , L-Valin:  $454 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ , L-Isoleucin:  $193 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) wurden durch die L-Alloisoleucin-Gabe nicht beeinflusst.

#### In vivo Leucin-Oxidation

Der L-Alloisoleucin-Bolustest erlaubt jedoch keine direkte Aussage über die in vivo-Oxidation verzweigtkettiger L-Aminosäuren. Daher wurde zu einem späteren Zeitpunkt bei der Patientin ein L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustest durchgeführt, um die Ganzkörper-L-Leucinoxidation zu bestimmen. Dabei wird L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin oral verabreicht. Als Kontrollparameter für Resorption und Isotopenverdünnung der applizierten  $^{13}\text{C}$ -Markierung werden Plasmakinetik von Konzentration und  $^{13}\text{C}$ -Markierung des L-Leucins und der zugehörigen 2-Oxosäure bestimmt. Die Oxidation des stabil-Isotopen-markierten Leucins wird mittels der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation ermittelt. Die im folgenden verwendeten Kontrollwerte stammen aus einer früheren Untersuchung an gesunden Probanden (*Schadewaldt et al., 1998*; vgl. Kapitel 2).

Die Plasmakinetik von L-Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat nach Bolusgabe war bei der lebertransplantierten Patientin H.S. weitgehend mit der von gesunden Kontrollpersonen vergleichbar (Abb. 3). Offensichtlich wurde das  $^{13}\text{C}$ -markierte L-Leucin sehr rasch resorbiert, so daß die L-Leucin-Konzentration im Plasma gegenüber der Kontrollgruppe zeitlich früher (Maximum bei 15 Minuten) anstieg und ein deutlicher ausgeprägtes Maximum aufwies ( $+ 101 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ; Kontrollgruppe:  $+51 \pm 10 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ,  $n = 10$ ).

Entsprechend lagen auch die Werte der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in L-Leucin und seiner korrespondierenden 2-Oxosäure in der initialen Phasen nach Bolusgabe an der oberen Normbereichsgrenze (Abb. 3) und erreichten Maximalwerte von

24.7 und 16.3 MPE im L-Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat (Kontrollgruppe: L-Leucin,  $18.4 \pm 4.0$  MPE; 4-Methyl-2-oxopentanoat,  $16.1 \pm 3.5$  MPE;  $n = 10$ ). Der nachfolgende Abfall der Isotopenanreicherung war deutlich ausgeprägt, so daß in der späteren Phase die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen an der unteren Normgrenze lagen. Letzteres ist vermutlich auf eine stärkere Isotopenverdünnung aufgrund der gegenüber der Norm erhöhten basalen L-Leucin- und 4-Methyl-2-oxopentanoat-Plasmakonzentrationen ( $259$  bzw.  $104 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ; Kontrolle:  $129 \pm 22$  bzw.  $44 \pm 7 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ;  $n = 10$ ) bei der Patientin H.S. zurückzuführen.

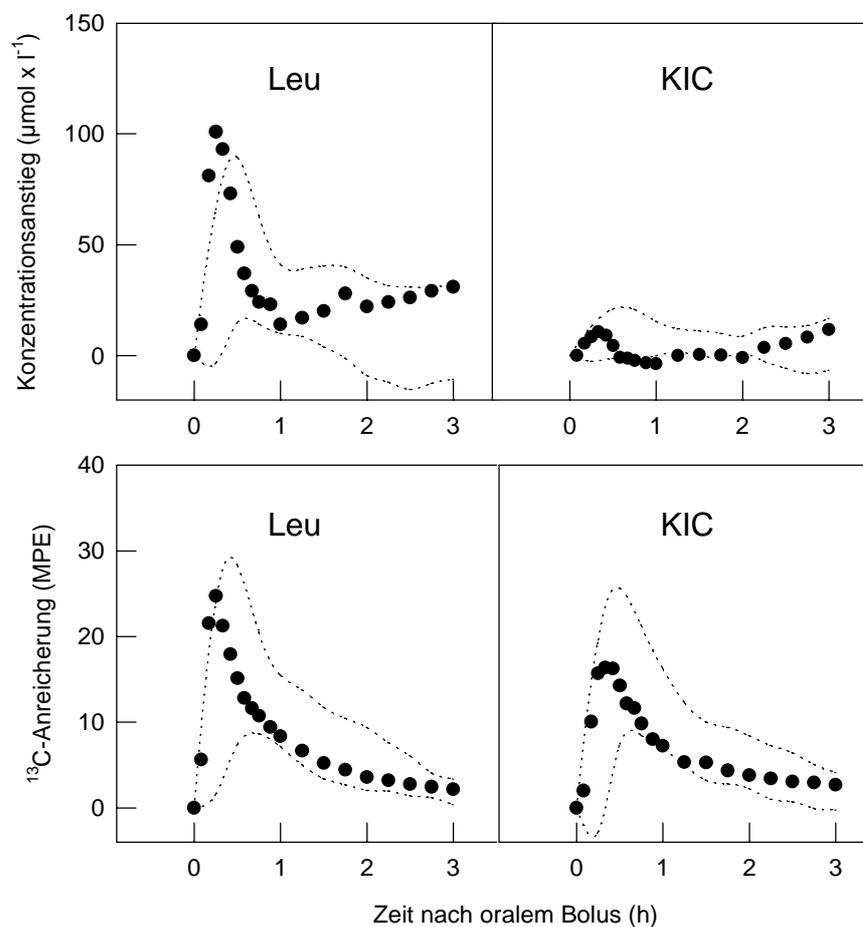


Abb. 3: Konzentrationsänderung (oben) und  $^{13}\text{C}$ -Isotopenanreicherung (unten) von L-Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat (KIC) im Plasma der lebertransplantierten ahornsirupkranken Patientin H.S. nach Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin ( $38 \mu\text{mol} \times \text{kg} (\text{KG})^{-1}$ , p.o.). Die initialen L-Leucin- und 4-Methyl-2-oxopentanoat-Spiegel vor Bolusgabe lagen bei  $259$  bzw.  $104 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Zum Vergleich ist der Bereich für gesunde Kontrollpersonen ist durch gepunktete Linie mitangegeben (MW  $\pm 2$  SD;  $n = 10$ ; aus *Schadewaldt et al., 1998*).

Die Kinetik der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation nach oralem Bolus bei der Patientin spiegelt die Kinetik der  $^{13}\text{C}$ -markierten Plasmametabolite wider und ist in Abb. 4 dargestellt. Die maximale  $^{13}\text{CO}_2$ -Abatmung betrug  $0.057 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  (Kontrollgruppe:  $0.041 \pm 0.010 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ;  $n = 10$ ) und wurde bereits 25 Minuten nach Bolusgabe erreicht. Die insgesamt abgeatmete  $^{13}\text{CO}_2$ -Menge betrug  $7.4 \mu\text{mol} \ ^{13}\text{CO}_2 \times (\text{kg KG})^{-1}$  und entsprach damit 19.5 % der applizierten Dosis. Unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen wurde bei den gesunden Probanden ein Wert von  $19.0 \pm 3.6 \%$  der Dosis ( $7.2 \pm 1.4 \mu\text{mol} \ ^{13}\text{CO}_2 \times (\text{kg KG})^{-1}$ ;  $n = 10$ ) ermittelt.

Bei der obligat heterozygoten Mutter der Patientin wurde ebenfalls eine normale  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation gefunden. Die Rate der maximalen  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation  $0.043 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ , die insgesamt abgeatmete  $^{13}\text{CO}_2$ -Menge lag bei  $6.2 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ , entsprechend 16.2 % der applizierten L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Dosis.

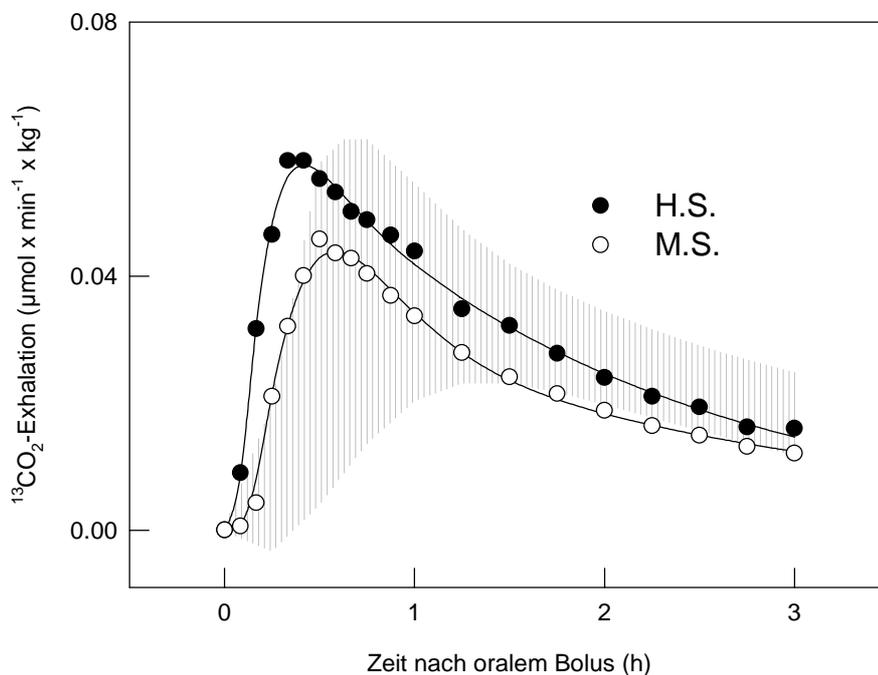


Abb. 4: Kinetik der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation der lebertransplantierten ahornsirupkranken Patientin H.S. (schwarze Symbole) nach oralem L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolus ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ). Zum Vergleich sind die Befunde bei der obligat heterozygoten Mutter M.S. (weiße Symbole) mit angegeben. Der Bereich für gesunde Kontrollpersonen ist grau unterlegt (MW  $\pm$  2 SD;  $n = 10$ ; aus *Schadewaldt et al., 1998*).

## 4.4 Diskussion

### 4.4.1 Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren bei Ahornsirupkrankheit nach Lebertransplantation

Vor der orthotopen Lebertransplantation in 5/91 wies die Patientin H.S. das typische Krankheitsbild eines Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit auf, das gekennzeichnet ist durch stark erhöhte Konzentrationen verzweigtkettiger L-Aminosäuren, einschließlich L-Alloisoleucin, deutlich reduzierte Leucin-Toleranz und häufige metabolische Dekompensationen infolge von interkurrenten Infekten (ausführliche Beschreibung bei *Netter et al., 1994*). Seit der Lebertransplantation sind die Plasmakonzentrationen bei nicht-eingeschränkter und altersentsprechender Zufuhr von verzweigtkettigen L-Aminosäuren mit der Nahrung in der über sechsjährigen Beobachtungsphase bis heute stabil und es traten keinerlei metabolische Krisen mehr auf. Die Plasmakonzentrationen von L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin waren allerdings gegenüber der Norm immer moderat erhöht. Besonders auffallend war, daß im Plasma der Patientin eine eindeutig pathologische Konzentration von L-Alloisoleucin (*Schadewaldt et al., 1999*) persistierte. Bisher wurden weltweit bei zwei weiteren ahornsirupkranken Patienten orthotope Lebertransplantationen durchgeführt. Unsere Befunde zur Entwicklung der Plasmakonzentrationen verzweigtkettiger L-Aminosäuren nach Lebertransplantation stehen in Übereinstimmung mit den wenigen, nur in Abstract-Form verfügbaren Beobachtungen an diesen beiden Patienten (*Merino et al., 1994; Kaplan et al., 1997*). Insgesamt führt die Transplantation einer metabolisch intakten Leber also zu einer weitgehenden, wie aber die Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren zeigen, keinesfalls zu einer vollständigen Normalisierung des Stoffwechsels der verzweigtkettigen L-Aminosäuren. Das bedeutet, daß das transplantierte Lebergewebe die weiter bestehenden mutationsbedingten enzymatischen Defizite in den extrahepatischen Geweben nicht komplett kompensieren kann.

Überraschend waren daher die Ergebnisse der beiden in vivo-Umsatzmessungen mit L-Alloisoleucin und L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin. Diese Testverfahren wurden in unserer Arbeitsgruppe etabliert und evaluiert und sind zur Charakterisierung des in vivo-Schweregrades bei Ahornsirupkrankheit geeignet (*Schadewaldt et al., 1991; Schadewaldt et al., 1998*). Diese Tests wurden an einem ahornsirupkranken Patienten nach Lebertransplantation weltweit erstmals durchgeführt, so daß aus der Literatur keine Vergleichsdaten zur Verfügung stehen. Die hier vorgestellten Daten sprechen allerdings eindeutig dafür, daß sowohl die Rate der metabolischen L-Alloisoleucin-Clearance als auch die mit L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin bestimmte Ganzkörper-L-Leucinoxidationsrate bei der Patientin H.S. im Bereich gesunder Kontrollpersonen liegen. Die normale L-Leucin-Oxidation spricht dafür, daß bei der Patientin normale metabolische Ganzkörper-Flußraten durch den verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex erreicht werden, obwohl hierfür nur die Leber als metabolisch aktives Organ zur Verfügung steht. Darüber hinaus zeigt das Ergebnis der L-Alloisoleucin-Belastung, daß die Flußraten in Abhängigkeit vom Substratangebot gesteigert werden können. Der L-Alloisoleucin-Katabolismus kann aus der Plasmakinetik anhand der Eliminationskonstante und unter der Annahme einer annähernden Gleichverteilung des Metaboliten im Körperwasser abgeschätzt werden. Zwischen der 3. und 8. Stunde nach Bolusgabe lag die L-Alloisoleucin-Konzentration im Bereich zwischen 600 - 750 µmol x l<sup>-1</sup>. In dieser Zeit dürften ca. 20 - 30 µmol x h<sup>-1</sup> x (kg KG)<sup>-1</sup> des applizierten L-Alloisoleucins in der Leber verstoffwechselt worden sein. Dies entspricht etwa der Größenordnung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation von gesunden Probanden, die im Mittel bei 20.0 ± 6.1 µmol x h<sup>-1</sup> x (kg KG)<sup>-1</sup> liegt (Zusammenstellung in *Schadewaldt et al., 1998*). In diesem Test blieben die Plasmakonzentrationen von L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin nach Bolusgabe unverändert. Dies zeigt, daß der Katabolismus dieser verzweigtkettigen L-Aminosäuren unverändert war und daß das applizierte L-Alloisoleucin zusätzlich zu den anderen verzweigtkettigen Metaboliten verstoffwechselt wurde.

Aufschlußreich bezüglich der Leberfunktion ist hier ein Vergleich mit früheren Ergebnissen entsprechender Bolustests bei anderen ahornsirupkranken Patienten. So wurde z.B. bei dem Patienten T.A. mit klassischer Form der Erkrankung für die metabolische L-Alloisoleucin-Clearance eine Eliminationskonstante von  $k_e = 0.0037 \text{ h}^{-1}$  ermittelt (*Schadewaldt et al., 1991*). Damit war die L-Alloisoleucin-Elimination bei diesem Patienten um fast das 20fache gegenüber der Elimination bei der lebertransplantierten Patientin H.S. vermindert. Auch konnte, im Gegensatz zur Patientin H.S., bei keinem der bisher mit dem L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustest untersuchten 10 Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit eine meßbare L-Leucin-Oxidation festgestellt werden (*Schadewaldt et al., 1998*). Diese Gegenüberstellungen zeigen, daß bei der Patientin H.S. tatsächlich das Lebertransplantat für den Abbau der applizierten verzweigt-kettigen Verbindungen verantwortlich war.

Über die Gesamtkapazität der menschlichen Leber zum Abbau verzweigt-kettiger Verbindungen ist nur wenig bekannt. In den drei bisher veröffentlichten Untersuchungen liegen die Angaben zur totalen Aktivität der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase bei etwa 0.02 (*Suryawan et al., 1998*), 0.04 (*Khatri et al., 1977*) und zwischen 0.05 und 0.10  $\text{U} \times (\text{g Lebergewebe})^{-1}$  (*Danner et al., 1975*). Unter Berücksichtigung des Anteils des Lebergewebes am Körpergewicht (*Magnus-Levy, 1910*) ergeben sich damit Gesamtkapazitäten der Leber zur Oxidation verzweigt-kettiger Verbindungen im Bereich zwischen 20 und 130  $\mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ .

In der moderat katabolen Situation nach Übernachtfasten werden beim Menschen etwa ein Fünftel der proteolytisch freigesetzten verzweigt-kettigen L-Aminosäuren, d.h. ca. 45 (L-Leucin, 20; L-Valin, 12; L-Isoleucin, 15; nach *Schadewaldt & Wendel, 1997*)  $\mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ , nicht wieder in der Proteinbiosynthese reutilisiert und oxidativ abgebaut. Bei der Patientin H.S. kann man, aufgrund der Konstanz der Plasmaspiegel nach Übernachtfasten, davon ausgehen, daß die freigesetzten verzweigt-kettigen L-Aminosäuren auch etwa mit der gleichen Rate in der Leber oxidativ abgebaut wurden. Bei

gesunden Probanden beträgt, nach arterio-venösen Differenzmessungen mit stabil-Isotopen markierten Verbindungen (*Tessari et al., 1996*), der Anteil des Splanchnicus-Gebietes an der Ganzkörper-L-Leucinoxidation ca.  $5 \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ . Damit war bei der Patientin H.S. im postabsorptiven Zustand die Rate der Gesamtoxidation verzweigtkettiger Verbindungen im Lebertransplantat etwa fünf Mal höher als bei Kontrollpersonen. Bei dem L-Alloisoleucin-Bolus wurde zusätzlich L-Alloisoleucin in einer Rate von etwa  $20 \text{ bis } 30 \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  abgebaut. Daraus kann eine gesamte in vivo Oxidationsrate im Lebertransplantat von ca.  $70 \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  abgeschätzt werden. Diese Rate ist zumindest mit den Angaben von *Danner et al. (1975)* zur Aktivität der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in humanem Lebergewebe kompatibel.

Die Ursache für die nach Lebertransplantation bei der Patientin H.S. offensichtlich normalen Ganzkörper-Umsatzraten von L-Alloisoleucin und L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin dürfte in den grenzwertig pathologisch erhöhten Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren und ihrer 2-Oxosäuren liegen. Vermutlich führt das erhöhte Angebot an verzweigtkettigen Substraten im Plasma zu einer Steigerung der Oxidationsrate im Lebertransplantat, so daß die fehlende Oxidation in den extrahepatischen Geweben weitestgehend kompensieren wird. Fraglich ist, welche regulatorische Mechanismen im Lebertransplantat zu der kompensatorischen Steigerung der Oxidationsraten führen. Einer gesteigerten Expression der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase kommt wahrscheinlich keine primäre Bedeutung zu, da ein solcher Mechanismus erst nach längerer Zeit zum Tragen kommt (*Paul et al., 1996; Torres et al., 1998; Huang & Chuang, 1999*) und die deutliche und schnelle Normalisierung der Plasmakonzentrationen bereits wenige Stunden nach Perfusion des Transplantates eintrat (*Netter et al., 1994*). Welche Bedeutung einer substratabhängigen Steigerung der metabolischen Flußrate durch den verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex einerseits und einer regulatorischen Steigerung des Aktivitäts(Phosphorylierungs-)status des

Enzymkomplexes durch Inhibition der Kinase (Paxton & Harris, 1984) andererseits in vivo zukommt, kann aufgrund der vorliegenden Befunde letztlich nicht geklärt werden. Allerdings zeigen in vitro Untersuchungen an humanen Zellen, daß für die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in situ Sättigungsbedingungen bereits bei physiologischen Konzentrationen verzweigt-kettiger L-Amino- und 2-Oxosäuren erreicht werden (s. Kapitel 6). Vermutlich ist daher die Inhibition der Kinase durch erhöhte Konzentrationen der verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren, vor allem des 4-Methyl-2-oxopentanoats (Yeaman, 1989), der entscheidende regulatorische Mechanismus der in der transplantierten Leber zu einer deutlichen Steigerung des Aktivitätsstatus der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase und zu einer weitgehenden Normalisierung der Ganzkörper-Stoffwechselraten führt. Offensichtlich ist die im Transplantat verfügbare Enzymkapazität ausreichend, um auch in stark katabolen Stoffwechsellagen, wie sie z.B. bei interkurrenten Infekten auftreten, die Entwicklung einer metabolische Krise zu verhindern.

#### 4.4.2 L-Alloisoleucin

Bei der Patientin H.S. persistierten auch nach Lebertransplantation eindeutig pathologische L-Alloisoleucin-Konzentrationen im Plasma. Eigene Untersuchungen zeigen, daß L-Alloisoleucin in vivo als Nebenprodukt bei der Transaminierung aus seinem metabolischen Vorläufers L-Isoleucin gebildet wird (Schadewaldt et al., 2000). Beim Menschen ist die verzweigt-kettige L-Aminosäuren-Aminotransferase hauptsächlich in der Skelettmuskulatur lokalisiert (Goto et al., 1977; Suryawan et al., 1998). Wahrscheinlich entsteht daher bei der Patientin das L-Alloisoleucin vor allem in der Skelettmuskulatur. Dort kann L-Alloisoleucin jedoch, aufgrund des Mangels an verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Aktivität, nicht oxidativ abgebaut werden und wird in den Extrazellulärraum abgegeben. L-Alloisoleucin akkumuliert im Plasmakompartiment relativ stärker als die anderen verzweigt-kettigen L-Aminosäuren, vor allem deswegen, weil L-Alloisoleucin im Vergleich zu den

anderen verzweigtkettigen L-Aminosäuren eine geringere Transaminierungsrate aufweist (*Schadewaldt et al., 1995*). Daher steht die korrespondierende 2-Oxosäure für den nachfolgenden oxidativen Abbau in der transplantierten Leber in geringerem Maße zur Verfügung. Die hohe Transaminierungsaktivität bei fehlendem Abbau verzweigtkettiger 2-Oxosäuren in der Skelettmuskulatur dürfte auch zu einer vermehrten Abgabe dieser Metabolite in das Plasma führen und damit ursächlich für die bei der Patientin beobachteten erhöhten 2-Oxosäure-Konzentrationen sein.

#### 4.4.3 Zur Bedeutung der Leber für den Katabolismus verzweigtkettiger L-Aminosäuren

In allen bisher untersuchten menschlichen Geweben kommt das initiale Enzym des Katabolismus der verzweigtkettigen L-Aminosäuren, die verzweigtkettigen L-Aminosäuren-Aminotransferase, in relativ hohen Aktivitäten und, in Relation zur Aktivität des nachfolgenden Enzyms, der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase, in einem beträchtlichen, 10- bis über 100fachem Überschuß vor (*Goto et al., 1977; Khatra et al., 1977; Suryawan et al., 1998*). Daher ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Abbau der verzweigtkettigen L-Aminosäuren in allen menschlichen Geweben die irreversible oxidative Decarboxylierung durch den verzweigtkettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex. Bei der Patientin H.S. kann dieser Schritt nur im Lebertransplantat erfolgen, da der Komplex, aufgrund der Mutation, in allen anderen Geweben praktisch katalytisch inaktiv ist. Es stellt sich nun die Frage inwieweit sich die Bedeutung des Leber-Katabolismus an der Ganzkörper-Oxidation verzweigtkettiger L-Aminosäuren bei der Patientin gegenüber der bei Normalpersonen unterscheidet.

Verschiedene Enzymaktivitäts- und in vivo-Untersuchungen deuten darauf hin, daß beim gesunden Menschen ca. 90 % der Ganzkörper-L-Leucinoxidation in den drei Geweben Muskel, Leber und Niere stattfindet, so daß alle anderen

Organe nur eine geringere Bedeutung haben dürften. Die Befunde zur Gesamtaktivität der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in der Muskulatur sind ähnlich variabel wie die bereits oben erwähnten Befunde im Lebergewebe. Die Angaben reichen von ca. 0.004 (*Khatra et al., 1977*) bis 0.022 U x (g Feuchtgewicht)<sup>-1</sup> (*Wagenmakers et al., 1989*). Zur Aktivität im Nierengewebe liegen nur zwei Befunde vor. *Khatra et al. (1977)* bestimmten 0.013 und *Suryawan et al. (1998)* ermitteln 0.111 U x (g Feuchtgewicht)<sup>-1</sup>. Legt man, für eine erste Abschätzung der Kapazität, die Mittelwerte aller publizierten Angaben zur Gesamtaktivität der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in Leber (0.053 ± 0.034 U x (g Feuchtgewicht)<sup>-1</sup>; n = 4: *Danner et al., 1975; Khatra et al., 1977; Suryawan et al., 1998*), Muskel (0.009 ± 0.006 U x (g Feuchtgewicht)<sup>-1</sup>; n = 6: *Khatra et al., 1977; Wagenmakers et al., 1989; van Hall et al., 1995; Rush et al., 1995; Bowtell et al., 1998; Suryawan et al., 1998*) und Niere (0.062 U x (g Feuchtgewicht)<sup>-1</sup>; n = 2: *Khatra et al., 1977; Suryawan et al., 1998*) zugrunde, so liegt, unter Berücksichtigung der jeweiligen Organgewichte, der Beitrag dieser Organe an der Gesamtkörper-Oxidationskapazität bei etwa 68 µmol x h<sup>-1</sup> x (kg KG)<sup>-1</sup>, Leber, 224 µmol x h<sup>-1</sup> x (kg KG)<sup>-1</sup>, Muskel, und bei etwa 14 µmol x h<sup>-1</sup> x (kg KG)<sup>-1</sup>, Niere. Aufgrund dieser Daten dürfte daher die Gesamtkapazität unter Einschluß der übrigen Organe beim gesunden Erwachsenen bei 300 bis 600 µmol x h<sup>-1</sup> x (kg KG)<sup>-1</sup> liegen.

Allerdings ist nur die dephosphorylierte Form des Multienzymkomplex enzymatisch aktiv. Beim Menschen sind zum Aktivitätsstatus nur wenige Daten verfügbar. Der Anteil des aktiven Enzyms an der Gesamtkapazität wurde in der Leber zu ca. 30 % (*Suryawan et al., 1998*), in der Muskulatur im Mittel zu 10 % (Bereich: 4-26%; vgl. *Wagenmakers et al., 1989; van Hall et al., 1995; Rush et al., 1995; Jackman et al., 1997; Bowtell et al., 1998; Suryawan et al., 1998*) und in der Niere zu ca. 14 % (*Suryawan et al., 1998*) bestimmt. Dies entspricht, bezogen auf den Gesamtkörper, einer Umsatzrate von etwa 20 µmol x h<sup>-1</sup> x (kg KG)<sup>-1</sup> in Leber und Muskulatur und ca. 2 µmol x h<sup>-1</sup> x (kg KG)<sup>-1</sup> im Nierengewebe. Damit ist die in den drei Organen abgeschätzte Aktivität von 45

$\mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  ausreichend, um den Ganzkörper-Fluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase unter Ruhebedingungen beim Menschen zu erklären, der in eigenen in vivo Untersuchungen mit Bolusgaben von  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertem L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin bei fünf gesunden Probanden zu  $43 \pm 7 \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  (Bodner et al., 1997) bestimmt wurde.

Die Ermittlung des Anteils individueller Organe an der Ganzkörper-Oxidation verzweigtkettiger L-Aminosäuren in vivo ist außerordentlich kompliziert und schwierig. Da solche Untersuchungen nur mittels markierter Verbindungen und arterio-venöser Differenzmessungen möglich sind, ist zur Durchführung eine multiple Katheterisierung des Organismus erforderlich. Einige wenige solcher Untersuchungen wurden an Versuchstieren wie Ratte, Schaf, Hund und Schwein (Ben Galim et al., 1980; Abumrad et al., 1982; Loble et al., 1990; Carraro et al., 1991; Matsuo et al., 1993; Baumann et al., 1994; Biolo et al., 1994) durchgeführt. Allerdings sind die dabei erhaltenen Ergebnisse bei Betrachtungen zum Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren beim Menschen nur bedingt hilfreich, da aufgrund der Unterschiede in der Enzymausstattung die Organinteraktion im Rahmen des Stoffwechsel der verzweigtkettigen Verbindungen bei Versuchstieren nur sehr begrenzt auf den menschlichen Organismus übertragbar sind (Khatra et al., 1977; Suryawan et al., 1998). Daher wird auf die Darstellung dieser Befunde verzichtet.

Da eine multiple Katheterisierung mit erheblichen Risiken verbunden ist, ist es verständlich, daß bis heute weltweit nur eine einzige in vivo Untersuchung zur Organinteraktion im Stoffwechsel der verzweigtkettigen L-Aminosäuren beim Menschen publiziert wurde. In dieser Studie untersuchten Tessari et al. (1996) an gesunden Probanden mittels gleichzeitiger Infusion von  $\text{N}^{15}$ -markiertem und  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markiertem L-Leucin die L-Leucin-Umsatzrate des Ganzkörpers und differenzierten die L-Leucin-Umsatzraten in Splanchnikus-Gebiet, Beinmuskulatur und Niere. Ein wesentliches Ergebnis dieser Untersuchung war, daß ca. 90 % der Ganzkörper-L-Leucinoxidation im postabsorptiven

Zustand in Splanchnikus-Gebiet, Beinmuskulatur und Niere stattfanden. Dabei entfielen auf das Splanchnikus-Gebiet und die Niere 18 % bzw. 26 % der Gesamt-L-Leucinoxidation, und auf die gesamte Skelettmuskulatur 48 %.

Unter Berücksichtigung der experimentellen Fehler und vor allem in Anbetracht der Schwierigkeiten bei der Bestimmung von Kapazität und Aktivitätszustand der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in humanem Gewebe (*Suryawan et al., 1998*) einerseits und der inhärenten Probleme arterio-venösen Differenzmessung an menschlichen Organen in situ andererseits, ergibt sich insgesamt eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der in vivo-Untersuchung und den obigen Abschätzungen, die auf der Grundlage von in vitro Enzymaktivitätsmessungen erfolgten.

Beide Ansätze zeigen übereinstimmend, daß ca. 90 % der Ganzkörper-Oxidation verzweigt-kettiger Verbindungen im postabsorptiven Zustand in diesen drei Organen stattfindet und daß die Skelettmuskulatur etwa für die Hälfte der Ganzkörper-Oxidation verantwortlich ist. Nicht so eindeutig ist die Übereinstimmung hinsichtlich des jeweiligen Anteils von Leber und Niere. Aufgrund der Daten zur Enzymaktivität könnte die Leber einen größeren Beitrag leisten als die Niere. Die Umsatzmessungen weisen jedoch auf gleiche Stoffwechselraten von Leber und Niere in vivo hin. Sicher sind hier weitere Untersuchungen notwendig, um die tatsächliche Bedeutung von Leber und Niere im oxidativen Stoffwechsel der verzweigt-kettigen Verbindungen zu klären.

#### 4.4.4 Interorganbeziehung

Abschließend seien die wesentlichen Aspekte der Interorganbeziehung im Katabolismus der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren bei Normalpersonen und bei der lebertransplantierten Patientin H.S. am Beispiel des L-Leucins vergleichend dargestellt (vgl. Abb. 5). Im postabsorptiven Zustand werden beim Menschen etwa  $120 \mu\text{mol L-Leucin} \times \text{h}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  durch Proteolyse freigesetzt und ca.  $100 \mu\text{mol L-Leucin} \times \text{h}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  in der

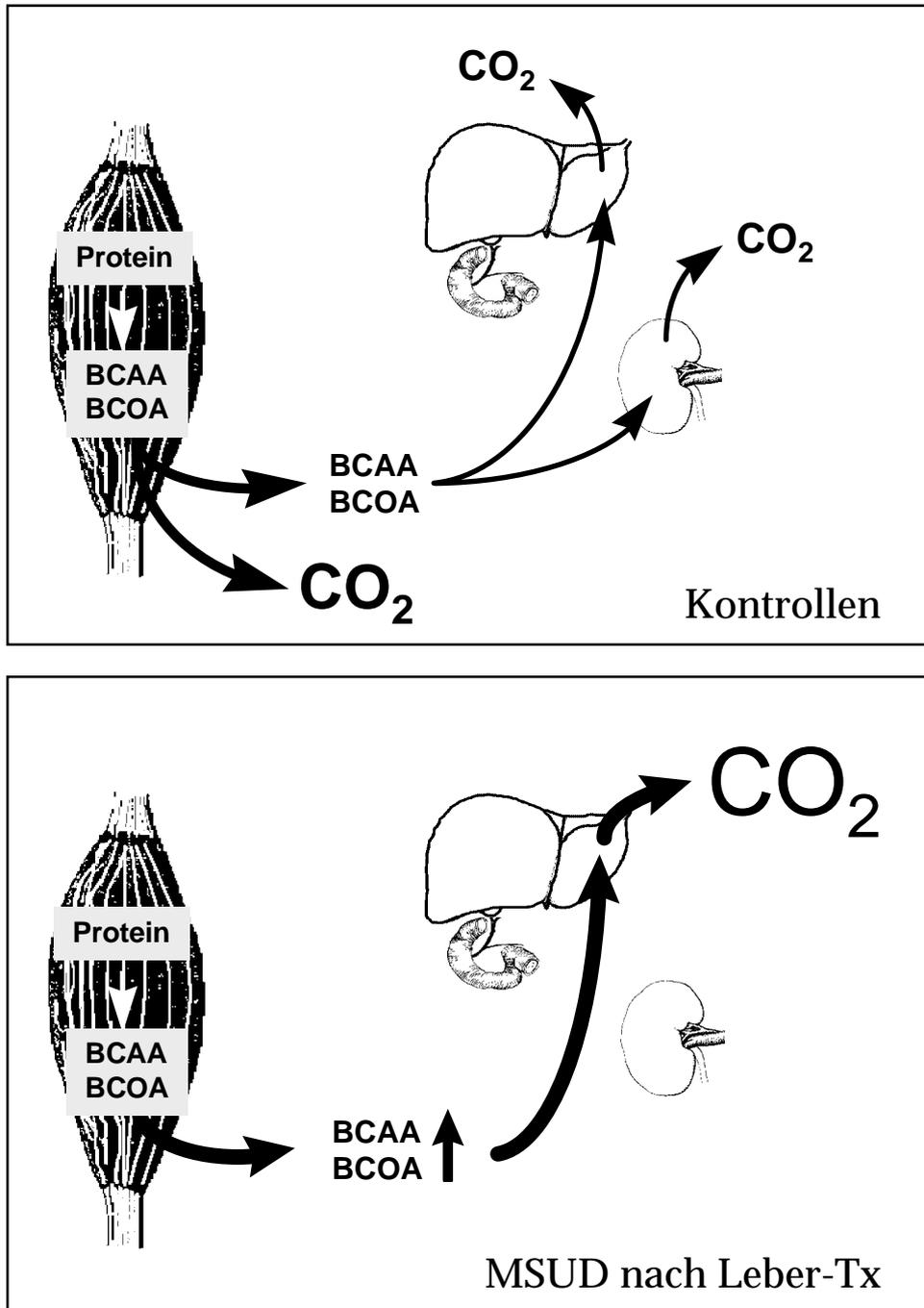


Abb. 5: Interorganbeziehung (schematisch, vereinfacht) im Katabolismus verzweigtkettiger L-Aminosäuren im postabsorptiven Zustand bei Normalpersonen (oben) und bei Ahornsirupkrankheit (MSUD) nach orthotoper Lebertransplantation (Leber-Tx) (unten). Die relativen Flußraten sind durch unterschiedliche Pfeil-Stärken symbolisch dargestellt.

Proteinbiosynthese reutilisiert.  $20 \mu\text{mol L-Leucin} \times \text{h}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  werden oxidativ abgebaut und stammen hauptsächlich aus der Skelettmuskulatur

(Felig, 1975). Beim gesunden Menschen finden ca. 50 % des oxidativen Abbaus in der Skelettmuskulatur selbst statt. Ein Teil wird als L-Leucin bzw. 4-Methyl-2-oxopentanoat an die Zirkulation abgegeben. Schätzungsweise jeweils 20 % der L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat-Oxidation finden in Leber und Niere statt, ein kleiner Anteil wird in anderen Organen oxidiert. Bei der lebertransplantierten Patienten kann in der Muskulatur eine Oxidation von L-Leucin nicht stattfinden, so daß dieses bzw. sein Transaminierungsprodukt 4-Methyl-2-oxopentanoat im Vergleich zu Normalpersonen in erhöhtem Maß an die Zirkulation abgegeben wird. Aufgrund der beeinträchtigten Oxidation in allen extrahepatischen Organen kommt es zur Erhöhung der Plasmakonzentrationen, die zu einer kompensatorischen Steigerung der L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat-Oxidation im Lebertransplantat führen dürfte. Letztlich dürften die erhöhten Plasmakonzentrationen und damit das erhöhte Substratangebot ursächlich dafür sein, daß bei der ahornsirupkranken Patientin nach der Lebertransplantation normale in vivo Stoffwechselraten beobachtet werden können.

### Teil III

## Der metabolische Fluß durch den verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex in situ

Untersuchungen zum oxidativen Abbau verzweigt-kettiger L-Aminosäuren bei gesunden Probanden in vivo (mittels  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierter Metabolite) und bei humanen Hautfibroblasten in vitro (mittels  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierter Substrate) zeigen, daß die Substratkonzentrationsverhältnisse von autoregulatorischer Bedeutung für die Zusammensetzung des metabolischen Flußes durch den verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex in situ sind.

## Kapitel 5

# Ganzkörper-Oxidation verzweigtkettiger L-Aminosäuren bei gesunden Erwachsenen\*

**Zusammenfassung.** Der in vivo Katabolismus der essentiellen verzweigtkettigen L-Aminosäuren, L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin wurde vergleichend untersucht. Hierzu wurden orale Bolustests mit  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierten verzweigtkettigen L-Aminosäuren ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) an fünf gesunden Probanden im postabsorptiven Zustand durchgeführt. Die Ganzkörper-Oxidationsraten der verzweigtkettigen L-Aminosäuren wurden basierend auf der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation und der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den verzweigtkettigen Plasmametaboliten unter

Verwendung eines 7-Kompartiment-Modells und nicht-linearer Regressionsverfahren ermittelt. Die verzweigtkettigen L-Aminosäuren wurden unterschiedlich, in der Reihenfolge L-Leucin » L-Valin > L-Isoleucin, oxidativ abgebaut. Die mittleren berechneten in vivo Oxidationsraten betragen  $0.32 \pm 0.06$  (L-Leucin),  $0.22 \pm 0.04$  (L-Valin) und  $0.17 \pm 0.05 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  (L-Isoleucin).

Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die aktuellen Angaben zum Bedarf der verzweigtkettigen L-Aminosäuren diskutiert.

---

\* publiziert als: *Whole body branched-chain L-amino acid oxidation in overnight fasted human subjects*

Bodner A, Hammen HW, Renn W, Wendel U, Schadewaldt P (1997) *Isotopes Environ Health Stud* 33: 189-196

## 5.1 Einleitung

Die verzweigtkettigen L-Aminosäuren L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin machen etwa 40 % der für den Menschen essentiellen Aminosäuren aus. Diese Aminosäuren werden hauptsächlich für die Proteinsynthese genutzt. In Abhängigkeit vom (patho)physiologischen Zustand werden variable Mengen oxidativ abgebaut und dienen somit zur Energiegewinnung (*Harper et al., 1984; Chuang & Shih, 1995*).

In den letzten Jahren hat das Interesse an quantitativen und regulatorischen Aspekten des Metabolismus der verzweigtkettigen L-Aminosäuren beim Menschen zugenommen. Für Stoffwechsel-Umsatzmessungen bei Probanden und Patienten wird in der Regel die primed continuous-Infusion-Technik mit stabil-Isotopen-markierten L-Aminosäuren als Substraten verwendet (s. *Bodner et al., 1996*). Mit Ausnahme einiger weniger Untersuchungen mit L-[1-<sup>13</sup>C]Valin (*Meguid et al., 1983; Staten et al., 1984; Meguid et al., 1986; Pelletier et al., 1991*) sind solche in vivo Untersuchungen zum Stoffwechsel der verzweigtkettigen L-Aminosäuren bisher praktisch ausschließlich mit L-Leucin als Substrat durchgeführt worden. Kenntnisse über den Metabolismus verzweigtkettiger L-Aminosäuren beim Menschen in vivo sind daher beschränkt auf den L-Leucin-Metabolismus unter experimentellen Gleichgewichtsbedingungen. Es gibt jedoch eine Reihe von Befunden, die daraufhin deuten, daß der Stoffwechsel jeder einzelnen verzweigtkettigen L-Aminosäuren individuelle Eigenschaften aufweist (*Meguid et al., 1983; Harper et al., 1984; Staten et al., 1984*). Daher ist fraglich, ob und inwieweit die Befunde zum in vivo L-Leucin-Stoffwechsel tatsächlich auf die anderen beiden verzweigtkettigen L-Aminosäuren übertragbar sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ganzkörper-Oxidationsraten der drei natürlichen verzweigtkettigen L-Aminosäuren bei gesunden Probanden im postabsorptiven Zustand vergleichend untersucht. Dazu wurden 1-<sup>13</sup>C-

markierte Substrate oral, als Bolus verabreicht und die Oxidationsraten aus der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation mit einem kompartmentellen Ansatz abgeschätzt.

## 5.2 Material und Methoden

### 5.2.1 Material

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt), Sigma Chemie (München) oder Boehringer (Mannheim) bezogen. L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin, L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Valin und L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin (je 99 % 1- $^{13}\text{C}$ ) stammte von Promochem (Wesel). Reinheit und Isotopengehalt der stabil-Isotopen-markierten Verbindungen wurden mittels automatischer Aminosäureanalyse bzw. GC-MS-Analyse (s. 2.2.3.2) bestimmt und entsprachen den Spezifikationen des Herstellers.

### 5.2.2 Probanden

Fünf gesunde Probanden (4 Männer, 1 Frau; mittleres ( $\pm$  SD) Alter  $30 \pm 9$  Jahre, Gewicht  $73 \pm 7$ , Größe  $179 \pm 11$  cm) nahmen an den oralen Bolustests teil. Alle Versuchsteilnehmer wurden einer körperlichen Untersuchung unterzogen; bei keinem konnte eine akute oder chronische Erkrankung festgestellt werden. Körpergewicht und Ernährungsgewohnheiten der Probanden blieben während des gesamten Untersuchungszeitraumes von 3-4 Monaten konstant. Das bei diesen Untersuchungen benutzte Versuchsprotokoll wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt.

### 5.2.3 Methoden

#### 5.2.3.1 In vivo Untersuchungen

Jeder Proband nahm an drei Bolustests teil. Im ersten Bolustest wurde L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin (99 % 1-<sup>13</sup>C), im zweiten L-[1-<sup>13</sup>C]Valin (99 % 1-<sup>13</sup>C) und im dritten L-[1-<sup>13</sup>C]Isoleucin (50 % 1-<sup>13</sup>C) oral verabreicht. Zwischen den einzelnen Tests lag jeweils ein Zeitraum von mindestens 4 Wochen. Bei der Durchführung des Tests wurde wie in 2.2.3.1 beschrieben verfahren. Den Versuchsteilnehmern wurden nach 12stündigem Übernachtsfasten unter Ruhebedingungen Proben der Exhalationsluft und venöse Blutproben (Kontrollwerte) entnommen. Anschließend wurde den Probanden zwischen 8:30 und 9:30 Uhr 1-<sup>13</sup>C-markierte verzweigtkettige L-Aminosäure ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ; gelöst in Zitronensäurelösung,  $5 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) oral als Bolus verabreicht und weitere Blut- und Atemluftproben im Abstand von 15 Minuten über eine Dauer von 3 Stunden entnommen.

#### 5.2.3.2 Analytische Verfahren

Die Konzentrationsbestimmung der verzweigtkettigen L-Aminosäuren und ihrer 2-Oxosäuren in den Plasma- und Urinproben erfolgte mittels automatischer Aminosäureanalyse mit kationenaustausch-chromatographischer Trennung und Ninhydrin-Detektion (*Schadewaldt et al., 1990*) bzw. RP-HPLC-Analyse der Chinoxalin-Derivate der 2-Oxosäure mit fluorimetrischer Detektion (*Schadewaldt et al., 1989*) (die 2-Oxosäuren in den Urinproben konnten aufgrund der zu geringen Konzentration nicht quantifiziert werden).

Zur Bestimmung der Isotopenanreicherung in den verzweigtkettigen L-Aminosäuren und den korrespondierenden 2-Oxosäuren wurden die Chinoxalin-Derivate präpariert und mit Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid derivatisiert. Die dabei entstandenen O-Trimethylsilyl-Chinoxalinol-Derivate wurden dann gaschromatographisch-massenspektrometrisch über chemische

Ionisation (CI) mit Ammoniak als Reaktantgas analysiert (*Schadewaldt et al., 1995*). Zur Bestimmung der  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Markierung wurde das Intensitätsverhältnis (R) der quasimolekularen Ionen  $[\text{MH}+1]^+$  und  $[\text{MH}]^+$  der Chinoxalinol-Derivate von L-Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat bzw. L-Isoleucin und 3-Methyl-2-oxopentanoat durch selected ion monitoring (SIM) bei m/z 276 und m/z 275 gemessen. Bei Bolusversuchen mit L- $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ Valin wurde das Verhältnis der Ionenintensitäten bei m/z 262 und m/z 261 bestimmt (*Schadewaldt et al., 1995*).

Wie bei früheren Untersuchungen erfolgte die Bestimmung der Isotopenanreicherung im  $\text{CO}_2$  mit Isotopenratio-Massenspektrometrie (*Schadewaldt et al., 1994*). Es wurde ein gegen Pee Dee Belemniten-kalibrierter Standard (PDB) verwendet (s. 2.2.3.2).

Die  $\text{CO}_2$ -Exhalation wurde kontinuierlich mittels Atemgasanalyse (Deltatrac Metabolic Monitor; Datex Instruments, Helsinki, Finnland) gemessen.

Die Creatininkonzentration in Plasma- und Urinproben wurde enzymatisch (*Wahlefeld & Siedel, 1985*) quantifiziert.

Zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an verzweigt-kettigen L-Aminosäuren im Urin wurden die Proben mit dem gleichen Volumen HCl ( $12 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ ) versetzt, 24 Stunden bei  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  hydrolysiert (*Hill, 1969*) und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 5-Sulphosalicylsäure (5 %; w:v) aufgenommen und die Aminosäuren wie oben angegeben bestimmt.

#### 5.2.4 Auswertung und Statistik

Die Isotopenanreicherung in „mol percent excess“ ( $\text{MPE} = \{\text{R}-\text{R}_0\} / \{\text{R}-\text{R}_0+1\} \times 100$ ) in den Plasmametaboliten wurde aus dem Verhältnis der Ionenintensitäten in den Proben, die nach der Applikation der  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierten verzweigt-kettigen L-Aminosäure entnommen wurden (R) und dem natürlich

vorkommenden Verhältnis in den vor dem oralen Bolus entnommenen Proben ( $R_0$ ) berechnet (Wolfe, 1984; s. 2.2.4.1).

Die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung (APE) im  $\text{CO}_2$  der Exhalationsluft wurde berechnet als Differenz zwischen dem  $^{13}\text{CO}_2$  in den vor dem oralen Bolus entnommenen Atemproben (Kontrollwert) und dem  $^{13}\text{CO}_2$  der Proben, die nach dem oralen Bolus entnommenen wurden (s. 2.2.4.1). Die Raten der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation über basal wurde aus der Isotopenanreicherung im  $\text{CO}_2$  und der mittleren Rate der  $\text{CO}_2$ -Exhalation, gemessen in dem 10minütigen Zeitintervall vor der Probenentnahme für die Isotopenratio-Massenspektrometrie-Analyse, errechnet (s. 2.2.4.1). Die unvollständige  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation wurde mit berücksichtigt (Faktor 1.25; Irving et al., 1983, Saccomani et al., 1995).

Die Raten der oxidativen Decarboxylierung der individuellen verzweigtkettigen L-Aminosäuren in vivo wurden auf der Basis der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsrate und der Isotopenanreicherung in der entsprechenden verzweigtkettigen 2-Oxo[1- $^{13}\text{C}$ ]säure im Plasma bestimmt (reciprocal-pool Modell, Schwenk et al., 1985). Die Evaluierung der in vivo-Stoffwechselraten erfolgte mit nicht-linearen Regressionsverfahren anhand eines 7-Kompartiment-Modells zur Beschreibung des Katabolismus der verzweigtkettigen L-Aminosäuren (Bodner et al., 1996; vgl. Kapitel 11)

Die renalen Clearance-Raten ( $Cl$ , in  $\text{ml} \times \text{min}^{-1}$ ) während der 3.5stündigen Versuchsdauer ( $t$ , in min) wurden unter Verwendung der modifizierten Clearance-Formel  $Cl = c_u / [c_{PI(s)} + c_{PI(e)}] / 2 \times V_u / t$  abgeschätzt und auf eine Körperoberfläche von  $1.73 \text{ m}^2$  normiert (Dubois & Dubois, 1915). Dabei waren  $c_u$  und  $V_u$  Konzentration in und Volumen (in ml) des am Ende des Experimentes gesammelten Spontanurins und  $c_{PI(s)}$  und  $c_{PI(e)}$  die Plasmakonzentrationen zu Beginn und am Ende des Experimentes.

Im allgemeinen sind die Ergebnisse als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben. Für die statistische Auswertung wurde der Rangsummen-Test von Wilcoxon verwendet.

### 5.3 Ergebnisse

Jeder Proband ( $n=5$ ) nahm an je einem oralen Bolustest mit  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertem L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin teil. Der zeitliche Verlauf der Konzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren und der korrespondierenden 2-Oxosäuren im Plasma nach oraler Applikation der jeweiligen  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierten Aminosäure ist in Abb.1 dargestellt. Alle drei verzweigtkettigen L-Aminosäuren wurden vergleichbar rasch resorbiert. Der maximale Konzentrationsanstieg im Plasma betrug etwa  $60\ \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  und wurde innerhalb von 30 Minuten erreicht.

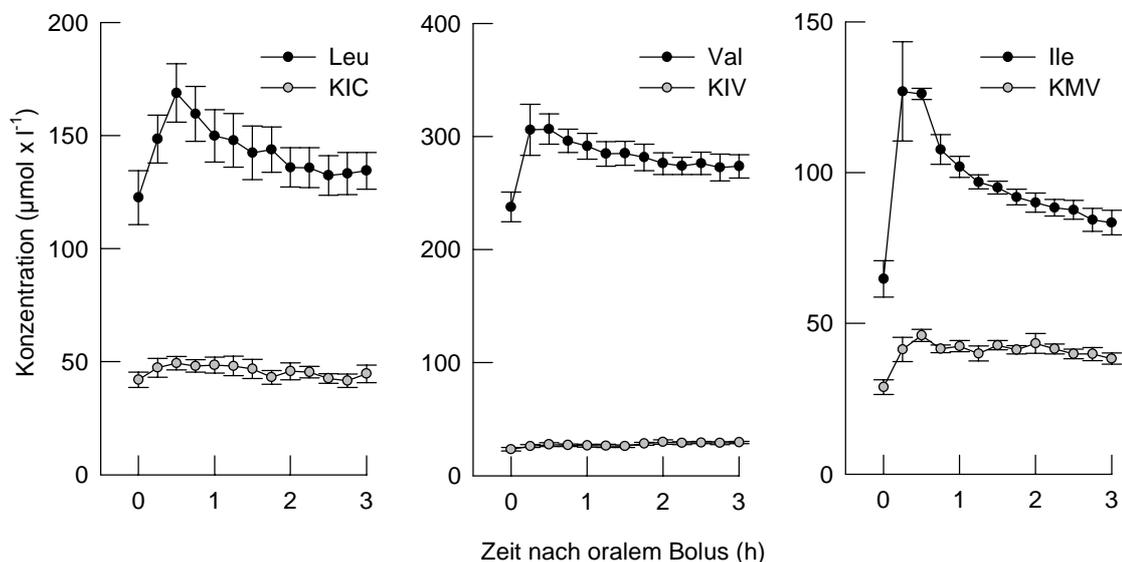


Abb. 1: Zeitlicher Verlauf der verzweigtkettigen L-Amino- (schwarze Punkte) und 2-Oxosäure-Konzentration (graue Punkte) im Plasma gesunder Probanden im postabsorptiven Zustand nach oraler Gabe ( $38\ \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) von L-[ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Leucin, L-[ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Valin und L-[ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Isoleucin. Dargestellt sind MW  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Abkürzungen: KIC, 4-Methyl-2-oxopentanoat; KIV, 3-Methyl-2-oxobutanoat; KMV, 3-Methyl-2-oxopentanoat

Der maximale Anstieg der verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Spiegel im Plasma war mit ca. 5 (3-Methyl-2-oxobutanoat) bis 20  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (3-Methyl-2-oxopentanoat) deutlich geringer und wurde etwas später als bei den verzweigt-kettigen L-Aminosäuren erreicht. Die anschließende Abnahme der Plasmakonzentrationen war auf eine metabolische Clearance der verzweigt-kettigen Metabolite zurückzuführen, da die renalen Clearance-Raten der verzweigt-kettigen Verbindungen vernachlässigbar gering waren. Die renalen Clearance-Raten lagen bei  $\leq 1\%$  der oral verabreichten Dosis (vgl. Tab. 1).

Tab. 1: Renale Clearance ausgewählter Metabolite in oralen Bolustests mit verzweigt-kettigen L-Aminosäuren<sup>§</sup>

<i>Bolustest mit (38 <math>\mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}</math>)</i>			
	<i>L-Leucin</i>	<i>L-Valin</i>	<i>L-Isoleucin</i>
Rate der renalen Clearance ( $\text{ml} \times \text{min}^{-1} \times 1.73 \text{ m}^{-2}$ )			
Leucin	0.34 $\pm$ 0.10	0.18 $\pm$ 0.06	0.16 $\pm$ 0.06
Valin	0.27 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ 0.07	0.15 $\pm$ 0.06
Isoleucin	0.31 $\pm$ 0.12	0.17 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.08
Creatinin	151 $\pm$ 27	153 $\pm$ 23	146 $\pm$ 19
Renale Ausscheidung der Aminosäuren ( $\mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) <sup>#</sup>			
Frei	0.10 $\pm$ 0.05 (0.25 $\pm$ 0.13) <sup>§</sup>	0.14 $\pm$ 0.06 (0.36 $\pm$ 0.15) <sup>§</sup>	0.04 $\pm$ 0.02 (0.09 $\pm$ 0.05) <sup>§</sup>
Peptid-gebunden*	0.27 $\pm$ 0.11	0.34 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.04

<sup>§</sup> angegeben sind MW  $\pm$  SD, n = 5; eine Ausscheidung von verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren war nicht nachweisbar; <sup>#</sup> während des 3.5stündigen Untersuchungszeitraumes; <sup>§</sup> die Angaben in den Klammern sind auf die verabreichte Dosis bezogen (% der Dosis); \* Menge, freigesetzt durch salzsaure Hydrolyse

Der <sup>13</sup>C-Anreicherung in den Plasmametaboliten verlief weitgehend parallel zu den entsprechenden Konzentrationen im Plasma (s. Abb. 2). Die Isotopenanreicherung in den verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren war im allgemeinen etwas niedriger als in den verzweigt-kettigen L-Aminosäuren. Das mittlere Verhältnis der 1-<sup>13</sup>C-Anreicherung in verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren/verzweigt-kettigen L-Aminosäure betrug bei den Versuchen mit L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin

$0.91 \pm 0.15$ , mit L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Valin  $0.86 \pm 0.13$ , und mit L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin  $0.98 \pm 0.18$  (je  $n = 5$ ).

Die mittlere  $\text{CO}_2$ -Exhalation war in allen drei Experimenten gleich und betrug  $2.92 \pm 0.19$  (L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin),  $2.85 \pm 0.15$  (L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Valin) und  $2.92 \pm 0.27$  ml  $\times$  min $^{-1}$   $\times$  (kg KG) $^{-1}$  (L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin). Der zeitliche Verlauf der Isotopenanreicherung im  $\text{CO}_2$  der Exhalationsluft war gegenüber der  $^{13}\text{C}$ -Markierung in den Plasmametaboliten deutlich verzögert. Die Isotopenverdünnung war, wie erwartet, beträchtlich (s. Abb. 2). Innerhalb der 3stündigen Versuchsdauer wurde bei den Versuchen mit L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin, L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Valin und L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin im Mittel  $13.3 \pm 2.1$  %,  $10.0 \pm 1.8$  % bzw.  $15.6 \pm 3.2$  % der oral verabreichten  $^{13}\text{C}$ -Dosis als  $^{13}\text{CO}_2$  in der Exhalationsluft wiedergefunden.

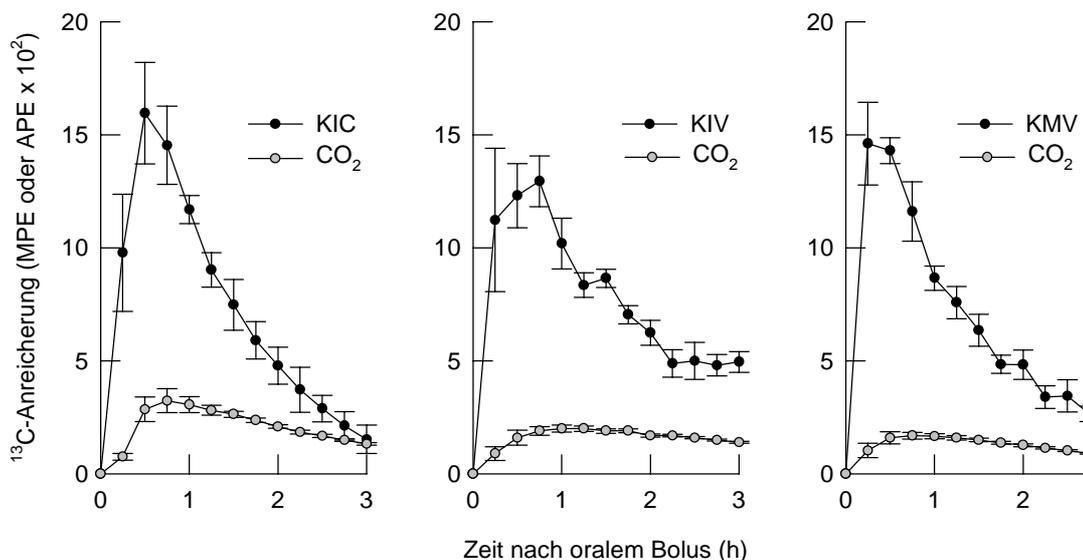


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den verzweigtkettigen 2-Oxosäuren im Plasma (MPE, schwarze Punkte) und im  $\text{CO}_2$  der Exhalationsluft (APE, graue Punkte) gesunder Probanden im postabsorptiven Zustand nach oraler Gabe ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin, L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Valin und L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin. Dargestellt sind MW  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Abkürzungen: KIC, 4-Methyl-2-oxopentanoat; KIV, 3-Methyl-2-oxobutanoat; KMV, 3-Methyl-2-oxopentanoat

Aus den experimentellen Daten wurde mit Hilfe eines 7-Kompartiment-Modells und nicht-linearer Regressionsverfahren der metabolische Fluß durch die

verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase *in vivo*, d.h. die Ganzkörper-Oxidationsraten der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren, abgeschätzt. Die in Abb. 3 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die individuellen verzweigt-kettigen Substrate mit unterschiedlichen Raten verstoffwechselt wurden. Unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen wurde mit L-Leucin als Substrat eine Ganzkörper-Oxidationsrate von  $0.317 \pm 0.057 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  ermittelt. Die Oxidationsraten, die mit L-Valin bzw. L-Isoleucin als Substrat ermittelt wurden, waren  $27 \pm 17 \%$  und  $45 \pm 18 \%$  niedriger als die Oxidationsrate von L-Leucin.

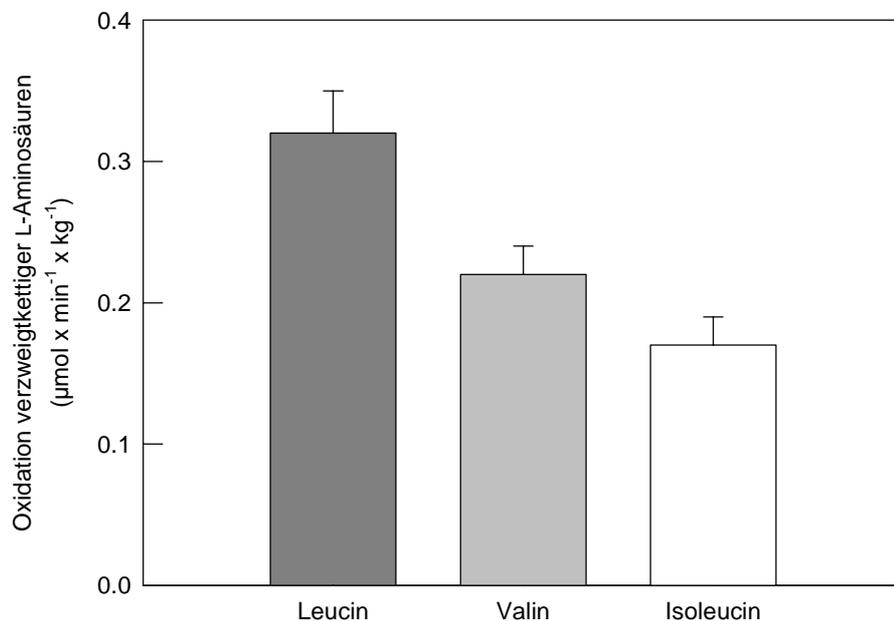


Abb. 3: *In vivo* Oxidationsrate verzweigt-kettiger L-Aminosäuren bei gesunden Probanden im postabsorptiven Zustand. Die Oxidationsraten wurden in oralen Bolustests mit verzweigt-kettigen L-Amino[1- $^{13}\text{C}$ ]säuren ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) bestimmt. Dargestellt sind MW  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ).

## 5.4 Diskussion

Zur Ganzkörper-L-Leucinoxidation liegen zahlreiche Befunde aus stabil-Isotopen-Untersuchungen vor. Dabei wurde bis jetzt ausschließlich der primed continuous infusion-Ansatz verwendet. Der mittlere Wert für die L-

Leucinoxidation bei gesunden Probanden im postabsorptiven Zustand liegt bei diesen Untersuchungen bei  $0.333 \pm 0.102 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  (vgl. Kapitel 2). Die vorliegenden, in oralen L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustests ermittelten Oxidationsraten stehen in sehr guter Übereinstimmung mit den Befunden aus den primed continuous infusion-Untersuchungen.

Bisher wurden zwei Untersuchungen zur L-Valinoxidation in vivo mit stabilisotopen-markierten Verbindungen publiziert. Mit der primed continuous infusion-Technik haben *Staten et al. (1984)* bei gesunden Probanden im postabsorptiven Zustand eine Ganzkörper-L-Valinoxidation von  $0.197 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  ermittelt. *Pelletier et al. (1991)* fanden unter entsprechenden Versuchsbedingungen Ganzkörper-L-Valinoxidationsraten zwischen  $0.150$  und  $0.190 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ . Diese Ergebnisse stimmen recht gut mit den hier ermittelten L-Valin-Oxidationsraten von  $0.223 \pm 0.038 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  überein, insbesondere wenn man berücksichtigt, daß die früheren Untersuchungen die tatsächlichen metabolischen Raten etwas unterschätzt haben. *Staten et al. (1984)* und *Pelletier et al. (1991)* dürften ihre Ergebnisse auf der Grundlage der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung im Plasma-L-Valin berechnet haben, und nicht auf der Grundlage der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in der korrespondierenden 2-Oxosäure, die nach dem reciprocal pool-Modell ein besseres Maß für die intrazelluläre Isotopenverdünnung darstellt (*Schwenk et al., 1985*). In den primed continuous infusion-Untersuchungen von *Staten et al. (1984)* wurde in separaten Experimenten zusätzlich die Ganzkörper-L-Leucinoxidation im postabsorptiven Zustand vergleichend bei den selben Probanden bestimmt. Die mit L-Valin als Substrat bestimmte Ganzkörper-Oxidationsrate lag  $22 \pm 15 \%$  ( $n=4$ ) unter der Rate der in vivo L-Leucin-Oxidation und steht somit in sehr guter Übereinstimmung mit der  $27 \pm 17\%$  geringeren Oxidation von L-Valin, die in den vorliegenden oralen Bolustests gefunden wurde.

Quantitative Umsatzmessungen zum L-Isoleucin-Metabolismus beim Menschen sind bisher noch nicht durchgeführt worden. Die hier vorgestellten stabilisotopen-Untersuchungen liefern erstmals experimentelle Daten zur Ganz-

körper-L-Isoleucinoxidation. Die zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen den anhand von Bolustests und den mit der konventionellen primed continuous infusion-Technik ermittelten Oxidationsraten von L-Leucin und L-Valin deutet darauf hin, daß die hier ermittelte Rate der L-Isoleucin-Oxidation von  $0.170 \pm 0.047 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  ebenfalls eine recht zuverlässige Abschätzung darstellt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die verzweigtkettigen L-Aminosäuren im postabsorptiven Zustand bei gesunden Probanden in unterschiedlichem Maß, in der Reihenfolge L-Leucin » L-Valin > L-Isoleucin (im Verhältnis 10 : 7 : 6), oxidativ abgebaut werden. Um eine ausgeglichene Bilanz der verzweigtkettigen L-Aminosäuren im Körper aufrechtzuerhalten, müssen die Verluste an verzweigtkettigen L-Aminosäuren, die unvermeidbar aus dem oxidativen Abbau resultieren, durch eine adäquate Zufuhr mit der Nahrung kompensiert werden. Daher ist die Kenntnis des physiologischen Minimalbedarfs jeder individuellen verzweigtkettigen L-Aminosäure wichtig.

Bisher liegen Empfehlungen, die auf überzeugenden experimentellen Befunden basieren, nur für den L-Leucin-Bedarf vor. In einer eindrucksvollen Serie von Experimenten mit stabil-Isotopen-markierten Verbindungen führten *Young et al.* eine Neu-Untersuchung des L-Leucin-Bedarfs erwachsener Personen (Übersicht bei *Young, 1994*) durch. Die Autoren ermittelten mit  $40 \text{ mg L-Leucin} \times (\text{kg KG})^{-1} \times \text{d}^{-1}$  einen Mindestbedarf, der deutlich über den Empfehlungen der FAO/WHO/UNU (*FAO/WHO/UNU, 1985*) liegt. Vor der Herausgabe von Empfehlungen hinsichtlich des Mindestbedarfes von L-Valin und L-Isoleucin müßte der Einfluß der offensichtlich komplexen diätabhängigen Kurzzeit- und Langzeit-Regulationen experimentell ausgearbeitet werden (*Harper et al., 1984; Young, 1994*). Eine vorläufige Abschätzung ist jedoch ausgehend von dem korrigierten L-Leucin-Bedarf und dem vorliegenden Verhältnis der Oxidationsraten der verzweigtkettigen L-Aminosäuren möglich. Basierend auf unseren Befunden dürfte der Mindestbedarf an L-Valin und L-Isoleucin bei Erwachsenen ca.  $25 \text{ mg} \times (\text{kg KG})^{-1} \times \text{d}^{-1}$  betragen.

## Kapitel 6

# Wirkungen verzweigt-kettiger Substrate auf den metabolischen Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in situ

**Zusammenfassung.** Bei Untersuchungen zum oxidativen Abbau verzweigt-kettiger L-Aminosäuren in vivo wurde fast ausschließlich L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin als Substrat eingesetzt. Daher ist unbekannt (a) inwieweit die L-Leucin-Oxidation repräsentativ für den gesamten metabolischen Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase ist und (b) ob die Relation der Oxidation verzweigt-kettiger Verbindungen von Erhöhungen der (Plasma)Konzentrationen, wie sie z.B. bei Ahornsirupkrankheit auftreten, beeinflusst wird. In vivo sind entsprechende Untersuchungen methodisch problematisch. Daher wurden Modelluntersuchungen mit humanen Hautfibroblasten durchgeführt. Die Zellen wurden mit 1-<sup>14</sup>C-markierten verzweigt-kettigen L-Amino- und 2-Oxosäuren bei Substratkonzentrationen inkubiert, die repräsentativ für Plasma von Normalpersonen (N) und von Patienten mit varianter (V) bzw. klassischer Form der Ahornsirupkrankheit (C) sind. In Fibroblasten von Normalpersonen lag die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in vollständig aktivierter Form vor, der Substratfluß war unter allen Bedingungen vergleichbar (ca. 10 nmol x 90 min<sup>-1</sup> x (mg Zellprotein)<sup>-1</sup>). Unter N- und V-Bedingungen war, bei gleicher relativer Zusammensetzung des Substratangebots, die Relation der L-Leucin- (ca. 45%), L-Valin- (ca. 30%), und L-Isoleucin-Oxidation (ca. 25%)

praktisch identisch. Unter C-Bedingungen, mit deutlich erhöhtem Anteil des L-Leucins am Substratangebot, war der Anteil der L-Leucin-Oxidation am Substratfluß deutlich erhöht, der der L-Valin- und der L-Isoleucin-Oxidation vermindert. In Fibroblasten eines Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit war, bei deutlich vermindelter Gesamtoxidationsrate, die relative Zusammensetzung des Flußes durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase mit der von Kontrollzelllinien vergleichbar. Die relative Zusammensetzung des Substratflußes unter physiologischen Substratbedingungen (N) in vitro stimmte überraschend gut mit Ergebnissen oraler Bolustests an Gesunden überein, bei denen die Ganzkörper-Oxidationsrate für jedes einzelne Substrat mittels 1-<sup>13</sup>C-markierten Verbindungen in getrennten Versuchen ermittelt wurde. Die Befunde zeigen, daß die Zusammensetzung des gesamten metabolischen Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase durch das Konzentrationsverhältnis der Substrate bestimmt wird. Deshalb müssen bei der Interpretation residualer Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten von ahornsirupkranken Patienten gegenüber der Norm veränderte Substratkonzentrationsverhältnisse im Plasma mit berücksichtigt werden.

## 6.1 Einleitung

Bei Ahornsirupkrankheit ist der oxidative Abbau der essentiellen verzweigtkettigen L-Aminosäuren auf der Stufe des mitochondrialen verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes (EC 1.2.4.4) beeinträchtigt. Als Folge des Enzymdefektes akkumulieren L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin sowie die korrespondierenden 2-Oxosäuren im Blut und anderen Körperflüssigkeiten. Höhere Konzentrationen der 2-Oxosäuren haben neurotoxische Wirkungen, die zugrundeliegenden biochemischen Mechanismen sind jedoch nicht bekannt. Bei der schwersten, klassischen Form der Erkrankung treten hohe Konzentrationen der verzweigtkettigen Verbindungen und neurotoxische Zeichen bereits in der Neonatalperiode auf. Bei varianten Formen ist die Manifestation deutlich verzögert und der Verlauf der Erkrankung milder (Übersicht bei *Chuang & Shih, 1995*).

Zur Bestimmung des Schweregrades der Erkrankung wird im allgemeinen die Restaktivität des Enzymkomplexes in kultivierten Hautfibroblasten der Patienten ermittelt. Allerdings ist die Korrelation zwischen dem in vitro meßbaren Schweregrad einerseits und den klinischen Befunden und der Protein(Leucin)toleranz andererseits unbefriedigend (*Chuang & Shih, 1995; Schadewaldt & Wendel, 1997*).

Zur Ermittlung des in vivo Schweregrades der Erkrankung werden daher in den letzten Jahren zunehmend Stoffwechsel-Umsatzmessungen mit stabilen Isotopen durchgeführt. Dabei wird den Patienten  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertes L-Leucin als Substrat verabreicht und die Ganzkörper-L-Leucinoxidation als Maß für die residuale Aktivität des defekten Enzymkomplexes bestimmt (*Collins et al., 1987; Thompson et al., 1990a; 1990b; 1991; Elsas et al., 1993*). Es ist jedoch unklar, inwieweit die Ganzkörper-L-Leucinoxidation tatsächlich repräsentativ für den Substratfluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in vivo ist. Bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit sind die Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen Metabolite gegenüber der Norm stark erhöht und in ihrer

Relation zueinander deutlich verändert (*Langenbeck et al., 1978; Shigematsu et al., 1983; Snyderman et al., 1984; Treacy et al., 1992; Schadewaldt et al., 1999a*). Untersuchungen mit kultivierten humanen Zellen und perfundierten Rattenherz haben gezeigt, daß die Oxidation einer individuellen verzweigtkettigen L-Aminosäure durch den Zusatz anderer verzweigtkettiger L-Aminosäuren spezifisch beeinflusst werden kann (*Schäfer & Schauder, 1988; Schadewaldt et al., 1990; Torres et al., 1995*). Aufgrund dieser Interaktion der verzweigtkettigen Verbindungen ist nicht auszuschließen, daß bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit der Anteil der L-Leucinoxidation am metabolischen Fluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase durch die vergrößerten Pools der verzweigtkettigen Metabolite signifikant verändert wird. In diesem Fall wäre die Vergleichbarkeit der Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten von ahornsirupkranken Patienten und Normalpersonen nicht gewährleistet und damit eine sinnvolle Beurteilung des in vivo Schweregrades der Erkrankung nicht möglich.

In vivo ist eine gleichzeitige Ermittlung des individuellen Anteils der Substrate am metabolischen Fluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase methodisch nicht durchführbar, da die CO<sub>2</sub>-Freisetzung aus den verschiedenen Substraten nicht differenziert ermittelt werden kann. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von Modellexperimenten in vitro untersucht, inwieweit die L-Leucinoxidation für den Substratfluß repräsentativ ist und in welchem Maße die L-Leucinoxidation durch veränderte Konzentrationen der verzweigtkettigen Metabolite beeinflusst wird. Dazu wurden kultivierte Hautfibroblasten von Normalpersonen und ahornsirupkranken Patienten mit verzweigtkettigen Metaboliten in Konzentrationen, wie sie typischerweise bei Normalpersonen und bei Patienten mit varianter und klassischer Form der Erkrankung auftreten, inkubiert. Individueller Zusatz von 1-<sup>14</sup>C-markierten Substraten ermöglichte dabei - anhand der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung - die Bestimmung des jeweiligen Anteils am gesamten metabolischen Fluß durch den verzweigtkettige 2-Oxosäuren Dehydrogenase Komplex.

## 6.2 Material und Methoden

### 6.2.1 Material

#### Chemikalien und Biochemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt), Sigma Chemie (München) oder Boehringer (Mannheim) bezogen. Katalase (EC 1.11.1.6; aus Rinderleber) stammte von Boehringer (Mannheim). L-Aminosäureoxidase (EC 1.4.3.2; aus Schlangengift von *Crotalus durissus*) wurde von Sigma bezogen. Dowex 50 W X8 (100 - 200 mesh, H<sup>+</sup>-Form) stammte von Serva (Heidelberg).

#### Radiochemikalien

L-[1-<sup>14</sup>C]Leucin (2.1 GBq x mmol<sup>-1</sup>), L-[1-<sup>14</sup>C]Valin (2.0 GBq x mmol<sup>-1</sup>) und eine Präparation von L-[1-<sup>14</sup>C]Isoleucin/L-[1-<sup>14</sup>C]Alloisoleucin (2.0 GBq x mmol<sup>-1</sup>) stammten von Biotrend (Köln). Die Enantiomerenreinheit des L-[1-<sup>14</sup>C]Isoleucin/L-[1-<sup>14</sup>C]Alloisoleucin-Gemisches wurde durch enzymatische Umsetzung mittels L-Aminosäureoxidase überprüft (vgl. *Schadewaldt & Wendel, 1987*). Dabei ergab sich kein Hinweis auf eine Verunreinigung mit D-Aminosäuren (> 1%).

Zur Präparation von reinem 1-<sup>14</sup>C-markiertem L-Isoleucin und L-Alloisoleucin wurde das kommerzielle Präparat zur Trockne eingedampft, der Rückstand in H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0.2 mol x l<sup>-1</sup>, 3 ml) aufgenommen und auf eine DC-6A-Kationenaustauscher-Säule (Durrum, Paolo Alto; 20 x 0.6 cm) aufgetragen. Die Auftrennung der L-Aminosäuren erfolgte bei 50 °C mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (0.1 mol x l<sup>-1</sup>, pH 3.3, 0.5 ml x min<sup>-1</sup>). Das Eluat wurde in 0.5 ml-Fraktionen gesammelt, die L-[1-<sup>14</sup>C]Isoleucin bzw. L-[1-<sup>14</sup>C]Alloisoleucin enthaltenden Fraktionen wurde mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung detektiert, vereinigt und mit HCl (2 mol x l<sup>-1</sup>) auf pH 1 eingestellt. Zur Entsalzung wurde die Lösung auf eine Dowex 50 WX8-Säule (100 - 200 mesh, H<sup>+</sup>-Form, 1 ml) aufgetragen. Dann wurde mit 5 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O gewaschen und das Präparat wie oben beschrieben mit NH<sub>4</sub>OH (2.5 mol x l<sup>-1</sup>, 0.5 ml x min<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>) eluiert. Das Eluat (2 ml) wurde mit 100 µl NaOH (2 mol x l<sup>-1</sup>) versetzt, zur Trockne eingedampft, mit 1 ml Wasser aufgenommen und durch Zusatz von HCl (2 mol x l<sup>-1</sup>) auf pH 7 eingestellt. Diese Aminosäure-Lösungen wurden für die Inkubationsversuche verwendet. Die Bestimmung der Aminosäuren- und der Radioaktivitätsreinheit erfolgte mittels automatischer Aminosäureanalyse (in Läufen mit bzw. ohne Ninhydrin; s. 2.2.3.2) und entsprachen den Spezifikationen des Herstellers.

Die 2-Oxo[1-<sup>14</sup>C]säuren der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren wurden ausgehend von den entsprechenden radioaktiv markierten reinen verzweigt-kettigen L-Aminosäuren durch oxidative Desaminierung mit L-Aminosäureoxidase, in Gegenwart von Katalase, dargestellt und durch Kationenaustauschchromatographie an Dowex 50 WX8 gereinigt (*Rüdiger et al., 1972*). Entsprechend wurde reines nicht-markiertes S-3-Methyl-2-oxopentanoat durch enzymatische Umsetzung von L-Isoleucin dargestellt.

R-2-Chlor-4-methylpentanoat, Na-Salz, wurde aus D-Leucin durch Diazotierung mit NaNO<sub>2</sub> in salzsaurer Lösung nach einer Vorschrift von *Harris et al. (1988)* dargestellt. Die Säure wurde aus dem Reaktionsgemisch mit Ether extrahiert, durch Vakuumdestillation gereinigt und mit NaOH neutralisiert. Das Produkt wurde durch Siedepunkt, spezifische Drehung, HPLC, sowie IR- und Massenspektrum charakterisiert.

## 6.2.2 Methoden

### 6.2.2.1 Zellkultur

Humane Hautfibroblasten wurden aus Hautbiopsien von Normalpersonen und eines Patienten (D.N.) mit milder varianter Form der Ahornsirupkrankheit gewonnen. In Fibroblasten dieses Patienten wurde nach *Schadewaldt et al. (1989)* mit L-[1-<sup>14</sup>C]Leucin als Substrat eine residuale Aktivität des verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes von 36 ± 21 % (n =

4) bestimmt. Die Fibroblasten wurden in Monolayer-Kultur in Eagle's Minimum Essential Medium mit HEPES ( $20 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ), fötalem Kälberserum (10 %), L-Glutamin ( $2 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ), Penicillin ( $100 \text{ IU Penicillin G} \times \text{l}^{-1}$ ) und Streptomycin ( $100 \mu\text{g Streptomycinsulphat} \times \text{l}^{-1}$ ), pH 7.2 kultiviert (*Wendel et al., 1975*). Tests auf Mycoplasmen-Kontamination waren negativ (Mycoplasma PCR ELISA; Boehringer, Mannheim). Nach 10 bis 15 Passagen wurde bei den konfluenten Fibroblastenkulturen das Medium gewechselt und die Zellen 3 - 4 Tage später durch Trypsinierung geerntet, in Kulturmedium resuspendiert und zwei mal mit NaCl-Lösung ( $0.154 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ ) gewaschen. Danach wurden die Fibroblasten in Dulbecco's phophat-gepufferter NaCl-Lösung (PBS) mit Rinderserumalbumin ( $1.2 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ ) und D-Glucose ( $18 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) resuspendiert. Im allgemeinen wurde die Zellzahl auf ca.  $2 \times 10^6 \text{ Zellen} \times \text{ml}^{-1}$  eingestellt. Diese Zellsuspension wurde für die folgenden Versuche eingesetzt.

#### 6.2.2.2 Bestimmung der Stoffwechselraten *in vitro*

Die Bestimmung der Transaminierungs- und oxidativen Decarboxylierungsraten wurden nach *Schadewaldt et al. (1989)* durchgeführt. Suspensionen von kultivierten humanen Hautfibroblasten ( $0.2 - 0.6 \text{ mg Zellprotein in } 0.3 \text{ ml}$ ) wurden in einem Endvolumen von  $1.0 \text{ ml}$  bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  für 90 Minuten in einem Schüttelwasserbad inkubiert.  $^{14}\text{CO}_2$ -dichte Inkubationsgefäße wurden aus  $22 \text{ ml-Glasszintillationsgefäßen}$  hergestellt (*Wagenmakers & Veerkamp, 1982; Schadewaldt et al., 1989*). Das Inkubationsmedium bestand aus Dulbecco's phophat-gepufferter NaCl-Lösung, D-Glucose ( $5.5 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) und Rinderserumalbumin ( $0.4 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ ).

In einer ersten Versuchsserie wurden dem Inkubationsmedium außerdem verzweigtkettige L-Aminosäuren in den in Tab. 1 angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Jeweils eine L-Aminosäure war dabei  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markiert. In einer zweiten Serie wurden dem Inkubationsmedium gleichzeitig alle verzweigtkettigen L-Aminosäuren und ihre 2-Oxosäuren in den in Tab. 2 spezifizierten physiologischen bzw. pathophysiologischen Konzentrationen

zugesetzt. In diesen Ansätzen kann der oxidative Abbau einer verzweigt-kettigen L-Aminosäure und ihrer korrespondierenden 2-Oxosäure nicht getrennt erfaßt werden, da die verzweigt-kettigen L-Amino- und 2-Oxosäuren über die Aminotransferase-Reaktion ineinander umgewandelt werden können. Daher wurde die oxidative Decarboxylierung jeweils eines L-Aminosäure/2-Oxosäure-Paares bestimmt. Dazu wurde jeweils eine verzweigt-kettige L-Aminosäure und ihre korrespondierende 2-Oxosäure in  $^{14}\text{C}$ -markierter Form so zugesetzt, daß bei beiden Metaboliten identische spezifische Radioaktivitäten vorlagen. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Zellsuspension gestartet und durch Injektion von 0.3 ml 5-Sulphosalicylsäure (10 %, w:v) gestoppt. Als Leerwerte dienten entsprechend angesetzte Proben ohne Zellsuspension. Im allgemeinen wurden Doppel- oder Dreifachproben angesetzt. Das während der Inkubationszeit durch oxidative Decarboxylierung freigesetzte  $^{14}\text{CO}_2$  wurde in 0.5 ml Ethanolamin:Ethylenglycol (1:2, v:v) absorbiert und über Flüssig-Szintillationszählung gemessen. In den nur L-Aminosäuren enthaltenden Ansätzen (Serie 1) wurden zusätzlich die im Inkubationsmedium akkumulierten 2-Oxo[1- $^{14}\text{C}$ ]säuren durch Zugabe von 0.5 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %) chemisch decarboxyliert (*Schadewaldt et al., 1984*) und mit frischer Absorptionslösung das dabei freigesetzte  $^{14}\text{CO}_2$ , wie oben beschrieben, bestimmt (*Schadewaldt et al., 1989*).

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach *Bradford (1976)* mit Rinderserumalbumin als Standardsubstanz.

### 6.2.3 Auswertung und Statistik

Die Stoffwechselraten wurden anhand der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung aus  $^{14}\text{C}$ -markierten Substraten auf der Basis der spezifischen Radioaktivität des C1-Atoms berechnet. Die Transaminierungsrate von L-Aminosäuren wurde als Summe der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung und der 2-Oxo[1- $^{14}\text{C}$ ]säure-Akkumulation berechnet.

Im allgemeinen sind die Ergebnisse im Text und in Tabellen als Mittelwerte  $\pm$  SD, in Abbildungen als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.

### 6.3 Ergebnisse

#### Interaktion verzweigtkettiger L-Aminosäuren

Erste in vitro Untersuchungen mit kultivierten humanen Hautfibroblasten und  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierten Substraten zeigten, daß der Katabolismus jeder verzweigtkettigen L-Aminosäure durch den Zusatz der anderen verzweigtkettigen L-Aminosäuren deutlich beeinflußt wird. Z.B. wurde die Rate der Transaminierung und oxidativen Decarboxylierung bei Inkubationen mit physiologischen L-Leucin-Konzentrationen ( $0.15 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) durch den gleichzeitigen Zusatz von L-Valin ( $0.25 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ), L-Isoleucin ( $0.075 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) und L-Alloisoleucin ( $0.002 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) in physiologischen Konzentrationen um etwa 50 % vermindert. Ähnliche inhibitorische Effekte wurden auch bei den anderen verzweigtkettigen L-Aminosäuren beobachtet (Tab. 1). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß der zelluläre Katabolismus jeder einzelnen verzweigtkettigen L-Aminosäure durch die Anwesenheit aller anderen verzweigtkettigen Substrate in spezifischem Maße inhibiert wird.

Tab. 1: Interaktion physiologischer Konzentrationen verzweigtkettiger L-Aminosäuren (BCAA) bei der oxidativen Decarboxylierung (DR) und Transaminierung (TR) in humanen Hautfibroblasten<sup>#</sup>

1- $^{14}\text{C}$ -markiertes Substrat <sup>§</sup> ( $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ )		Katabolismus der [ $^{14}\text{C}$ ]Aminosäuren ( $\text{nmol} \times 90 \text{ min}^{-1} \times (\text{mg Zellprotein})^{-1}$ )		Änderung (%)
		ohne BCAA	mit BCAA*	
L-Leu (150)	DR <sup>§</sup>	$7.0 \pm 2.3$	$3.6 \pm 1.2$	$-48 \pm 6$
	TR <sup>§§</sup>	$45.6 \pm 7.5$	$24.0 \pm 5.4$	$-48 \pm 4$
L-Val (250)	DR	$4.6 \pm 1.6$	$2.9 \pm 0.9$	$-38 \pm 6$
	TR	$25.7 \pm 9.4$	$16.5 \pm 5.8$	$-36 \pm 1$
L-Ile (75)	DR	$3.3 \pm 1.6$	$1.5 \pm 0.5$	$-48 \pm 16$
	TR	$27.5 \pm 7.9$	$14.2 \pm 4.5$	$-49 \pm 2$
L-Allo (2)	DR	n.d.	n.d.	--
	TR	n.d.	n.d.	--

<sup>#</sup> kultivierte Zellen eines gesunden Spenders wurden 90 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert; <sup>§</sup> spezifische Radioaktivitäten L-Leu, L-Val, L-Ile bzw. L-Allo: 0.11, 0.06, 0.10 bzw. 0.10  $\text{kBq} \times \text{nmol}^{-1}$ ; \*in Anwesenheit aller anderen nicht-markierten L-Aminosäuren in der angegebenen Konzentration; <sup>§</sup>  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung; <sup>§§</sup> Summe von  $^{14}\text{CO}_2$ - und 2-Oxo[ $^{14}\text{C}$ ]säure-Freisetzung; n.d. nicht meßbar; angegeben sind MW  $\pm$  SD (n=3)

Substratfluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in situ  
Bei der Untersuchung des Substratflusses durch den verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex müssen alle natürlichen Substrate berücksichtigt werden: die vier L-Aminosäuren L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin und L-Alloisoleucin und ihre korrespondierenden 2-Oxosäuren 4-Methyl-2-oxopentanoat, 3-Methyl-2-oxobutanoat, S-3-Methyl-2-oxopentanoat und R-3-Methyl-2-oxopentanoat.

Tab.2: Konzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren und ihrer korrespondierenden 2-Oxosäuren in Inkubationen intakter humaner Hautfibroblasten

Substrate	Konzentrationsbereich #		
	N	V	C
	(µmol x l <sup>-1</sup> )		
L-Leu / KIC	150 / 50 (0.11) <sup>§</sup>	250 / 100 (0.07)	700 / 450 (0.02)
L-Val / KIV	250 / 20 (0.07)	400 / 50 (0.04)	300 / 50 (0.06)
L-Ile / S-KMV	75 / 25 (0.22)	150 / 100 (0.11)	200 / 150 (0.08)
L-Allo / R-KMV	2 / 0 (0.83)	20 / 5 (0.83)	100 / 50 (0.17)

# N, normal; V, variante MSUD; C, klassische MSUD (vgl. Text); <sup>§</sup> Angaben zur spezifischen Radioaktivität der Substratpaare (kBq x nmol<sup>-1</sup>) in Klammern; Abkürzungen: KIC, 4-Methyl-2-oxopentanoat; KIV, 3-Methyl-2-oxobutanoat; KMV, 3-Methyl-2-oxopentanoat

Für die Bestimmung des Substratflusses durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in situ wurden kultivierte Hautfibroblasten mit allen acht Substraten inkubiert und dabei Substratkonzentrationsverhältnisse gewählt, wie sie typischerweise bei Normalpersonen (N-Bedingung), bei Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit (V-Bedingung) bzw. bei Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit im Plasma auftreten (C-Bedingung) (s. Tab. 2) (Bremer et al., 1981; Hagenfeldt et al., 1984; Gregory et al., 1986; Schadewaldt et al., 1996; Schadewaldt et al., 1999a; Schadewaldt et al., 1999b weitere Literatur in: Slocum & Cummings, 1991). Für

jedes L-Aminosäure/2-Oxosäure-Paar wurde die Oxidationsrate unter Einsatz  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierter Substrate anhand der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung individuell ermittelt. Der Substratfluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase ergab sich dann als Gesamtrate, d.h. als Summe der unter identischen Inkubationsbedingungen mit den individuellen Substratepaaren ermittelten Oxidationsraten.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 3 dargestellt. In Hautfibroblasten von Normalpersonen war die Gesamtrate der oxidativen Decarboxylierung mit etwa  $10 \text{ nmol} \times 90 \text{ min}^{-1} \times (\text{mg Zellprotein})^{-1}$  unter allen Substratbedingungen vergleichbar. Dieses Ergebnis war überraschend, da die Gesamtkonzentration an verzweigtkettigem Substrat mit 0.57, 1.08 und 2.00  $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$  unter N-, V- und C-Bedingungen sehr unterschiedlich war. Dies deutete daraufhin, daß der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex unter den Inkubationsbedingungen vollständig in der dephosphorylierten, aktiven Form vorliegen dürfte. Daher wurde der Aktivitätsstatus des Enzymkomplexes in den humanen Hautfibroblasten im Rahmen dieser Untersuchungen zusätzlich unter Einsatz von 2-Chlor-4-methylpentanoat, einem spezifischen Inhibitor der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Kinase (*Harris et al., 1982*), überprüft. Bei Substratkonzentrationen von 0.05, 0.10 und 1.00  $\text{mmol L-[1-}^{14}\text{C]Leucin} \times \text{l}^{-1}$  bewirkte der Zusatz von 2-Chlor-4-methylpentanoat in Konzentrationen von 0.1 und 0.5  $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$  zum Inkubationsmedium keine Steigerung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung. Dies belegt, in Übereinstimmung mit früheren Befunden (*Schadewaldt et al., 1989*), daß der Enzymkomplex in den kultivierten Zellen vollständig aktiviert war.

Unter den hier gewählten N- und V-Bedingungen betrug der relative Anteil der L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat (L-Valin/3-Methyl-2-oxobutanoat; L-Isoleucin/S-3-Methyl-2-oxopentanoat; L-Alloisoleucin/R-3-Methyl-2-oxopentanoat)-Oxidation an der Gesamt-Decarboxylierungsrate  $47 \pm 4$  ( $29 \pm 2$ ;  $24 \pm 2$ ; 0) % und  $43 \pm 4$  ( $31 \pm 1$ ;  $25 \pm 3$ ;  $0.8 \pm 0.1$ ) % ( $n = 3$ ). Damit war der Anteil von L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat an der Gesamtrate der oxidativen

Decarboxylierung, bei gleichem relativen Beitrag zum Angebot an verzweigt-kettigem Substrat von ca. 30 %, unter N- und V-Bedingungen praktisch identisch. Entsprechendes war bei den anderen verzweigt-kettigen L-Aminosäure/2-Oxosäure-Substratpaaren feststellbar. Unter C-Bedingungen lag, bei einem L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat-Beitrag zum gesamten Substratangebot von ca. 60 %, der relative Anteil der L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat-Oxidation an der Gesamt-Decarboxylierungsrate bei  $70 \pm 4$  % (n = 3). Die Anteile der L-Valin/3-Methyl-2-oxobutanoat-, L-Isoleucin/S-3-Methyl-2-oxopentanoat- bzw. L-Alloisoleucin/R-3-Methyl-2-oxopentanoat-Oxidation waren entsprechend erniedrigt und betrugen  $11 \pm 1$ ,  $16 \pm 2$  bzw.  $3.0 \pm 0.5$  %.

Tab.3: Zusammensetzung des Substratflusses durch den verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex (BCOA-DH) in inkubierten Hautfibroblasten von Normalpersonen und eines Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit (MSUD)

1- <sup>14</sup> C-markierte Substrate	Decarboxylierungsrate # (nmol x 90 min <sup>-1</sup> x (mg Zellprotein) <sup>-1</sup> )		
	Konzentrationsbereich der verzweigt-kettigen Amino- und 2-Oxosäuren *		
	N	V	C
	<b>Kontrolle</b>		
L-Leu / KIC	4.57 ± 0.29	4.74 ± 0.51	7.64 ± 1.70
L-Val / KIV	2.76 ± 0.58	3.40 ± 0.09	1.19 ± 0.14
L-Ile / S-KMV	2.36 ± 0.52	2.79 ± 0.33	1.66 ± 0.28
L-Allo / R-KMV	n.d.	0.09 ± 0.01	0.31 ± 0.04
BCOA-DH Fluß (Σ)	9.79 ± 1.37	11.01 ± 0.09	10.79 ± 2.03
	<b>MSUD</b>		
L-Leu / KIC	1.08 ± 0.16	1.54 ± 0.15	3.65 ± 0.69
L-Val / KIV	0.72 ± 0.09	1.05 ± 0.32	0.70 ± 0.31
L-Ile / S-KMV	0.67 ± 0.04	0.97 ± 0.11	0.65 ± 0.04
L-Allo / R-KMV	n.d.	0.02 ± 0.01	0.19 ± 0.12
BCOA-DH Fluß (Σ)	2.47 ± 0.26	3.59 ± 0.57	5.20 ± 1.11

# <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung; \* N, normal; V, variante Ahornsirupkrankheit; C, klassische Ahornsirupkrankheit (s. Tab. 2); n.d. nicht meßbar; angegeben sind MW ± SD (n=3); Abkürzungen: KIC, 4-Methyl-2-oxopentanoat; KIV, 3-Methyl-2-oxobutanoat; KMV, 3-Methyl-2-oxopentanoat

In weiteren Inkubationsversuchen wurde vergleichend untersucht, inwieweit die bei Normalzellen erhobenen Befunde zur Zusammensetzung des Substratflusses durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in situ auf Zellen mit beeinträchtigtem Stoffwechsel der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren übertragbar sind.

In Fibroblasten eines Patienten mit milder varianter Form der Ahornsirupkrankheit zeigte die Gesamtrate der oxidativen Decarboxylierung eine gewisse Abhängigkeit vom Substratangebot im Inkubationsmedium (Tab. 3). Unter N-, V-, und C-Bedingungen lag die Gesamtrate der oxidativen Decarboxylierung verzweigt-kettiger Verbindungen bei  $2.5 \pm 0.3$ ,  $3.6 \pm 0.6$  bzw.  $5.2 \pm 1.1 \text{ nmol} \times 90 \text{ min}^{-1} \times (\text{mg Zellprotein})^{-1}$  ( $n = 3$ ) und betrug damit 25 %, 32 % bzw. 48 % der bei Kontrollzellen ermittelten Oxidationsraten. Der Anteil der L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat (L-Valin/3-Methyl-2-oxobutanoat; L-Isoleucin/S-3-Methyl-2-oxopentanoat; L-Alloisoleucin/R-3-Methyl-2-oxopentanoat)-Oxidation an der Gesamt-Decarboxylierungsrate betrug unter N-Bedingungen  $44 \pm 3$  ( $29 \pm 1$ ;  $27 \pm 2$ ; 0) %, unter V-Bedingungen  $43 \pm 2$  ( $29 \pm 4$ ;  $27 \pm 2$ ;  $0.5 \pm 0.2$ ) % und unter C-Bedingungen  $71 \pm 3$  ( $13 \pm 3$ ;  $13 \pm 2$ ;  $3 \pm 2$ ) %. Diese Ergebnisse sind mit den bei Fibroblasten von Normalpersonen ermittelten Werten identisch.

Die Ergebnisse zur Zusammensetzung des Substratflusses durch den verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex in humanen Hautfibroblasten in vitro sind in Abb. 1 den in vivo Befunden zur Ganzkörper-Oxidation verzweigt-kettiger L-Aminosäuren gegenübergestellt. Die Oxidationsraten jeder verzweigt-kettigen L-Aminosäuren in vivo wurden mittels oraler Bolustests bei einem Kollektiv gesunder Probanden in Einzelversuchen bestimmt und der Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase als Summe der einzelnen Oxidationsraten berechnet (Tab.4). Bei diesen Experimenten lagen die initialen Plasmakonzentrationen der verzweigt-kettigen L-Amino- und 2-Oxosäuren bei allen Probanden im Normbereich (Tab. 4; vgl. Kapitel 5) und waren mit den für die N-Bedingungen gewählten Substratkonzentrationen sehr gut vergleichbar.

Tab.4: In vivo Oxidation verzweigt-kettiger L-Aminosäuren bei gesunden Probanden im postabsorptiven Zustand

1- <sup>13</sup> C-markiertes Substrat	Ganzkörper-Oxidationsrate* ( $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ )
L-Leu §	0.32 $\pm$ 0.06
L-Val #	0.22 $\pm$ 0.04
L-Ile §	0.17 $\pm$ 0.05
BCOA-DH Fluß ( $\Sigma$ )	0.71 $\pm$ 0.11

\* bestimmt in oralen Bolustests mit verzweigt-kettigen L-Amino[1-<sup>13</sup>C]säuren ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg} \text{ KG})^{-1}$ ); Angaben sind MW  $\pm$  SD (n=5)

§ initiale Plasmaspiegel: Leu (KIC), 119 $\pm$ 26 (42 $\pm$ 8); Val (KIV), 215 $\pm$ 40 (21 $\pm$ 3); Ile (KIV) 54 $\pm$ 13 (25 $\pm$ 2)

# initiale Plasmaspiegel: Leu (KIC), 136 $\pm$ 7 (47 $\pm$ 8); Val (KIV), 238 $\pm$ 30(24 $\pm$ 4); Ile (KIV) 60 $\pm$ 9 (31 $\pm$ 9)

§ initiale Plasmaspiegel: Leu (KIC), 129 $\pm$ 27 (49 $\pm$ 7); Val (KIV), 239 $\pm$ 49 (26 $\pm$ 4); Ile (KIV) 63 $\pm$ 13 (28 $\pm$ 4)

Abkürzungen: BCOA-DH, verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase

In vivo betrug der metabolische Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase  $0.71 \pm 0.11 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$  (n = 5), der Anteil der Oxidation von L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin am gesamten Fluß lag bei  $45 \pm 7 \%$ ,  $32 \pm 3 \%$  und  $24 \pm 4 \%$ . Damit sind, bei vergleichbaren Substratkonzentrationen, die Anteile der einzelnen Substrate am Gesamtfluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in vivo mit den Verhältnissen in vitro fast identisch.

Insgesamt zeigen die Befunde, daß die relative Zusammensetzung des Substratflusses durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase bei Konzentrationen der verzweigt-kettigen L-Amino- und 2-Oxosäuren, die für Plasma von Normalpersonen und Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit repräsentativ sind, konstant war. Erst bei sehr stark erhöhten und in ihrer Relation zueinander gegenüber der Norm veränderten Konzentrationen der verzweigt-kettigen L-Amino- und 2-Oxosäuren änderte sich der Anteil der Oxidation einer individuellen L-Aminosäure an der Gesamt-Decarboxylierungsrate.

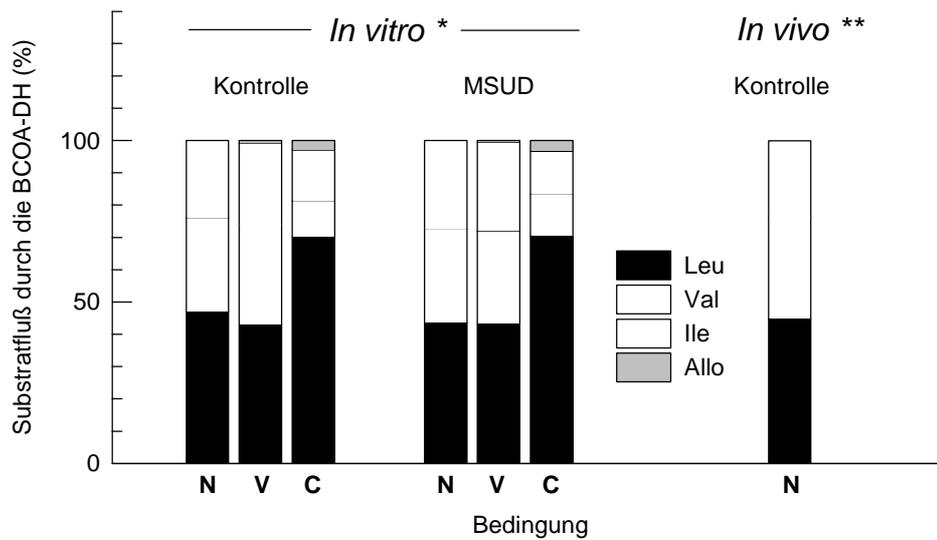


Abb.1: Relative Zusammensetzung des Substratfluß durch den verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex (BCOA-DH) in vitro und in vivo. \* Inkubationsbedingungen in vitro: vgl. Tab.2; \*\* Konzentrationen der verzweigtkettige L-Amino- und 2-Oxosäuren: vgl. Tab.4. Abkürzungen: MSUD, Ahornsirupkrankheit

## 6.4 Diskussion

### 6.4.1 Katabolismus verzweigtkettiger L-Aminosäuren beim Menschen

Quantitative Untersuchungen zum Katabolismus verzweigtkettiger L-Aminosäuren beim Menschen in vivo wurden bisher fast ausschließlich mit stabil-Isotopen-markiertem L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin als Substrat durchgeführt (Schadewaldt et al., 1998; vgl. Kap. 2). Zum Katabolismus von L-Valin liegen einige wenige Befunde vor (Meguid et al., 1983; Staten et al., 1984; Meguid et al., 1986; Pelletier et al., 1991), zum oxidativen Abbau von L-Isoleucin wurden bisher keine Daten veröffentlicht.

Bezüglich des oxidativen Abbaues aller drei verzweigtkettigen L-Aminosäuren stehen einige Ergebnisse aus in vitro Untersuchungen an kultivierten humanen Zellen zur Verfügung, in denen der Katabolismus aller drei verzweigtkettigen L-Aminosäuren vergleichend untersucht wurde (Schadewaldt & Wendel, 1987; Schadewaldt & Wendel, 1989; Schadewaldt et al., 1989). Allerdings wurde bei

diesen Experimenten in der Regel eine L-Aminosäure als alleiniges Substrat verwendet. Ein Rückschluß aufgrund dieser experimentellen Befunde auf die in vivo Situation ist nicht möglich. Vor allem wegen der Tatsache, daß in vivo insgesamt acht Substrate, nämlich die verzweigt-kettigen L-Aminosäuren - L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin, L-Alloisoleucin - und ihre korrespondierenden 2-Oxosäuren - 4-Methyl-2-oxopentanoat, 3-Methyl-2-oxobutanoat, S-3-Methyl-2-oxopentanoat, R-3-Methyl-2-oxopentanoat - als Substrate berücksichtigt werden müssen. In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise, daß der Katabolismus eines bestimmten verzweigt-kettigen Metaboliten durch die Anwesenheit anderer verzweigt-kettiger Metaboliten in spezifischer Weise beeinflußt wird. Einer der ersten Befunde, die auf diese Interaktion der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren hinweisen, wurde von *Swendseid et al. (1965)* publiziert. *Swendseid et al. (1965)* fanden, daß die orale Gabe von Leucin-Dosen ( $200$  und  $1000 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) beim Menschen zu einer deutlichen dosisabhängigen Senkung der Plasmaspiegel von L-Valin und L-Isoleucin führte. Dagegen war bei oralen Valin-Belastung keine wesentliche Änderung der Plasmakonzentration der beiden anderen verzweigt-kettigen L-Aminosäuren festzustellen. Letzteres wurde von *Schauder et al. (1984)* in oralen Belastungen mit  $534 \mu\text{mol L-Valin} \times (\text{kg KG})^{-1}$  bestätigt. In Übereinstimmung mit den bisher zitierten Befunden wurde auch bei oralen L-Isoleucin-Belastungen ( $1527 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ), die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, keine wesentliche Änderungen der Plasmaspiegel von L-Leucin und L-Valin gefunden (*Schadewaldt et al., 1990; 1999b*). Ergänzend wurde von *Hambraeus et al. (1976)* wie auch von *Motil et al. (1981)* beobachtet, daß bei Probanden, die mit einer L-Leucin-armen Diät ernährt wurden, deutliche Erhöhungen der L-Valinkonzentrationen im Plasma festzustellen waren. Dagegen führte eine entsprechend L-Valin-reduzierte Diät nicht zu vergleichbaren Änderungen der L-Leucin-Konzentration im Plasma. Zur Erklärung dieser Beobachtungen stellte *Harper (Harper et al., 1984)* die sog. Leucin:Valin und Isoleucin-Antagonismus-Hypothese auf. Diese besagt im wesentlichen, daß der spezifische Effekt hoher L-Leucin-Gaben auf einer durch die korrespondierende 2-Oxosäure 4-Methyl-2-oxopentanoat vermittelten

Hemmung der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Kinase (Dephosphorylierung der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase) beruht (vgl. *Yeaman, 1989*).

Die obigen Befunde im Plasma erlauben allerdings keine direkten Rückschlüsse auf das Ausmaß der Interaktion der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren, da die Einstellung der Plasmaspiegel einerseits durch die Gesamtzufuhr freier Aminosäuren über endogene Proteolyse und exogene Nahrungszufuhr und andererseits den Verbrauch dieser Metabolite im Rahmen der Proteinbiosynthese und des oxidativen Abbaues bestimmt wird (Hinweis: die renale Ausscheidung ist vernachlässigbar gering; *Schadewaldt et al., 1999a*). Insgesamt deuten diese Befunde allerdings daraufhin, daß der oxidative Abbau der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren durch Gabe hoher L-Leucin-Dosen insgesamt gesteigert wird.

Andererseits zeigen einige *in vitro* Untersuchungen an humanen Zellen, daß die verzweigt-kettigen L-Aminosäuren auch einen wechselseitigen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Einfluß auf ihren oxidativen Abbau haben können (*Schäfer & Schauder, 1988; Schadewaldt et al., 1990*). Die eigenen Befunde (s. Tab. 1) zeigen erstmals, daß solche inhibitorischen Wirkungen auch bei physiologischen Substratkonzentrationen auftreten.

Aufgrund der bisher verfügbaren experimentellen Befunde kann daher weder die Frage nach der tatsächlichen Größe des metabolischen Flußes durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase *in vivo*, noch die nach seiner relativen Zusammensetzung hinsichtlich der einzelnen Substrate beantwortet werden.

#### 6.4.2 Metabolischer Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase

In vivo ist eine direkte Bestimmung des gesamten metabolischen Flußes durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase und seiner Zusammensetzung aus folgenden Gründen nicht durchführbar:

1. Zur Bestimmung der Decarboxylierungsraten einzelner Metabolite werden bei in vivo Untersuchungen  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierte Substrate appliziert und die Ganzkörper-Decarboxylierungsraten anhand der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation unter Berücksichtigung der endogenen Isotopenverdünnung ermittelt (*Schwenk et al., 1985; Thompson et al., 1989*). Bei Gabe mehrerer  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierter Substrate ist eine differenzierte Erfassung der  $^{13}\text{CO}_2$ -Bildung aus einzelnen Metaboliten nicht möglich. Daher können im selben Versuchsansatz die individuellen Oxidationsraten verschiedener verzweigt-kettiger Substrate nicht gleichzeitig ermittelt werden. Werden die Oxidationsraten einzelner Substrate in getrennten Versuchsansätzen ermittelt, ist die Beurteilung der Ergebnisse unsicher, da bisher weder der Einfluß einer möglichen intraindividuellen Variabilität des Stoffwechsels noch der Einfluß eines von Versuch zu Versuch möglicherweise unterschiedlichen Substratangebots an verzweigt-kettigen Verbindungen abgeschätzt werden kann.

2. Prinzipiell wäre eine Ermittlung des gesamten metabolischen Flußes durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase über die Bestimmung der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsrate möglich, wenn es gelänge, durch Zufuhr aufeinander abgestimmter Mengen  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierter L-Aminosäuren die endogene Isotopenanreicherung bei allen verzweigt-kettigen Substraten auf identische Werte einzustellen. Praktisch ist dieser Ansatz allerdings nicht durchführbar, da die für eine bestimmte gewünschte Isotopenanreicherung zu applizierende Menge an  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierter L-Aminosäure nicht mit ausreichender Genauigkeit vorausberechnet werden kann (*Wolfe, 1992*). Eine simultane Untersuchung des Katabolismus der drei wesentlichen verzweigt-kettigen Substrate in vivo wäre also nur möglich, wenn diese unterschiedliche Markierung am C1-Atom tragen würden, z.B.  $1\text{-}^{11}\text{C}$ ,  $1\text{-}^{14}\text{C}$ ,  $1\text{-}^{13}\text{C}$ . Solche Untersuchungen wären mit

immensen Kosten verbunden und sind aus offensichtlichen ethischen Gründen nicht durchführbar.

3. Bei Untersuchungen zur oxidativen Decarboxylierung in vivo ist es auch nicht möglich regulatorische Effekte, die durch das Substratangebot und -zusammensetzung bedingt sind, von enzymaktivierenden Effekten auf die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase abzugrenzen, da multiple (Muskel)Biopsien zur Bestimmung des Aktivitätsstatus des Enzymkomplexes beim Menschen nicht durchgeführt werden können.

Aufgrund der obigen Überlegungen ergibt sich, daß Untersuchungen zum metabolischen Fluß unter kontrollierten experimentellen Bedingungen nur modellhaft und an in vitro Systemen möglich sind, wie sie in dieser Arbeit auch durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse der Versuche mit 2-Chlor-4-methylpentanoat, einem spezifischen Inhibitor der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Kinase (*Harris et al., 1982*), zeigen, daß in den für diese Inkubationsversuche verwendeten humanen Hautfibroblasten der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex vollständig in der aktiven Form vorlag. Wäre in den inkubierten Zellen die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase nur teilweise aktiviert, hätte dieser Inhibitor - zumindest bei der sehr niedrigen L-Leucin-Konzentrationen von  $50 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  bei denen eine Hemmung der Kinase durch die korrespondierende 2-Oxosäure des L-Leucins, aufgrund der sehr niedrigen 2-Oxosäure-Konzentration im Inkubationsansatz, unwahrscheinlich ist (*Schadewaldt et al., 1987*) - eine Steigerung des Substratflusses bewirken müssen. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, bei denen eine Inkubation mit dem (weniger spezifischen) Kinase-Inhibitor Dichloracetat (*Crabb et al., 1981; Paxton & Harris, 1984; Schadewaldt et al., 1984*) ebenfalls zu keiner Steigerung der L-Leucin-Oxidation führte (*Schadewaldt et al., 1989*).

Die unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen ermittelten Gesamt-Decarboxylierungsraten zeigen, daß eine Steigerung der Substratkonzentration

nicht zu einer Steigerung der oxidativen Decarboxylierungsrate in den Zellen führte. Dies weist darauf hin, daß bereits bei Zusatz physiologischer Substratkonzentrationen zum Inkubationsmedium Substratsättigungsbedingungen für die enzymatisch aktive verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase erreicht wurden. Dieses Modellsystem eignet sich also hervorragend für die spezifische Untersuchung der Interaktionseffekte der verzweigt-kettigen Substrate auf den metabolischen Fluß durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in situ, da Effekte durch Änderung des Aktivitätsstatus des Enzyms ausgeschlossen werden können.

Zur Untersuchung der Substratinteraktion wurden alle natürlich vorkommenden verzweigt-kettigen L-Amino- und ihre 2-Oxosäuren eingesetzt. Da der Versuchsansatz sowohl L-Aminosäure als auch die korrespondierende 2-Oxosäure enthielt, war eine differenzierte Erfassung der oxidativen Decarboxylierungsraten von L-Aminosäure und 2-Oxosäure bei Einsatz  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierter Substrate und Bestimmung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung methodisch nicht möglich. Bei Einsatz nur einer radioaktiv markierten Komponente des Substratepaares, würde sich die spezifische Aktivität in der markierten Komponente aufgrund der aktiven, reversiblen Transaminierung zeitabhängig verringern. Entsprechend würde in der zunächst nicht-markierten Komponente die  $^{14}\text{C}$ -Markierung allmählich akkumulieren. Dabei würden sich die spezifischen Markierungen der Substrate während der Inkubation nicht-kontrollierbar verändern und damit wäre eine Berechnung der Decarboxylierungsrate, die eine bekannte und konstante spezifische Radioaktivität des Substrates voraussetzt, nicht möglich. Aus diesen Gründen wurden bei den Untersuchungen L-Amino- und 2-Oxosäure gleichzeitig in identischer spezifischer Radioaktivität eingesetzt und die Decarboxylierungsrate für das Substratpaar bestimmt.

In den Versuchsansätzen sind sowohl Substratkonzentrationsänderungen durch den Fibroblasten-Metabolismus, als auch Änderungen der spezifischen Radioaktivität durch zelluläre Metabolite vernachlässigbar gering, da die

exogenen Substrate in erheblichem Überschuß vorliegen (*Schadewaldt & Wendel, 1987*).

Unter Inkubationsbedingungen, die hinsichtlich der Konzentration verzweigtkettiger Substrate denjenigen entsprechen, die beim Menschen im postabsorptiven Zustand vorkommen (N-Bedingungen; *Bremer et al., 1981; Hagenfeldt et al., 1984; Gregory et al., 1986*; weitere Literatur in: *Slocum & Cummings, 1991*), lag die Relation der Substratkonzentrationen von L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat, L-Valin/3-Methyl-2-oxobutanoat, L-Isoleucin/S-3-Methyl-2-oxopentanoat bzw. L-Alloisoleucin/R-3-Methyl-2-oxopentanoat bei etwa 10:13:5:0, die Relation der oxidativen Decarboxylierung dagegen bei etwa 10:6:5:0. Diese Relation der Decarboxylierungsraten wurde auch bei Inkubationen mit moderat erhöhten Konzentrationen, aber mit vergleichbarer Relation der Substrate (V-Bedingungen) gefunden. Dagegen wurde bei Inkubationen mit hohen Konzentrationen (C-Bedingungen) und gegenüber den obigen Bedingungen vor allem durch den hohen L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat-Anteil deutlich veränderten Substratrelationen (etwa 10:3:3:1), bei insgesamt unveränderter Gesamt-Oxidationsrate, die Relation der oxidativen Decarboxylierung zugunsten des L-Leucin/4-Methyl-2-oxopentanoat-Substratpaares verändert und lag bei etwa 10:1:2:1.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang ein Vergleich der mit physiologischen Substratkonzentrationen *in vitro* erhaltenen relativen Substratoxidationsraten mit den entsprechenden *in vivo* Befunden an gesunden Probanden im postabsorptiven Zustand (vgl. Kap. 5). Unter beiden Bedingungen wurden, bei praktisch identischen Substratkonzentrationen im Inkubationsmedium *in vitro* bzw. im Plasma *in vivo*, übereinstimmende relative Flußraten der einzelnen Substratpaare beobachtet. Überdies stimmen unter den Substratkonzentrationskonstellationen des postabsorptiven Zustandes die Relation der Oxidationsraten *in vivo* wie *in vitro* überraschen gut mit den (wenigen) Angaben zum Verhältnis der L-Aminosäuren L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin im humanen Muskelprotein überein (10:6:6; *Fürst et al., 1970; Fürst,*

1983), das unter Fastenbedingungen die wesentliche Quelle darstellt aus der Aminosäuren für den nachfolgenden Katabolismus freigesetzt werden.

Weder unter in vitro Bedingungen noch in vivo entspricht die Relation der verzweigt-kettigen Substrate dem Verhältnis ihres Katabolismus. So beträgt z.B. bei gesunden gefasteten Probanden die Relation der Oxidationsraten von L-Leucin:L-Valin:L-Isoleucin 10:7:5, das Konzentrationsverhältnis im Plasma liegt bei 10:17:5 (vgl. Tab. 4). Bemerkenswerterweise findet sich dieses Verhältnis der Substratkonzentrationen auch bei Patienten mit Diabetes mellitus, die mit Normalpersonen vergleichbare in vivo L-Leucin-Oxidationsraten bei gleichzeitig deutlich erhöhten Plasmakonzentrationen der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren (ca. 1.5fach der Norm) aufweisen (*Carlsten et al. 1966; Felig et al., 1970; Schadewaldt et al., 1999b*).

In diesem Zusammenhang erwähnenswert sind auch die bei einer Patientin mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit nach orthotoper Lebertransplantation erhobenen Befunde (*Wendel et al., 1999*; vgl. Kap. 4). Bei dieser Patientin, bei der die Oxidation der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren nur im metabolisch intakten Lebergewebe stattfinden kann, wurden normale Ganzkörper-L-Leucinoxidationsraten und normale Verhältnisse der drei verzweigt-kettigen L-Aminosäuren im Plasma (L-Leucin:L-Valin:L-Isoleucin 10:17:7) festgestellt. Allerdings war die absolute Konzentration aller drei L-Aminosäuren gegenüber der Norm etwa 2fach erhöht (vgl. Kap. 4). Damit übereinstimmend zeigen die eigenen Untersuchungen an kultivierten Hautfibroblasten eines Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit (Tab. 3, Abb. 1), daß bei normalen physiologischen Substratkonzentrationen, auch bei eingeschränkter Gesamt-Oxidationsrate (Tab. 3), die Relationen des oxidativen Abbaus der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren normal ist (Abb.1).

Insgesamt deuten diese Befunde darauf hin, daß die relative Zusammensetzung des metabolischen Flußes durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in vitro wie auch in vivo durch die Zusammensetzung des Substratangebots bestimmt wird. Offenbar ergeben

sich in vivo die relativen Substratkonzentrationen (im Plasma) aus der für die jeweilige metabolische Situation adäquaten Zusammensetzung der Flußrate durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase. Daher erscheint es erklärlich, daß die Relation der verzweigtkettigen L-Aminosäuren (im Plasma) weder der Relation ihrer oxidativen Decarboxylierung (im Gewebe) noch ihrer Relation im (Muskel)Protein entspricht.

#### 6.4.3 Zur substratabhängigen Regulation des Katabolismus verzweigtkettiger L-Aminosäuren

Die unerwartet hohe Übereinstimmung der relativen Oxidationsraten verzweigtkettiger L-Aminosäuren in humanen Hautfibroblasten und bei gesunden Probanden in vivo lassen vermuten, daß auch in vivo die - enzymatisch aktive - verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in situ bei physiologischen Konzentrationen der verzweigtkettigen Verbindungen mit Substrat weitgehend oder auch vollständig gesättigt ist. Unter diesen Bedingungen haben Substratkonzentrationsänderungen autoregulatorische Bedeutung. Z.B dürfte nach den oben diskutierten Befunden eine isolierte Erhöhung der L-Leucin-Konzentration zu einer Steigerung der L-Leucin-Oxidation und damit des L-Leucin-Verbrauchs bei gleichzeitiger Reduktion der beiden anderen unter diesen Bedingungen im relativen Unterschluß vorhandenen verzweigtkettigen L-Aminosäuren L-Valin und L-Isoleucin führen. Entsprechend dürfte eine isolierte Verminderung der L-Leucin-Konzentration zu einer kompensatorischen Reduktion der L-Leucin-Oxidation und damit zur Einsparung dieses Substrates führen.

Über diesen Regulationsmechanismus würden letztlich wieder die normalen Konzentrationsverhältnisse hergestellt, ohne daß ein wesentlicher oxidationsbedingter Verlust der anderen essentiellen verzweigtkettigen L-Aminosäuren zu verzeichnen wäre.

Die physiologische Bedeutung einer solchen Regulation des Katabolismus liegt in der Tatsache, daß dieser substratabhängige Mechanismus eine spezifische

und flexible (Gegen)Reaktion auf Änderungen der Zusammensetzung des Substratangebots erlaubt. Dieser Regulationsmechanismus ist vor allem darauf ausgelegt, Änderungen der Konzentrationsverhältnisse von L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin zu kompensieren. Konzentrationsänderungen können über diesen Mechanismus allerdings nur sehr begrenzt bzw. nicht kompensiert werden. So bleiben z.B. bei einer gleichmäßigen Erhöhung aller Substrate die Konzentrationsverhältnisse erhalten und damit blieben die Oxidationsraten unverändert.

Konzentrationsveränderungen können nur über Veränderungen der enzymatischen Kapazität kompensiert werden. Beim Katabolismus der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren erfolgt dies hauptsächlich über eine Hemmung der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Kinase und der damit zusammenhängenden Veränderung des Phosphorylierungsstatus (Yeaman, 1989). Der wesentliche Kinase-Inhibitor unter physiologischen Bedingungen ist die korrespondierende 2-Oxosäure des L-Leucins, das 4-Methyl-2-oxopentanoat. Diese 2-Oxosäure hemmt die Kinase deutlich stärker als die anderen verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren und bewirkt damit eine Zunahme der dephosphorylierten, enzymatisch aktiven Form der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase (Jones & Yeaman, 1986). Folge dieser Kapazitätserhöhung ist eine gleichmäßige Steigerung des oxidativen Abbaues aller drei verzweigt-kettigen L-Aminosäuren.

Es stellt sich hier die Frage warum gerade 4-Methyl-2-oxopentanoat der entscheidende physiologische Regulator für die Aktivierung des oxidativen Abbaues aller drei verzweigt-kettigen L-Aminosäuren darstellt. Vermutlich beruht diese Sonderstellung der 2-Oxosäure des L-Leucins darauf, daß in den meisten körpereigenen und Nahrungsproteinen die Aminosäure L-Leucin in höherer Konzentration enthalten ist, als die beiden anderen verzweigt-kettigen L-Aminosäuren. Bei übermäßigem Angebot können bei den beiden L-Aminosäuren L-Valin und L-Isoleucin Hydroxylierung der 2-Oxosäuren bzw. beim L-Isoleucin Bildung von L-Alloisoleucin prinzipiell als alternative

Stoffwechselwege beschrieben werden. Solche letztlich konzentrationssenkenden Mechanismen bestehen für L-Leucin bzw. seine korrespondierende 2-Oxosäure in vergleichsweise sehr geringem Maß. Diese Unterschiede im Stoffwechsel werden besonders deutlich bei der Ahornsirupkrankheit, bei der L-Leucin als Folge des fehlenden bzw. eingeschränkten oxidativen Abbaues immer die vorherrschende verzweigtkettige L-Aminosäure im Plasma darstellt.

Es erscheint physiologisch sinnvoll, daß die im (Nahrungs)Protein mengenmäßig bedeutendste Komponente, L-Leucin, das Signal für einen gesteigerten Gesamtkatabolismus aller verzweigtkettigen L-Aminosäuren darstellt und über ihre 2-Oxosäure letztlich die Kapazität des oxidativen Abbaues reguliert.

Dieser Regulationsmechanismus der Kapazität stellt also eine notwendige Ergänzung zum Substratregulationsmechanismus dar, damit sowohl Substratimbilanzen als auch Substratüberschüsse schnell und effektiv kompensiert werden können. Gegenüber diesen beiden Mechanismen dürften die anderen bekannten Regulationsmechanismen, wie Energie- und Redoxstatus sowie Substratinhibition (*Yeaman, 1989*), insgesamt von untergeordneter Bedeutung sein und nur in speziellen Stoffwechselsituationen, wie starker Muskelarbeit oder Hypoxie, modifizierend wirken

#### 6.4.4 L-Leucinoxidation als Indikator für den Substratfluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase

Die hier vorgestellten Ergebnisse erlauben auch eine Antwort auf die eingangs gestellten Frage, ob und inwieweit die Bestimmung der L-Leucin-Oxidation repräsentativ für den metabolischen Fluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase ist. Alle oben diskutierten Befunde zeigen übereinstimmend, daß bei normalen Relationen der verzweigtkettigen L-

Aminosäuren, unabhängig von der Höhe der Aminosäure-Konzentrationen, ein weitgehend konstantes Verhältnis ihrer relativen Oxidationsraten wird. Damit erscheint es bei normalen Konzentrationsverhältnissen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren erlaubt, aus der Bestimmung der L-Leucin-Oxidation Rückschlüsse auf die Oxidationsraten der beiden anderen verzweigtkettigen L-Aminosäuren und auf den gesamten metabolischen Fluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase zu ziehen. Dies gilt, wie die eigenen Befunde zeigen, jedoch sicher nicht für Stoffwechselsituationen, wie z. B. bei Ahornsirupkrankheit, in denen deutlich von der normalen Relation abweichende Konzentrationsverhältnisse der L-Aminosäuren vorliegen. Daher ist es bei der Beurteilung von Untersuchungsergebnissen zum Katabolismus der verzweigtkettigen L-Aminosäuren unerlässlich, die Konzentrationsrelation der verzweigtkettigen L-Aminosäuren im Plasma mit zu berücksichtigen.



## Teil IV

### Geradkettige Analoga als Alternativ-Substrate zur Untersuchung des metabolischen Flußes durch den verzweigt-kettige 2-Oxosäuren- Dehydrogenase-Komplex

Bisher liegen keine Befunde zum Stoffwechsel der Nor-Analoga verzweigt-kettiger L-Aminosäuren beim Menschen vor. In vitro Untersuchungen mit  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierten Substraten zeigen nun, daß in humanen Zellen L-Norleucin und L-Norvalin vergleichbar ihren natürlichen verzweigt-kettigen Analoga verstoffwechselt werden.

---



## Kapitel 7

# Übersicht über die bisherigen Befunde zum Stoffwechsel von Nor-Leucin und Nor-Valin bei Mammalia

**Zusammenfassung.** Als Vorbereitung für eine später geplante experimentelle Prüfung der Eignung von L-Norleucin und L-Norvalin als „metabolische Sonden“ für die Bestimmung des metabolischen Flußes durch den verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex in situ wurde eine ausführliche Literaturrecherche durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Analoga der verzweigt-kettigen Aminosäuren L-Norleucin und L-Norvalin bei verschiedenen Mammalia (einschließlich des Menschen) abgebaut werden können. Aufnahme in die Zellen und Abbau scheint rasch zu erfolgen. Die initialen Schritte des Katabolismus sind mit denen des Stoffwechsels der physiologischen verzweigt-kettigen L-Aminosäuren wohl identisch. Nach Transaminierung durch die verzweigt-kettigen Aminosäuren-Aminotransferase zu den korrespondierenden 2-Oxosäuren erfolgt deren oxidative Decarboxylierung spezifisch durch den verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-

Dehydrogenase-Komplex. Die Acyl-CoA-Verbindungen werden dann über die  $\beta$ -Oxidation weiter zu Propionyl-CoA und Acetyl-CoA abgebaut. Die renale Ausscheidung sowie die Bildung von 2-Hydroxysäuren dürfte für die in vivo Clearance von untergeordneter Bedeutung sein. Für L-Norleucin wurden bisher keine Nebenwirkungen oder toxische Effekte beschrieben. L-Norvalin hemmt einige Enzyme des Harnstoffzyklus kompetitiv. Jedoch müssen bei Untersuchungen an intakten Zellen, Organen und Versuchstieren sehr hohe Dosen eingesetzt werden, um meßbare Hemmeffekte zu erzielen. Bisher wurden jedoch weder bei akuter noch bei mehrwöchiger Behandlung von Versuchstieren toxische Wirkungen festgestellt.

Es kann angenommen werden, daß sich die beiden Nor-Analoga als „metabolische Sonden“ für die Bestimmung des in vivo Substratflußes durch den verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex in situ als geeignet erweisen werden.

## 7.1 Vorbemerkungen

Die Bestimmung des in vivo Ganzkörperflusses durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase (E.C. 1.2.4.4) beim Menschen erfolgt in der Regel anhand von Stoffwechsel-Umsatzmessungen mit stabil-Isotopen-markierten verzweigtkettigen L-Aminosäuren. Voraussetzung für diesen methodischen Ansatz mit natürlichen  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierten Substratvorläufern des Enzymkomplexes ist allerdings eine ausreichend stabile Stoffwechsellage. Patienten mit Ahornsirupkrankheit haben aufgrund der Erkrankung eine labilen Stoffwechsellage, so daß Umsatzmessungen mit verzweigtkettigen  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierten L-Aminosäuren, bedingt durch den schwierig abzuschätzenden Einfluß des Proteinmetabolismus und die erhebliche Isotopenverdünnung durch die auch zeitlich variablen Poolgrößen an Aminosäuren im Körper, hier erschwert sein können (*Thompson et al., 1989; Schadewaldt & Wendel, 1997; Schadewaldt et al., 1998*).

Eine Umgehung dieser Probleme könnte die Anwendung markierter Substratanaloga darstellen, die weder im Körper vorkommen noch am Proteinmetabolismus beteiligt sind. Vorbedingung für eine solche „metabolische Sonde“ ist, daß sie im Rahmen des Intermediärstoffwechsels spezifisch und mit ausreichend hoher Rate durch die verzweigtkettigen L-Aminosäuren-Aminotransferase (E.C. 2.6.1.42) und die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase in situ umgesetzt wird, daß die dabei entstehenden Stoffwechselprodukte weiter abgebaut werden können und keine toxischen Effekte auftreten.

Ein Analogon erster Wahl für gesunde Probanden ist L-Alloisoleucin, da diese nicht-proteinogene Aminosäure nur in vernachlässigbar geringen Spuren im Serum vorkommt, schnell katabolisiert wird und für L-Alloisoleucin keine toxischen Wirkungen nachgewiesen wurden (*Snyderman et al., 1964; Schadewaldt et al., 1991*). Patienten mit Ahornsirupkrankheit weisen jedoch alle einen mehr oder weniger deutlich erhöhten L-Alloisoleucin-

Konzentrationen im Plasma und relativ große Gesamtkörper-Pools auf. Obwohl diese L-Alloisoleucin-Pools verglichen mit denen der anderen verzweigtkettigen L-Aminosäuren wesentlich geringere Schwankungen aufweisen, bleibt das Problem der Verdünnung durch die Körper-Pools letztlich bestehen (s. *Schadewaldt & Wendel, 1989; Schadewaldt et al., 1990, 1991; Wendel et al., 1989*).

Als „metabolische Sonden“, die eine weitgehend störungsfreie Bestimmung des in vivo Ganzkörperflusses durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase ermöglichen sollten, kommen prinzipiell vor allem L-Norleucin und L-Norvalin in Betracht. Diese geradkettigen Analoga des L-Leucin bzw. des L-Valin konnten bisher bei Eukaryonten nicht nachgewiesen werden (*Weber & Miller, 1978; McClendon, 1987*).

Als Vorbereitung für eine später geplante experimentelle Prüfung von L-Norleucin oder L-Norvalin als „metabolische Sonden“ für die Bestimmung des in vivo Ganzkörperflusses durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase bei Normalpersonen und Patienten mit Ahornsirupkrankheit wurde, um Hinweise über Spezifität, Metabolismus und auch mögliche Toxizität der Nor-Analoga L-Norleucin und L-Norvalin zu erhalten, eine ausführliche Literaturrecherche durchgeführt. Die Recherche erfolgte vor allem anhand der Literaturverzeichnisse 'Medline' (ab 1966) und 'Index Medicus'. Dabei wurden in dieser Übersicht nur die bezüglich des Stoffwechsels von L-Norleucin und L-Norvalin wesentlichen Arbeiten berücksichtigt.

## 7.2 Zusammenstellung der Literaturbefunde

### 7.2.1 L-Norleucin (L-2-Aminohexanoat)

Erste, frühe Befunde zum Vorkommen von L-Norleucin in Proteinen aus Nervengewebe von Säugern (*Thudichum, 1884; Aberhalden & Weil, 1912*,

1913a,b; Czarnetzky & Schmidt, 1932), die eine Funktion dieses L-Leucin-Isomeren als proteinogene Aminosäure nahelegten, konnten später nicht bestätigt werden (Consdon *et al.*, 1945; Black & Kleiber, 1955). Zunächst wurde L-Norleucin auch bei Fütterungsversuchen zur Aufklärung der für die Ratte essentiellen Aminosäuren eingesetzt (Rose, 1931; McCoy *et al.*, 1935). Womack & Rose zeigten jedoch 1936 in einer eleganten Studie erstmals, daß L-Norleucin, im Gegensatz zu L-Leucin und L-Isoleucin, keine essentielle Nahrungskomponente darstellt.

Im Gegensatz zu Eukaryonten kann bei Prokaryonten (*E. coli*) L-Norleucin anstelle von L-Methionin in Proteine eingebaut werden (Lampen & Jones, 1947; Munier & Cohen, 1959; Cowie *et al.*, 1959; Barker & Bruton, 1979). Heute ist dies für die bakterielle Expression rekombinanter Säugerproteine von Bedeutung. Soweit bisher untersucht, führt der Einbau von L-Norleucin in Proteine, z.B. ACTH (Boissonas *et al.*, 1966), IL-2 (Tsai *et al.*, 1988), Rinder-Somatotropin (Bogosian *et al.*, 1989), IGF-1 (Forsberg *et al.*, 1990), CCK-8 (Schäfer *et al.*, 1994), M-CSF (Randhawa *et al.* 1994), jedoch nicht zu einer Einschränkung ihrer Bioaktivität.

Zum Metabolismus von L-Norleucin liegen nur fragmentarische Befunde vor. Die s.c. Applikation hoher bis sehr hoher Dosen ( $\geq$  oder  $\gg 1 \text{ g} \times \text{kg}^{-1}$ ) führte bei Phlorrizin-behandelten Hunden (ohne narkotische oder toxische Anzeichen) zu einer etwa äquivalent gesteigerten Glucosurie (Greenwald, 1916) und bei Norleucin-gefütterten Ratten zu einer, mit einer Isoleucin-Fütterung vergleichbar gesteigerten Glykogendeposition mit moderater Ketonurie (Butts *et al.*, 1937). Untersuchungen zum Metabolismus von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Norleucin in Rattenleberhomogenat legen nahe, daß die glucogene Wirkung letztlich auf dem Abbau zu Propionat (neben Acetat) beruht (Kinnory *et al.*, 1955). Bei einer vergleichenden *in vivo* Studie zum Abbau von  $^{14}\text{C}$ -markiertem DL-Leucin, DL-Norleucin und DL-Norvalin ( $450 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  i.p.) bei Ratten wurde innerhalb von 8 h  $< 5\%$  der applizierten Radioaktivitätsdosis im Urin ausgeschieden und 55, 69 bzw. 75 % als  $^{14}\text{CO}_2$  abgeatmet. Die maximale Rate der  $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung

wurde bei Leucin nach etwa 1 h, bei Norleucin und Norvalin nach 1.5-2 h erreicht (*ul Hassan & Greenberg, 1942*). Weitere relevante Befunde zu einzelnen enzymatischen Schritten im Katabolismus von L-Norleucin und L-Norvalin sind weiter unten (s. 7.2.3) zusammengefaßt.

Die von L-Norleucin abgeleitete 2-Oxosäure, nicht aber die Aminosäure selbst, stimuliert die Insulinfreisetzung isolierter Pankreasinseln der Ratte. Dieser Effekt erscheint unspezifisch, da andere von den verzweigt-kettigen L-Aminosäuren und ihren Analoga (einschließlich L-Norvalin) abgeleiteten 2-Oxosäuren vergleichbare Wirkungen haben (*Hutton et al., 1980; Sener et al., 1981, 1983; Sener & Malaisse, 1984; Lenzen et al., 1982, 1985*). Bezüglich Proteinmetabolismus und Wachstum liegen folgende Befunde vor: Der Proteinabbau in isolierten Rattenhepatocyten wurde durch hohe Konzentrationen verschiedener Leucin-Analoga ( $10 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ), einschließlich D- und L-Norleucin, gehemmt (*Grinde & Seglen, 1981*). Mehrtägige i.p. Applikation von L-Norleucin ( $0.13\text{-}1.3 \text{ g} \times \text{kg}^{-1} \times \text{d}^{-1}$ ) führte bei neugeborene Ratten zu einer moderaten Zunahme der Proteinkonzentration (und -synthese) im Skelettmuskel und der Leber und zu einer Verminderung der Proteinkonzentration nicht aber der Proteinsynthese im Dünndarm (*Schott et al., 1985*). Bei diesen in vivo Versuchen wurden bei einigen Gewebeamino-säuren moderate Veränderungen gefunden, die auch nach Abbau des L-Norleucin zumindest kurzfristig persistierten. Nach 10-tägiger Fütterung junger Ratten mit einer Leucin-armen und Norleucin-angereicherten Diät ( $0.27\text{-}1.15 \text{ g} \times \text{kg}^{-1} \times \text{d}^{-1}$ ) wurde von *Tews et al. (1991)* Leucin-ähnliche hemmende Effekte auf Futteraufnahme und Wachstum sowie eine verzweigt-kettige Aminosäuren-Imbalance, in stärkerer Ausprägung vor allem im Gehirn, beobachtet. Effekte auf Neurotransmitter-Konzentrationen wurden nicht festgestellt. Durch eine ausreichende Leucin(verzweigt-kettige L-Aminosäuren)-Versorgung konnten die Effekte niedriger Norleucin-Dosen vollständig, die hoher Dosen weitgehend verhindert werden. Bei einmaliger und mehrtägiger Fütterung einer Kombination mit anderen Aminosäure-Analoga (L-Norvalin, DL-2-Aminophenylacetat, DL-2-Amino-octanoat) wurden, bei entsprechender

Dosierung (ca.  $1 \text{ g} \times \text{kg}^{-1} \times \text{d}^{-1}$ ), ähnliche Wirkungen festgestellt (Tews & Harper, 1983, 1985; Tews et al., 1988, 1990).

Zu Nebenwirkungen wird mitgeteilt: „**These quantities** (L-Norleucin bzw. L-Norvalin  $450\text{-}500 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1} \text{ i.p.}$ ) **were well tolerated by the animals...**(Ratten).“ (ul Hassan & Greenberg, 1952) und „**there was no obvious evidence of norleucine toxicity** (ca.  $1 \text{ g} \times \text{kg}^{-1} \times \text{d}^{-1}$ ) **in our experimentes when rats were fed for 10 d with diets also containing suitable proportions of leucine and valine**“ (Tews et al., 1991).

### 7.2.2 L-Norvalin (L-2-Aminopentanoat)

Ersten vorläufigen Berichten über die Bedeutung von Norvalin als Bestandteil von Proteinen wie Globin (Aberhalden & Bahn, 1930) oder Casein (Aberhalden & Reich, 1930) folgte keine weitere Bestätigung. Aufgrund des heutigen Kenntnisstandes ist das Vorkommen dieser Aminosäure in Zellen unwahrscheinlich.

L-Norvalin wurde von Marshall & Cohen (1972) und Lusty et al. (1979) neben L-Leucin und einigen anderen Aminosäuren als kompetitiver Inhibitor der Ornithin-Transcarbamylase charakterisiert. Die  $K_i$  ( $50\text{-}100 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) liegt mindestens eine Zehnerpotenz niedriger als für andere Aminosäuren. Der inhibitorische Effekt ist nicht enzymspezifisch, da L-Norvalin mit ähnlicher Effektivität auch die Arginase und die Argininosuccinat-Synthetase hemmt (Lusty et al., 1979).

L-Norvalin wurde vor allem bei Untersuchungen zur Regulation des  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -stimulierten Harnstoffzyklus in isolierten Zellen (Rognstad, 1977, 1985; Grunnet & Katz, 1978; Wendler & Tremblay, 1980; Fico et al., 1984; Pausch et al., 1985; Meijer et al., 1985; Snodgrass & Linn, 1987), Mitochondrien (Wanders et al., 1985) und der isoliert-perfundierten Leber der Ratte (Saheki et

*al.*, 1979; Bode *et al.*, 1994) sowie bei permeabilisierten Zellen (Penverne *et al.*, 1994) und in vivo (Pausch *et al.*, 1977; Saheki *et al.*, 1979; Meijer *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1993) eingesetzt. Im allgemeinen wurden für signifikante Inhibitorwirkungen in vitro Konzentrationen  $> 2.5 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$  benötigt und in vivo eine Dosis zwischen 234 und 1785  $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$  i.p. verabreicht.

Bei Ratten scheint die hemmende Wirkung von L-Norvalin auf Nahrungsaufnahme und Wachstum deutlich geringer zu sein als die von L-Norleucin (s. o.). Die Effekte können durch erhöhten Leucingehalt des Futters vollständig verhindert werden (Anonymous, 1991).

Bis auf die bereits oben erwähnte Untersuchung von *ul Hassan & Greenberg* (1952) liegen keine weiteren speziellen Untersuchungen zum Metabolismus und zur renalen Clearance von Norvalin vor. Allerdings darf aus den in der Literatur enthaltenen Hinweisen zu Plasmakonzentrationen und Wirkungseintritt nach oraler (Schott *et al.*, 1985; Tews & Harper, 1985; Tews *et al.*, 1988) oder i.p. Applikation (Meijer *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1993) insgesamt vermutet werden, daß L-Norvalin, und ebenso L-Norleucin, zumindest bei der Ratte relativ schnell resorbiert und auch metabolisiert werden können. So war z. B. bei Ratten nach i.p. Gabe von 234  $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$  80 min später in der Leber kein L-Norvalin mehr nachweisbar (Saheki *et al.*, 1979).

### 7.2.3 Zellulärer Transport, Transaminierung und Decarboxylierung

Für den Einsatz C1-markierten L-Norleucins oder L-Norvalins als „Stoffwechselsonden“ zur Bestimmung des Substratflusses durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase sind carriervermittelter Transport über die Plasma- und die innere Mitochondrienmembran, reversible Transaminierung und irreversible oxidative Decarboxylierung die entscheidenden zellulären Reaktionsschritte. Die dazu in der Literatur verfügbaren Informationen sind im folgenden zusammengestellt.

Spezielle Untersuchungen zum Transport wurden nicht durchgeführt. Wettbewerbsstudien *in vivo* und *in vitro* legen jedoch - in Verbindung mit den oben zitierten Arbeiten zur Resorption - nahe, daß diese Aminosäuren sowohl vom Na<sup>+</sup>-abhängigen A- wie vom L-System effektiv transportiert werden können (Oxender & Christensen, 1963; Daniels *et al.*, 1969; Oxender *et al.*, 1977; Tews & Harper, 1983; Chiles & Kilberg, 1986; Tews *et al.*, 1988; Tovar *et al.*, 1988). Der Transport über die innere Mitochondrienmembran stellt ein spezielles und bisher wenig untersuchtes Phänomen dar, da kürzlich gezeigt wurde, daß, zumindest in extrahepatischen Geweben der Ratte, der vermutete und rekonstituierte mitochondriale Carrier für verzweigtkettige 2-Oxosäuren (Hutson & Rannels, 1985; Hutson *et al.*, 1990) mit der verzweigtkettigen L-Aminosäuren-Aminotransferase identisch ist (Hutson & Hall, 1993).

Die Enzymaktivität der verzweigtkettigen L-Aminosäuren-Aminotransferase ist vorwiegend in extrahepatischen Geweben vorhanden und dort weitgehend oder vollständig mitochondrial lokalisiert (Schadewaldt *et al.*, 1995; Suryawan *et al.*, 1998). Wie bereits erwähnt, hat das mitochondriale Enzym des Rattenherzens und wahrscheinlich auch anderer Gewebe gleichzeitig die Funktion eines 2-Oxosäuretransporters (Hutson & Hall, 1993). Die Substratspezifität ist relativ breit. Neben den verzweigtkettigen L-Aminosäuren und ihren 2-Oxosäuren sowie den entsprechenden unverzweigten Analoga (L-Norleucin und L-Norvalin und deren 2-Oxosäuren) werden bevorzugt Glutamat und 2-Oxoglutarat als Aminogruppendonatoren bzw. -akzeptoren gebunden und umgesetzt. Die Aktivität gegenüber anderen Aminosäuresubstraten ist deutlich geringer oder nicht vorhanden (Übersicht bei Schadewaldt *et al.*, 1995).

*In vivo* dürfte die Bildung der 2-Oxosäuren aus L-Norleucin und L-Norvalin spezifisch durch die verzweigtkettigen L-Aminosäuren-Aminotransferase erfolgen. Andere Aminotransferasen wie Alanin (E.C. 2.6.1.2)- oder Aspartat-Aminotransferase (E.C. 2.6.1.1) oder die Glutamat-Dehydrogenase (E.C. 1.4.1.2), die vor allem in der Leber in hohen Aktivitäten vorkommen, setzen diese Aminosäuren unter physiologischen Bedingungen entweder nicht

(Alanin-Aminotransferase) oder mit vernachlässigbarer Geschwindigkeit (Alanin-Aminotransferase, Glutamat-Dehydrogenase) um (*Struck & Sizer, 1960; Barman, 1969a,b,c; Hornby & Engel, 1983*).

Ähnlich wie die Transaminase weist auch der mitochondriale verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex, dessen Gesamtaktivität beim Menschen vor allem in Niere (ca. 10 % der Gesamtaktivität des Organismus), Leber (ca. 20 %) und Skelettmuskulatur (ca. 60 %) lokalisiert sein soll (*Danner et al., 1975; Khatra et al., 1977; Wagenmakers et al., 1989; van Hall et al., 1995; Rush et al., 1995; Tessari et al., 1996; Bowtell et al., 1998; Suryawan et al., 1998*), eine relativ breite Substratspezifität gegenüber kurzkettigen 2-Oxosäuren (C3-C6) mit verzweigten und unverzweigten aliphatischen (auch S-haltiger) Resten auf. Mit steigender Kettenlänge des Substrats nehmen die Michaeliskonstanten ab und die Umsatzraten steigen an. Die Decarboxylierungsaktivität ist gegenüber Pyruvat sehr gering, steigt bei 2-Oxobutyrat und 4-Methylthio-2-oxobutyrat an und ist gegenüber den verzweigtkettigen 2-Oxosäuren (C5-C6) maximal (*Conelly et al., 1968; Parker & Randle, 1978a,b; Pettit et al., 1978; Ono et al., 1987; Paxton, 1988*). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß bei Inkubationen von isolierten Pankreasinseln und Leberschnitten von *ob/ob*-Mäusen mit den  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierten 2-Oxosäuren von L-Leucin und L-Norleucin vergleichbare Decarboxylierungsraten gemessen wurden (*Lenzen et al., 1982*). Letztlich steht jedoch eine mit den oben genannten Substraten vergleichbar eingehende Charakterisierung der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Aktivität gegenüber den 2-Oxosäuren von L-Norleucin und L-Norvalin noch aus. Von den beiden anderen mitochondrialen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexen, der Pyruvat-Dehydrogenase (E.C. 1.2.4.1) und der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (E.C. 1.2.4.2), werden diese beiden 2-Oxosäuren aufgrund ihrer unpolaren Natur und der Kettenlänge nicht umgesetzt (*Pettit & Reed, 1982; Jones & Yeaman, 1986; Paxton et al., 1986; Paxton & Sievert, 1991*).

### 7.3 Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse einer ausführlichen Literaturrecherche zeigen, daß die Analoga der verzweigtkettigen L-Aminosäuren L-Norleucin und L-Norvalin bei verschiedenen Mammalia wie Ratte, Maus, Hund und Rind, und auch beim Menschen abgebaut werden können. Aufnahme in die Zellen und Abbau scheint insgesamt relativ rasch zu erfolgen. Unter physiologischen Bedingungen sind die initialen Schritte des Katabolismus mit denen des Stoffwechsels der physiologischen verzweigtkettigen L-Aminosäuren wohl identisch. Nach Transaminierung durch die verzweigtkettigen L-Aminosäuren-Aminotransferase zu den korrespondierenden 2-Oxosäuren erfolgt deren oxidative Decarboxylierung, wahrscheinlich spezifisch durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase, zu den Acyl-CoA-Verbindungen. Diese werden über die Schritte der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren weiter zu Propionyl-CoA und Acetyl-CoA, normalen Metaboliten des Intermediärstoffwechsels weiter abgebaut. Die renale Ausscheidung sowie die Bildung von 2-Hydroxysäuren dürfte für die in vivo-Clearance der Analoga der verzweigtkettigen L-Aminosäuren von untergeordneter Bedeutung sein.

Für L-Norleucin wurden bisher keine Nebenwirkungen oder toxische Effekte beschrieben. L-Norvalin ist für einige Enzyme des Harnstoffzyklus ein kompetitiver Inhibitor. Im Gegensatz zu den gereinigten Enzymen müssen jedoch bei Untersuchungen an intakten Zellen oder Organen hohe Konzentrationen in vitro eingesetzt bzw. sehr hohe Dosen am Ganztier in vivo appliziert werden, um bei gleichzeitiger Stimulation der Harnstoffsynthese, deutlich meßbarer Hemmeffekte erzielen zu können. Bisher ergaben sich jedoch weder bei akuter noch bei mehrwöchiger Behandlung von Versuchstieren Hinweise auf toxische Wirkungen.

Unter Berücksichtigung aller verfügbaren Informationen kann angenommen werden, daß sich diese beiden Analoga der verzweigtkettigen L-Aminosäuren als „metabolische Sonden“ für die Bestimmung des in vivo-Substratflusses

durch den verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex auch beim Menschen als geeignet erweisen werden.



## Kapitel 8

# Transaminierung und oxidative Decarboxylierung der Nor-Analoga verzweigtkettiger L-Aminosäuren in humanen Hautfibroblasten

**Zusammenfassung.** Bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit ist die Untersuchung des metabolischen Flußes durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase unter Anwendung natürlicher  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierter verzweigtkettiger L-Aminosäuren aufgrund variabler und instabiler Poolgrößen dieser Metabolite und der daraus resultierenden unterschiedlichen Isotopenverdünnung erschwert. Prinzipiell könnten die nicht-proteinogenen und nicht-physiologischen Nor-Analoga der verzweigtkettigen L-Aminosäuren eine alternative Substanzgruppe für solche *in vivo* Umsatzmessungen darstellen. Da bisher keine Befunde zum Metabolismus der Nor-Analoga beim Menschen vorliegen, wurde der Katabolismus  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierter verzweigtkettiger L-Aminosäuren und ihrer Nor-Analoga *in vitro* vergleichend untersucht.

In kultivierten Hautfibroblasten von Normalpersonen betragen unter Substratsättigungsbedingungen die Rate der Transaminierung und der oxidativen Decarboxylierung von L-Leucin (L-Valin)  $65 \pm 23$  ( $34 \pm 13$ ) und  $6 \pm 3$  ( $7 \pm 4$ )  $\text{nmol} \times 90 \text{ min}^{-1} \times (\text{mg Zellprotein})^{-1}$  ( $n = 12$  bis  $16$ ). Mit den Nor-Analoga

waren die Raten etwa halb so hoch. In Fibroblasten von Patienten mit Ahornsirupkrankheit entsprachen die Transaminierungsraten den Kontrollwerten. Dagegen war bei schwerer varianter Ahornsirupkrankheit die oxidative Decarboxylierung von L-Leucin (L-Valin) gegenüber der Norm um  $96 \pm 4\%$  ( $99 \pm 1\%$ ) reduziert. Bei varianter Ahornsirupkrankheit betrug die Reduktion  $81 \pm 7\%$  ( $84 \pm 2\%$ ), bei einer milden Variante  $63 \pm 21\%$  ( $63 \pm 14\%$ ) (jeweils  $n = 3 - 4$ ). Bei allen drei Zelllinien war die Verminderung der oxidativen Decarboxylierung der Nor-Analoga mit der der natürlichen verzweigtkettigen Substrate vergleichbar.

Die Ergebnisse zeigen erstmals, daß L-Norleucin und L-Norvalin in menschlichen Zellen vergleichbar ihren natürlichen Analoga verstoffwechselt und spezifisch durch die verzweigtkettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase oxidativ decarboxyliert werden. Ob diese Verbindungen auch als 'metabolische Sonden' zur Bestimmung des Schweregrades bei Ahornsirupkrankheit geeignet sind, muß nun in *in vivo* Stoffwechseluntersuchungen geprüft werden.

## 8.1 Einleitung

Bei Ahornsirupkrankheit ist der oxidative Abbau der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren auf der Stufe des mitochondrialen verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes (E.C. 1.2.4.4) gestört (Chuang & Shih, 1995). Bei den Patienten findet sich allerdings insgesamt keine befriedigende Korrelation zwischen klinischem Schweregrad, der Leucin-Toleranz und der Restaktivität des 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes in kultivierten Zellen (Chuang & Shih, 1995; Schadewaldt & Wendel, 1997).

Die bisherigen Ansätze zur experimentellen Erfassung des *in vivo* Schweregrades der Erkrankung beruhen auf der Bestimmung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation in Stoffwechselumsatzmessungen mit  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertem L-Leucin als Substrat. Solche Untersuchungen wurden (mit Ausnahme der in Kapitel 3 dargestellten eigenen Untersuchungen) ausschließlich an Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit durchgeführt. Dabei ergaben sich teilweise diskrepante Ergebnisse. Von einer Londoner Arbeitsgruppe wurde in vier Publikationen von insgesamt 16 Untersuchungen an Patienten mit klassischer Form der Erkrankung berichtet, die eine entsprechend reduzierte Leucintoleranz und eine residuale *in vitro* Enzymaktivität von  $< 2\%$  der Norm aufwiesen. In acht dieser Untersuchungen war mit dem primed continuous infusion-Ansatz keine L-Leucinoxidation nachweisbar. Dagegen wurden in acht Fällen erstaunlich hohe L-Leucinoxidationsraten gefunden, die zwischen 5 und  $> 40\%$  der Norm lagen (Collins *et al.*, 1987; Thompson *et al.*, 1990a; Thompson *et al.*, 1990b; Thompson *et al.*, 1991). Unsere Arbeitsgruppe hat mit dem oralen L-[ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustest, einem Verfahren mit vergleichbarer Sensitivität (Schadewaldt *et al.*, 1998), bisher bei 10 Patienten mit klassischer Form der Erkrankung die Ganzkörper-L-Leucinoxidation untersucht. Bei keinem dieser Patienten konnte eine meßbar Ganzkörper-L-Leucinoxidation festgestellt werden.

Bei den *in vivo* Umsatzmessung wird die Erfassung der L-Leucinoxidationsrate vor allem durch zwei Störgrößen beeinflusst. Einerseits nimmt L-Leucin am Proteinstoffwechsel teil. Die proteinogene Komponente des Aminosäurestoffwechsels spielt jedoch während des Testzeitraumes eine erhebliche Rolle (*Bier, 1989*). Zum anderen haben die Patienten mit Ahornsirupkrankheit im Vergleich zu Normalpersonen vergrößerte und zusätzlich variable verzweigtkettige L-Aminosäure- bzw. verzweigtkettigen 2-Oxosäure-Pools, die über variable Isotopenverdünnung letztlich die  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation wesentlich beeinflussen können (*Schadewaldt & Wendel, 1997; Schadewaldt et al., 1998*).

Eine für Untersuchung an Normalpersonen besser geeignetes Substrat könnte die verzweigtkettige L-Aminosäure L-Alloisoleucin darstellen, da sie nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden ist, nicht-proteinogen ist und rasch verstoffwechselt wird (*Schadewaldt et al., 1990, 1991*). Für quantitative *in vivo* Stoffwechseluntersuchungen an Patienten mit Ahornsirupkrankheit ist diese Substanz letztlich jedoch nicht geeignet, da diese Patienten im Vergleich zu Normalpersonen auch deutlich vergrößerte L-Alloisoleucin-Pools aufweisen (*Wendel et al., 1989; Schadewaldt et al., 1999*).

Prinzipiell könnten die nicht-proteinogenen und nicht-physiologischen Nor-Analoga der verzweigtkettigen L-Aminosäuren besser geeignete Substanzen zur Bestimmung der Aktivität der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase *in vivo* darstellen. Bei Verwendung dieser geradkettigen Aminosäuren würden die beiden zuvor genannten Einflußgrößen - die Teilnahme am Proteinstoffwechsel und die Variabilität der Substratpools - ausgeschaltet oder zumindest minimiert werden. Mit dieser Art von „metabolischer Sonde“ sollte dann eine weitgehend störungsfreie Bestimmung des Substratflusses durch den verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes *in vivo* bei Patienten mit unterschiedlich schwerer Form der Ahornsirupkrankheit möglich sein.

Da bisher keine Befunde zum Metabolismus der Nor-Analoga beim Menschen vorliegen (Literaturübersicht s. Kapitel 7), wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Untersuchungen an kultivierten humanen Hautfibroblasten von Normalpersonen mit dem Ziel durchgeführt, zu prüfen, ob und in welchem Maße die Nor-Analoga L-Norleucin und L-Norvalin im Vergleich zu ihren natürlichen verzweigtkettigen L-Aminosäuren verstoffwechselt werden. Anschließend wurde an Fibroblasten von Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad der Ahornsirupkrankheit untersucht, ob die Aktivität des genetisch veränderten Enzyms gegenüber den Nor-Analoga und den natürlichen Aminosäuren gleichmäßig reduziert ist.

## 8.2 Material und Methoden

### 8.2.1 Material

#### Chemikalien und Biochemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt), Sigma Chemie (München) oder Boehringer (Mannheim) bezogen. Katalase (EC 1.11.1.6; aus Rinderleber) und D-Aminosäureoxidase (EC 1.4.3.3; aus Schweinenieren) sowie NADH (Dinatrium-Salz) stammten von Boehringer (Mannheim). L-Aminosäureoxidase (EC 1.4.3.2; aus Schlangengift von *Crotalus durissus*), L-Leucin-Dehydrogenase (EC 1.4.1.9 aus *Bacillus spec.*, gelöst in Kaliumphosphat-Puffer  $0.1 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ , pH 7.4, mit 50% Glycerol, v:v) wurde von Sigma bezogen. Dowex 50 WX8 (100 - 200 mesh,  $\text{H}^+$ -Form) stammte von Serva (Heidelberg).

#### Radiochemikalien

L-[1- $^{14}\text{C}$ ]Leucin ( $2.1 \text{ GBq} \times \text{mmol}^{-1}$ ) und L-[1- $^{14}\text{C}$ ]Valin ( $2.0 \text{ GBq} \times \text{mmol}^{-1}$ ) stammten von Biotrend (Köln). Die Bestimmung der Aminosäuren- und Radioaktivitäts-Reinheit erfolgte mittels automatischer Aminosäureanalyse (in Läufen mit bzw. ohne Ninhydrin; s. 2.2.3.2) und entsprachen den

Spezifikationen des Herstellers. L-[1-<sup>14</sup>C]Alanin (2.1 GBq x mmol<sup>-1</sup>) und K<sup>14</sup>CN (2.2 GBq x mmol<sup>-1</sup>) stammte von DuPont (Bad Homburg). L-[1-<sup>14</sup>C]Norleucin und L-[1-<sup>14</sup>C]Norvalin waren nicht kommerziell erhältlich und wurden synthetisiert (s. 8.2.2).

## 8.2.2 Methoden

### 8.2.2.1 Synthese von <sup>14</sup>C-markierten L-Aminosäuren

#### Methodik

Für die Synthese von L-[1-<sup>14</sup>C]Norleucin und L-[1-<sup>14</sup>C]Norvalin wurde die modifizierte Strecker-Synthese verwendet. Ausgehend vom nächst niederen Aldehyd wurde über das Hydrogensulfitadditionsprodukt (*Bucherer & Lieb, 1934*) durch Umsetzung mit K<sup>14</sup>CN und (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> das Hydantoin (*Bucherer & Steiner, 1934*) synthetisiert und nach saurer Hydrolyse die racemische DL-Aminosäure erhalten. Diese wurden durch gleichzeitige Behandlung mit D- und L-Aminosäureoxidase unter Zusatz von Katalase in die korrespondierende 2-Oxosäure umgesetzt. Die enzymatische Reaktion verlief quantitativ. Durch nachfolgende enantioselektive reduktive Aminierung mit L-Leucin-Dehydrogenase wurde die L-Aminosäure erhalten.

#### Synthesen

In den folgenden Abschnitten werden die Syntheseschritte am Beispiel des L-[1-<sup>14</sup>C]Norleucins beschrieben. Angaben zur Ausbeute beziehen sich auf die Synthese von a) L-[1-<sup>14</sup>C]Norleucin und b) L-[1-<sup>14</sup>C]Norvalin.

#### Synthese des Hydrogensulfitadditionsproduktes

0.18 mol Valerianaldehyd wurde unter Rühren zu 80 ml im Eisbad gekühlter NaHSO<sub>3</sub>-Lösung (39%, w:w) getropft. Hierbei fiel das Valerian-Hydrogensulfitadditionsprodukt als farbloser Niederschlag aus. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit jeweils 100 ml Diethylether dreimal gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute:

- a) 0.12 mol Valerianaldehyd-Hydrogensulfitadditionsprodukt
- b) 0.11 mol Butyraldehyd-Hydrogensulfitadditionsprodukt

#### Synthese des Hydantoins

In ein Hydrolyserohr mit Seitenansatz wurden unter Eiskühlung nacheinander 0.42 mmol Valerian-Hydrogensulfitadditionsprodukt, 0.92 mmol  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 0.22 mmol KCN, 500  $\mu\text{l}$  wäßrige  $\text{K}^{14}\text{CN}$ -Lösung (11.6 MBq, 6.8  $\mu\text{mol}$ ), 1.5 ml Ethanol und 1.5 ml Wasser zugesetzt. Abweichend von den üblichen Synthesevorschriften wurde hier KCN/ $\text{K}^{14}\text{CN}$  bewußt im Unterschuß eingesetzt. Der Ansatz wurde 6 Stunden bei 45 °C im Wasserbad gerührt. Danach wurde zur Zersetzung des überschüssigen  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  die Temperatur für 1.5 Stunden auf 80 °C erhöht. Nach dem Abkühlen wurden 3.0 ml konzentrierte HCl zugetropft, so daß eine ca. 6 molare Lösung vorlag. Danach wurde der Ansatz evakuiert und 24 Stunden bei 110 °C hydrolysiert. Der Ansatz wurde am Rotationsverdampfer bis fast zur Trockne eingeeengt und mit 5 ml HCl (0.1 mol  $\times$   $\text{l}^{-1}$ ) aufgenommen. Zur Trennung von DL-Norleucin und nicht-hydrolysiertem Hydantoin wurde der Ansatz auf eine Dowex 50 WX8-Säule (100 - 200 mesh,  $\text{H}^+$ -Form, 4 ml) aufgetragen. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen, bis keine Radioaktivität im Eluat mehr detektierbar war. Dann wurde die DL-Aminosäure mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  (2.5 mol  $\times$   $\text{l}^{-1}$ ) eluiert und das Eluat in 0.5 ml-Fractionen gesammelt. Die Fractionen, die radioaktiv markiertes Material enthielten, wurden vereinigt und zur Trockne eingedampft. Das Produkt wurde durch Aminosäureanalyse charakterisiert.

Ausbeute:

- a) 141  $\mu\text{mol}$  DL-[1- $^{14}\text{C}$ ]Norleucin, 7.2 MBq (62 %, bezogen auf eingesetztes  $\text{K}^{14}\text{CN}$ )
- b) 77  $\mu\text{mol}$  DL-[1- $^{14}\text{C}$ ]Norvalin, 3.9 MBq (34 %, bezogen auf eingesetztes  $\text{K}^{14}\text{CN}$ )

Enzymatische Umsetzung von DL-[1-<sup>14</sup>C]Norleucin zum L-[1-<sup>14</sup>C]Norleucin

Der Aminosäure-haltige Rückstand wurde in Tris/HCl-Puffer (0.1 mol x l<sup>-1</sup>, pH 8.0, 1.8 ml) aufgenommen und mit Katalase-Suspension (260 mmol x min<sup>-1</sup> x ml<sup>-1</sup>, 200 µl), D-Aminosäureoxidase-Suspension (15 µmol x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup>, 200 µl) und L-Aminosäureoxidase-Suspension (7 µmol x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup>, 200 µl) versetzt. Der Ansatz wurde, mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) äquibriert, bei 37 °C inkubiert. Nach ca. 3 Stunden waren mindestens 99.8 % der Aminosäure enzymatisch umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5-Sulphosalicylsäure (60 %, w:v, 120 µl) gestoppt und das ausgefällte Protein durch Zentrifugation entfernt (10 Minuten, 4 °C, 10 000 x g). Der Überstand (2.6 ml) enthielt die 2-Oxosäure und wurde durch Zusatz von NH<sub>4</sub>OH (2.5 mol x l<sup>-1</sup>, 340 µl) neutralisiert und mit NH<sub>4</sub>OH/NH<sub>4</sub>Cl-Puffer (5 mol x l<sup>-1</sup>, pH 8.3, 530 µl) versetzt. Für die Präparation der korrespondierenden L-Aminosäure wurde NADH (Dinatrium-Salz, 150 mg) und L-Leucin-Dehydrogenase-Lösung (12.5 mmol x min x l<sup>-1</sup>, 100 µl) zugesetzt. Der Ansatz wurde 10 Stunden bei 37 °C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von HCl (2 mol x l<sup>-1</sup>) gestoppt und auf pH 1 eingestellt. Zur Trennung der L-Aminosäure und der nicht-umgesetzten 2-Oxosäure wurde der Ansatz auf eine Dowex 50 WX8-Säule (100 - 200 mesh, H<sup>+</sup>-Form, 15 ml) aufgetragen. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen, bis keine Radioaktivität im Eluat mehr detektierbar war. Die L-Aminosäure wurde mit NH<sub>4</sub>OH (2.5 mol x l<sup>-1</sup>, 0.5 ml x min<sup>-1</sup>) eluiert und in 2 ml-Fractionen gesammelt. Die radioaktiv markiertes Material enthaltenden Fractionen wurden vereinigt und zur Trockne eingedampft.

Zur weiteren Aufreinigung wurde der Rückstand in H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0.2 mol x l<sup>-1</sup>, 3 ml) aufgenommen und auf eine DC-6A-Kationenaustauscher-Säule (Durrum, Paolo Alto; 20 x 0.6 cm) aufgetragen. Die Elution erfolgte bei 50 °C mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (0.1 mol x l<sup>-1</sup>, pH 3.3, 0.5 ml x min<sup>-1</sup>). Das Eluat wurde in 0.5 ml-Fractionen gesammelt, die L-[<sup>14</sup>C]Norleucin enthaltenden Fractionen wurde mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung detektiert, vereinigt und mit HCl (2 mol x l<sup>-1</sup>) auf pH 1 eingestellt. Zur Entsalzung wurde die Lösung auf eine Dowex 50 WX8-Säule (100 - 200 mesh, H<sup>+</sup>-Form, 1 ml) aufgetragen. Dann wurde mit 5 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O gewaschen und das Präparat wie oben mit

NH<sub>4</sub>OH (2.5 mol x l<sup>-1</sup>, 0.5 ml x min<sup>-1</sup>) eluiert. Das Eluat (2 ml) wurde mit 100 µl NaOH (2 mol x l<sup>-1</sup>) versetzt, zur Trockne eingedampft, mit 1 ml Wasser aufgenommen und durch Zusatz von HCl (2 mol x l<sup>-1</sup>) auf pH 7 eingestellt. Diese Aminosäure-Lösung wurde für die Versuche verwendet.

Ausbeute:

- a) 133 µmol L-[1-<sup>14</sup>C]Norleucin, 5.2 MBq (72 %, bezogen auf eingesetztes radioaktiv markiertes Material)
- b) 63 µmol L-[1-<sup>14</sup>C]Norvalin, 2.8 MBq (72%, bezogen auf eingesetztes radioaktiv markiertes Material)

#### Reinheitsprüfungen

Die chemische und radiochemische Reinheit der synthetisierten L-[1-<sup>14</sup>C]Aminosäuren wurde mittels automatischer Aminosäureanalyse (in Läufen mit und ohne Ninhydrin; s. 2.2.3.2) bestimmt. Die Präparate waren frei von anderen Aminosäuren (L-[1-<sup>14</sup>C]Norleucin: andere Aminosäuren < 1 %; L-[1-<sup>14</sup>C]Norvalin: andere Aminosäuren < 2 %) und von hoher radiochemischer Reinheit (L-[1-<sup>14</sup>C]Norleucin > 98 %; L-[1-<sup>14</sup>C]Norvalin > 96 %). Die Bestimmung der Enantiomerenreinheit erfolgte nach Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phthalaldehyd mittels reversed phase HPLC und Komplexbildung mit Cu(II)-L-Prolin und fluorimetrischer Detektion nach *Lam (1986)*. Die synthetisierten Präparate waren enantiomerenrein (L-[1-<sup>14</sup>C]Norleucin, 99.9 %; L-[1-<sup>14</sup>C]Norvalin, 99.7 %).

Die spezifischen Radioaktivitäten von L-[1-<sup>14</sup>C]Norleucin und L-[1-<sup>14</sup>C]Norvalin betragen 39 MBq x mmol<sup>-1</sup> bzw. 44 MBq x mmol<sup>-1</sup>.

#### 8.2.2.2 Bestimmung von Stoffwechselraten *in vitro*

Humane Hautfibroblasten wurde wie in *Wendel et al. (1975)* kultiviert. Tests auf Mycoplasmen-Kontamination waren negativ (Mycoplasma PCR ELISA; Boehringer, Mannheim). Für die Inkubationsversuche (Endvolumen 1 ml) wurden die Zellen (0.5 - 1.0 x 10<sup>6</sup> Zellen), soweit nicht anders angegeben, bei einer Sättigungskonzentration von 1 mmol L-Amino[1-<sup>14</sup>C]säure x l<sup>-1</sup> 90 Minuten

bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der Transaminierungs- und oxidativen Decarboxylierungsraten der L-Amino[1-<sup>14</sup>C]säuren im Inkubationsansatz erfolgten nach *Schadewaldt & Wendel (1987)* (vgl. Kapitel 6). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach *Bradford (1976)* mit Rinderserumalbumin als Standard.

### 8.2.2.3 Cytotoxizitätsprüfung

Zur Prüfung der cytotoxischen Wirkung von L-Norleucin und L-Norvalin auf menschliche Zellen, wurden Kulturen konfluenten humaner Hautfibroblasten derselben Zelllinie (und Passage) verwendet. Dem Standardmedium wurde L-Norleucin bzw. L-Norvalin (je 5 mmol x l<sup>-1</sup>) zugesetzt und die Zellen 8 Tage inkubiert (unter Standardkulturbedingungen). Zur Kontrolle wurden Kulturen mit Medium ohne Zusatz weiterer L-Aminosäuren, bzw. mit Medium, dem L-Leucin bzw. L-Valin (je 5 mmol x l<sup>-1</sup>) zugesetzt wurde, parallel inkubiert. Die Prüfung auf Zellschädigung erfolgte zunächst durch tägliche lichtmikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie. Am Ende der Inkubationsphase wurde als Cytotoxizitätsmarker die Freisetzung von L-Laktat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.28) in das Kulturmedium bestimmt (*Kirkland et al., 1990*). Die Messung der L-Laktat-Dehydrogenase-Aktivität im Kulturüberstand erfolgte spektrophotometrisch nach einem modifizierten Ansatz nach *Beutler (1975)*. Der Ansatz (1 ml) enthielt Pyruvat (0.5 mmol x l<sup>-1</sup>), NADH (0.2 mmol x l<sup>-1</sup>), Imidazol/HCl-Puffer (pH 7.8, 50 mmol x l<sup>-1</sup>) und 0.1 ml Probe

### 8.2.3 Auswertung und Statistik

Die Stoffwechselraten wurden anhand der zugehörigen <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung auf der Basis der spezifischen Radioaktivität des C1-Atoms der entsprechenden L-Amino[1-<sup>14</sup>C]säure berechnet. Die Transaminierungsrate ergab sich als Summe der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung und der 2-Oxo[1-<sup>14</sup>C]säure-Akkumulation.

Im allgemeinen sind die Ergebnisse im Text und in Tabellen als Mittelwerte (MW) ± SD, in Abbildungen als Mittelwerte ± SEM angegeben.

## 8.3 Ergebnisse

### Cytotoxizitätsprüfung

Bei Inkubation konfluenter Kulturen humaner Hautfibroblasten mit hohen Konzentrationen von L-Norleucin bzw. L-Norvalin (je  $5 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) konnte über eine Expositionsdauer von 8 Tagen keine lichtmikroskopisch sichtbare morphologischen Veränderung der Zellstruktur festgestellt werden. Die Morphologie der Zellen entsprach derjenigen von parallel inkubierten Fibroblasten der gleichen Zelllinie und Passage, die mit Aminosäure-Zusatz-freiem Medium als Kontrolle mitgeführt wurden (Abb. 1). Weder bei Kontrollen, noch bei den unter Zusatz der Nor-Analoga inkubierten Zellen war am Ende der 8tägigen Expositionsperiode eine Freisetzung von L-Laktat-Dehydrogenase in das Kulturmedium (Cytotoxizitätsmarker; *Kirkland et al., 1990*) meßbar.

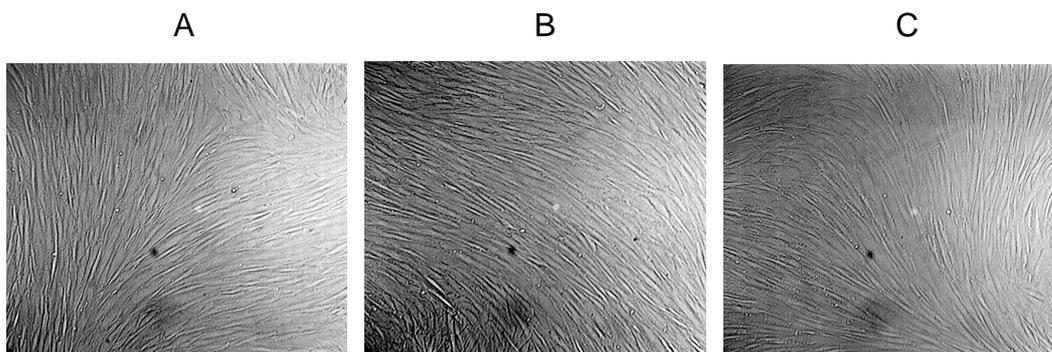


Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme (100 x) von Kulturen konfluenter humaner Hautfibroblasten nach 8tägiger Inkubation mit Standardmedium (A). Bei B war dem Medium zusätzlich L-Norleucin ( $5 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ), bei C zusätzlich L-Norvalin ( $5 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) zugesetzt.

### Katabolismus von L-Norleucin und L-Norvalin in Kontroll-Fibroblasten

Zunächst wurde die Konzentrationsabhängigkeit des oxidativen Abbaus von L-Norleucin und L-Norvalin untersucht. Dazu wurden kultivierte Hautfibroblasten einer gesunden Person mit steigenden Konzentrationen der  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierten Nor-Analoga inkubiert und die oxidative Decarboxylierung der Aminosäuren anhand der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt. Die Raten der oxidativen Decarboxylierung nahmen mit steigender

Substratkonzentration zu, bis bei einer Konzentration von etwa  $1 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$  Sättigungsbedingungen erreicht wurden. Diese Konzentrationsabhängigkeit entsprach weitgehend der der natürlichen verzweigtkettigen Substrate L-Leucin und L-Valin (*Schadewaldt & Wendel, 1987*). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die folgenden *in vitro* Experimente als Substrat-sättigungskonzentration eine Aminosäurekonzentration von  $1 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$  gewählt.

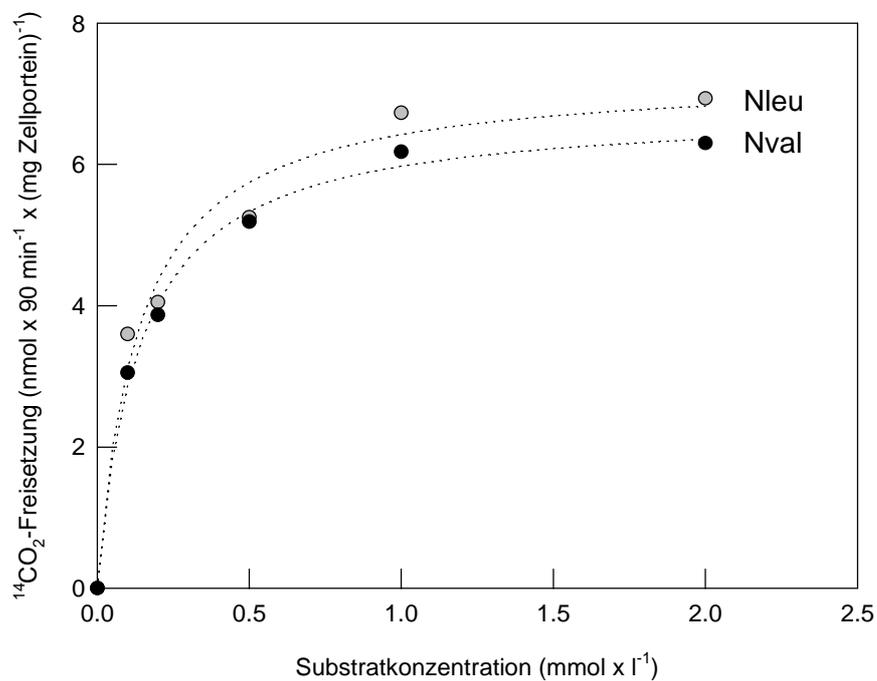


Abb. 2: Konzentrationsabhängigkeit der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung aus  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierten L-Norleucin (Nleu) und L-Norvalin (Nval) in Inkubationen kultivierter humaner Hautfibroblasten (90 Minuten,  $37^\circ\text{C}$ ). Dargestellt sind Ergebnisse eines Einzelexperimentes. Jeder Ansatz enthielt  $16.7 \text{ kBq } ^{14}\text{C}$ -markiertes Substrat, die Konzentrationen variierten von  $0.1 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$  ( $167 \text{ Bq} \times \text{nmol}^{-1}$ ) bis  $2.0 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$  ( $8.4 \text{ Bq} \times \text{nmol}^{-1}$ ).

In Inkubationsversuchen mit einer größeren Zahl von Zelllinien wurde der Katabolismus der Nor-Analoga quantifiziert. Die Transaminierungs- und oxidativen Decarboxylierungsraten der L-Aminosäuren wurden unter Standardbedingungen (Inkubation mit  $1 \text{ mmol } ^{14}\text{C}$ -markiertem Substrat  $\times \text{l}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$  90 Min.) bestimmt. Die natürlichen Aminosäure-Substrate wurden in diesen Versuchen zum Vergleich miteingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3

dargestellt. In Fibroblasten von Normalpersonen betragen die Transaminierungsraten von L-Leucin und L-Norleucin  $64.6 \pm 23.3$  und  $27.3 \pm 13.2$   $\text{nmol} \times 90 \text{ min}^{-1} \times (\text{mg Zellprotein})^{-1}$ , von L-Valin und L-Norvalin  $34.4 \pm 13.0$  und  $21.5 \pm 9.9$   $\text{nmol} \times 90 \text{ min}^{-1} \times (\text{mg Zellprotein})^{-1}$  ( $n = 12$  bis  $16$ ). Von den Transaminierungsprodukten wurden bei L-Leucin und L-Norleucin  $8.6 \pm 4.1$  und  $12.9 \pm 5.8$  %, bei L-Valin und L-Norvalin  $21.0 \pm 10.0$  und  $20.3 \pm 10.2$  % oxidativ decarboxyliert. Bei den Nor-Analoga war damit die Rate der Transaminierung wie auch die Rate der oxidativen Decarboxylierung etwa halb so hoch wie die der jeweils zugehörigen natürlichen verzweigtkettigen L-Aminosäuren.

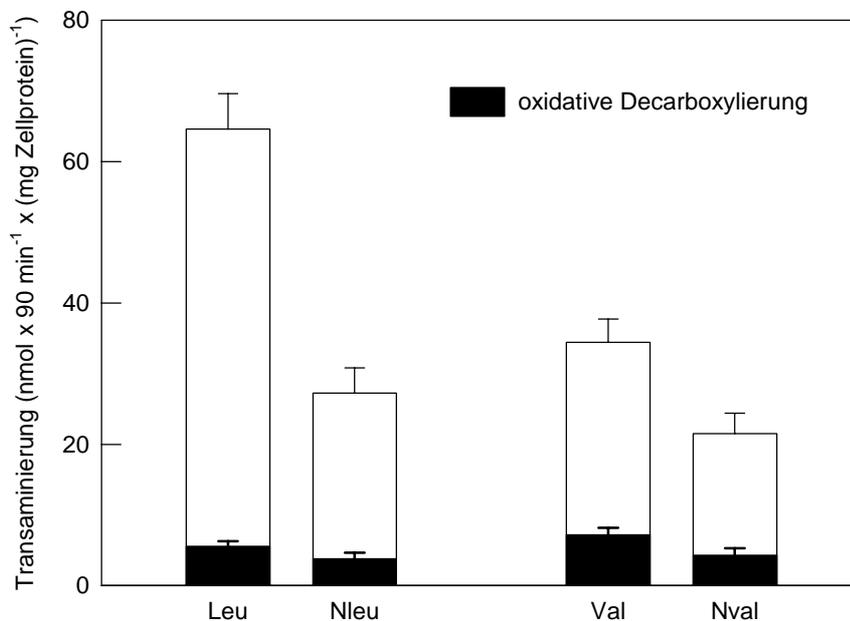


Abb. 3: Katabolismus verzweigtkettiger L-Amino[1-<sup>14</sup>C]säuren und ihrer geradkettigen Analoga in inkubierten kultivierten Hautfibroblasten gesunder Kontrollpersonen. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen inkubiert (Substrat  $1 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ,  $16.7 \text{ Bq} \times \text{nmol}^{-1}$ ; 90 Minuten,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Die Transaminierungsrate wurde als Summe der Raten von Decarboxylierung und 2-Oxo[1-<sup>14</sup>C]säuren-Bildung berechnet. Angegeben sind MW  $\pm$  SEM ( $n = 12$  bis  $16$ ; 4 Zelllinien jeweils  $n = 3$  bis  $4$ ). Abkürzungen: Nleu, Norleucin; Nval, Norvalin.

## Katabolismus der Nor-Analoga in Fibroblasten ahornsirupkranker Patienten

In Inkubationsversuchen mit Hautfibroblasten von drei Patienten mit unterschiedlichem klinischen Schweregrad der Ahornsirupkrankheit wurde untersucht, ob und in wie weit der Katabolismus der Nor-Analoga im Vergleich zu ihren natürlichen Substraten eingeschränkt ist.

In den Fibroblasten dieser Patienten mit varianter Form der Erkrankung wurde nach *Schadewaldt et al. (1989)* mit L-[1-<sup>14</sup>C]Leucin als Substrat folgende residuale Aktivität des verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes bestimmt (n = 3 bis 4): Patient D.N. 36 ± 21 %, Patient J.W. 19 ± 7 % und Patient C.C. 4 ± 4 % der Norm. Die Aktivität des mitochondrialen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes in diesen Zelllinien wurde anhand der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung in Inkubationen mit L-[1-<sup>14</sup>C]Alanin als Substrat unter Standardbedingungen geprüft. Dabei ergaben sich folgende Stoffwechselraten: Patient D.N. 4.7 ± 2.1, Patient J.W. 5.2 ± 1.4 und Patient C.C. 4.6 ± 2.1 nmol x 90 min<sup>-1</sup> x (mg Zellprotein)<sup>-1</sup> (n = 3). Damit lag die Pyruvat-Dehydrogenase-Aktivität in den Fibroblasten der Patienten mit Ahornsirupkrankheit im Normalbereich (5.8 ± 3.4 nmol x 90 min<sup>-1</sup> x (mg Zellprotein)<sup>-1</sup>, n = 10; 4 normale Zelllinien, n = 2 bis 3).

Tab. 1: Transaminierung von verzweigt-kettigen und geradkettigen L-Amino[1-<sup>14</sup>C]säuren in kultivierten humanen Hautfibroblasten von drei Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit (MSUD) \*

MSUD-Zelllinie	L-Leucin	Transaminierungsrate von:		
		L-Norleucin	L-Valin	L-Norvalin
(nmol x 90 min <sup>-1</sup> x (mg Zellprotein) <sup>-1</sup> )				
D.N.	63.62 ± 20.16	21.30 ± 4.11	38.07 ± 12.73	15.91 ± 2.94
J.W.	46.42 ± 5.98	21.30 ± 2.99	27.23 ± 6.81	23.94 ± 3.28
C.C.	83.21 ± 14.01	32.54 ± 1.79	44.98 ± 11.22	26.49 ± 5.42

\* Die Zellen wurden unter Standardbedingungen inkubiert (Substrat 1 mmol x l<sup>-1</sup>, 16.7 Bq x nmol<sup>-1</sup>; 90 Minuten, 37 °C). Die Transaminierungsrate wurde als Summe der Raten von Decarboxylierung und 2-Oxo[1-<sup>14</sup>C]säuren-Bildung ermittelt. Dargestellt sind MW ± SD (n = 4).

Erwartungsgemäß lagen die Transaminierungsraten der Nor-Analoga und der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren bei allen drei Zelllinien im Normbereich (Tab. 1). Dagegen waren, bezogen auf die in Fibroblasten von Normalpersonen ermittelten Raten (= 100 %), die Decarboxylierungsraten mit L-Leucin und L-Norleucin (L-Valin und L-Norvalin) bei den einzelnen Zelllinien wie folgt vermindert (Abb.4):

D.N.:  $-63 \pm 21 \%$  und  $-77 \pm 10 \%$  ( $-63 \pm 14 \%$  und  $-80 \pm 4 \%$ );

J.W.:  $-81 \pm 7 \%$  und  $-86 \pm 1 \%$  ( $-84 \pm 2 \%$  und  $-82 \pm 3 \%$ );

C.C.:  $-96 \pm 4 \%$  und  $-97 \pm 4 \%$  ( $-99 \pm 1 \%$  und  $-99 \pm 1 \%$ ).

Damit waren die Decarboxylierungsraten der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren und ihrer Nor-Analoga bei allen drei Zelllinien im Vergleich zu den entsprechenden Normwerten relativ gleichmäßig und entsprechend der jeweiligen Restaktivität des Enzymkomplexes reduziert.

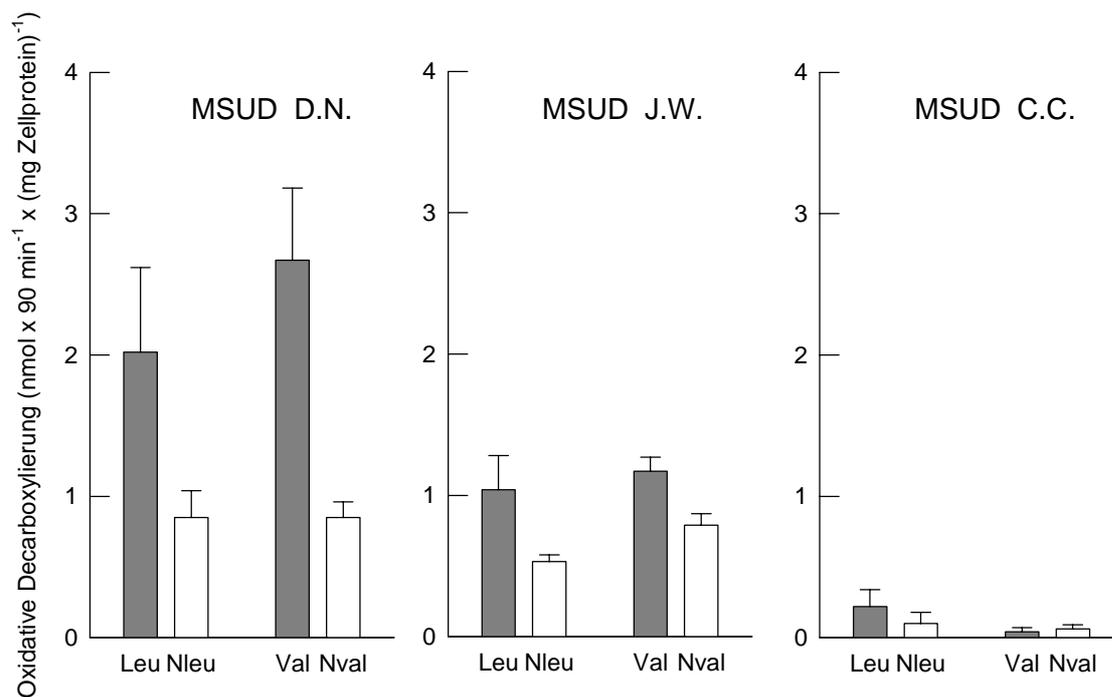


Abb. 4: Oxidative Decarboxylierung verzweigt-kettiger L-Amino[1-<sup>14</sup>C]säuren (dunkelgraue Balken) und ihrer geradkettigen Analoga (hellgraue Balken) in kultivierten Hautfibroblasten von drei Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad der Ahornsirupkrankheit (MSUD). Dargestellt sind die Raten der oxidativen Decarboxylierung (MW  $\pm$  SEM; n = 4). Die Zellen wurden unter Standardbedingungen inkubiert (Substrat 1 mmol x l<sup>-1</sup>, 16.7 Bq x nmol<sup>-1</sup>; 90 Minuten, 37 °C). Abkürzungen: Nleu, Norleucin; Nval, Norvalin.

## 8.4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Cytotoxizität von L-Norleucin und L-Norvalin auf menschliche Zellen in mehrtägigen Inkubationen humaner Hautfibroblasten mit hoher Nor-Analoga-Konzentration ( $5 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) geprüft. Dabei ergaben sich keinerlei Hinweise auf cytotoxische Wirkungen der Nor-Analoga. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen an Versuchstieren, bei denen auch nach Gabe hoher bis sehr hoher Dosen von L-Norleucin und L-Norvalin keine toxischen Wirkungen festgestellt werden konnte (*ul Hassan & Greenberg, 1952; Tews et al., 1991*).

Bisher war nicht bekannt, ob und in welchem Ausmaß die Nor-Analoga (L-Norleucin, L-Norvalin) der natürlichen verzweigtkettigen L-Aminosäuren (L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin) beim Menschen verstoffwechselt werden können. Die vorliegende *in vitro* Untersuchung mit normalen kultivierten humanen Hautfibroblasten zeigt erstmals, daß die Nor-Analoga tatsächlich in menschlichen Zellen abgebaut werden können. Verglichen mit den natürlichen Substraten L-Leucin und L-Valin waren die Transaminierungs- und oxidativen Decarboxylierungsraten, als initiale Schritte des Abbaus, bei den Nor-Analoga um ca. 50 % reduziert. Die relativ verminderte Abbaurate der Nor-Analoga gegenüber den natürlichen verzweigtkettigen L-Aminosäuren in Hautfibroblasten ist nicht darauf zurückzuführen, daß die Nor-Analoga über andere Stoffwechselwege abgebaut werden als L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin. Folgende Befunde sprechen eindeutig dafür, daß der Katabolismus der Nor-Analoga und der verzweigtkettigen L-Aminosäuren initial über dieselben enzymatischen Schritte verläuft: Die Bildung von 2-Oxosäuren aus L-Norleucin und L-Norvalin dürfte spezifisch durch die verzweigtkettigen L-Aminosäuren-Aminotransferase (EC 2.6.1.42) katalysiert werden. In Fibroblasten, ähnlich wie in fast allen anderen humanen Geweben mit Ausnahme von Hirn, Plazenta und Ovar (*Suryawan et al., 1998*), ist ausschließlich das mitochondriale Isoenzym exprimiert (*Schadewaldt et al., 1995*). Untersuchungen zu den kinetischen Eigenschaften des mitochondrialen

humanen Enzyms zeigen eine breite Substratspezifität. Das Enzym transaminiert L-Leucin und L-Valin mit einer zwei- bis dreifach höheren Rate als die entsprechenden Nor-Analoga (*Schadewaldt et al., 1995*). Die hier erhobenen Befunde zur Transaminierung dieser Aminosäuren in intakten Fibroblasten stehen damit in Übereinstimmung mit den kinetischen Eigenschaften der Aminotransferase.

Eine Transaminierung der Nor-Analoga durch andere Enzyme ist weitgehend auszuschließen, da andere beim Menschen bekannten Aminotransferasen, wie z.B. Alanin- und Aspartat-Aminotransferase, und Aminosäuren-Dehydrogenasen, wie z.B. Glutamat-Dehydrogenase, substratspezifisch sind und die verzweigtkettigen L-Aminosäuren und ihre Nor-Analoga unter physiologischen Bedingungen praktisch nicht umsetzen (*Struck & Sizer, 1960; Barman, 1969a,b,c; Hornby & Engel, 1983*).

Die nachfolgende irreversible oxidative Decarboxylierung der gebildeten 2-Oxosäuren erfolgt wahrscheinlich spezifisch durch den mitochondrialen verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex. Kinetische Untersuchungen am (partiell) gereinigten Enzym zeigen eine relativ breite Substratspezifität gegenüber kurzkettigen 2-Oxosäuren (C3-C6) mit verzweigten und unverzweigten aliphatischen Resten (*Conelly et al., 1968; Parker & Randle, 1978a,b; Pettit et al., 1978; Ono et al., 1987; Paxton, 1988*). Von den beiden anderen mitochondrialen 2-Oxosäure-Dehydrogenase-Komplexen, der Pyruvat-Dehydrogenase und der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, werden die 2-Oxosäuren von L-Norleucin und L-Norvalin aufgrund ihrer unpolaren Natur und der Kettenlänge nicht umgesetzt (*Pettit & Reed, 1982; Jones & Yeaman, 1986; Paxton et al., 1986; Paxton & Sievert, 1991*). Neben der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase ist bei Säugern nur ein einziges weiteres Enzym bekannt, die 4-Methyl-2-oxopentanoat-Dioxygenase, das die oxidative Decarboxylierung verzweigtkettiger 2-Oxosäuren katalysiert. Dieses Enzym wurde jedoch ausschließlich in der Rattenleber nachgewiesen und setzt nur die

korrespondierenden 2-Oxosäuren der Aminosäuren L-Leucin und L-Methionin um (Sabourin & Biber, 1988).

Letztlich belegen die eigenen Befunde zur Oxidation der Nor-Analoga in Fibroblasten von Patienten mit Ahornsirupkrankheit, daß die oxidative Decarboxylierung der geradkettigen 2-Oxosäuren in der intakten Zelle tatsächlich durch den verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex katalysiert wird. Bei normaler Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes in allen drei Zelllinien von Patienten mit unterschiedlicher varianter Form der Ahornsirupkrankheit war die oxidative Decarboxylierung der Nor-Analoga spezifisch, in Abhängigkeit von der residualen Enzymaktivität, vermindert. Außerdem war die Reduktion des oxidativen Abbaus mit der der natürlichen Substrate vergleichbar. Letztere Befunde zeigen auch, daß mit den Nor-Analoga eine Bestimmung der Restaktivität des verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex *in vitro* möglich ist. Ausgehend von L-Norleucin und L-Norvalin als Substrat werden bei der oxidativen Decarboxylierung Valeryl-CoA bzw. Butyryl-CoA gebildet. Die weitere Verstoffwechslung dieser Metabolite stellt für die Zelle kein Problem dar. Sie werden im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation zu Acetyl-CoA und Propionyl-CoA bzw. Acetyl-CoA abgebaut und können somit letztlich im Citronensäure-Zyklus weiter oxidiert werden.

Aufgrund dieser *in vitro* Befunde kann davon ausgegangen werden, daß L-Norleucin und L-Norvalin auch *in vivo* vergleichbar mit den natürlichen Aminosäuren katabolisiert werden. Sobald die 1-<sup>13</sup>C-markierten Nor-Analoga (kommerziell) verfügbar werden, muß nun in *in vivo* Stoffwechseluntersuchungen geprüft werden, ob diese Verbindungen tatsächlich zur Bestimmung des *in vivo* Ganzkörperflusses durch den verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex geeignet sind und ob sie damit als „metabolische Sonden“ zur Bestimmung des *in vivo* Schweregrades bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit eingesetzt werden können.



## **Teil V**

### **L-Alloisoleucin**

Zunächst werden in vivo Untersuchungen zum Mechanismus der L-Alloisoleucin-Bildung aus L-Isoleucin beim Menschen vorgestellt. Anschließend wird die Aussagefähigkeit dieses Metaboliten für die Diagnosestellung bei Ahornsirupkrankheit geprüft.

---



## Kapitel 9

### Zum Mechanismus der Bildung von L-Alloisoleucin in vivo \*

**Zusammenfassung.** L-Alloisoleucin (2*S*,3*R*), ein Diastereomer des L-Isoleucins (2*S*,3*S*), ist normaler Bestandteil des humanen Plasmas und wird in vivo wahrscheinlich aus L-Isoleucin gebildet. Beachtliche Mengen L-Alloisoleucin akkumulieren bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit, einer angeborenen Stoffwechselerkrankung, bei der die Funktion des verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes beeinträchtigt ist. Der Weg der L-Alloisoleucin-Bildung ist unklar. Um den Mechanismus der L-Alloisoleucin-Bildung in vivo aufzuklären wurden orale Bolustests mit L-[1-<sup>13</sup>C]Isoleucin ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ , 50 % 1-<sup>13</sup>C) bei gesunden Probanden (n=4) im postabsorptiven Zustand durchgeführt und die Kinetik der <sup>13</sup>C-Anreicherung in den Plasma-metaboliten des L-Isoleucins während einer 3stündigen Versuchsdauer gemessen. Verglichen mit L-Isoleucin war der zeitliche Verlauf der Isotopenanreicherung in der korrespondierenden

2-Oxosäure S-3-Methyl-2-oxopentanoat nur geringfügig verzögert. Die maximale <sup>13</sup>C-Anreicherung betrug im L-Isoleucin  $18 \pm 4$  MPE und in der 2-Oxosäure  $17 \pm 3$  MPE. Die Maximalwerte wurden 35 Minuten (L-Isoleucin) bzw. 45 Minuten (S-3-Methyl-2-oxopentanoat) nach Bolusgabe erreicht. Die Kinetik der <sup>13</sup>C-Anreicherung in den beiden enantiomeren 2-Oxosäuren S- und R-3-Methyl-2-oxopentanoat war praktisch identisch, die Isotopenanreicherungen waren linear korreliert ( $p \ll 0.001$ ). Im L-Alloisoleucin akkumulierte die <sup>13</sup>C-Markierung jedoch erst allmählich und, verglichen mit den anderen L-Isoleucinmetaboliten, in deutlich geringerem Maß.

Die Ergebnisse zeigen, daß R-3-Methyl-2-oxopentanoat als Nebenprodukt bei der Transaminierung von L-Isoleucin in vivo rasch entsteht und L-Alloisoleucin in vivo primär durch nachfolgende "Re"Transaminierung von 3-Methyl-2-oxopentanoat gebildet wird.

---

\* publiziert als: *Formation of L-alloisoleucin in vivo: a L-[<sup>13</sup>C]isoleucine study in man*

Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U (2000) *Pediatr Res* 47: 271-277

## 9.1 Einleitung

Die verzweigt-kettigen L-Aminosäuren L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin (2S,3S), und ihre korrespondierenden 2-Oxosäuren 4-Methyl-2-oxopentanoat, 3-Methyl-2-oxobutanoat, S-3-Methyl-2-oxopentanoat sind normale Bestandteile des humanen Plasmas. Zusätzlich sind L-Alloisoleucin (2S,3R) und die korrespondierende 2-Oxosäure R-3-Methyl-2-oxopentanoat in sehr geringen Mengen vorhanden. Deutlich erhöhte Konzentrationen dieser Metabolite kommen bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit vor. Bei dieser angeborenen Stoffwechselerkrankung ist die Funktion des verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex (E.C. 1.2.4.4) beeinträchtigt. Als Folge des Enzymdefektes akkumulieren verzweigt-kettige Metabolite in Blut und anderen Körperflüssigkeiten (Übersicht bei *Chuang & Shih, 1995*).

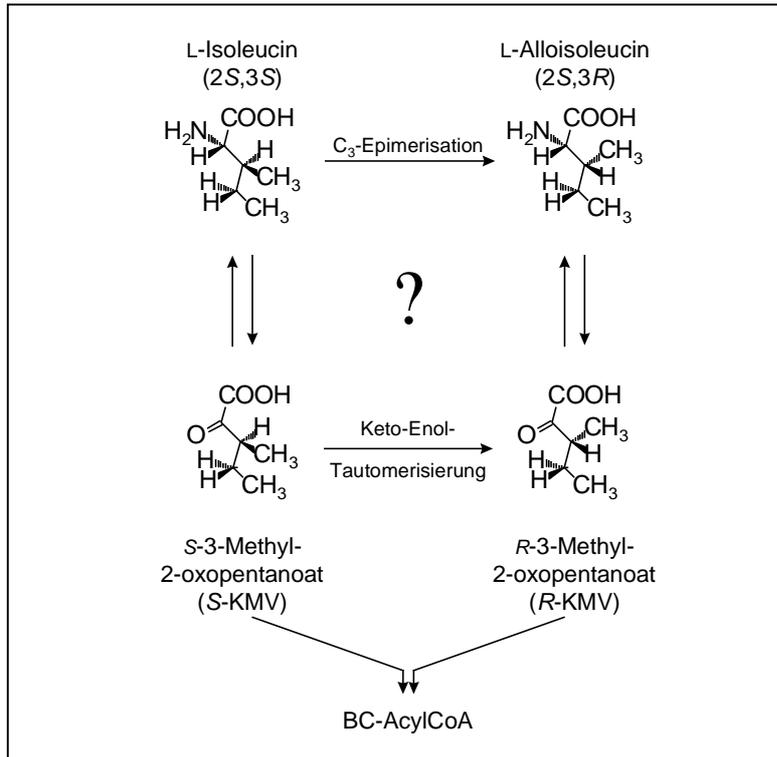
L-Alloisoleucin wurde beim Menschen erstmals im Plasma von Patienten mit Ahornsirupkrankheit nachgewiesen. Aufgrund seines chromatographischen Verhaltens wurde dieser Metabolit zunächst mit Methionin verwechselt (*Dancis et al., 1960*), schließlich jedoch von *Norton et al. (1962)* als Alloisoleucin identifiziert. Die L-Chiralität wurde dann 1970 von *Halpern & Pollock* nachgewiesen. Bezüglich der korrespondierende R-2-Oxosäure wurden zwei gaschromatographische Peaks der Oxim-Derivate zunächst für R- und S-3-Methyl-2-oxopentanoat gehalten wurden (*Jakobs et al., 1977*). Später wurde jedoch nachgewiesen, daß diese beiden Peaks auf die E- und Z-Isomerie zurückgeführt waren (*Mamer et al., 1980*). Erst vor kurzem wurde eine Methode zur differenzierten Bestimmung von R- und S-3-Methyl-2-oxopentanoat etabliert, so daß jetzt auch Angaben zur Konzentration von R-3-Methyl-2-oxopentanoat im humanen Plasma verfügbar sind (*Schadewaldt et al., 1996*).

Es ist bekannt, daß der Katabolismus der beiden diastereomeren L-Aminosäuren L-Isoleucin und L-Alloisoleucin mit einer reversiblen Transaminierung beginnt, die durch die verzweigt-kettigen L-Aminosäuren-Aminotransferase (E.C. 2.6.1.42) katalysiert wird. Die dabei gebildeten 2-

Oxosäuren *S*- und *R*-3-Methyl-2-oxopentanoat werden dann durch den mitochondrialen verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Multienzymkomplex irreversibel decarboxyliert. Es entstehen dabei *S*- und *R*-verzweigt-kettigen Acyl-CoA-Derivate, die dann über den sog. "S- bzw. R-pathway" weiter abgebaut werden (*Mamer et al., 1976*). Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Aminosäuren ist, daß L-Alloisoleucin, im Unterschied zu L-Isoleucin, nicht zur Proteinsynthese verwendet wird (*Batshaw et al., 1976*).

Für den Mechanismus der L-Alloisoleucin-Bildung *in vivo* existieren zwei unterschiedliche Hypothesen (Schema 1). *Meister & White (1951)* schlugen als Mechanismus eine Racemisierung von *S*- zu *R*-3-Methyl-2-oxopentanoat über Oxo-Enol-Tautomerisierung mit nachfolgender Transaminierung vor. Diese Hypothese wurde später zur Erklärung der L-Alloisoleucin-Bildung bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit herangezogen (*Snyderman et al., 1964*). *Matthews et al. (1980)* verabreichten zwei ahornsirupkranken Patienten L-[N<sup>15</sup>]Leucin und beobachteten bei L-Alloisoleucin einen gegenüber L-Isoleucin etwas verzögerten Einbau von <sup>15</sup>N-Markierung und schlossen daraus, daß L-Isoleucin und L-Alloisoleucin *in vivo* über die korrespondierenden 2-Oxosäuren äquilibrieren. Die Gültigkeit dieser Schlußfolgerung ist jedoch, aufgrund des vielfachen Recyclings von  $\alpha$ -Aminogruppe *in vivo* (*Mamer & Ramer, 1992*; *Schadewaldt et al., 1995*), sehr fraglich. Außerdem konnte eine Racemisierung der 2-Oxosäuren bei pH-Werten < 8.4 *in vitro* nicht beobachtet (*Meister, 1951*) werden. Darüber hinaus konnte in einer kürzlich durchgeführte <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopiestudie eindeutig gezeigt werden, daß auch unter physiologischen Bedingungen keine spontane Racemisierung eintritt (*Mamer & Reimer, 1992*). Die offensichtliche Diskrepanz zwischen dem Nichtauftreten einer 2-Oxosäure-Racemisierung *in vitro* einerseits und der scheinbar relativ raschen Umwandlung von *S*- zu *R*-3-Methyl-2-oxopentanoat *in vivo* andererseits (*Weinberg & Walser, 1977*), veranlaßte *Walser et al. (1981)* zu der Behauptung 'the interconversion is evidently catalyzed by a racemase somewhere in the body'. Diese Annahme wurde jedoch nie experimentell belegt.

Mamer & Reimer (1992) lehnten schließlich die Hypothese der 2-Oxosäure-Racemisierung als Mechanismus zur Bildung von L-Alloisoleucin nach kritischer Sichtung der dazu verfügbaren Informationen ab und kamen aus theoretischen Überlegungen zu dem Schluß, daß L-Alloisoleucin demnach direkt bei der Transaminierung aus L-Isoleucin gebildet werden muß (Schema 1).



Schema 1: Hypothesen zum Mechanismus der Bildung von L-Alloisoleucin aus L-Isoleucin in vivo. Für die Umwandlung dieser Aminosäuren ineinander wurde eine Keto-Enol-Tautomerisierung der 2-Oxosäuren mit nachfolgender „Re“Transaminierung (Meister & White, 1951; Snyderman et al., 1964) und alternativ eine C<sub>3</sub>-Epimerisierung der L-Aminosäuren bei der Bindung an den Pyridoxal-Anteil der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren-Aminotransferase und nachfolgender Freisetzung von dem Enzym durch Hydrolyse (Mamer & Reimer, 1992) vorgeschlagen.

Prinzipiell sind <sup>13</sup>C-markierte Substrate hervorragend zur Untersuchung der Fragestellung, ob L-Alloisoleucin beim Menschen über die 2-Oxosäuren oder direkt aus L-Isoleucin gebildet wird, geeignet. Solche Untersuchungen waren bisher, aufgrund fehlender Methoden zur differenzierten Bestimmung der <sup>13</sup>C-

Anreicherung in den *S*- und *R*-3-Methyl-2-oxopentanoat-Enantiomeren, nicht durchführbar (Schadewaldt *et al.*, 1990; Mamer & Reimer, 1992). Seit kurzem steht in unserer Arbeitsgruppe eine solche Methode zur Verfügung (Schadewaldt *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde nun der Frage zum Mechanismus der L-Alloisoleucin-Bildung *in vivo* nachgegangen, indem gesunden Probanden L-[1-<sup>13</sup>C]Isoleucin als oraler Bolus verabreicht wurde und nachfolgend der zeitliche Verlauf der <sup>13</sup>C-Anreicherung in den vier L-Isoleucin-Plasmametaboliten L-Isoleucin, *S*-3-Methyl-2-oxopentanoat, L-Alloisoleucin und *R*-3-Methyl-2-oxopentanoat bestimmt wurde.

## 9.2 Material und Methoden

### 9.2.1 Material

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt), Sigma Chemie (München) oder Boehringer (Mannheim) bezogen. L-[1-<sup>13</sup>C]Isoleucin (99 % 1-<sup>13</sup>C) stammte von Promochem (Wesel). Der Isotopengehalt des L-[1-<sup>13</sup>C]Isoleucins wurde mittels GC-MS-Analyse (s. 9.2.3.2) bestimmt und entsprach den Spezifikationen des Herstellers. Natürlich angereicherte L-Isoleucin- bzw. L-Alloisoleucin-Präparationen wurden von Merck bzw. Bachem Biochemica (Heidelberg) bezogen.

Die Reinheit des <sup>13</sup>C-markierten sowie des natürlich angereicherten L-Isoleucins und L-Alloisoleucins wurden mittels automatischer Aminosäureanalyse (s. 9.2.3.2) bestimmt. <sup>13</sup>C-markiertes und natürlich angereichertes L-Isoleucin enthielten < 0.2 % bzw. < 0.3 % Alloisoleucin. Alloisoleucin enthielt < 0.1 % Isoleucin. Die Enantiomerenreinheit der L-Isoleucin- und L-Alloisoleucin-Präparationen wurde mittels D,L-Aminosäure-HPLC-Analyse (Lam, 1986) bestimmt und lag bei > 99.8 %.

## 9.2.2 Probanden

Fünf gesunde Probanden nahmen an den Untersuchungen teil (4 Männer, 1 Frau; mittleres ( $\pm$  SD) Alter  $32 \pm 8$  Jahre, Größe  $179 \pm 6$  cm, Gewicht  $76 \pm 8$  kg). Alle Teilnehmer wurden einer körperlichen Untersuchung unterzogen; bei keinem wurde eine akute oder chronische Erkrankung festgestellt. Vier Probanden erhielten nur L-[1- $^{13}$ C]Isoleucin. Einer der Probanden, mit normalem L-Isoleucin- und L-Alloisoleucin-Metabolismus (in früheren Tests untersucht; *Schadewaldt et al., 1991; Schadewaldt et al., 1990*), erhielt gleichzeitig L-Isoleucin und L-Alloisoleucin (je  $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ). Vor der Teilnahme an der Untersuchung wurde von allen Probanden eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Das bei diesen Untersuchungen benutzte Versuchsprotokoll wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt.

## 9.2.3 Methoden

### 9.2.3.1 L-[1- $^{13}$ C]Isoleucin-Bolustests

Die oralen Bolustests erfolgten, wie in 2.2.3.1 beschrieben, unter Ruhebedingungen im Liegen (*Bodner et al., 1997*). Den Versuchsteilnehmern wurde nach 12stündigem Übernachtsfasten zwischen 8:00 und 8:30 Uhr eine Venenverweilkanüle in die V. basilica gelegt. Die Kanüle wurde durch eine Tropfinfusion mit steriler NaCl-Lösung offen gehalten. Nach einer Ruheperiode von 45 Minuten wurden, unmittelbar vor der Gabe des Bolus, EDTA-Blutproben und Proben der Exhalationsluft als Kontrollwerte entnommen. Anschließend wurde den Probanden 1- $^{13}$ C-markiertes L-Isoleucin ( $50\% \text{ } 1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ), gelöst in 150 ml verdünnter Zitronensäure ( $5 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ), oral als Bolus verabreicht. Danach wurden weitere Proben des venösen Blutes und parallel dazu Proben der Exhalationsluft während der 3stündigen Versuchsdauer nach folgendem Zeitschema entnommen: 0-45. Minute alle 5 Minuten, 45.-60. Minute alle 7.5 Minuten und 60.-180. Minute alle 15 Minuten. Die  $\text{CO}_2$ -Exhalation

wurde kontinuierlich, mittels Atemgasanalyse (Deltatrac Metabolic Monitor; Datex Instruments, Helsinki, Finnland), bestimmt.

### 9.2.3.2 Analytische Verfahren

#### Konzentrationsbestimmung der Plasmametabolite

Die diastereomeren L-Aminosäuren L-Isoleucin und L-Alloisoleucin, sowie die korrespondierenden enantiomeren 2-Oxosäuren, nach enzymatischer Umsetzung zu den L-Aminosäuren (*Schadewaldt et al., 1996*), wurden mittels automatischer Aminosäureanalyse quantifiziert. Hierzu wurde Plasma (1.9 ml) mit 5-Sulphosalicylsäure ( $60 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ , 0.1 ml), die 2-Oxohexanoat (Na-Salz,  $2 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) und DL-Norleucin ( $2 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) als interne Standards enthält, gemischt. Das ausgefällte Protein wurde durch Zentrifugation entfernt (10 min,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\,000 \times \text{g}$ ). Zur Trennung der Amino- und 2-Oxosäuren wurde der Überstand (1.5 ml) auf eine Dowex 50 WX 8-Säule (200 - 400 mesh,  $\text{H}^{+}$ -Form, 0.5 ml), äquilibriert mit 5-Sulphosalicylsäure ( $3 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ ), aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 0.5 ml 5-Sulphosalicylsäure ( $3 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ ) gewaschen. Die ersten 0.5 ml des Eluates wurden verworfen. Das restliche Eluat enthält die 2-Oxosäuren und wurde gesammelt. Es wurde durch Zusatz von  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $2.5 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ , 0.15 ml) neutralisiert und mit  $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}$ -Puffer ( $5 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ , pH 8.3, 0.3 ml) gemischt. Für die Präparation der korrespondierenden L-Aminosäuren wurde NADH ( $100 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ , 0.1 ml) und L-Leucin-Dehydrogenase-Lösung ( $12.5 \text{ mmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{l}^{-1}$ , 0.2 ml) zugesetzt und die Proben bei  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  für 2 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5-Sulphosalicylsäure ( $20 \text{ g} \times 100 \text{ ml}^{-1}$ , 3 ml) gestoppt und die Proben auf eine 1.8 ml-Dowex 50 WX 8-Säule (200 - 400 mesh,  $\text{H}^{+}$ -Form) aufgetragen. Danach wurde die Säule viermal mit 2 ml Wasser gewaschen und die enzymatisch gebildeten Aminosäuren mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $2.5 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ , 4 ml) eluiert. Das Eluat wurde zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser (0.5 ml) aufgenommen und zentrifugiert ( $10\,000 \times \text{g}$ , 2 min). Aliquots des Überstandes wurden zur Trockne eingedampft. Die Überstände wurden zur Quantifizierung (mittels automatischer Aminosäureanalyse nach *Schadewaldt*

*et al.* (1990)) und zur Bestimmung der Isotopenanreicherung (über Gaschromatographie-Massenspektrometrie, s. unten) verwendet.

Die verzweigt-kettigen Plasma-Aminosäuren wurden nach den 2-Oxosäuren von der ersten Dowex 50 WX 8-Säule eluiert. Die Säule wurde viermal mit Wasser (2 ml) gewaschen, um die 5-Sulphosalicylsäure vollständig zu entfernen. Die Elution der L-Aminosäuren erfolgte mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $2.5 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ , 1.2 ml). Das Eluat wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand zur Konzentrationsbestimmung, wie oben angegeben, und zur Bestimmung der Isotopenanreicherung eingesetzt.

#### Bestimmung der Isotopenanreicherung

Zur Bestimmung der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den Plasma-Aminosäuren wurden die Rückstände, die die ursprünglichen verzweigt-kettigen L-Aminosäuren enthielten, eingesetzt. Für die Bestimmung der Anreicherung in den 2-Oxosäuren wurden die Rückstände mit den aus der enzymatischen Umsetzung der 2-Oxosäuren stammenden verzweigt-kettigen L-Aminosäuren eingesetzt. Die Rückstände wurden in 50  $\mu\text{l}$  einer Mischung aus N-Methyl-N-(t-butyl-dimethylsilyl)-trifluoracetamid (MTBSTFA, Pierce Chemicals, Rockford, Illinois, USA) und  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1, v:v) aufgenommen und eine Stunde bei 70 °C inkubiert, um die N,O-t-Butyldimethylsilyl-Aminosäure-Derivate zu bilden. Zur gaschromatographischen-massenspektrometrischen Analyse wurde ein HP 6890 Gaschromatograph (Hewlett Packard, Waldbronn), ausgestattet mit einer HP-5 MS-Kapillarsäule (5 % Phenylmethylpolysiloxan; 30 m, 0.25 mm Innendurchmesser, 0.25  $\mu\text{m}$  Filmdicke), mit direkter Kopplung zu einem HP massenselektiven Detektor benutzt. Helium diente als Trägergas ( $0.35 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ ). Die Temperatur von Injektor und Verbindung zum Massenspektrometer betrug 250 °C. Im allgemeinen wurde das folgende Zeitprogramm benutzt: Säulentemperatur zu Beginn 100 °C, nach 1.5 Minuten um  $4 \text{ }^\circ\text{C} \times \text{min}^{-1}$  auf 176 °C, dann auf 320 °C ansteigend (die Temperatur von 320 °C wurde für 5 Minuten gehalten). Die massenspektrometrische Bestimmung der N,O-t-Butyldimethylsilyl-Aminosäure-Derivate erfolgte im EI-Modus mit einer

Temperatur der Ionenquelle von 140 °C und einer Elektronen-Energie von 70 eV.

Zur Bestimmung der  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Anreicherung wurde das Verhältnis (R) der Ionenintensitäten bei m/z 303 zu m/z 302 durch selected ion monitoring (SIM) in den L-Isoleucinmetaboliten bestimmt. Die Standardabweichung dieser Bestimmung in L-Isoleucin und S-Methyl-2-oxopentanoat betrug typischerweise  $\pm 0.1$  MPE. Aufgrund der geringen Plasmakonzentrationen von L-Alloisoleucin und R-Methyl-2-oxopentanoat lag die Standardabweichung bei der Bestimmung der Isotopenanreicherung in diesen Metaboliten bei ca.  $\pm 0.2$  MPE.

Die Bestimmung der Isotopenanreicherung im  $\text{CO}_2$  der Exhalationsluft erfolgte, wie unter 2.2.3.2 beschrieben, über Isotopenratio-Massenspektrometrie. Es wurde ein gegen PeeDee Belemniten (PDB) kalibrierter Standard verwendet.

#### 9.2.4 Auswertung und Statistik

Die Isotopenanreicherung in „mol percent excess“ ( $\text{MPE} = \{R - R_0\} / \{R - R_0 + 1\} \times 100$ ) in den Plasmametaboliten wurde aus dem Verhältnis der Ionenintensitäten bei m/z 303 zu m/z 302 (R), gemessen in den vor dem oralen Bolus entnommenen Proben ( $R_0$ ), und dem Verhältnis der Ionenintensitäten in den Proben, die nach oraler Gabe des  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierten L-Isoleucins entnommen wurden (R), berechnet (Wolfe, 1992; s. 2.2.4.1).

Die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung (APE) im  $\text{CO}_2$  der Exhalationsluft wurde berechnet als Differenz zwischen dem  $^{13}\text{CO}_2$  in den vor (Kontrollwert) und nach dem oralen Bolus entnommenen Atemproben (s. 2.2.4.1). Die Raten der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation über basal wurden auf der Basis der Isotopenanreicherung im  $\text{CO}_2$  (APE) und der  $\text{CO}_2$ -Exhalationsrate errechnet (s. 2.2.4.1). Die kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation über basal wurde anhand der Trapezoidal-Regel berechnet (s. 2.2.4.1).

Im allgemeinen sind die Ergebnisse als Mittelwert (MW)  $\pm$  (SEM), unter Angabe der Anzahl der Bestimmungen in Klammern, angegeben. Korrelationen wurden mit linearer Regressionsanalyse (Methode der kleinsten Fehlerquadrate; RGP-Funktion von MS Excel 5.0) geprüft. Steigung und Konstante der Regressionsgeraden sind  $\pm$  Standardfehler angegeben.

### 9.3 Ergebnisse

#### Zeitlicher Verlauf der Plasmakonzentrationen

In oralen Bolustests mit L-[1-<sup>13</sup>C]Isoleucin (50 % <sup>1-13</sup>C; 38  $\mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) wurde bei gesunden, postabsorptiven Probanden ein klarer, jedoch interindividuell variabler, zeitlicher Konzentrationsverlauf der L-Isoleucin-Metabolite im Plasma beobachtet (Abb. 1). Die mittleren initialen L-Isoleucin-Spiegel im Plasma betragen  $62.5 \pm 8.5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (MW  $\pm$  SEM). Der maximale Anstieg der Konzentration nach Applikation des L-[1-<sup>13</sup>C]Isoleucins lag bei  $80.0 \pm 16.7 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Die Spitzenwerte wurden innerhalb von 10 bis 35 Minuten nach Bolusgabe erreicht, wobei sich andeutet, daß die Größe des Konzentrationsanstieges invers mit dem Zeitpunkt des Maximums korreliert war. Danach nahmen die Plasmaspiegel allmählich ab, sie blieben jedoch im Vergleich zu den Ausgangswerten am Ende der 3stündigen Versuchsdauer erhöht ( $80.9 \pm 4.1 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ). Die Plasmakinetik der korrespondierenden 2-Oxosäuren war, verglichen mit den Aminosäuren, leicht verzögert und abgeschwächt. Die initialen Konzentrationen von S- und R-3-Methyl-2-oxopentanoat betragen  $27.6 \pm 2.9 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  und  $0.78 \pm 0.11 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Maximale Konzentrationsanstiege der enantiomeren 2-Oxosäuren wurden parallel 15 bis 45 Minuten nach Bolusgabe erreicht und lagen für S-3-Methyl-2-oxopentanoat bei  $+ 17.4 \pm 2.9 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  und für R-3-Methyl-2-oxopentanoat bei  $+ 0.43 \pm 0.12 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Am Ende der Versuchsdauer waren die Konzentrationen von S-3-Methyl-2-oxopentanoat auf  $36.4 \pm 1.6 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  und von R-3-Methyl-2-oxopentanoat auf  $0.94 \pm 0.05 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  zurückgegangen.

Die Kinetik von L-Alloisoleucin unterschied sich deutlich von der der anderen Plasmametabolite. Bei L-Alloisoleucin wurde kein Konzentrationsmaximum beobachtet, sondern vielmehr ein allmählicher Konzentrationsanstieg. Vor Bolusgabe lagen die Konzentrationen bei  $2.23 \pm 0.40 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  und stiegen bis zum Ende der Untersuchung im Mittel um etwa 10 %, auf  $2.46 \pm 0.39 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ , an.

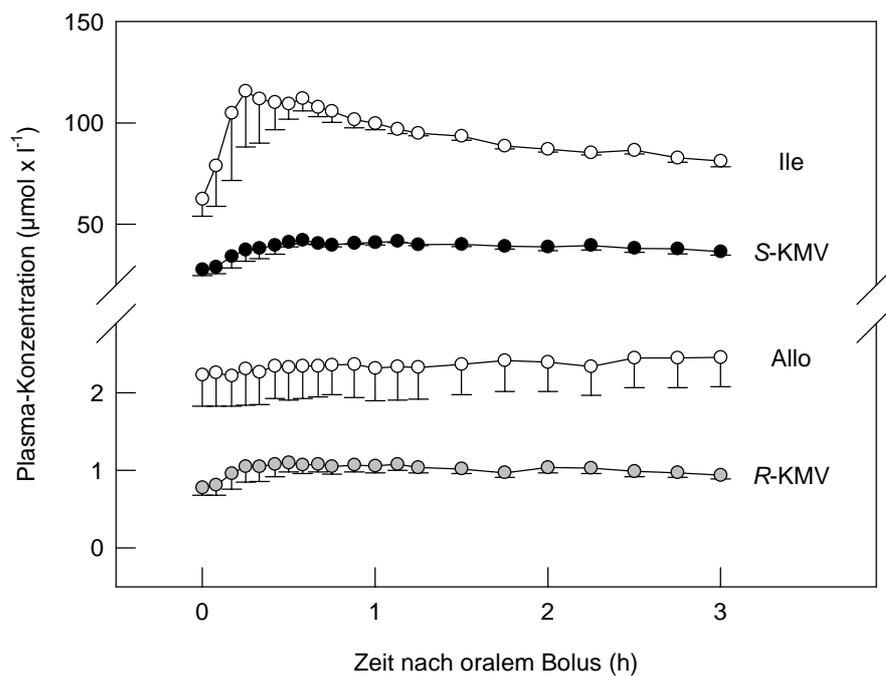


Abb. 1: Zeitlicher Verlauf der Konzentration der Isoleucinmetabolite im Plasma gesunder Probanden im postabsorptiven Zustand nach oraler Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin ( $50\% \text{ } ^{13}\text{C}$ ,  $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ). Abkürzungen: Ile, L-Isoleucin; Allo, L-Alloisoleucin; S-KMV, S-3-Methyl-2-oxopentanoat; R-KMV, R-3-Methyl-2-oxopentanoat. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=4$ ).

#### Zeitlicher Verlauf der Isotopenanreicherung

Der durch die Bolusgabe verursachte Anstieg der Isotopenmarkierung in den Isoleucin-Metaboliten ist in Abb. 2 (A) dargestellt. Die Kinetik der  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Anreicherungen verlief weitgehend parallel zu den jeweiligen Konzentrationen im Plasma. D.h. die Isotopenmarkierung erschien zuerst im L-Isoleucin, danach in den enantiomeren 2-Oxosäuren und schließlich deutlich verzögert und verringert im L-Alloisoleucin.

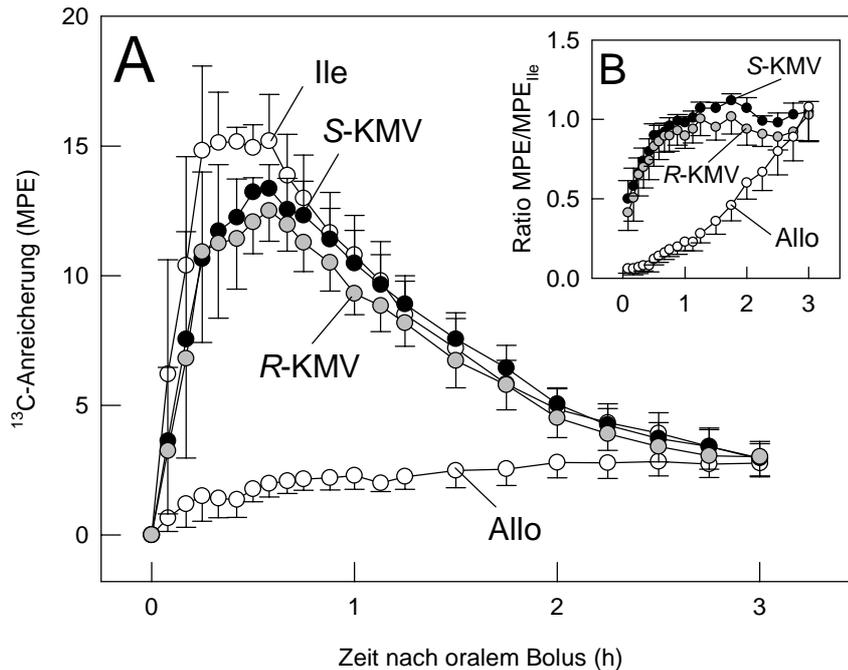


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der (A)  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den Isoleucinmetaboliten im Plasma gesunder Probanden im postabsorptiven Zustand nach oraler Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin ( $50\% \text{ } ^{13}\text{C}$ ,  $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) und (B) Relation der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung (MPE) im L-Isoleucin (Ile), in den enantiomeren 3-Methyl-2-oxopentanoaten (S- und R-KMV) und im L-Alloisoleucin (Allo). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). In (B) ist die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den Metaboliten bezogen auf die Isotopenanreicherung im L-Isoleucin ( $\equiv 1$  zu jedem Zeitpunkt) dargestellt.

Unerwarteterweise waren bei jedem einzelnen Probanden sowohl die Kinetik, als auch die Menge der  $^{13}\text{C}$ -Markierung im S- und R-3-Methyl-2-oxopentanoat sehr ähnlich und linear korreliert ( $p \ll 0.001$ ; vgl. Abb. 3). Sie unterschieden sich klar von der Markierungskinetik im L-Alloisoleucin. Verdeutlicht sind diese Befunde in Abb. 2 B, in der die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den 2-Oxosäuren und im L-Alloisoleucin, bezogen auf die Anreicherung im gemeinsamen metabolischen Vorläufer L-Isoleucin, dargestellt ist. Die Abbildung zeigt, daß die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den beiden 2-Oxosäuren zeitlich verzögert zum L-Isoleucin auftrat. Letztlich wurde aber ca. eine Stunde nach Bolusgabe eine konstante und nahezu mit der Markierung im L-Isoleucin identische  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den 2-Oxosäuren erreicht. Im Gegensatz dazu erschien die Markierung im L-Alloisoleucin erst allmählich.  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen, die mit denen in den 2-Oxosäuren vergleichbar waren, wurde erst am Ende der Versuchsdauer erreicht.

In diesen Untersuchungen lag die kumulative  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation während der 3stündigen Versuchsdauer bei  $2.85 \pm 0.40 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  und betrug somit  $15.0 \pm 2.1 \%$  der applizierten  $^{13}\text{C}$ -Dosis.

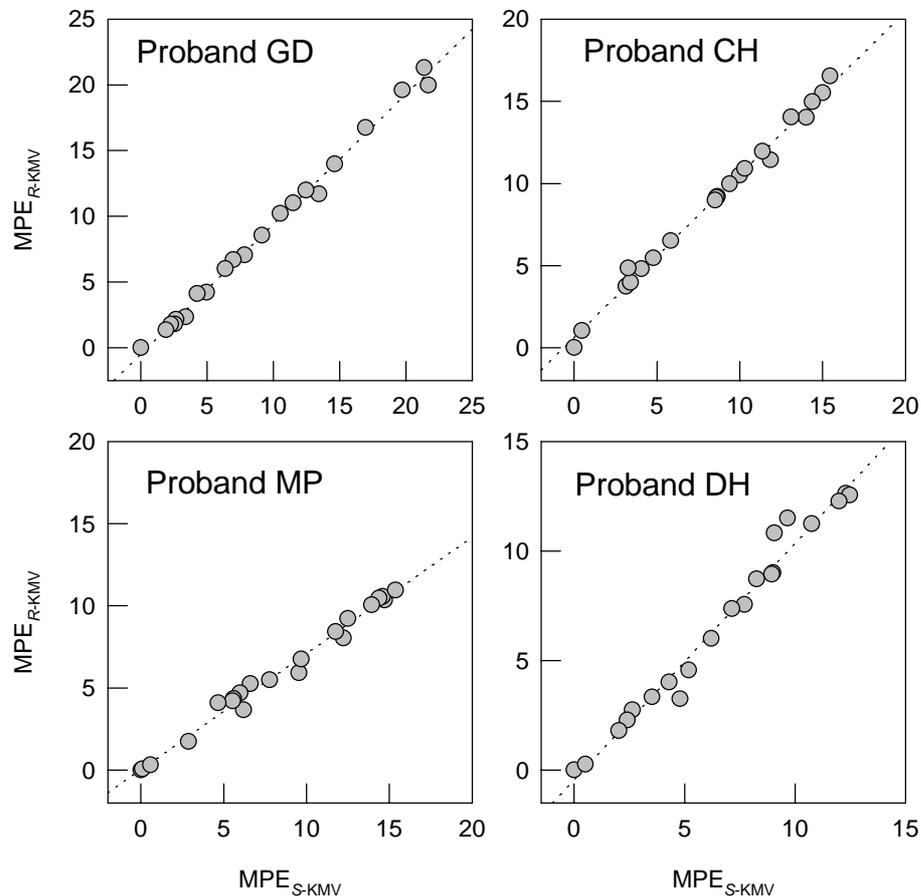


Abb. 3: Lineare Beziehung zwischen der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung (MPE) in den 3-Methyl-2-oxopentanoat-Enantiomeren (S- und R-KMV) im Plasma nach oraler Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin. Dargestellt sind die individuellen Ergebnisse von vier gesunden Probanden, die an den in Abb. 2 dargestellten Untersuchungen teilgenommen haben. Gepunktete Linien: Regressionsgeraden (Methode der kleinsten Fehlerquadrate); Gleichungen: Proband GD:  $y = 0.99 (\pm 0.02) x - 0.48 (\pm 0.18)$ ; Proband CH:  $y = 0.99 (\pm 0.02) x + 0.63 (\pm 0.18)$ ; Proband MP:  $y = 0.71 (\pm 0.03) x + 0.03 (\pm 0.18)$ ; Proband DH:  $y = 1.08 (\pm 0.04) x - 0.45 (\pm 0.28)$ ; je:  $n = 21$ ,  $r > 0.989$ ,  $p \ll 0.001$ ).

### Effekt eines kombinierten Bolus mit L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin und L-Alloisoleucin

Die bisherigen Befunde deuten darauf hin, daß L-Alloisoleucin eine Art metabolisch inaktiver Sammelpool für die  $^{13}\text{C}$ -Markierung, die ursprünglich über die Transaminierung von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin in die 3-Methyl-2-oxopentanoat-

Pools eingebracht wurde, darstellen könnte. Um die mögliche Bedeutung von L-Alloisoleucin als Sammelpool für die  $^{13}\text{C}$ -Markierung weiter zu untersuchen, wurde ein Bolustest mit L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin durchgeführt, bei dem gleichzeitig der L-Alloisoleucin-Pool durch orale Applikation von natürlich angereicherterem L-Alloisoleucin vergrößert wurde (je  $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ). Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt. Die initiale L-Isoleucin-Konzentration im Plasma betrug  $47.7 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Die maximale Konzentration wurde 20 Minuten nach Bolusgabe erreicht und lag bei  $123.3 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Parallel dazu stieg die L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma um das 30fache, von  $2.4 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  auf  $80.8 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Die Spiegel von S- und R-3-Methyl-2-oxopentanoat stiegen zeitlich verzögert von initial  $16.4 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  bzw.  $0.88 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  auf maximal  $31.3 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (nach 30 Minuten) bzw.  $8.2 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (nach 45 Minuten) an. Die Kinetik der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung im L-Isoleucin und seiner korrespondierenden 2-Oxosäure war vergleichbar mit den oben beschriebenen zeitlichen Verläufen in L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin-Bolustests und wurde durch die gleichzeitige Gabe von L-Alloisoleucin offenbar nicht beeinflusst. Dies galt auch für die Rate der Ganzkörper-L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucinoxidation. Wie bei den obigen Experimenten wurden auch hier während der 3stündigen Versuchsdauer 15 % ( $2.86 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) der applizierten  $^{13}\text{C}$ -Dosis als  $^{13}\text{CO}_2$  in der Exhalationsluft wiedergefunden. Im L-Alloisoleucin konnte im Plasma kein Anstieg der  $^{13}\text{C}$ -Markierung gemessen werden, vermutlich aufgrund der sehr hohen Isotopenverdünnung durch das verabreichte nicht-markierte L-Alloisoleucin. Im Gegensatz dazu war im R-3-Methyl-2-oxopentanoat während der initialen Phase des Experimentes immer noch eine verlässliche Bestimmung der Anreicherungen möglich. Die Kinetik der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung unterschied sich jedoch deutlich vom Konzentrationsverlauf. So wurde die maximale  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung 20 Minuten vor dem Spitzenwert der Konzentration erreicht. Das Maximum der Isotopenanreicherung im R-3-Methyl-2-oxopentanoat war mit 4.3 MPE 5mal niedriger als in der S-2-Oxosäure (19.4 MPE). Dies steht in bemerkenswert guter Übereinstimmung mit der durch den L-Alloisoleucin-Bolus verursachten Erhöhung der Konzentration an (nicht-markiertem) R-3-Methyl-2-oxopentanoat ( $5.8 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) zu diesem Zeitpunkt.

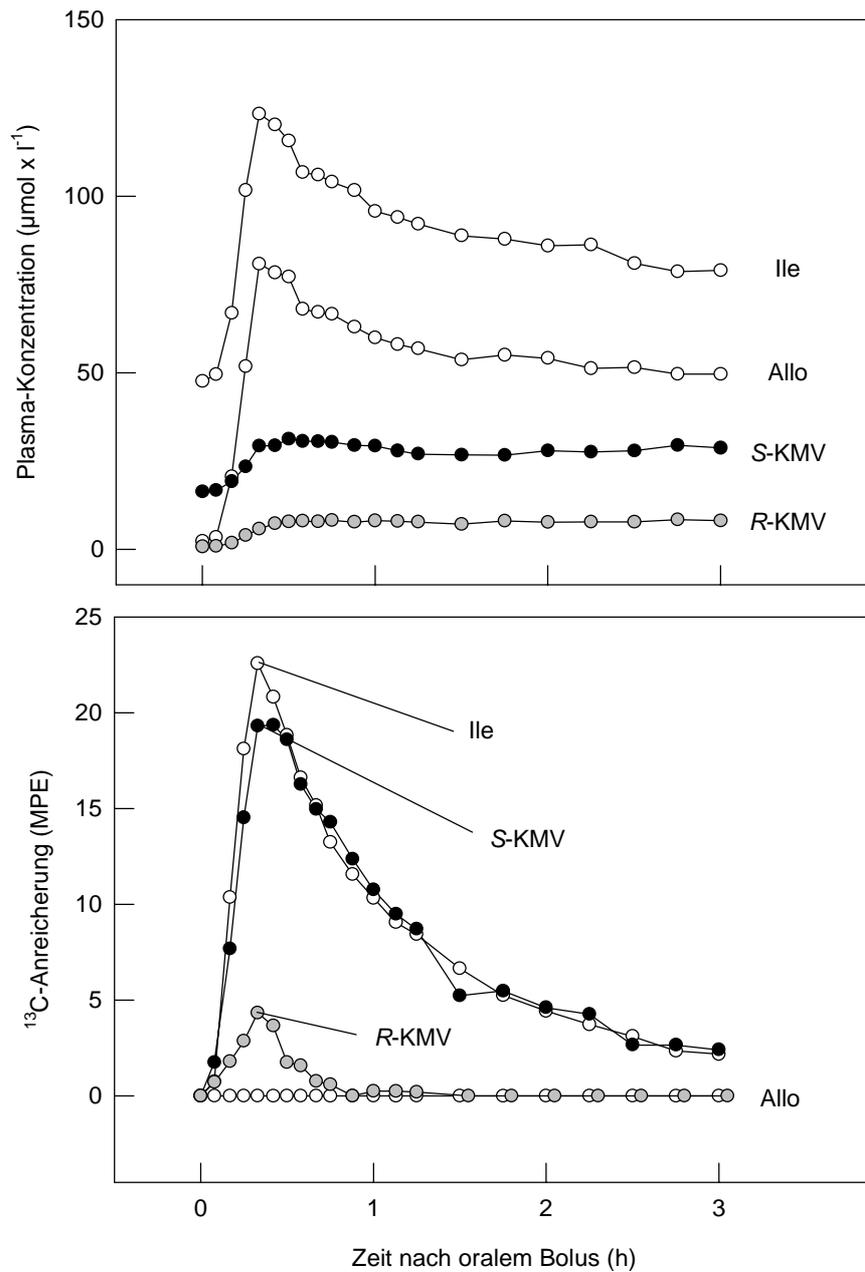


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der Konzentration und <sup>13</sup>C-Anreicherung in Isoleucin-Metaboliten im Plasma eines gesunden Probanden im postabsorptiven Zustand nach kombiniertem oralem Bolus mit L-[1-<sup>13</sup>C]Isoleucin (50 % <sup>1-13</sup>C) und natürlich angereichertem L-Alloisoleucin (je 38 µmol x (kg KG)<sup>-1</sup>). Abkürzungen: Ile, L-Isoleucin; Allo, L-Alloisoleucin; S-KMV, S-3-Methyl-2-oxopentanoat; R-KMV, R-3-Methyl-2-oxopentanoat.

## 9.4 Diskussion

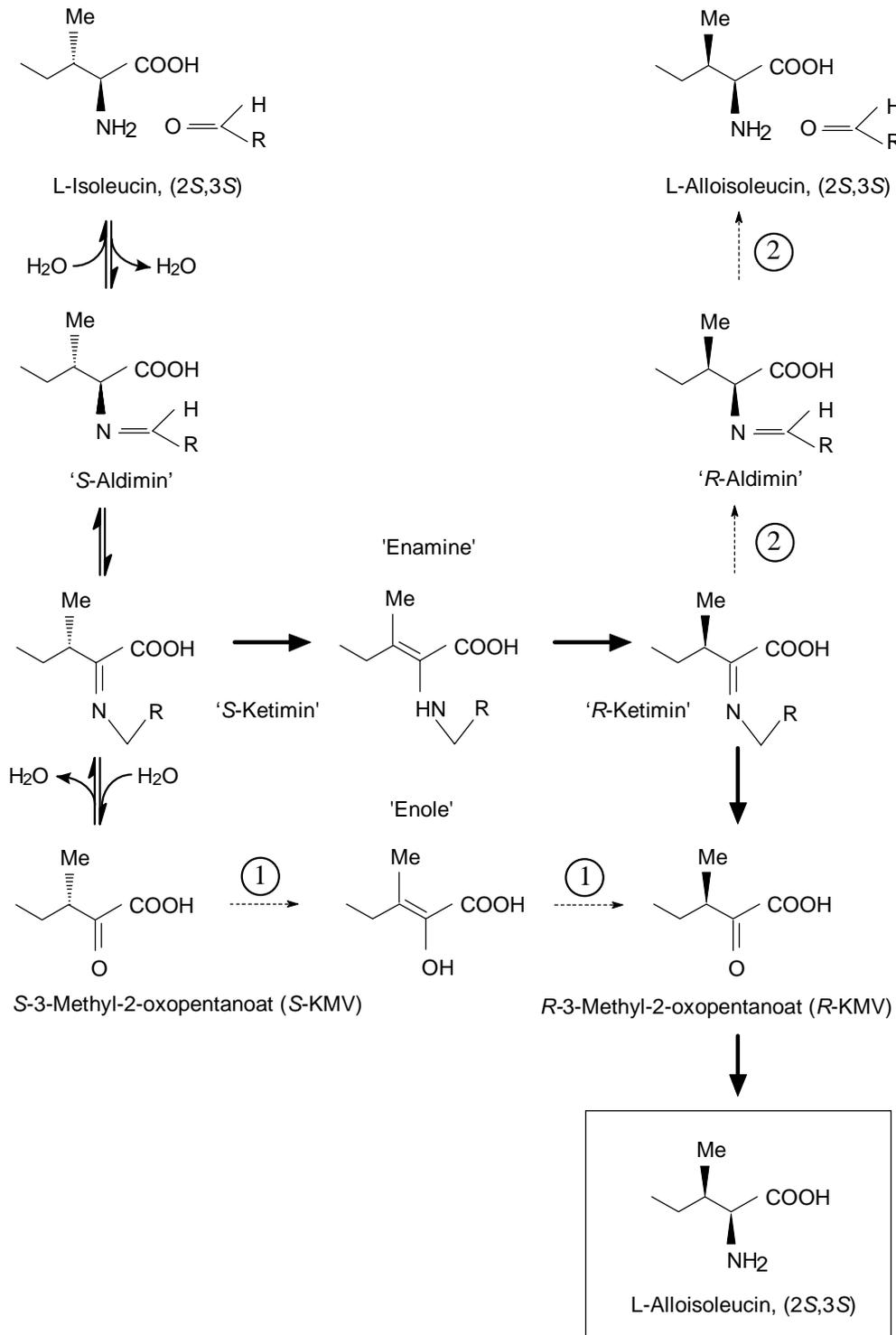
Im allgemeinen wird davon ausgegangen, daß L-Alloisoleucin in vivo aus L-Isoleucin entsteht (*Chuang & Shih, 1995*). Ein direkter experimenteller

Nachweis für diese Annahme ist bisher nicht erbracht worden. Bisher liegen folgende indirekten Hinweise vor: 1. Bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit wurden bei L-Isoleucin und L-Alloisoleucin ähnliche Plasmakinetiken beobachtet (*Snyderman et al., 1964; Wendel et al., 1989*). 2. Die Gabe von L-Isoleucin führte bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit (*Dent & Westall, 1961; Snyderman et al., 1964*) und bei gesunden Probanden (*Schadewaldt et al., 1990*) zu einem mehr oder weniger deutlichen und persistierenden Anstieg der L-Alloisoleucin-Konzentration in vivo. Vergleichbares wurde in kultivierten Hautfibroblasten von Normalpersonen und Patienten mit Ahornsirupkrankheit (*Schadewaldt et al., 1990*) bei Belastungen mit L-Isoleucin beobachtet. 3. Auch führte die Gabe von großen Mengen S-3-Methyl-2-oxopentanoat übereinstimmend bei Patienten (*Walser et al., 1981*) und Labortieren (*Weinberg & Walser, 1977; Funk et al., 1987*) neben der Akkumulation von L-Isoleucin auch immer zur Bildung von gewissen Mengen L-Alloisoleucin. 4. Darüber hinaus gibt es einige Hinweise darauf, daß auch der umgekehrte Stoffwechselweg in gewissem Ausmaß in vivo beschritten wird: Bei Tieren, die mit einer L-Isoleucin-armen Diät ernährt wurden, förderte eine Supplementierung der Nahrung mit *R*- oder *razemischem R,S*-3-Methyl-2-oxopentanoat das Wachstum, jedoch in geringerem Maß als ein Zusatz von S-3-Methyl-2-oxopentanoat (*Meister & White, 1951; Funk et al., 1987*). Dagegen förderte der Zusatz von L-Alloisoleucin zur Nahrung das Wachstum nicht (*Greenstein et al., 1951*). Die vorliegenden Befunde über den Transfer der  $^{13}\text{C}$ -Markierung zeigen nun unzweifelhaft, daß das Kohlenstoff-Skelett des L-Isoleucins der physiologische Vorläufer von L-Alloisoleucin beim Menschen ist.

Für die Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin und L-Alloisoleucin wurde der physiologische enterale Weg gewählt. Die Plasmakinetik von L-Isoleucin und L-Alloisoleucin in dem kombinierten Bolustest deutet darauf hin, daß hinsichtlich der Geschwindigkeit der carrier-vermittelten Resorption im Darm und der Freisetzung in die Blutbahn keine Unterschiede zwischen den beiden diastereomeren verzweigt-kettigen L-Aminosäuren bestehen. Vergleicht man den zeitlichen Verlauf der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den Plasmametaboliten, zeigt

sich, daß die Kinetik der Isotopenmarkierung in den von L-Isoleucin abgeleiteten Metaboliten, einschließlich L-Alloisoleucin, immer zeitlich deutlich verzögert zu der Kinetik der  $^{13}\text{C}$ -Markierung des L-Isoleucins verlief. Daher ist höchst unwahrscheinlich, daß eine Umwandlung von L-Isoleucin zu L-Alloisoleucin während der initialen Passage des Gastrointestinal-Traktes (first-pass-Effekt) stattfand. Die vorliegende Tracerkinetik legt nahe, daß die Bildung von L-Alloisoleucin ubiquitär möglich ist und, wie weiter unten im einzelnen erläutert wird, primär in Organen mit hoher Kapazität zur L-Aminosäuren-Transaminierung, d.h. vorallem in der Skelettmuskulatur (*Goto et al., 1977; Suryawan et al., 1998*), erfolgen dürfte.

Bei den Experimenten wurde die  $^{13}\text{C}$ -Markierung in den Plasmametaboliten in der zeitlichen Reihenfolge L-Isoleucin > S-3-Methyl-2-oxopentanoat  $\cong$  R-3-Methyl-2-oxopentanoat >> L-Alloisoleucin nachweisbar. Diese Abfolge legt nahe, daß ausgehend von L-Isoleucin die beiden enantiomeren verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren rasch und gleichzeitig, jedoch in recht unterschiedlichen Mengen, gebildet werden und L-Alloisoleucin erst allmählich entsteht. Da eine Umwandlung der L-Isoleucin-Metabolite ineinander durch spontane nicht-enzymatische Reaktionen unter physiologischen Bedingungen sicher ausgeschlossen werden kann (vgl. Einleitung), ist die durch die verzweigt-kettige L-Aminosäuren-Aminotransferase katalysierte Reaktion der einzige Schritt der zu der vorliegenden Tracerkinetik beitragen kann. Die vorliegenden Befunde weisen darauf hin, daß R-3-Methyl-2-oxopentanoat als unvermeidbares Nebenprodukt bei der enzymkatalysierten Transaminierung von L-Isoleucin entsteht. Es wäre daher möglich, daß die Aminotransferase gleichzeitig die Funktion einer S-3-Methyl-2-oxopentanoat-Razemase aufweist. Die Existenz einer solchen Enzymaktivität wird seit langem postuliert (*Walser et al., 1981*), um den Unterschied zwischen der schnellen S- zu R-2-Oxosäure-Racemisierung bei Hunden in vivo und der fehlenden Racemisierung in gepufferten Lösungen in vitro zu erklären (*Meister & White, 1951; Weinberg & Walser, 1977; Mamer & Reimer, 1992*).



Schema 2: Stoffwechselweg zur Entstehung von L-Alloisoleucin aus L-Isoleucin über *R*-3-Methyl-2-oxopentanoat basierend auf den vorliegenden Tracer-Untersuchungen. Die früher vorgeschlagenen Mechanismen 1 (Keto-Enol-Tautomerisierung; Meister & White, 1951; Snyderman et al., 1964) und 2 (C<sub>3</sub>-Epimerisierung; Mamer & Reimer, 1992) sind mit den verfügbaren experimentellen Daten nicht vereinbar (siehe Diskussion). Der Pyridoxal-5-Phosphat-Anteil der beteiligten verzweigtkettigen Aminosäuren-Aminotransferase ist als R-CHO dargestellt.

*Mamer & Reimer (1992)* wiesen bezüglich des Mechanismus kürzlich darauf hin, daß nach Bindung des L-Isoleucins an das Pyridoxal-5-Phosphat der Aminotransferase, theoretisch am  $\beta$ -C-Atom des L-Isoleucins in der Ketimin-Form eine Tautomerisierung über das Enamin möglich ist (s. Schema 2). Im Verlauf der enzymatischen Reaktion könnten daher die *S*- und *R*-Formen des Ketimins gebildet werden. Durch Hydrolyse des *R*-Ketimins könnte dann *R*-3-Methyl-2-oxopentanoat entstehen. Alternativ könnte nach Umwandlung zum *R*-Aldimin L-Alloisoleucin hydrolytisch direkt von der Aminotransferase freigesetzt werden. *Mamer & Reimer (1992)* favorisierten aus theoretischen Erwägungen die direkte Bildung von L-Alloisoleucin aus L-Isoleucin auf der Stufe der Transaminierung, ohne jedoch experimentelle Beweise geliefert zu haben. Wäre in den Untersuchungen L-Alloisoleucin direkt aus dem verabreichten  $^{13}\text{C}$ -markierten L-Isoleucin gebildet worden, wäre die  $^{13}\text{C}$ -Markierung zuerst im L-Alloisoleucin und dann zeitlich verzögert im *R*-3-Methyl-2-oxopentanoat erschienen. Wenn der Weg der Markierung von L-Isoleucin zum *R*-3-Methyl-2-oxopentanoat über L-Alloisoleucin verlaufen würde, wäre darüber hinaus, aufgrund der hohen Verdünnung durch das applizierte nicht-markierte L-Alloisoleucin, in dem kombinierten Bolustest L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin und L-Alloisoleucin keine  $^{13}\text{C}$ -Markierung im *R*-3-Methyl-2-oxopentanoat, nachweisbar gewesen. Wenn L-Isoleucin der direkte Vorläufer von L-Alloisoleucin wäre, wäre auch die Rate der L-Alloisoleucin-Bildung abhängig von der L-Isoleucin-Konzentration. Der Verlauf der L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma müßte dann die von L-Isoleucin widerspiegeln. Dies wurde jedoch weder in den vorliegenden Experimenten noch in früheren oralen Bolustests mit hochdosiertem L-Isoleucin ( $1.5 \text{ mmol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) beobachtet. In den letzteren Experimenten wurden maximale Plasmakonzentrationen von L-Isoleucin etwa 1-2 Stunden nach Bolusgabe und die von L-Alloisoleucin zeitlich stark verzögert, nach 6-8 Stunden, erreicht (*Schadewaldt et al., 1990*). Im Gegensatz dazu war, sowohl bei hoher als auch bei niedriger Dosierung von L-Isoleucin, die Kinetik der 3-Methyl-2-oxopentanoat-Konzentration mit der der Vorläufer-Aminosäure vergleichbar, was auf die Konzentrationsabhängigkeit der Transaminierung hinweist. Die Unterschiede in der Plasmakinetik zwischen

3-Methyl-2-oxopentanoat und L-Alloisoleucin nach einer Belastung mit L-Isoleucin scheinen unter in vitro Bedingungen noch stärker ausgeprägt zu sein (*Schadewaldt et al., 1990*).

Insgesamt deuten die verfügbaren experimentellen Befunde darauf hin, daß eine L-Alloisoleucin-Bildung in vivo über 3-Methyl-2-oxopentanoat-Intermediate und nachfolgender „Re“-Transaminierung wahrscheinlicher ist, als über die  $\beta$ -Epimerisierung der L-Aminosäure.

Als metabolischer Vorläufer von L-Alloisoleucin kommt nicht nur *R*-3-Methyl-2-oxopentanoat in Frage. Aufgrund der Reversibilität der Aminotransferase-Reaktion wird L-Alloisoleucin wahrscheinlich auch als Nebenprodukt bei der natürlichen „Re“-Transaminierung von *S*-3-Methyl-2-oxopentanoat gebildet. Die vorliegenden Befunde und die bereits früher erwähnten Belastungstest mit *S*-3-Methyl-2-oxopentanoat (*Weinberg & Walser, 1977; Walser et al., 1981; Funk et al., 1987*) legen nahe, daß die Rate L-Alloisoleucin-Bildung aus *S*-3-Methyl-2-oxopentanoat vergleichsweise niedrig ist. Daher ist wahrscheinlich die Ratenkonstante für die L-Alloisoleucin-Bildung aus der *R*-2-Oxosäure deutlich höher als die für die L-Alloisoleucin-Produktion über „Re“-Transaminierung der *S*-2-Oxosäure. Dennoch kann aufgrund der deutlich unterschiedlichen Poolgrößen von *R*- und *S*-3-Methyl-2-oxopentanoat in vivo (Relation in humanem Plasma 1:30) nicht ausgeschlossen werden, daß die Transaminierung beider Enantiomere zur L-Alloisoleucin-Bildung beiträgt. Das Verhältnis zwischen der L-Alloisoleucin-Bildung aus *R*- und der aus *S*-3-Methyl-2-oxopentanoat kann jedoch aus den vorliegenden Experimenten nicht abgeleitet werden. Denkbar ist, daß diese Relation z.B. anhand in vivo Untersuchungen mit gleichzeitiger Gabe von unterschiedlich stabil-Isotopen-markierten Enantiomeren der 2-Oxosäuren letztlich erfaßt werden kann.

Wenn die L-Alloisoleucin-Bildung in vivo primär aus dem 3-Methyl-2-Oxosäure-Pool über Transaminierung erfolgt, stellt sich die Frage nach den zugrunde liegenden Ursachen. Eine mögliche Erklärung könnte in den unterschiedlichen Größen und Interaktionen der intra- und extrazellulären L-Amino- und 2-

Oxosäure-Pools liegen. Die intrazellulären Konzentrationen der verzweigtkettigen 2-Oxosäuren sind deutlich niedriger als die extrazellulären Konzentrationen (Crowell *et al.*, 1988; Matsuo *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu sind die Konzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren intrazellulär etwas höher als extrazellulär (Askanazi *et al.*, 1980). Daher dürfte das 3-Methyl-2-oxopentanoat des extrazellulären Kompartments den größten Teil des 2-Oxosäure-Körperpools ausmachen. Offensichtlich wird dieser Pool durch eine recht effektive Ausschleusung von intrazellulär nicht oxidativ abgebauten 2-Oxosäuren gespeist (vgl. z.B. Abb. 4). Die beachtliche Änderung der <sup>13</sup>C-Markierung in den Plasmapools des 3-Methyl-2-oxopentanoates in Relation zu den zu den relativ geringfügigen Änderungen der Konzentrationen und der weitgehend vergleichbaren Markierungskinetik in der Vorläufer-L-Aminosäure deuten auf ein beachtliches "Cycling" von Kohlenstoff-Körpern zwischen dem intrazellulären L-Isoleucin-Pool und dem extrazellulären 2-Oxosäure-Pool hin, daß durch die gemeinsame Aktivität von Aminotransferase und zellulären Transportmechanismen katalysiert wird. In vivo (Matthews *et al.*, 1980; Chinkes *et al.*, 1996) und in vitro Untersuchungen (Schadewaldt *et al.*, 1988; Schadewaldt *et al.*, 1989) zeigen, daß 2-Oxosäuren, die von außen in das intrazelluläre Kompartiment aufgenommen werden, bevorzugt zu den entsprechenden Aminosäuren retransaminiert und nicht direkt durch oxidative Decarboxylierung abgebaut werden. Daher ist durchaus vorstellbar, daß 3-Methyl-2-oxopentanoat, aus dem extrazellulären Kompartiment aufgenommen, den primären Vorläufer darstellt aus dem der L-Alloisoleucin-Pool durch 2-Oxosäure-Transaminierung gespeist wird. Eine vorübergehende Speicherung der 2-Oxosäure im metabolisch weitgehend inaktiven Extrazellulärraum des Körpers könnte ursächlich sein für den verzögerten Anstieg von L-Alloisoleucin im Vergleich zum L-Isoleucin im Plasma von ahornsirupkranken Patienten und den hier untersuchten gesunden Probanden.

Bei den Probanden dürfte ein Teil des intrazellulär gebildeten *R*-3-Methyl-2-oxopentanoates über den sog. „*R*-Pathway“ des L-Isoleucin-Metabolismus abgebaut worden sein (vgl. Abb. 4). Der Abbau über diesen Stoffwechselweg

ist unvollständig. Die Hauptprodukte, die letztlich über die Nieren ausgeschieden werden, sind 2-Ethylhydracryl- und Ethylmalonsäure (*Stalder 1959; Mamer et al., 1976*). Beim Gesunden können diese Substanzen über den Urin mit einer Rate von bis zu  $0.05 \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  ausgeschieden werden (abgeschätzt anhand der Ergebnisse aus *Stalder 1959* und *Mamer et al., 1976*). Die Rate der Ganzkörper-L-Isoleucin-Oxidation gesunder Probanden im postabsorptiven Zustand liegt bei  $10 \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  (*Bodner et al., 1997*). Vergleicht man diese Raten, so zeigt sich, daß der metabolische Fluß durch den „R-pathway“ unter normalen Bedingungen weit weniger als 1 % des gesamten Flußes durch den „S-pathway“ ausmacht.

Physiologisch könnte der „R-pathway“ ein Mechanismus zum Abbau des bei der Transaminierungsreaktion unvermeidbar entstehenden R-3-Methyl-2-oxopentanoates darstellen. Offensichtlich wurde jedoch ein Teil des R-3-Methyl-2-oxopentanoats nicht sofort nach der Entstehung weiter oxidativ abgebaut, sondern in den Extrazellulärraum transportiert und akkumuliert schließlich im L-Alloisoleucin-Pool. Da L-Alloisoleucin nicht für die Proteinsynthese verwendet wird (*Batshaw et al., 1976*), seine renale Clearance gering ist (*Schadewaldt et al., 1999*) und zusätzlich ein relativ schlechtes Substrat für die verzweigtkettigen L-Aminosäuren-Aminotransferase darstellt (*Schadewaldt et al., 1996*), scheint L-Alloisoleucin vor allem eine vergleichsweise metabolisch inaktive Speicherform der reaktiven R-2-Oxosäure zu sein. Die im Vergleich zum Vorläufer L-Isoleucin niedrigeren Bildungs- und Abbauraten von L-Alloisoleucin *in vivo* werden bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit besonders deutlich. Bei diesen Patienten wurde durchgängig eine im Vergleich zum L-Isoleucin verzögerte Plasmakinetik von L-Alloisoleucin gefunden (*Snyderman et al., 1964; Wendel et al., 1989*).

Insgesamt konnte in den Experimenten anhand der Kinetik der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den Isoleucin-Plasmametaboliten gesunder Probanden nach oralem L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Isoleucin-Bolus zum ersten Mal gezeigt werden, daß *in vivo* das Kohlenstoffskelett des L-Alloisoleucin von L-Isoleucin stammt. Darüber

hinaus wurde gezeigt, daß *R*-3-Methyl-2-oxopentanoat rasch als Nebenprodukt bei der Transaminierung von L-Isoleucin gebildet wird und L-Alloisoleucin in einer nachfolgenden relativ langsamen „Re“-Transaminierung entsteht. Inwieweit die Nebenprodukt-Bildung während der „Re“-Transaminierung von *S*-3-Methyl-2-oxopentanoat zur L-Alloisoleucin-Bildung in vivo mitbeiträgt, muß in weiterführenden in vivo-Untersuchungen geklärt werden.



## Kapitel 10

# L-Alloisoleucin als pathognomonischer Parameter der Ahornsirupkrankheit\*

**Zusammenfassung.** In der vorliegenden Arbeit wurde die Aussagefähigkeit der Plasmakonzentration von L-Alloisoleucin, einem Metaboliten, der in vivo aus L-Isoleucin gebildet wird, für die Diagnosestellung bei Ahornsirupkrankheit geprüft. Referenzwerte für die L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma wurden bei gesunden Erwachsenen, Kindern (3 – 11 Jahre) und Kleinkindern (< 3 Jahre) etabliert und lagen bei  $1.9 \pm 0.6 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (MW  $\pm$  SD; n = 35),  $1.6 \pm 0.4 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (n = 17) und  $1.4 \pm 0.5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (n = 50). Die Wirkung einer L-Isoleucin-Aufnahme mit der Nahrung wurde in oralen Bolustests an gesunden Kontrollpersonen nach Übernachtsfasten untersucht. Bei der Gabe von 38 (n = 6) bzw.  $1527 \mu\text{mol L-Isoleucin} \times (\text{kg KG})^{-1}$  (n = 3) betrug der maximale Konzentrationsanstieg von L-Isoleucin im Plasma  $78 \pm 24$  bzw.  $1763 \pm 133 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  über basal. Ein Anstieg der L-Alloisoleucinspiegel war jedoch bei der niedrigen Dosierung kaum meßbar ( $< 0.3 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) und nur gering bei der hohen Dosierung (mittlerer Maximalanstieg:  $+ 5.5 \pm 2.1 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ). Bei Patienten mit Diabetes mellitus, ketotischer

Hypoglykämie, Phenylketonurie und bei obligat heterozygoten Eltern von ahornsirupkranken Patienten waren die L-Alloisoleucin-Konzentrationen normal. Daher wurde eine L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma von  $5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  als „cut-off“-Wert benutzt. Bei Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit (n = 7) lag die L-Alloisoleucin-Konzentration in 2451 von 2453 nicht-selektierten Plasmaproben über dem „cut-off“-Wert. Bei Patienten mit varianter Form der Erkrankung (n = 9) war die L-Alloisoleucin-Konzentration  $> 5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  in allen Plasmaproben, die zur Diagnosestellung führten, und in 94 % der Proben, die zur Kontrolle der metabolischen Einstellung entnommen wurden (n = 624). Bei den anderen verzweigtkettigen L-Aminosäuren lag die Häufigkeit der diagnostisch relevanten Konzentrationserhöhungen bei  $< 45\%$ . Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma über dem „cut-off“-Wert ( $5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) der spezifischste und sensitivste diagnostische Parameter für alle Formen der Ahornsirupkrankheit darstellt.

---

\* publiziert als: *Significance of L-alloisoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease*  
Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U (1999) Clin Chem 45:  
1734-1740

## 10.1 Einleitung

Die Ahornsirupkrankheit ist eine angeborene Stoffwechselerkrankung, bei der der Abbau der essentiellen verzweigtkettigen L-Aminosäuren L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin und der korrespondierenden 2-Oxosäuren auf der Stufe des mitochondrialen verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes (E.C. 1.2.4.4) beeinträchtigt ist. Als Folge des Enzymdefektes akkumulieren die verzweigtkettigen Metabolite, die in höheren Konzentrationen über bisher ungeklärte Mechanismen zu neurotoxischen Effekten führen können. Man unterscheidet zwei klinische Formen der Erkrankung: eine schwere (klassische) Formen, die eine sehr geringe Aktivität des verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes in kultivierten humanen Hautfibroblasten aufweisen (< 2 % der Norm), und variante Formen, mit variablen residualen Enzymaktivitäten (in vitro: 2 - 40 % der Norm) (Übersicht bei *Chuang & Shih, 1995*). Bei Patienten mit klassischer Form der Erkrankung treten im Verlauf der ersten Lebenswoche schwere neurologische Symptome und ein Ahornsirup-ähnlicher Geruch auf. Sehr stark erhöhte Konzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren im Plasma sichern die Diagnose.

Die Detektion von Patienten mit milder, varianter Form der Ahornsirupkrankheit kann jedoch schwierig sein (*Chuang & Shih, 1995*). Bei diesen Patienten können Diagnose-weisende klinische Symptome über einen Zeitraum von Monaten, Jahren oder Jahrzehnten ausbleiben (*Fisher & Gerritsen, 1971; Zaleski et al., 1973; Saudubray et al., 1982*). Werden die Patienten nicht im Neonatal-Screening detektiert, so wird eine späte Diagnose in der Regel erst beim Auftreten einer lebensbedrohlichen metabolischen Krise gestellt, die meist durch interkurrente Infekte in nicht vorhersehbarer Weise ausgelöst wird (Zusammenstellung der Literatur bei *Chuang & Shih, 1995*). So wurde z.B. kürzlich bei zwei 4 und 5 Jahre alten deutschen Patienten, die im Neonatal-Screening nicht entdeckt worden waren, im Verlauf einer schweren metabolischen Krise die Diagnose variante Ahornsirupkrankheit gestellt.

Eine frühe Diagnose ist bei Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit entscheidend, damit die Entwicklung lebensbedrohlicher metabolischer Krisen, durch Einleitung adäquater therapeutischer Maßnahmen, vermieden wird. In Abwesenheit schwerer klinischer Symptome weisen die Patienten jedoch fast normale oder nur moderat erhöhte Plasmaspiegel von L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin auf, die mit Spiegeln vergleichbar sind, wie sie auch bei katabolen Zuständen oder bei sekundären Störungen des Aminosäurestoffwechsels (z.B. ketotische Hypoglykämie und Diabetes mellitus (*Carlsten et al., 1966; Adibi, 1968; Felig et al., 1969; Felig et al., 1970; Hambræus et al., 1972; Held et al., 1976*) auftreten können. Daher wird ein geeigneter, für die Ahornsirupkrankheit spezifischer Parameter benötigt, der eine frühe Differentialdiagnose der varianten Form der Ahornsirupkrankheit erlaubt.

Wir haben daher die (patho)physiologische Bedeutung der L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma für die Differentialdiagnose der Ahornsirupkrankheit geprüft. L-Alloisoleucin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure und wird in vivo aus L-Isoleucin gebildet (*Mamer & Reimer, 1992; Schadewaldt et al., 2000*). L-Alloisoleucin ist immer in humanem Plasma vorhanden und kann zuverlässig zusammen mit den anderen verzweigkettigen L-Aminosäuren quantifiziert werden (*Schadewaldt et al., 1990*). In der vorliegenden Arbeit wurden Referenzwerte für die Konzentration von L-Alloisoleucin im Plasma etabliert sowie die Wirkung einer L-Isoleucin-Aufnahme mit der Nahrung auf die Plasmaspiegel von L-Alloisoleucin untersucht. Basierend auf der Grundlage dieser Befunde konnte ein „cut-off“-Wert definiert werden. Dieser Wert wurde dann verwendet, um die Sensitivität und Spezifität einer erhöhten L-Alloisoleucin-Plasmakonzentrationen für die Diagnose der Ahornsirupkrankheit zu ermitteln.

## 10.2 Material und Methoden

### 10.2.1 Probanden und Patienten

Die erwachsenen Kontrollpersonen (23 Männer, 12 Frauen; mittleres Alter ( $\pm$  SD)  $28 \pm 9$  Jahre) wurden einer körperlichen Untersuchung unterzogen; bei keinem konnte eine akute oder chronische Erkrankung festgestellt werden. Bei keinem der Kinder (9 Jungen, 8 Mädchen;  $5.6 \pm 2.2$  Jahre) und Kleinkinder (27 Jungen, 23 Mädchen;  $1.1 \pm 1.0$  Jahre) lag eine metabolische Stoffwechselstörung vor. Patienten mit Diabetes mellitus (33 Männer, 36 Frauen;  $54 \pm 14$  Jahre) und mit Phenylketonurie (6 Jungen, 9 Mädchen;  $13 \pm 8$  Jahre) wurden in der Klinik des Diabetes Forschungsinstituts bzw. in der Ambulanz der Universitäts-Kinderklinik betreut. Plasmaproben von Patienten mit ketotischer Hypoglykämie wurden freundlicherweise von Dr. Bodamer, London, UK, zur Verfügung gestellt. Die Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit (4 Jungen, 3 Mädchen;  $13 \pm 4$  Jahre) wurden anhand der neonatalen Manifestation der Erkrankung, einer sehr niedrigen Proteintoleranz, sowie einer residualen L-[1- $^{14}$ C]Leucin-Oxidation in kultivierten Hautfibroblasten von  $< 1$  % der Kontrollen charakterisiert (*Schadewaldt et al., 1989*). Bei den untersuchten obligat Heterozygoten (5 Männer, 5 Frauen;  $38 \pm 9$  Jahre) handelte es sich um Eltern von Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit. Die charakteristischen klinischen Daten der Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Bei allen Patienten wurden die Blutproben im Rahmen einer klinischen Routineuntersuchung zur Kontrolle der metabolischen Einstellung entnommen.

### 10.2.2 Methoden

#### 10.2.2.1 Analytische Verfahren

Die Konzentrationen der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren im Plasma von Kontrollpersonen wurden mit automatischer Aminosäureanalyse (LC 5000, LC

6000, Biotronik, München), unter Verwendung des Analysen-Kurzprogramms von *Schadewaldt et al. (1990)*, bestimmt. Der Variationskoeffizient lag dabei deutlich unter 10 %. Bei einer L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma von 1 bzw. 250  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  betrug der Variationskoeffizient in der Serie ( $n = 10$ ) 7 bzw. 2 % und der Variationskoeffizient von Tag zu Tag ( $n=9$ ) lag bei 8 bzw. 2 %. Die analytische Befunde von externen Patienten mit Ahornsirupkrankheit wurden von den entsprechenden betreuenden Stoffwechselzentren zur Verfügung gestellt, die eine äquivalente Methode zur Bestimmung der Aminosäuren im Plasma verwendeten. Die residuale Aktivität der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase wurde in kultivierten Hautfibroblasten mit L-[1- $^{14}\text{C}$ ]Leucin als Substrat bestimmt (*Schadewaldt et al., 1989*).

#### 10.2.2.2 Bolustests

Nach 12stündigem Übernachtsfasten wurde sechs gesunden Versuchsteilnehmern (5 Männer, 1 Frau;  $31 \pm 5$  Jahre) 38  $\mu\text{mol}$  L-Isoleucin  $\times (\text{kg KG})^{-1}$  (gelöst in 50 ml verdünnter Zitronensäure, 5  $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) oral verabreicht. An den oralen L-Isoleucin-Belastungstests mit 1527  $\mu\text{mol}$  L-Isoleucin  $\times (\text{kg KG})^{-1}$  (sorgfältig gemischt mit 150 ml Natur-Yoghurt) nahmen drei Probanden (2 Männer, 1 Frau;  $29 \pm 9$  Jahre) teil. L-Isoleucin (Bachem, Heidelberg) enthielt  $< 0.03$  % L-Alloisoleucin. Proben des venösen Blutes wurden unmittelbar vor (Kontrollwerte) und nach Applikation des L-Isoleucins (Zeitschemata siehe Abb. 1) entnommen und in EDTA-Monovetten (Becton-Dickinson, Meylan, Frankreich) überführt. Das Plasma wurde durch Zentrifugation gewonnen und die L-Aminosäuren, wie oben beschrieben, quantifiziert. Von allen Versuchsteilnehmern wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Das bei diesen Untersuchungen benutzte Versuchsprotokoll wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt.

### 10.2.3 Auswertung und Statistik

Im allgemeinen sind die Ergebnisse als Mittelwert (MW)  $\pm$  SEM (Anzahl der Bestimmungen in Klammern) angegeben. Die Korrelationen wurden mittels linearer Regression (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) geprüft. Für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test (2seitig) angewendet. Abschätzungen der Sensitivität basieren auf dem Verhältnis von Plasmaproben mit L-Alloisoleucin-Konzentrationen, die über dem „cut-off“-Wert liegen, zur gesamten Anzahl der analysierten Plasmaproben.

## 10.3 Ergebnisse

### Referenzwerte

Zur Etablierung von L-Alloisoleucin-Referenzwerten wurden die Konzentrationen der verzweigkettigen L-Aminosäuren im Plasma von gesunden Erwachsenen, Kindern (3 - 11 Jahre) und Kleinkindern (< 3 Jahre) bestimmt. Die mittleren Konzentrationen von L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin waren bei Kindern und Erwachsenen weitgehend vergleichbar (Tab. 1). Die Konzentrationen von L-Alloisoleucin betragen  $1.6 \pm 0.1$  ( $n = 17$ ) und  $1.9 \pm 0.1$   $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  ( $n = 35$ ). Bei Kleinkindern ( $n = 50$ ) war die mittlere L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma, bei erhöhten Spiegel der anderen verzweigkettigen L-Aminosäuren ( $p < \text{oder} \ll 0.001$ ), geringfügig ( $1.4 \pm 0.1$   $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ), aber signifikant niedriger als bei Erwachsenen ( $p \ll 0.001$ ) (s. Tab. 1).

Tab. 1: Konzentration verzweigtkettiger L-Aminosäuren im Plasma

Probanden	Plasma-Konzentration ( $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ )*				(n)
	Leu	Val	Ile	Allo	
<b>Kontrollen</b>					
Erwachsene	129 $\pm$ 4 (129; 78-165)	232 $\pm$ 7 (233; 145-304)	66 $\pm$ 2 (67; 39-91)	1.9 $\pm$ 0.1 (1.8; 0.7-3.4)	(35)
Kinder (3-11 Jahre)	169 $\pm$ 10 (172; 82-240)	264 $\pm$ 15 (251; 166-407)	77 $\pm$ 5 (73; 41-124)	1.6 $\pm$ 0.1 (1.5; 0.7-2.5)	(17)
Kleinkinder (< 3 Jahre)	178 $\pm$ 8 (188; 63-299)	253 $\pm$ 11 (243; 130-432)	84 $\pm$ 4 (86; 34-147)	1.4 $\pm$ 0.1 (1.4; 0.5-2.6)	(50)
<b>Nicht-MSUD Patienten mit</b>					
Diabetes mellitus	198 $\pm$ 5 (196; 116-318)	316 $\pm$ 9 (306; 194-517)	89 $\pm$ 2 (92; 56-180)	2.2 $\pm$ 0.1 (1.8; 0.8-4.6)	(69)
Phenyl- ketonurie	155 $\pm$ 20 (131; 44-330)	282 $\pm$ 25 (245; 160-464)	79 $\pm$ 10 (65; 40-180)	1.6 $\pm$ 0.1 (1.5; 0.5-2.6)	(15)
Ketotische Hypoglykämie	109 $\pm$ 7 (101; 78-161)	169 $\pm$ 9 (165; 119-211)	56 $\pm$ 3 (53; 47-72)	< 2.5	(10) <sup>†</sup>
<b>MSUD</b>					
Heterozygote Eltern	175 $\pm$ 22 (150; 114-310)	261 $\pm$ 26 (237; 192-455)	79 $\pm$ 11 (63; 53-170)	2.0 $\pm$ 0.3 (1.8; 1.1-3.7)	(10)
Klassische MSUD	409 $\pm$ 7 (344; 2-3794)	245 $\pm$ 3 (222; 17-1308)	182 $\pm$ 2 (168; <1-1290)	127 $\pm$ 1 (115; <1-626)	(2453) <sup>‡</sup>

\* Median und Bereich in Klammern; Proben von <sup>†</sup>5 und <sup>‡</sup>7 verschiedenen Patienten; Abkürzungen: MSUD, Ahornsirupkrankheit

### Bolustests

Um den Einfluß einer L-Isoleucin-Aufnahme mit der Nahrung auf die L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma zu untersuchen, wurden orale Bolustests mit L-Isoleucin an gesunden Probanden durchgeführt. Bei der Gabe von 38  $\mu\text{mol}$  L-Isoleucin  $\times$  (kg KG)<sup>-1</sup> betrug der mittlere maximale Konzentrationsanstieg von L-Isoleucin im Plasma 78  $\pm$  10  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (+ 121  $\pm$  10 %; n = 6) über basal. Ein Anstieg der L-Alloisoleucin-Konzentration war jedoch

praktisch nicht meßbar ( $< 0.3 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ , s. Abb. 1). In Übereinstimmung mit diesen Befunden führte die orale Gabe von L-Isoleucin in der hohen Dosierung ( $1527 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) zu einem sehr deutlichen Anstieg der L-Isoleucin-Konzentration ( $+ 1763 \pm 133 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ;  $n = 3$ ), jedoch nur zu einem geringen Anstieg der L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma ( $+ 5.5 \pm 1.2 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ; s. Abb. 1).

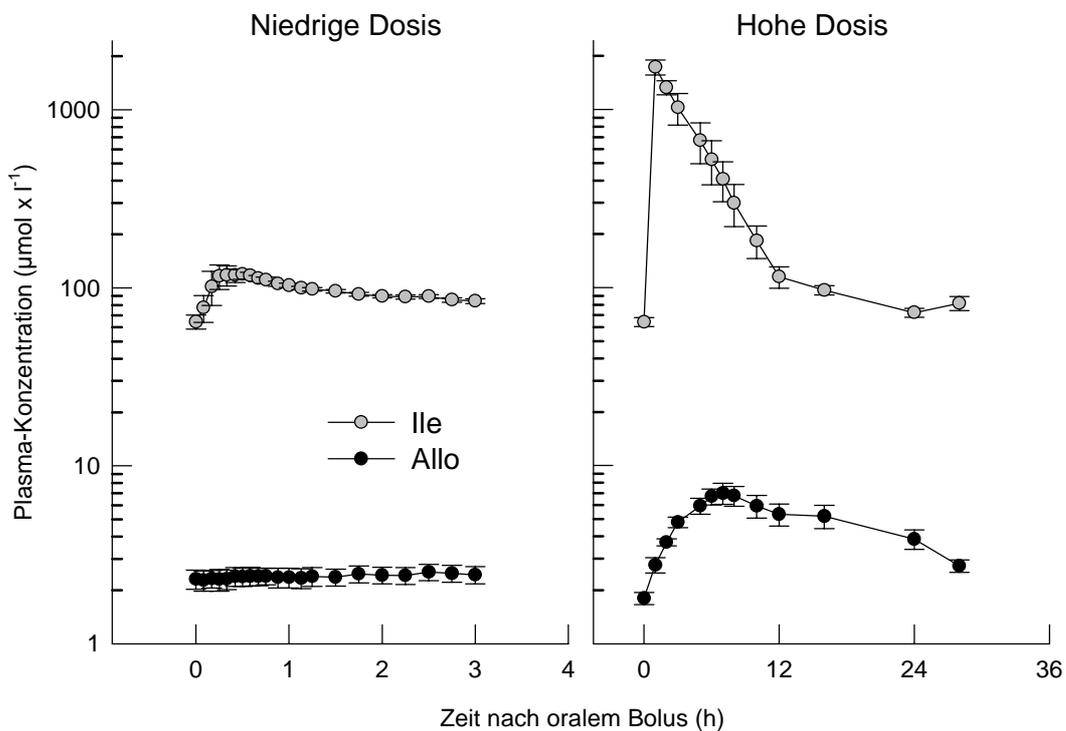


Abb. 1: Effekt des oralen L-Isoleucin-Bolus auf die Plasmaspiegel von L-Isoleucin und L-Alloisoleucin. Gesunde Probanden erhielten nach 12stündigem Übernachtsfasten 38 (niedrige Dosis,  $n = 6$ ) bzw.  $1527 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$  L-Isoleucin (hohe Dosis,  $n = 3$ ). Vor der Applikation des Bolus lagen die Konzentrationen von L-Isoleucin (L-Alloisoleucin) bei  $64 \pm 6$  ( $2.3 \pm 0.3$ ) bzw.  $64 \pm 4$  ( $1.8 \pm 0.1$ )  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Die Plasmakonzentrationen sind als MW  $\pm$  SEM angegeben und zur Vereinfachung semi-logarithmisch dargestellt.

### Nicht-ahornsirupkranke Patienten

Die Konzentration von L-Alloisoleucin wurde zusätzlich im Plasma von Patienten mit verschiedenen anderen Stoffwechselstörungen bestimmt. Patienten mit Diabetes mellitus, die im Mittel signifikant über die Norm erhöhte

L-Leucin- (+ 53 %), L-Valin- (+ 36 %) und L-Isoleucin-Konzentrationen (+35 %) im Plasma ( $p \ll 0.001$  gegenüber erwachsenen Kontrollpersonen) aufwiesen, lag die Konzentration von L-Alloisoleucin im Normbereich (s. Tab. 1). Bei Patienten mit Phenylketonurie und Patienten mit ketotischer Hypoglykämie waren die Konzentrationen der verzweigtkettigen L-Aminosäuren, einschließlich L-Alloisoleucin, ebenfalls normal. Bei keiner der bisherigen Untersuchungsgruppen (gesunde Erwachsene, Kinder und Kleinkinder eingeschlossen) konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationen von L-Alloisoleucin und den Konzentrationen des metabolischen Vorläufers L-Isoleucin festgestellt werden (z.B. Regressionsgleichung für gesunde Personen:  $y = 0.002 (\pm 0.002)x + 1.39 (\pm 0.20)$ ,  $r^2 = 0.008$ ,  $n = 102$ ).

#### Patienten mit Ahornsirupkrankheit

Bei allen Gesunden und nicht-ahornsirupkranken Patienten lagen die Plasmakonzentrationen von L-Alloisoleucin unter  $5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Die Ergebnisse der Bolustests mit reinem L-Isoleucin legen nahe, daß diese Plasmakonzentration bei Gesunden und nicht-ahornsirupkranken Patienten die normale Mengen von verzweigtkettigen L-Aminosäuren mit der Nahrung aufnehmen, nicht überschritten werden dürfte. Daher wurde eine L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma von  $5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  als „cut-off“-Wert für die Diskriminierung ahornsirupkranker und nicht-ahornsirupkranker Patienten verwendet.

Erwähnenswert ist, daß die L-Alloisoleucin-Konzentrationen bei den obligat heterozygoten Eltern von Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit unterhalb des „cut-off“-wertes lagen (s. Tab. 1). Bei Patienten mit klassischer Form der Erkrankung war die L-Alloisoleucin-Konzentration in 99.9 % einer repräsentativen Zahl nicht-selektierter Plasmaproben ( $n = 2453$  von 7 Patienten; s. Tab. 1) über den „cut-off“-Wert von  $5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  erhöht. Zwischen den Plasmakonzentrationen von L-Isoleucin ( $x$ ) und L-Alloisoleucin ( $y$ ) bestand ein hoch signifikanter linearer Zusammenhang ( $y = 0.40 (\pm 0.01)x + 54.6 (\pm 2.0)$ ;  $p \ll 0.001$ ;  $r^2 = 0.419$ ).

Tab. 2: Charakteristische Daten von Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit

Patient	Alter bei Diagnosestellung*	BCOA-DH- Aktivität <sup>†</sup>  (% der Kontrolle)	Protein- Zufuhr <sup>‡</sup>  (g x (kg KG) <sup>-1</sup> x d <sup>-1</sup> )	Konzentrationen im Plasma <sup>§</sup> ( $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ )			Erhöhtes Allo <sup>  </sup>  (Probenanzahl)
				Leu	Ile	Allo	
D.G. (weiblich, *1974)	3 Wochen <sup>¶</sup> (01/80-12/98)	2	0.5-0.6	254 ± 10 (260; 61-496)	145 ± 5 (137; 31-290)	95 ± 4 (92; 15-313)	135/135 (236/236)
Y.M. <sup>¶¶</sup> (weiblich, *1977)	2 Monate <sup>¶</sup> (12/77-04/89)	4	0.5-0.6	347 ± 11 (346; 160-500)	156 ± 6 (157; 38-250)	79 ± 3 (76; 8-132)	71/71 (95/95)
S.C. <sup>¶¶</sup> (weiblich, *1986)	21 Monate <sup>¶</sup> (02/88-08/89)	7	1.2-1.4	421 ± 14 (435; 328-473)	202 ± 5 (199; 175-229)	66 ± 5 (65; 46-107)	12/12 (21/21)
H.H. (männlich, *1985)	7.5 Jahre <sup>¶</sup> (02/92-09/98)	9	0.8-1.2	242 ± 9 (237; 178-327)	107 ± 6 (105; 69-165)	11 ± 1 (12; 7-20)	24/24 (25/25)
S.T. <sup>¶¶</sup> (weiblich, *1977)	3 Wochen <sup>**</sup> (08/77-07/88)	11	1.0-1.5	209 ± 10 (199; 71-474)	101 ± 5 (92; 32-228)	21 ± 3 (15; 1-163)	51/59 (56/64)
T.R. (männlich, *1964)	3.2 Jahre <sup>¶</sup> (10/67-03/98)	15	0.6 - 1.0	304 ± 30 (339; 99-467)	152 ± 12 (150; 77-239)	26 ± 5 (23; 8-62)	13/13 (22/23)
S.K. <sup>¶¶</sup> (männlich, *1979)	3 Wochen <sup>††</sup> (07/79-11/86)	17	1.5-2.0	250 ± 13 (253; 170-336)	121 ± 7 (122; 83-183)	17 ± 3 (15; 2-38)	12/13 (13/14)
D.N. <sup>¶¶</sup> (männlich, *1978)	4 Wochen <sup>††</sup> (11/78-09/98)	25	1.5	278 ± 18 (261; 136-500)	128 ± 9 (110; 60-242)	18 ± 3 (12; 3-97)	28/32 (33/37)
L.F. (weiblich, *1990)	3 Wochen <sup>††</sup> (07/90-12/98)	n.b.	1.0-1.5	245 ± 9 (237; 92-458)	123 ± 5 (118; 46-237)	13 ± 1 (8; 1-61)	76/98 (87/109)

\* in Klammern: Beobachtungszeitraum; <sup>†</sup> bestimmt in kultivierten Fibroblasten (s. Methoden); <sup>‡</sup> diätetischer Bedarf; <sup>¶</sup> ergänzt mit verzweigtkettige Aminosäuren-freier Aminosäuremischung; <sup>§</sup> im Zeitraum guter bis zufriedenstellender metabolischer Einstellung (s. Ergebnisse), Median und Bereich in Klammern; <sup>||</sup> > 5  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ , bezogen auf die gesamte Probenanzahl unter guter bis zufriedenstellender metabolischen Kontrolle, in Klammern: Anzahl im Verhältnis zur Gesamt-Probenzahl; diagnostiziert über: <sup>¶</sup> Metabolische Krise, <sup>\*\*</sup> Ahornsirup-Geruch, <sup>††</sup> Neonatal-Screening; n.b.: nicht bestimmt; zusätzliche Patienten-Daten in <sup>¶¶</sup> Wendel et al., 1989, <sup>§§</sup> Boisse et al., 1979; Abkürzungen: BCOA-DH, verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase

In Plasmaproben mit Konzentrationen der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren in Bereichen, die für eine gute bis zufriedenstellende metabolische Einstellung der Patienten sprechen (Leu: 50-500  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ; Val: 100-700  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ; Ile: 30-300  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ), war die L-Alloisoleucin-Konzentration stets größer als 7  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (MW  $\pm$  SD (Bereich):  $120 \pm 2$  (7-443); n = 1085). In den 208 Plasmaproben mit normalen Konzentrationen der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren (Leu: 50-250  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ; Val: 100-400  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ; Ile: 30-150  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ), lag die L-Alloisoleucin-Konzentration im Mittel bei  $90 \pm 3$  (Bereich: 7-244)  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Insgesamt gab es nur zwei Plasmaproben von Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit, in denen die L-Alloisoleucin-Konzentration unter dem „cut-off“-Wert von 5  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  lag. Diese Proben, die von einem Patienten stammten, war praktisch L-Isoleucin-frei ( $< 1 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ). Weitere sechs Plasmaproben, mit entsprechend niedrigen L-Isoleucin-Konzentrationen, wiesen allerdings L-Alloisoleucin-Konzentration von  $69 \pm 9 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (Bereich: 38-92  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) auf. Dies stimmt gut mit der anhand der obigen Korrelationsanalyse voraussagbaren L-Alloisoleucin-Plasmakonzentration überein.

Bei varianter Form der Ahornsirupkrankheit ist die Anzahl der verfügbaren Daten wesentlich geringer. Daten von neun Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad der Erkrankung sind in Tab. 2 zusammengestellt. Bei all diesen Patienten lag die L-Alloisoleucin-Konzentration in den Plasmaproben, die - vor Beginn der Diättherapie - zur Sicherung der Diagnose entnommen worden waren, über dem „cut-off“-Wert von 5  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Fünf Patienten mit schwerer varianter Form der Ahornsirupkrankheit (Patienten D.G., Y.M., S.C., H.H., T.R.) wiesen, auch bei guter bis zufriedenstellender metabolischer Einstellung, immer deutlich erhöhte L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma auf. Bei Patienten mit milderer varianter Form der Ahornsirupkrankheit waren die Plasmaspiegel etwas niedriger und die individuelle Häufigkeit der über den „cut-off“-Wert erhöhten L-Alloisoleucin-Konzentrationen variabler. Die individuelle Häufigkeit lag jedoch nie unter 78 % (Patient L.F.; vgl. Tab. 2). Bemerkenswert ist, daß bei Patienten mit varianter Form der

Ahornsirupkrankheit in 86 % (153 von 179) der Plasmaproben, die ansonsten normale Konzentrationen verzweigtkettiger L-Aminosäuren (s. oben) aufwiesen, erhöhte L-Alloisoleucin-Konzentrationen gefunden wurden. Insgesamt lag die Inzidenz von L-Alloisoleucin-Konzentration über dem „cut-off“-Wert bei diesen Patienten bei 94 % (n = 624, s. Tab. 2).

## 10.4 Diskussion

Die Befunde bei gesunden Erwachsenen, Kindern und Kleinkindern sowie bei nicht-ahornsirupkranken Patienten bestätigen unsere frühere Behauptung, daß L-Alloisoleucin ein normaler Bestandteile humanen Plasmas ist (*Schadewaldt et al., 1990; Schadewaldt et al., 1996*). Die Konzentrationen von L-Alloisoleucin sind jedoch oft zu niedrig, um verlässlich in der Routine-Aminosäureanalyse bestimmbar zu sein. Interessanterweise lagen die mittleren L-Alloisoleucin-Konzentrationen im Plasma der untersuchten Kinder, trotz erhöhter mittlerer Konzentrationen der anderen verzweigtkettigen L-Aminosäuren, signifikant unter denen von Erwachsenen. Die im Vergleich zu älteren Personen geringere relative Muskelmasse der Kinder könnte eine Erklärung für diese mögliche Altersabhängigkeit darstellen. Höchstwahrscheinlich wird L-Alloisoleucin als Nebenprodukt bei der Transaminierung von L-Isoleucin gebildet (*Mamer & Reimer, 1992; Schadewaldt et al., 2000*) und diese dürfte beim Menschen hauptsächlich in der Muskulatur, in der die Hauptaktivität der verzweigtkettigen L-Aminosäuren-Aminotransferase (E.C. 2.6.1.42) lokalisiert ist (*Suryawan et al., 1998*), stattfinden.

Die Ergebnisse bei Patienten mit Diabetes mellitus zeigen, daß moderat erhöhte Plasmaspiegel der verzweigtkettigen L-Aminosäuren nicht per se zu erhöhten L-Alloisoleucin-Konzentrationen führen. Entsprechend scheint eine transiente Aminoacidämie, wie sie z.B. bei ketotischer Hypoglykämie und Hunger auftritt, nicht mit auffällig erhöhten L-Alloisoleucin-Spiegeln verbunden zu sein (*Carlsten et al., 1966; Adibi, 1968; Felig et al., 1969; Felig et al., 1970;*

*Hambraeus et al., 1972; Held et al., 1976*). Ebenso hatte der nach oraler Gabe der niedrigen L-Isoleucin-Dosis vorübergehende Anstieg der L-Isoleucin-Plasmakonzentration auf das Zweifache der Normwerte keinen signifikanten Einfluß auf die L-Alloisoleucin-Konzentrationen im Plasma. Das bei den hoch-dosierten Bolustests verabreichte L-Isoleucin entsprach einer Gabe von  $4 \text{ g Protein} \times (\text{kg KG})^{-1}$ . Diese Zufuhr übersteigt bei weitem die mit einer normalen Mahlzeit zugeführten Proteinmenge. Der Einfluß auf den Anstieg der L-Alloisoleucin-Konzentration war jedoch gering, trotz eines Anstieg der Plasmakonzentration um etwa das 30fache. Zusammengenommen weisen diese Befunde darauf hin, daß bei Gesunden und bei nicht-ahornsirupkranken Patienten erhöhte L-Isoleucin-Plasmaspiegel und eine normale diätetische Zufuhr von L-Isoleucin nur einen vernachlässigbaren Einfluß auf die L-Alloisoleucin-Konzentrationen. Mit Ausnahme der hoch-dosierten L-Isoleucin-Bolustests wurde bei keiner der nicht-ahornsirupkranken Versuchsgruppen eine L-Alloisoleucin-Plasmakonzentrationen von  $> 5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  beobachtet. Daher wurde diese Konzentration versuchsweise als „cut-off“-Wert für eine retrospektive Analyse bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit verwendet.

Die allgemeine Annahme, daß das Vorkommen von L-Alloisoleucin charakteristisch für Ahornsirupkrankheit ist (*Bremer et al., 1981; Gibson et al., 1996; Chuang & Shih, 1995*), ist anscheinend aber niemals quantitativ belegt worden. Aus den vorliegenden Befunden geht hervor, daß L-Alloisoleucinspiegel unterhalb des „cut-off“-wertes bei Patienten mit klassischer Form Ahornsirupkrankheit extrem selten sind und nur bei zu strenger diätetischer Einstellung auftreten. Im allgemeinen persistieren erhöhte L-Alloisoleucin-Spiegel auch dann, wenn die L-Isoleucin-Plasmakonzentrationen extrem niedrig sind ( $< 1 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ). Letzteres ist bei Ahornsirupkrankheit nicht unerwartet, da gezeigt wurde, daß nach einer L-Isoleucin-Belastung L-Alloisoleucin im Plasma innerhalb von Stunden anstieg, aber mit einer trägen Plasmakinetik innerhalb von Tagen oder sogar Wochen abnahm (*Snyderman et al., 1964; Wendel et al., 1989; Schadewaldt et al., 1991*). In zwei Plasmaproben eines Patienten, der eine stark eingeschränkte

Diät erhielt, lag die L-Alloisoleucin-Konzentration bei  $< 5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  und L-Isoleucin war praktisch nicht mehr nachweisbar. Höchst wahrscheinlich lag bei diesem Patienten ein länger andauernder L-Isoleucin-Mangel vor, der letztlich auch zu einem Verschwinden des Plasma-L-Alloisoleucins.

Die hier untersuchten Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit zeigen ein Spektrum des Schweregrades, das repräsentativ für diese Form der Erkrankung ist. Bei den Patienten war die L-Alloisoleucin-Konzentration in verschiedenen Plasmaproben unterhalb des „cut-off“-Wertes, während die Konzentrationen von L-Isoleucin generell über  $30 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  (untere Normgrenze) lag. Die Häufigkeit von erhöhten L-Alloisoleucin-Spiegeln nahm mit dem Schweregrad der Erkrankung ab. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, bei denen eine abgestufte Verbesserung der metabolischen L-Alloisoleucin-Clearance bei varianter Ahornsirupkrankheit festgestellt wurde, die recht gut der der residualen verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Aktivität der Patienten entsprach (*Schadewaldt et al., 1991*). In der Mehrzahl der Plasmaproben lag jedoch die L-Alloisoleucin-Konzentration bei  $> 5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . In mindestens 78 % der Proben jedes individuellen Patienten wurden erhöhte L-Alloisoleucin-Konzentrationen gefunden, ohne daß klinische Symptome oder extrem erhöhte Konzentrationen der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren vorlagen. Selbst bei Plasmaproben, bei denen die Konzentrationen der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin im Normbereich lagen, betrug die Häufigkeit von über den „cut-off“-Wert erhöhten L-Alloisoleucin-Konzentrationen noch mindestens 70 % (Patientin L.F.; Ergebnisse nicht dargestellt).

Um eine verlässliche Differenzierung zwischen spezifisch durch Ahornsirupkrankheit verursachten Konzentrationserhöhungen und sekundären Störungen im Metabolismus verzweigt-kettiger L-Aminosäuren, wie sie z.B. bei ketotischer Hypoglykämie auftreten können (*Hambreus et al., 1972; Held et al., 1976*), zu ermöglichen, sollten für die Diagnose der Ahornsirupkrankheit die Plasmakonzentrationen der verzweigt-kettigen L-Aminosäuren L-Leucin, L-Valin

und L-Isoleucin sollten über 400, 600 und 250  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  liegen. Bei unseren Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit, lag der prozentuale Anteil der Plasmaproben, mit über die genannten Schwellenwerte erhöhten Konzentrationen bei 43 % für L-Leucin, 2 % für L-Valin und 20 % für L-Isoleucin. Im Vergleich dazu wurde in > 99 % der Proben erhöhte L-Alloisoleucin-Konzentrationen gefunden. Bei den varianten Formen lag die Häufigkeit der Plasmaproben, mit über die genannten Schwellenwerte erhöhten Konzentrationen, bei 28 % für L-Leucin, bei 3 % für L-Valin, bei 14 % für L-Isoleucin, verglichen mit > 94 % für L-Alloisoleucin. Gleichzeitig über die diagnostische Schwellenwerte erhöhten Konzentrationen von L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin fanden sich nur in 2 % aller Proben bei klassischer Ahornsirupkrankheit und bei 3 % der Proben von Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit.

Insgesamt weisen die vorliegenden Befunde darauf hin, daß die L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma der spezifischste und sensitivste diagnostische Parameter sowohl für die klassische Form als auch für die varianten Formen der Ahornsirupkrankheit ist. Die Bestimmung der L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma erlaubt, auch in Episoden mit milden klinischen Symptomen und vor dem Auftreten einer schweren metabolischen Krise, eine Differentialdiagnose der Ahornsirupkrankheit. Aufgrund der geringen und sehr variablen fraktionellen renalen Clearance der verzweigtkettigen Metabolite, ist eine Analyse im Urin sehr viel weniger aussagekräftig als die im Plasma (*Schadewaldt et al., 1999*). Unter Verwendung des „cut-off“-Wertes für die L-Alloisoleucin-Plasmakonzentration von 5  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  kann die Sensitivität dieses Parameters für die Detektion varianter bzw. klassischer Ahornsirupkrankheit, auch ohne begleitende klinische Symptomatik, auf > 90 % bzw. > 99 % abgeschätzt werden. Bei Auftreten klinischer Symptome kann von einer Sensitivität von nahezu 100 % ausgegangen werden. Die diagnostische Spezifität dieses Parameters dürfte aufgrund dieser Untersuchungen praktisch 100 % betragen.



## Teil VI

### Auswertung von [ $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustests

Im folgenden wird die Anwendbarkeit eines 7-Kompartiment-Modells für die Ermittlung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation mittels oraler Bolustests an gesunden Probanden evaluiert.

---



## Kapitel 11

### Modellierung des L-Leucin-Katabolismus mittels Kompartiment-Analyse \*

**Zusammenfassung.** Unter Verwendung eines 7-Kompartiment-Modells wurde anhand von oralen L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustests ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) die Ganzkörper-L-Leucinoxidationsrate bei fünf gesunden Probanden ermittelt. Das Model berücksichtigt Transport und Resorption im Gastrointestinal-Trakt in ein zentrales L-Leucin-Kompartiment. Dieses steht reversibel mit dem Protein-Kompartiment und dem Kompartiment für die korrespondierende 2-Oxosäure in Verbindung. Aus dem letzteren erfolgt die <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Bildung differenziert in ein schnelles und ein langsames CO<sub>2</sub>-Kompartiment. Diese beiden sind reversibel mit einem zentralen CO<sub>2</sub>-Kompartiment verbunden, aus dem dann die Exhalation erfolgt. Die Schätzung der Parameter erfolgte mit Hilfe der Optimierungsroutine fmins des Programms MATLAB. Mit dem Modell war eine gute Beschreibung der experimentell ermittelten zeitlichen Verläufe der <sup>13</sup>C-markierten Metabolite

(L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin, 4-Methyl-2-oxo[1-<sup>13</sup>C]pentanoat, <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>) möglich. Die mit dem Modell ermittelte mittlere in vivo L-Leucinoxidationsrate lag bei  $0.365 \pm 0.071 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ . Die Zuverlässigkeit der Modellrechnung wurde geprüft, indem L-Leucinoxidationsraten für primed continuous infusion-Versuche (Priming: L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin,  $5 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ; NaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub>,  $1.2 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ , Infusion: L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin,  $5 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ) anhand der individuellen Parametersätze für die Probanden vorausberechnet und mit experimentellen Ergebnissen verglichen wurden. Insgesamt ergab sich, bei einer gewissen intraindividuellen Variabilität, mit  $0.358 \pm 0.105 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  bzw.  $0.324 \pm 0.099 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  eine gute Übereinstimmung zwischen der mittleren experimentell ermittelten und der vorausgerechneten Rate der Ganzkörper-L-Leucinoxidation.

---

\* publiziert als: *Compartmental approach for evaluation of plasma kinetics and <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-exhalation after oral loading with L-[1-<sup>13</sup>C]leucine*

Bodner A, Wendel U, Renn W, Schadewaldt P (1996) *Isotopes Environ Health Stud* 32: 237-246

## 11.1 Einleitung

L-Leucin und die anderen natürlichen verzweigt-kettigen Aminosäuren L-Valin und L-Isoleucin machen etwa 40 % der für den Menschen essentiellen Aminosäuren aus (*Harper et al., 1984*). Untersuchungen zur Regulation des Katabolismus dieser Aminosäuren sind bei Normalpersonen und vor allem auch bei verschiedenen Erkrankungen (*Desai et al., 1987*), insbesondere bei Ahornsirupkrankheit (*Chuang & Shih, 1995*), von Bedeutung. Zur Untersuchung der Ganzkörper-L-Leucinoxidation beim Menschen mittels stabil-Isotopen-markierter Verbindungen können zwei recht unterschiedliche Versuchsansätze angewendet werden: der primed continuous infusion-Ansatz und der intravenöse oder orale Bolustest. Bei der primed continuous infusion-Technik handelt es sich um einen nicht-kompartimentellen, steady state-Ansatz, der nur wenige Informationen liefert (*Wolfe, 1992a*). Dieser Ansatz wird jedoch fast ausschließlich angewendet (z.B. *Matthews et al., 1981; Meguid et al., 1986; Cortiella et al., 1988; Carlson et al., 1994; Lariviere et al., 1994; Masud et al., 1994*), da sowohl die Durchführung als auch die Auswertung der Experimente einfach ist. Bolus-Tests sind dagegen prinzipiell kompartimentelle Versuchsansätze (*Wolfe, 1992b*). Da die Auswertung dieser Experimente sehr aufwendig ist, sind bisher nur wenige solcher Untersuchungen am Menschen durchgeführt worden (*Cobelli et al., 1991; Ellerine et al., 1993; Elsas et al., 1993*).

*Elsas et al. (1993)* verwendeten den kompartimentellen Ansatz in einem nicht-invasiven Atemtest mit oraler Gabe von L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin. Dabei wurde lediglich die Kinetik der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation bestimmt und daraus die Ganzkörper-L-Leucinoxidation abgeleitet. Bei der Überprüfung dieses Ansatzes ergab sich jedoch, daß bei gesunden Probanden eine erhebliche inter- und intraindividuelle Variabilität der Leucin-Kinetik feststellbar ist, durch die wiederum der zeitliche Verlauf der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation wesentlich beeinflußt wird. Diese Variabilität scheint bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit noch ausgeprägter zu sein (*Schadewaldt et al., 1994*). Daher muß bei den

Untersuchungen zur Ganzkörper-L-Leucinoxidation, bei denen der kompartmentelle Versuchsansatz angewendet wird, die Plasmakinetik mitberücksichtigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird ein 7-Kompartiment-Modell für die Analyse solcher oralen L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustests bei gesunden Probanden beschrieben. Zur Plausibilitätsprüfung wurden mit diesem Modell die Ergebnisse für primed continuous infusion-Tests vorrausgerechnet und mit den experimentell ermittelten Werten verglichen.

## 11.2 Material und Methoden

### 11.2.1 Material

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von Merck (Darmstadt), Sigma Chemie (München) oder Boehringer (Mannheim) bezogen. L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin (99 % 1-<sup>13</sup>C) und NaHCO<sub>3</sub> stammte von Promochem (Wesel). Reinheit und Isotopengehalt des L-[1-<sup>13</sup>C]Leucins wurden mittels automatischer Aminosäureanalyse (s. 11.2.3.2) bzw. GC-MS-Analyse (s. 11.2.3.2) bestimmt und entsprachen den Spezifikationen des Herstellers.

### 11.2.2 Probanden

Fünf gesunde Probanden (4 Männer, 1 Frau) nahmen an den oralen Bolustests und den primed-continuous infusion-Untersuchungen teil. Das Alter der Probanden lag zwischen 24 und 44 Jahren (MW ± SD 31 ± 8 Jahre), das Gewicht zwischen 63 und 75 kg (71 ± 4 kg) und die Größe zwischen 160 und 191 cm (175 ± 10 cm). Bei der körperlichen Untersuchung der Teilnehmer wurden weder akute noch chronische Erkrankungen festgestellt. Von allen Probanden wurde vor der Teilnahme an den Untersuchungen eine schriftliche

Einverständniserklärung eingeholt. Das bei diesen Untersuchungen verwendete Versuchsprotokoll wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geprüft und genehmigt.

### 11.2.3 Methoden

#### 11.2.3.1 In vivo Untersuchungen

##### Oraler Bolustest

Bei der Durchführung des Tests wurde wie in 2.2.3.1 beschrieben verfahren. Den Versuchsteilnehmern wurden, unter Ruhebedingungen im Liegen, nach 12stündigem Übernachtsfasten Proben der Exhalationsluft und venöse Blutproben (Kontrollwerte) entnommen und anschließend zwischen 8:30 und 9:30 Uhr L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin ( $38 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) oral als Bolus verabreicht. Danach wurden weitere Blut- und Atemluftproben im Abstand von 15 Minuten über eine Dauer von 3 Stunden entnommen.

##### Primed continuous infusion-Test

Der gesamte Versuch fand unter Ruhebedingungen im Liegen statt. Nach 12stündigem Übernachtsfasten wurde den Probanden zwischen 8.00 und 9.00 Uhr eine Venenverweilkanüle (Vasofix-Braunüle, 1.2 mm; B. Braun, Melsungen) in die V. basilica des linken Armes gelegt. Über diese Kanüle wurde das priming mit L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin ( $5 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ , in  $0.154 \text{ mol NaCl} \times \text{l}^{-1}$ ) und  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  ( $1.2 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1}$ ) appliziert. Unmittelbar danach wurde über die Kanüle L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin ( $5 \mu\text{mol} \times (\text{kg KG})^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ) für eine Dauer von 4 Stunden kontinuierlich infundiert. Zur Blutentnahme wurde den Probanden eine weitere Venenverweilkanüle (Vasofix-Braunüle, 1.4 mm; B. Braun) in eine geeignete oberflächliche Handvene des kontralateralen Armes gelegt. Zur Arterialisierung des venösen Blutes befand sich die Hand in einem beheizten Kasten (60 °C) (*Copeland et al., 1992*). Proben der Exhalationsluft wurden in Atembeuteln gesammelt (*Schadewaldt et al., 1994*). Kontrollproben wurden vor Gabe des primings entnommen. Die Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Exhalation erfolgte

kontinuierlich mittels Atemgasanalyse (Deltatrac Metabolic Monitor; Datex Instruments, Helsinki, Finnland; vgl. 2.2.3.1).

Die Entnahme der Blut- und Atemluftproben begann 2 Stunden nach Gabe des primings und wurde alle 10 Minuten über eine Dauer von 2 Stunden wiederholt. Bei der Entnahme wurde wie bereits beschrieben verfahren (s. 2.2.3.1). Unter diesen experimentellen Bedingungen wurde innerhalb von 2 Stunden nach Gabe des primings ein „steady state“ im  $^{13}\text{CO}_2$  der Exhalationsluft und in den  $^{13}\text{C}$ -markierten Plasmametaboliten erreicht.

#### 11.2.3.2 Analytische Verfahren

Die Konzentrationsbestimmung von Amino- und 2-Oxosäuren in den Plasmaproben erfolgte über automatische Aminosäureanalyse mit kationenaustauschchromatographischer Trennung und nachfolgender Ninhydrin-Detektion (*Schadewaldt et al., 1990*) bzw. RP-HPLC-Analyse des Chinoxalin-Derivates der 2-Oxosäure mit Fluoreszenz-Detektion (*Schadewaldt et al., 1989*).

Zur Bestimmung der Isotopenanreicherung in L-Leucin und der korrespondierenden 2-Oxosäuren 4-Methyl-2-oxopentanoat wurden die Chinoxalin-Derivate synthetisiert und mit Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid derivatisiert. Die dabei gebildeten O-Trimethylsilyl-Chinoxalinol-Derivate wurden dann gaschromatographisch-massenspektrometrisch mit chemische Ionisation (CI; mit Ammoniak als Reaktantgas) analysiert (*Matthiesen & Schadewaldt, 1994*). Zur Bestimmung der  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Markierung wurde das Intensitätsverhältnis (R) der quasimolekularen Ionen  $[\text{MH}+1]^+$  und  $[\text{MH}]^+$  der O-Trimethylsilyl-Chinoxalinol-Derivate von L-Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat durch selected ion monitoring (SIM) bei  $m/z$  276 und  $m/z$  275 gemessen. Die natürliche Anreicherung wurde durch zusätzliche Messung des Verhältnis der entsprechenden Ionenintensitäten bei  $m/z$  276 und  $m/z$  275 im Chromatographie-Peak der O-Trimethylsilyl-Chinoxalinol-Derivate von L-Isoleucin und 3-Methyl-2-oxopentanoat ( $R_0$ ) in jedem Lauf ermittelt (*Matthiesen*

& Schadewaldt, 1994). Die Bestimmung der Isotopenanreicherung im CO<sub>2</sub> erfolgte über Isotopenratio-Massenspektrometrie (Schadewaldt et al., 1994). Es wurde ein gegen Pee Dee Belemniten (PDB) kalibrierter Standard verwendet (s. 2.2.3.2).

#### 11.2.4 Auswertung und Statistik

##### 11.2.4.1 Kompartiment-Modell

Für die Evaluierung der oralen Bolustests wurde das in Abb. 1 dargestellte 7-Kompartiment-Modell verwendet. Dieses Modell berücksichtigt die Gabe des L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolus in den Magen-Darm-Trakt (Kompartiment 0). Von dort aus erfolgt die Resorption in ein zentrales Leucin-Kompartiment (Kompartiment 1). Bedingt durch die Transaminierung von L-Leucin zu seiner korrespondierenden 2-Oxosäure 4-Methyl-2-oxopentanoat (KIC) und der möglichen Retransaminierung ist das zentrale Leucin-Kompartiment reversibel mit einem ebenfalls zentralen 4-Methyl-2-oxopentanoat(KIC)-Kompartiment (Kompartiment 2) verbunden. Das Leucin-Kompartiment steht zusätzlich reversibel mit dem Protein-Pool (Kompartiment p) in Verbindung. Dadurch wird der Einbau von L-Leucin in das Protein, sowie eine Freisetzung von L-Leucin aus dem Protein-Pool berücksichtigt. Die oxidative Decarboxylierung der verzweigtkettigen 2-Oxosäuren durch den verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex findet im 2-Oxosäure-Kompartiment statt und das dabei gebildete CO<sub>2</sub> gelangt in das Hydrogencarbonat-Kompartiment-System. Eine Zusammenstellung der experimentellen Befunde zeigt, daß sich dieses System mit einem 3-Kompartiment-Modell gut anpassen läßt (Irving et al., 1983; Saccomani et al., 1995). Sowohl Exhalation als auch nicht-respiratorische Verluste erfolgen aus einem zentralen Hydrogencarbonat-Pool (Kompartiment 3) der reversibel mit einem schnellen (Kompartiment 4) und einem langsamen CO<sub>2</sub>-Pool (Kompartiment 5) verbunden ist. Dadurch wird die schnellere CO<sub>2</sub>-Produktion stoffwechselaktiverer Organe, z.B. Leber, und die langsamere

Produktion von  $\text{CO}_2$  in weniger stoffwechselaktiven Organen, wie Muskulatur, berücksichtigt.

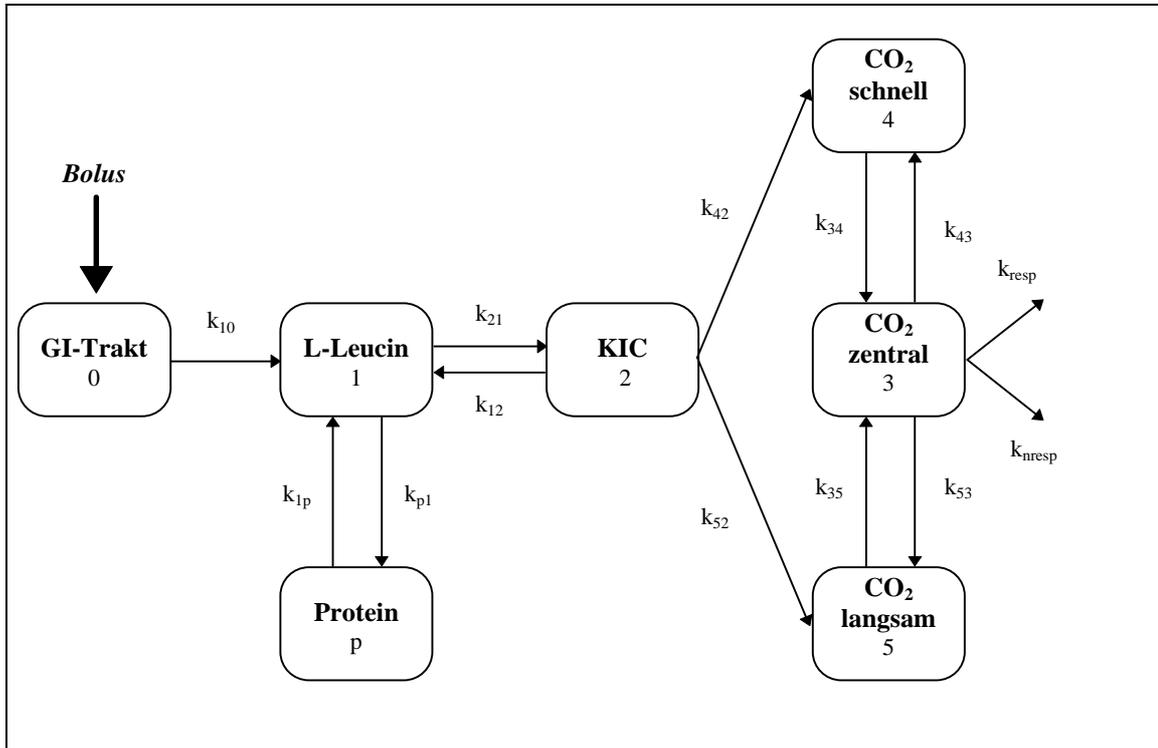


Abb. 1: Kompartiment-Modell für die Evaluierung von oralen L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustests. Abkürzungen: GI, gastrointestinal; KIC, 4-Methyl-2-oxopentanoat; k, Ratenkonstante; resp., respiratorische Elimination; nresp., nicht-respiratorischer Verlust.

Die Modellierung und Parameteroptimierung erfolgte mit mathematischen Standardverfahren: Für jedes Kompartiment ( $q$ ) wurde unter Berücksichtigung aller Eliminations- und Akkumulationsraten eine Bilanzgleichung ( $d_{q(i)}/dt$ ) aufgestellt. Dabei ist  $q_i$  die Stoffmenge an markierter Substanz in Kompartiment  $i$  ( $i = p, 0, \dots, 5$ ), in  $\mu\text{mol}$  und  $k_{ij}$  die Ratenkonstante für den Fluß von Kompartiment  $j$  nach  $i$ , in  $\text{min}^{-1}$ . Insgesamt ergab sich folgendes Gleichungssystem:

$$\begin{aligned}
 dq_0/dt &= -k_{10}q_0 + \text{Bolus} \\
 dq_p/dt &= -k_{1p}q_p + k_{p1}q_1 \\
 dq_1/dt &= +k_{10}q_0 + k_{1p}q_p - k_{p1}q_1 - k_{21}q_1 + k_{12}q_2 \\
 dq_2/dt &= +k_{21}q_1 - k_{12}q_2 - k_{42}q_2 - k_{52}q_2 \\
 dq_3/dt &= -k_{43}q_3 - k_{53}q_3 + k_{34}q_4 + k_{35}q_5 \\
 dq_4/dt &= +k_{42}q_2 + k_{43}q_3 - k_{34}q_4 \\
 dq_5/dt &= +k_{52}q_2 + k_{53}q_3 - k_{35}q_5
 \end{aligned}$$

Zur Vereinfachung wurden die Gesamt-Eliminationsraten aus den einzelnen Kompartimenten wie folgt definiert:

$$\begin{aligned}
 k_{11} &= k_{21} + k_{p1} \\
 k_{22} &= k_{12} + k_{42} + k_{52} \\
 k_{33} &= k_{43} + k_{53} + k_{\text{resp}} + k_{\text{nresp}} \\
 k_{44} &= k_{34} \\
 k_{55} &= k_{35}
 \end{aligned}$$

Die obigen Differentialgleichungen wurden für das L-Leucin- und das 4-Methyl-2-oxopentanoat-System analytisch, und für das Hydrogencarbonat-System, mit Hilfe der Marquardt-Methode des Programmes MATLAB, numerisch gelöst.

Folgende Gleichung beschreibt den theoretischen Konzentrationsverlauf der  $^{13}\text{C}$ -markierten Metabolite L-Leucin und 4-Methyl-2-oxopentanoat in ihrem jeweiligen Kompartiment nach oralem L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolus:

$$q_i(t) = A_1 e^{-kt} + A_2 e^{-\alpha t} + A_3 e^{-\beta t}$$

es gilt für das:

	Leucin-Kompartiment	4-Methyl-2-oxopentanoat-Kompartiment
$A_1$	$= \frac{\text{Dosis} \times k \times (k_{22} - k)}{V_1 \times (\alpha - k) \times (\beta - k)}$	$= \frac{\text{Dosis} \times k \times k_{21}}{V_2 \times (\alpha - k) \times (\beta - k)}$
$A_2$	$= \frac{\text{Dosis} \times k \times (k_{22} - \alpha)}{V_1 \times (k - \alpha) \times (\beta - \alpha)}$	$= \frac{\text{Dosis} \times k \times k_{22}}{V_2 \times (k - \alpha) \times (\beta - \alpha)}$
$A_3$	$= \frac{\text{Dosis} \times k \times (k_{22} - \beta)}{V_1 \times (k - \beta) \times (\alpha - \beta)}$	$= \frac{\text{Dosis} \times k \times k_{21}}{V_2 \times (k - \beta) \times (\alpha - \beta)}$
$\alpha, \beta$	$= \frac{1}{2} \left[ (k_{11} + k_{22}) \pm \sqrt{(k_{11} + k_{22})^2 - 4(k_{11} * k_{22} - k_{12} * k_{21})} \right]$	

$A_i$ : fiktive initiale Konzentration,  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$

$\alpha, \beta$ : Zeitkonstanten

$k$ : Ratenkonstante für den Fluß vom Magen-Darm-Trakt in das Leucin-Kompartiment,  $\text{min}^{-1}$

$k_{ij}$ : Gesamteliminationsrate aus dem Kompartiment i,  $\text{min}^{-1}$

Dosis: oral verabreichte L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Dosis,  $\mu\text{mol}$

$V_i$ : initiales Verteilungsvolumen für Leucin bzw. 4-Methyl-2-oxopentanoat, ml

Anhand dieser Lösungen und geeigneter Anfangsparameter wurde mit Hilfe der Optimierungsroutine *fmins* des Programms MATLAB der zeitliche Verlauf der L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin- und 4-Methyl-2-oxo[1-<sup>13</sup>C]pentanoat-Konzentration im Plasma und des <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> in der Exhalationsluft modelliert.

Zur Simulation der primed continuous infusion-Experimente wurde das Modell modifiziert. Dazu wurde das gastrointestinale Kompartiment entfernt und das priming und die kontinuierliche Infusion des L-[1-<sup>13</sup>C]Leucins direkt in das zentrale L-Leucin-Kompartiment eingeführt.

#### 11.2.4.2 Berechnungen

Die Isotopenanreicherung in „mol percent excess“ ( $MPE = \{R-R_0\} / \{R-R_0+1\} \times 100$ ) in den Metaboliten wurde anhand des natürlich vorkommenden Verhältnis der Ionenintensitäten ( $R_0$ ) und dem Verhältnis der Ionenintensitäten in den Proben ( $R$ ), ermittelt (*Wolfe (1984)*, s. 2.2.4.1). Der Anstieg der <sup>13</sup>C-Anreicherung (APE) im CO<sub>2</sub> der Exhalationsluft wurde berechnet als Differenz zwischen dem <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Gehalt in den vor (Kontrollwert) und nach dem oralen Bolus entnommenen Atemproben (s. 2.2.4.1). Die Raten der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation über basal wurden auf der Basis der Isotopenanreicherung im CO<sub>2</sub> und der mittleren Rate der CO<sub>2</sub>-Exhalation, gemessen in dem 10minütigen Zeitintervall vor der Probenentnahme für die IRMS-Analyse, errechnet (s. 2.2.4.1). Die unvollständige <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation wurde mit berücksichtigt (Faktor 1.25; *Irving et al., 1983, Saccomani et al., 1995*). Die Raten der Ganzkörper-L-Leucinoxidation in den primed continuous infusion-Tests wurden, entsprechend dem reciprocal pool-Modell aus der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalationsrate und der Isotopenanreicherung im 4-Methyl-2-oxopentanoat im Plasma berechnet (*Schwenk et al., 1985*).

Im allgemeinen sind die Ergebnisse als Mittelwert (MW) ± SD (Anzahl der Bestimmungen in Klammern) angegeben.

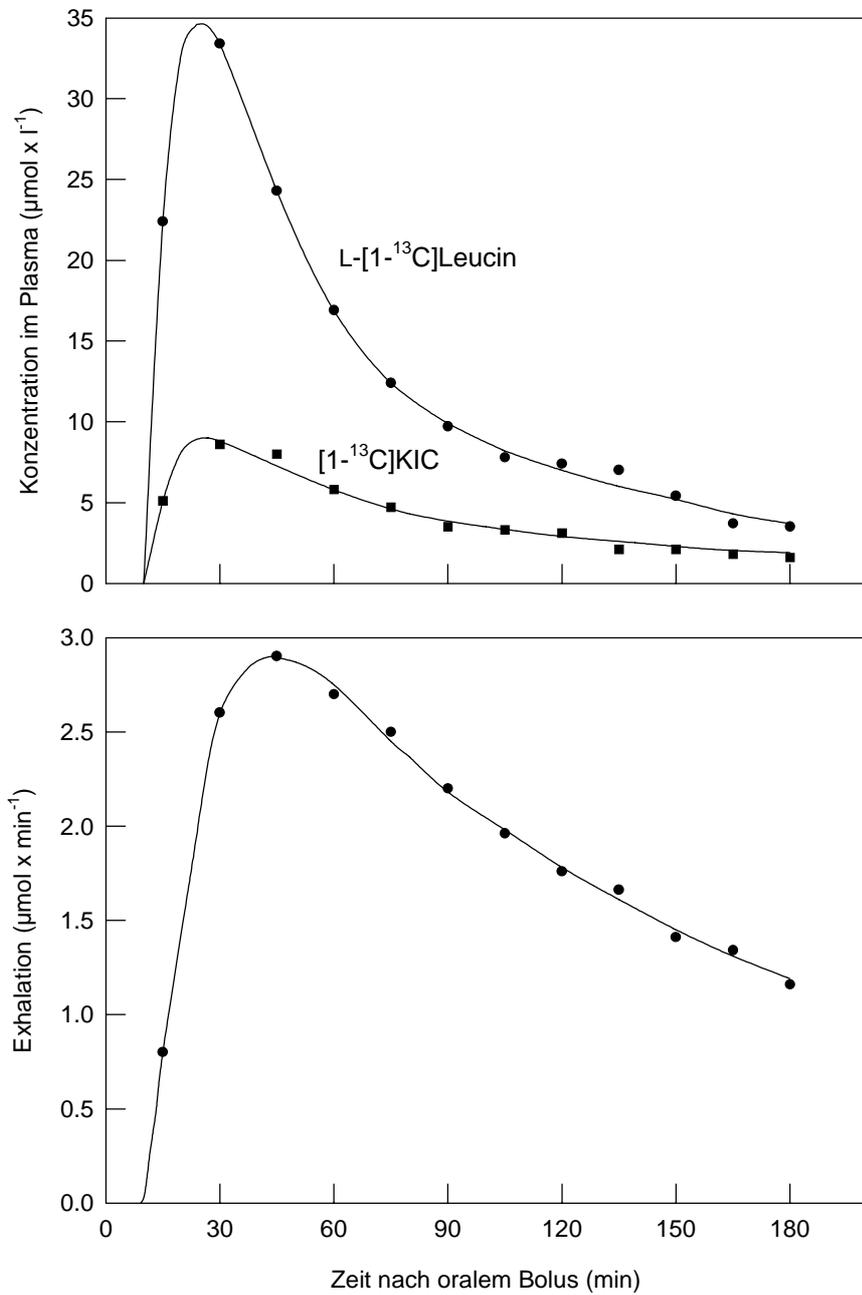


Abb. 2: Kompartiment-Analyse des zeitlichen Verlaufes der <sup>13</sup>C-markierten Plasmametabolite sowie des <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> in der Exhalationsluft nach oralem L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolus (38 µmol x (kg KG)<sup>-1</sup>). Die Parameter des 7-Kompartiment-Modells wurden mit Hilfe des Marquardt-Levenberg-Algorithmus für nicht-lineare Regressionsanalysen an die experimentellen Daten angepaßt. Abkürzungen: KIC, 4-Methyl-2-oxopentanoat

### 11.3 Ergebnisse

Jeder der fünf gesunden Probanden nahm sowohl an dem oralen Bolustest als auch an dem primed continuous infusion-Experiment mit L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin als markiertem Substrat teil. Die Ergebnisse der oralen L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustests wurden mit dem in Abb. 1 dargestellten 7-Kompartiment-Modell mathematisch ausgewertet. Die Modellparameter wurden dazu systematisch mit Hilfe des Marquart-Levenberg-Algorithmus für nicht-lineare Regressionsanalysen an die experimentellen Daten angepaßt. Die Übereinstimmung der berechneten mit den experimentell ermittelten zeitlichen Verläufen der L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin- und 4-Methyl-2-oxo[1-<sup>13</sup>C]pentanoat-Konzentrationen im Plasma und der <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Exhalation war gut (Abb. 2). Anhand des Modells wurden dann die Raten der Ganzkörper-L-Leucinoxidation ermittelt. Die berechneten Raten reichten von 0.274 bis 0.371  $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ , die mittlere L-Leucin-Oxidation betrug  $0.365 \pm 0.071 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  (n = 5).

Zusätzlich wurden primed continuous infusion-Untersuchungen durchgeführt, dabei die Rate der Ganzkörper-L-Leucinoxidation unter steady state Bedingungen bestimmt und mit den anhand des für primed continuous infusion-Tests modifizierten Kompartiment-Modells vorausberechneten Oxidationsraten verglichen (Tab. 1).

Tab. 1: Raten der Ganzkörper-L-Leucinoxidation gesunder Probanden im postabsorptiven Zustand. Die experimentellen Ergebnisse wurden unter steady state Bedingungen anhand von primed continuous infusion-Test mit L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin als Substrat ermittelt. Die berechneten Raten sind zum Vergleich mit angegeben und wurden mit Hilfe des für die primed continuous infusion-Experimente modifizierten Kompartiment-Modells bestimmt.

Probanden	Geschlecht	Rate der L-Leucin-Oxidation	
		Experimentell	Berechnet
( $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ )			
P.S.	m	0.451	0.252
M.H.	m	0.449	0.288
D.H.	m	0.326	0.499
C.H.	w	0.195	0.278
R.Z.	m	0.373	0.306

In diesen Untersuchungen lag die experimentell ermittelte mittlere Rate der L-Leucin-Oxidation in vivo bei  $0.358 \pm 0.105 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  ( $n = 5$ ). Die anhand des Modells durchgeführten Simulationsrechnungen ergaben mittlere L-Leucin-Oxidationsraten von  $0.324 \pm 0.099 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ . Abb. 3 zeigt, daß die vorausberechnete Oxidationsrate für das gesamte Probandenkollektiv - bei nicht unbeträchtlichen intraindividuellen Unterschieden - gut mit den experimentellen Daten übereinstimmte.

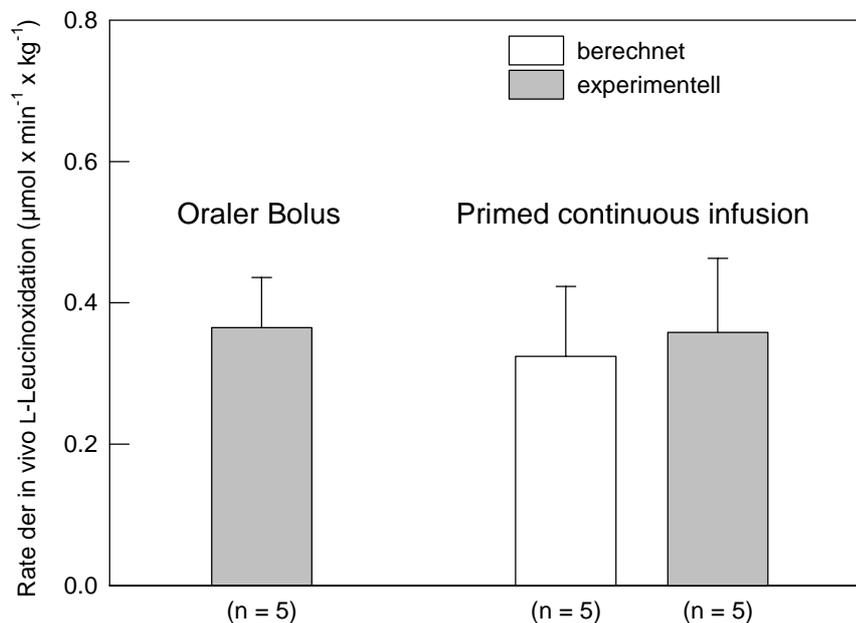


Abb. 3: Bestimmung der in vivo L-Leucinoxidationsrate gesunder Probanden im postabsorptiven Zustand anhand der kompartmentellen (oraler Bolus) und der nicht-kompartimentellen Technik (primed continuous infusion). Jeder Proband nahm an beiden Tests teil (s. 11.2.3.1). Ergebnisse des Bolustests wurden anhand eines 7-Kompartiment-Modells (Abb. 1) evaluiert. Das Modell wurde dann zur Simulation von primed continuous infusion-Experimenten angewendet. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD ( $n = 5$ ) der vorausberechneten (weißer Balken) und der experimentell ermittelten (grauer Balken) Oxidationsraten.

## 11.4 Diskussion

Bisher wurde für die Untersuchung des in vivo L-Leucin-Stoffwechsels beim Menschen mittels stabil-Isotopen-markierter Verbindungen praktisch ausschließlich, als nicht-kompartimenteller Ansatz, die (primed) continuous

infusion-Technik angewendet. Die mit dieser Methode erhobenen Befunde zur in vivo L-Leucinoxidation bei gesunden Probanden im postabsorptiven Zustand reichen von  $< 0.15 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  (Elahi et al., 1993) bis  $> 0.50 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  (Klein et al., 1992). Die Zusammenstellung von Daten aus einer repräsentativen Anzahl von primed continuous infusion-Untersuchungen, die 1980 publiziert wurden, ergab für gesunde Probanden im postabsorptiven Zustand eine mittlere Oxidationsrate von  $0.333 \pm 0.102 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  (vgl. Kapitel 2). Dieser Literaturwert stimmt gut mit der hier, mit dem gleichen experimentellen Ansatz, ermittelten mittleren in vivo L-Leucinoxidationsrate von  $0.358 \pm 0.105 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  ( $n = 5$ ) überein.

Eine quantitative Bestimmung der in vivo L-Leucinoxidation beim Menschen mit oralen L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustests ist bisher noch nicht durchgeführt worden. Die einzige Untersuchung am Menschen, bei der ein kompartmenteller Versuchsansatz verwendet wurde, ist die von Cobelli et al. (1991). In dieser Untersuchung wurde bei zwei Probanden ein Bolus von  $^{14}\text{C}$ -markiertem L-Leucin und gleichzeitig von  $^3\text{H}$ -markierter korrespondierender 2-Oxosäure, 4-Methyl-2-oxopentanoat, intravenös appliziert. Anhand der Kinetik der Isotopenmarkierten Plasmametabolite und der  $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung wurde die in vivo L-Leucinoxidation unter Verwendung eines 11-Kompartiment-Modells mit mehreren intrazellulären Kompartimenten für die L-Amino- und die 2-Oxosäure berechnet. Diese Kompartiment-Analyse ergab eine L-Leucin-Oxidationsrate von  $0.32 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  für Probanden 1 und von  $0.42 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  für Probanden 2. Cobelli et al. (1991) verwendeten dieses Modell auch für die Auswertung von Untersuchungen, bei denen vier Probanden eine kontinuierliche Infusion von stabil-Isotopen-markierten Substraten ( $^{13}\text{C}$ -markiertes L-Leucin und  $^2\text{H}$ -markiertes 4-Methyl-2-oxopentanoat) erhielten. Die berechnete mittlere Oxidationsrate von L-Leucin in diesen Experimenten lag bei  $0.375 \pm 0.135 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$  (Cobelli et al., 1991).

Für die Auswertung der vorliegenden oralen Bolustests wurde ein einfacheres Modell gewählt, vergleichbar den Modellen, die zur Untersuchung des

Muskelmetabolismus anhand von arterio-venöse Differenzmessungen verwendet werden (*Cheng et al., 1985*). Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Probanden betrug die mittlere L-Leucin-Oxidation  $0.365 \pm 0.071 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{kg KG})^{-1}$ . Dieser Wert ist nicht nur vergleichbar mit den von *Cobelli et al. (1991)* ermittelten L-Leucin-Oxidationsraten, sondern auch mit den entsprechenden Ergebnissen der primed continuous infusion-Untersuchungen.

Um die Zuverlässigkeit der Modellrechnungen zu prüfen, wurden L-Leucin-Oxidationsraten für primed continuous infusion-Versuche, anhand der individuellen Parametersätze für die Probanden, mit dem entsprechend modifizierten Modell vorausberechnet und mit experimentellen Ergebnissen verglichen. Dabei ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen der experimentell ermittelten und der vorausberechneten Oxidationsrate für das Gesamtkollektiv. Bei einem Vergleich der individuellen Raten der einzelnen Probanden ergaben sich jedoch Abweichungen. Zwei Faktoren könnten, einzeln oder in Kombination, als Ursache für die Abweichungen in Frage kommen: (1) In dieser Arbeit wurde für die Auswertung der oralen Bolustests bewußt ein relativ einfaches Modell gewählt, um zunächst eine robuste Berechnung der Parameter zu ermöglichen. Bezüglich der individuellen Parameter ist daher nicht auszuschließen, daß nur Näherungswerte erhalten wurden. (2) Die in vivo L-Leucin-Oxidation beim Menschen wird durch eine Vielzahl von Langzeit- und Kurzzeit-Einflüssen, wie z.B. die Nahrungszusammensetzung (*Cortiella et al., 1988; Carlson et al., 1994; Darmaun et al., 1994; El-Khoury et al., 1994a; Hiramatsu et al., 1994; Quevedo et al., 1994*), L-Leucin-Zufuhr (*Meguid et al., 1986; Cortiella et al., 1988; El-Khoury et al., 1994b*), Hormone (*Elahi et al., 1993; Lariviere et al., 1994; Masud et al., 1994; Mauras & Beaufreere, 1995*), körperliche Aktivität (*Hagg et al., 1982; Tarnopolsky et al., 1991*), und Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen Aminosäuren (*Schwenk & Haymond, 1987; Bennet et al., 1990; Heslin et al., 1994; Garrel et al., 1995*), reguliert. Darüberhinaus wurde in früheren Untersuchungen bei den oralen Bolustests, unter praktisch identischen experimentellen Bedingungen, eine beträchtliche intraindividuelle

Variabilität des L-Leucin-Metabolismus beobachtet (*Schadewaldt et al., 1994*). Zwischen den hier durchgeführten oralen Bolustests und den primed continuous infusion-Experimenten lag ein Zeitraum von mindestens drei Monaten. Daher ist es durchaus möglich, daß die Unterschiede zwischen den anhand des Modells vorausberechneten und den experimentell ermittelten Stoffwechselraten - zumindest teilweise - auf tatsächlichen Unterschieden in den Stoffwechselraten zum Zeitpunkt der jeweiligen Untersuchung beruhen.

Ob und inwieweit eine intraindividuelle Variabilität ursächlich für die beobachteten Differenzen ist, soll jetzt mittels Kompartiment-Analysen multipler Bolustests an zwei gesunden Probanden untersucht werden. Der - mögliche - Einfluß der Modellstruktur soll mit Hilfe eines weiterentwickelten Kompartiment-Modells geprüft werden, das zusätzlich zu dem hier verwendeten Modell sowohl die Beteiligung des Gastrointestinal-Traktes am Metabolismus der verzweigt-kettigen Verbindungen als auch eine intrazelluläre Kompartimentierung von L-Leucin und der korrespondierenden 2-Oxosäure, 4-Methyl-2-oxopentanoat, berücksichtigt.



## **Teil VII**

### **Synopsis**

Abschließend werden die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit und ihre (patho)physiologische Bedeutung dargestellt.

---



## 12 Zusammenfassung der Befunde zum Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren

Zielsetzung der Arbeit war die wiederholbare Bestimmung des *in vivo* Schweregrades bei Patienten mit unterschiedlicher klinischer Form der Ahornsirupkrankheit, d.h. letztlich die experimentelle Bestimmung des *in vivo* Ganzkörperflusses durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase. Dazu wurden zwei verschiedene, sich ergänzende experimentelle Strategien verfolgt: zum einen die Verwendung von Substraten, deren Poolgrößen wenig variabel sind, da diese nicht am Proteinstoffwechsel teilnehmen, als sog. "metabolische Sonden" und zum anderen die Anwendung von kompartmentellen Versuchsansätzen (Bolustests).

### *Verwendung von Alternativsubstraten für die Bestimmung des Ganzkörperflusses durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase*

Eine ausführliche Literaturrecherche ergab, daß die nicht-proteinogenen, nicht-physiologischen Nor-Analoga der verzweigtkettigen L-Aminosäuren prinzipiell eine alternative Substanzgruppe für die Bestimmung des Ganzkörperflusses durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase darstellen könnten. Da allerdings bisher keine Befunde zum Katabolismus der Nor-Analoga beim Menschen vorliegen, wurde in Untersuchungen an kultivierten humanen Hautfibroblasten von Normalpersonen und ahornsirupkranken Patienten geprüft, ob und in welchem Maße die Nor-Analoga im Vergleich zu ihren natürlichen verzweigtkettigen L-Aminosäuren verstoffwechselt werden und ob bei Ahornsirupkrankheit die Aktivität des genetisch veränderten Enzyms gegenüber den Nor-Analoga und den natürlichen Aminosäuren gleichmäßig eingeschränkt ist. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen erstmals, daß L-Norleucin und L-Norvalin in humanen Zellen vergleichbar ihren natürlichen Analoga verstoffwechselt und spezifisch durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase oxidativ decarboxyliert werden. An kultivierten Zellen von Patienten mit unterschiedlicher varianter Form der Ahornsirupkrankheit konnte nachgewiesen werden, daß die Rate der oxidativen

Decarboxylierung der Nor-Analoga relativ gleichmäßig und entsprechend ihrer residualen Enzymaktivität eingeschränkt ist. Die letzteren Befunde zeigen, daß mit den Nor-Analoga eine Bestimmung der Restaktivität des verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexes *in vitro* möglich ist und sie sich damit zur Bestimmung des *in vivo* Ganzkörperflusses durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase eignen sollten.

Die nicht-proteinogene Aminosäure L-Alloisoleucin könnte ebenfalls eine alternative Substanz für die Bestimmung des Ganzkörperflusses durch die verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase darstellen, da L-Alloisoleucin bei Gesunden nur in vernachlässigbar geringen Mengen im Serum vorkommt, *in vivo* relativ rasch katabolisiert wird und für diese Aminosäure keine toxischen Wirkungen bekannt sind. Patienten mit Ahornsirupkrankheit haben zwar mehr oder weniger erhöhte L-Alloisoleucin-Plasmakonzentrationen, jedoch weist der L-Alloisoleucin-Pool wesentlich geringere Schwankungen auf als die Pools der anderen verzweigt-kettigen L-Aminosäuren. Bezüglich der Bildung von L-Alloisoleucin wird angenommen, daß es *in vivo* aus L-Isoleucin entsteht. Der Mechanismus der L-Alloisoleucin-Bildung ist jedoch unklar. Zur Untersuchung der L-Alloisoleucin-Bildung beim Menschen wurden bei gesunden Probanden orale L-[1-<sup>13</sup>C]Isoleucin-Bolustests durchgeführt und die Kinetik der <sup>13</sup>C-Anreicherung in den vier L-Isoleucin-Metaboliten L-Isoleucin, S-3-Methyl-2-oxopentanoat, L-Alloisoleucin und R-3-Methyl-2-oxopentanoat im Plasma bestimmt. Die Kinetik der <sup>13</sup>C-Markierung in den enantiomeren 2-Oxosäuren S- und R-3-Methyl-2-oxopentanoat war praktisch identisch und der Kinetik der <sup>13</sup>C-Markierung im metabolischen Vorläufer L-Isoleucin sehr ähnlich. Dagegen war die Kinetik beim L-Alloisoleucin deutlich abgeschwächt und verzögert. Die Markierungskinetiken zeigen, daß (i) L-Isoleucin tatsächlich der physiologische Vorläufer von L-Alloisoleucin ist, daß (ii) die korrespondierende 2-Oxosäure, R-3-Methyl-2-oxopentanoat, *in vivo* als Nebenprodukt der Transaminierungsreaktion von L-Isoleucin gebildet wird und daß (iii) L-Alloisoleucin letztlich in einer nachfolgenden relativ langsamen "Re"-Transaminierung aus 3-Methyl-2-oxopentanoat entsteht.

Aus den Untersuchungen zum Mechanismus der L-Alloisoleucin-Bildung ergaben sich Hinweise, daß erhöhte L-Alloisoleucin-Konzentrationen im Plasma ein spezifischeres Merkmal für Ahornsirupkrankheit darstellen könnten als erhöhte Konzentrationen der proteinogenen verzweigtkettigen L-Aminosäuren. Daher wurde die Aussagefähigkeit der L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma für die Diagnosestellung bei klassischer und varianter Form der Ahornsirupkrankheit untersucht. Zunächst wurden Referenzbereiche für die L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma von gesunden Erwachsenen, Kindern und Kleinkindern etabliert. Zusätzlich wurde die L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma von Patienten mit verschiedenen anderen Stoffwechselstörungen, bei denen erhöhte Konzentrationen der proteinogenen verzweigtkettigen L-Aminosäuren vorkommen (können), bestimmt. Bei allen Gesunden und nicht-ahornsirupkranken Patienten lagen die Plasma-Konzentrationen von L-Alloisoleucin unter  $5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Dieser Wert wurde als "cut-off"-Wert für die Diskriminierung ahornsirupkranker und nicht-ahornsirupkranker Patienten verwendet. Eine retrospektive Untersuchung zeigt, daß bei Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit die L-Alloisoleucin-Konzentration in 99.9 % der nicht-selektierten Plasmaproben ( $n = 2453$ ) über dem "cut-off"-Wert lag. Bei Patienten mit varianter Form war die L-Alloisoleucin-Konzentration  $> 5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$  in 94 % ( $n = 624$ ) der Plasmaproben. Die Häufigkeit der diagnostisch eindeutigen Konzentrationserhöhungen war bei den anderen verzweigtkettigen L-Aminosäuren deutlich niedriger ( $< 45 \%$ ). Diese Ergebnisse zeigen, daß eine erhöhte L-Alloisoleucin-Konzentration im Plasma ( $> 5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ) den spezifischsten und sensitivsten diagnostischen Marker für alle Formen der Ahornsirupkrankheit darstellt.

Insgesamt deuten die Untersuchungen zum Stoffwechsel der Nor-Analoga und L-Alloisoleucin darauf hin, daß diese Substanzen zur Bestimmung des Schweregrades der Ahornsirupkrankheit *in vivo* geeignet sein könnten. Eine endgültige Prüfung der Anwendbarkeit dieser Substanzen als "metabolische Sonden", ist jedoch erst möglich, wenn sie in  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierter Form für *in vivo* Untersuchungen verfügbar sind.

### *Anwendung von kompartmentellen Versuchsansätzen*

Die Etablierung eines experimentellen Verfahrens zur wiederholbaren Bestimmung der residualen *in vivo* L-Leucinoxidation bei Patienten mit unterschiedlicher klinischer Form der Ahornsirupkrankheit erfolgte in drei Phasen.

In der ersten Phase wurde geprüft, ob ein in der Literatur vorgeschlagener nicht-invasiver  $^{13}\text{CO}_2$ -Atemtest mit oraler Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin zur Bestimmung der *in vivo* L-Leucinoxidation bei Probanden und ahornsirupkranken Patienten geeignet ist. Dazu wurden zunächst an Normalpersonen invasive L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin-Bolustests durchgeführt und die Kinetik der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation sowie die Kinetik der Isotopenanreicherung in L-Leucin und der korrespondierenden 2-Oxosäure, 4-Methyl-2-oxopentanoat, im Plasma analysiert. Anhand der Ergebnisse dieser Versuche wurde als Beurteilungsgrundlage für die *in vivo* L-Leucinoxidation ahornsirupkranker Patienten der Normbereich durch Ergebnisse zur intra- und interindividuellen Variabilität der *in vivo* L-Leucinoxidation definiert und eine Kompartment-Analyse als adäquate Auswertemethode etabliert.

In Untersuchungen an klinisch gut definierten Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit wurde dann geprüft, ob bei diesen am schwersten betroffenen Patienten ein spezifischer Anstieg der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation nach Gabe von L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leucin festzustellen ist. Im Gegensatz zu den wenigen bisherigen Literaturbefunden konnte bei keinem der zehn untersuchten ahornsirupkranken Patienten ein signifikanter Anstieg der  $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation festgestellt werden. Die bei den Patienten aufgrund der vergrößerten und auch zeitlich variablen verzweigtkettige L-Amino- und 2-Oxosäure-Pools beobachtete im Vergleich zu Normalpersonen deutlich stärkere und nicht vorausbestimmbare Isotopenverdünnung zeigt, daß für eine zuverlässige Bestimmung der *in vivo* L-Leucinoxidation die Anwendung eines invasives Testverfahren erforderlich ist.

Da sich die Pools der verzweigtkettigen L-Aminosäuren bei Ahornsirupkrankheit in Größe und relativer Zusammensetzung deutlich von

denen der Normalpersonen unterscheiden, wurde in einer zweiten Phase geprüft, ob und in wieweit die L-Leucin-Oxidation als repräsentativ für den gesamten metabolische Fluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase *in situ* angesehen werden kann. Dazu wurde erstmals der *in vivo* Katabolismus der verzweigtkettigen L-Aminosäuren L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin anhand von oralen Bolustests vergleichend an gesunden Probanden untersucht und die *in vivo* Oxidationsraten mit einem Kompartiment-Modell abgeschätzt. In Modellexperimenten an kultivierten humanen Hautfibroblasten von gesunden Kontrollpersonen und ahornsirupkranken Patienten wurde die Zusammensetzung des metabolischen Flußes durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase unter Substratbedingungen, die repräsentativ für Plasma von Normalpersonen und von Patienten mit varianter und klassischer Form der Ahornsirupkrankheit waren, untersucht. Die Befunde zeigen, daß in Fibroblasten von Normalpersonen und ahornsirupkranken Patienten die relative Zusammensetzung des Substratflußes durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase bei Konzentrationen der verzweigtkettigen L-Amino- und 2-Oxosäuren, die für Plasma von Normalpersonen und Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit repräsentativ sind, konstant war. Unter beiden Substratbedingungen machte z.B. die L-Leucin-Oxidation etwa die Hälfte des gesamten metabolischen Flußes durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase aus. Erst bei sehr stark erhöhten und in ihrer Relation zueinander gegenüber der Norm veränderten Konzentrationen der verzweigtkettigen L-Amino- und 2-Oxosäuren änderte sich der Anteil der Oxidation einer individuellen L-Aminosäure an dem gesamten Substratfluß durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase. Die relative Zusammensetzung des Substratflußes unter physiologischen Verhältnissen *in vitro* stimmte überraschend gut mit den Ergebnissen der oralen Bolustests an Gesunden überein.

Insgesamt zeigen diese Befunde, daß die Zusammensetzung des metabolischen Flußes durch die verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase *in situ* durch das Konzentrationsverhältnis der Substrate bestimmt wird. Deshalb müssen bei der Interpretation residualer *in vivo* L-

Leucinoxidationsraten von ahornsirupkranken Patienten gegenüber der Norm veränderte Konzentrationsverhältnisse mit berücksichtigt werden.

In einer dritten Phase wurde der invasive L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustest zur Bestimmung der residualen *in vivo* L-Leucinoxidation bei einer repräsentativen Anzahl von Patienten mit unterschiedlicher klinischer Form der Ahornsirupkrankheit angewendet. Zur Auswertung dieser Experimente wurde ein nicht-kompartimentelles Berechnungsverfahren abgeleitet, das die Ermittlung des wesentlichen Parameters residuale *in vivo* L-Leucinoxidation auch ohne Kompartiment-Analyse erlaubt, um so eine allgemeine Anwendbarkeit des *in vivo* Tests zur Bestimmung des *in vivo* Schweregrades zu ermöglichen. Bezogen auf das Normalkollektiv wurden bei den Patienten mit schwerer varianter Form der Ahornsirupkrankheit residuale *in vivo* L-Leucinoxidationsraten von 5 % und bei Patienten mit (milder) varianter Form von 20 % bis 85 % ermittelt. Bei der Wiederholungsuntersuchung eines Patienten wurden, trotz deutlicher Unterschiede in den <sup>13</sup>C-Markierungskinetiken, praktisch identische residuale *in vivo* L-Leucinoxidationsraten ermittelt. Die residualen *in vivo* Oxidation bei den Patienten lagen über den jeweiligen in Fibroblasten ermittelten *in vitro* Restaktivitäten der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, daß bei varianten Formen der Ahornsirupkrankheit eine Quantifizierung der residualen L-Leucinoxidation reproduzierbar möglich ist. Die vergleichsweise hohe *in vivo* L-Leucinoxidation wird vermutlich durch einen gegenüber der Norm gesteigerten Aktivitäts(De phosphorylierungs)status der verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase *in vivo* erreicht.

Im Rahmen der Arbeit ergab sich die Möglichkeit bei einem der weltweit drei lebertransplantierten ahornsirupkranken Patienten den Stoffwechsel verzweigt-kettiger L-Aminosäuren nach Lebertransplantation zu charakterisieren. Die Charakterisierung erfolgte über eine Langzeitbeobachtung der Plasmakonzentrationen verzweigt-kettiger L-Aminosäuren, sowie über *in vivo* Umsatzmessungen. Diese Untersuchungen

sollten Aufschluß darüber geben, ob und inwieweit die Transplantation des metabolisch intakten Lebergewebes zu einer Normalisierung des Stoffwechsels führt und ob darüberhinaus Rückschlüsse auf Interorganbeziehungen im Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren möglich sind. Die Langzeitbeobachtung ergab, daß die Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen Metabolite seit der Transplantation auf moderat erhöhtem Niveau stabil blieben. Im Vergleich zu den proteinogenen verzweigtkettigen L-Aminosäuren blieb nach Lebertransplantation eine auffällig hohe Konzentration von L-Alloisoleucin im Plasma bestehen. Überraschend waren die Ergebnisse der beiden *in vivo* Umsatzmessungen mit L-Alloisoleucin und L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin. Obwohl bei dem Patienten ein oxidativer Abbau der verzweigtkettigen L-Aminosäuren nur in der transplantierten Leber möglich ist, lag sowohl die metabolische L-Alloisoleucin-Clearance als auch die *in vivo* L-Leucinoxidation im Bereich gesunder Kontrollpersonen. Offensichtlich führt bei dem Patienten die im Vergleich zu Normalpersonen gesteigerte Freisetzung von verzweigtkettigen L-Amino- und 2-Oxosäuren aus extrahepatischen Geweben, vor allem der Skelettmuskulatur, zu einer Erhöhung der Substratkonzentrationen im Plasma. Dies bewirkt, höchstwahrscheinlich über eine Erhöhung des Aktivitätsstatus der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase, eine kompensatorische Steigerung des Abbaues im funktionell intakten Lebergewebe.

Zusammenfassend zeigen die Befunde, daß die residuale *in vivo* Aktivität der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase bei Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit mit < 3% der Norm so gering ist, daß sie in *in vivo* Umsatzmessungen nicht quantitativ erfaßt werden kann. Dagegen kann bei Patienten mit varianter Form der Erkrankung die residuale L-Leucinoxidation mit dem invasiven L-[1-<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustest bestimmt werden, so daß bei varianter Ahornsirupkrankheit die Charakterisierung des *in vivo* Schweregrades möglich ist.



# Literaturverzeichnis

## Teil I Einführung

Bowtell JL, Leese GP, Smith K, Watt PW, Nevill A, Rooyackers O, Wagenmakers AJM, Rennie MJ (1998) Modulation of whole body protein metabolism, during and after exercise, by variation of dietary protein. *J Appl Physiol* 85: 1744-1752

Buse MG, Reid SS (1975) Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J Clin Invest* 56: 1250-1261

Chuang DT, Fisher CW, Lau KS, Griffin TA, Wynn RM, Cox RP (1991) Maple syrup urine disease: domain structure, mutations and exon skipping in the dihydrolipoyl transacylase (E2) component of the branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex. *Molec Biol Med* 8: 49-63

Chuang DT, Shih VE (1995) Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 1239-1277

Chuang JL, Cox RP, Chuang DT (1997) E2 Transacylase-deficient (Type II) maple syrup urine disease. *J Clin Invest* 100: 736-744

Chuang JL, Cox RP, Chuang DT (1993) Characterization of the promotor-regulatory region and structural organization of the E1 $\alpha$  gene of human branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex (BCKDHA). *J Biol Chem* 268: 8309-8313

Crabb DW, Deaven LL, Luedemann M, Zhang B, Harris RA (1989) Assignment of the gene for the E1 $\alpha$  subunit of branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase (BCKDHA) to chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 50: 40-41

Duran M, Tielens AG, Wadman SK, Stigter JC, Kleijer WJ (1978) Effects of thiamine in a patient with variant form of branched-chain ketoaciduria. *Acta Paediatr Scand* 67: 367-372

Duran M, Wadman SK (1985) Thiamine-responsive inborn errors of metabolism. *J Inherited Metabol Dis (Suppl 1)* 8: 70-75

Ellerine NP, Herring WJ, Elsas LJ, McKean MC, Klein PD, Danner DJ (1993) Thiamin-responsive maple syrup urine disease in a patient antigenically missing dihydrolipoamide acyltransferase. *Biochem Med Metab Biol* 49: 363-374

Elsas L, Blocker T, Wheeler F, Pask B, Perl D, Trusler S (1972) Variant „classical“ maple syrup urine disease: co-factor response. *Clin Res* 2043: 929-944

Elsas LJ, Danner D (1982) The role of thiamine in maple syrup urine disease. *Ann NY Acad Sci* 378: 404-421

Elsas LJ, Ellerine NP, Klein PD (1993) Practical methods to estimate whole body leucine oxidation in maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 33: 445-451

Feigenbaum AS, Robinson BH (1993) The structure of the human dihydrolipoamide dehydrogenase gene (DLD) and its upstream elements. *Genomics* 17: 376-381

Fekete G, Plattner R, Crabb DW, Zhang B, Harris RA, Heerema N, Palmer CG (1989) Localization of the human gene for the E1 $\alpha$  subunit of branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase (BCKDHA) to chromosome 19q13.1→q13.2. *Cytogenet Cell Genet* 50: 236-237

Fernhoff PM, Lubitz D, Danner DJ, Dembure PP, Schwartz HP, Hillman R, Bier DM, Elsas LJ (1985) Thiamine-response in maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 19: 1011-1016

Fisher CW, Fisher CR, Chuang JL, Lau KS, Chuang DT, Cox RP (1993) Occurrence of a 2-bp (AT) deletion allele and a nonsense (G-to-T) mutant allele at the E2 (DBT) locus of six patients with maple syrup urine disease: multiple exon skipping as a secondary effect of the mutations. *Am J Human Genet* 52: 414-419

Fisher CW, Lau KS, Fisher CR, Wynn RM, Cox RP, Chuang DT (1991) A 17-bp insertion and a phe-to-cys missense mutation in the dihydrolipoyl transacylase (E2) mRNA from a thiamine-responsive maple syrup urine disease patient WG-34. *Biochem Biophys Res Comm* 174: 804-809

- Gibson KM, Elpeleg ON, Wappner RS (1996). In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME (eds.) Physicians guide to the laboratory daignosis of metabolic diseases. Chapman & Hall, London, pp. 125-144
- Goto M, Shinno H, Ichihara A (1977) Isoenzyme patterns of branched-chain amino acid transaminase in human tissues and tumors. *Gann* 68: 663-667
- Harper AE, Miller RH, Block KP (1984) Branched-chain amino acid metabolism. *Ann Rev Nutr* 4: 409-454
- Harris RA, Kuntz MJ, Simpson R (1988) Inhibition of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase kinase by  $\alpha$ -chloroisocaproate. In: Abelson JN, Simon MI (eds.) *Methods in enzymology*. Academic Press, San Diego: pp. 114-123
- Herring WJ, Litwer S, Weber JL, Danner DJ (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 Human Genet* 48: 342-350
- Herring WJ, McKean M, Dracopoli N, Danner DJ (1992) Branched chain acyltransferase absence due to an Alu-based genomic deletion allele and an exon skipping allele in a compound heterozygote proband expressing maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 1138: 236-242
- Hong SOC, Layman DK (1984) Effects of leucine on in vitro protein synthesis and degradation in rat skeletal muscle. *J Nutr* 114: 1204-1212
- Hutson SM, Hall TR (1993) Identification of the mitochondrial branched chain aminotransferase as a branched chain  $\alpha$ -keto acid transport protein. *J Biol Chem* 268: 3084-3091
- Hutton JC, Sener A, Malaisse WJ (1980) Interaction of branched chain amino acids and keto acids upon pancreatic islet metabolism and insulin secretion. *J Biol Chem* 255: 7340-7346
- Jackman ML, Gibala MJ, Hultman E, Graham TE (1997) Nutritional status affects branched-chain oxoacid dehydrogenase activity during exercise in humans. *Am J Physiol* 272: E233-E238
- Johnson M, Yang HS, Johanning GL, Patel MS (1997) Characterization of the mouse dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD) gene: genomic structure, promoter sequence, and chromosomale localization. *Genomics* 41: 320-326
- Kodama S, Seki A, Hanabusa M, Morisita Y, Sakurai T (1976) Mild variant of maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 124: 31-36
- Korein J, Sansaricq C, Kalmijn M, Honig J, Lange B (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
- Lau KS, Eddy RL, Shows TB, Fisher CW, Chuang DT, Cox RP (1991) Localization of the dihydrolipoamid branched-chain transacylase (DBT) of the human branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex to chromosome 1. *Cytogenet Cell Genet* 56: 33-35
- Lau KS, Herring WJ, Chuang JL, McKean M, Danner DJ, Cox RP, Chuang DT (1992) Stucture of the gene encoding dihydrolipoyl transacylase (E2) component of human branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex and characterization of an E2 pseudogene. *J Biol Chem* 267: 24090-24096
- Lenzen S, Formanek H, Panten U (1982) Signal function of metabolism of neutral amino acids and 2-keto acids for initiation of insulin secretion. *J Biol Chem* 257: 6631-6633
- Liu TC, Kim H, Arizmendi C, Kitano A, Patel MS (1993) Identification of two missense mutations in a dihydrolipoamide dehydrogenase-deficient patient. *Proc Nat Acad Sci* 90: 5186-5190
- Lundholm KS, Edström L, Ekman L, Karlberg I, Walker P, Schersten T (1981) Protein degradation in human skeletal muscle tissue: the effect of insulin, leucine, amino acids, and ions. *Clin Sci* 60: 319-326
- Mamer OA, Reimer MLJ (1992) On the mechanism of the formation of L-alloisoleucine and the 2-hydroxy-3-methylvaleric acid stereoisomers from L-isoleucine in maple syrup urine disease patients and in normal humans. *J Biol Chem* 267: 22141-22147
- Mamer OA, Tjoa SS, Scriver CR, Klassen GA (1976) Demonstration of a new mammalian isoleucine catabolic pathway yielding an R series of metabolites. *Biochem J* 160: 417-426
- Matalon R, Stumpf DA, Michals K, Hart RD, Parks JK, Goodman SI (1984) Lipoamid dehydrogenase deficiency with primary lactic acidosis: favorable response to treatment with oral lipoic acid. *J Pediatr* 104: 65-69

- Matsuda I, Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Indo Y, Endo F, Asaka J, Harada A (1990) A T-to-A substitution in the E1 $\alpha$  subunit gene the human branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex in two cell lines derived from Menonite (sic) maple syrup urine disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 646-651
- Matuda S, Kitano A, Sakaguchi Y, Yoshino M, Saheki T (1984) Pyruvate dehydrogenase subcomplex with lipoamid dehydrogenase deficiency in a patient with lactic acidosis and branched chain ketoaciduria. *Clin Chim Acta* 140: 59-64
- Meister A (1951) Studies on d- and l- $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvaleric acids. *J Biol Chem* 190: 269-276
- Menkes JH, Hurst PL, Craig JM (1954) A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* 14: 462-466
- Mitch WE, Cleark AS. Specificity of the effects of leucine and its metabolites on protein degradation in skeletal muscle. *Biochem J* 222: 579-586
- Mitsubuchi H, Nobukuni Y, Akaboshi I, Indo Y, Endo F, Matsuda I (1991b) Maple syrup urine disease caused by a partial deletion in the inner E2 core domain of the branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex due to an aberrant splicing: a single base deletion at a 5-prime-splice donor site of an intron of the E2 gene disrupts the consensus sequence in this region. *J Clin Invest* 87: 1207-1211
- Mitsubuchi H, Nobukuni Y, Endo F, Matsuda I (1991a) Structural organization and chromosome localisation of the gene for E1 $\beta$  subunit of human of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase. *J Biol Chem* 266: 14686-14691
- Munnich A, Saudubray JM, Taylor J, Charpentier C, Marsac C, Rocchiccioli F, Amedee-Manesme O, Coude FX, Frezal J, Robinson BH (1982) Congenital lactic acidosis,  $\alpha$ -ketoglutaric aciduria and variant form of maple syrup urine disease due to a single enzyme defect: Dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency. *Acta Paediatr Scand* 71: 167-171
- Nair KS, Schwartz RG, Welle S (1992) Leucine as a regulator of whole body and skeletal muscle protein metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* 263: E928-E934
- Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Akaboshi I, Indo Y, Endo F, Yoshioka A, Matsuda I (1991) Maple syrup urine disease: complete defect of the E1 $\beta$  subunit of the branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex due to a deletion of an 11-bp repeat sequence which encodes a mitochondrial targeting leader peptide in a family with the disease. *J Clin Invest* 87: 1862-1866
- Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Hayashida Y, Ohta K, Indo Y, Ichiba Y, Endo F, Matsuda I (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
- Norton PM, Roitman E, Snyderman SE, Holt LE Jr (1962) A new finding in maple syrup urine disease. *Lancet* 1: 26-27
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM <sup>TM</sup>. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 248600/-11/-10: 10/18/1999. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- Paul HS, Adibi SA (1982) Role of ATP in the regulation of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase activity in liver and muscle mitochondria of fed, fasted, and diabetic rats. *J Biol Chem* 257: 4875-4881
- Paxton R, Harris RA (1982) Isolation of rabbit liver branched chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem* 257: 14433-14439
- Pösö AR, Wert JJ, Mortimore GE (1982) Multifunctional control by amino acids of deprivation-induced proteolysis in liver. Role of leucine. *J Biol Chem* 257: 12114-12120
- Püschel SM, Bresnan MJ, Shih VE, Levy HL (1979) Thiamine-responsive intermittent branched-chain ketoaciduria. *J Pediatr* 94: 628-631
- Robinson BH, Taylor J, Kahler SG, Kirkman HN (1981) Lactic acidemia, neurologic deterioration and carbohydrate dependence in a girl with lipoamid dehydrogenase deficiency. *Eur J Pediatr* 136: 35-39
- Robinson BH, Taylor J, Sherwood WG (1977) Deficiency of lipoamid dehydrogenase: a cause of congenital chronic lactic acidosis in infancy. *Pediatr Res* 11: 1198-1202

- Rush JWE, MacLean DA, Hultman E, Graham TE (1995) Exercise causes branched-chain oxoacid dehydrogenase dephosphorylation but not AMP deaminase binding. *J Appl Physiol* 78: 2193-2200
- Schadewaldt P, Hammen HW, Dalle-Feste C, Wendel U (1990) On the mechanism of L-alloisoleucine formation: studies on a healthy subject and in fibroblasts from normals and patients with maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 13: 137-150
- Schadewaldt P, Wendel U, Hammen HW (1995) Human branched-chain L-amino acid aminotransferase: Activity and subcellular localization in cultured skin fibroblasts. *Amino Acids* 9: 147-160
- Scherer SW, Otulakowski G, Robinson BH, Tsui LC (1991) Localization of the human dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD) to 7.q31-q32. *Cytogenet Cell Genet* 56: 176-177
- Scriver CR, Clow CL, George HG (1985) So-called thiamin-responsive maple syrup urine disease: 15-year follow-up of the original patient. *J Pediatr* 107 (5): 763-765
- Scriver CR, Mackenzie S, Clow CL, Delvin E (1971) Thiamine-responsive maple-syrup urine disease. *Lancet* 1: 310-312
- Shany E, Saada A, Landau D, Shaag A, Hershkowitz E, Elpeleg ON (1999) Lipoamide dehydrogenase deficiency due to a novel mutation in the interface domain. *Biochem Biophys Res Comm* 262: 163-166
- Silberberg DH (1969) Maple syrup urine disease metabolites studied in cerebellum cultures. *J Neurochem* 16: 1141-1146
- Snyderman SE, Norton PM, Roitman E, Holt LE Jr (1964) Maple syrup urine disease with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics* 34: 454-462
- Stalder K (1959) Über das Vorkommen von Äthylmalonsäure im Harn. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 314: 205-210
- Suryawan A, Hawes JW, Harris RA, Shimomura Y, Jenkins AE, Hutson SM (1998) A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr* 68: 72-81
- Taylor J, Robinson BH, Sherwood WG (1978) A defect in branched-chain amino acid metabolism in a patient with congenital lactic acidosis due to with lipoamid dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 12: 60-62
- Tessari P, Garibotto G, Inchiostro S, Robaudo C, Saffioti S, Vettore M, Zanetti M, Russo R, Deferrari G (1996) Kidney, splanchnic, and leg protein turnover in humans. Insight from leucine and phenylalanine kinetics. *J Clin Invest* 98: 1481-1492
- Tischler ME, Desautels M, Goldberg AL (1982) Does leucine, leucyl-t-RNA, or some metabolite of leucine regulate protein synthesis and degradation and cardiac muscle? *J Biol Chem* 257: 1613-1621
- Tsuruta M, Mitsubuchi H, Mardy S, Miura Y, Hayashida Y, Kinugasa A, Ishitsu T, Matsuda I, Indo Y (1998) Molecular basis of the intermittent maple syruo urine disease: novel mutations in the E2 gene of the branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex. *J Human Genet* 43: 91-100
- van Hall G, Saltin B, van der Vusse GJ, Söderlund K, Wagenmakers AJM (1995) Deamination of amino acids as source for ammonia production in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J Physiol* 489: 251-261
- Wagenmakers AJM, Brookes JH, Coakley JF, Reilly T, Edwards RHT (1989) Exercise-induced activation of the branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase in human muscle. *Eur J Appl Physiol* 59: 159-167
- Wendel U, Langenbeck U, Lombeck I, Bremer HJ (1982a) Maple syrup urine disease - therapeutic use of insulin in catabolic states. *Eur J Pediatr* 139: 172-175
- Wendel U, Langenbeck U, Lombeck I, Bremer HJ (1982b) Exchange transfusion in acute episodes of maple-syrup urine disease. Studies on branched-chain amino and keto acids. *Eur J Pediatr* 138: 293-296
- Wendel U, Saudubray JM, Bodner A, Schadewaldt P (1999) Liver transplantation in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 158 (Suppl 1): S 60-S64
- Yeaman SJ (1989) The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem J* 257: 625-632
- Zneimer SM, Lau KS, Eddy RL, Shows TB, Chuang JL, Chuang DT, Cox RP (1991) Regional assignment of two genes of the human of 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

## Teil II

### Katabolismus verzweigtkettiger L-Aminosäuren in vivo bei Ahornsirupkrankheit

Abumrad NN, Wise KL, Williams PE, Abumrad NA, Lacy WW (1982) Disposal of  $\alpha$ -ketoisocaproate: roles of liver, gut and kidneys. *Am J Physiol* 243: E123-E131

Allsop JR, Wolfe RR, Burke JF (1978) Tracer priming the bicarbonate pool. *J Appl Physiol* 45: 137-139

Arnold J, Campbell IT, Samuels TA, Devlin JC, Green CJ, Hipkin LJ, MacDonald IA, Scrimgeour CM, Smith K, Rennie MJ (1993) Increased whole body protein breakdown predominates over increased whole body protein synthesis in multiple organ failure. *Clin Sci* 84: 655-661

Askanazi J, Carpentier YA, Michelsen CB, Elwyn DH, Furst P, Kantrowitz LR, Gump FE, Kinney JM (1980) Muscle and plasma amino acids following injury. Influence of intercurrent infection. *Ann Surg* 192: 78-85

Balagopal P, Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, Nair KS (1997) Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *Am J Physiol* 273: E790-E800

Baumann PQ, Stirewalt WS, O'Rourke BD, Howard D, Nair KS (1994) Precursor pools of protein synthesis: a stable isotope study in a swine model. *Am J Physiol* 267: E203-E209

Beaufrère B, Chassard D, Broussolle C, Riou JP, Beylot M (1992) Effects of D- $\beta$ -hydroxybutyrate and long- and medium-chain triglycerides on leucine metabolism in humans. *Am J Physiol* 262: E268-E274

Beaufrère B, Horber FF, Schwenk WF, Marsh H, Matthews DE, Gerich JE, Haymond MW (1989) Glucocorticosteroids increase leucine oxidation and impair leucine balance in humans. *Am J Physiol* 257: E712-E721

Ben Galim E, Hruska K, Bier DM, Matthews DE, Haymond MW (1980) Branched-chain amino acid nitrogen transfer to alanine in vivo in Dogs. *J Clin Invest* 66: 1295-1304

Bennet WM, Connacher AA, Scrimgeour CM, Jung RT, Rennie MJ (1990a) Euglycemic hyperinsulinemia augments amino acid uptake by human leg tissues during hyperaminoacidemia. *Am J Physiol* 259: E185-E194

Bennet WM, Connacher AA, Scrimgeour CM, Rennie MJ (1990b) The effect of amino acid infusion on leg protein turnover assessed by L-[ $^{15}\text{N}$ ]phenylalanine and L-[1- $^{13}\text{C}$ ]leucine exchange. *Eur J Clin Invest* 20: 41-50

Bergstöm J, Furst P, Norée L-O, Vinnars E (1974) Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J Appl Physiol* 36: 693-697

Berry GT, Heidenreich R, Kaplan P, Levine F, Mazur A, Palmieri MJ, Yudkoff M, Segal S (1991) Branched-chain amino acid free parenteral nutrition in the treatment of acute metabolic decompensation in patients with maple syrup urine disease. *New Engl J Med* 324: 175-179

Bier DM (1989) Intrinsically difficult problems: the kinetics of body proteins and amino acids in man. *Diab Metab Rev* 5: 111-132

Biolo G, Gastaldelli A, Zhkang XJ, Wolfe RR (1994) Protein synthesis and breakdown in skin and skeletal muscle: a leg model of amino acid kinetics. *Am J Physiol* 267: E467-E474

Bodner A, Hammen HW, Renn W, Wendel U, Schadewaldt P (1997) Whole body branched-chain L-amino acid oxidation in overnight fasted human subjects. *Isotopes Environ Health Stud* 33: 189-196

Bodner A, Renn W, Wendel U, Schadewaldt P (1996) Compartmental approach for evaluation of plasma kinetics and  $^{13}\text{CO}_2$ -exhalation after oral loading with L-[1- $^{13}\text{C}$ ]leucine. *Isotopes Environ Health Stud* 32: 237-246

- Bodner A, Wendel U, Saudubray JM, Schadowaldt P (1998) Liver transplantation in maple syrup urine disease: near normalization of branched-chain L-amino acid metabolism. *J Inher Metab Dis* 21 (Suppl 2): 19
- Bowtell JL, Leese GP, Smith K, Watt PW, Nevill A, Rooyackers O, Wagenmakers AJM, Rennie MJ (1998) Modulation of whole body protein metabolism, during and after exercise, by variation of dietary protein. *J Appl Physiol* 85: 1744-1752
- Brillon DJ, Zheng B, Campbell RG, Matthews DE (1995) Effect of cortisol on energy expenditure and amino acid metabolism in humans. *Am J Physiol* 268: E501-E513
- Caballero B, Wurtman RJ (1991) Differential effects of insulin resistance on leucine and glucose kinetics in obesity. *Metabolism* 40: 51-58
- Carbonel F, Messing B, Darmaun D, Rimbart A, Rgnier M, Rigal O, Koziat J, Thuillier F, Desjeu JF (1995) Energy and protein metabolism in malnutrition due to neoplastic gastrointestinal diseases. *Metabolism* 44: 1110-1115
- Carli F, Ramachandra V, Gandy J, Merritt H, Ford GC, Read M, Halliday D (1990) Effect of general anaesthesia on whole body protein turnover in patients undergoing elective surgery. *Br J Anaesthesia* 65: 373-379
- Carlson MG, Snead WL, Campbell PJ (1994) Fuel and energy metabolism in fasting humans. *Am J Clin Nutr*. 60: 29-36
- Carraro F, Rosenblatt J, Wolfe RR (1991) Isotopic determination of fibronectin synthesis in humans. *Metabolism* 40: 553-561
- Cayol M, Tauveron I, Frambourdin F, Prugnaud J, Gachon P, Thielbot P, Grizard J, Obled C (1995) Whole-body protein turnover and hepatic protein synthesis are increased by vaccination in man. *Clin Sci* 89: 389-396
- Chuang DT, Shih VE (1995) Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw Hill, New York, pp. 1239-1277
- Cobelli C, Saccomani MP, Tessari P, Biolo G, Luzi L, Matthews DE (1991) Compartmental model of leucine kinetics in humans. *Am J Physiol* 261: E539-E550
- Collins JE, Umpleby AM, Boroujerdi MA, Leonard JV, Sonksen PH (1987) Effect of insulin on leucine kinetics in maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 21: 10-13
- Collin-Vidal C, Cayol M, Obled C, Ziegler F, Bommelaer G, Beaufrère B (1994) Leucine kinetics are different during feeding with whole protein or oligopeptides. *Am J Physiol* 267: E907-E914
- Copeland KC, Nair KS (1994) Acute growth hormone effects on amino acid and lipid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1040-1047
- Cortiella J, Matthews DE, Hoerr RA, Bier DM, Young VR (1988) Leucine kinetics at graded intakes in young men: quantitative fate of dietary leucine. *Am J Clin Nutr* 48: 998-1009
- Crowe PJ, Royle GT, Wagner D, Burke JF (1989) Does hyperketonemia affect protein or glucose kinetics in postabsorptive or traumatized man? *J Surg Res* 47: 313-318
- Danner DJ, Davidson ED, Elsas LJ (1975) Thiamine increases the specific activity of human liver branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenases. *Nature* 254: 529-530
- Darmaun D, Just B, Messing B, Rongier M, Thuillier F, Koziat J, Grassset E (1994) Glutamine metabolism in healthy adult men: response to enteral and intravenous feeding. *Am. J. Clin. Nutr.* 59: 1395-1402
- De Feo P, Volpi E, Lucidici P, Cruciani G, Santeusano F, Bolli GB, Brunetti P (1994) Chloroquine reduces whole body proteolysis in humans. *Am J Physiol* 267: E183-E186
- Devlin JT, Brodsky I, Scrimgeour A, Fuller S, Bier DM (1990) Amino acid metabolism after intense exercise. *Am J Physiol* 258: E249-E255
- Dubois D, Dubois EF (1915) The measurement of the surface area of man. *Arch Intern Med* 15: 868-881
- Duran M, Tielens AG, Wadman SK, Stigter JC, Kleijer WJ (1978) Effects of thiamine in a patient with variant form of branched-chain ketoaciduria. *Acta Paediatr Scand* 67: 367-372
- Duran M, Wadman SK (1985) Thiamine-responsive inborn errors of metabolism. *J Inherited Metab Dis (Suppl 1)* 8: 70-75

- Elahi D, McLoon-Dyke M, Fukagawa NK, Sclater AL, Wong GA, Shannon RP, Minaker KL, Miles JM, Rubenstein AR, Vandepol CJ, Guler HP, Good WR, Seaman JJ, Wolfe RR (1993) Effect of recombinant human IGF-I on glucose and leucine kinetics in men. *Am J Physiol* 256: E831-E838
- Ellerine NP, Herring WJ, Elsas LJ, McKean MC, Klein PD, Danner DJ (1993) Thiamin-responsive maple syrup urine disease in a patient antigenically missing dihydrolipoamide acyltransferase. *Biochem Med Metab Biol* 49: 363-374
- Elsas L, Blocker T, Wheeler F, Pask B, Perl D, Trusler S (1972) Variant „classical“ maple syrup urine disease: co-factor response. *Clin Res* 2043: 929-944
- Elsas LJ, Danner D (1982) The role of thiamine in maple syrup urine disease. *Ann NY Acad Sci* 378: 404-421
- Elsas LJ, Ellerine NP, Klein PD (1993) Practical methods to estimate whole body leucine oxidation in maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 33: 445-451
- Felig P (1975) Amino acid metabolism in man. *Annu Rev Biochem* 44: 933-955
- Fernhoff PM, Lubitz D, Danner DJ, Dembure PP, Schwartz HP, Hillman R, Bier DM, Elsas LJ (1985) Thiamine-response in maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 19: 1011-1016
- Flakoll PJ, Hill JO, Abumrad NN (1993) Acute hyperglycemia enhances proteolysis in normal man. *Am J Physiol* 265: E715-E721
- Fong Y, Matthews DE, He W, Marano MA, Moldawer LL and Lowry SF (1994) Whole body and splanchnic leucine, phenylalanine, and glucose kinetics during endotoxemia in humans. *Am J Physiol* 266: R419-R425
- Fukagawa NK, Minaker KL, Young VR, Matthews DE, Bier DM, Rowe JW (1989) Leucine metabolism in aging humans: effect of insulin and substrate availability. *Am J Physiol* 256: E288-E294
- Garrel DR, Moussali R, De Oliveira A, Lesiège D, Larivière F (1995) RU 486 prevents the acute effects of cortisol on glucose and leucine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 379-385
- Gelfand RA, Glickman MG, Castellino P, Louard RJ, DeFronzo RA (1988) Measurement of L-[1-<sup>14</sup>C]leucine kinetics in splanchnic and leg tissues in humans: effect of amino acid infusion. *Diabetes* 37: 1365-1372
- Ghoos YF, Maes BD, Geypens BJ, Mys G, Hiele MI, Rutgeerts PJ, Vantrappen G (1993) Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test. *Gastroenterology* 104: 1640-1647.
- Gibson KM, Elpeleg ON, Wappner RS (1996). In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME (eds.) *Physicians guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. Chapman & Hall, London, pp. 125-144
- Giordano M, Castellino P, Carroll CA, DeFronzo RA (1995) Comparison of the effects of human recombinant insulin-like growth factor I and insulin on plasma amino acid concentrations and leucine kinetics in humans. *Diabetologia* 38: 732-738
- Gortner L, Leupold D, Pohlandt F, Bartman P (1989) Peritoneal dialysis in the treatment of metabolic crisis caused by inherited disorders of organic and amino acid metabolism. *Acta Paediatr Scand* 78: 706-711
- Goto M, Shinno H, Ichihara A (1977) Isoenzyme patterns of branched-chain amino acid transaminase in human tissues and tumors. *Gann* 68: 663-667
- Hammersen G, Wille L, Schmidt H, Lutz P, Bickel H (1978) Maple syrup urine disease: treatment of the acutely ill newborn. *Eur J Pediatr* 129: 157-165
- Hankard RG, Haymond MW, Darmaun D (1997) Role of glutamine as a glucose precursor in fasting humans. *Diabetes* 46: 1535-1541
- Hartl WH, Miyoshi H, Jahoor F, Klein S, Elahi D, Wolfe RR (1990) Bradykinin attenuates glucagon-induced leucine oxidation in humans. *Am J Physiol* 259: E229-E245
- Haycock G, Schwartz G, Wisotsky D (1978) Geometric method for measuring body surface area: a height-weight formula validated in infants, children and adults. *J Pediatr* 93: 62-66
- Hayworth JC, Perry TL, Blass JP, Hansen S, Urquart N (1976) Lactic acidosis in three sibs due to defects in both pyruvate dehydrogenase and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complexes. *Pediatrics* 58: 564-572
- Heslin MJ, Newman E, Wolf RF, Pisters PWT, Brennan MF (1992) Effect of hyperinsulinemia on whole body and skeletal muscle leucine carbon kinetics in humans. *Am J Physiol* 262: E911-E918

- Hill RL (1965) Hydrolysis of proteins. *Adv Prot Chem* 20: 37-107
- Hiramatsu T, Cortiella J, Marchini JS, Chapman TE, Young VR (1994) Source and amount of dietary nonspecific nitrogen in relation to whole-body leucine, phenylalanine, and tyrosine kinetics in young men. *Am J Clin Nutr* 59: 1347-1355
- Hoerr RA, Matthews DE, Bier DM, Young VR (1991) Leucine kinetics from [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]- and [<sup>13</sup>C]leucine infused simultaneously by gut and vein. *Am J Physiol* 260: E111-E117
- Hoffer LJ, Yang RD, Matthews DE, Bistran BR, Bier DM, Young VR (1985) Effects of meal consumption on whole body leucine and alanine kinetics in young adult men. *Br J Nutr* 53: 31-38
- Horber FF, Haymond MW (1990) Human growth hormone prevents the protein catabolic side effects of prednisone in humans. *J Clin Invest* 86: 265-272
- Huang YS, Chuang DT (1999) Down-regulation of rat mitochondrial branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase kinase gene expression by glucocorticoids. *Biochem J* 339: 503-510
- Hutson SM, Harper AE (1981) Blood and tissue branched-chain amino and  $\alpha$ -keto acid concentrations: effect of diet, starvation and disease. *Am J Clin Nutr* 34: 173-183
- Inchiostro S, Biolo G, Bruttosmeso D, Fongher C, Sabadin L, Carlini M, Duner E, Tiengo A, Tessari P (1992) Effect of insulin and amini acid infusion on leucine and phenylalanine kinetics in type I diabetes. *Am J Physiol* 262: E203-E210
- Indo Y, Kitano A, Endo F, Akaboshi I, Matsuda I (1987) Altered kinetic properties of the branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex due to mutation of the  $\beta$ -subunit of the branched-chain  $\alpha$ -keto acid decarboxylase (E1) component in lymphoblastoid cells derived from patients with maple syrup urine disease. *J Clin Invest* 80: 63-70
- Irving CS, Wong WW, Shulman RJ, Smith EO'B, Klein PD (1983) [<sup>13</sup>C]Bicarbonate kinetics in humans: intra- vs. interindividual variations. *Am J Physiol* 245: R190-R202
- Jackman ML, Gibala MJ, Hultman E, Graham TE (1997) Nutritional status affects branched-chain oxoacid dehydrogenase activity during exercise in humans. *Am J Physiol* 272: E233-E238
- Jensen MD, Miles JM, Gerich JE, Cryer PE, Haymond MW (1988) Preservation of insulin effects on glucose production and proteolysis during fasting. *Am J Physiol* 254: E700-E707
- Jones SM, Yeaman SJ (1986) Oxidative decarboxylation of 4-methylthio-2-oxobutyrate by branched-chain 2-oxo acids dehydrogenase complex. *Biochem J* 237: 621-623
- Kaplan P, Mazur AM, Smith R, Olthoff K, Maller E, Palmieri M, Berry GT (1997) Transplantation for maple syrup urine disease (MSUD) and methylmalonic acidopathy (MMA). *J Inher Metab Dis* 20 (Suppl 1): 37
- Khatra BS, Chawla RK, Sewell CW, Rudman D (1977) Distribution of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenases in primate tissues. *J Clin Invest* 59: 558-564
- Klein S, Jahoor F, Wolfe RR, Stuart CA (1992) Generalized lipodystrophy: in vivo evidence for hypermetabolism and insulin-resistant lipid, glucose, and amino acid kinetics. *Metabolism* 41: 893-896
- Knapik J, Meredith C, Jones B, Fielding R, Young V, Evans W (1991) Leucine metabolism during fasting and exercise. *J Appl Physiol* 70: 43-47
- Kodama S, Seki A, Hanabusa M, Morisita Y, Sakurai T (1976) Mild variant of maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 124: 31-36
- Korein J, Sansaricq C, Kalmijn M, Honig J, Lange B (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
- Lamont LS, McCullough AJ, Kalhan SC (1995)  $\beta$ -adrenergic blockade heightens the exercise-induced increase in leucine oxidation. *Am J Physiol* 268: E910-E916
- Lariviere F, Kupranycz D, Chiasson JL, Hoffer LJ (1992) Plasma leucine kinetics and urinary nitrogen excretion in intensively-treated diabetes mellitus. *Am J Physiol* 263: E173-E179
- Lariviere F, Moussalli R, Garell DR (1994) Increased leucine flux and leucine oxidation during the luteal phase of the menstrual cycle in women. *Am J Physiol* 267: E422-E428
- Livesey G, Lund P (1982) Binding of branched-chain 2-oxo acids to bovine serum albumin. *Biochem J* 204: 265-272
- Lobley GE, Connell A, Milne E, Buchan V, Calder AG, Anderson SE, Vint H (1990) Muscle protein synthesis in response to testosterone adminiostartion in wether lambs. *Br J Nutr* 64: 691-704

- Louard RJ, Barrett EJ, Gelfand RA (1995) Overnight branched-chain amino acid infusion causes sustained suppression of muscle proteolysis. *Metabolism* 44: 424-429
- Luzi L, Battezzati A, Perseghin G, Bianchi E, Terruzzi I, Spotti D, Vergani S, Secchi A, La Rocca E, Ferrari G, Staudacher C, Castoldi R, Di Carlo V, Pozza G (1994) Combined pancreas and kidney transplantation normalizes protein metabolism in insulin-dependent diabetic-uremic patients. *J Clin Invest* 93: 1948-1958
- Luzi L, Castellino P, Simonson DC, Petrides AS, DeFronzo RA (1990) Leucine metabolism in IDDM: role of insulin and substrate availability. *Diabetes* 39: 38-48
- Macallan DC, McNurlan MA, Milne E, Calder AG, Garlick PJ (1995) Whole-body protein turnover from leucine kinetics and the response to nutrition in human immunodeficiency virus infection. *Am J Clin Nutr* 61: 818-826
- Magnus-Levy A (1910) Über den Gehalt normaler menschlicher Organe an Chlor, Calcium, Magnesium und Eisen sowie an Wasser, Eiweiß und Fett. *Biochem Z* 24: 363-380
- Maroni BJ, Staffeld C, Young VR, Manatunga A, Tom K (1997) Mechanisms permitting nephrotic patients to achieve nitrogen equilibrium with a protein-restricted diet. *J Clin Invest* 99: 2479-2487
- Matalon R, Stumpf DA, Michals K, Hart RD, Parks JK, Goodman SI (1984) Lipoamid dehydrogenase deficiency with primary lactic acidosis: favorable response to treatment with oral lipoic acid. *J Pediatr* 104: 65-69
- Matsuo Y, Yagi M, Walser M (1993) Arteriovenous differences and tissue concentrations of branched-chain ketoacids. *J Lab Clin Med* 121: 779-784
- Matthews DE, Bier DM, Rennie MJ, Edwards RHT, Halliday D, Millward DJ, Clugston GA (1981) Regulation of leucine metabolism in man: a stable isotope study. *Science* 214: 1129-1131
- Matthews DE, Motil KJ, Rohrbaugh DK, Burke JF, Young VR, Bier DM (1980) Measurement of leucine metabolism in man from a primed continuous infusion of L-[1-<sup>13</sup>C]leucine. *Am J Physiol* 238: E473-E479
- Matthews DE, Pesola G, Campbell RG (1990) Effect of epinephrine on amino acid and energy metabolism in humans. *Am J Physiol* 258: E948-E956
- Matthiesen U, Schadewaldt P (1994) Determination of isotope enrichment in <sup>13</sup>C- or <sup>2</sup>H-labelled branched-chain L-amino acids from physiological fluids by gaschromatography-mass spectrometry: use of L-leucine dehydrogenase for specific preparation of the quinoxalinol derivatives. *Isotopes Environ Health Stud* 30: 219-230
- Matuda S, Kitano A, Sakaguchi Y, Yoshino M, Saheki T (1984) Pyruvate dehydrogenase subcomplex with lipoamid dehydrogenase deficiency in a patient with lactic acidosis and branched chain ketoaciduria. *Clin Chim Acta* 140: 59-64
- Mauras N, Beaufrère B (1995) Recombinant human insulin-like growth factor-I enhances whole body protein anabolism and significantly diminishes the protein catabolic effects of prednisone in humans without a diabetogenic effect. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 869-874
- Mc Cullough AJ, Mullen KD, Tavill AS, Kalhan SC (1996) In vivo differences between the turnover rates of leucine and leucine's ketoacid in stable cirrhosis. *Gastroenterology* 103: 571-578
- Meguid MM, Matthews DE, Bier DM, Meredith CN, Soeldner JS, Young VR (1986) Leucine kinetics at graded leucine intakes in young men. *Am J Clin Nutr* 43: 770-780
- Meguid MM, Schwarz H, Matthews DE, Karl IE, Young VR, Bier DM (1983) In vivo and in vitro branched-chain amino acid interactions. In: Blackburn GL, Grant JP, Young VR (eds.) *Amino acids. Metabolism and medical applications*. John Wright, Boston, pp. 147-154
- Melville S, McNurlan MA, McHardy KC, Broom J, Milne E, Calder AG, Garlick PJ (1989) The role of degradation in the acute control of protein balance in adult man: failure of feeding to stimulate protein synthesis as assessed by L-[1-<sup>13</sup>C]leucine infusion. *Metabolism* 38: 248-255
- Menkes JH, Hurst PL, Craig JM (1954) A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* 14: 462-466
- Merinero B, Rerez-Cerda C, Sanz P, Font LM, Garcia MJ, Martinez Pardo M, Hierro L, Jara P, Ugarte M (1994) Liver Transplantation (LT) in a spanish MSUD patient. Abstracts 32<sup>nd</sup> SSIEM Annual Symposium P64

- Motil KJ, Bier DM, Matthews DE, Burke JF, Young VR (1981a) Whole body leucine and lysine metabolism studied with [1-<sup>13</sup>C]leucine and [ $\alpha$ -<sup>15</sup>N]lysine: response in healthy young men given excess energy intake. *Metabolism* 30: 783-791
- Motil KJ, Matthews DE, Bier DM, Burke JF, Munro HN, Young VR (1981b) Whole-body leucine and lysine metabolism: response to dietary protein intake in young men. *Am J Physiol* 240: E712-E721
- Munnich A, Saudubray JM, Taylor J, Charpentier C, Marsac C, Rocchiccioli F, Amedee-Manesme O, Coude FX, Frezal J, Robinson BH (1982) Congenital lactic acidosis,  $\alpha$ -ketoglutaric aciduria and variant form of maple syrup urine disease due to a single enzyme defect: Dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency. *Acta Paediatr Scand* 71: 167-171
- Nair KS, Ford GC, Halliday D (1983a) Effect of intravenous insulin treatment on in vivo whole body leucine kinetics and oxygen consumption in insulin-deprived type I diabetic patients. *Metabolism* 36: 491-495
- Nair KS, Garrow JS, Ford C, Mahler RF, Halliday D (1983b) Effect of poor diabetic control and obesity on whole body protein metabolism in man. *Diabetologia* 25: 400-403
- Nair KS, Halliday D, Matthews DE, Welle SL (1987a) Hyperglucagonemia during insulin deficiency accelerates protein catabolism. *Am J Physiol* 253: E208-E213
- Nair KS, Woolf PD, Welle SL, Matthews DE (1987b) Leucine, glucose, and energy metabolism after 3 days of fasting in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr* 46: 557-562
- Netter JC, Cossarizza G, Narcy C, Hubert P, Ogier H, Revillon Y, Rabier D, Saudubray JM (1994) Devenir à moyen terme de deux cas de leucinose: place de la transplantation hépatique dans le traitement. *Arch Pédiatr* 1: 730-734
- Paul HS, Liu WQ, Adibi SA (1996) Alteration in gene expression of branched-chain keto acid dehydrogenase kinase but not in gene expression of its substrate in the liver of clofibrate-treated rats. *Biochem J* 317: 411-417
- Paxton R, Harris RA (1984) Regulation of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase kinase. *Arch Biochem Biophys* 231: 48-57
- Petrides AS, Luzi L, DeFronzo RA (1994) Time-dependent regulation by insulin of leucine metabolism in young healthy adults. *Am J Physiol* 267: E361-E368
- Püschel SM, Bresnan MJ, Shih VE, Levy HL (1979) Thiamine-responsive intermittent branched-chain ketoaciduria. *J Pediatr* 94: 628-631
- Quevedo MR, Price GM, Halliday D, Pacy PJ, Millward DJ (1994) Nitrogen homeostasis in man: diurnal changes in nitrogen excretion, leucine oxidation and whole body leucine kinetics during a reduction from a high to a moderate protein intake. *Clin Sci* 86: 185-193
- Rennie MJ, Edwards RHT, Halliday D, Matthews DE, Wolman SL, Millward DJ (1982) Muscle protein synthesis measured by stable isotope techniques in man: the effects of feeding and fasting. *Clin Sci* 63: 519-523
- Rey F, Rey J, Cloup M, Feron JF, Dore F, Labrune B, Frezal J (1969) Traitement d'urgence d'une forme grave de leucinose par dialyse péritoneale. *Arch Fr Pédiatr* 26: 133-137
- Robert JJ, Bier DM, Zhao XH, Matthews DE, Young VR (1982) Glucose and insulin effects on de novo amino acid synthesis in young men: studies with stable isotope labeled alanine, glycine, leucine, and lysine. *Metabolism* 31: 1210-1218
- Robinson BH, Taylor J, Kahler SG, Kirkman HN (1981) Lactic acidemia, neurologic deterioration and carbohydrate dependence in a girl with lipoamid dehydrogenase deficiency. *Eur J Pediatr* 136: 35-39
- Robinson BH, Taylor J, Sherwood WG (1977) Deficiency of lipoamid dehydrogenase: a cause of congenital chronic lactic acidosis in infancy. *Pediatr Res* 11: 1198-1202
- Rush JWE, MacLean DA, Hultman E, Graham TE (1995) Exercise causes branched-chain oxoacid dehydrogenase dephosphorylation but not AMP deaminase binding. *J Appl Physiol* 78: 2193-2200
- Rutledge SL, Havens PL, Haymond MW, McLean RH, Kann JS, Brusilow SW (1990) Neonatal hemodialysis: effective therapy for the encephalopathy of inborn errors of metabolism. *J Pediatr* 116: 125-128

- Saccomani MP, Bonadonna RC, Cavegion E, DeFronzo RA, Cobelli C (1995) Bicarbonate kinetics in humans: identification and validation of a three-compartment model. *Am J Physiol* 269: E183-E192
- Sallan SE, Cottom D (1969) Peritoneal dialysis in maple syrup urine disease. *Lancet* 2: 1423-1424
- Schadewaldt P, Beck K, Wendel U (1989) Analysis of maple syrup urine disease in cell culture: use of substrates. *Clin Chim Acta* 184: 47-56
- Schadewaldt P, Bodner A, Brösicke H, Hammen HW, Wendel U (1998) Assessment of whole body L-leucine oxidation by non-invasive L-[1-<sup>13</sup>C]leucine breath tests: a reappraisal in patients with maple syrup urine disease, obligate heterozygotes, and healthy subjects. *Pediatr Res* 43: 592-600
- Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U (1999) Significance of L-alloisoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease. *Clin Chem* 45: 1734-1740
- Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U (2000) Formation of L-alloisoleucine in vivo: a L-[<sup>13</sup>C]isoleucine study in man. *Pediatr Res* 47: 271-277
- Schadewaldt P, Brösicke H, Haisch M, Matthiesen U, Wendel U (1994) Leucine oxidation in vivo: inter- and intraindividual variation in healthy subjects as assessed by oral L-[1-<sup>13</sup>C]leucine loads. *Isotopenpraxis Environ Health Stud* 30: 141-150
- Schadewaldt P, Dalle-Feste C, Langenbeck U, Wendel U (1991) Oral L-alloisoleucine loading studies in healthy subjects and in patients with maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 30: 430-434
- Schadewaldt P, Hammen H-W, Dalle-Feste C, Wendel U (1990) On the mechanism of L-alloisoleucine formation: studies on a healthy subject and in fibroblasts from normals and patients with maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 13: 137-150
- Schadewaldt P, Hammen H-W, Wendel U, Matthiesen U (1995) Enzymatic-chemical preparation of quinoxaline derivatives from L-amino acids for gas chromatographic-mass spectrometric analyses. *Anal Biochem* 229: 153-161
- Schadewaldt P, Hummel W, Trautvetter U, Wendel U (1989) A convenient enzymatic method for the determination of 4-methyl-2-oxopentanoate: comparison with high performance liquid chromatographic analysis. *Clin Chim Acta* 183: 171-182
- Schadewaldt P, Wendel U (1997) Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 156 (Suppl 1): S62-S66
- Schäfer G, Schauder P (1988) Assessment of effects of amino acids and branched chain keto acids on leucine oxidation in human lymphocytes. *Scand J Lab Invest* 48: 531-536
- Schoeller DA, Schneider JF, Salomons NW, Watkins JB, Klein PD (1977) Clinical diagnosis with the stable isotope <sup>13</sup>C in CO<sub>2</sub> breath tests: methodology and fundamental considerations. *J Lab Clin Med* 90: 412-421
- Schwenk W, Beaufrère B, Haymond MW (1985) Use of reciprocal pool specific activity to model leucine metabolism in humans. *Am J Physiol* 249: E646-E650
- Scriver CR, Clow CL, George HG (1985) So-called thiamin-responsive maple syrup urine disease: 15-year follow-up of the original patient. *J Pediatr* 107: 763-765
- Scriver CR, Mackenzie S, Clow CL, Delvin E (1971) Thiamine-responsive maple-syrup urine disease. *Lancet* 1: 310-312
- Shany E, Saada A, Landau D, Shaag A, Hershkowitz E, Elpeleg ON (1999) Lipoamide dehydrogenase deficiency due to a novel mutation in the interface domain. *Biochem Biophys Res Comm* 262: 163-166
- Shigematsu Y, Kikuchi K, Momoi T, Sudo M, Kikawa Y, Nosaka, K, Kuriyama M, Haruki S, Sanada K, Hamano M, Suzuki Y (1983) Organic acids and branched-chain amino acids in body fluids before and after multiple exchange transfusion in maple syruo urine disease. *J Inher Metab Dis* 6: 183-189
- Shreeve WW, Cerasi E, Luft R (1970) Metabolism of [2-<sup>14</sup>C]pyruvate in normal, acromegalic, and GHG treated human subjects. *Acta Endocrinol* 65: 155-169
- Silberberg DH (1969) Maple syrup urine disease metabolites studied in cerebellum cultures. *J Neurochem* 16: 1141-1146

Snyderman SE, Norton PM, Roitman E, Holt Jr. LE (1964) Maple syrup urine disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics* 34: 454-462  
Staten MA, Bier DM, Matthews DE (1994) Regulation of valine metabolism in man: a stable isotope study. *Am J Clin Nutr* 40: 1224-1234

Suryawan A, Hawes JW, Harris RA, Shimomura Y, Jenkins AE, Hutson SM (1998) A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr* 68: 72-81

Taylor J, Robinson BH, Sherwood WG (1978) A defect in branched-chain amino acid metabolism in a patient with congenital lactic acidosis due to with lipoamid dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 12: 60-62

Tessari P, Garibotto G, Inchiostro S, Robaudo C, Saffioti S, Vettore M, Zanetti M, Russo R, Deferrari G (1996) Kindney, splanchnic, and leg protein turnover in humans. Insight from leucine and phenylalanine kinetics. *J Clin Invest* 98: 1481-1492

Tessari P, Inchiostro S, Zanetti M, Barazzoni R (1995) A model of skeletal muscle leucine kinetics measured across the human forearm. *Am J Physiol* 269: E127-E136

Tessari P, Trevisan R, Inchiostro S, Biolo G, Nosadini R, De Kreutzenberg SV, Duner E, Tiengo A, Crepaldi G (1986) Dose-response curves of effects of insulin on leucine kinetics in humans. *Am J Physiol* 251: E334-E342

Thompson GN, Bresson JL, Pacy PJ, Bonnefont JP, Walter JH, Leonard JV, Saudubray JM, Halliday D (1990a) Protein and leucine metabolism in maple syrup urine disease. *Am J Physiol* 258: E654-E660

Thompson GN, Francis DEM, Halliday D (1991) Acute illness in maple syrup urine disease: dynamics of protein metabolism and implications for management. *J Pediatr* 119: 35-41

Thompson GN, Pacy PJ, Ford GC, Halliday D (1989) Practical considerations in the use of stable isotope labelled compounds as tracers in clinical studies. *Biomed Environ Mass Spectrom* 18: 321-327

Thompson GN, Walter JH, Leonard JV, Halliday D (1990b) In vivo enzyme activity in inborn errors of metabolism. *Metabolism* 39: 799-807

Torres N, Lopez G, De Santiago S, Hutson SM, Tovar AR (1998) Dietary protein level regulates expression of the mitochondrial branched-chain aminotransferases in rats. *J Nutr* 128: 1368-1375

Umpleby AM, Boroujerdi MA, Brown PM, Carson ER, Sonksen PH (1986) The effect of metabolic control on leucine metabolism in type I (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 29: 131-141

van Hall G, Saltin B, van der Vusse GJ, Söderlund K, Wagenmakers AJM (1995) Deamination of amino acids as source for ammonia production in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J Physiol* 489: 251-261

Wagenmakers AJM, Brookes JH, Coakley JF, Reilly T, Edwards RHT (1989) Exercise-induced activation of the branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase in human muscle. *Eur J Appl Physiol* 59: 159-167

Wahlefeld AW, Siedel J (1985) Creatine and creatinine. In: Bergmeyer HU (ed.) *Methods in enzymatic analysis*, vol VII, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 488-506

Walser M, Lund P, Ruderman NB, Coulter AW (1973) Synthesis of essential amino acids from their  $\alpha$ -keto analogues by perfused rat liver and muscle. *J Clin Invest* 52: 2865-2877

Welle S, Statt M, Barnard R, Amatruda J (1994) Differential effect of insulin on whole-body proteolysis and glucose metabolism of normal-weight, obese, and reduced-obese women. *Metabolism* 43: 441-445

Welle S, Thornton C, Statt M (1995) Myofibrillar protein synthesis in young and old human subjects after three months of resistance training. *Am J Physiol* 268: E422-E427

Wendel U (1984) Acute and long-term treatment of children with maple syrup urine disease. In: Adibi SA, Fekl W, Langenbeck U, Schauder P (eds.) *Branched chain amino and keto acids in health and disease*. Karger, Basel, pp. 335-347

Wendel U, Langenbeck U, Lombeck I, Bremer HJ (1982a) Maple syrup urine disease - therapeutic use of insulin in catabolic states. *Eur J Pediatr* 139: 172-175

Wendel U, Langenbeck U, Lombeck I, Bremer HJ (1982b) Exchange transfusion in acute episodes of maple-syrup urine disease. *Studies on branched-chain amino and keto acids*. *Eur J Pediatr* 138: 293-296

Wendel U, Saudubray JM, Bodner A, Schadewaldt P (1999) Liver transplantation in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 158 (Suppl 1): S 60-S64

- Wendel U, Wenstrup H, Rüdiger HW (1975) Maple syrup urine disease: analysis of branched chain keto acid decarboxylation in cultured fibroblasts. *Ped Res* 9: 709-717
- Wolfe RR (1984) Tracers in metabolic research: radioisotope and stable isotope mass spectrometry methods. Wiley-Liss, New York, pp. 230-232
- Wolfe RR (1992) Radioactive and stable isotope tracers in biomedicine: principles and practice of kinetic analysis. Wiley-Liss New York, p 32
- Wolfe RR, Goodenough RD, Wolfe MH, Royle GT, Nadel ER (1982) Isotopic analysis of leucine and urea metabolism in exercising humans. *J Appl Physiol* 52: 458-466
- Wolfe RR, Wolfe MH, Nadel ER, Shaw JHF (1984) Isotopic determination of amino acid-urea interactions in exercise in humans. *J Appl Physiol* 56: 221-229
- Yeaman SJ (1989) The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem J* 257: 625-632

### Teil III

## Der metabolische Fluß durch den verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex in situ

- Bodner A, Renn W, Wendel U, Schadewaldt P (1996) Compartmental approach for evaluation of plasma kinetics and  $^{13}\text{CO}_2$ -exhalation after oral loading with L-[1- $^{13}\text{C}$ ]leucine. *Isotopes Environ Health Stud* 32: 237-246
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-154
- Bremer HJ, Duran M, Kamerling JP, Przyrembel H, Wadman SK (1981) Disturbances of amino acid metabolism. *Clinical chemistry and diagnosis*. Urban & Schwarzenberg, München, pp. 203-217
- Carlsten A, Hallgren B, Jagenburg R, Svanborg A, Werkö L (1966) Amino acids and free fatty acids in plasma in diabetes. 1. The effect of insulin on the arterial levels. *Acta Med Scand* 179: 361-370
- Chuang DT, Shih VE (1995) Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 1239-1277
- Collins JE, Umpleby AM, Boroujerdi MA, Leonard JV, Sonksen PH (1987) Effect of insulin on leucine kinetics in maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 21: 10-13
- Crabb DW, Yount EA, Harris RA (1981) The metabolic effects of dichloroacetate. *Metabolism* 30: 1024-1039
- Dubois D, Dubois EF (1915) The measurement of the surface area of man. *Arch Intern Med* 15:868-881
- Elsas LJ, Ellerine NP, Klein PD (1993) Practical methods to estimate whole body leucine oxidation in maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 33: 445-451
- FAO/WHO/UNU (1985) Energy and protein requirements. In: Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation, World Health Organization, Geneva, Switzerland. Technical Report Series 724
- Felig P, Marliss E, Ohman JL, Cahill GF (1970) Plasma amino acid levels in diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 19: 727-729
- Fürst P (1983) Intracellular muscle free amino acids - their measurement and function. *Proc Nutr Soc* 42: 451-463
- Fürst P, Jonsson A, Josephson B, Vinnars E (1970) Distribution in muscle and liver protein of  $^{15}\text{N}$  administered as ammonium acetate in man. *J Appl Physiol* 29: 307-312
- Gregory DM, Sovetts D, Clow CL, Scriver CR (1986) Plasma free amino acid values in normal children and adolescents. *Metabolism* 35: 967-969
- Hagenfeldt L, Bjerkenstedt L, Edman G, sedvall G, Wiesel FA (1984) Amino acids in plasma and CSF and monoamine metabolites in CSF: interrelationship in healthy subjects. *J Neurochem* 42: 833-837
- Hambraeus L, Bilmazes C, Dippel C, Scrimshaw N, Young VR (1976) Regulatory role of dietary leucine on plasma branched chain amino acid levels in young men. *J Nutr* 106: 230-240

- Harper AE, Miller RH, Block KP (1984) Branched-chain amino acid metabolism. *Ann Rev Nutr* 4: 409-454
- Harris RA, Kuntz MJ, Simpson R (1988) inhibition of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase kinase by  $\alpha$ -chlorisocaproate. In: Harris RA, Sokatch JR (eds.) *Methods in enzymology* Volume 166. Academic Press, San Diego, pp. 114-123
- Harris RA, Paxton R, DePaoli-Roach AA (1982) Inhibition of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase activity by alpha-chlorisocaproate. *J Biol Chem* 257: 13915-13918
- Hill RL (1965) Hydrolysis of proteins. *Adv Prot Chem* 20:37-107
- Irving CS, Wong WW, Shulman RJ, Smith EO'B, Klein PD (1983) [ $^{13}$ C]Bicarbonate kinetics in humans: intra- vs. interindividual variations. *Am J Physiol* 245:R190-R202
- Jones SM, Yeaman SJ (1986) Oxidative decarboxylation of 4-methylthio-2-oxobutyrate by branched-chain 2-oxo acids dehydrogenase complex. *Biochem J* 237: 621-623
- Langenbeck U, Wendel U, Mench-Hoinowski A, Kuschel D, Becker K, Przyrembel H, Bremer HJ (1978) Correlations between branched-chain amino acids and branched chain  $\alpha$ -keto acids in blood in maple syrup urine disease. *Clin Chim Acta* 88: 283-291
- Meguid MM, Matthews DE, Bier DM, Meredith CN, Young VR (1986) Valine kinetics at graded valine intakes in young man. *Am J Clin Nutr* 43: 781-786
- Meguid MM, Schwarz H, Matthews DE, Karl IE, Young VR, Bier DM (1983) In vivo and in vitro branched-chain amino acid interactions. In Blackburn GL, Grant JP, Young VR (eds.) *Amino Acids: Metabolism and medical application*, John Wright Inc., Boston MA, pp. 147-154
- Motil KJ, Matthews DE, Bier DM, Burke JF, Munro HM, Young VR (1981) Whole body leucine and lysine metabolism: response to dietary protein intake in young men. *Am J Physiol* 240: E712-E721
- Paxton R, Harris RA (1984) Clofibrilic acid, phenylpyruvate, and dichloracetate inhibition of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase kinase in vitro and in perfused rat heart. *Arch Biochem Biophys* 231: 58-66
- Pelletier Y, Marks L, Wagner DA, Hoerr RA, Young VR (1991) Branched-chain amino acid interactions with reference to amino acid requirements in adult men: valine metabolism at different leucine intakes. *Am J Clin Nutr* 54: 395-401
- Rüdiger HW, Langenbeck U, Goedde HW (1972) A simplified method for the preparation of  $^{14}$ C-labelled branched-chain  $\alpha$ -oxo acids. *Biochem J* 126: 445-446
- Saccomani MP, Bonadonna RC, Cavegion E, DeFronzo RA, Cobelli C (1995) Bicarbonate kinetics in humans: identification and validation of a three-compartment model. *Am J Physiol* 269: E183-E192
- Schadewaldt P, Beck K, Wendel U (1989) Analysis of maple syrup urine disease in cell culture: use of substrates. *Clin Chim Acta* 184: 47-56
- Schadewaldt P, Bodner A, Brösicke H, Hammen HW, Wendel U (1998) Assessment of whole body L-leucine oxidation by non-invasive L-[1- $^{13}$ C]leucine breath tests: a reappraisal in patients with maple syrup urine disease, obligate heterozygotes, and healthy subjects. *Pediatr Res* 43: 592-600
- Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U (1999b) Significance of L-Alloisoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease. *Clin Chem* 45: 1734-1740
- Schadewaldt P, Brösicke H, Haisch M, Matthiesen U, Wendel U (1994) Leucine oxidation in vivo: inter- and intraindividual variation in healthy subjects as assessed by oral L-[1- $^{13}$ C]leucine loads. *Isotopenpraxis Environ Health Stud* 30: 141-150
- Schadewaldt P, Hammen HW, Dalle-Feste C, Wendel U (1990) On the mechanism of L-alloisoleucine formation: studies on a healthy subject and in fibroblasts from normals and patients with maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 13: 137-150
- Schadewaldt P, Hammen H-W, Ott A-C, Wendel U (1999a) Renal clearance of branched-chain L-amino and 2-oxo acids in maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 22: 706-722
- Schadewaldt P, Hammen HW, Wendel U, Matthiesen U (1995) Enzymatic-chemical preparation of quinoxaline derivatives from L-amino acids for gas chromatographic-mass spectrometric analyses. *Anal Biochem* 229: 153-161

- Schadewaldt P, Hummel W, Trautvetter U, Wendel U (1989) A convenient enzymatic method for the determination of 4-methyl-2-oxopentanoate: comparison with high performance liquid chromatographic analysis. *Clin Chim Acta* 183: 171-182
- Schadewaldt P, Oelers R, Radeck W, Staib W (1984) Oxidative determination of <sup>14</sup>C-labelled 2-oxo acids. *Anal Biochem* 143: 449-457
- Schadewaldt P, Wendel U (1987) Comparison of the catabolism of branched-chain L-amino acids in cultured human skin fibroblasts. *Pediatr Res* 22: 591-594
- Schadewaldt P, Wendel U (1989) Functional differences in the catabolism of branched-chain L-amino acids in cultured normal and maple syrup urine disease fibroblasts. *Biochem Med Metab Biol* 41: 105-116
- Schadewaldt P, Wendel U (1997) Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 156 (Suppl 1): S62-S66
- Schäfer G, Schauder P (1988) Assessment of effects of amino acids and branched chain keto acids on leucine oxidation in human lymphocytes. *Scand J Lab Invest* 48: 531-536
- Schauder P, Schroder K, Herbertz L, Henning von H, Langenbeck U (1984) Oral administration of  $\alpha$ -ketovaleric acid or valine in humans: blood kinetics and biochemical effects. *J Lab Clin Med* 103: 597-605
- Schwenk W, Beaufrère B, Haymond MW (1985) Use of reciprocal pool specific activity to model leucine metabolism in humans. *Am J Physiol* 249:E646-E650
- Shigematsu Y, Kikuchi K, Momoi T, Sudo M, Kikawa Y, Nosaka K, Kuriyama M, Haruki S, Sanada K, Hamano N, Suzuki Y (1983) Organic acids and branched-chain amino acids in body fluids before and after multiple exchange transfusions in maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 6: 183-189
- Slocum RH, Cummings JG (1991) Amino acid analysis of physiological samples. In: Hommes FA (ed.) *Techniques in diagnostic human biochemical genetics. A laboratory manual*. Wiley-Liss, New York, pp. 87-126
- Snyderman SE, Goldstein F, Sansariq C, Norton PM (1984) The relation between the branched chain amino acids and their  $\alpha$ -ketoacids in maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 18 (9): 851-853
- Staten MA, Bier DM, Matthews DE (1984) Regulation of valine metabolism in man: a stable isotope study. *Am J Clin Nutr* 40: 1224-1234
- Swendseid ME, Villalobos J, Figueroa WS, Drenick EJ (1965) The effect of test doses of leucine, isoleucine or valine on plasma amino acid levels. The unique effect of leucine. *Am J Clin Nutr* 17: 317-321
- Thompson GN, Bresson JL, Pacy PJ, Bonnefont JP, Walter JH, Leonard JV, Saudubray JM, Halliday D (1990a) Protein and leucine metabolism in maple syrup urine disease. *Am J Physiol* 258: E654-E660
- Thompson GN, Francis DEM, Halliday D (1991) Acute illness in maple syrup urine disease: dynamics of protein metabolism and implications for management. *J Pediatr* 119: 35-41
- Thompson GN, Pacy PJ, Ford GC, Halliday D (1989) Practical considerations in the use of stable isotope labeled compounds as tracers in clinical studies. *Biomed Mass Spectrom* 18: 321-327
- Thompson GN, Walter JH, Leonard JV, Halliday D (1990b) In vivo enzyme activity in inborn errors of metabolism. *Metabolism* 39: 799-807
- Torres N, Tovar AR, Harper AE (1995) Leucine affects the metabolism of valine by isolated perfused rat hearts: relation to branched-chain amino acid antagonism. *J Nutr* 125: 1884-1893
- Treacy E, Clow CL, Reade TR, Chitayat D, Mamer OA, Scriver CR (1992) Maple syrup urine disease: interrelations between branched-chain amino-, oxo-, and hydroxyacids; Implications for Treatment; Associations with CNS dysmyelination. *J Inher Metab Dis* 15: 121-135
- Wagenmakers AJM, Veerkamp JH (1982) Degradation of branched-chain amino acids and derived 2-oxo acids in human and rat heart and skeletal muscle. *Biochem Med* 28: 16-31
- Wahlefeld AW, Siedel J (1985) Creatine and creatinine. In: Bergmeyer HU (ed.) *Methods in enzymatic analysis*, vol VII, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 488-506
- Wendel U, Saudubray JM, Bodner A, Schadewaldt P (1999) Liver transplantation in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 158 (Suppl 1): S 60-S64
- Wendel U, Wentrup H, Rüdiger HW (1975) Maple syrup urine disease: analysis of branched-chain keto acid decarboxylation in cultured fibroblasts. *Ped Res* 9: 709-717

Wolfe RR (1984) Tracers in metabolic research: radioisotope and stable isotope mass spectrometry methods. Wiley-Liss, New York 1984, pp. 230-232

Wolfe RR (1992) Radioactive and stable isotope tracers in biomedicine. Principles and practice of kinetic analysis. Wiley Liss, New York, pp. 126-128

Yeaman SJ (1989) The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem J* 257: 625-632

Young VR (1994) Adult amino acid requirements: the case for a major revision in current recommendations. *J Nutr* 124: 1517S-1523S

#### Teil IV

### Geradkettige Analoga als Alternativ-Substrate zur Untersuchung des metabolische Flußes durch den verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex

Abderhalden E, Bahn A (1930a) Nachweis von d- $\alpha$ -Amino-valeriansäure (Nor-valin) neben d- $\alpha$ -Amino-isovaleriansäure (Valin) unter den Spaltprodukten des Globins auf Grund der verschiedenen Aminierungs-Geschwindigkeiten der dazugehörigen  $\alpha$ -Bromverbindungen. *Ber Chem* 63: 914-921

Abderhalden E, Reich F (1930b) d- $\alpha$ -Amino-norvaleriansäure (Norvalin) ein Baustein von Eiweißstoffen. *Z Physiol Chem* 193: 198-200

Abderhalden E, Weil A (1912) Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt der verschiedenen Bestandteile des Nervensystems an Aminosäuren. I. Mitteilung *Z Physiol Chem* 81: 207

Abderhalden E, Weil A (1913a) Über die Identifizierung der aus Proteinen der Nervensubstanz gewonnenen Aminosäure von der Zusammensetzung  $C_6H_{13}NO_2$ . II. Mitteilung *Z Physiol Chem* 88: 272-275

Abderhalden E, Weil A (1913b) Über eine neue Aminosäure von der Zusammensetzung  $C_6H_{13}NO_2$ , gewonnen bei der totalen Hydrolyse der Proteine aus Nervensubstanz. *Z Physiol Chem* IXXXIV: 39-59

Anonymous (1991) Norleucine, an amino acid analogue, depresses food intake and feeding behavior. *Nutr Rev* 49: 239-241

Barker DG, Bruton CJ (1979) The fate of norleucine as a replacement for methionine in protein synthesis. *J Mol Biol* 133: 217-231

Barman TE (1969a) Aspartate aminotransferase. In: *Enzyme handbook*, vol I, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 354-355

Barman TE (1969b) Alanine aminotransferase. In: *Enzyme handbook*, vol I, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 356-357

Barman TE (1969c) Glutamate dehydrogenase. In: *Enzyme Handbook*, vol I, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p 169

Beutler E (1975) *Red cell metabolism*. Grune und Stratton, Stuttgart

Bier DM (1989) Intrinsically difficult problems: the kinetics of body proteins and amino acids in man. *Diab Metab Rev* 5: 111-132

Black AL, Kleiber M (1955) The recovery of norleucine from casein after administering norleucine- $3-C^{14}$  to intact cows. *J Am Chem Soc* 77: 6082-6083

Bode AM, Fosters JD, Nordlie RC (1994) Glycogenesis from glucose and ureagenesis in isolated perfused rat livers. Influence of ammonium ion, norvaline, and ethoxazolamide. *J Biol Chem* 269: 7879-7886

Bogosian G, Violand BN, Dorward-King EJ, Workman WE, Jung PE, Kane JF (1989) Biosynthesis and incorporation into protein of norleucine by *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1: 531-539

Bowtell JL, Leese GP, Smith K, Watt PW, Nevill A, Rooyackers O, Wagenmakers AJM, Rennie MJ (1998) Modulation of whole body protein metabolism, during and after exercise, by variation of dietary protein. *J Appl Physiol* 85: 1744-1752

- Brack A (1987) Selective emergence and survival of early polypeptides in water. *Origins of Life* 17: 367-379
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-154
- Bucherer HAT, Lieb VA (1934) Über die Bildung substituierter Hydantoine aus Aldehyden und Ketonen. *J Prakt Chem* 141: 5-43
- Bucherer HAT, Steiner W (1934) Über die Reaktionen der  $\alpha$ -Oxy und  $\alpha$ -Aminonitrile. *J Prakt Chem* 140: 291-316
- Butts JS, Blunden H, Dunn MS (1937) Studies in amino acid metabolism III. The fate of dl-leucine, dl-norleucine, and dl-isoleucine in the normal animal. *J Biol Chem* 120: 289-295
- Chiles TC, Kilberg MS (1986) System A transport activity in normal rat hepatocytes and transformed liver cells: substrate protection from inactivation by sulfhydryl-modifying reagents. *J Cell Physiol* 129: 321-328
- Chuang DT, Shih VE (1995) Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 1239-1277
- Collins JE, Umpleby AM, Boroujerdi MA, Leonard JV, Sonksen PH (1987) Effect of insulin on leucine kinetics in maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 21: 10-13
- Connelly JL, Danner DJ, Bowden JA (1968) Branched-chain  $\alpha$ -keto acid metabolism. I. Isolation, purification and partial characterization of bovine liver  $\alpha$ -keto-isocaproic: $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvaleric acid dehydrogenase. *J Biol Chem* 243: 1198-1203
- Consden R, Gordon AH, Martin AJP, Rosenheim O, Synge RLM (1945) The non-identity of Thudichum's 'Glycoleucine' and norleucine. *Biochem J* 39: 251-258
- Cowie DB, Cohen GN, Bolton ET, De Robichon-Szulmajster H (1959) Amino acid analog incorporation into bacterial proteins. *Biochim Biophys Acta* 34: 39-46
- Czarnetzky EJ, Schmidt CLA (1932) The isolation of norleucine, with evidence for its identity, and some thermodynamic data based on the dissociation pressures of the compounds which the isomeric leucines form with ammonia and hydrogen chloride. *J Biol Chem* 97: 333-343
- Daniels VG, Dawson AG, Newey H, Smyth DH (1969) Effect of carbon chain length and amino group position on neutral amino acid transport systems in small rat intestine. *Biochim Biophys Acta* 173: 575-577
- Danner DJ, Davidson ED, Elsas LJ (1975) Thiamine increases the specific activity of human liver branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenases. *Nature* 254: 529-530
- Fico ME, Motyl T, Milner JA (1984) Species comparison of the influence of ammonia on orotic acid and urea biosynthesis in liver. *J Nutr* 114: 613-621
- Forsberg G, Palm G, Ekebacke A, Josephson S, Hartmanis M (1990) Separation and characterization of modified variants of recombinant human insulin-like growth factor I derived from a fusion protein secreted from *Escherichia coli*. *Biochem J* 271: 357-363
- Greenwald I (1916) The fate of normal  $\alpha$ -aminocaproic acid in the phlorrhizinized dog. *J Biol Chem* 25: 81-86
- Grinde B, Seglen PO (1981) Effect of amino acid analogues on protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 676: 43-50
- Grunnet N, Katz J (1978) Effect of ammonia and norvaline on lactate metabolism by hepatocytes from starved rats. The use of  $^{14}\text{C}$ -labelled lactate in studies of hepatic gluconeogenesis. *Biochem J* 172: 595-603
- Hornby DP, Engel PC (1983) Beef liver glutamate dehydrogenase: A study of the oxidation of various alternative amino acid substrates retaining the correct spacing of the two carboxylate groups. *Int J Biochem* 15 (4): 495-500
- Hutson SM, Hall TR (1993) Identification of the mitochondrial branched chain aminotransferase as a branched chain  $\alpha$ -keto acid transport protein. *J Biol Chem* 268: 3084-3091
- Hutson SM, Rannels SL (1985) Characterization of a mitochondrial transport system for branched chain  $\alpha$ -keto acids. *J Biol Chem* 260: 14189-14193

- Hutson SM, Roten S, Kaplan RS (1990) Solubilization and functional reconstitution of the branched-chain  $\alpha$ -keto acid transporter from rat heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1028-1031
- Jones SM, Yeaman SJ (1986) Oxidative decarboxylation of 4-methylthio-2-oxobutyrate by branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex. *Biochem J* 237: 621-623
- Khatra BS, Chawla RK, Sewell CW, Rudman D (1977) Distribution of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase in primate tissues. *J Clin Invest* 59: 558-564
- Kinnory DS, Takeda Y, Grennberg DM (1955) Metabolism of DL- $\alpha$ -aminobutyrate-3- $^{14}$ C and DL-norleucine-3- $^{14}$ C. *Biochim Biophys Acta* 17: 561-564
- Kirkland JB (1990) Lipid peroxidation, protein thiol oxidation and DANN-damage in hydrogen peroxide-induced injury to endothelial cells: role of activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *Biochim Biophys Acta* 1092: 319-325
- Lam S (1986) Resolution of D- and L-amino acids after precolumn derivatisation with  $\alpha$ -phthalaldehyde by mixed chelation with Cu(II)-L-proline. *J Chrom* 355: 157-164
- Lampen JO, Jones MJ (1947) Studies on the sulfur metabolism of *Escherichia coli*. II. Interrelations of norleucine and methionine in the nutrition of *Escherichia coli* and of a methionine-requiring mutant of *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 13: 47-53
- Lenzen S, Formanek H, Panten U (1982) Signal function of metabolism of neutral amino acids and 2-keto acids for initiation of insulin secretion. *J Biol Chem* 257: 6631-6633
- Lenzen S, Schmidt W, Panten U (1985) Transamination of neutral amino acids and 2-keto acids in pancreatic B-cell mitochondria. *J Biol Chem* 260: 12629-12634
- Lusty CJ, Jilka RL, Nietsch EH (1979) Ornithine transcarbamylase of rat liver. Kinetic, physical, and chemical properties. *J Biol Chem* 254: 10030-10036
- Marshall M, Cohen PP (1972) Ornithine transcarbamylase from *Streptococcus faecalis* and bovine liver II. Multiple binding sites for carbamyl-P and L-norvaline, correlation with steady state kinetics. *J Biol Chem* 247: 1654-1668
- McClendon JH (1987) The relationship between the biosynthetic paths to the amino acids and their coding. *Origins of Life* 17: 401-417
- Meijer AJ, Lof C, Ramos IC, Verhoeven AJ (1985) Control of ureogenesis. *Eur J Biochem* 148: 189-196
- Munier R, Cohen GN (1959) Incorporation of structural analogues of amino acid into the bacterial proteins during their synthesis in vivo. *Biochim Biophys Acta* 31: 378-391
- Nelson J, Qureshi IA, Vasudevan S, Sarma DSR (1993) The effects of various inhibitors on the regulation of orotic acid excretion in sparse-fur mutant mice (spf/Y) deficient in ornithine transcarbamylase. *Chem Biol Interact* 89: 35-47
- Ono K, Hakozaki M, Nishimaki H, Kochi H (1987) Purification and characterization of human liver branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex. *Biochem Med Metab Biol* 37: 133-141
- Oxender DL, Christensen HN (1963) Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *J Biol Chem* 238: 3686-3699
- Oxender DL, Lee M, Moore PA, Cecchini G (1977) Neutral amino acid transport systems of tissue culture cells. *J Biol Chem* 252: 2675-2679
- Parker PJ, Randle PJ (1978a) Branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex of rat liver. *FEBS Lett* 90: 183-186
- Parker PJ, Randle PJ (1978b) Partial purification and properties of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase of ox liver. *Biochem J* 171: 751-757
- Pausch J, Rasenack J, Häussinger D, Gerok W (1985) Hepatic carbamoyl phosphate metabolism. *Eur J Biochem* 150: 189-194
- Pausch J, Wohleb B, Gerok W (1977) Protective effect of ammonium ions and L-norvaline on galactosamine induced liver injury. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 358: 595-597
- Paxton R (1988) Branched-chain  $\alpha$ -keto dehydrogenase and its kinase from rabbit liver and heart. *Meth Enzymol* 166: 313-320
- Paxton R, Scislawski PWD, Davis EJ, Harris RA (1986) Role of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase in 2-oxybutyrate metabolism. *Biochem J* 234: 295-303

- Paxton R, Sievert LM (1991) An improved assay for pyruvate dehydrogenase in liver and heart. *Biochem J* 277: 547-551
- Penverne B, Belkaid M, Hervé G (1994) In situ behavior of the pyrimidine pathway enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 309: 85-93
- Pettit FH, Reed LJ (1982) Pyruvate dehydrogenase from bovine kidney and heart. *Meth Enzymol* 89: 376-386
- Pettit FH, Reed LJ (1988) Branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex from bovine kidney. *Meth Enzymol* 166: 309-312
- Pettit FH, Yeaman SJ, Reed LJ (1978) Purification and characterization of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4881-4885
- Randhawa ZI, Witkowska HE, Cone J, Wilkins JA, Hughes P, Yamanishi K, Yasuda S, Masui Y, Arthur P, Kletke C, Bitsch F, Shackleton CHL (1994) Incorporation of norleucine at methionine positions in recombinant human macrophage colony stimulating factor (M-CSF, 4-153) expressed in *E. coli*: structural analysis. *Biochemistry* 33: 4352-4362
- Rognstad R (1977) Sources of ammonia for urea synthesis in isolated rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* 496: 249-254
- Rognstad R (1985) Possible role for carbamyl phosphate in the control of liver glycogen synthesis. *Biochem Biophys Res Comm* 130: 229-233
- Rose WC (1931) Feeding experiments with mixtures of highly purified amino acids I. The inadequacy of diets containing nineteen amino acids. *J Biol. Chem* 94: 155-165
- Rush JWE, MacLean DA, Hultman E, Graham TE (1995) Exercise causes branched-chain oxoacid dehydrogenase dephosphorylation but not AMP deaminase binding. *J Appl Physiol* 78: 2193-2200
- Sabourin PJ, Biber LL (1988) Purification and assay of  $\alpha$ -KIC-dioxygenase from rat liver. *Meth Enzymol* 166: 288-297
- Saheki T, Sato Y, Takada S, Katsunuma T (1979) Regulation of urea synthesis in rat liver. Inhibition of urea synthesis by L-norvaline. *J Biochem* 86: 745-750
- Schadewaldt P, Beck K, Wendel U (1989) Analysis of maple syrup urine disease in cell culture: use of substrates. *Clin Chim Acta* 184: 47-56
- Schadewaldt P, Bodner A, Brösicke H, Hammen HW, Wendel U (1998) Assessment of whole body L-leucine oxidation by non-invasive L-[1-<sup>13</sup>C]leucine breath test: a reappraisal in patients with maple syrup urine disease, obligate heterozygotes and healthy subjects. *Ped Res* 43: 592-600
- Schadewaldt P, Dalle-Feste C, Langenbeck U, Wendel U (1991) Oral L-alloisoleucine loading studies in healthy subjects and in patients with maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 30: 430-434
- Schadewaldt P, Hammen HW, Dalle-Feste C, Wendel U (1990) On the mechanism of L-alloisoleucine formation: Studies on a healthy subject and in fibroblasts from normals and patients with maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 13: 137-150
- Schadewaldt P, Wendel U (1987) Comparison of the catabolism of branched-chain L-amino acids in cultured human skin fibroblasts. *Ped Res*: 22:591-594
- Schadewaldt P, Wendel U (1989) Functional differences in the catabolism of branched-chain L-amino acids in cultured normal and maple syrup urine disease fibroblasts. *Biochem. Med Metab Biol* 41: 105-116
- Schadewaldt P, Wendel U (1997) Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 156 (Suppl 1): S62-S66
- Schadewaldt P, Wendel U, Hammen HW (1995) Human branched-chain L-amino acid aminotransferase: Activity and subcellular localization in cultured skin fibroblasts. *Amino Acids* 9: 147-160
- Schäfer U, Harhammer R, Boomgaarden M, Sohr R, Ott T, Henklein P, Repke H (1994) Binding of cholecystokinin-8 (CCK-8) peptide derivatives to CCK<sub>A</sub> and CCK<sub>B</sub> receptors. *J Neurochem* 62: 1426-1431
- Schott K, Gehrmann J, Pötter U, Neuhoff V (1985) On the role of branched-chain amino acids in protein turnover of skeletal muscle. Studies in vivo with L-norleucine. *Z Naturforsch* 40 c: 427-437
- Sener A, Malaisse-Lagae F, Malaisse WJ (1983) Does leucine- and norleucine-induced insulin release depend on amino acid aminotransferase activity? *J Biol Chem* 258: 6693-6694

- Sener A, Somers G, Devis G, Malaisse WJ (1981) The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Biosynthetic and secretory responses of rat pancreatic islet to L-leucine and L-glutamine. *Diabetologia* 21: 135-142
- Snodgrass PJ, Lin RC (1987) Differing effects of arginine deficiency on the urea cycle enzymes of rat liver, cultured hepatocytes and hepatoma cells. *J Nutr* 117: 1827-1837
- Snyderman SE, Norton PM, Roitman E, Holt LE (1964) Maple syrup urine disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics* 34: 454-462
- Struck Jr J, Sizer IW (1960) The substrate specificity of glutamic acid dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 86: 260-266
- Suryawan A, Hawes JW, Harris RA, Shimomura Y, Jenkins AE, Hutson SM (1998) A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr* 68: 72-81
- Tessari P, Garibotto G, Inchiostro S, Robaudo C, Saffioti S, Vettore M, Zanetti M, Russo R, Deferrari G (1996) Kindney, splanchnic, and leg protein turnover in humans. Insight from leucine and phenylalanine kinetics. *J Clin Invest* 98: 1481-1492
- Tews JK, Greenwood J, Pratt OE, Harper AE (1988) Dietary amino acid analogues and transport of lysine or valine across the blood-brain barrier in rats. *J Nutr* 118: 756-763
- Tews JK, Harper AE (1983) Atypical amino acids inhibit histidine, valine, or lysine transport into rat brain. *Am J Physiol* 245: R556-R563
- Tews JK, Harper AE (1985) Food intake, growth and tissue amino acids in rats fed amino acid analogues. *J Nutr* 115: 1180-1195
- Thompson GN, Bresson JL, Pacy PJ, Bonnefont JP, Walter FH, Leonard JV, Saudubray JM, Halliday D (1990a) Protein and leucine metabolism in maple syrup urine disease. *Am J Physiol* 258: E654-E660
- Thompson GN, Francis DEM, Halliday D (1991) Acute illness in maple syrup urine disease: dynamics of protein metabolism and implications for management. *J Pediatr* 119: 35-41
- Thompson GN, Pacy PJ, Ford GC, Halliday D (1989) Practical considerations in the use of stable isotope labelled compounds as tracers in clinical studies *Biomed Mass Spectrom*: 321-327
- Thompson GN, Walter JH, Leonard JV, Halliday D (1990b) In vivo enzyme activity in inborn errors of metabolism. *Metabolism* 39: 799-807
- Thudichum JLW (1884) in *Physiological chemistry of the brain*. Cited in: Greenstein JP, Winitz M (1961) *Chemistry of the amino acids*, vol I, John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, p 20
- Tovar A, Tews JK, Torres N, Harper AE (1988) Some characteristics of threonine transport across the blood-brain barrier of the rat. *J Neurochem* 51: 1285-1293
- Tsai LB, Lu HS, Kenney WC, Curlless CC, Klein ML, Lai PH, Fenton DM, Altrock BW, Mann MB (1988) Control of misincorporation of de novo synthesized norleucine into recombinant interleukin-2 in *E. coli*. *Biochem Biophys Res Comm* 31: 733-739
- Turnell DC, Cooper JDH (1982) Rapid assay for amino acids in serum or urine by pre-column derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem* 28 (3): 527-531
- ul Hassan M, Greenberg DM (1952) Distribution of label from metabolism of radioactive leucine, norleucine and norvaline in tissues, excreta and respiratory carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys* 39: 129-137
- van Hall G, Saltin B, van der Vusse GJ, Söderlund K, Wagenmakers AJM (1995) Deamination of amino acids as source for ammonia production in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J Physiol* 489: 251-261
- Wagenmakers AJM, Brookes JH, Coakley JF, Reilly T, Edwards RHT (1989) Exercise-induced activation of the branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase in human muscle. *Eur J Appl Physiol* 59: 159-167
- Wanders RJA, van Roermund CWT, Meijer AJ (1984) Analysis of the control of citrulline synthesis in isolated rat-liver mitochondria. *Eur J Biochem* 142: 247-254
- Weber AL, Miller SL (1981) Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids. *J Mol Evol* 17: 273-284
- Wendel U, Langenbeck U, Seakins JWT (1989) Interrelation between the metabolism of L-isoleucine and L-allo-isoleucine in patients with maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 25: 11-14

Wendel U, Wentrup H, Rüdiger HW (1975) Maple syrup urine disease: analysis of branched-chain keto acid decarboxylation in cultured fibroblasts. *Ped Res* 9: 709-717

Wendler PA, Tremblay GC (1980) Quantitative isolation of radiolabeled metabolites without chromatography: Measurements of the biosynthesis of purines, pyrimidines, and urea in isolated hepatocytes. *Annal Biochem* 108: 406-418

Womack M, Rose WC (1936) The relation of leucine, isoleucine, and norleucine to growth. *J Biol Chem* 116: 381-391

## Teil V L-Alloisoleucin

Adibi SA (1968) Influence of dietary deprivations on plasma concentrations of free amino acids of man. *J Appl Physiol* 25: 52-57

Askanazi J, Carpentier YA, Michelsen CB, Elwyn DH, Fürst P, Kantrowitz LR, Gump FE, Kinney JM (1980) Muscle and plasma amino acids following injury. Influence of intercurrent infections. *Ann Surg* 192: 78-85

Batshaw ML, Brusilow S, Walser M (1976) Long-term management of a case of carbamyl phosphate synthetase deficiency using ketoanalogues and hydroxyanalogues of essential amino acids. *Pediatrics* 58: 227-235

Bodner A, Hammen HW, Renn W, Wendel U, Schadewaldt P (1997) Whole body branched-chain L-amino acid oxidation in overnight fasted human subjects. *Isotopes Environ Health Stud* 33: 189-196

Boisse J, Saudubray J-M, Pham-Huu-Trung, Charpentier C, Castets M, Lemonnier A, Jerome H, Mozziconacci P (1971) La variante intermittente de la leucinose. Etude d'une nouvelle observation. *Arch Fr Pédiatr* 28: 161-177

Bremer HJ, Duran M, Kamerling JP, Przyrembel H, Wadman SK (1981) Disturbances of amino acid metabolism: clinical chemistry and diagnosis. Baltimore-Munich, Urban & Schwarzenberg, p 359

Carlsten A, Hallgren B, Jagenburg R, Svanborg A, Werkö L (1966) Amino acids and free fatty acids in plasma in diabetes. 1. The effect of insulin on the arterial levels. *Acta Med Scand* 179: 361-370

Chinkes D, Klein S, Zhang X-J, Wolfe RR (1996) Infusion of labeled KIC is more accurate than labeled leucine to determine human muscle protein synthesis. *Am J Physiol* 270: E67-E71.

Chuang DT, Shih VE (1995) Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 1239-1227

Crowell PL, Miller RH, Harper AE (1988) Measurement of plasma and tissue levels of branched-chain  $\alpha$ -keto acids by gas-liquid chromatography. *Meth Enzymol* 166: 39-46

Dancis J, Levitz M, Westall RG (1960) Maple syrup urine disease: branched-chain keto-aciduria. *Pediatrics* 25: 72-791

Dent CE, Westall RG (1961) Studies in maple syrup urine disease. *Arch Dis Child* 36: 259-268

Felig P, Marliss E, Ohman JL, Cahill GF (1970) Plasma amino acid levels in diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 19: 727-729

Felig P, Owen OE, Wahren J, Cahill GF (1969) Amino acid metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest* 48: 584-594

Fisher MH, Gerritsen T (1971) Biochemical studies on a variant of branched chain ketoaciduria in a 19-year-old female. *Pediatrics* 48: 795-801

Funk MA, Lowry KR, Baker DH (1987) Utilization of the L- and DL-isomers of  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvaleric acid by rats and comparative efficacy of the keto analogs of branched-chain amino acids provided as ornithine, lysine and histidine salts. *J Nutr* 117: 1550-1555

Gibson KM, Elpeleg ON, Wappner RS (1996) Disorders of leucine metabolism. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME (eds.) *Physicians guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. Chapman & Hall, London, pp. 125-144

Goto M, Shinno H, Ichihara A (1977) Isoenzyme patterns of branched-chain amino acid transaminase in human tissues and tumors. *Gann* 68: 663-667

- Greenstein J P, Levintow L, Baker CG, White J (1951) Preparation of the four stereoisomers of isoleucine. *J Biol Chem* 188: 647-663
- Halpern B, Pollock GE (1970) The configuration of the alloisoleucine present in maple syrup urine disease plasma. *Biochem Med* 4: 352-356
- Hambraeus L, Westphal O, Hagberg B (1972) Ketotic hypoglycaemia associated with transient branched-chain aminoacidemia. *Acta Paediat Scand* 61:81-89
- Held KR, Sternowsky HJ, Singh S, Plettner C, Gruttner R (1976) Intermittent branched-chain ketoaciduria in ketotic hypoglycemia: investigation to localize the biochemical defect. *Monatsschr Kinderheilkd* 124: 59-65
- Jakobs C, Solem E, Ek J, Halvorsen K, Jellum E (1977) Investigation of the metabolic pattern in maple syrup urine disease by means of glass capillary gas chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr* 143: 31-38
- Lam S (1986) Resolution of D- and L-amino acids after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde by mixed chelation with Cu(II)-L-proline. *J Chromatogr* 355: 157-164
- Mamer OA, Montgomery JA, Taguchi VY (1980) Origin of the two peaks for 2-keto-3-methylvaleric acid produced by the oximation of the keto acids occurring in maple syrup urine disease. *J Chromatogr* 182: 221-225
- Mamer OA, Reimer MLJ (1992) On the mechanism of the formation of L-alloisoleucine and the 2-hydroxy-3-methylvaleric acid stereoisomers from L-isoleucine in maple syrup urine disease patients and in normal humans. *J Biol Chem* 267: 22141-22147
- Mamer OA, Reimer MLJ (1992) On the mechanism of the formation of L-alloisoleucine and the 2-hydroxy-3-methylvaleric acid stereoisomers from L-isoleucine in maple syrup urine disease patients and in normal humans. *J Biol Chem* 267: 22141-22147
- Mamer OA, Tjoa SS, Scriver CR, Klassen GA (1976) Demonstration of a new mammalian isoleucine catabolic pathway yielding an R series of metabolites. *Biochem J* 160: 417-426
- Matthews DE, Ben-Galim E, Haymond MW, Bier DM (1980) Alloisoleucine formation in maple syrup urine disease: isotopic evidence for the mechanism. *Pediatr Res* 14: 854-857
- Matuso Y, Yagi M, Walser M (1993) Arteriovenous differences and tissue concentrations of branched-chain ketoacids. *J Lab Clin Med* 121: 779-784
- Meister A (1951) Studies on d- and l- $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvaleric acids. *J Biol Chem* 190: 269-276
- Meister A, White J (1951) Growth response of the rat to the keto analogues of leucine and isoleucine. *J Biol Chem* 191: 211-216
- Norton PM, Roitman E, Snyderman SE, Holt LE Jr (1962) A new finding in maple syrup urine disease. *Lancet* 1: 26-27
- Saudubray JM, Amédée-Manesme O, Munnich A, Ogier H, Depondt E, Charpentier C, Coudé FX, Rey F, Frézal J (1982) Hétérogénéité de la leucine. Corrélation entre l'aspect clinique, la tolérance protéique et le déficit enzymatique. *Arch Fr Pédiatr* 39: 735-740
- Schadewaldt P, Beck K, Wendel U (1989) Analysis of maple syrup urine disease in cell culture: use of substrates. *Clin Chim Acta* 184: 47-56
- Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U (2000) Formation of L-alloisoleucine in vivo: a L-[<sup>13</sup>C]isoleucine study in man. *Pediatr Res* 47: 271-277
- Schadewaldt P, Dalle-Feste C, Langenbeck U, Wendel U (1991) Oral L-alloisoleucine loading studies in healthy subjects and in patients with maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 30: 430-434
- Schadewaldt P, Hammen HW, Dalle-Feste C, Wendel U (1990) On the mechanism of L-alloisoleucine formation: studies on a healthy subject and in fibroblasts from normals and patients with maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 13: 137-150
- Schadewaldt P, Hammen H-W, Ott A-C, Wendel U (1999) Renal clearance of branched-chain L-amino and 2-oxo acids in maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 22: 706-722
- Schadewaldt P, Radeck W, Hammen H-W, Staib W (1989) Transamination and oxidative decarboxylation of L-isoleucine, L-alloisoleucine and related 2-oxo acids in perfused rat hind limb muscle. *Biochim Biophys Acta* 992: 115-123
- Schadewaldt P, Radeck W, Hammen H-W, Wendel U (1988) Transamination and oxidative decarboxylation rates of branched-chain 2-oxo acids in cultured human skin fibroblasts. *Pediatr Res* 23: 40-44

- Schadewaldt P, Wendel U, Hammen HW (1995) Human branched-chain L-amino acid aminotransferase: activity and subcellular localization in cultured skin fibroblasts. *Amino Acids* 9: 147-160
- Schadewaldt P, Wendel U, Hammen H-W (1996) Determination of R- and S-3-methyl-2-oxopentanoate enantiomers in human plasma: suitable method for label enrichment analysis. *J Chromatogr B* 682: 209-218
- Snyderman SE, Norton PM, Roitman E, Holt LE Jr (1964) Maple syrup urine disease with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics* 34: 454-462
- Stalder K (1959) Über das Vorkommen von Äthylmalonsäure im Harn. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 314: 205-210
- Suryawan A, Hawes JW, Harris RA, Shimomura Y, Jenkins AE, Hutson SM (1998) A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr* 68: 72-81
- Walser M, Sapir DG, Mitch WE, Chan W (1981) In: Walser M, Williamson JR (eds.) *Metabolism and Clinical Implication of Branched Chain Amino and Ketoacids*. Elsevier, North Holland, pp. 291-299
- Weinberg RB, Walser M (1977) Racemization and amination of the keto-analog of isoleucine in the intact dog. *Biochem Med* 17: 164-172
- Wendel U, Langebeck U, Seakins JWT (1989) Interrelation between the metabolism of L-isoleucine and L-allo-isoleucine in patients with maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 25: 11-14
- Wolfe RR (1992) *Radioactive and Stable Isotope Tracers in Biomedicine. Principles and Practice of Kinetic Analysis*. Wiley-Liss, New York
- Zaleski LA, Dancis J, Cox RP, Hutzler J, Zaleski WA, Hill A (1973) Variant maple syrup urine disease in mother and daughter. *Can Med Assoc J* 109: 299-304

## Teil VI

### Auswertung von [<sup>13</sup>C]Leucin-Bolustests

- Bennet WM, Connacher AA, Scrimgeour CM, Rennie MJ (1990) The effect of amino acid infusion on leg protein turnover assessed by L-[<sup>15</sup>N]phenylalanine and L-[1-<sup>13</sup>C]leucine exchange. *Eur J Clin Invest* 20: 41-50
- Carlson MG, Snead WL, Campbell PJ (1994) Fuel and energy metabolism in fasting humans. *Am J Clin Nutr* 60: 29-36
- Cheng KN, Dwordzak F, Ford GC, Rennie MJ, Halliday D (1985) Direct determination of leucine metabolism and protein breakdown in humans using L[1-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]-leucine and the forearm model. *Eur J Clin Invest* 15: 349-354
- Chuang DT, Shih VE (1995) Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 1239-1277
- Cobelli C, Saccomani MP, Tessari P, Biolo G, Luzi L, Matthews DE (1991) Compartmental model of leucine kinetics in humans. *Am J Physiol* 261: E539-E550
- Copeland KC, Kenney FA, Nair KS (1992) Heated dorsal vein sampling for metabolic studies: a reappraisal. *Am J Physiol* 263: E1010-E1014
- Cortiella J, Matthews DE, Hoerr RA, Bier DM, Young VR (1988) Leucine kinetics at graded intakes in young men: quantitative fate of dietary leucine. *Am J Clin Nutr* 48: 998-1009
- Darmaun D, Just B, Messing B, Rongier M, Thuillier F, Koziat J, Grasset E (1994) Glutamine metabolism in healthy adult men: response to enteral and intravenous feeding. *Am J Clin Nutr* 59: 1395-1402
- Desai SP, Bistrrian BR, Palombo JD, Moldawer LL, Blackburn GL (1987) Branched-chain amino acid administration in surgical patients. Effects on amino acid and fuel substrate profiles. *Arch Surg* 122: 760-764
- Elahi D, McLoon-Dyke M, Fukagawa NK, Sclater AL, Wong GA, Shannon RP, Minaker KL, Miles JM, Rubenstein AR, Vandepol CJ, Guler HP, Good WR, Seaman JJ, Wolfe RR (1993) Effect of recombinant human IGF-I on glucose and leucine kinetics in men. *Am J Physiol* 256: E831-E838

- El-Khoury AE, Fukagawa NK, Sanchez M, Tsay RH, Gleason RE, Chapman TE, Young VR (1994b) The 24-h pattern and rate of leucine oxidation, with particular reference to tracer estimates of leucine requirements in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 59: 1012-1020
- El-Khoury AE, Fukagawa NK, Sanchez M, Tsay RH, Gleason RE, Chapman TE, Young VR (1994a) Validation of the tracer balance concept with reference to leucine: 24-h intravenous tracer studies with L-[1-<sup>13</sup>C]leucine and [<sup>15</sup>N-<sup>15</sup>N]urea. *Am J Clin Nutr* 59: 1000-1011
- Ellerine NP, Herring WJ, Elsas II LJ, McKean MC, Klein PD, Danner DJ (1993) Thiamine-responsive maple syrup urine disease in a patient antigenically missing dihydrolipoamide acyltransferase. *Biochem Med Metab Biol* 49: 363-374
- Elsas LJ, Ellerine NP, Klein PD (1993) Practical methods to estimate whole body leucine oxidation in maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 33: 445-451
- Garrel DR, Moussali R, De Oliveira A, Lesiège D, Larivière F (1995) RU 486 prevents the acute effects of cortisol on glucose and leucine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 379-385
- Hagg SA, Morse EL, Adibi SA (1982) Effect of exercise on rates of oxidation, turnover, and plasma clearance of leucine in human subjects. *Am J Physiol* 242: E407-E410
- Harper AE, Miller RH, Block KP (1984) Branched-chain amino acid metabolism. *Ann Rev Nutr* 4: 409-454
- Heslin MJ, Newman E, Wolf RF, Pisters PWT, Brennan MF (1994) Effect of hyperinsulinemia on whole body and skeletal muscle leucine carbon kinetics in humans. *Am J Physiol* 262: E911-E918
- Hiramatsu T, Cortiella J, Marchini JS, Chapman TE, Young VR (1994) Source and amount of dietary nonspecific nitrogen in relation to whole-body leucine, phenylalanine, and tyrosine kinetics in young men. *Am J Clin Nutr* 59: 1347-1355
- Irving CS, Wong WW, Shulman RJ, Smith EO, Klein PD (1983) [<sup>13</sup>C]bicarbonate kinetics in humans: intra- vs. interindividual variations. *Am J Physiol* 245: R190-R202
- Klein S, Jahoor F, Wolfe RR, Stuart CA (1992) Generalized lipodystrophy: in vivo evidence for hypermetabolism and insulin-resistant lipid, glucose, and amino acid kinetics. *Metabolism* 41: 893-896
- Larivière F, Moussali R, Garell DR (1994) Increased leucine flux and leucine oxidation during the luteal phase of the menstrual cycle in women. *Am J Physiol* 267: E422-E428
- Masud T, Young VR, Chapman T, Maroni J (1994) Adaptive responses to very low protein diets: the first comparison of ketoacids to essential amino acids. *Kidney Int* 45: 1182-1192
- Matthews DE, Bier DM, Rennie MJ, Edwards RHT, Halliday D, Millward DJ and Clugston GA (1981) Regulation of leucine metabolism in man: a stable isotope study. *Science* 214: 1129-1131
- Matthiesen U, Schadowaldt P (1994) Determination of isotope enrichment in <sup>13</sup>C- or <sup>2</sup>H-labelled branched-chain L-amino acids from physiological fluids by gas chromatography-mass spectrometry: use of L-leucine dehydrogenase for specific preparation of the quinoxalinol derivatives. *Isotopenpraxis Environ Health Stud* 30: 219-230
- Mauras N, Beaufrère B (1995) Recombinant human insulin-like growth factor-I enhances whole body protein anabolism and significantly diminishes the protein catabolic effects of prednisone in humans without a diabetogenic effect. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 869-874
- Meguid MM, Matthews DE, Bier DM, Meredith CN, Soeldner JS, Young VR (1986) Leucine kinetics at graded leucine intakes in young men. *Am J Clin Nutr* 43: 770-780
- Quevedo MR, Price GM, Halliday D, Pacy PJ, Millward DJ (1994) Nitrogen homeostasis in man: diurnal changes in nitrogen excretion, leucine oxidation and whole body leucine kinetics during a reduction from a high to a moderate protein intake. *Clin Sci* 86: 185-193
- Saccomani MP, Bonadonna RC, Cavegion E, DeFronzo RA, Cobelli C (1995) Bicarbonate kinetics in humans: identification and validation of a three-compartment model. *Am J Physiol* 269: E183-E192
- Schadowaldt P, Brösicke H, Haisch M, Matthiesen U, Wendel U (1994) Leucine oxidation in vivo: inter- and intraindividual variation in healthy subjects as assessed by oral L-[1-<sup>13</sup>C]leucine loads. *Isotopenpraxis Environ Health Stud* 30: 141-150
- Schadowaldt P, Hammen HW, Dalle-Feste C, Wendel U (1990) On the mechanism of L-alloisoleucine formation: studies on a healthy subject and in fibroblasts from normals and patients with maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 13: 137-150

Schadewaldt P, Hummel W, Trautvetter U, Wendel U (1989) A convenient enzymatic method for the determination of 4-methyl-2-oxopentanoate: comparison with high performance liquid chromatographic analysis. *Clin Chim Acta* 183: 171-182

Schwenk WF, Beaufrère B, Haymond MW (1985) Use of reciprocal pool specific activity to model leucine metabolism in humans. *Am J Physiol* 249: E646-E650

Schwenk WF, Haymond MW (1987) Effects of leucine, isoleucine, or threonine infusion on leucine metabolism in humans. *Am J Physiol* 253: E428-E434

Tarnopolsky MA, Atkinson SA, McDougall JD, Senior BB, Lemon PWR, Schwarcz H (1991) Whole body leucine metabolism during and after resistance exercise in fed humans. *Med Sci Sports Exerc* 23: 326-333

Wolfe RR (1984) Tracers in metabolic research: radioisotope and stable isotope mass spectrometry methods. Wiley-Liss, New York, pp. 230-232

Wolfe RR (1992a) Radioactive and stable isotope tracers in biomedicine: principles and practice of kinetic analysis. Wiley-Liss, New York, pp. 119-144

Wolfe RR (1992b) Radioactive and stable isotope tracers in biomedicine: principles and practice of kinetic analysis. Wiley-Liss, New York, pp. 145-165



Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes „In vivo Substratstoffwechsel bei Ahornsirupkrankheit: Untersuchungen mit stabil-Isotopen markierten Verbindungen (Leiter: Prof. Dr. U. Wendel, Prof. Dr. P. Schadewaldt)“ durchgeführt.

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Schadewaldt, der den Grundstein für mein Interesse an in vivo Stoffwechsel-Umsatzmessungen mit stabilen Isotopen gelegt hat. Für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, die zahlreichen Ratschläge, seine Unterstützung und sein Verständnis bin ich ihm sehr dankbar.

Herrn Professor Grieshaber danke ich für die Betreuung und sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Bei Herrn Professor Wendel bedanke ich mich ganz besonders herzlich für seine Unterstützung, sein großes Interesse am Fortgang meiner Arbeit, sowie für die Überlassung einiger Vergleichsdaten zum L-Alloisoleucin-Stoffwechsel.

Herrn Dipl. Biol. H.-W. Hammen danke ich für die Einführung in die Aminosäure-, HPLC- und GC-MS-Analytik, sowie für die Synthese des 2-Chlor-4-methylpentanoates. Ganz herzlich möchte ich ihm für die sehr harmonische Zusammenarbeit und seine stete Hilfsbereitschaft danken.

Herrn Dr. med. Dipl. Phys. H. Brösicke-Herrmann, Berlin, möchte ich herzlich für die Durchführung der  $^{13}\text{CO}_2$ -Bestimmungen danken.

Herrn Dr. rer. nat. W. Renn, Tübingen, möchte ich meinen Dank für die Erstellung des Kompartiment-Modells und die Einführung in die mathematische Modellierung aussprechen.

Herrn Dr. rer. nat. U. Matthiesen danke ich für die Durchführung der ersten massenspektrometrischen Bestimmungen als der Arbeitsgruppe noch kein eigenes Massenspektrometer zur Verfügung stand.

Bei Frau S. Mosler möchte ich mich ganz besonders für ihre technische Assistenz bei den in vitro Experimenten und bei der Betreuung der Zellkultur bedanken.

Herrn Dipl. Chem. G. Wienrich gilt mein Dank für die Durchführung der Synthesen der  $^{14}\text{C}$ -markierten Nor-Analoga.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. med. J. Karpi-Schadewaldt für ärztliche Betreuung der Probanden während der in vivo Untersuchungen und die Unterstützung, die sie mir hat zuteil werden lassen, bedanken.

Den Probanden und ganz besonders den Patienten und ihren Eltern möchte ich für ihre Bereitschaft zur Teilnahme an den in vivo Untersuchungen herzlich danken.

Bei Frau Dr. med. D. Leupold, Ulm, Herrn Dr. med. R. Mallmann, Essen, Herrn Prof. Dr. med. E. Mönch, Berlin, Herrn Dr. med. K. Mohnike, Magdeburg, Herrn Dr. med. H. Niederhoff, Freiburg, Frau Dr. med. B. Pleçko, Graz, Herrn Prof. Dr. med. J.M. Saudubray, Paris und Herrn Dr. med. J. Seidel, Jena, bedanke ich mich dafür, daß es ihnen gelungen ist ihre Patienten und deren Eltern für eine Teilnahme an den in vivo Untersuchungen zu gewinnen. Für ihre Mithilfe bei den Untersuchungen, sowie die Überlassung von klinisch-chemischen Daten ihrer Patienten möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Den niedergelassenen Pädiatern Herrn Dr. med. A. G. Schuble, Spaichingen, und Frau Dr. med. I. Behr-Heinz, Friedrichshafen, möchte ich für ihre Mithilfe und Überlassung ihrer Praxisräume anlässlich der in vivo Untersuchung ihrer Patienten danken.

Bei Frau Dr. R. Link und Herrn H. Brehl, Scientific Hospital Support, Heilbronn, bedanke ich mich für die Überlassung von Spezialnahrung.

Herrn Professor Hort und Frau Dr. med. H. Hort möchte ich ebenfalls meinen herzlichsten Dank aussprechen. Mit dem Hedwig- und Waldemar-Hort - Stipendium haben sie mir Gelegenheit gegeben mir in einer renommierten englischen Arbeitsgruppe Kenntnisse über in vivo Messungen mit stabilen Isotopen anzueignen und haben mitgeholfen meine Begeisterung für in vivo Stoffwechsel-Umsatzmessungen zu wecken.

