

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde
der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf
Komm. Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. U. Göbel

**Klinische und molekulare Charakterisierung
von Patienten mit Ahornsirup-Krankheit**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marco Henneke

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A.
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Udo Wendel
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Schadewaldt

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Jutta Gärtner und Herrn Prof. Dr. med. Udo Wendel für das entgegengebrachte Vertrauen und ihre ständige, motivierende Unterstützung und intensive Betreuung, die es mir möglich machten, wissenschaftliches Arbeiten kennenzulernen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peter Schadewaldt danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Für die Überlassung der klinisch-biochemischen Daten einzelner Patienten danke ich Frau Dr. rer. nat. Annette Bodner-Leidecker, Frau Elke Diekmann, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peter Schadewaldt und Herrn Dr. med. Christoph Helbling.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Neuropathologie und der Urologie möchte ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die spontane Hilfe im Laboralltag danken. Hervorheben möchte ich Dr. rer. nat. Marietta Wolter, deren kompetente Ratschläge für mich stets von großem Wert waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor der Kinderklinik, Dr. med. Natalie Preuß, Dr. rer. nat. Martina Biermanns, Dr. rer. nat. Ute Brosius, Tanja Prick, Dr. med. Sabine Weller, Thomas Dehmel, Dr. rer. nat. Peter Roerig, Stefan Schönberger, Hendrik Rosewich und Markus Pattschull, für das einmalige Arbeitsklima, ihre ständige Hilfsbereitschaft und die vielen gemeinsam verbrachten Stunden.

Für meine Großmutter und meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Liste verwendeter Abkürzungen	III
--	------------

1 Einleitung	1
---------------------------	----------

1.1 Historische Perspektive	1
1.2 Der genetische Defekt	2
1.3 Klinische Phänotypen	4
1.4 Tiermodell	7
1.5 Diagnose und Therapie	7
1.6 Multienzymkomplex	8
1.7 Molekulargenetik	11
1.8 Zielsetzung der Arbeit	12

2 Patienten, Material und Methoden	14
---	-----------

2.1 Patienten mit Ahornsirup-Krankheit	14
2.2 Material	14
2.3 Methoden	15
2.3.1 Isolierung von genomischer DNS	15
2.3.2 Isolierung von DNS-Fragmenten	16
2.3.2.1 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	16
2.3.2.2 Isolierung von DNS aus Polyacrylamidgelen	16
2.3.2.3 Aufreinigung von DNS-Fragmenten durch Säulenchromatographie	16
2.3.3 Isolierung von mRNS	17
2.3.4 Reverse Transkription von mRNS	17
2.3.5 Polymerasekettenreaktion	18
2.3.5.1 Amplifikation von DNS-Fragmenten mit einer Länge von 60 bis 1000 bp	18
2.3.5.2 Amplifikation von DNS-Fragmenten mit einer Länge von 1000 bis 20000 bp	19
2.3.6 Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNS-Fragmenten	21
2.3.7 Konformationspolymorphismen	21

2.3.8	Bestimmung von Nukleotidsequenzen	22
2.3.8.1	Radioaktive Sequenzierung	22
2.3.8.2	Cycle-Sequencing (ABI).....	24
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Klinische und biochemische Merkmale der Patienten	26
3.2	Mutationen bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit	30
3.2.1	Mutationen im E1 α -Gen	32
3.2.2	Mutationen im E1 β -Gen	37
3.2.3	Mutationen im E2-Gen	44
4	Diskussion.....	50
4.1	Mutationen im E1 α -Gen (Typ IA).....	52
4.2	Mutationen im E1 β -Gen (Typ IB).....	65
4.3	Mutationen im E2-Gen (Typ II)	74
4.4	Genotyp-Phänotyp-Korrelation	80
4.5	Überlegungen zur Methodik	82
4.6	Stellenwert der Molekulargenetik	83
5	Zusammenfassung	85
6	Literaturverzeichnis	86
	Anhang	102

Liste verwendeter Abkürzungen

A	Adenin
BD	Bindungsdomäne
bp	Basenpaare
BCKD	Branched-Chain α -Keto Acid Dehydrogenase
C	Cytosin
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynucleotidtriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
kb	Kilobase(n), Kilobasenpaar(e)
KD	Kerndomäne
kD	Kilodalton
LD	Liponsäure tragende Domäne
MSUD	Maple Syrup Urine Disease
mRNS	messenger (Boten-)Ribonukleinsäure
OD	Optische Dichte
P	Phosphat
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNS	Ribonukleinsäure
SP	Signalpeptid
SSCP	Single Strand Conformational Polymorphism
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'Tetramethylethylendiamin
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
U	Unit (Einheit des katalytischen Umsatzes)

1 Einleitung

1.1 Historische Perspektive

Zu Anfang des 20. Jahrhunderts begann der englische Arzt Sir Archibald Garrod seine für das Gebiet der angeborenen Stoffwechselstörungen wegweisenden Untersuchungen über die Alkaptonurie (Garrod 1908). Er analysierte den Urin der Patienten und konnte dabei große Mengen an Homogentisinsäure nachweisen, die normalerweise nur in Spuren im menschlichen Urin vorkommt. Darüber hinaus beobachtete Garrod dieses Phänomen auch bei Verwandten der Patienten. Er zog daraus den bemerkenswerten Schluß, dass die Erkrankung durch einen erblichen Fehler im Bereich desjenigen Fermentes zustande kommt, das Homogentisinsäure abbaut. Er prägte damals den heute noch gebräuchlichen Begriff „inborn error of metabolism“. Garrod hatte erkannt, dass der Mensch neben seinem äußeren Erscheinungsbild (Phänotyp) eine chemische Individualität (Chemotyp) besitzt, die durch angeboren ererbte (Genotyp) und äußere Faktoren (Umwelt) determiniert wird. Die Entwicklung molekularbiologischer Techniken in den vergangenen beiden Jahrzehnten hat in eindrucksvoller Weise bestätigt, daß der Genotyp den Chemotyp und Phänotyp maßgeblich bestimmt. Die vorliegende Arbeit untersucht den Genotyp und Phänotyp von Patienten mit Ahornsirup-Krankheit, einer autosomal-rezessiv erblichen Stoffwechselkrankheit.

Die ersten Patienten mit Ahornsirup-Krankheit wurden 1954 beschrieben. Es handelte sich um vier von sechs Kindern einer Familie, die unter dem klinischen Bild einer progredient verlaufenden Enzephalopathie bereits in den ersten Lebenswochen verstarben (Menkes et al. 1954). Histopathologisch lagen ein Mangel an Myelin und eine ausgeprägte spongiöse Degeneration der weißen Hirnsubstanz vor. Ein charakteristisches klinisches Merkmal war der auffällige Geruch des Urins der Patienten nach Ahornsirup, der der Erkrankung ihren Namen gab (Westall et al. 1957). Es konnten bald weitere Patienten mit diesem Phänotyp identifiziert werden. Durch entsprechende Familienanamnesen wurde ein autosomal-rezessiver Vererbungsmodus deutlich. 1999 konnte die Substanz Sotolone als verantwortlich für den charakteristischen Geruch des Urins der Patienten identifiziert werden (Podebrad et al. 1999). Diese Substanz ist auch im Ahornsirup enthalten, womit die Krankheit ihren Namen zu Recht trägt.

1.2 Der genetische Defekt

Die Ahornsirup-Krankheit tritt in allen ethnischen Gruppen mit einer allgemeinen Inzidenz von etwa 1:185000 Lebendgeborenen auf (Chuang und Shih 2001). In Inzucht-Populationen mit höherer Heterozygoten-Frequenz kann diese Inzidenz auf 1:176 Lebendgeborenen ansteigen, wie dies für die Gemeinschaft der Mennoniten Nordamerikas beschrieben wurde (DiGeorge et al. 1982). Der Ahornsirup-Krankheit liegen unterschiedliche genetische Defekte innerhalb des Multienzymkomplexes der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase zugrunde. Die daraus resultierende reduzierte enzymatische Gesamtaktivität führt zur deutlichen Einschränkung oder fast vollständigen Blockade des Abbaus der drei verzweigtkettigen Aminosäuren Leuzin, Valin und Isoleuzin nach reversibler Transaminierung auf der Stufe ihrer 2-Ketosäuren (siehe Abbildung 1). Es kommt zur Akkumulation dieser Metabolite im Körper, die in höheren Konzentrationen über letztlich nicht geklärte Mechanismen neurotoxisch wirken (Silberberg 1969; Korein et al. 1994).

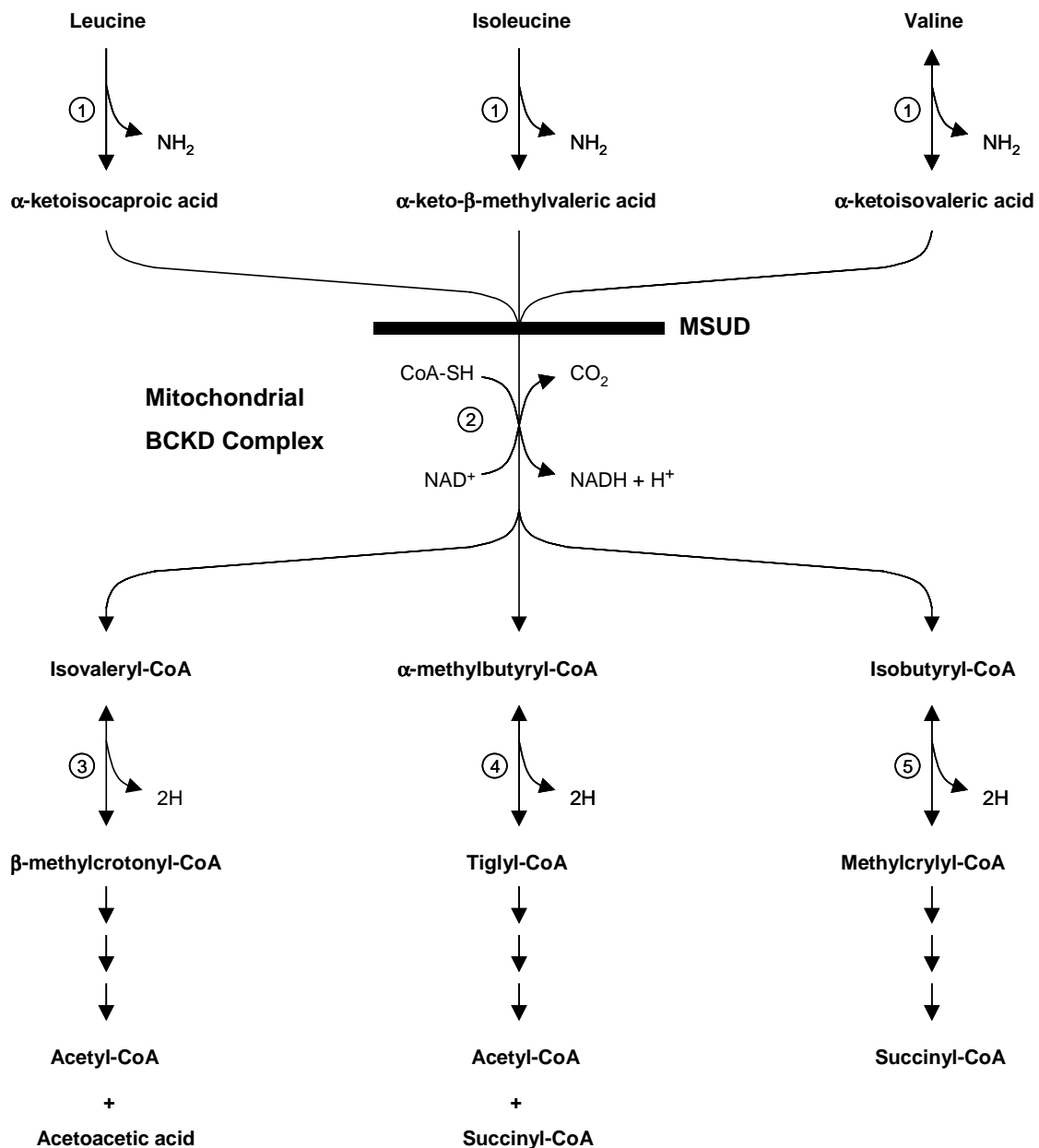


Abbildung 1: Stufenweiser Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren Leuzin, Isoleuzin und Valin (nach Chuang und Shih 2001).

(1) Reversible Transaminierung durch verzweigt-kettige Aminosäuren-Aminotransferase; (2) irreversible oxidative Dekarboxylierung durch den Multienzymkomplex der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuredehydrogenase (BCKD Complex); (3) Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase; (4) verzweigt-kettige Acyl-CoA Dehydrogenase; der weitere Abbau erfolgt stufenweise auf dem Niveau verschiedener Acyl-CoA-Verbindungen. Der bei der Ahornsirup-Krankheit (MSUD) durch genetische Defekte innerhalb des Multienzymkomplexes der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase blockierte Stoffwechselschritt ist durch einen horizontalen Balken gekennzeichnet.

1.3 Klinische Phänotypen

Abhängig von dem Alter der Patienten bei Erstmanifestation der Erkrankung, dem klinischen Bild, dem weiteren klinischen Verlauf, der Höhe der Konzentration der verzweigtkettigen Aminosäuren im Blut, einem möglichen therapeutischen Ansprechen auf Thiamin sowie der verbleibenden Restaktivität der verzweigtkettigen 2-Ketosäuredehydrogenase werden fünf verschiedene Phänotypen unterschieden: die klassische, die intermediäre, die intermittierende, die Thiamin-responsive Verlaufsform und schließlich der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase(E3)-Mangel.

Die ersten von Menkes et al. beschriebenen Patienten litten an der **klassischen Form** der Ahornsirup-Krankheit, der schwersten und häufigsten Verlaufsform. Die intrauterin bereits im Körper betroffener Feten anfallenden verzweigtkettigen Substanzen werden durch die Mutter über die Plazenta eliminiert, so dass die Kinder bei Geburt zunächst unauffällig erscheinen. Durch Abbau von Gewebe- und Nahrungsproteinen kommt es postpartal jedoch zu einem kontinuierlichen Anstieg der Spiegel der verzweigtkettigen Amino- und Ketosäuren, so dass die Kinder ab dem vierten bis siebten Lebenstag klinisch symptomatisch werden. Insbesondere Leuzin und seine Ketosäure erreichen rasch Blutspiegel zwischen 2000 und 4000 μM (Norm für Leuzin: $< 138 \mu\text{M}$). Das Neugeborene wird lethargisch, ahornsirupartiger Geruch ist wahrzunehmen, es zeigt Trinkschwäche und entwickelt eine progrediente neurologische Symptomatik mit Hypo- oder Areflexie, Rumpfhypotonie bei gleichzeitiger Hypertonie der Extremitäten, vorgewölbter Fontanelle als Zeichen eines Hirnödems, zerebralen Krampfanfällen, respiratorischer Insuffizienz und schließlich tiefem Koma, das unbehandelt in den ersten Lebenswochen in den Tod mündet. Unter adäquater Therapie sind die Symptome in Abhängigkeit von der Höhe der Konzentration der neurotoxischen Metabolite und der Dauer dieses Zustandes reversibel oder gehen in neurologische Defektsyndrome über, die von einer Intelligenzminderung bis hin zur infantilen spastischen Zerebralparese reichen können (Clow et al. 1981; Naughten et al. 1982; Snyderman 1988; Hilliges et al. 1990; Kaplan et al. 1991). Die residuale Enzymaktivität in der Fibroblasten- oder Lymphoblastenkultur ist meist auf unter zwei Prozent der Norm herabgesetzt.

Bei der sogenannten **intermediären Verlaufsform** fallen die Patienten meist erst im Alter zwischen fünf Monaten und sieben Jahren mit verzögerter psychomotorischer Entwicklung und/oder Krampfanfällen auf, ohne dass es zu akuten metabolischen

Dekompensationen oder neonataler Enzephalopathie gekommen wäre (Schulman et al. 1970). Bei den betroffenen Kindern war es zuvor über einen langen Zeitraum unkontrolliert zu deutlich erhöhten Spiegeln verzweigtkettiger Metabolite in Blut und Geweben gekommen. Bei diesen Patienten ergibt die Bestimmung der Enzymrestaktivität in Fibroblasten Werte zwischen drei und 30 Prozent der Norm. Es wurde bislang über annähernd 20 Patienten mit intermediärer Form der Ahornsirup-Krankheit in der Literatur berichtet.

Patienten mit der episodenhaften, **intermittierenden Form** der Ahornsirup-Krankheit entwickeln sich dagegen im allgemeinen neurologisch und geistig normal. Im Rahmen außergewöhnlicher Stoffwechselbelastungen wie Infekte, Impfungen, Operationen oder plötzliche übermäßige Proteinzufuhr kommt es jedoch zu akuter metabolischer Dekompensation mit Anstieg der sonst normalen oder nur mäßig erhöhten Spiegel der verzweigtkettigen Metabolite in den neurotoxischen Bereich. Die Kinder reagieren initial meist im Alter zwischen fünf Monaten und zwei Jahren mit neurologischen Symptomen wie Lethargie, Ataxie und Somnolenz (Morris et al. 1961). Der typische Geruch nach Ahornsirup ist dann während der im Verlauf häufig rezidivierenden, krisenhaften Episoden wahrzunehmen. Die Aktivität der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase, gemessen in Fibroblasten, liegt bei diesen Patienten im Bereich zwischen fünf und 20 Prozent der Norm. Es wurde weltweit bereits über zahlreiche Fälle dieser Verlaufsform berichtet.

Wiederholt wurden Patienten mit der sogenannten **Thiamin-responsiven Ahornsirup-Krankheit** in der Literatur geschildert, erstmals durch Scriver in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts (Scriver et al. 1971). Im allgemeinen zeigen die Betroffenen keine neonatale Enzephalopathie, der klinische Verlauf gleicht dem der intermediären Form. Pharmakologisch hohe Dosen an verabreichtem Thiamin (Cofaktor des Enzymkomplexes) sollen zu einem drastischen Abfall der Spiegel für verzweigtkettige Metabolite bei diesen Patienten führen. Es herrschen kontroverse Diskussionen über die tatsächliche Existenz dieser Thiamin-responsiven Verlaufsformen der Erkrankung. Die Gruppe von in Frage kommenden Patienten ist äußerst heterogen und das Fehlen einheitlicher Kriterien zu Therapieversuchen mit Thiamin erschwert die Einschätzung des Grades einer möglichen Thiamin-Abhängigkeit und die Vergleichbarkeit entsprechender Patienten.

Der sogenannte Dihydrolipoyl-Dehydrogenase(**E3**)-**Mangel** ist ein spezielles eigenständiges Krankheitsbild, da nicht nur alleine die Aktivität des

Multienzymkomplexes der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase, sondern zusätzlich auch die der mitochondrialen Pyruvat-Dehydrogenase und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase beeinträchtigt ist (Haworth et al. 1976). Die komplexe metabolische Störung ähnelt in ihrem klinischen Bild der intermittierenden Form der Ahornsirupkrankheit in Kombination mit einer schweren Laktazidose und einem Anstieg der Spiegel für Pyruvat und α -Ketoglutarat. Der E3-Mangel ist sehr selten, es wurden bislang weniger als 20 Patienten beschrieben. Auf den E3-Mangel wird im Rahmen der Arbeit nicht weiter eingegangen.

Die intermediäre, die intermittierende und die Thiamin-responsive Form können als **variante Verlaufsformen** der Ahornsirupkrankheit zusammengefasst werden. Die genaue Differenzierung und Kategorisierung dieser varianten Formen ist vielfach durch das Fehlen einheitlicher Kriterien erschwert.

Tabelle 1: Klinische und biochemische Phänotypen bei Ahornsirup-Krankheit.

Klinischer Phänotyp	Symptome	Restaktivität der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase (% d. Norm)
klassisch (c.a. 80 %)	Neonatale Enzephalopathie und Koma in der ersten Lebenswoche	0-2
variante Formen (c.a. 20%): intermediär intermittierend Thiamin-responsiv (nicht exakt klassifiziert)	mildere Verläufe, neurologische Symptome meist erst später bei interkurrenten Krankheiten oder überhöhter Proteinzufuhr, psychomotorische Retardierung	Kontinuum von 2-40

1.4 Tiermodell

Als Tiermodell für die Ahornsirupkrankheit kann annähernd ein bei Poll-Hereford-Kälbern aus Inzucht-Populationen in Australien beobachtetes Krankheitsbild mit Störung im Stoffwechsel verzweigtkettiger Aminosäuren dienen (Harper et al. 1986; Harper et al. 1989). Die Mehrzahl der betroffenen Kälber wird bereits mit einer schweren Enzephalopathie geboren und verstirbt innerhalb der ersten fünf Lebensstage. Der Urin weist den typischen Geruch nach Ahornsirup auf. Züchtungs-Experimente lassen einen autosomal-rezessiven Erbgang erkennen. Die enzymatische Aktivität der bovinen verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase ist stark herabgesetzt.

1.5 Diagnose und Therapie

Bei entsprechendem klinischen Verdacht erfolgt die **Diagnose** der Ahornsirup-Krankheit durch Plasmaaminoanalyse, die erhöhte Spiegel von Leuzin, Valin und Isoleuzin sowie den pathognomonischen Nachweis von Alloisoleuzin ergibt. Ein stark positiver Dinitrophenylhydrazin-Test im Urin zeigt eine starke Ausscheidung von 2-Ketosäuren an.

Eine Pränataldiagnostik ist auf Enzymebene in Chorionzottenmaterial oder in kultivierten Amniozyten möglich (Wendel et al. 1973, Wendel und Claussen 1979). Nur in wenigen Fällen kam bislang eine molekulargenetische Mutationsanalyse auf DNS-Ebene, beispielsweise mittels allelspezifischer Oligonukleotidhybridisierung, bei bekannter Mutation für eine Pränataldiagnostik zur Anwendung (Kleijer et al. 1985; Mitsubuchi et al. 1992).

Die **Therapie** der Ahornsirup-Krankheit besteht in einer lebenslangen Proteinrestriktiven Diät. Zielsetzung ist es, die Plasmakonzentrationen der verzweigtkettigen Metabolite möglichst in den Normbereich abzusenken und gleichzeitig in Abhängigkeit von Alter und Wachstumsrate noch eine ausreichende Zufuhr der drei essentiellen verzweigtkettigen Aminosäuren Leuzin, Valin und Isoleuzin über natürliches Eiweiß zur Gewährleistung eines normalen Wachstums und einer normalen Entwicklung des Kindes sicherzustellen (Snyderman et al. 1964; Chuang und Shih 2001). Zur Diät muß der Zusatz von handelsfertigen speziellen

Aminosäuregemischen, die frei von Leuzin, Valin und Isoleuzin sind, erfolgen. In akuten metabolischen Krisen mit kataboler Stoffwechsellage wird die Zufuhr von Proteinen weiter reduziert und der Katabolie durch Gabe von Glukose, gegebenenfalls unter Zusatz von Insulin, entgegengewirkt (Wendel et al. 1982a). In lebensbedrohlichen, konservativ nicht mehr beherrschbaren Situationen kann eine Dialysetherapie (Peritonealdialyse, Hämodialyse, Hämofiltration) oder eine Blutaustauschtransfusion erforderlich werden (Gauil 1969; Sallan et al. 1969; Wendel et al. 1980; Wendel et al. 1982b). In wenigen Fällen von klassischer Ahornsirup-Krankheit konnte über eine erfolgreiche Lebertransplantation berichtet werden, durch die der schwere Stoffwechseldefekt in eine sehr milde variante Form der Erkrankung überführt werden konnte (Kaplan et al. 1997; Wendel et al. 1999).

Langfristig besteht im Sinne eines kausalen Therapieansatzes das Ziel in der Etablierung einer somatischen Gentherapie. Zahlreiche Untersuchungen *in vitro* lassen die Ahornsirup-Krankheit für diese Therapieoption als sehr geeignet und vielversprechend erscheinen (Koyata et al. 1993; Mueller et al. 1995). Erste Voraussetzung dafür ist die exakte molekulargenetische Charakterisierung der Patienten.

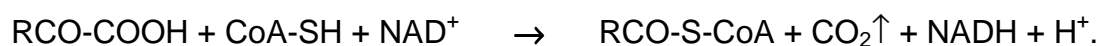
1.6 Multienzymkomplex

Der Multienzymkomplex der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase befindet sich an der inneren Membran der Mitochondrien aller Gewebe (Yeaman 1986) und konnte erstmals 1978 aus boviner Niere (Pettit et al. 1978) und später aus menschlicher Leber (Ono et al. 1987) isoliert und aufgereinigt werden. Dieser Enzymkomplex ist ein Makromolekül mit einer geschätzten Masse von 4×10^6 Dalton. Er ist Mitglied einer Familie dreier hoch konservierter Enzyme mit ähnlicher Struktur und Funktion, zu der noch die Pyruvat-Dehydrogenase und die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase zählen (Yeaman 1989). Die verzweigt-kettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase setzt sich aus drei katalytischen Untereinheiten zusammen: einer Thiaminpyrophosphat-abhängigen 2-Ketosäuren-Decarboxylase (E1, ein Heterotetramer $\alpha_2\beta_2$), einer Dihydrolipoyl-Transacylase (E2, ein Homopolymer α_{24}) und einer Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3, ein Homodimer α_2). E1 und E2 sind spezifisch für die verzweigt-kettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase,

E3 ist gemeinsame Komponente der oben genannten Enzymfamilie der 2-Ketosäuren-Dehydrogenase-Komplexe. Die Enzymaktivität der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase wird durch zwei spezifische Enzyme reguliert: eine aktivierende (dephosphorylierende) Phosphatase und eine inaktivierende (phosphorylierende) Kinase (Reed et al. 1985). Als Substrat dieser Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsreaktion fungieren zwei Serin-Reste innerhalb der E1 α -Untereinheit (Paxton et al. 1986). Daneben ist der Aktivitätsstatus des Enzymkomplexes von der Substrat-, Substratanaloga- und Produktkonzentration (Williamson et al. 1979; Patel et al. 1981; Corkey et al. 1982; Danner et al. 1982) sowie von der Genexpression abhängig (Chuang et al. 1983; MacDonald et al. 1991; Chicco et al. 1994; Chinsky et al. 1994). In humanen Geweben (Leber, Niere, Skelettmuskel, Gehirn, Herz, Intestinum, Fettgewebe) liegt der Enzymkomplex überwiegend in der inaktiven Form vor (Suryavan et al. 1998). Skelettmuskel, Leber und Niere stellen die zentralen Organe im oxidativen Abbau verzweigt-kettiger Aminosäuren dar (Suryavan et al. 1998).

Der Multienzymkomplex der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase besitzt einen zentralen Kern kubischer Struktur, der durch 24 Kopien der E2-Untereinheit gebildet wird. Um diesen Kern herum sind zwölf Kopien der E1-Untereinheit (jeweils aus E1 α und E1 β zusammengesetzt), sechs Kopien der E3-Untereinheit, sowie die Kinase und die Phosphatase über Ionenbindungen angeordnet (Mattevi et al. 1991; Mattevi et al. 1992; Aevansson et al. 1999; Aevansson et al. 2000).

Die makromolekulare Struktur des Multienzymkomplexes und die durch die drei einzelnen Enzymkomponenten E1, E2 und E3 katalysierten Reaktionsschritte sind in Abbildung 2 dargestellt. Die durch den Multienzymkomplex der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase katalysierte Gesamtreaktion lautet:



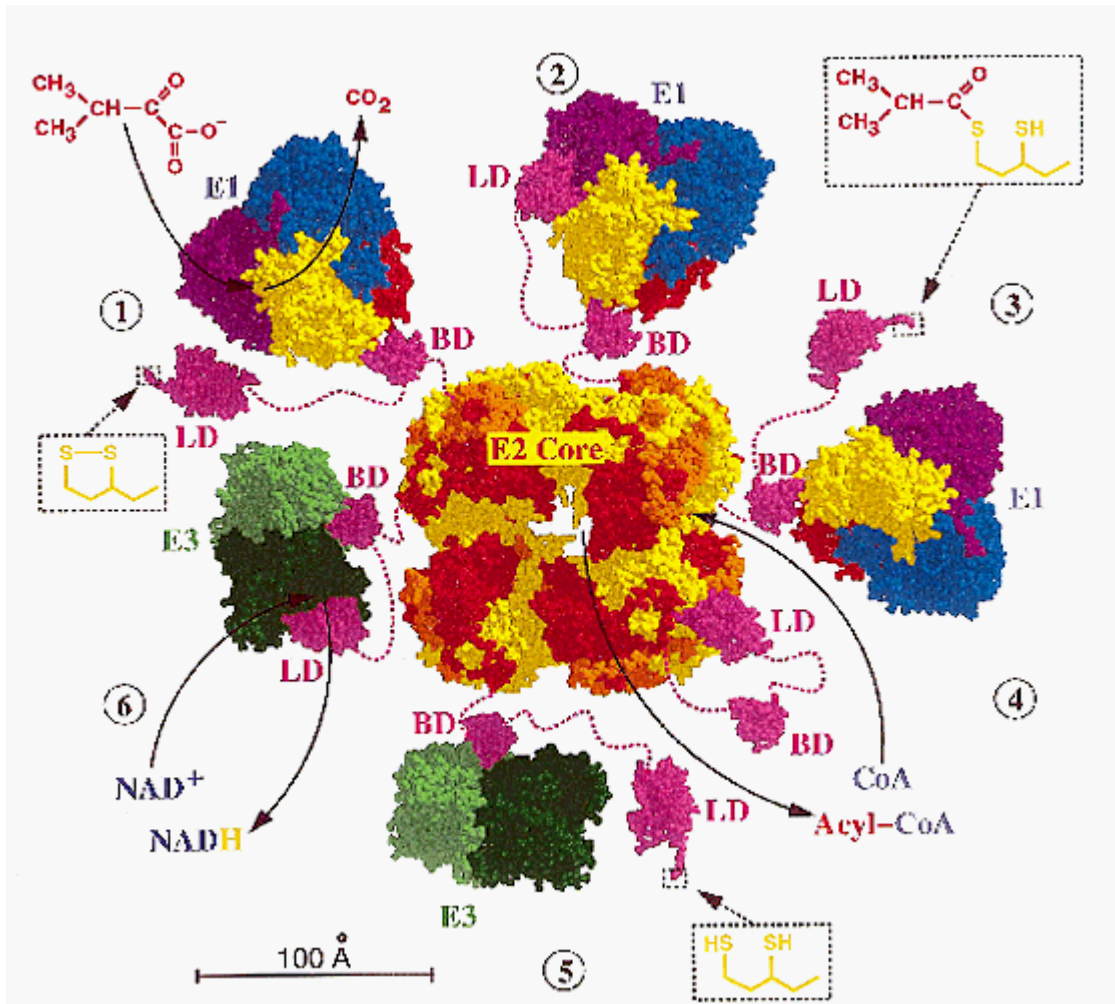


Abbildung 2: Makromolekulare Struktur und einzelne enzymatische Reaktionsschritte des Multienzymkomplexes der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase (aus Aevansson et al. 1999).

Zentral befindet sich in kubischer Form die innere Kerndomäne der Transacylase (E2), um die über Ionenbindungen die Decarboxylase (E1) und die Dehydrogenase (E3) angeordnet sind. Die E2-Untereinheit besitzt drei beweglich miteinander verbundene Domänen: Die Liponsäure tragende Domäne (LD), die E1-/E3-Bindungsdomäne (BD) und die eigentliche innere E2-Kerndomäne. E1 und E3 sind über BD an die E2-Kerndomäne gebunden. (1) E1 katalysiert die Thiaminpyrophosphat-abhängige oxidative Decarboxylierung der verzweigt-kettigen Ketosäuren; (2) LD schwingt als beweglicher Arm ins aktive Zentrum von E1, um die an Thiaminpyrophosphat gebundene Acyl-Gruppe zu übernehmen; (3) LD verlässt mit der gebundenen Acylgruppe das aktive Zentrum von E1; (4) LD schwingt ins aktive Zentrum der E2-Kerndomäne, um die Acyl-Gruppe auf Coenzym A (CoA) zu übertragen, das entstehende Acyl-CoA verlässt den Komplex; (5) Liponsäure liegt als Dihydrolipoamid in deacetyliertem und reduziertem Zustand vor; (6) LD schwingt ins aktive Zentrum von E3, um Dihydrolipoamid unter Reduktion von NAD^+ zu reoxidieren. LD verlässt mit der so regenerierten Liponsäure das aktive Zentrum von E3 und steht für einen neuen Reaktionszyklus zur Verfügung.

1.7 Molekulargenetik

Die vier katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten des humanen Multienzymkomplexes der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase werden durch sechs unterschiedliche Gene verschiedener chromosomaler Lokalisation nukleär kodiert. Das E1 α -Gen befindet sich auf Chromosom 19 (19q13.1-q13.2; Crabb et al. 1989; Fekete et al. 1989), das E1 β -Gen auf Chromosom sechs (6p21-p22; Mitsubuchi et al. 1991a; Zneimer et al. 1991), das E2-Gen auf Chromosom eins (1p31; Herring et al. 1991; Lau et al. 1991; Zneimer et al. 1991) und das E3-Gen auf Chromosom sieben (7q31-q32; Scherer et al. 1991). Die chromosomale Lokalisation des menschlichen Kinase- und Phosphatase-Gens ist bislang noch nicht beschrieben. Die strukturelle Organisation einschließlich der regulatorischen Promotor-Region des E1 α -, E1 β -, E2- und E3- Gens ist bekannt, die des menschlichen Kinase- und Phosphatase-Gens ist noch ungeklärt, die des Kinase-Gens der Ratte ist beschrieben. Die Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI Blast Search) beinhaltet zur Zeit sieben cDNA-Sequenzen für das E1 α -Gen, sechs für das E1 β -Gen, sieben für das E2-Gen, 65 für das E3-Gen und drei für das Kinase-Gen (Chuang und Shih 2001). Das menschliche E1 α -Gen (>55kb) enthält neun Exone (GenBank L08634; Dariush et al. 1991; Chuang et al. 1993), das E1 β -Gen (>100kb) zehn Exone (GenBank D90382-D90391; Mitsubuchi et al. 1991a) und das E2-Gen (68kb) elf Exone (GenBank X15069/X68104; Lau et al. 1992). Das menschliche E3-Gen (ca. 20kb) umfasst 14 Exone (GenBank L13761; Johanning et al. 1992; Feigenbaum und Robinson 1993) und das Kinase-Gen (6kb) der Ratte elf Exone (GenBank U36774; Huang und Chuang 1996).

Nach der Biosynthese größerer Vorläufer-Polypeptide der einzelnen Untereinheiten im Zytosol erfolgt ein Import ins Mitochondrium, in dem diese nachfolgend zu kleineren, reifen Formen prozessiert werden, sich falten und sich schließlich zum Enzymkomplex zusammenlagern (Hartl et al. 1989; Lindsay et al. 1989). Die Vorläufer-Polypeptide beginnen mit aminoterminalen Leit- oder Präsequenzen, den sogenannten Mitochondrieneintrittssequenzen mit einer Länge von 35-61 Aminosäuren je nach Untereinheit (Otulakowski und Robinson 1987; Hu et al. 1988; Griffin et al. 1988; Nobukuni et al. 1990). Die genaue Bedeutung dieser Regionen für den mitochondrialen Import ist noch nicht bekannt. Bei der Faltung und Aggregation

der reifen Enzymproteine im Organell wirken mitochondriale Chaperonine mit (Wynn et al. 1992; Hartl et al. 1992; Wynn et al. 2000).

Theoretisch können Defekte in jedem der sechs genannten Gen-Loci zum Phänotyp der Ahornsirup-Krankheit führen, was die genetische Heterogenität der Erkrankung verdeutlicht. Bisher wird anhand der durch die Mutation betroffenen Untereinheit zwischen folgenden molekulargenetischen Formen unterschieden: Typ IA (MIM 248600) mit Defekten im E1 α -Gen, Typ IB (MIM 248611) mit Defekten im E1 β -Gen, Typ II (MIM 248610) mit Defekten im E2-Gen und Typ III (MIM 246900) mit Defekten im E3-Gen (eigenständiger klinischer Phänotyp des E3-Mangels). Eine weitere Unterteilung in Typ IV und Typ V ist für bislang noch nicht beschriebene Mutationen im Kinase bzw. Phosphatase-Gen vorgesehen. Zum jetzigen Zeitpunkt konnten in der Literatur bereits 65 Mutationen den vier erstgenannten molekulargenetischen Formen der Ahornsirup-Krankheit zugeordnet werden (Chuang und Shih 2001; Edelmann et al 2001; Wynn et al 2001), einige konnten bereits näher charakterisiert werden. Am häufigsten treten Defekte vom Typ IA und vom Typ II auf. Die betroffenen Patienten sind entweder, wie meist im Falle konsanguiner Eltern, homozygot für eine Mutation oder zusammengesetzt („compound-“) heterozygot für zwei verschiedene Mutationen in den beiden Allelen des Gens einer Untereinheit. Die Kombination verschiedener Defekte innerhalb eines Gens bzw. Typs kann so zu unterschiedlichen klinischen Phänotypen führen. Eine genaue Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist bislang nicht eindeutig möglich. Zum besseren pathogenetischen Verständnis der Erkrankung sind weitere molekulargenetische Untersuchungen von Patienten mit Ahornsirup-Krankheit notwendig.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende klinisch-experimentelle Arbeit verfolgte die folgenden Ziele:

1. Patienten mit klassischer und varianter Form der Ahornsirup-Krankheit sollten phänotypisch hinsichtlich ihrer klinisch-biochemischen Merkmale charakterisiert werden.
2. Diese Patienten sollten hinsichtlich möglicher Defekte im E1 α -Gen, im E1 β -Gen und im E2-Gen molekular charakterisiert werden.

3. Die nachgewiesenen Mutationseignisse sollten in ihren Auswirkungen auf den Multienzymkomplex der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase zur Erweiterung des pathogenetischen Verständnisses der Ahornsirup-Krankheit diskutiert werden.
4. Das klinisch-biochemische Erscheinungsbild dieser Patienten sollte schließlich zur Prüfung einer möglichen Genotyp-Phänotyp-Korrelation den nachgewiesenen Mutationen gegenübergestellt werden.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten mit Ahornsirup-Krankheit

24 Patienten deutscher, türkischer, italienischer oder französischer Herkunft mit der klinischen und biochemischen Diagnose Ahornsirup-Krankheit wurden untersucht. Zur klinischen Charakterisierung wurde die Einteilung der Patienten in die schwer verlaufende klassische Form und in die leichter verlaufenden sogenannten varianten Formen der Erkrankung vorgenommen. Die biochemische Charakterisierung der Patienten umfaßte die Analyse der Plasmaspiegel der verzweigtkettigen Aminosäuren zum Diagnosezeitpunkt und Untersuchungen zur Enzymaktivität durch *in vitro* Bestimmung der Restaktivität der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase in Fibroblasten, durch Messung der *in vivo* Leuzin-Ganzkörperoxidation mit ¹³C-Leuzin sowie durch Berechnung der Alloisoleuzin/Isoleuzin-Ratio in stabilen metabolischen Phasen (über einen längeren Zeitraum dokumentierte weitgehend konstante Leuzinspiegel) im Plasma. Die Charakterisierung des E1 α -, E1 β - und E2-Gens erfolgte mittels genomischer DNS oder cDNS aus EDTA-Blut der Patienten. Zur E1 α -, E1 β - und E2-Genanalyse der Eltern und Verwandten von Patienten und von gesunden Probanden wurde genomische DNS aus EDTA-Blut verwendet.

2.2 Material

Chemikalien wurden, wenn nicht als versuchsspezifische Materialien gesondert aufgeführt, von den folgenden Firmen in höchstmöglichem Reinheitsgrad bezogen: Merck (Darmstadt), Gibco BRL (Gaithersburg, U.S.A.), Biochrom KG (Berlin), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Nunc GmbH (Wiesbaden-Biebrich). Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Elektrophoresen wurden in Gelkammern von Gibco BRL, Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) und Owl Scientific (Woburn, U.S.A.) durchgeführt. Für photometrische Messungen wurde das UVIKON Spectrophotometer 922, Kontron Instruments (Neufahrn) und für die Zentrifugation Geräte der Firmen Eppendorf (Hamburg) und Beckmann (Klosterneuburg) verwendet.

2.3 Methoden

2.3.1 Isolierung von genomischer DNS

Die Isolierung genomischer DNS erfolgte aus EDTA-Blut. Hierzu wurden folgende autoklavierte Lösungen verwendet:

Lösung A:	10 mM Tris-HCl	Lösung B:	400 mM Tris-HCl
	320 mM Sucrose		60 mM EDTA
	5 mM MgCl ₂		150 mM NaCl
	1% TritonX-100		1% SDS
	pH 8,0		pH 8,0

Lösung C: 5 M Natriumperchloratlösung

Zur DNS-Extraktion aus Blut wurden zunächst die kernhaltigen Zellen aus dem Vollblut präpariert. Hierzu wurden 5 bis 10 ml EDTA- Blut mit 40 ml Lösung A versetzt und 4 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Erythrozytenlysat wurde von den kernhaltigen Zellen durch zehn Minuten Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1300 x g getrennt und als Überstand abgenommen. Das in diesem Schritt gewonnene Leukozytenpellet (ca. 35×10^6 Zellen) wurde zur besseren Aufreinigung erneut mit Lösung A versetzt und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 2ml Lösung B resuspendiert, um die kernhaltigen Zellen zu lysieren. Nach Zugabe von 500 µl Lösung C wurde die Probe über 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend für 25 Minuten bei 65°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Extraktion der genomischen DNS wurden 2 ml Chloroform (-20°C) zu dem Zellysat gegeben, zehn Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 15 Minuten bei 4°C und 800 x g zentrifugiert. Für die Fällung der DNS wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in 6 ml 98% Ethanol (-20°C) überführt. Das DNS-Präzipitat wurde in 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und über 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 300 µl TE-Puffer (1 mM Na-EDTA, 10 mM Tris-HCL, pH 8,0) gelöst und bei 4°C aufbewahrt. Die Konzentration und Reinheit der DNS

wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) mittels Photometer bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt. Für reine DNS wurde ein Verhältnis von $OD_{260\text{ nm}}$ zu $OD_{280\text{ nm}}$ zwischen 1,7 und 1,9 angenommen.

Alternativ wurde genomische DNS aus EDTA-Blut auch mittels Genomic-Tip 100/G und mittels Genomic DNA Buffer Set der Qiagen GmbH (Hilden) nach Anweisung des Herstellers isoliert.

2.3.2 Isolierung von DNS-Fragmenten

2.3.2.1 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Materialien: QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH)

Die Isolierung von DNS-Fragmenten mit Längen von 99 bp bis 378 bp wurde mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. 70 bis 80% der in der Agarose enthaltenen DNS wurden zurückgewonnen.

2.3.2.2 Isolierung von DNS aus Polyacrylamidgelen

Die ausgeschnittenen Gelstücke mit den gewünschten DNS-Fragmenten wurden in 100 µl destilliertem Wasser über 5 Minuten auf 99°C erhitzt und über Nacht bei 4°C gelöst.

1 bis 4 µl der Suspension wurden mit der Polymerasekettenreaktion reamplifiziert, das erhaltene Amplifikationsprodukt wurde isoliert und anschließend für die Sequenzreaktion eingesetzt.

2.3.2.3 Aufreinigung von DNS-Fragmenten durch Säulenchromatographie

Materialien: QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH)

Die Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Polymerasekettenreaktionsansätzen erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach den Angaben des Herstellers.

2.3.3 Isolierung von mRNA

Die Isolierung von mRNA erfolgte aus EDTA-Blut.

Materialien: Qiagen RNeasy Blood Mini Kit (Qiagen GmbH)

Zur Gewinnung von zellulärer RNS aus Vollblut wurde der RNeasy Blood Mini Kit eingesetzt. Das Präparationsprotokoll entsprach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit der RNS wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) mittels Photometer bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt. Für reine RNS wurde ein Verhältnis von $OD_{260\text{ nm}}$ zu $OD_{280\text{ nm}}$ zwischen 1,9 und 2,1 angenommen.

2.3.4 Reverse Transkription von mRNA

Materialien: Oligo(dT)₁₅ (Boehringer, Mannheim)

Superscript™ II RNase H⁻Reverse Transkriptase (Gibco BRL)

Die RNS-Transkription wurde mit Hilfe von Superscript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers durchgeführt. 2 bis 5 µg zellulärer RNS wurden mit 100 ng Oligo dT₁₅ in Rnase-freiem Wasser zu 16 µl gelöst. Nach Überschichtung der Probe mit 40 µl Mineralöl wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis inkubiert. Die reverse Transkription wurde durch Zufügen von 6 µl 5x Puffer (250 mM Tris-HCl [pH 8.3 bei Raumtemperatur], 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 3 µl DTT (0,1 M), 1,5 µl dNTPs (10 mM) und 2 µl Superscript II (200 U/µl) eingeleitet und für 60 Minuten bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 65°C denaturiert. Die cDNS wurde bei -20°C gelagert. Für eine Polymerase-Kettenreaktion wurden 2 bis 4 µl der auf diese Weise erhaltenen cDNS-Probe eingesetzt.

2.3.5 Polymerasekettenreaktion

2.3.5.1 Amplifikation von DNS-Fragmenten mit einer Länge von 60 bis 1000 bp

Materialien: PrimeZyme™ DNA Polymerase Kit (Biometra, Göttingen)

Die Amplifikation der genomischen DNS bzw. cDNS erfolgte mit Hilfe von genspezifischen Oligonukleotiden mit einer Länge von 18-24 bp. Die Fragmentlänge aller PCR-Produkte lag zwischen 99 und 378 bp. Die Tabellen I – III im Anhang zeigen die für die Amplifikation und Sequenzierung der E2-cDNS bzw. der genomischen DNS des E1 α , E1 β - und E2-Gens verwendeten Oligonukleotide. In 25 μ l Reaktionsansatz (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 0,04 U/ μ l DNA Polymerase, 400 μ M dNTP, 2% Formamid) wurden 200 ng genomischer DNS bzw. 50 bis 100 ng der cDNS mit jeweils 50 pmol des 5'- und 3'-Oligonukleotids versetzt. Die Ansätze wurden mit ca. 35 μ l Mineralöl überschichtet und in einem DNS Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer GmbH, Ueberlingen) bzw. einem Trio-Thermoblock (Biometra) folgendermaßen inkubiert:

1 Zyklus	96°C	5 Minuten
30 Zyklen	94°C	1 Minute (Denaturierung)
	xx°C*	1 Minute (Primer-Anlagerung)
	74°C	1 Minute (Primer-Verlängerung)
1 Zyklen	74°C	3 Minuten
	4°C	∞

Die mit einem Stern gekennzeichnete Temperatur stellt die Spannbreite der T_m-Werte der Oligonukleotide dar. Für die einzelnen Oligonukleotid-Paare wurde eine individuell optimale Anlagerungstemperatur ermittelt (siehe Tabelle I – III im Anhang). Als T_m-Basiswert dient die Berechnung nach folgender Formel:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G und C}) + 2 \times (\text{Anzahl A und T}) \text{ [}^\circ\text{C]} \quad (\text{Suggs et al. 1981}).$$

Die Charakterisierung der PCR-Produkte erfolgte durch gelelektrophoretische Methoden.

2.3.5.2 Amplifikation von DNS-Fragmenten mit einer Länge von 1000 bis 20000 bp

Materialien: Expand Long Template PCR System (Boehringer)

Expand 20 kb^{Plus} PCR System (Boehringer)

Bei Verwendung des Expand Long Template PCR Systems wurden 300 ng genomische DNS in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit je 2 µl (25 pmol/µl) des 5'Primers und des 3'Primers, 1µl des Desoxy-Nukleotidtriphosphat-Gemisches (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, jeweils 10mM) und mit 5 µl des 10x PCR-Puffers mit 22,5 mM MgCl₂ versetzt, mit ca. 35 µl Mineralöl überschichtet und folgenden Zyklen unterzogen:

1 Zyklus	98°C	12 Minuten
10 Zyklen	92°C	30 Sekunden
	xx*°C	30 Sekunden
	68°C	3 Minuten
20 Zyklen	92°C	30 Sekunden
	xx*°C	30 Sekunden
	68°C	3 Minuten
		(+ 20 Sekunden Elongationszeitverlängerung/Zyklus)
1 Zyklus	68°C	7 Minuten
	4°C	∞

Bei Verwendung des Expand 20 kb^{Plus} PCR Systems wurden jeweils 450 ng genomische DNS in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit je 2 µl (25 pmol/µl) des 5'Primers und des 3'Primers, mit 2,5 µl eines Desoxy-Nukleotidtriphosphat-Gemisches (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, jeweils 10mM) und mit 10 µl eines 5x konzentrierten PCR-Reaktionspuffers mit 11,25 mM MgCl₂ versetzt, mit ca. 35 µl Mineralöl überschichtet und unter folgenden Bedingungen inkubiert:

1 Zyklus	94°C	2 Minuten
10 Zyklen	92°C	15 Sekunden
	xx °C*	30 Sekunden
	68°C	15 Minuten
20 Zyklen	92°C	15 Sekunden
	xx °C*	30 Sekunden
	68°C	15 Minuten
	(+ 10 Sekunden Elongationszeitverlängerung/Zyklus)	
1 Zyklus	68°C	7 Minuten
	4°C	∞

Bei der Verwendung beider Expand-Systeme wurde nach der Denaturierung bei 98 bzw. 94°C jeder Ansatz mit 0,75 µl (2,5 U) der Taq-Polymerase versetzt. Dieser „Hot Start“ hat den Vorteil, dass die Template-DNS über eine längere Zeit bei einer höheren Temperatur und damit vollständiger denaturiert werden kann, ohne dass die Enzymaktivität der Taq-Polymerase temperaturbedingt erniedrigt wird.

Die mit einem Stern gekennzeichnete Temperatur stellt die Spannbreite der T_m-Werte der Oligonukleotide dar. Für die einzelnen Oligonukleotid-Paare wurde eine individuell optimale Anlagerungstemperatur ermittelt (siehe Tabelle I – III im Anhang). Als T_m-Basiswert dient die Berechnung nach folgender Formel:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G und C}) + 2 \times (\text{Anzahl A und T}) \text{ [}^\circ\text{C]} \quad (\text{Suggs et al. 1981}).$$

Die Charakterisierung der PCR-Produkte beider Expand-Systeme erfolgte durch gelelektrophoretische Methoden.

2.3.6 Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNS-Fragmenten

Materialien: Qualex-Gold-Agarose (Peqlab Biotechnologie GmbH)
123 bp DNA Ladder (Gibco BRL)

5 µl des zu trennenden DNS-Fragmentgemisches wurden mit 2 µl Blaumarker (30% Glycerin, 0,25% Xylencyanol, 0,25% Bromphenolblau) versetzt und auf ein 0,8-2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Prozentigkeit des Gels wurde in Abhängigkeit von der Größe der DNS-Fragmente und den Anforderungen an die Qualität der Auftrennung gewählt. Die Elektrophorese wurde bei 200 mA mit maximal 100 V in 1x TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2,5 mM Na₂-EDTA, pH 8,0) für ca. 30-60 Minuten durchgeführt. Als DNS-Längenstandard wurde die 123 bp-Leiter verwendet. Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte durch eine 5 bis 20-minütige Inkubation des Agarosegels in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) und nachfolgende Anregung des interkalierten Ethidiumbromids mit UV-Licht bei 254 oder 365 nm (UV-Transluminator GE-FLX-20L; AGS, Heidelberg). Das spezifische Bandenmuster wurde mit Hilfe eines Polaroid-Kamera-Systems (DS-34) der Firma AGS photographisch dokumentiert.

2.3.7 Konformationspolymorphismen

Materialien. 30% PAA, 29:1 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
GelBond PAG (Biozym, Oldendorf)

Für die SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)-Untersuchung wurden mittels der Polymerasekettenreaktion amplifizierte Fragmente genomischer DNS und cDNS mit einer Länge von 180 bis 321 bp eingesetzt. Die Durchführung der SSCP erfolgte nach einer modifizierten Methode von Orita und Mitarbeitern (Orita et al. 1989). Das Prinzip der SSCP beruht auf einem unterschiedlichen Wanderungsverhalten von DNS-Einzelsträngen denaturierter PCR-Produkte, das von

ihrer Konformation abhängig ist. Eine unterschiedliche Primärstruktur bzw. Sequenz beeinflusst die Konformation und damit die Wanderungsgeschwindigkeit der Einzelstränge in der Polyacrylamidgelelektrophorese. Somit können mit Hilfe der SSCP DNS-Fragmente detektiert werden, die aufgrund von Mutationen oder Polymorphismen ein anderes Laufverhalten als Kontrollfragmente zeigen. 4 bis 8 µl PCR-Produkt wurden mit 4 µl einer Lösung aus einem Teil Bromphenol Blue-Xylene Cyanole Dye Solution und vier Teilen 99% Formamide (beides Sigma-Aldrich Chemie GmbH) versetzt und für 3 bis 5 Minuten bei 94°C hitzedenaturiert. Die Proben wurden auf ein Polyacrylamidgel mit einer Dicke von 0,45 mm (10% Acrylamid:Bisacrylamid 29:1, 3 M Urea, 1x TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2,5 mM Na₂-EDTA, pH 8,0)) aufgetragen, welches zur Vereinfachung der Handhabung bei der Färbung auf GelBond PAG-Folie gegossen wurde. Zur Steigerung der Detektionsrate wurde bei einigen SSCP-Untersuchungen der Gelmatrix 5% Glycerin zugefügt (Nataraj et al. 1999). Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE-Puffer bei 180-220 V und 4°C Umgebungstemperatur für 18 bis 24 Stunden. Zum Nachweis der Nukleinsäuren wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Das Gel wurde in einer Lösung aus 10% Ethanol und 1% Eisessig für mindestens 20 Minuten fixiert, 30 Minuten in einer 0,15%igen Silbernitratlösung gefärbt und daraufhin zweimal mit Aqua dest gewaschen. Anschließend wurde das Gel bis zur gewünschten Farbtintensität (10 bis 15 Minuten) in Entwickler (0,5% Formaldehyd, 1,5% NaOH) gelegt und für weitere 5 Minuten in 0,75% Natriumbicarbonatlösung neutralisiert. Die gefärbten Gele wurden in Klarsichtfolie eingeschweißt und durch Vergleich der Bandenmuster zwischen Kontrollen und Patienten ausgewertet. Die PCR-Produkte, deren Einzelstränge ein auffälliges Wanderungsmuster zeigten, wurden direkt bzw. als isoliertes DNS-Fragment (vgl.: 2.3.2) sequenziert.

2.3.8 Bestimmung von Nukleotidsequenzen

2.3.8.1 Radioaktive Sequenzierung

Materialien: Sequenase PCR Product Sequencing Kit (USB Corporation, Cleveland, U.S.A.)

Sequencing Mix (Gibco BRL)

Glycerol Tolerant Gel Buffer (USB Corporation)

³⁵S-dATP (Hartmann, Braunschweig)

40% Acrylamid-Bisacrylamid Solution 19:1 (Peqlab Biotechnologie GmbH)

Filterpapier, 0,6 mm (Whatman International Ltd, Maidstone, England)

KODAK BioMax MR Film (Eastman KODAK Company, Rochester, U.SA)

Jeweils 5 µl eines zuvor über ein Agarosegel charakterisierten (vgl.:2.3.6) PCR-Ansatzes bzw. 7µl eines isolierten DNS-Fragmentes (vgl.: 2.3.2) wurden nach der Kettenabbruchmethode sequenziert (Sanger et al. 1977). Durch den Einsatz von Alkalischer Phosphatase und Exonuklease I erfolgte der Abbau überschüssiger dNTPs und Oligonukleotide, daher konnten die PCR-Produkte direkt in die Sequenzierreaktion eingesetzt werden. 5 µl des PCR-Produkts wurden zunächst mit 2 U Alkalischer Phosphatase und 10 U Exonuklease I versetzt, mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme 15 Minuten bei 80°C inaktiviert. Für die isolierten DNS-Fragmente entfiel der enzymatische Abbau von Oligonukleotiden und dNTPs, die Proben wurden lediglich mit Mineralöl überschichtet. Die Ansätze wurden mit je 2 µl Primer (25 pmol/µl) Oligonukleotid versetzt, für 5 bis 7 Minuten bei 99°C hitzedenaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Für die radioaktive Markierung wurden 10 µl der vorbehandelten Probe in einem Reaktionsansatz mit 2 µl Sequenase-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl), 1µl DTT (0,1 M), 2 µl Labeling-Mix (jeweils 1,5 µM dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 µl α-³⁵S-dATP (5 µCi) und 2µl Sequenase 2,0 (1,6 U/µl) versetzt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die nachfolgende Sequenzierreaktion wurden von 3,5 bis 4 µl der markierten Probe mit jeweils 2,5 µl der auf 42°C vorgewärmten vier Terminations-Ansätze (8 µM ddNTP A,C,G oder T; jeweils 80 µM dGTP, dATP, dCTP, dTTP; 50 mM NaCl) gemischt und 5 Minuten bei 42°C inkubiert. Hierbei führen die in den Terminations-Ansätzen jeweils einzeln vorhandenen Didesoxynukleotide ddATP, ddCTP, ddGTP bzw. ddTTP zum spezifischen Kettenabbruch. Durch Zugabe von 4,5 µl Stop-Lösung (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol) wurden die einzelnen Reaktionen abgebrochen. Die Lagerung der Reaktionsansätze erfolgte bei -20°C. Die Proben wurden in Polyacrylamidgelen (6% Acrylamid:Bisacrylamid

19:1, 7 M Harnstoff, 1x Glycerol Tolerant Gel Puffer: 1,08% Tris, 0,36% Taurin, 0,02% NaEDTA, 0,06% APS, 0,03% TEMED) von 0,4 mm Dicke in 0,8x Glycerol tolerantem Gelpuffer bei 70 W über ein bis fünf Stunden in einer S2-Kammer der Firma Gibco aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend 15 Minuten in einer Lösung aus 5% Essigsäure und 5% Ethanol fixiert, auf ein Whatman-Filterpapier übertragen und 1 bis 2 Stunden bei 80°C auf einem Geltrockner der Firma AGS unter Vakuum getrocknet. Schließlich wurde es für 24 bis 48 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Röntgenfilm plaziert und in einem X-Omat 3000 RA Prozessor (Eastman KODAK Company) entwickelt. Die abgebildete Sequenz wurde anhand der Lauflänge der verschiedenen Fragmente bestimmt.

2.3.8.2 Cycle-Sequencing (ABI)

Materialien: DNA Sequencing Kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Die nicht-radioaktive Sequenzierung wurde nach der „Dye-Terminator“-Methode durchgeführt. Dabei werden in einer „Cycle“-Sequenzierreaktion mit Hilfe des „Dye-Terminator“-Sequenzierkits (ABI) fluoreszierende Nukleotide eingebaut; die verschiedenen Nukleotide sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden 7,5 µl der isolierten DNS-Fragmente (vgl.: 2.3.2) mit 5 bis 12.5 pmol Primer und 2 µl Premix versetzt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Sequenzierreaktion wurde dann in einem Trio-Thermoblock (Biometra) mit dem folgenden Programm durchgeführt:

25 Zyklen: 96°C 10 Sekunden (Denaturierung)
50°C 5 Sekunden (Primer-Anlagerung)
60°C 4 Minuten (Primer-Verlängerung)
4°C ∞

Die Aufbereitung der Proben erfolgte mittels Natriumacetat-Ethanol-Fällung. Hierzu wurde die komplette Probe der Sequenzierreaktion mit 1µl 3 M Na-Acetat (pH 4,6) und 25 µl 95% Ethanol versetzt, gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Probe wurde 30 Minuten bei 4°C und 15800 x g (Eppendorf Zentrifuge 5415C)

zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrirte mit je 200 µl 70% Ethanol. Die Pellets wurden bei 37°C ca. 30 Minuten lang getrocknet und in 3,5 µl Auftragspuffer (80% Formamid, 5 mM EDTA, pH 8,0, 5% Dextranblau) resuspendiert. Jeweils 1,8-2,2µl wurden anschließend auf ein ABI-Sequenziergel aufgetragen. Die Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktionen erfolgte auf 5%igen Polyacrylamidgelen (7 M Harnstoff) mit Hilfe des automatischen Sequenziergerätes ABI 377.

Alternativ wurde die Aufbereitung der Proben mittels DyeEx Spin Columns (Qiagen GmbH) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische und biochemische Merkmale der Patienten

Es wurden 24 Patienten deutscher, türkischer, italienischer oder französischer Herkunft mit der klinischen und biochemischen Diagnose Ahornsirup-Krankheit untersucht. Der größte Anteil der Patienten wird in der Abteilung für Stoffwechselkrankheiten der Universitätskinderklinik Düsseldorf betreut. Hier wurden auch in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. P. Schadewaldt aus der Abteilung für klinische Biochemie am Diabetes Forschungsinstitut, Heinrich Heine-Universität Düsseldorf der größte Anteil der klinischen und biochemischen Befunde erhoben (Wendel et al. 1989; Schadewaldt et al. 1998; Schadewaldt et al. 2001).

Tabelle 2 zeigt die klinischen und biochemischen Merkmale der Patienten. Die Parameter der Restaktivität der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase der Patienten sind Tabelle 3 gesondert zu entnehmen.

Anhand der klinisch-biochemischen Merkmale sind 17 der 24 untersuchten Patienten der klassischen schweren Verlaufsform der Ahornsirup-Krankheit und sieben der untersuchten 24 Patienten den mildereren varianten Verlaufsformen zuzuordnen. Bei allen Patienten mit klassischer Ahornsirup-Krankheit liegt die Diagnosestellung im Zeitraum der ersten 17 Lebenstage. Alle Patienten mit milderer varianter Verlaufsform waren zum Zeitpunkt der Diagnose älter. Im Plasma der Patienten wurden bei Erstdiagnose die Konzentrationen der verzweigt-kettigen Aminosäuren Leuzin, Valin, Isoleuzin sowie des pathognomonischen Alloisoleuzins bestimmt. Es können für gesunde Kinder zwischen drei und elf Jahren die folgenden Normbereiche (Mittelwert +/- Standardabweichung) für diese Parameter zugrundegelegt werden: Leuzin 169 +/- 10 µM, Valin 264 +/- 15 µM, Isoleuzin 77 +/- 5 µM und Alloisoleuzin 1,6 +/- 0,1 µM (Schadewaldt et al. 1999). Für jüngere Kinder unter drei Jahren können in etwa vergleichbare Werte gelten (Schadewaldt et al. 1999). Mit Ausnahme der Patientin L.W. liegen bei den leichteren varianten Verlaufsformen die Plasmaspiegel dieser vier verzweigt-kettigen Aminosäuren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose deutlich niedriger als bei den klassischen Formen. Bei den Patienten L.S. und C.S. mit klassischer Ahornsirup-Krankheit kam es aufgrund der Kenntnis eines älteren von der Erkrankung betroffenen Geschwisterkindes zur Diagnosestellung am ersten Lebenstag mit vergleichsweise nur leicht erhöhten

Werten. Als Maß der enzymatischen Restfunktion dienen die Bestimmung der Restaktivität der verzweigkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase in kultivierten Fibroblasten, die Alloisoleuzin/Isoleuzin-Ratio in stabilen metabolischen Phasen (über einen längeren Zeitraum dokumentierte weitgehend konstante Leuzinspiegel) im Plasma und die *in vivo* Leuzin-Ganzkörperoxidation. Die leichteren varianten Verlaufsformen der Ahornsirup-Krankheit weisen eine deutlich höhere enzymatische Restaktivität auf als die klassische Form: Bei der klassischen Form mit einer Enzymrestaktivität von unter zwei Prozent der Norm liegt die Alloisoleuzin/Isoleuzin-Ratio bei 0,6 bis 0,7, bei varianten Formen mit Enzymrestaktivitäten zwischen zwei und 40 Prozent der Norm fällt diese Ratio mit zunehmender Restaktivität von 0,7 bis auf zum Teil weniger als 0,1 ab.

Tabelle 2: Demographische, klinische und biochemische Merkmale der Patienten mit Ahornsirup-Krankheit.

Patient	ethnische	konsanguine	Alter	Leuzin	Valin	Isoleuzin	Alloisoleuzin	Maßnahme	klinisch-biochem.
	Herkunft	Eltern	b. ED	b. ED (Plasma)	b. ED (Plasma)	b. ED (Plasma)	b. ED (Plasma)	Detoxifizierung	Phänotyp
B.A.	türkisch	Ja	8 Tage	2840 µM	462 µM	191 µM		AT	klassisch
M.B.	türkisch	Ja	16 Tage	*	*	*		keine	klassisch
C.C.	italienisch		15 Tage	2937 µM	556 µM	519 µM	176 µM	AT	klassisch
G.C.	türkisch		13 Tage	2557 µM	587 µM	387 µM	182 µM	AT	klassisch
L.G.	spanisch	Nein	12 Tage	1893 µM	564 µM	229 µM			klassisch
A.H.	türkisch		59 Tage	191 µM	179 µM	84 µM	38 µM	keine	variant
P.H.	deutsch		4 Jahre, 10 Mon.	1291 µM	862 µM	432 µM			variant
H.H.	österreichisch		7 Jahre, 9 Mon.	532 µM	505 µM	321 µM			variant
D.K.	türkisch		22 Tage	1216 µM	856 µM	435 µM	253 µM	keine	variant
S.K.	türkisch		13 Tage	1697 µM	580 µM	306 µM		HF	klassisch
A.M.	türkisch		9 Tage	3791 µM	790 µM	495 µM	169 µM	AT	klassisch
M.M.	deutsch	Ja	13 Tage	2099 µM	85 µM	84 µM			klassisch
D.N.	deutsch	Nein	22 Tage	427 µM	462 µM	168 µM	8 µM	keine	variant
S.O.	türkisch	Ja	17 Tage	2870 µM	624 µM	519 µM	206 µM	AT	klassisch
H.O.	türkisch	Ja	14 Tage	3107 µM	615 µM	489 µM	214 µM		klassisch
G.S.	deutsch	Ja [†]	8 Tage	4504 µM	855 µM	710 µM		AT, PD	klassisch
L.S.	deutsch	Ja [†]	2 Tage	763 µM	530 µM	435 µM	45 µM	keine	klassisch
D.S.	deutsch		12 Tage	2672 µM	462 µM	252 µM	176 µM	keine	klassisch
E.S.	türkisch		11 Tage	2137 µM				AT	klassisch
C.S.	italienisch	Ja	1 Tag	236 µM				keine	klassisch
G.T.	türkisch	Ja [†]	13 Tage	2336 µM	658 µM	305 µM		AT	klassisch
S.T.	französisch		3 Jahre, 2 Mon.	641 µM	367 µM				variant
J.W.	deutsch		13 Tage	2850 µM	221 µM	211 µM		PD, HF	klassisch
L.W.	deutsch		3 Jahre, 9 Mon.	4198 µM				PD	variant

AT: Austauschtransfusion
 ED: Erstdiagnose
 HF: Hämofiltration

PD: Peritonealdialyse

Ja[†]: fraglich weitläufig konsanguin
 *: kein initialer Wert (bei ED) vorhanden

Tabelle 3: Parameter der Restaktivität der verzweigkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase.

Patient	Enzymrestaktivität (Fibroblastenkultur <i>in vitro</i>)	Leuzin-Oxidation (Ganzkörper <i>in vivo</i>)	Allo/Ile-Ratio (Plasma)
B.A.	3,15 % d. Norm		
M.B.			
C.C.	2,83 % d. Norm		0,69 +/- 0,13
G.C.	2,8 % d. Norm		
L.G.		< 5 % d. Norm	
A.H.	22 % d. Norm		
P.H.	20 % d. Norm	49 % d. Norm	
H.H.	7 % d. Norm	86 % d. Norm	
D.K.	2-3 % d. Norm	< 10 % d. Norm	0,56 +/- 0,12
S.K.			
A.M.			
M.M.		< 5 % d. Norm	
D.N.	13,7 % d. Norm	77 % d. Norm	0,09 +/- 0,04
S.O.	≤ 1 % d. Norm		0,63 +/- 0,09
H.O.	≤ 1 % d. Norm		0,70 +/- 0,12
G.S.		< 5 % d. Norm	
L.S.		< 5 % d. Norm	
D.S.	0 % d. Norm		
E.S.			
C.S.	≤ 1 d. Norm		0,72 +/- 0,12
G.T.	2,74 % d. Norm		
S.T.		65% d. Norm	
J.W.			
L.W.			

3.2 Mutationen bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit

Zur Charakterisierung der molekularen Veränderungen im E1 α -, E1 β - und E2-Gen wurde zunächst die genomische DNS der Patienten aus EDTA-Blut gewonnen. Die neun Exone des E1 α -Gens, die zehn Exone des E1 β -Gens und die elf Exone des E2-Gens wurden mit den jeweils angrenzenden Intronsequenzen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die gewonnenen DNS-Fragmente wurden mit der SSCP(Single Strand Conformational Polymorphism)-Screeningmethode untersucht. Anschließend wurde die Basenabfolge der Fragmente mit im Vergleich zu gesunden Kontrollen abnormem Wanderungsverhalten mittels radioaktiver bzw. automatischer Sequenzierung bestimmt. In einem Fall mußte zusätzlich mRNA aus EDTA-Blut des Patienten gewonnen und mittels reverser Transkription cDNS erstellt werden. Danach wurde ein Fragment im E2-Gen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und direkt der Nukleotidsequenzbestimmung mittels radioaktiver Sequenzierung zugeführt.

Da die Ahornsirup-Krankheit einem autosomal-rezessiven Vererbungsmodus folgt, müssen bei jedem Patienten zwei Allele eines der drei Gene von einer Mutation betroffen sein. Bei 13 der 24 Patienten konnten in beiden Allelen für eines der drei Gene eine Mutation nachgewiesen werden (D.K., H.O., C.C., S.O., G.C., C.S., M.M., L.G., B.A., L.S., G.S., S.T., H.H.). Bei sechs Patienten konnte nur ein verändertes Allel mit den genannten Methoden identifiziert werden (D.S., S.K., L.W., J.W., P.H., A.M.). Bei fünf Patienten konnte jeweils in keinem der möglichen sechs Allele ein Mutationsereignis aufgedeckt werden (G.T., E.S., A.H., D.N., M.B.). Insgesamt wurden 21 unterschiedliche Mutationen gefunden, davon sieben im E1 α -Gen, zehn im E1 β -Gen und vier im E2-Gen. Im E1 α -Gen zeigten sich zwei unterschiedliche Polymorphismen. Tabelle 4 fasst die Ergebnisse der Mutationsanalyse zu den 24 einzelnen Patienten mit Ahornsirup-Krankheit zusammen.

Es wurde den allgemeinen Empfehlungen zur Nomenklatur menschlicher Genmutationen gefolgt (Antonarakis und die Nomenclature Working Group 1998).

Tabelle 4: Mutationen bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit

Patient	Phänotyp	Genotyp		Allele
		Gen	Mutation	
B.A.	klassisch	E1 α E1 α	R242X F279F	homozygot homozygot
M.B.	klassisch			
C.C.	klassisch	E1 α E1 α E1 β	F279F L362L c.937delG	heterozygot heterozygot homozygot
G.C.	klassisch	E2	IVS7-1G>A	homozygot
L.G.	klassisch	E1 α E1 β E1 β E2	P-7H G85R c.595-596delAG G323S	heterozygot heterozygot heterozygot heterozygot
A.H.	variant	E1 α	F279F	homozygot
P.H.	variant	E1 β	Y194H	heterozygot
H.H.	variant	E1 β	c.595-596delAG G228S	heterozygot heterozygot
D.K.	variant	E1 α	G245R F279F	homozygot homozygot
S.K.	klassisch	E1 α	P-7H	heterozygot
A.M.	klassisch	E2	G323S	heterozygot
M.M.	klassisch	E1 α E2	Y393N G323S	homozygot homozygot
D.N.	variant			
S.O.	klassisch	E1 α E1 β	T106M V201A	heterozygot homozygot
H.O.	klassisch	E1 α E1 α E1 β	F279F L362L Y333X	homozygot homozygot homozygot
G.S.	klassisch	E1 β	K191X	homozygot
L.S.	klassisch	E1 β	K191X	homozygot
D.S.	klassisch	E1 β	c.166-167insTTAC	heterozygot
E.S.	klassisch	E1 α	F279F	homozygot
C.S.	klassisch	E1 α	A240P	homozygot
G.T.	klassisch	E1 α	F279F L362L	homozygot homozygot
S.T.	variant	E1 α E2 E2	P-7H I368N V385M	heterozygot heterozygot heterozygot
J.W.	klassisch	E1 α	W309X	heterozygot
L.W.	variant	E1 β	V233A	heterozygot

3.2.1 Mutationen im E1 α -Gen

Exon 2 des E1 α -Gens:

Die Länge des untersuchten Fragments betrug 320 bp. Ein auffälliges Bandenmuster in der SSCP-Analyse ergab sich bei den Patienten S.K., L.G. und S.T. Bei allen drei Patienten zeigte die Bestimmung der Nukleotidsequenz einen heterozygoten Basenaustausch von Cytosin gegen Adenin in Position 116 der cDNS. Dieser verändert Kodon -7 (CCC→CAC) im Bereich der Mitochondrieneintrittssequenz und führt zum Austausch der Aminosäure Prolin gegen Histidin (P(-7)H). Bei der Untersuchung der Eltern der Patientin S.K. konnte P(-7)H bei der Mutter heterozygot nachgewiesen werden, die Sequenz des Vaters entsprach der des Wildtyps.

Exon 4 des E1 α -Gens:

Für Exon 4 wurde ein 149 bp langes Fragment untersucht. Bei dem Patienten S.O. zeigte sich ein auffälliges Muster in der SSCP-Analyse. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz in diesem Bereich ergab einen heterozygoten Basenaustausch von Cytosin gegen Thymin in Position 452 der cDNS. Das hierdurch veränderte Basentriplett 106 (ACG→ATG) kodiert nicht mehr für die Aminosäure Threonin, sondern für Methionin (T106M). Bei der Untersuchung der Mutter lag T106M heterozygot vor, die Sequenz des Vaters entsprach der des Wildtyps.

Exon 6 des E1 α -Gens:

Die Länge des untersuchten Fragments betrug 247 bp. Die Probe der Patientin C.S. fiel durch verändertes Wanderungsverhalten in der SSCP-Analyse auf. Bei der folgenden Sequenzierung zeigte sich homozygot eine Transversion von Guanin zu Cytosin in Position 853 der cDNS (siehe Abbildung 3). Dadurch wird Kodon 240 (GCA→CCA) verändert und kodiert anstatt für die Aminosäure Alanin für Prolin. Es resultiert die Mutation A240P.

Patientin C.S.: A240P homozygot
 Allel 1: TGGCATT^CGTATGGG
 Allel 2: TGGCATT^CGTATGGG
Wildtyp: TGGCATT^GGTATGGG

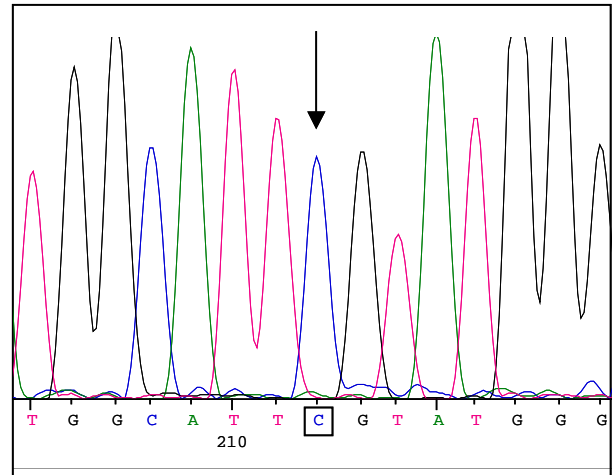


Abbildung 3: ABI-Sequenzierung der Mutation A240P in Exon 6 des E1 α -Gens.

Rechts ist das Chromatogramm der entsprechenden Region in Exon 6 der Patientin C.S. dargestellt. Links sind die veränderte Sequenz und die Wildtyp-Sequenz in reverser Richtung untereinander aufgeführt. Im Chromatogramm lässt sich in Position c.853 ausschließlich ein Ausschlag für die Base Cytosin (umrahmt dargestellt) erkennen. Die Patientin ist somit homozygot für A240P.

Exon 7 des E1 α -Gens:

Das untersuchte Fragment für Exon 7 war 240 bp lang. Ein auffälliges Bandenmuster in verschiedenen SSCP-Analysen ergab sich bei den Patienten D.K., B.A., G.T., H.O., C.C., E.S. und A.H.. Bei B.A. zeigte die Nukleotidsequenzbestimmung eine homozygote Transition von Cytosin zu Thymin in Position 859 der cDNS. Durch diesen Basenaustausch wird das normalerweise für Arginin kodierende Triplet 242 (CGA→TGA) zu einem Stopkodon. Es resultiert die Mutation R242X. Das entsprechende Protein ist um 159 Aminosäuren verkürzt. Bei D.K. zeigte die Bestimmung der Nukleotidsequenz einen Basenaustausch von Guanin gegen Adenin in Position 868 der cDNS. Dieser betrifft Kodon 245 (GCG→ACG) und bewirkt einen Austausch der Aminosäure Glycin gegen Arginin (G245R). Diese Mutation liegt homozygot bei der Patientin vor. Darüber hinaus wies die Sequenzierung bei den Patienten D.K., E.S., A.H., B.A. G.T. und H.O. einen Polymorphismus in homozygoter Form und bei der Patientin C.C. in heterozygoter Form nach. Diesem Polymorphismus liegt eine Transition von Thymin zu Cytosin in Position 972 der cDNS zugrunde. Dies hat keine Konsequenz für das entstehende Protein, da das so

veränderte Kodon 279 (TTT→TTC) aufgrund des degenerierten genetischen Kodes weiterhin für die Aminosäure Phenylalanin steht (F279F).

Exon 8 des E1 α -Gens:

Die Länge des untersuchten Fragments betrug 210 bp. Ein auffallendes SSCP-Bandenmuster zeigte die Probe der Patientin J.W.. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz zeigte eine heterozygote Transition von Guanin zu Adenin in Position 1061 der cDNS. Durch diesen Basenaustausch wird das normalerweise für Tryptophan kodierende Triplet 309 (TGG→TAG) zu einem Stopkodon. Es resultiert die Mutation W309X. Das entsprechende Protein ist um 92 Aminosäuren verkürzt. In keinem der verbleibenden Fragmente des E1 α -Gens fand sich bei der Patientin J.W. zusätzlich eine Auffälligkeit in der SSCP-Analyse. Zur Aufdeckung eines zweiten mutierten Allels wurde daher die Basenabfolge der übrigen acht Exone des E1 α -Gens mittels direkter Sequenzierung bestimmt. Dabei konnte keine weitere Mutation nachgewiesen werden.

Exon 9 des E1 α -Gens:

Für Exon 9 wurde ein 243 bp langes Fragment untersucht. Ein auffälliges Laufmuster in verschiedenen SSCP-Analysen ergab sich bei den Patienten M.M., G.T., H.O. und C.C.. Bei M.M. zeigte die Bestimmung der Nukleotidsequenz eine homozygote Transversion von Thymin zu Adenin in Position 1312 der cDNS. Dieser betrifft Kodon 393 (TAC→AAC) und bewirkt einen Austausch der Aminosäure Tyrosin gegen Asparagin. Es handelt sich um die bekannte sogenannte Mennoniten-Mutation Y393N. Ferner wies die Bestimmung der Basenabfolge bei den Patienten G.T. und H.O. einen Polymorphismus in homozygoter Form und bei der Patientin C.C. in heterozygoter Form nach. Diesem Polymorphismus liegt ein Basenaustausch von Guanin gegen Adenin in Position 1221 der cDNS zugrunde. Dies hat keine Konsequenz für das entstehende Protein, da das so veränderte Triplet 362 (CTG→CTA) aufgrund des degenerierten genetischen Kodes weiterhin die Aminosäure Leuzin kodiert (L362L). Eine gesunde Kontrollperson war heterozygot für L362L.

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv waren mit dem dargestellten Methodenspektrum in den Exonen 1, 3 und 5 des E1 α -Gens keine Mutationen nachweisbar. Die Tabellen 5 und 6 fassen die Ergebnisse der Mutationsanalyse im E1 α -Gen bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit zusammen.

Tabelle 5: Mutationen im E1 α -Gen.

Patient	Phänotyp	Exon	Nukleotid-Ebene	Allele	mRNS/Protein-Ebene	Vater	Mutter	Geschwister
S.K.	k	2	c.116 C>A	heteroz.	P(-7)H	wt	mt	n.b.
L.G.	k	2	c.116 C>A	heteroz.	P(-7)H	n.b.	n.b.	n.b.
S.T.	v	2	c.116 C>A	heteroz.	P(-7)H	n.b.	n.b.	n.b.
S.O.	k	4	c.452 C>T	heteroz.	T106M	wt	mt	n.b.
C.S.	k	6	c.853 G>C	homoz.	A240P	n.b.	n.b.	n.b.
B.A.	k	7	c.859 C>T	homoz.	R242X	n.b.	n.b.	n.b.
D.K.	v	7	c.868 G>A	homoz.	G245R	n.b.	n.b.	n.b.
J.W.	k	8	c.1061 G>A	heteroz.	W309X	n.b.	n.b.	n.b.
M.M.	k	9	c.1312 T>A	homoz.	Y393N	n.b.	n.b.	n.b.

k: klassisch

v: variant

heteroz.: heterozygot

homoz.: homozygot

mt: Eltern bzw. Geschwister sind heterozygot für die entsprechende Mutation

wt: Wildtyp

n.b.: nicht bestimmt, da kein Material zur Verfügung stand

Tabelle 6: Polymorphismen im E1 α -Gen.

Patient	Phänotyp	Exon	Nukleotid- Ebene	Allele	mRNS/Protein- Ebene	Vater	Mutter	Ge- schwister
D.K.	v	7	c.972 T>C	homoz.	F279F	n.b.	n.b.	n.b.
E.S.	k	7	c.972 T>C	homoz.	F279F	n.b.	n.b.	n.b.
A.H.	v	7	c.972 T>C	homoz.	F279F	n.b.	n.b.	n.b.
B.A.	k	7	c.972 T>C	homoz.	F279F	n.b.	n.b.	n.b.
G.T.	k	7	c.972 T>C	homoz.	F279F	n.b.	n.b.	n.b.
		9	c.1221 G>A	homoz.	L362L	n.b.	n.b.	n.b.
H.O.	k	7	c.972 T>C	homoz.	F279F	n.b.	n.b.	n.b.
		9	c.1221 G>A	homoz.	L362L	n.b.	n.b.	n.b.
C.C.	k	7	c.972 T>C	heteroz.	F279F	n.b.	n.b.	n.b.
		9	c.1221 G>A	heteroz.	L362L	n.b.	n.b.	n.b.

k: klassisch

v: variant

heteroz.: heterozygot

homoz.: homozygot

n.b.: nicht bestimmt, da kein Material zur Verfügung stand

3.2.2 Mutationen im E1 β -Gen

Exon 1 des E1 β -Gens:

Die Länge des untersuchten Fragments betrug 255 bp. Ein auffälliges Bandenmuster in der SSCP-Analyse ergab sich bei dem Patienten D.S.. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz zeigte eine heterozygote Insertion von vier Basenpaaren (Adenin, Cytosin, Thymin und Thymin) zwischen Position 166 und 167 der cDNS (c.166-167 insACTT). Dies führt zur Verschiebung des Leserasters bei der Translation und zur Synthese eines fehlerhaften Proteins ab Kodon 6 (TTC→TACTTTC).

Exon 4 des E1 β -Gens:

Für Exon 4 wurde ein 164 bp langes Fragment untersucht. Bei der Patientin G.L. zeigte sich ein auffälliges Wanderungsverhalten in der SSCP-Analyse. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz in diesem Bereich ergab eine heterozygote Transition von Guanin zu Adenin in Position 403 der cDNS. Das hierdurch veränderte Basentriplett 85 (GGA→AGA) kodiert nicht mehr für die Aminosäure Glycin, sondern für Arginin (G85R).

Exon 5 des E1 β -Gens:

Das untersuchte Fragment für Exon 5 war 186 bp lang. Ein auffälliges Bandenmuster in der SSCP-Analyse ergab sich bei den Patienten L.G. und H.H.. Bei beiden sicher nicht verwandten Patienten zeigte die Nukleotidsequenzbestimmung eine Deletion von zwei Basenpaaren (Adenin und Guanin) in Position 595 und 596 der cDNS (c.595-596 delAG). Beide Patienten sind heterozygot für diese Deletion. Sie führt zur Verschiebung des Leserasters bei der Translation und zur Synthese eines fehlerhaften Proteins ab Kodon 149 (AGT→_ _T).

Exon 6 des E1 β -Gens:

Für Exon 6 wurde ein 139 bp langes Fragment untersucht. Ein auffälliges Laufmuster in der SSCP-Analyse ergab sich bei den Patienten L.S., G.S. und P.H.. L.S. und G.S. sind Geschwister. Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen erbrachte folgende Ergebnisse: Bei den Patienten L.S. und G.S. zeigte sich eine homozygote Transversion von Adenin zu Thymin in Position 721 der cDNS. Durch diesen

Basenaustausch wird das normalerweise für Lysin kodierende Basentriplett 191 (AAA→TAA) zu einem Stopkodon. Es resultiert die Mutation K191X. Das entsprechende Protein ist um 152 Aminosäuren verkürzt.

Bei der Untersuchung der Familie der Patienten L.S. und G.S. fand sich K191X beim Vater, der Mutter und einem älteren Bruder heterozygot, die Sequenz der zweieiigen Zwillingsschwester von L.S. entsprach in beiden Allelen der des Wildtyps. Bei Patient P.H. liegt in heterozygoter Form ein Basenaustausch von Thymin gegen Cytosin in Position 730 der cDNS vor. Dieser verändert Kodon 194 (TAC→CAC) und führt zum Austausch der Aminosäure Tyrosin gegen Histidin (Y194H).

Abbildung 4 zeigt das charakteristische Ergebnis der SSCP-Analyse in der Familie der Patienten G.S. und L.S., Abbildung 5 den entsprechenden Familienstammbaum.

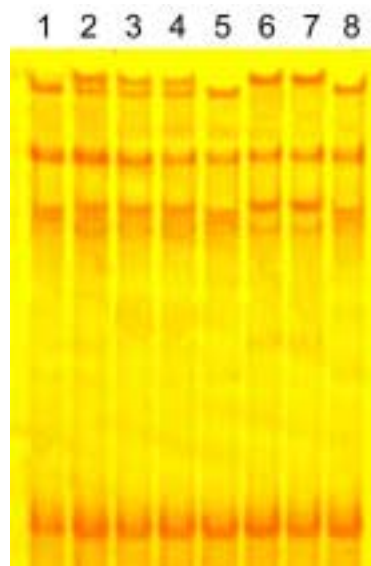


Abbildung 4: SSCP-Analyse – Exon 6 des E1 β -Gens der Familie der Patienten G.S. und L.S..

Aufgetragen wurde das Amplifikat des Vaters (Probe 2), der Mutter (Probe 3), des älteren Bruders (Probe 4), der Zwillingsschwester von L.S. (Probe 5), der Patienten L.S. und G.S. (Proben 6 bzw. 7), sowie zweier gesunder Kontrollen als Wildtyp (Proben 1 und 8). Das SSCP-Laufverhalten der Proben entspricht dem Ergebnis der Sequenzierung: G.S. und L.S. sind homozygot für K191X, die Eltern und der ältere Bruder sind heterozygot für K191X und die zweieiige Zwillingsschwester von L.S. ist homozygot für das Allel des Wildtyps.

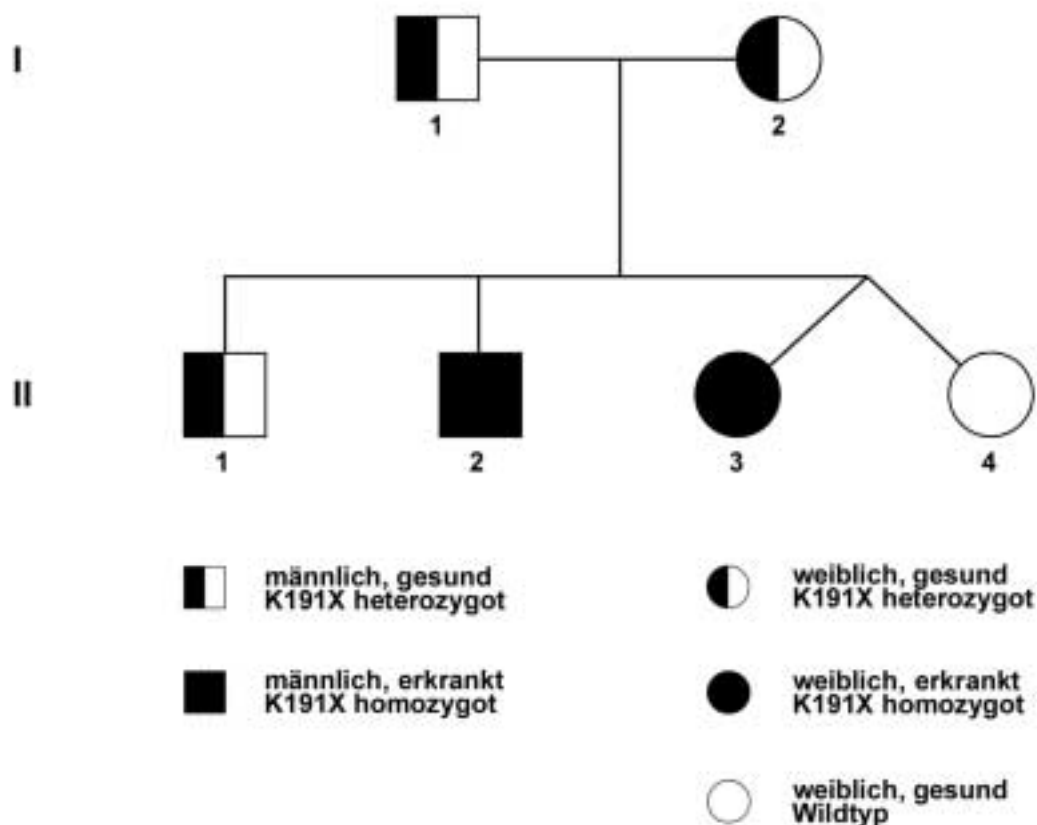


Abbildung 5: Stammbaum der Familie der Patienten G.S. und L.S..
 Eingetragen sind die Phäno- und Genotypen der einzelnen Familienmitglieder.

Exon 7 des E1 β -Gens:

Die Länge des untersuchten Fragments betrug 128 bp. Ein auffälliges SSCP-Bandenmuster fiel bei den Patienten S.O. und H.H. auf. Bei der folgenden Sequenzierung konnte bei Patient S.O. in homozygoter Form eine Transition von Thymin zu Cytosin in Position 752 der cDNS identifiziert werden (siehe Abbildung 6). Dieser Basenaustausch betrifft Kodon 201 (GTC→GCC) und bewirkt einen Aminosäureaustausch von Valin gegen Alanin (V201A). Bei der Untersuchung der Eltern von Patient S.O. konnte V201A sowohl beim Vater als auch bei der Mutter heterozygot nachgewiesen werden. Bei der Bestimmung der Nukleotidsequenz von Patient H.H. fand sich heterozygot in Position 832 der cDNS eine Transition von

Guanin zu Adenin. Dadurch wird Basentriplett 228 (GGC→AGC) verändert und kodiert anstatt für die Aminosäure Glycin für Serin. Es resultiert die Mutation G228S.

Patient S.O.: V201A homozygot
 Allel 1: TATAGGG**G**CTTCTTC
 Allel 2: TATAGGG**G**CTTCTTC
Wildtyp: TATAGGG**A**CTTCTTC

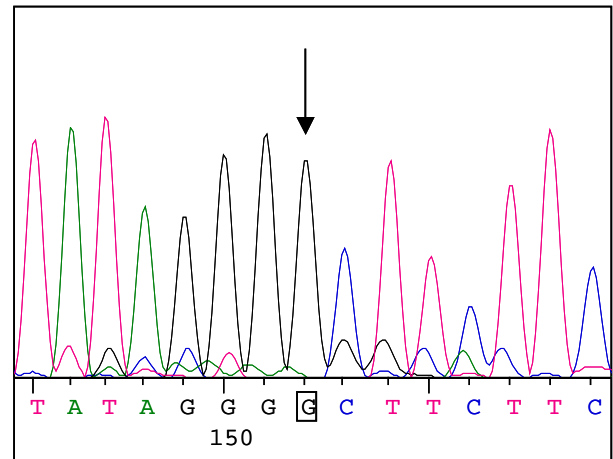


Abbildung 6: ABI-Sequenzierung der Mutation V201A in Exon 7 des E1β-Gens. Rechts ist das Chromatogramm der entsprechenden Region in Exon 7 des Patienten S.O. dargestellt. Links sind die veränderte Sequenz und die Wildtyp-Sequenz in reverser Richtung untereinander aufgeführt. Im Chromatogramm lässt sich in Position c.752 ausschließlich ein Ausschlag für die Base Guanin (umrahmt dargestellt) erkennen. Der Patient ist somit homozygot für V201A.

Exon 8 des E1β-Gens:

Das untersuchte Fragment für Exon 8 war 141 bp lang. Bei den Patienten L.W. und C.C. fiel ein auffallendes Laufverhalten in der SSCP-Analyse auf. Die anschließende Bestimmung der Basenabfolge erbrachte folgende Ergebnisse: Bei der Patientin L.W. fand sich heterozygot eine Transition von Thymin zu Cytosin in Position 848 der cDNS. Das hierdurch veränderte Basentriplett 233 (GTG→GCG) kodiert nicht mehr für die Aminosäure Valin, sondern für Alanin (V233A). Bei der Patientin C.C. konnte in Position 937 der cDNS eine homozygote Deletion eines Basenpaares (Guanin) identifiziert werden (c.937 delG). Dies führt zur Verschiebung des Leserasters bei der Translation und zur Synthese eines fehlerhaften Proteins ab Kodon 263 (GAC→_AC).

Exon 10 des E1 β -Gens:

Für Exon 10 wurde ein 216 bp langes Fragment untersucht. Ein auffälliges Bandenmuster in der SSCP-Analyse ergab sich bei der Patientin H.O.. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz zeigte einen Basenaustausch von Thymin gegen Adenin in Position 1149 der cDNS. Durch diese Transversion wird das normalerweise für Tyrosin kodierende Basentriplett 333 (TAT→TAA) zu einem Stopkodon (siehe Abbildung 7 und 8). Es resultiert die Mutation Y333X, die bei der Patientin homozygot vorliegt. Das entsprechende Protein ist um zehn Aminosäuren verkürzt.



Abbildung 7: SSCP-Analyse – Exon 10 des E1 β -Gens der Patientin H.O..

Aufgetragen wurde das Amplifikat der Patientin H.O.(Probe 1) und dreier Kontrollen als Wildtyp (Proben 2 bis 4). Man erkennt das abweichende Laufverhalten von Probe 1 („shift“).

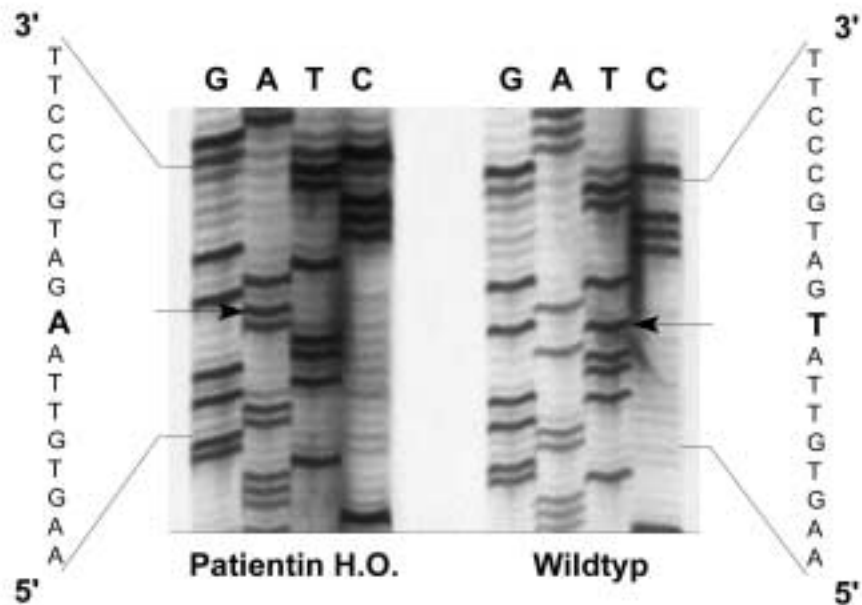


Abbildung 8: Radioaktive Sequenzierung – Mutation Y333X in Exon 10 des E1 β -Gens.

Auf der linken Seite ist die Basenabfolge der genomischen DNS der Patientin H.O. und auf der rechten Seite die einer gesunden Kontrolle abgebildet. Die Stelle der homozygoten Transversion (T→A) in Position 1149 der cDNS ist durch Pfeile gekennzeichnet.

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv waren mit dem dargestellten Methodenspektrum in den Exonen 2, 3 und 9 des E1 β -Gens keine Mutationen nachweisbar. Tabelle 7 fasst die Ergebnisse der Mutationsanalyse im E1 β -Gen bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit zusammen.

Tabelle 7: Mutationen im E1 β -Gen.

Patient	Phänotyp	Exon	Nukleotid- Ebene	Allele	mRNS/Protein- Ebene	Vater	Mutter	Ge- schwister
D.S.	k	1	c.166-167 insACTT	heteroz.	"Frameshift" ab Kodon 6	n.b.	n.b.	n.b.
L.G.	k	4	c.403 G>A	heteroz.	G85R (4)	n.b.	n.b.	n.b.
		5	c.595-596 delAG	heteroz.	"Frameshift" ab Kodon 149	n.b.	n.b.	n.b.
H.H.	v	5	c.595-596 delAG	heteroz.	"Frameshift" ab Kodon 149	n.b.	n.b.	n.b.
		7	c.832 G>A	heteroz.	G228S	n.b.	n.b.	n.b.
L.S.	k	6	c.721 A>T	homoz.	K191X	mt	mt	mt, wt
G.S.	k	6	c.721 A>T	homoz.	K191X	mt	mt	mt, wt
P.H.	v	6	c.730 T>C	heteroz.	Y194H	n.b.	n.b.	n.b.
S.O.	k	7	c.752 T>C	homoz.	V201A	mt	mt	n.b.
L.W.	v	8	c.848 T>C	heteroz.	V233A	n.b.	n.b.	n.b.
C.C.	k	8	c.937 delG	homoz.	"Frameshift" ab Kodon 263	n.b.	n.b.	n.b.
H.O.	k	10	c.1149 T>A	homoz.	Y333X	n.b.	n.b.	n.b.

k: klassisch

v: variant

heteroz.: heterozygot

homoz.: homozygot

mt: Eltern bzw. Geschwister sind heterozygot für die entsprechende Mutation

wt: Wildtyp

n.b.: nicht bestimmt, da kein Material zur Verfügung stand

3.2.3 Mutationen im E2-Gen

Exone 5-7 des E2-Gens:

Das untersuchte Fragment für Exon 5 war 341 bp lang, das für Exon 6 war 373 bp lang und die Länge des für Exon 7 untersuchten Fragments betrug 378 bp. In mehrfachen Versuchen unter unterschiedlichsten Bedingungen gelang es bei der Patientin M.B. nicht mittels Polymerasekettenreaktion die Fragmente für Exon 5, 6 und 7 zu amplifizieren. Die Amplifikation der Fragmente für Exon 4 und 8 war dagegen problemlos möglich. Dies legte den Verdacht auf eine Deletion im Bereich zwischen Intron 4 und Intron 7 nahe. Dieser Bereich überspannt eine Länge von maximal 21006 bp (21 Kb). Es stand kein Material zur Extraktion von mRNA und zur Erstellung von cDNA zur Verfügung, um einen möglichen Mutationsbereich einfach mittels konventioneller Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von cDNA eingrenzen zu können. Daher wurde unter mehrfacher Variation der jeweiligen Bedingungen der Versuch unternommen, sowohl mittels verschachtelter konventioneller Polymerasekettenreaktion als auch mittels sogenannter „Long-Range- Polymerasekettenreaktion“ (Verwendung von Expand-Systemen zur Amplifikation von Fragmenten von c.a 1000-20000 bp) das Ausmaß einer möglichen Deletion näher bestimmen zu können. Es gelang mit keiner der beiden PCR-Methoden spezifische Amplifikate zu erzeugen.

Intron 7 und Exon 8 des E2-Gens:

Das untersuchte Fragment für Exon 8 war 205 bp lang. Ein auffälliges Laufverhalten in der SSCP-Analyse zeigte sich bei der Patientin G.C.. In der folgenden Sequenzierung konnte eine homozygote Transition von Guanin zu Adenin in Position -1 (Intron 7) im Bereich der Spleißregion der Akzeptorstelle von Exon 8 identifiziert werden. Es resultiert die Mutation IVS7-1 G>A. Um das Vorliegen und gegebenenfalls das Ausmaß eines möglichen Fehlers beim Spleißen des primären Transkriptionsproduktes zu prüfen, wurde aus EDTA-Blut der Patientin und einer gesunden Kontrollperson reife mRNA extrahiert und anschließend zur Erstellung von cDNA eine reverse Transkription dieser mRNA durchgeführt. Danach wurde mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung eines 5'Primers aus Exon 7 und eines 3'Primers aus Exon 9 ein Exon-übergreifendes Fragment mit einer zu erwartenden Länge von 162 bp amplifiziert. Bereits bei der Kontrolle der Amplifikate in der

Agarosegelelektrophorese fiel bei der Patientin eine deutlich verkürzte Fragmentlänge im Vergleich zur Probe der gesunden Kontrolle auf (siehe Abbildung 9). Die sich anschließende Bestimmung der Basenabfolge zeigte eine homozygote Deletion des gesamten Exons 8 mit einer Länge von 78 bp bei der Patientin C.G. Es wurde somit ein auf 84 bp verkürztes Fragment der Patientin sequenziert. Dies führt zum Verlust der Kodons 253-278 ohne Konsequenz auf den Leserahmen folgender Exone und damit zum Verlust der entsprechenden 26 Aminosäuren im Protein.

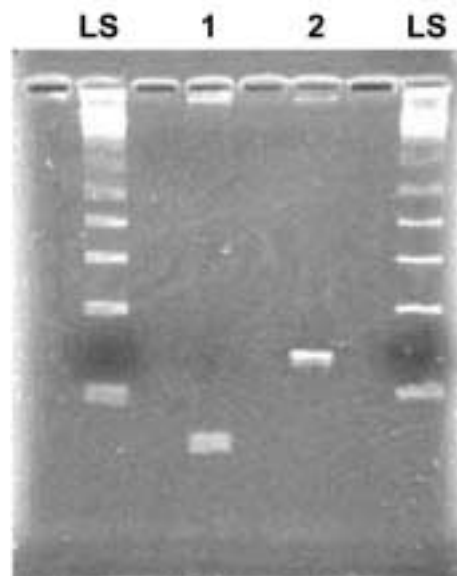


Abbildung 9: Agarosegelelektrophorese – cDNS des E2-Gens der Patientin G.C..

Aufgetragen wurde das Amplifikat der Patientin G.C. (Probe 1) und einer gesunden Kontrolle als Wildtyp (Probe 2). Aussen auf der rechten und linken Seite befindet sich jeweils ein mitgelaufener 123bp-Längenstandard. Man erkennt, dass die Probe der Patientin G.C. aufgrund ihrer geringeren Länge deutlich weiter gewandert ist. Die folgende Sequenzierung der Probe der Patientin ergab eine homozygote Deletion von 78 bp (Exon 8).

Exon 9 des E2-Gens:

Die Länge des untersuchten Fragments betrug 128 bp. Ein auffälliges Laufmuster in verschiedenen SSCP-Analysen fiel bei den Patienten A.M., M.M. und L.G. auf. Ferner zeigten zwei von fünf willkürlich gewählten gesunden Kontrollen das gleiche

SSCP-Bandenmuster wie die Patienten A.M. und L.G.. Bei der nachfolgenden Bestimmung der Nukleotidsequenz aller Proben konnte ein Basenaustausch von Guanin gegen Adenin in Position 1150 der cDNS nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10). Dadurch wird Basentriplett 323 (GGT→AGT) verändert und kodiert anstatt für die Aminosäure Glycin für Serin (G323S). Der Patient M.M. ist homozygot für G323S, die Patienten A.M. und L.G. sowie die beiden Kontrollen mit gleichem SSCP-Laufverhalten sind heterozygot für G323S und die restlichen drei Kontrollen weisen die Sequenz des Wildtyps in beiden Allelen auf.

Patient M.M.: G323S homozygot
 Allel 1: AGCTGAC^TCACAGAG
 Allel 2: AGCTGAC^TCACAGAG
Wildtyp: AGCTGAC^CCACAGAG

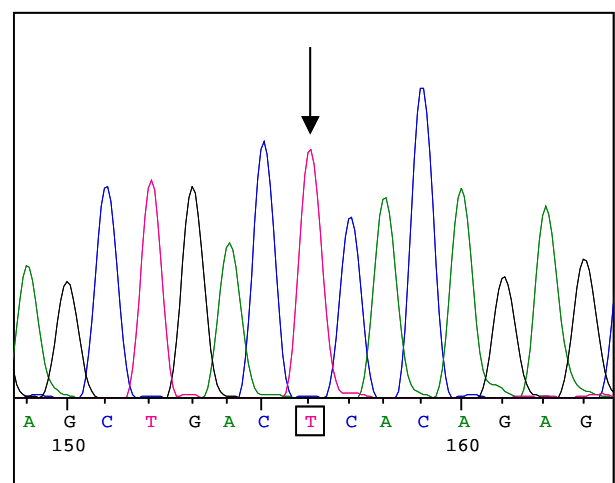


Abbildung 10: ABI-Sequenzierung der Mutation G323S in Exon 9 des E2-Gens. Rechts ist das Chromatogramm der entsprechenden Region in Exon 9 des Patienten M.M. dargestellt. Links sind die veränderte Sequenz und die Wildtyp-Sequenz in reverser Richtung untereinander aufgeführt. Im Chromatogramm lässt sich in Position c.1150 ausschließlich ein Ausschlag für die Base Thymin (umrahmt dargestellt) erkennen. Der Patient ist somit homozygot für G323S.

Exon 11 des E2-Gens:

Für Exon 11 wurde ein 273 bp langes Fragment untersucht. Ein auffälliges Bandenmuster in der SSCP-Analyse ergab sich bei dem Patienten S.T.. Die Sequenzierung dieses Fragments offenbarte zwei verschiedene jeweils heterozygote Mutationen des Patienten: In Position 1286 der cDNS fand sich eine Transversion von Thymin zu Adenin (siehe Abbildung 11). Diese betrifft das Protein in Position 368

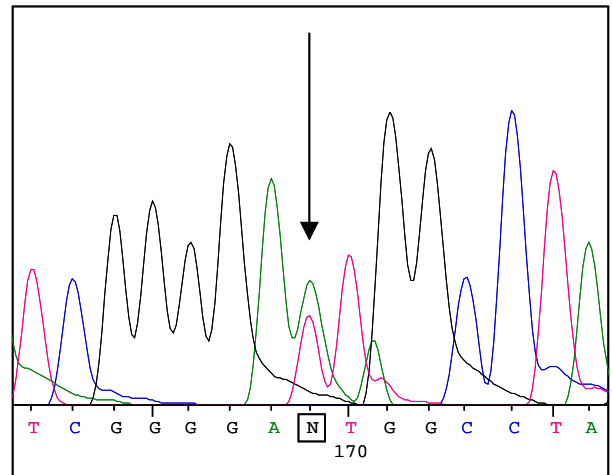
(ATT→AAT) und bewirkt einen Austausch der Aminosäure Isoleuzin gegen Asparagin (I368N). Als zweites Mutationsereignis konnte in Position 1336 der cDNS eine Transition von Guanin zu Adenin identifiziert werden (siehe Abbildung 11). Das hierdurch veränderte Basentriplett 385 (GTG→ATG) kodiert nicht mehr für die Aminosäure Valin, sondern für Methionin (V385M).

Patient S.T.: I368N heterozygot

Allel 1: TCGGGGAATGGCCTA

Allel 2: TCGGGGATGGCCTA

Wildtyp: TCGGGGAATGGCCTA



Patient S.T.: V385M heterozygot

Allel 1: CAGCTCACATTCATT

Allel 2: CAGCTCATATTCATT

Wildtyp: CAGCTCACATTCATT

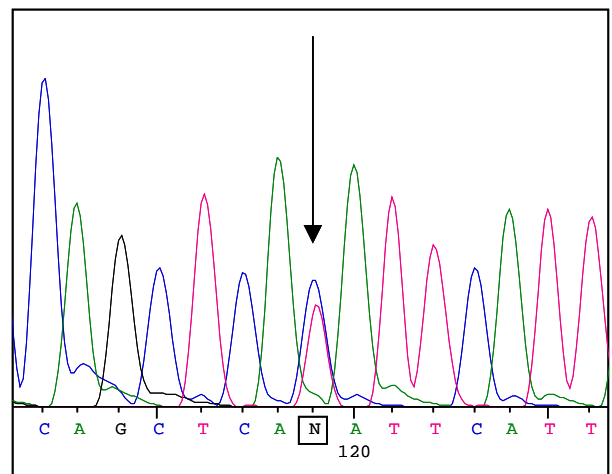


Abbildung 11: ABI-Sequenzierung der Mutationen I368N und V385M in Exon 11 des E2-Gens.

Rechts sind für beide Mutationen die Chromatogramme der entsprechenden Regionen in Exon 11 des Patienten S.T. dargestellt. Links sind die veränderten Sequenzen und die Wildtyp-Sequenzen in reverser Richtung jeweils untereinander aufgeführt. Im oberen Chromatogramm lässt sich in Position c.1286 sowohl ein Ausschlag für die Base Adenin als auch für die Base Thymin (als umrahmtes "N" dargestellt) erkennen. Der Patient ist somit heterozygot für I368N.

Im unteren Chromatogramm zeigt sich in Position c.1336 sowohl ein Ausschlag für die Base Cytosin als auch für die Base Thymin (als umrahmtes "N" dargestellt). Der Patient ist somit heterozygot für V385M.

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv waren mit dem dargestellten Methodenspektrum in den Exonen 1-7 und 10 des E2-Gens keine Mutationen nachweisbar. Tabelle 8 fasst die Ergebnisse der Mutationsanalyse im E2-Gen bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit zusammen.

Tabelle 8: Mutationen im E2-Gen.

Patient	Phänotyp	Exon (Intron)	Nukleotid- Ebene	Allele	mRNS/Protein- Ebene	Vater	Mutter	Ge- schwister
G.C.	k	8 (7)	IVS7-1 G>A	homoz.	Verlust Exon 8	n.b.	n.b.	n.b.
M.M.	k	9	c.1150 G>A	homoz.	G323S	n.b.	n.b.	n.b.
L.G.	k	9	c.1150 G>A	heteroz.	G323S	n.b.	n.b.	n.b.
A.M.	k	9	c.1150 G>A	heteroz.	G323S	n.b.	n.b.	n.b.
S.T.	v	11	c.1286 T>A	heteroz.	I368N	n.b.	n.b.	n.b.
		11	c.1336 G>A	heteroz.	V385M	n.b.	n.b.	n.b.

k: klassisch

v: variant

heteroz.: heterozygot

homoz.: homozygot

n.b.: nicht bestimmt, da kein Material zur Verfügung stand

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 24 Patienten mit Ahornsirup-Krankheit klinisch-biochemisch charakterisiert und molekulargenetisch untersucht. Bei 13 der 24 Patienten konnten in beiden Allelen für eines der drei in Frage kommenden Gene eine Mutation nachgewiesen werden. Bei sechs Patienten konnte nur ein verändertes Allel identifiziert werden. Bei fünf Patienten konnte jeweils in keinem der möglichen sechs Allele ein krankheitsrelevantes Mutationsereignis aufgedeckt werden. Insgesamt wurden 21 unterschiedliche Mutationen gefunden, davon sieben im E1 α -Gen, zehn im E1 β -Gen und vier im E2-Gen. Im E1 α -Gen zeigten sich ferner zwei unterschiedliche Polymorphismen.

Kürzlich veröffentlichte röntgenkristallographische Untersuchungen zur Struktur der menschlichen E1-Untereinheit (Heterotetramer $\alpha_2\beta_2$) der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase ermöglichen eine neue Dimension im Verständnis einzelner Mutationen bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit in ihren Auswirkungen auf die Struktur und Funktion des Multienzymkomplexes (Ævarsson et al. 2000). Abbildung 12 ist eine vergleichende Darstellung der Proteinprimärsequenzen der E1 α - und E1 β -Untereinheit von Mensch und *P. putida*. Die dort eingetragenen Sekundärstrukturelemente werden im weiteren für die Diskussion einzelner Mutationen von großer Bedeutung sein.

Im Gegensatz zur E1-Untereinheit des Multienzymkomplexes der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase ist bislang keine der drei Domänen der menschlichen E2-Untereinheit (Homopolymer α_{24}) in ihrer dreidimensionalen Kristallstruktur aufgeklärt.

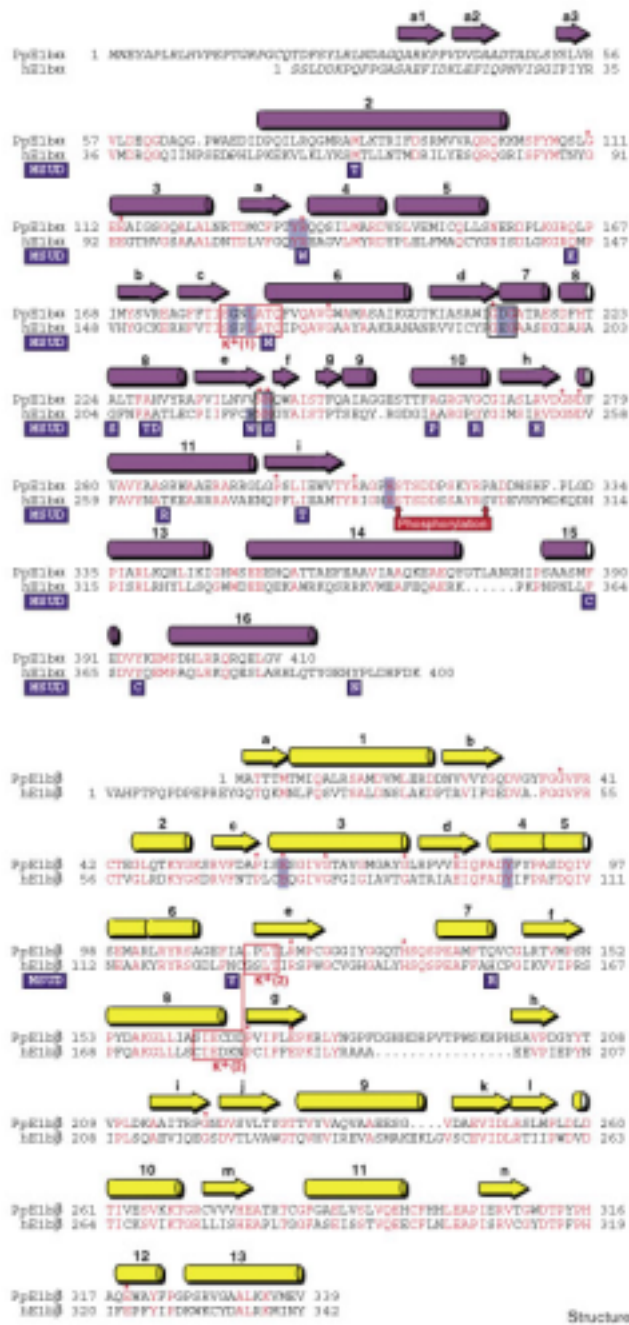


Abbildung 12: Vergleich der Proteinsequenzen der E1 α - und E1 β -Untereinheit von Mensch und *P. putida* (aus *Ævarsson et al. 2000*).

Rot dargestellte Aminosäurereste sind in beiden Sequenzen identisch, schwarz dargestellte Reste sind nicht identisch. Kursiv dargestellte Sequenzabschnitte zeigen in beiden Sequenzen eine sehr unterschiedliche Konformation. Die Sekundärstrukturelemente sind über den Aminosäuren eingetragen: Zylinder stehen für α -Helices und Pfeile für β -Faltblattstrukturen (violett in der α -Untereinheit, gelb in der β -Untereinheit). Wichtige Reste für die Bindung des Cofaktors TPP sind schattiert, das gemeinsame Sequenzmotiv der Familie der TPP-abhängigen Enzyme ist schwarz und wichtige Regionen für die Bindung von Kaliumionen sind rot eingrahmt. Bekannte die Erkrankung verursachende Mutationen sind unter der Sequenz blau dargestellt.

4.1 Mutationen im E1 α -Gen (Typ IA)

Bis Mitte 2002 wurden im E1 α -Gen bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit weltweit 22 verschiedene Mutationen beschrieben (Chuang und Shih 2001). 16 Mutationen (73%) sind Missense-Mutation infolge eines einzelnen Basenaustausches. In einem Fall kommt es aufgrund einer punktmutationsbedingten Veränderung einer Spleißregion zum Verlust der genetischen Information eines gesamten Exons. Drei der beschriebenen Mutationsereignisse sind Deletionen oder Insertionen und führen zur Verschiebung des Leserasters bei der Translation. In zwei Fällen handelt es sich um eine Nonsense-Mutation. Die Verteilung der Mutationen zeigt keine Clusterbildung in bestimmten Abschnitten des Gens. Die Mehrzahl der Mutationen vom Typ IA wurde nur bei einzelnen betroffenen Patienten nachgewiesen.

Besonders hervorzuheben ist daher die Missense-Mutation Y393N. Diese tritt mit ungewöhnlich hoher Frequenz in homozygoter Form innerhalb der Inzucht-Population der Mennoniten Nordamerikas auf, in der die Inzidenz der Ahornsirup-Krankheit mit 1:176 Lebendgeborenen deutlich überdurchschnittlich ausfällt (Marshall und DiGeorge 1981; Matsuda et al. 1990; Fisher et al. 1991a). Dies legt den Verdacht auf das Vorliegen eines sogenannten „Founder-Effekts“ nahe. Von ebenfalls erhöhter ethnischer Bedeutung scheint die Missense-Mutation G245R zu sein, die bei mehreren nicht verwandten Patienten hispanisch-mexikanischen Ursprungs mit einer varianten Verlaufsform der Ahornsirup-Krankheit in jeweils beiden Allelen nachgewiesen werden konnte (Chuang et al. 1995). Darüber hinaus finden sich mit relativ erhöhten Allelfrequenzen noch vier weitere Punktmutationen vom Typ IA (R114W, Q145K, A208T, I281T) innerhalb der japanischen Bevölkerung (Nobukuni et al. 1993).

Die homozygot bei australischen Poll-Hereford-Kälbern mit einem der Ahornsirup-Krankheit ähnlichen Krankheitsbild gefundene Nonsense-Mutation Q(-6)X ist die bislang einzig beschriebene Veränderung innerhalb der sogenannten Mitochondrieneintrittssequenz (Zhang et al. 1990).

Von sechs Ausnahmen abgesehen, verursachen alle bislang aus der Literatur bekannten Mutationen vom Typ IA die schwere klassische Verlaufsform der Erkrankung.

In der vorliegenden Arbeit wurden 48 Allele des E1 α -Gens von Patienten mit Ahornsirup-Krankheit untersucht. Dabei wurden sieben unterschiedliche Mutationen

in insgesamt 13 Allelen nachgewiesen. Fünf der sieben nachgewiesenen Mutationen sind Missense-Mutationen, die in ihrer Lokalisation über das gesamte Gen verteilt liegen. In zwei Fällen handelt es sich um Nonsense-Mutationen. Vier der sieben Mutationen sind bereits aus der Literatur bekannt, darunter die sogenannte Mennoniten-Mutation Y393N. Drei der nachgewiesenen Mutationen wurden bislang noch nicht beschrieben: P(-7)H, T106M und W309X. Ferner fanden sich unter den Patienten in insgesamt 18 Allelen zwei verschiedene Polymorphismen: F279F und L362L.

Im folgenden sollen die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Mutationen und Polymorphismen einzeln diskutiert werden:

P(-7)H:

Diese Missense-Mutation wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

P(-7)H führt zum Austausch des neutralen Prolins mit seiner unpolaren Seitenkette gegen das positiv geladene Histidin mit seiner polaren Seitenkette. Diese Mutation liegt im Bereich der Mitochondrieneintrittssequenz. Vergleichende Studien der Aminosäureprimärsequenzen der E1 α -Untereinheiten von Mensch, Maus, Ratte und Rind zeigen durchgängig prozentual niedrigere Homologien im Bereich der Mitochondrieneintrittssequenz (bis Kodon -1: 64-72%) als im Bereich des reifen Peptids (ab Kodon +1: 94-96%) (Zhang et al. 1987; Hu et al. 1988; McKean et al. 1992; Chuang et al. 1993; Costeas und Chinsky 1996). Der Bereich des reifen Peptids erscheint daher höher konserviert zu sein als der Bereich der Mitochondrieneintrittssequenz. Analysen zur Hydrophobizität der Mitochondrieneintrittssequenzen des E1 α -Proteins von Mensch, Maus und Ratte zeigen jedoch ein sehr ähnliches Muster (Costeas und Chinsky 1996). Prolin (-7) liegt innerhalb der Mitochondrieneintrittssequenz zwar zwischen zwei unter den oben genannten Spezies hoch konservierten Regionen (siehe Abbildung 13). Prolin (-7) selbst zeigt jedoch bei Vergleich der entsprechenden Aminosäureposition innerhalb der Präsequenzen von Mensch, Maus, Ratte und Rind eine erhebliche Varianz (siehe Abbildung 13). So befindet sich an entsprechender Stelle bei Maus und Ratte ein polarer Serinrest. Beim Rind liegt dort sogar ein Histidinrest, was somit dem beschriebenen Mutationsereignis P(-7)H entspricht.

Grundsätzlich stellt sich bei einer solchen Missense-Mutation in der Region der Mitochondrieneintrittssequenz die Frage, inwieweit dies zu einem fehlerhaften bzw.

ausbleibenden Import des gesamten Peptids ins Mitochondrium führt. Bislang wurde bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit noch kein weiteres vergleichbares Mutationseignis beschrieben. Die bei Poll-Hereford-Kälbern nachgewiesene Nonsense-Mutation Q(-6)X im Bereich der Mitochondrieneintrittssequenz ist, da sie durch Schaffung eines vorzeitigen Stop-Signals zu einem verkürzten Protein führt, zum Vergleich nicht geeignet (Zhang et al. 1990). Zwar ist eine mögliche Auswirkung von P(-7)H auf den mitochondrialen Import der E1 α -Untereinheit letztlich nur durch detaillierte Funktionsstudien zu widerlegen. Die oben dargelegten vielfältigen Vergleiche der Primärsequenzen legen jedoch die starke Vermutung nahe, dass P(-7)H keine funktionellen Auswirkungen auf den mitochondrialen Import der Prä-E1 α -Untereinheit hat. Darüber hinaus kann weiter in diesem Sinne in Hinblick auf die Sekundärstruktur der Mitochondrieneintrittssequenz argumentiert werden, dass eine mögliche α -Helix unterbrechende oder β -Schleifen bildende Wirkung von Prolin (-7) sicherlich durch den zweiten hochkonservierten Prolinrest in Kodonposition (-8) in ausreichendem Maße aufrechterhalten werden kann (siehe Abbildung 13). Die Missense-Mutation P(-7)H wurde bei drei Patienten (S.K., L.G., S.T.) unterschiedlicher ethnischer Herkunft jeweils heterozygot nachgewiesen. Bei zwei dieser Patienten (L.G., S.T.) liegen zudem für die Erkrankung verantwortliche Mutationen in den Genen für die beiden anderen Untereinheiten des Enzymkomplexes vor. Die Patienten S.K. und L.G. leiden an einer klassischen, S.T. an einer varianten Verlaufsform.

SAAKIWRPSRGLRQAALLLLGRPGARGLARFHP	SR - QQQQ - Q	Ratte
: :	: : : : : : : : : : : : : : : : : : : :	
MSAAKIWRPSRGLRQAALLLLGRSGVRGLARSH	SR - QQQQ - Q	Maus
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : :	: : : : : : : : : : : : : : : : : : : :	
MAVAIAAARVWRLNRGLSQAALLLLRQPGARGLARSH	PR - QQQQ - F	Mensch
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : :	: : : : : : : : : : : : : : : : : : : :	
MQGSAKMAMAVAVAVARVWTPSRGLGRTGLPLLRLLGARGLARFHP	HRWQQQQHF	Rind

Abbildung 13: Vergleich der Mitochondrieneintrittssequenzen der E1 α -Untereinheit von Ratte, Maus, Mensch und Rind.

Identische Aminosäurereste der vier Spezies sind durch Doppelpunkte verbunden. Der menschliche Prolinrest (-7) und die korrespondierende Position bei Ratte, Maus und Rind sind eingerahmt, der menschliche Prolinrest (-8) und die korrespondierende Position der anderen drei Spezies ist kursiv gedruckt.

T106M:

Diese Missense-Mutation wurde erstmals 1998 von unserer Arbeitsgruppe bei einem Patienten türkischer Herkunft in einem Allel beschrieben (Henneke et al. 1998, Dursun et al. 2002). Die hier betroffene Aminosäure ist zwischen Mensch, Ratte, Maus, Rind und *Pseudomonas putida* als prokaryontem Vertreter konserviert (Zhang et al. 1987; Hu et al. 1988; Dariush et al. 1991; Costeas und Chinsky 1996; *Æ*Evarsson et al. 2000). T106M bedingt den Austausch von Threonin gegen Methionin in Kodonposition 106. Threonin 106 liegt in Hinblick auf die Sekundärstruktur des Polypeptids im Bereich des Verbindungspunktes zwischen α -Helix 3 und β -Faltblatt a, die Teil des hydrophoben Kerns der Hauptdomäne der E1 α -Untereinheit sind (*Æ*Evarsson et al 2000). Dieser Verbindungspunkt besteht aus drei Aminosäureresten in den Kodonpositionen 104 bis 106. Bei Mensch, Ratte, Maus, Rind und *Pseudomonas putida* finden sich an den korrespondierenden Stellen von Kodon 105 und 106 ausschließlich hydrophile Aminosäurereste mit polaren Seitenketten (Zhang et al. 1987; Hu et al. 1988; Dariush et al. 1991; Costeas und Chinsky 1996; *Æ*Evarsson et al. 2000). Daher ist dieses gesamte Verbindungsstück als funktionell hoch konserviert zu bezeichnen. Dieser hohe Grad der Konservierung legt nahe, dass ein Austausch der kleinen polaren Seitenkette des Threonins in Kodonposition 106 gegen eine größere unpolare schwefelhaltige Seitenkette des Methionins Auswirkungen auf die Gesamtkonformation des hydrophoben Kerns der Hauptdomäne der E1 α -Untereinheit und damit letztlich auf die gesamte Enzymaktivität haben könnte.

T106M wurde bei dem Patienten S.O. mit klassischer Ahornsirup-Krankheit in einem Allel nachgewiesen. Die Untersuchung der konsanguinen Eltern türkischer Herkunft offenbarte das betroffene Allel als von der Mutter ererbt. Darüber hinaus zeigte sich bei diesem Patienten eine krankheitsrelevante homozygote Mutation im E1 β -Gen. Inwieweit das Zusammenspiel der drei betroffenen Allele einen Anteil am Zustandekommen des Phänotyps hat, ist nur durch detaillierte Funktionsstudien zu den beiden einzelnen Mutationen zu klären.

A240P:

Diese Missense-Mutation bedingt die Substitution der Aminosäure Alanin in Position 240 durch die heterozyklische Iminosäure Prolin. Alanin 240 ist zwischen Mensch, Ratte, Maus, Rind und *Pseudomonas putida* konserviert (Zhang et al. 1987; Hu et al.

1988; Dariush et al. 1991; Costeas und Chinsky 1996; Ævarsson et al. 2000). Wynn et al. untersuchten im Rahmen von Expressionsstudien in *E.coli* die Auswirkungen einiger Missense-Mutationen vom Typ IA auf die Zusammenlagerung der von der jeweiligen Mutation betroffenen E1 α -Untereinheiten mit intakten E1 β -Untereinheiten zum E1-Heterotetramer $\alpha_2\beta_2$ (Wynn et al. 1998). Dabei ergab sich für die A240P Mutation bei der Aggregation der Untereinheiten im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verlangsamte Kinetik. Das rekombinante von A240P betroffene E1-Protein zeigt im Vergleich zum Wildtyp keinerlei enzymatische Aktivität. Der dieser Untersuchung zugrundeliegende Patient mit klassischer Ahornsirup-Krankheit ist heterozygot für A240P und trägt im zweiten Allel die Missense-Mutation Y393N.

Die Arbeitsgruppe um Ævarsson konnte auf der Grundlage ihrer kristallographischen Röntgenstrukturanalyse der gesamten E1-Untereinheit A240P schließlich einer Gruppe von Missense-Mutationen zuordnen, die die Verbindungen der vier Untereinheiten miteinander innerhalb des E1-Heterotetramers ($\alpha_2\beta_2$) beeinträchtigen (Ævarsson et al. 2000). Dabei betrifft die Mutation A240P die Kontaktfläche zwischen den beiden E1 α -Untereinheiten (α - α') innerhalb des Heterotetramers (siehe Abbildung 14). Diese Kontaktfläche wird im Inneren des Tetramers zum größten Teil durch die beiden α -Helices 10 (Reste Glycin 238 bis Tyrosin 246) der beiden E1 α -Untereinheiten gebildet. Die Aminosäure Alanin in Position 240 ist Teil eines ausgedehnten Netzwerkes von Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen, das durch präzise Positionierung von α -Helix 10 die regelrechte Konformation der α - α' -Kontaktfläche und so die Zusammenlagerung zu einem aktiven Heterotetramer sicherstellt. Dabei bildet die Aminogruppe von Alanin 240 eine stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung mit der negativ geladenen Seitenkette der Glutaminsäure in Position 282 aus. Der Austausch von Alanin gegen Prolin in Position 240 unterbricht aufgrund der Elimination der freien Aminogruppe des Alanins am Beginn von α -Helix 10 diese Wasserstoffbrückenbindung. Zudem verhindert Prolin in Position 240 aufgrund sterischer Hindernisse die Ausbildung einer weiteren Wasserstoffbrückenbindung zwischen Glutaminsäure 282 und Isoleuzin 239.

A240P konnte bei der italienischstämmigen Patientin C.S. mit klassischer Ahornsirupkrankheit in beiden Allelen nachgewiesen werden und ist daher als krankheitsverursachend anzusehen.

R242X:

Durch diese Nonsense-Mutation entsteht durch vorzeitigen Abbruch der Translation eine um 159 carboxyterminale Aminosäuren verkürzte E1 α -Untereinheit. R242X wurde erstmals als Ursache mehrerer Fälle von Ahornsirup-Krankheit innerhalb einer Inzuchtpopulation von Beduinen im Süden Israels beschrieben (Chinsky et al. 1998). Die Arbeitsgruppe um Chinsky konnte zeigen, dass sich in R242X tragenden Zellen keine die E1 α -Untereinheit kodierende mRNA nachweisen lässt. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen zahlreicher Arbeiten zur Ahornsirup-Krankheit und zu anderen Erkrankungen, die alle einen durch Nonsense-Mutationen bedingten deutlich herabgesetzten Gehalt an mRNA beschrieben (Baserga und Benz 1988; Zhang et al. 1990; Fisher et al. 1993; Chuang et al. 1994). Die Ursache hierfür wird in der vorzeitigen Degradierung der „nackten“ mRNA, die aufgrund des mutationsbedingten verfrühten Abbruchs der Translation rasch von den Ribosomen dissoziiert, durch endogene Nukleasen gesehen (Daar und Maquat 1988). Daher ist davon auszugehen, dass R242X aufgrund deutlich erniedrigter mRNA Konzentrationen auch zu einer deutlich eingeschränkten Synthese des verkürzten E1 α -Proteins führt. Davon abgesehen betrifft die durch R242X bedingte Verkürzung der E1 α -Untereinheit in Hinblick auf die Kristallstruktur des gesamten E1-Proteins für die Enzymfunktion völlig unerlässliche Bereiche (Ævarsson et al. 2000). Dies umfasst große Teile der Hauptdomäne einschließlich der für die Regulation der Aktivität des gesamten Multienzymkomplexes notwendigen Serinreste (Position 292, 302) und die gesamte kleine C-terminale Domäne (Reste 356 bis 400). Diese ist für die Zusammenlagerung zum Heterotetramer unverzichtbar, wie zahlreiche Missense-Mutationen in diesem Bereich belegen.

R242X konnte bei der an klassischer Ahornsirup-Krankheit leidenden Patientin B.A. homozygot nachgewiesen werden. Sie ist türkischer Abstammung und ihre Eltern sind als Cousine/Cousin 1. Grades konsanguin. Die Mutter der Patientin stammt selbst aus konsanguiner Ehe, neun Geschwister der Mutter sind kurz nach der Geburt in der Türkei verstorben. Eine ähnliche Familienanamnese ist für den Beduinenstamm, in dem diese Mutation erstmals nachgewiesen wurde, beschrieben. Das Auftreten von R242X bei unserer Patientin zeigt, dass diese Nonsense-Mutation auch ausserhalb dieser eng begrenzten ethnischen Gruppe anzutreffen ist.

G245R:

Diese Mutation ersetzt in Position 245 die kleine unpolare Seitenkette des Glycins gegen die große geladene Seitenkette des Arginins. Glycin 245 ist zwischen Mensch, Ratte, Maus, Rind und *Pseudomonas putida* konserviert (Zhang et al. 1987; Hu et al. 1988; Dariush et al. 1991; Costeas und Chinsky 1996; Ævarsson et al. 2000). G245R wurde erstmals jeweils homozygot bei drei nicht verwandten hispanisch-mexikanischen Patienten mit varianter intermediärer Verlaufsform der Ahornsirup-Krankheit beschrieben (Chuang et al. 1995). In zwei unterschiedlichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass G245R die Zusammenlagerung der E1 α - und β -Untereinheiten zum E1-Heterotetramer ($\alpha_2\beta_2$) beeinträchtigt (Chuang et al. 1995, Wynn et al. 1998). Unter Berücksichtigung der Kristallstruktur der E1-Komponente lässt sich G245R genauso wie A240P in eine Gruppe von Missense-Mutationen einordnen, die die Verbindungen der vier Untereinheiten miteinander innerhalb des E1-Heterotetramers ($\alpha_2\beta_2$) beeinflussen (Ævarsson et al. 2000). Der kleine Glycinrest in Position 245 ist Teil der beiden α -Helices 10, die den größten Teil der α - α' -Kontaktfläche bilden (siehe Abbildung 14). Dieser Rest erlaubt eine enge Verbindung der beiden E1 α -Untereinheiten innerhalb des Heterotetramers. Der Austausch dieses Glycins gegen Arginin mit seiner großen Seitenkette durch G245R verhindert die Möglichkeit eines solch engen Kontaktes. Offenbar kann dennoch eine wenn auch nicht ganz regelrechte Zusammenlagerung zum Heterotetramer stattfinden, die eine geringe enzymatische Restaktivität ermöglicht und so zu einem milderem intermediären klinischen Phänotyp führt. Als enzymatische Restaktivität des von G245R betroffenen rekombinanten E1-Proteins wird ein Wert von 2,66% der Norm angegeben (Chuang et al. 1995, Wynn et al. 1998). Die enzymatische Restaktivität in Fibroblastenkulturen von Patienten, die homozygot für G245R sind, wird mit Werten zwischen 4,0 und 5,6% der Norm beziffert (Chuang et al. 1995).

G245R konnte bei der türkischstämmigen Patientin D.K. in beiden Allelen nachgewiesen werden und ist daher als krankheitsverursachend anzusehen. Der klinisch-biochemische Phänotyp unserer Patientin stimmt mit dem beschriebenen Phänotyp der drei hispanisch-mexikanischen Patienten im Wesentlichen überein. Auch die Patientin D.K. leidet an einer intermediären Verlaufsform der Ahornsirup-Krankheit. Die bei ihr ermittelte Restenzymaktivität in der Fibroblastenkultur beläuft sich auf Werte zwischen 2 und 3% der Norm. Der Nachweis von G245R bei der

Patientin D.K. zeigt, dass diese Missense-Mutation auch ausserhalb der hispanisch-mexikanischen Bevölkerung auftritt.

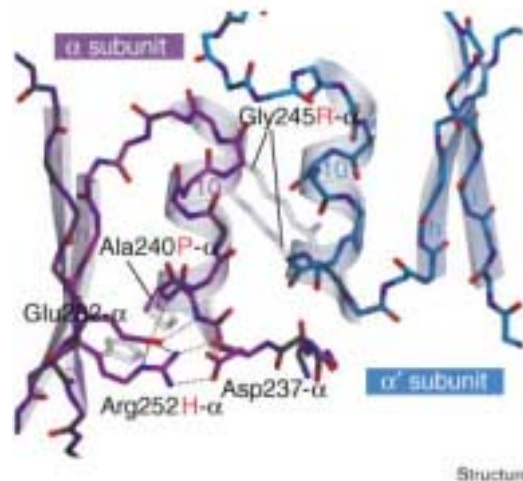


Abbildung 14: Auswirkungen der Missense-Mutationen A240P und G245R auf das Zusammenspiel der beiden E1 α -Untereinheiten (α - α') innerhalb des E1-Heterotetramers (modifiziert aus \AA Evansson et al. 2000).

A240P beeinträchtigt das Netzwerk von Bindungen zwischen geladenen Gruppen am N-Terminus von α -Helix 10. Diese Wechselwirkungen sind für die exakte Position der beiden Helices zueinander und für die regelrechte Konformation der α - α' -Kontaktfläche von großer Bedeutung. G245R bewirkt den Einbau einer großen geladenen Seitenkette an einer Stelle, an der eine kleine Seitenkette zur Herstellung einer engen Verbindung der beiden α -Helices α_{10} und α_{10}' benötigt wird.

W309X:

Diese Nonsense-Mutation wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen. W309X führt durch vorzeitigen Abbruch der Translation zu einer um 92 carboxyterminale Aminosäuren verkürzten E1 α -Untereinheit. Wie bereits zur Mutation R242X oben diskutiert, konnte von verschiedenen Autoren in unterschiedlichen Fällen gezeigt werden, dass Nonsense-Mutationen zu einem deutlich herabgesetzten Gehalt an mRNA für das betroffene Protein führen können (Baserga und Benz 1988; Zhang et al. 1990; Fisher et al. 1993; Chuang et al. 1994

Chinsky et al. 1997). Gleiches ist im Falle der Nonsense-Mutation W309X anzunehmen. Auch W309X dürfte aufgrund einer erniedrigten Konzentration an mRNA zu einer deutlich eingeschränkten Synthese der verkürzten E1 α -Untereinheit führen. Darüber hinaus betrifft die durch W309X bedingte Verkürzung des E1 α -Proteins in Hinblick auf die Kristallstruktur der gesamten E1-Komponente für die Enzymfunktion völlig unerlässliche Bereiche (Ævarsson et al. 2000). Dies umfasst Teile der Hauptdomäne und die gesamte kleine C-terminale Domäne (Reste 356 bis 400). Diese ist für die Zusammenlagerung zum enzymatisch aktiven Heterotetramer unverzichtbar, wie zahlreiche Missense-Mutationen in diesem Bereich belegen.

W309X fand sich bei der von der klassischen Form der Ahornsirup-Krankheit betroffenen Patientin J.W. heterozygot. Trotz direkter Sequenzierung der übrigen acht Exone des E1 α -Gens konnte kein zweites mutiertes Allel identifiziert werden. Als Gründe hierfür sind verschiedene Aspekte in Erwägung zu ziehen. Obgleich eine krankheitsrelevante Bedeutung von W309X per se unbestritten sein dürfte, so könnten dennoch im Falle der Patientin J.W. Mutationsereignisse in folgenden Bereichen für die Erkrankung primär verantwortlich sein: nicht untersuchte Abschnitte des E1 α -, E1 β und E2-Gens, untersuchte Abschnitte des E1 β und E2-Gens sowie schließlich die nicht untersuchten Gene der die Aktivität des gesamten Enzymkomplexes regulierenden Kinase und Phosphatase. Unter die nicht untersuchten Abschnitte des E1 α -, E1 β - und E2-Gens fallen die jeweiligen regulatorischen Promotorregionen der drei Gene und die zwischen den untersuchten Exonen liegenden großen Intronbereiche. In den Promotorregionen der drei Gene wurden in der Literatur bislang noch keine die Erkrankung verursachenden Mutationsereignisse beschrieben. Für die Intronbereiche wurden bereits mehrfach den korrekten Spleißvorgang der unreifen Prä-mRNA beeinträchtigende Mutationen nachgewiesen, darunter eine 3,2 kb große Deletion in Intron 4 des E2-Gens mit der Folge einer spleißingbedingten 17bp großen Insertion in der reifen mRNA der E2-Untereinheit (Chuang et al. 1997; Tsuruta et al. 1998). Nicht erfasste Mutationsereignisse der untersuchten Abschnitte im E1 β und E2-Gen sind als methodenbedingt zu betrachten. Zu diesem Aspekt sei auf den Abschnitt 4.6 „Überlegungen zur Methodik“ verwiesen. Für die nicht untersuchten Gene der spezifischen Kinase und Phosphatase wurden bislang noch keine krankheitsrelevanten Mutationen beschrieben.

Y393N:

Bei dieser Mutation handelt es sich um die sogenannte Mennoniten-Mutation. Y393N führt zur Substitution der aromatischen Seitenkette des Tyrosins durch die deutlich kleinere nicht aromatische Seitenkette des Asparagins. Tyrosin 393 ist zwischen Mensch, Ratte, Maus, Rind und *Pseudomonas putida* konserviert (Zhang et al. 1987; Hu et al. 1988; Dariush et al. 1991; Costeas und Chinsky 1996; Ævarsson et al. 2000). Zhang et al. beschrieben diese Mutation erstmals 1989 in einem Allel eines Patienten mit klassischer Ahornsirup-Krankheit (Zhang et al. 1989). Weitere Untersuchungen konnten Y393N bei nordamerikanischen Mennoniten homozygot nachweisen, in deren Inzucht-Population die klassische Ahornsirup-Krankheit mit einer stark erhöhten Inzidenz von 1:176 Lebendgeborenen auftritt (Marshall und DiGeorge 1981; Matsuda et al. 1990; Fisher et al. 1991a; Fisher et al. 1991b; Mitsubuchi et al. 1992). Y393N beeinträchtigt die Zusammenlagerung der E1 α - und β -Untereinheiten zum E1-Heterotetramer ($\alpha_2\beta_2$) (Matsuda et al. 1990; Fisher et al. 1991a; Fisher et al. 1991b; Wynn et al. 1998). Ævarsson et al. ordneten in ihrer Arbeit zur Kristallstruktur der E1-Komponente Y393N in die Gruppe der zuvor diskutierten Missense-Mutationen A240P und G245R ein, die die Verbindungen der Untereinheiten innerhalb des Heterotetramers beeinflussen (Ævarsson et al. 2000). Die Mutation ist im Bereich der kleinen C-terminalen Domäne (Reste 356 bis 400) lokalisiert, die mit beiden β -Untereinheiten (β und β') in Verbindung steht. Innerhalb dieser Domäne befindet sich eine Reihe aromatischer Aminosäuren, die enge Wechselwirkungen mit einer Reihe aromatischer Aminosäuren der β' -Untereinheit eingehen. Tyrosin 393 ist einer dieser aromatischen Reste und bildet, eingebettet zwischen den aromatischen Resten Tryptophan 330 und Phenylalanin 324 der β' -Untereinheit, über seine Hydroxylgruppe Wasserstoffbrückenbindungen zu den Seitenketten von Asparaginsäure 328 der β' -Untereinheit und Histidin 385 der α -Untereinheit aus. Der Austausch von Tyrosin in Position 393 gegen Asparagin mit seiner deutlich kleineren Seitenkette kann diese ausgedehnten Wechselwirkungen im Sinne eines stabilen Heterotetramers nicht aufrechterhalten.

Aus zahlreichen biochemischen Funktionsstudien und der Strukturanalyse des E1-Proteins ergibt sich ein Bild des wahrscheinlichen Ablaufs der Zusammenlagerung der vier Untereinheiten zum stabilen E1-Heterotetramer *in vivo* (siehe Abbildung 15): Ausgehend von vier einzelnen Untereinheiten, kommt es über die Bildung zweier

intermediärer Heterodimere $\alpha\beta$ und $\alpha'\beta'$ zur Zusammenlagerung zum Heterotetramer $\alpha_2\beta_2$. Die Missense-Mutation Y393N blockiert diesen Vorgang auf der Stufe der Heterodimere und verhindert die Aggregation zum stabilen Heterotetramer, da die Kontaktfläche zwischen der α und β' -Untereinheit betroffen ist (Wynn et al. 1998; *Ævarsson et al. 2000*).

Bei dem deutschen Patienten M.M. mit klassischer Ahornsirup-Krankheit konnte Y393N homozygot nachgewiesen werden. Die Eltern des Patienten sind konsanguin. Der hohen Frequenz der Y393N Mutation in homozygoter Form bei den Mennoniten liegt ein sogenannter „Founder-Effekt“ zugrunde (Marshall und DiGeorge 1981; Fisher et al. 1991a). Die Stammbäume der betroffenen Mennoniten lassen sich auf wenige Emigranten im 17. und 18. Jahrhundert aus Deutschland und der Schweiz zurück verfolgen (Auerbach und DiGeorge 1973; Marshall und DiGeorge 1981). In zahlreichen Fällen konnte Y393N auch in einem Allel von Erkrankten anderer ethnischer Herkunft nachgewiesen werden, obgleich die Region um Tyrosin 393 keine Kriterien eines „Hot Spots“ für Mutationen erfüllt (Fisher et al. 1991a; Parrella et. al 1994). Daher kann der Ursprung der Mutation im Falle unseres Patienten sowohl in einer entfernten Verwandtschaft zu den oben erwähnten Emigranten als auch in einem unabhängigen Ereignis liegen.

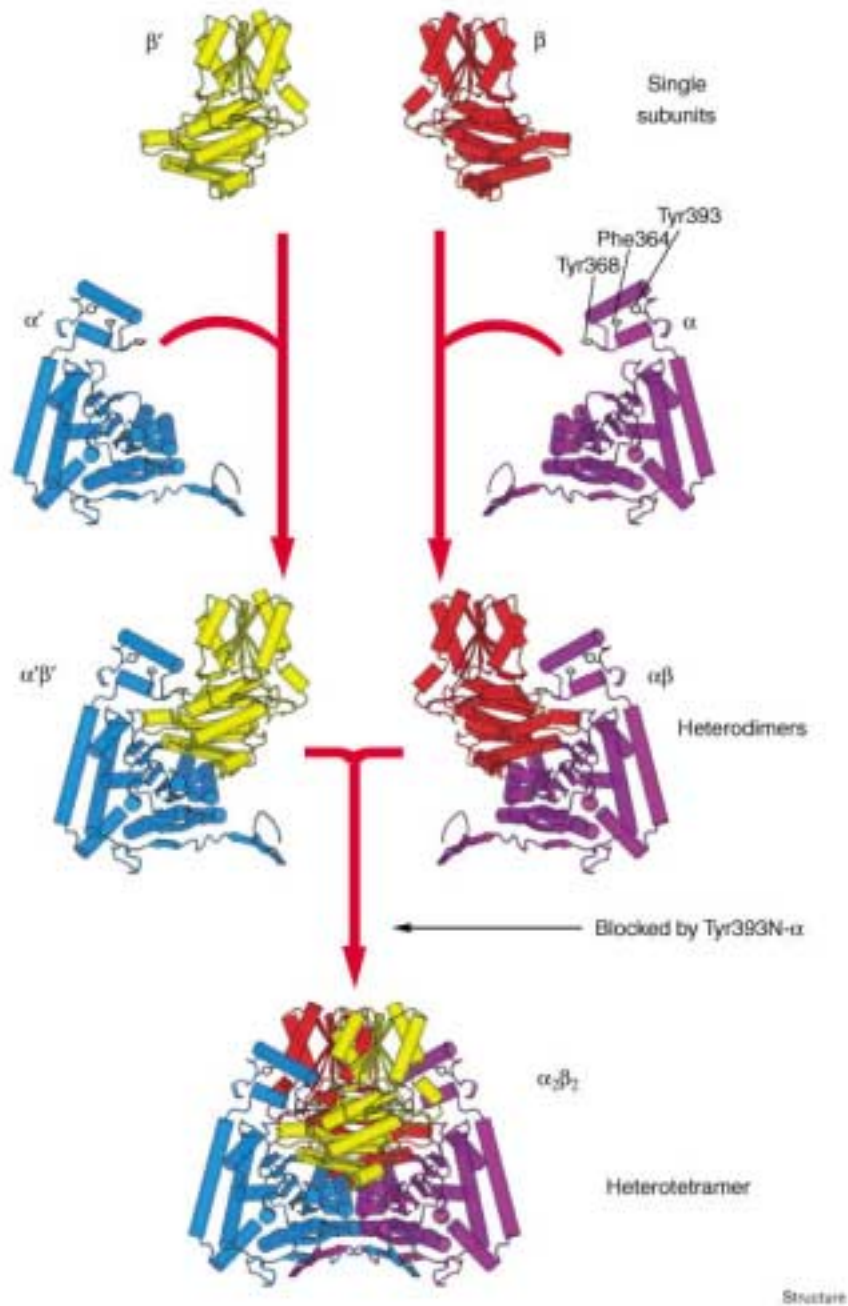


Abbildung 15: Ablauf der Zusammenlagerung der vier Untereinheiten zum E1-Heterotetramer und Auswirkungen der Missense-Mutation Y393N (modifiziert aus *Ævarsson et al. 2000*).

Das stabile Heterotetramer entsteht über die Bildung zweier intermediärer Heterodimere. Bei der Zusammenlagerung von Y393N tragenden Proteinen kommt es nur zur Bildung der beiden Heterodimere $\alpha\beta$ und $\alpha'\beta'$, da die Mutation die Wechselwirkungen zwischen der α und β' und der α' und β -Untereinheit beeinträchtigt.

F279F:

Eine Transition von Thymin zu Cytosin in Position 972 der cDNS führt zu dieser Allelvariation gegenüber den bis dato veröffentlichten cDNS-Sequenzen der E1 α -Untereinheit (Henneke et al. 1999). Das so veränderte Kodon 279 (TTT→TTC) kodiert weiterhin für Phenylalanin. Die Nukleotidposition 972 betrifft keine Konsensussequenzen für Spleißregionen, so dass auch der Spleißvorgang unbeeinflusst bleibt (Senapathy et al. 1990). Der Polymorphismus F279F hat somit keine Konsequenz für das entstehende E1 α -Protein. Phenylalanin 279 ist zwischen Mensch, Ratte, Maus und Rind konserviert, *Pseudomonas putida* besitzt an entsprechender Stelle einen Serinrest (Zhang et al. 1987; Hu et al. 1988; Dariush et al. 1991; Costeas und Chinsky 1996; Ævarsson et al. 2000). Auf Nukleotid-Ebene befindet sich bei Ratte Maus und Rind dem Polymorphismus entsprechend an korrespondierender Position ein Cytosin. Kürzlich ist der F279F zugrundeliegende Nukleotidaustausch auch in den Nukleotidsequenzen zum menschlichen E1 α -Gen unter den Zugangsnummern AC011462 und XM_030901 in GenBank erschienen. F279F fand sich in insgesamt 13 der 50 untersuchten Allele des E1 α -Gens (48 untersuchte Allele von Patienten plus zwei untersuchte Allele einer gesunden Kontrolle).

L362L:

Eine Transition von Guanin zu Adenin in Position 1221 der cDNS führt zu dieser Allelvariation gegenüber den bis dato veröffentlichten cDNS-Sequenzen der E1 α -Untereinheit (Henneke et al. 1999). Das so veränderte Kodon 362 (CTG→CTA) kodiert weiterhin für Leuzin. Die Nukleotidposition 1221 betrifft keine Konsensussequenzen für Spleißregionen, so dass auch der Spleißvorgang unbeeinflusst bleibt (Senapathy et al. 1990). Der Polymorphismus L362L hat somit keine Konsequenz für das entstehende E1 α -Protein. Leuzin 362 ist zwischen Mensch, Ratte, Maus und Rind konserviert, *Pseudomonas putida* besitzt an entsprechender Stelle einen Serinrest (Zhang et al. 1987; Hu et al. 1988; Dariush et al. 1991; Costeas und Chinsky 1996; Ævarsson et al. 2000). Auf Nukleotid-Ebene befindet sich an korrespondierender Position bei Ratte und Maus ein Cytosin und beim Rind der Ausgangssequenz entsprechend ein Guanin. Kürzlich ist der L362L zugrundeliegende Nukleotidaustausch auch in den Nukleotidsequenzen zum

menschlichen E1 α -Gen unter den Zugangsnummern AC011462 und XM_030901 in GenBank erschienen. L362L fand sich in insgesamt sechs der 50 untersuchten Allele des E1 α -Gens (48 untersuchte Allele von Patienten plus zwei untersuchte Allele einer gesunden Kontrolle).

4.2 Mutationen im E1 β -Gen (Typ IB)

Bis Mitte 2002 wurden im E1 β -Gen bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit weltweit insgesamt 11 verschiedene Mutationen beschrieben, darunter fünf Missense-Mutationen, drei Deletionen bzw. Insertionen, zwei Nonsense-Mutationen und eine Spleiß-Mutante (Chuang und Shih 2001; Edelmann et al. 2001; Wynn et al. 2001). Die Verteilung der Mutationen zeigt keine Clusterbildung in bestimmten Abschnitten des Gens. Fünf der Mutationen vom Typ Ib finden sich innerhalb der japanischen Bevölkerung bei Patienten mit klassischer Ahornsirup-Krankheit (Nobukuni et al. 1991; Nobukuni et al. 1993; Hayshida et al. 1994). Aufgrund ihrer relativ erhöhten Allelfrequenz ist die Mutation 92del11 hervorzuheben, die nicht nur bei betroffenen Japanern sondern auch bei Betroffenen italienischer Herkunft gefunden wird (Nobukuni et al. 1991; Nobukuni et al. 1993; Parrella et al. 1994). Von besonderem Interesse ist ein Basenaustausch von Thymin zu Guanin in der Spleißregion von Intron 5, der den Verlust der gesamten genetischen Information von Exon 5 und 6 zur Folge hat (Hayshida et al 1994). Erst kürzlich konnten vier neue Mutationen vom Typ Ib bei Patienten jüdischen bzw. nicht-jüdisch israelischen Ursprungs beschrieben werden: R133P, E322X, G228S und S289L (Edelmann et al. 2001; Wynn et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden 48 Allele des E1 β -Gens von Patienten mit Ahornsirup-Krankheit untersucht. Dabei wurden zehn unterschiedliche Mutationen in insgesamt 17 Allelen nachgewiesen. Unter den zehn nachgewiesenen Mutationen befinden sich fünf Missense-Mutationen, zwei Nonsense Mutationen, zwei Deletionen und eine Insertion. Alle Mutationen liegen in ihrer Lokalisation über das gesamte Gen verteilt. Eine der zehn Mutationen ist bereits aus der Literatur bekannt: G228S (Edelmann et al. 2001). Die übrigen neun nachgewiesenen Mutationen wurden bislang noch nicht beschrieben: c.166-167insACTT, G85R, c.595-596delAG, K191X, Y194H, V201A, V233A, c.937delG und Y333X. Die Mutationen V201A und

Y333X wurden unabhängig von unseren Untersuchungen in permanenten lymphoblastoiden Zelllinien unserer entsprechenden Patienten nachgewiesen (Nellis und Danner 2001).

Von zwei Ausnahmen abgesehen, verursachen alle bislang aus der Literatur bekannten Mutationen vom Typ IB die schwere klassische Verlaufsform der Erkrankung.

Im folgenden sollen die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Mutationen einzeln diskutiert werden:

c.166-167insACTT:

Diese Insertion von vier Basenpaaren wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen. Der Einschub der vier Basen zwischen Position 166 und 167 der cDNS entspricht einer Wiederholung der Basen in den Positionen 163-166 der cDNS. Dadurch kommt es bei der Translation zu einer frühen Verschiebung des Leserasters ab Kodon 6 und so zur Generierung eines vorzeitigen Stop-Signals nach weiteren 28 Kodonpositionen. c.166-167insACTT hat somit ein völlig verändertes und stark verkürztes Protein mit entsprechenden Auswirkungen auf die Funktion der E1 β -Untereinheit zur Folge. Zudem ist auch hier, wie oben bereits zu anderen Mutationen, die zu einem vorzeitigen Stop-Signal führen, diskutiert, von einer deutlich verminderten Stabilität der mRNS auszugehen. Diese Insertionsmutation wurde bei dem an klassischer Ahornsirup-Krankheit leidenden Patienten D.S. in einem Allel nachgewiesen. Mit den verwendeten Methoden konnte kein zweites verändertes Allel im E1 β -Gen dieses Patienten identifiziert werden. Mögliche Gründe hierfür sollen in Abschnitt 4.6 weiter diskutiert werden.

G85R:

Diese Missense-Mutation wurde bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. Sie bedingt die Substitution des neutralen Glycins in Position 85 durch das positiv geladene Arginin. Glycin 85 ist zwischen Mensch, Ratte, Maus, Rind und *Pseudomonas putida* konserviert (Nobukuni et al. 1990; Zhao et al. 1992; Chinsky et al 1993; Chuang et al. 1996; Ævarsson et al. 2000). Glycin 85 liegt in Hinblick auf die Sekundärstruktur des Polypeptids zentral im Bereich von α -Helix 3, die an der Bildung des aktiven Zentrums für die Bindung des Cofaktors Thiaminpyrophosphat an der Kontaktfläche der α - und β '- bzw. α '- und β -Untereinheit beteiligt ist

(Ævarsson et al. 2000). Am N-terminalen Beginn von α -Helix 3 befindet sich der Aminosäurerest Glutaminsäure 76, der direkt an das N₁-Atom des Pyrimidinringes des Thiaminpyrophosphats gebunden ist. Diese Bindung ist ein konserviertes Strukturmerkmal innerhalb der Familie der TPP-abhängigen Multienzymkomplexe. Ferner folgen Glutaminsäure 76 in Richtung des C-Terminus von α -Helix 3 (Reste Cystein 75 bis Glycin 90) hoch konservierte und fast ausschließlich neutrale Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten. Dieser hohe Grad der Konservierung legt nahe, dass ein Austausch der kleinen unpolaren Seitenkette des neutralen Glycins (einzelnes Wasserstoffatom) in Kodonposition 85 gegen die ausgesprochen große polare Seitenkette des positiv geladenen Arginins Auswirkungen auf die Konformation dieses Proteinbereiches und damit auf die Bindung des Cofaktors und letztlich die gesamte Enzymaktivität haben könnte.

G85R wurde bei der Patientin L.G. mit klassischer Ahornsirup-Krankheit in einem Allel nachgewiesen. Diese Patientin spanischer Herkunft ist „compound-heterozygot“ und trägt im zweiten Allel für die E1 β -Untereinheit die nachfolgend diskutierte Deletion c.595-596delAG.

c.595-596delAG:

Diese Deletion von zwei Basenpaaren wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen. Die deletierten beiden Basen in Position 595 und 596 der cDNS entsprechen einer Wiederholung der vorausgegangenen Basen in den Positionen 593 und 594 der cDNS. Es kommt bei der Translation zur Verschiebung des Leserasters ab Kodon 149 und so zur Generierung eines vorzeitigen Stop-Signals nach nur zwei weiteren Kodonpositionen. Dies führt zu einer um 193 carboxyterminale Aminosäuren verkürzten E1 β -Untereinheit. Wie bereits zu den Nonsense-Mutationen im E1 α -Gen diskutiert, konnte vielfach gezeigt werden, dass mutationsbedingte vorzeitige Stop-Signale aufgrund deutlich herabgesetzter Spiegel an mRNA auch zu einer entsprechend herabgesetzten Synthese des verkürzten Proteins führen (Baserga und Benz 1988; Zhang et al. 1990; Fisher et al. 1993; Chuang et al. 1994 Chinsky et al. 1997). In Hinblick auf die Kristallstruktur der gesamten E1-Komponente bedingt das vorzeitige Stoppsignal darüber hinaus den Verlust von funktionell völlig unerlässlichen Bereichen (Ævarsson et al. 2000). Dazu

zählt exemplarisch eine für die Stabilität der tetrameren Struktur der E1-Komponente bedeutsame Bindungsstelle für ein Kaliumion (Reste 178 bis 183).

c.595-596delAG wurde in jeweils einem Allel bei der Patientin L.G. mit klassischer Form und dem Patienten H.H. mit varianter Form der Ahornsirup-Krankheit nachgewiesen. Beide Patienten sind „compound-heterozygot“ und tragen im zweiten Allel für die E1 β -Untereinheit eine weitere Mutation. Bei L.G. handelt es sich um die oben zuvor diskutierte Missense-Mutation G85R, bei H.H. um die unten diskutierte Missense-Mutation G228S.

K191X:

K191X ist bislang noch nicht aus der Literatur bekannt. Durch diese Nonsense-Mutation entsteht durch vorzeitigen Abbruch der Translation eine um 152 carboxyterminale Aminosäuren verkürzte E1 β -Untereinheit. Wie bereits zu vorausgegangenen Nonsense-Mutationen mehrfach dargelegt, ist auch für K191X anzunehmen, dass das vorzeitige Stop-Signal aufgrund deutlich herabgesetzter Spiegel an mRNA auch zu einer entsprechend herabgesetzten Synthese des verkürzten Proteins führt (Baserga und Benz 1988; Zhang et al. 1990; Fisher et al. 1993; Chuang et al. 1994 Chinsky et al. 1997). Davon abgesehen, umfasst die durch K191X bedingte Verkürzung des E1 β -Proteins in Hinblick auf die Kristallstruktur der E1-Komponente die gesamte C-terminale Domäne (Ævarsson et al. 2000). Diese große Domäne (Reste 199 bis 342) ist aufgrund zahlreicher Interaktionen mit den anderen drei Untereinheiten für eine exakte Zusammenlagerung zum enzymatisch aktiven Heterotetramer völlig unverzichtbar. Darüber hinaus befindet sich die Bindungsstelle für die Bindungsdomäne der E2-Komponente am E1-Heterotetramer im Bereich des C-Terminus der E1 β -Untereinheit.

K191X fand sich bei den von der klassischen Form der Ahornsirup-Krankheit betroffenen beiden Geschwistern G.S. und L.S. in jeweils homozygoter Form. Die Untersuchung der Kernfamilie konnte beide Elternteile und einen phänotypisch gesunden Bruder als heterozygot für K191X identifizieren. Die phänotypisch gesunde zweieiige Zwillingsschwester von L.S. wies homozygot das Allel des Wildtyps auf. Die Eltern sind nicht unmittelbar konsanguin, stammen aber beide aus alteingesessenen Familien einer eng umschriebenen geographischen Region. Daher ist von einer weitläufigen Verwandtschaft auszugehen. Eine weitere eigenständige im Rahmen der Arbeit nicht untersuchte Familie dieser Region weist ebenfalls von der

Ahornsirup-Krankheit betroffene Patienten auf. Sollte auch in dieser Familie K191X für die Erkrankung verantwortlich sein, wäre ähnlich der Mennoniten-Mutation Y393N des E1 α -Gens ein „Founder-Effekt“ anzunehmen.

Y194H:

Diese Missense-Mutation wurde erstmals im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Die hier betroffene Aminosäure ist zwischen Mensch, Ratte, Maus, Rind und *Pseudomonas putida* konserviert (Nobukuni et al. 1990; Zhao et al. 1992; Chinsky et al. 1993; Chuang et al. 1996; ÅEvarsson et al. 2000). Y194H führt zum Austausch des neutralen Tyrosin durch das positiv geladene Histidin in Kodonposition 194. Tyrosin 194 liegt in Hinblick auf die Kristallstruktur der E1 β -Untereinheit im Bereich des Verbindungspunktes der großen N-terminalen Domäne (Reste 1 bis 191) mit der großen C-terminalen Domäne (Reste 199 bis 342) (ÅEvarsson et al. 2000). Dieses Verbindungspeptid besteht somit aus sieben Aminosäureresten in den Kodonpositionen 192 bis 198. Es ist anzunehmen, dass ein Austausch der aromatischen neutralen Seitenkette des hoch konservierten Tyrosins 194 gegen die positiv geladene heterozyklische Seitenkette des Histidins innerhalb dieses Verbindungspeptids Auswirkungen auf die räumliche Beziehung der beiden großen Domänen zueinander haben könnte. Dadurch wäre die Gesamtkonformation der E1 β -Untereinheit verändert und damit letztlich die Enzymaktivität der ganzen E1-Komponente beeinträchtigt.

Y194H wurde bei dem an einer milden varianten Form der Ahornsirup-Krankheit leidenden Patienten P.H. in einem Allel nachgewiesen. Mit den verwendeten Methoden konnte kein zweites verändertes Allel im E1 β -Gen dieses Patienten deutscher Herkunft identifiziert werden. Mögliche Gründe hierfür sollen in Abschnitt 4.6 weiter diskutiert werden. Y194H ist mit den oben dargestellten möglichen Auswirkungen auf die Proteinfaltung für sich betrachtet gut mit einem milderem klinischen Phänotyp vereinbar.

V201A:

Diese Missense-Mutation führt zur Substitution des verzweigtkettigen Valins in Position 201 gegen Alanin. Es handelt sich um einen konservativen Aminosäureaustausch, da Valin und Alanin beide neutral sind und eine unpolare Seitenkette besitzen. Valin 201 ist zwischen Mensch, Ratte, Maus, Rind und

Pseudomonas putida konserviert (Nobukuni et al. 1990; Zhao et al. 1992; Chinsky et al. 1993; Chuang et al. 1996; ÅEvarsson et al. 2000). Valin 201 ist in Hinblick auf die Sekundärstruktur des Polypeptids Teil des kleinen β -Faltblattes h, das als erstes N-terminales Sekundärstrukturelement der C-terminalen Domäne der E1 β -Untereinheit nur fünf Aminosäurereste in den Kodonpositionen 199 bis 203 umfasst (ÅEvarsson et al. 2000). Der Aminosäurerest Valin ist grundsätzlich mit relativ größerer Häufigkeit als der Aminosäurerest Alanin in β -Faltblattstrukturen anzutreffen, d.h. Valin begünstigt stärker im Vergleich zu Alanin die Ausbildung einer β -Faltblattstruktur (Creighton 1983). Die verzweigt-kettige Seitenkette des Valins ist darüber hinaus größer als die des Alanins und daher in ausgedehnterem Maße in der Lage, Wechselwirkungen mit der Umgebung einzugehen. Die oben genannten Aspekte legen auch unter Berücksichtigung des hohen Konservierungsgrades von Valin 201 nahe, dass ein konservativer Austausch von Valin gegen Alanin in Position 201 die intakte Ausbildung von β -Faltblatt h mit seinen Wechselwirkungen als Teil der C-terminalen Domäne der E1 β -Untereinheit behindert. Die Bindungsstelle für die Bindungsdomäne der E2-Komponente am E1-Heterotetramer liegt im Bereich dieser C-terminalen Domäne. Diese Mutation könnte somit Auswirkungen auf die Bindung der E2-Untereinheit und auf die Zusammenlagerung zum Multienzymkomplex haben. V201A zeigte sich bei dem Patienten S.O. mit klassischer Ahornsirup-Krankheit in homozygoter Form. Bei der Untersuchung der konsanguinen Eltern türkischer Herkunft wurde V201A bei Vater und Mutter heterozygot nachgewiesen. Darüber hinaus zeigte sich bei dem Patienten in einem Allel des E1 α -Gens die in Abschnitt 4.2 diskutierte Missense-Mutation T106M. Inwieweit das Zusammenspiel der drei betroffenen Allele einen Anteil am Zustandekommen des Phänotyps hat, ist nur durch detaillierte Funktionsstudien zu den beiden einzelnen Mutationen zu klären. Nellis und Danner wiesen kürzlich V201A unabhängig von unseren Untersuchungen in einer permanenten lymphoblastoiden Zelllinie unseres Patienten S.O. nach, nachdem sie zuvor in entsprechenden Komplementierungsstudien E1 β als defekten Genlocus identifizieren konnten (Nellis und Danner 2001). Auch auf der Grundlage der Kristallstruktur der E1-Komponente halten Nellis und Danner den Mechanismus der Zerstörung der Enzymfunktion durch V201A für letztlich noch ungeklärt.

G228S:

Durch diese Missense-Mutation wird in Kodonposition 228 die kleine unpolare Seitenkette des Glycins gegen die größere polare Seitenkette des Serins ersetzt. Glycin 228 ist zwischen Mensch, Ratte, Maus, Rind und *Pseudomonas putida* konserviert (Nobukuni et al. 1990; Zhao et al. 1992; Chinsky et al. 1993; Chuang et al. 1996; Ævarsson et al. 2000). Kürzlich wurde G228S in einem Allel eines „compound-heterozygoten“ Patienten mit intermediärer Form der Ahornsirup-Krankheit beschrieben (Edelmann et al. 2001). Im zweiten Allel trägt dieser Patient jüdischer Herkunft die Missense-Mutation R133P, die in homozygoter Form zur klassischen Ahornsirup-Krankheit führt (Edelmann et al. 2001; Wynn et al. 2001). Der mildere Phänotyp der Erkrankung muss im Fall dieses Patienten somit allein durch G228S bedingt sein. In Hinblick auf die Kristallstruktur der E1-Komponente verbindet Glycin 228 zusammen mit Threonin 229 vergleichbar einer Haarnadelkurve die Sekundärstrukturelemente β -Faltblatt j und α -Helix 9 miteinander (Ævarsson et al. 2000; Edelmann et al. 2001; siehe Abbildung 16). Als letzter Aminosäurerest von β -Faltblatt j bildet das unmittelbar vorgeschaltete Tryptophan 227 mit seiner Seitenkette eine Wasserstoffbrückenbindung zu Glutaminsäure 151 aus. Glutaminsäure 151 wiederum ist innerhalb des Heterotetramers im Bereich der β - β' -Kontaktfläche an der Ausbildung einer hydrophoben „Tasche“ beteiligt, in die sich ein Aminosäurerest der anderen β -Untereinheit (Histidin 156) wie ein Knopf ins Knopfloch einstülpt. Es kann vermutet werden, dass G228S diese Wechselwirkungen zwischen den beiden E1 β -Untereinheiten während der Zusammenlagerung zum Heterotetramer destabilisiert und so die enzymatische Aktivität der E1-Komponente beeinträchtigt. Diese Art der möglichen Auswirkung von G228S ist gut mit einem milderen klinischen Phänotyp in Einklang zu bringen.

G228S wurde in einem Allel bei dem Patienten H.H. mit varianter Form der Ahornsirup-Krankheit nachgewiesen. Dieser Patient österreichischer Herkunft ist „compound-heterozygot“ und trägt im zweiten Allel für die E1 β -Untereinheit die oben zuvor diskutierte Deletion c.595-596delAG. Diese Deletion zieht für sich betrachtet zweifellos einen völligen Funktionsausfall des resultierenden Proteins nach sich. Daher muß auch im Falle unseres Patienten H.H. der mildere klinische Verlauf der Erkrankung allein durch G228S bedingt sein.



Abbildung 16: Kristallstruktur der E1 β -Untereinheit und Position der durch G228S betroffenen Aminosäure (modifiziert aus Edlmann et al. 2001).

Der Pfeil zeigt auf die weiß dargestellte Seitenkette von Glycin228. Dieser Aminosäurerest ist vergleichbar einer Haarnadelkurve der Verbindungspunkt zweier Sekundärstrukturelemente und daher bedeutsam für die regelrechte Gesamtkonformation der E1 β -Untereinheit.

V233A:

V233A ist bislang noch nicht aus der Literatur bekannt. Diese Missense-Mutation hat den Austausch des verzweigt-kettigen Valins in Position 233 gegen Alanin zur Folge. Es handelt sich um einen konservativen Aminosäureaustausch, da Valin und Alanin beide neutral sind und eine unpolare Seitenkette besitzen. Valin 233 ist zwischen Mensch, Ratte, Maus, Rind und *Pseudomonas putida* konserviert (Nobukuni et al. 1990; Zhao et al. 1992; Chinsky et al. 1993; Chuang et al. 1996; Ævarsson et al. 2000). In Hinblick auf die Sekundärstruktur der E1 β -Untereinheit ist Valin 233 als Teil der C-terminalen Domäne im Bereich von α -Helix 9 lokalisiert (Ævarsson et al. 2000). Diese Domäne geht zahlreiche Interaktionen mit den anderen drei Untereinheiten bei der Zusammenlagerung zum E1-Heterotetramer ein und beinhaltet die Bindungsstelle für die Bindungsdomäne der E2-Komponente am E1-Heterotetramer. Die verzweigt-kettige Seitenkette des Valins ist größer als die des Alanins und daher nicht in gleichem Maße in der Lage, Wechselwirkungen mit der

Umgebung einzugehen. Ein konservativer Austausch von Valin 233 gegen Alanin könnte daher auch unter Berücksichtigung des hohen Konservierungsgrades diese Wechselwirkungen der C-terminalen Domäne innerhalb des Heterotetramers oder innerhalb des Enzymkomplexes mit der E2-Untereinheit beeinträchtigen.

V233A wurde bei der an einer milden varianten Form der Ahornsirup-Krankheit leidenden Patientin L.W. in einem Allel nachgewiesen. Mit den verwendeten Methoden konnte kein zweites verändertes Allel im E1 β -Gen dieser Patientin deutscher Herkunft identifiziert werden. Mögliche Gründe hierfür sollen in Abschnitt 4.6 weiter diskutiert werden. V233A ist mit den oben dargestellten möglichen Auswirkungen für sich betrachtet gut mit einem milderem klinischen Phänotyp vereinbar.

c.937delG:

Diese Deletion eines Basenpaares ist bislang ebenfalls noch nicht aus der Literatur bekannt. Die deletierte Basen Guanin in Position 937 der cDNS entspricht einer Wiederholung der vorausgegangenen Base in Position 936 der cDNS. Es kommt bei der Translation zur Verschiebung des Leserasters ab Kodon 263 und so zur Generierung eines vorzeitigen Stop-Signals nach nur sechs weiteren Kodonpositionen. Dies führt zu einer um 74 carboxyterminale Aminosäuren verkürzten E1 β -Untereinheit. Wie bereits zu vorausgegangenen Nonsense-Mutationen dargelegt, ist anzunehmen, dass dieses vorzeitige Stop-Signal aufgrund deutlich herabgesetzter Spiegel an mRNA auch zu einer entsprechend herabgesetzten Synthese des verkürzten Proteins führt (Baserga und Benz 1988; Zhang et al. 1990; Fisher et al. 1993; Chuang et al. 1994 Chinsky et al. 1997). Darüber hinaus betrifft die mutationsbedingte Verkürzung des E1 β -Proteins in Hinblick auf die Kristallstruktur große Teile der C-terminalen Domäne, die aufgrund zahlreicher Interaktionen mit den anderen Untereinheiten der E1-Komponente und mit der E2-Komponente für die Enzymfunktion völlig unerlässlich ist (Ævarsson et al. 2000).

c.937delG fand sich bei der italienischstämmigen Patientin C.C. mit klassischer Ahornsirup-Krankheit in homozygoter Form.

Y333X:

Diese Nonsense-Mutation wurde erstmals von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Henneke et al. 1999). Y333X hat durch vorzeitigen Abbruch der Translation eine um zehn carboxyterminale Aminosäuren verkürzte E1 β -Untereinheit zur Folge. In Hinblick auf die Kristallstruktur der E1-Komponente bedeutet diese Verkürzung den Verlust großer Teile von α -Helix 13, die mit den Aminosäureresten 329 bis 342 den C-Terminus der E1 β -Untereinheit ausmacht (Ævarsson et al. 2000). Dieser Bereich ist an der Bildung der Bindungsstelle für die Bindungsdomäne der E2-Komponente am E1-Heterotetramer beteiligt, so dass die Verkürzung der E1 β -Untereinheit um diesen Bereich Auswirkungen auf die Zusammenlagerung zum Multienzymkomplex haben dürfte.

Y333X wurde bei der türkischstämmigen Patientin H.O. mit klassischer Ahornsirup-Krankheit in beiden Allelen nachgewiesen. Die Eltern der Patientin sind konsanguin. Nellis und Danner wiesen kürzlich Y333X unabhängig von unseren Untersuchungen in einer permanenten lymphoblastoiden Zelllinie unserer Patientin H.O. nach, nachdem sie zuvor in entsprechenden Komplementierungsstudien E1 β als defekten Genlocus identifizieren konnten (Nellis und Danner 2001).

4.3 Mutationen im E2-Gen (Typ II)

Bis Mitte 2002 wurden im E2-Gen bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit weltweit 27 verschiedene Mutationen beschrieben (Chuang und Shih 2001). Im Gegensatz zu den Mutationen vom Typ Ia handelt es sich bei den Mutationen vom Typ II mit nur 44% der Fälle um deutlich weniger Missense-Mutationen (zwölf Missense-Mutationen). Fünf der bereits aus der Literatur bekannten Mutationsereignisse sind Deletionen innerhalb der für das E2-Protein kodierenden Genbereiche. In zwei Fällen kommt es zu einer Nonsense-Mutation, und in vier Fällen handelt es sich um mutationsbedingte Veränderungen von Spleißstellen im Bereich der Exon-Introngrenzen („einfache“ Spleiß-Mutanten).

Gesondert hervorzuheben ist eine Gruppe von vier Mutationen vom Typ II, bei denen ausgedehnte Deletionen und punktuelle Substitutionen einzelner Basen innerhalb der für das Protein nicht kodierenden langen Intronsegmente durch Aktivierung verborgener oder Generierung neuer Spleiß-Stellen zu sekundären Deletionen und

Insertionen innerhalb der reifen mRNA führen. Exemplarisch hierfür sei eine 3,2 kb große Deletion in Intron 4 des E2-Gens (IVS4del[-3,2kb:-14]) mit der Folge einer spleißingbedingten 17bp großen Insertion in der reifen mRNA des E2-Proteins erwähnt (Chuang et al. 1997). Die oben genannten Zahlen zeigen, dass das E2-Gen offenbar im Vergleich zum E1 α - und E1 β -Gen überproportional zu den korrekten Spleißvorgang beeinträchtigenden Mutationen neigt. Zwei unterschiedliche Spleißing-Mutationen führen beide auf mRNA-Ebene zum Verlust des gesamten Exons 8: K278K am 3'-Ende von Exon 8 und IVS8del+1g im Bereich der 5'-Donorstelle von Intron 8 (Mitsubuchi et al. 1991; Herring et al. 1992). Auf drei Mutationen sei aufgrund ihrer relativ erhöhten Allelfrequenzen in verschiedenen ethnischen Gruppen speziell hingewiesen: Die Missense-Mutation F215C, die Nonsense-Mutation E163X und die Deletion 90delAT (Fisher et al. 1991c; Fisher et al. 1993). Die Mutationen F215C und IVS4del[-3,2kb:-14] wurden jeweils heterozygot bei dem von Scriver beschriebenen Patienten mit Thiamin-responsiver Ahornsirup-Krankheit nachgewiesen (Scriver et al. 1971). Vier Missense-Mutationen betreffen die Liponsäure tragende Domäne des E2-Proteins: P73L, P73R, D76Y und I77T (Chuang et al. 1991; Chuang und Shih 2001). Diese Mutationen scheinen offenbar die Stabilität der E2-Untereinheit zu beeinträchtigen, ohne jedoch Auswirkungen auf die Bindung der Liponsäure zu besitzen. Die Verteilung der Mutationen zeigt keine Clusterbildung in bestimmten Abschnitten des Gens.

Anders als Mutationen vom Typ Ia und Ib sind die Mutationen vom Typ II häufiger mit einem milderem klinischen Phänotyp assoziiert. Die Mehrzahl der Patienten mit Mutationen vom Typ II weist die intermediäre oder intermittierende Form der Ahornsirup-Krankheit auf. Von einigen dieser Patienten wurde ein Ansprechen auf therapeutische Gaben von Thiamin in der Literatur berichtet.

In der vorliegenden Arbeit wurden 48 Allele des E2-Gens von Patienten mit Ahornsirup-Krankheit untersucht. Dabei wurden vier unterschiedliche Mutationen in insgesamt 8 Allelen nachgewiesen. Unter den vier nachgewiesenen Mutationen befinden sich drei Missense-Mutationen und eine Spleißing-Mutation. Eine der vier Mutationen ist bereits aus der Literatur bekannt: G323S (Tsuruta et al. 1998). Die übrigen drei nachgewiesenen Mutationen wurden bislang noch nicht beschrieben: IVS7-1G>A, I368N und V385M. In einem Fall ergab sich der Verdacht auf das Vorliegen einer großen Deletion, ohne die genauen Grenzen dieser Deletion exakt bestimmen zu können.

Im folgenden sollen die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Mutationen einzeln diskutiert werden:

Exone 5-7:

Bei der türkischstämmigen Patientin M.B. mit klassischer Ahornsirup-Krankheit konnten mittels der Polymerasekettenreaktion bei unterschiedlichsten Bedingungen unter Verwendung der entsprechenden Exon-flankierenden intronischen Primerpaare die Exone 5-7 nicht amplifiziert werden. Die Amplifikation der Fragmente für die Exone 4 und 8 war bei der Patientin möglich. Dies legt den Verdacht auf eine große homozygote Deletion nahe, die mit einer maximal möglichen Länge von etwa 21Kb den Bereich zwischen Intron 4 und 7 beträfe. Bedauerlicherweise stand kein Material zur Extraktion von mRNA und zur Erstellung von cDNA zur Verfügung, um auf dieser Ebene die angenommene Deletion der Exone 5-7 einfach zu bestätigen. Beispielfür eine solche Mutation im E2-Gen sei eine bereits bekannte 15-20 kb große durch ein Rekombinationsereignis bedingte Alu-Deletion erwähnt, die sich von einer Alu-Sequenz in Intron 6 bis hinter die kodierenden Bereiche von Exon 11 erstreckt (Herring et al. 1992).

IVS7-1G>A:

Diese Transition von Guanin zu Adenin in Position -1 von Intron 7 ist bisher nicht aus der Literatur bekannt. IVS7-1G>A verändert die Konsensus-Sequenz der 3'-Spleiß-Akzeptorstelle. Die Untersuchung der mRNA bei der betroffenen Patientin offenbarte die Deletion des gesamten Exons 8 (78 bp) und damit den Verlust der Aminosäuren in den Kodonpositionen 253 bis 278. Diese 26 Aminosäuren liegen im Bereich der katalytischen inneren Kerndomäne der E2-Untereinheit (siehe Abbildung 16). Der Vergleich von 13 Sequenzen aus der Familie der Dihydrolipoyl-Transacylasen bei unterschiedlichen pro- und eukaryonten Spezies zeigt für den Bereich dieser 26 Aminosäuren einen hohen Grad der Konservierung und ausgeprägte Homologien zur Pyruvat-Dehydrogenase und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (Russel und Guest 1991). Dies macht die große biologische Bedeutung dieser Region in der inneren Kerndomäne für die katalytische Funktion der E2-Untereinheit deutlich.

In der Literatur sind bereits zwei Spleißing-Mutationen im Bereich der Donorstelle an der Grenze Exon 8/Intron8 beschrieben, die auch beide zum Verlust von Exon 8 in der reifen mRNA führen: K278K und IVS8del+1g (Mitsubuchi et al. 1991; Herring et

al. 1992). K278K wurde bei einem „compound-heterozygoten“ Patienten mit Thiamin-responsiver Ahornsirup-Krankheit gefunden. IVS8del+1g wurde homozygot bei einem japanischen Patienten mit klassischer Ahornsirup-Krankheit gefunden. Der aus IVS7-1G>A, K278K und IVS8del+1g resultierende Verlust von Exon 8 ist mit dem „Exon-definierenden Modell“ zum Spleißvorgang vereinbar (Berget 1995). IVS7-1G>A bzw. der Verlust von Exon 8 in der mRNA wurde bei der türkischstämmigen Patientin C.G. mit klassischer Ahornsirup-Krankheit homozygot nachgewiesen.

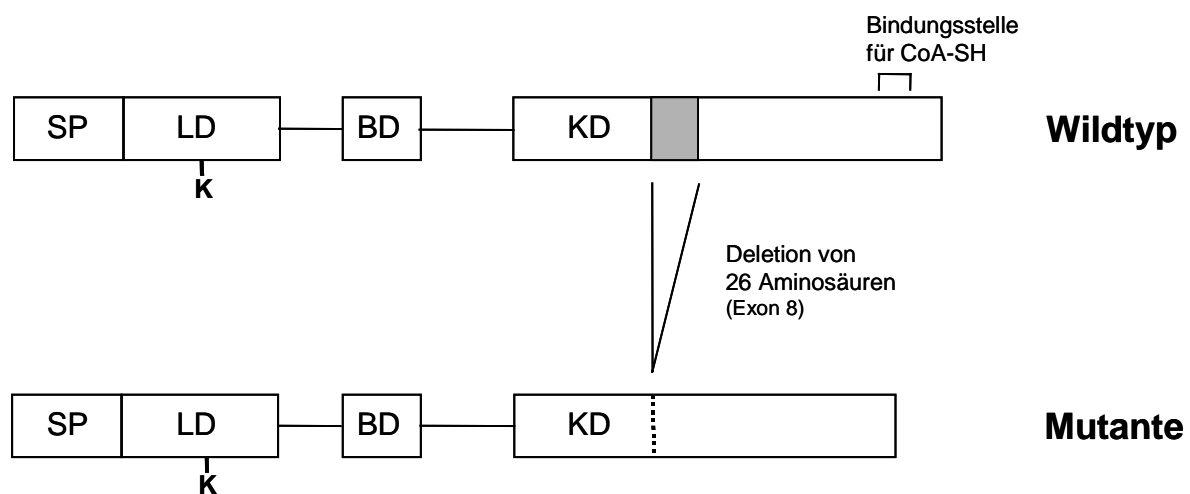


Abbildung 17: Schematischer Vergleich der normalen und der von IVS7-1G>A betroffenen E2-Untereinheit.

Das Signalpeptid und die drei Hauptdomänen sind als Rechtecke dargestellt (SP Signalpeptid; LD Liponsäure tragende Domäne; BD E1-/E3-Bindungsdomäne; KD innere Kerndomäne mit der CoA-SH-Bindungsstelle). „K“ steht für den Lysinrest, über den die Liponsäure gebunden wird. Der Bereich der Deletion von Exon 8 innerhalb der E2-Kerndomäne ist schattiert hervorgehoben, das resultierende Protein ist deutlich verkürzt.

G323S:

Durch diese Missense-Mutation wird in Kodonposition 323 die kleine unpolare Seitenkette des Glycins gegen die größere polare Seitenkette des Serins ersetzt. Glycin 323 ist zwischen Mensch, Maus und Rind konserviert (Russel und Guest 1991; Costeas et al. 1996). Der Vergleich von Sequenzen aus der Familie der Dihydrolipoyl-Transacylasen bei unterschiedlichen pro- und eukaryonten Spezies weist in neun von 13 Fällen Glycin an der Kodonposition 323 entsprechenden Position aus (Russel und Guest 1991). In keinem Fall liegt ein Serinrest an entsprechender Stelle. Glycin 323 befindet sich im Bereich der katalytischen inneren Kerndomäne der E2-Untereinheit. Ein Austausch des hoch konservierten Glycins gegen Serin in dieser Position könnte die Konformation der Kerndomäne und damit die enzymatische Funktion der E2-Untereinheit beeinträchtigen.

G323S wurde bereits in einem Allel eines „compound-heterozygoten“ Patienten japanischer Herkunft mit intermittierender Form der Ahornsirup-Krankheit beschrieben (Tsuruta et al. 1998). In derselben Arbeit wurde bei der Untersuchung der genomischen DNS von 30 gesunden Kontrollpersonen mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) in keinem Allel G323S nachgewiesen.

G323S wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei dem Patienten M.M. in homozygoter Form und bei den Patienten L.G. und A.M. in heterozygoter Form gefunden. Alle drei Patienten leiden an der klassischen Form der Ahornsirup-Krankheit und sind unterschiedlicher ethnischer Herkunft. Für den Patienten M.M. ist in erster Linie die in beiden Allelen des E1 α -Gens nachgewiesene Mennoniten-Mutation Y393N als krankheitsrelevant anzusehen. Die Patientin L.G. ist „compound-heterozygot“ für zwei unterschiedliche Mutationen im E1 β -Gen, die auch primär als krankheitsrelevant anzusehen sind. Für den Patienten A.M. konnte mit den verwendeten Methoden in keinem der drei untersuchten Gene ein weiteres verändertes Allel identifiziert werden. Mögliche Gründe hierfür sollen in Abschnitt 4.6 weiter diskutiert werden. Bei der Untersuchung der genomischen DNS von fünf gesunden Kontrollpersonen mittels direkter Sequenzierung wurde G323S in zwei Fällen in je einem Allel nachgewiesen. Insgesamt zeigt sich damit im Gegensatz zur oben genannten Arbeit von Tsuruta et al. für G323S in unseren Untersuchungen eine Allelfrequenz, wie man sie in dieser Höhe eher von Polymorphismen kennt.

Zwar ist eine pathogene Bedeutung von G323S letztlich nur durch detaillierte Funktionsstudien zu widerlegen. Die oben dargelegten Ergebnisse legen jedoch die

Vermutung nahe, daß G323S allenfalls geringe Auswirkungen auf die Enzymfunktion der E2-Untereinheit besitzt.

I368N:

Diese Missense-Mutation wurde bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. Sie führt in Kodonposition 368 zur Substitution des verzweigt-kettigen Isoleuzins mit seiner unpolaren Seitenkette gegen Asparagin mit seiner polaren Seitenkette. Bei der Maus und beim Rind liegt an entsprechender Position ein ebenfalls verzweigt-kettiger unpolarer Leuzinrest (Russel und Guest 1991; Costeas et al. 1996). Der Vergleich von Sequenzen aus der Familie der Dihydrolipoyl-Transacylasen bei unterschiedlichen pro- und eukaryonten Spezies weist in elf von 13 Fällen eine der drei verzweigt-kettigen Aminosäuren (Valin, Leuzin oder Isoleuzin) an der Kodonposition 368 entsprechenden Position aus (Russel und Guest 1991). In keinem Fall befindet sich Asparagin an entsprechender Stelle. Isoleuzin 368 ist somit als funktionell konservierter Rest zu betrachten. I368N betrifft den Bereich der katalytischen inneren Kerndomäne der E2-Untereinheit und könnte die Konformation dieser Domäne und damit die enzymatische Funktion beeinträchtigen.

Bei dem französischen Patienten S.T. mit milder varianter Verlaufsform der Ahornsirup-Krankheit wurde I368N in einem Allel nachgewiesen. Der Patient ist „compound-heterozygot“ und trägt im zweiten Allel für die E2-Untereinheit die nachfolgend diskutierte Missense-Mutation V368M.

V385M:

Diese Missense-Mutation ist bislang ebenfalls noch nicht aus der Literatur bekannt. V385M ersetzt in Kodonposition 385 das verzweigt-kettige Valin gegen das schwefelhaltige Methionin. Valin 385 ist zwischen Mensch, Maus und Rind konserviert (Russel und Guest 1991; Costeas et al. 1996). Der Vergleich von 13 Sequenzen aus der Familie der Dihydrolipoyl-Transacylasen bei unterschiedlichen pro- und eukaryonten Spezies weist in sechs Fällen Valin und in den übrigen sieben Fällen eine der beiden anderen verzweigt-kettigen Aminosäuren (Leuzin oder Isoleuzin) an der Kodonposition 385 entsprechenden Position aus (Russel und Guest 1991). In keinem Fall liegt ein Methioninrest an entsprechender Position. Valin 385 befindet sich im Bereich der katalytischen inneren Kerndomäne der E2-Untereinheit. In unmittelbarer Nähe zu Valin 385 sind die Reste Asparaginsäure 390 und Histidin

391 lokalisiert, die sich ausnahmslos in dieser Position bei allen Mitgliedern der Familie der Dihydrolipoyl-Transacylasen wiederfinden (Russel und Guest 1991). Die Substitution von Histidin 391 der bovinen E2-Untereinheit durch eine andere Aminosäure mittels positionsgerichteter Mutagenese führt in Expressionsstudien zum Verlust der Transacylase-Aktivität (Meng und Chuang 1994). Ein Austausch des hoch konservierten Valins gegen Methionin in Position 385 könnte die Konformation dieses unverzichtbaren Proteinbereiches innerhalb der Kerndomäne und damit die enzymatische Funktion der E2-Untereinheit beeinträchtigen.

Bei dem französischen Patienten S.T. mit milder varianter Verlaufsform der Ahornsirup-Krankheit wurde V385M in einem Allel nachgewiesen. Der Patient ist „compound-heterozygot“ und trägt im zweiten Allel für die E2-Untereinheit die zuvor diskutierte Missense-Mutation I368N.

4.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Von zahlreichen Autoren konnten bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit signifikante Korrelationen zwischen dem klinischen und dem biochemischen Phänotyp hergestellt werden. Zur klinischen Einordnung dienen das Lebensalter und die Symptomatik bzw. die Umstände bei Erstmanifestation, sowie der weitere Verlauf der Erkrankung. Zur Charakterisierung des biochemischen Phänotyps werden in erster Linie die Bestimmung der Restaktivität der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase in Fibro- oder Lymphoblastenkulturen (*in vitro*) und die L-Leuzin-Ganzkörperoxidation (*in vivo*) durchgeführt (Dancis et al. 1972; Indo et al. 1988; Schadewaldt et al. 2001). In stabilen metabolischen Phasen korreliert die aus im Blutplasma ermittelten Werten errechnete L-Alloisoleuzin/L-Isoleuzin-Ratio indirekt mit der in der Zellkultur bestimmten Enzymrestaktivität und kann als relevanter Parameter zur Beurteilung der Schwere des metabolischen Defektes bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit herangezogen werden (Wendel et al. 1989). Auf Basis dieser klinisch-biochemischen Merkmale lassen sich grob zwei unterschiedliche klinisch-biochemische Phänotypen abgrenzen: eine Gruppe der klassischen schweren Verlaufsform und eine heterogene Gruppe der mildereren varianten Verlaufsformen.

Eine Gegenüberstellung dieser beiden Phänotypen mit den bislang bekannten Genotypen ergibt keine sichere Genotyp-Phänotyp-Korrelationen. Es lassen sich

jedoch folgende Tendenzen erkennen: Mutationen vom Typ IA und IB sind überwiegend mit der schweren klassischen Verlaufsform assoziiert, während Mutationen vom Typ II überwiegend bei den mildereren varianten Formen angetroffen werden (Chuang und Shih 2001). Gesondert in der Literatur herausgestellt wird eine eindeutige Assoziation der mildereren Variante der Thiamin-responsiven Form mit Typ II-Mutationen. Bemerkenswerterweise handelt es sich bei dem größten Anteil von schon beschriebenen Typ IA-Mutationen um Missense-Mutationen (63%) und bei dem größten Anteil von Typ II-Mutationen um Deletionen, Nonsense- oder Spleißing-Mutationen (55%). Angesichts der ausgedehnten Auswirkungen von Deletionen, Nonsense- oder Spleißing-Mutationen auf ein Protein wäre eine umgekehrte Verteilung eher zu erwarten gewesen. Die phäno- und genotypische Charakterisierung unserer Patienten ergibt keine neuen signifikanten Aspekte einer möglichen Genotyp-Phänotyp-Korrelation.

Von den in der vorliegenden Arbeit insgesamt nachgewiesenen 21 Mutationen entfallen sieben auf Mutationen vom Typ IA, zehn auf Mutationen vom Typ IB und lediglich vier auf Mutationen vom Typ II. Die im Verhältnis geringe Anzahl an nachgewiesenen Typ II-Mutationen kann auf der möglichen Grundlage einer Korrelation der mildereren Varianten mit Mutationen vom Typ II erklärt werden. Von den 24 untersuchten Patienten mit Ahornsirup-Krankheit leiden lediglich sieben Patienten an einer mildereren varianten Form. Patienten mit wahrscheinlichen Typ II-Mutationen sind somit im untersuchten Patientenkollektiv unterrepräsentiert.

Sechs der insgesamt 21 nachgewiesenen Mutationen sind bereits aus der Literatur bekannt. Die Phänotypen unserer Patienten mit den Mutationen A240P- α , R242X- α , G245R- α , Y393N- α und G228S- β stimmen genau mit den zu den jeweiligen Mutationen publizierten Phänotypen überein. Für die Missense-Mutation G323S im E2-Gen stimmen die Phänotypen unserer Patienten und des publizierten Patienten nicht überein, mögliche Gründe hierfür wurden in Abschnitt 4.3 bereits diskutiert. Abgesehen von variierenden Phänotypen durch Interaktionen zwischen zwei unterschiedlichen Allelen bei „compound-heterozygoten“ Patienten zeigt dies, daß die phänotypische Ausprägung eines mutierten Allels bei der Ahornsirup-Krankheit offenbar keinen Modifikationen unterliegt.

4.5 Überlegungen zur Methodik

Von den in der vorliegenden Arbeit insgesamt untersuchten 24 Patienten mit Ahornsirup-Krankheit konnte bei 13 Patienten in beiden Allelen für eines der drei untersuchten Gene ein Mutationsereignis aufgedeckt werden. Bei sechs Patienten konnte mit den verwendeten Methoden nur ein verändertes Allel identifiziert werden, bei fünf Patienten konnte in keinem der sechs möglichen Allele eine krankheitsrelevante Mutation nachgewiesen werden. Als potentielle Gründe für den Verbleib von sechs teil- und fünf unaufgeklärten Patienten sind verschiedenen Aspekte zu diskutieren. Dem Nachweis entgangene Mutationsereignisse in folgenden Bereichen könnten bei diesen Patienten für die Erkrankung verantwortlich sein: untersuchte Abschnitte des E1 α -, E1 β und E2-Gens, nicht untersuchte Abschnitte des E1 α -, E1 β und E2-Gens sowie die nicht untersuchten Gene der die Aktivität des gesamten Enzymkomplexes regulierenden Kinase und Phosphatase. Nicht erfasste Mutationsereignisse der untersuchten kodierenden Abschnitte des E1 α -, E1 β und E2-Gens sind als methodenbedingt zu betrachten bzw. sind der SSCP-Screeningmethode für Mutationen entgangen. Die Sensitivität der SSCP-Analyse schwankt in Abhängigkeit zahlreicher verschiedener Faktoren erheblich (Sheffield et al. 1993; Nataraj et al. 1999). Zur Erhöhung der Detektionsrate könnte die SSCP mit weiteren und ggf. effektiveren Mutationsscreeningverfahren wie die Heteroduplexanalyse (HA) oder die Temperatur-Gradient-Gelelektrophorese (TGGE) kombiniert werden. Alle diese Screeningmethoden müssen jedoch in ihrer Effektivität und ihrem Zeit- und Kostenaufwand am „Goldstandard“ des Mutationsnachweises, der direkten DNS-Sequenzierung, gemessen werden, die eine Sensitivität von nahezu 100% aufweist (Nataraj et al. 1999).

Unter die nicht untersuchten Abschnitte des E1 α -, E1 β - und E2-Gens fallen die jeweiligen regulatorischen Promotorregionen der drei Gene und die zwischen den untersuchten kodierenden Exonen liegenden großen Intronbereiche. In den Promotorregionen der drei Gene wurden in der Literatur bislang noch keine die Erkrankung verursachenden Mutationsereignisse beschrieben. Für die Intronbereiche wurden bereits mehrfach den korrekten Spleißvorgang der unreifen Prä-mRNS beeinträchtigende Mutationen nachgewiesen (Chuang und Shih 2001). Um Veränderungen der nicht-kodierenden Bereiche der drei Gene besser zu erfassen, muß neben der genomischen DNS auch die reife mRNA der Patienten

untersucht werden. Diese kann aus kultivierten Fibro- und Lymphoblasten oder aus peripheren Leukozyten einer frischen Blutprobe extrahiert werden.

Für die nicht untersuchten Gene der spezifischen Kinase und Phosphatase wurden bislang noch keine krankheitsrelevanten Mutationen beschrieben.

4.6 Stellenwert der Molekulargenetik

Die Durchführung molekulargenetischer Analysen bei Patienten mit Ahornsirup-Krankheit führt zur Erweiterung des Verständnisses der pathogenetischen Grundlagen der Erkrankung. Diese molekularen Grundlagen stellen eine unverzichtbare Voraussetzung für die Etablierung neuer kausaler richtungsweisender und erfolgversprechender Therapieansätze dar. In erster Linie ist hier die somatische Gentherapie zu nennen. Angesichts häufig nur kleiner prozentualer Unterschiede in der enzymatischen Restaktivität, die schwere klassische Verläufe von milderen varianten Verläufen der Erkrankung trennen, erscheint die Ahornsirup-Krankheit für eine somatische Gentherapie geeignet. Alternative Ansätze zielen auf in ihren phänotypischen Auswirkungen mildere Mutationen, deren krankheitsrelevanter Effekt in einer Destabilisierung der E1-Komponente des Multienzymkomplexes besteht. Die Entwicklung kleinmolekularer Substanzen mit hoher spezifischer Affinität zur E1-Komponente sollen, als Medikament verabreicht, dieser mutationsbedingten Destabilisierung des Proteins während und nach der Faltung entgegenwirken und so die phänotypischen Auswirkungen der Erkrankung lindern können (Ævarsson et al. 2000).

Da die Diagnose der Ahornsirup-Krankheit anhand klinischer und biochemischer Parameter schnell und problemlos möglich ist, spielt die Molekulargenetik in der routinemäßigen primären Diagnostik keine wesentliche Rolle. Der molekulargenetische Nachweis krankheitsrelevanter Mutationen ist jedoch im Einzelfall von großer Bedeutung für die genetische Beratung betroffener Familien. So ist bei bekannter Mutation zum einen die gezielte Untersuchung weiterer phänotypisch gesunder Familienmitglieder und zum anderen eine ausgesprochen sichere und verlässliche Pränataldiagnostik möglich. Im Gegensatz zu allen biochemischen diagnostischen Methoden erlaubt die Molekulargenetik die Ermittlung des Heterozygotenstatus gesunder Verwandter von Betroffenen bzw. die

Identifizierung gesunder Träger und damit Überträger relevanter Mutationen. Dies ist nicht zuletzt für Familien mit Stammbäumen mit bereits vielen Betroffenen aufgrund zahlreicher Blutsverwandtschaften, wie sie z.B. häufiger in der Türkei anzutreffen sind, von großem Wert.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende klinisch-experimentelle Arbeit untersucht den Phänotyp und den Genotyp von Patienten mit Ahornsirup-Krankheit. Hierzu wurden 24 Patienten klinisch und biochemisch charakterisiert. Drei der sechs die Komponenten des Multienzymkomplexes der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase kodierenden Gene, in denen bereits zum Phänotyp der Ahornsirup-Krankheit führende Defekte aus der Literatur bekannt sind, wurden bei diesen Patienten auf das Vorhandensein von Mutationen untersucht: Das E1 α -Gen, das E1 β -Gen und das E2-Gen. Der Genotyp der einzelnen Patienten wurde dem klinisch-biochemischen Phänotyp gegenübergestellt. Zum Nachweis der Mutationen wurden vor allem die SSCP-Screeninguntersuchung und die Sequenzierung von PCR-Produkten etabliert und optimiert.

Die klinisch-biochemische Charakterisierung der 24 Patienten ergab die Einteilung in eine Gruppe von 17 Patienten mit der schweren klassischen Verlaufsform der Ahornsirup-Krankheit und eine Gruppe von sieben Patienten mit mildereren varianten Verlaufsformen der Erkrankung. Bei 13 Patienten konnte in beiden Allelen für eines der drei in Frage kommenden Gene eine Mutation nachgewiesen werden. Bei sechs Patienten konnte nur ein verändertes Allel identifiziert werden. Bei fünf Patienten konnte jeweils in keinem der möglichen sechs Allele ein krankheitsrelevantes Mutationsereignis aufgedeckt werden. Insgesamt wurden 21 unterschiedliche Mutationen gefunden, davon sieben im E1 α -Gen, zehn im E1 β -Gen und vier im E2-Gen. Im E1 α -Gen zeigten sich ferner zwei unterschiedliche Polymorphismen. 15 der 21 detektierten Mutationen wurden erstmals im Rahmen dieser Arbeit beschrieben. Sechs der nachgewiesenen Mutationen sind bereits aus der Literatur bekannt, darunter die gesondert hervorzuhebende sogenannte Mennoniten-Mutation Y393N. Es besteht eine Korrelation des klinischen Phänotyps mit dem biochemischen Phänotyp. Es ergibt sich jedoch keine sichere Beziehung zwischen dem Genotyp und dem klinisch-biochemischen Phänotyp der Patienten. Die in dieser Arbeit durchgeführte molekulare Charakterisierung von Patienten mit Ahornsirup-Krankheit erweitert das Verständnis der pathogenetischen Grundlagen der Erkrankung und ist grundlegende Voraussetzung für neue richtungsweisende kausale Therapieansätze.

6 Literaturverzeichnis

- Ævarsson A, Chuang JL, Wynn RM, Turley S, Chuang DT, Hol WG (2000) Crystal structure of human branched-chain α -ketoacid dehydrogenase and the molecular basis of multienzyme complex deficiency in maple syrup urine disease. *Structure Fold Des* 8: 277-91.
- Ævarsson A, Seger K, Turley S, Sokatch JR, Hol WG (1999) Crystal structure of 2-oxoisovalerate and dehydrogenase and the architecture of 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. *Nat Struct Biol* 6: 785-92.
- Antonarakis SE (1998) Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* 11: 1-3.
- Auerbach V, DiGeorge A (1973) Maple syrup urine disease. In: Van Den Berg C (ed) *Inborn errors of metabolism*. Academic Press, London and New York, pp 337-354.
- Baserga SJ, Benz EJ, Jr. (1988) Nonsense mutations in the human β -globin gene affect mRNA metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 2056-60.
- Berget SM (1995) Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem* 270: 2411-4.
- Chicco AG, Adibi SA, Liu WQ, Morris SM, Jr., Paul HS (1994) Regulation of gene expression of branched-chain keto acid dehydrogenase complex in primary cultured hepatocytes by dexamethasone and a cAMP analog. *J Biol Chem* 269: 19427-34.
- Chinsky J, Appel M, Almashanu S, Costeas P, Ambulos N, Jr., Carmi R (1998) A nonsense mutation (R242X) in the branched-chain α -keto acid dehydrogenase E1 α subunit gene (BCKDHA) as a cause of maple syrup urine disease. *Mutations in brief no. 160*. Online. *Hum Mutat* 12: 136.

- Chinsky JM, Bohlen LM, Costeas PA (1994) Noncoordinated responses of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase subunit genes to dietary protein. *Faseb J* 8: 114-20.
- Chinsky JM, Costeas PA (1993) Molecular cloning and analysis of the expression of the E1 β subunit of branched chain α -ketoacid dehydrogenase in mice. *Biochim Biophys Acta* 1216: 499-503.
- 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 α -keto acid dehydrogenase complex. *Mol Biol Med* 8: 49-63.
- Chuang DT, Hu CW, Patel MS (1983) Induction of the branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex in 3T3-L1 adipocytes during differentiation. *Biochem J* 214: 177-81.
- Chuang DT, Shih VE (2001) Maple Syrup Urine Disease (Branched-Chain Ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudet A, Sly W, D V (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn, vol II. McGraw-Hill, New York, pp 1971-2006 (chapter 87).
- Chuang JL, Cox RP, Chuang DT (1993) Characterization of the promoter-regulatory region and structural organization of E1 α gene (BCKDHA) of human branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. *J Biol Chem* 268: 8309-16.
- Chuang JL, Cox RP, Chuang DT (1996) Maple syrup urine disease: the E1 β gene of human branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex has 11 rather than 10 exons, and the 3' UTR in one of the two E1 β mRNAs arises from intronic sequences. *Am J Hum Genet* 58: 1373-7.

- Chuang JL, Cox RP, Chuang DT (1997) E2 transacylase-deficient (type II) maple syrup urine disease. Aberrant splicing of E2 mRNA caused by internal intronic deletions and association with thiamine-responsive phenotype. *J Clin Invest* 100: 736-44.
- Chuang JL, Davie JR, Chinsky JM, Wynn RM, Cox RP, Chuang DT (1995) Molecular and biochemical basis of intermediate maple syrup urine disease. Occurrence of homozygous G245R and F364C mutations at the E1 α locus of Hispanic-Mexican patients. *J Clin Invest* 95: 954-63.
- Chuang JL, Fisher CR, Cox RP, Chuang DT (1994) Molecular basis of maple syrup urine disease: novel mutations at the E1 α locus that impair E1($\alpha_2\beta_2$) assembly or decrease steady-state E1 α mRNA levels of branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. *Am J Hum Genet* 55: 297-304.
- Clow CL, Reade TM, Scriver CR (1981) Outcome of early and long-term management of classical maple syrup urine disease. *Pediatrics* 68: 856-62.
- Corkey BE, Martin-Requero A, Walajtys-Rode E, Williams RJ, Williamson JR (1982) Regulation of the branched chain α -ketoacid pathway in liver. *J Biol Chem* 257: 9668-76.
- Costeas PA, Chinsky JM (1996) Effects of insulin on the regulation of branched-chain α -keto acid dehydrogenase E1 α subunit gene expression. *Biochem J* 318: 85-92.
- Costeas PA, Tonelli LA, Chinsky JM (1996) Molecular cloning of the murine branched chain α -ketoacid dehydrogenase E2 subunit: presence of 3' B1 repeat elements. *Biochim Biophys Acta* 1305: 25-8.
- Crabb DW, Deaven LL, Luedemann M, Zhang B, Harris RA (1989) Assignment of the gene for the E1 α subunit of branched chain α -ketoacid dehydrogenase to chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 50: 40-1.

- Creighton TE (1983) *Proteins: Structures and Molecular Properties*. Freeman, New York, p 235.
- Daar IO, Maquat LE (1988) Premature translation termination mediates triosephosphate isomerase mRNA degradation. *Mol Cell Biol* 8: 802-13.
- Dancis J, Hutzler J, Snyderman SE, Cox RP (1972) Enzyme activity in classical and variant forms of maple syrup urine disease. *J Pediatr* 81: 312-20.
- Danner DJ, Sewell ET, Elsas LJ (1982) Clofibrac acid and phenylpyruvic acid as biochemical probes for studying soluble bovine liver branched chain ketoacid dehydrogenase. *J Biol Chem* 257: 659-62.
- Dariush N, Fisher CW, Cox RP, Chuang DT (1991) Structure of the gene encoding the entire mature E1 α subunit of human branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. *FEBS Lett* 284: 34-8.
- Dursun A, Henneke M, Ozgul K, Gartner J, Coskun T, Tokatli A, Kalkanoglu HS, Demirkol M, Wendel U, Ozalp I (2002) Maple syrup urine disease: mutation analysis in Turkish patients. *J Inherit Metab Dis* 25: 89-97.
- Edelmann L, Wasserstein MP, Kornreich R, Sansaricq C, Snyderman SE, Diaz GA (2001) Maple syrup urine disease: identification and carrier-frequency determination of a novel founder mutation in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 69: 863-8.
- Feigenbaum AS, Robinson BH (1993) The structure of the human dihydrolipoamide dehydrogenase gene (DLD) and its upstream elements. *Genomics* 17: 376-81.
- Fekete G, Plattner R, Crabb DW, Zhang B, Harris RA, Heerema N, Palmer CG (1989) Localization of the human gene for the E1 α subunit of branched chain keto acid dehydrogenase (BCKDHA) to chromosome 19q13.1-q13.2. *Cytogenet Cell Genet* 50: 236-7.

- Fisher CR, Chuang JL, Cox RP, Fisher CW, Star RA, Chuang DT (1991b) Maple syrup urine disease in Mennonites. Evidence that the Y393N mutation in E1 α impedes assembly of the E1 component of branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. *J Clin Invest* 88: 1034-7.
- Fisher CR, Fisher CW, Chuang DT, Cox RP (1991a) Occurrence of a Tyr393 \rightarrow Asn (Y393N) mutation in the E1 α gene of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex in maple syrup urine disease patients from a Mennonite population. *Am J Hum Genet* 49: 429-34.
- 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 Hum Genet* 52: 414-24.
- Fisher CW, Lau KS, Fisher CR, Wynn RM, Cox RP, Chuang DT (1991c) A 17-bp insertion and a Phe215 \rightarrow Cys missense mutation in the dihydrolipoyl transacylase (E2) mRNA from a thiamine-responsive maple syrup urine disease patient WG-34. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 804-9.
- Garrod A (1908) Inborn errors of metabolism (Croonian Lectures). *Lancet* 2: 1-7, 73-79, 142-148, 214-220.
- Griffin TA, Lau KS, Chuang DT (1988) Characterization and conservation of the inner E2 core domain structure of branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex from bovine liver. Construction of a cDNA encoding the entire transacylase (E2b) precursor. *J Biol Chem* 263: 14008-14.
- Harper PA, Dennis JA, Healy PJ, Brown GK (1989) Maple syrup urine disease in calves: a clinical, pathological and biochemical study. *Aust Vet J* 66: 46-9.
- Harper PA, Healy PJ, Dennis JA (1986) Maple syrup urine disease as a cause of spongiform encephalopathy in calves. *Vet Rec* 119: 62-5.

- Hartl FU, Martin J, Neupert W (1992) Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21: 293-322.
- Hartl FU, Pfanner N, Nicholson DW, Neupert W (1989) Mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* 988: 1-45.
- Haworth JC, Perry TL, Blass JP, Hansen S, Urquhart N (1976) Lactic acidosis in three sibs due to defects in both pyruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase complexes. *Pediatrics* 58: 564-72.
- Hayashida Y, Mitsubuchi H, Indo Y, Ohta K, Endo F, Wada Y, Matsuda I (1994) Deficiency of the E1 β subunit in the branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex due to a single base substitution of the intron 5, resulting in two alternatively spliced mRNAs in a patient with maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 1225: 317-25.
- Henneke M, Dursun A, Wendel U, Gärtner J (1998) Mutationsanalyse bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit (MSUD). *Monatsschr Kinderheilkd* 5: 545.
- Henneke M, Gärtner J, Schadewaldt P, Wendel U (1999) Molekulargenetik der Ahornsirupkrankheit (MSUD). *Monatsschr Kinderheilkd* 5: 537.
- 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 Hum Genet* 48: 342-50.
- 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: 236-42.
- Hilliges C, Awiszus D, Wendel U (1993) Intellectual performance of children with maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 152: 144-7.

- Hu CW, Lau KS, Griffin TA, Chuang JL, Fisher CW, Cox RP, Chuang DT (1988) Isolation and sequencing of a cDNA encoding the decarboxylase (E1) α precursor of bovine branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. Expression of E1 α mRNA and subunit in maple-syrup-urine- disease and 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 263: 9007-14.
- Huang Y, Chuang DT (1996) Structural organization of the rat branched-chain 2-oxo-acid dehydrogenase kinase gene and partial characterization of the promoter-regulatory region. *Biochem J* 313: 603-9.
- Indo Y, Akaboshi I, Nobukuni Y, Endo F, Matsuda I (1988) Maple syrup urine disease: a possible biochemical basis for the clinical heterogeneity. *Hum Genet* 80: 6-10.
- Johanning GL, Morris JI, Madhusudhan KT, Samols D, Patel MS (1992) Characterization of the transcriptional regulatory region of the human dihydrolipoamide dehydrogenase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10964-8.
- Kaplan P, Mazur A, Field M, Berlin JA, Berry GT, Heidenreich R, Yudkoff M, Segal S (1991) Intellectual outcome in children with maple syrup urine disease. *J Pediatr* 119: 46-50.
- Kaplan P, Mazur A, Smith R (1997) Transplantation for maple syrup urine disease (MSUD) and methylmalonic acidopathy (MMA). *J Inherit Metab Dis* 20: 37.
- Kleijer WJ, Horsman D, Mancini GM, Fois A, Boue J (1985) First-trimester diagnosis of maple syrup urine disease on intact chorionic villi. *N Engl J Med* 313: 1608.
- 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.

- Koyata H, Cox RP, Chuang DT (1993) Stable correction of maple syrup urine disease in cells from a Mennonite patient by retroviral-mediated gene transfer. *Biochem J* 295: 635-9.
- Lau KS, Eddy RL, Shows TB, Fisher CW, Chuang DT, Cox RP (1991) Localization of the dihydrolipoamide branched-chain transacylase gene (DBT) of the human branched-chain keto acid dehydrogenase complex to chromosome 1. *Cytogenet Cell Genet* 56: 33-5.
- Lau KS, Herring WJ, Chuang JL, McKean M, Danner DJ, Cox RP, Chuang DT (1992) Structure of the gene encoding dihydrolipoyl transacylase (E2) component of human branched chain α -keto acid dehydrogenase complex and characterization of an E2 pseudogene. *J Biol Chem* 267: 24090-6.
- Lindsay JG (1989) Targeting of 2-oxo acid dehydrogenase complexes to the mitochondrion. *Ann N Y Acad Sci* 573: 254-66.
- MacDonald MJ, McKenzie DI, Kaysen JH, Walker TM, Moran SM, Fahien LA, Towle HC (1991) Glucose regulates leucine-induced insulin release and the expression of the branched chain ketoacid dehydrogenase E1 α subunit gene in pancreatic islets. *J Biol Chem* 266: 1335-40.
- Marshall La, DiGeorge A (1981) Maple syrup urine disease in the old order Mennonites. *Am J Hum Genet* 33: 139A.
- Matsuda I, Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Indo Y, Endo F, Asaka J, Harada A (1990) A T-to-A substitution in the E1 α subunit gene of the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex in two cell lines derived from Menonite maple syrup urine disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 646-51.
- Mattevi A, Obmolova G, Schulze E, Kalk KH, Westphal AH, de Kok A, Hol WG (1992) Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Science* 255: 1544-50.

- Mattevi A, Schierbeek AJ, Hol WG (1991) Refined crystal structure of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* at 2.2 Å resolution. A comparison with the structure of glutathione reductase. *J Mol Biol* 220: 975-94.
- McKean MC, Winkeler KA, Danner DJ (1992) Nucleotide sequence of the 5' end including the initiation codon of cDNA for the E1 α subunit of the human branched chain α -ketoacid dehydrogenase complex. *Biochim Biophys Acta* 1171: 109-12.
- Meng M, Chuang DT (1994) Site-directed mutagenesis and functional analysis of the active-site residues of the E2 component of bovine branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. *Biochemistry* 33: 12879-85.
- Menkes J, Hurst P, Craig J (1954) A new syndrome: Progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* 14: 462-466.
- Mitsubuchi H, Matsuda I, Nobukuni Y, Heidenreich R, Indo Y, Endo F, Mallee J, Segal S (1992) Gene analysis of Mennonite maple syrup urine disease kindred using primer-specified restriction map modification. *J Inher Metab Dis* 15: 181-7.
- Mitsubuchi H, Nobukuni Y, Akaboshi I, Indo Y, Endo F, Matsuda I (1991a) Maple syrup urine disease caused by a partial deletion in the inner E2 core domain of the branched chain α -keto acid dehydrogenase complex due to aberrant splicing. A single base deletion at a 5'-splice donor site of an intron of the E2 gene disrupts the consensus sequence in this region. *J Clin Invest* 87: 1207-11.
- Mitsubuchi H, Nobukuni Y, Endo F, Matsuda I (1991b) Structural organization and chromosomal localization of the gene for the E1 β subunit of human branched chain α -keto acid dehydrogenase. *J Biol Chem* 266: 14686-91.
- Morris M, Lewis B, Doolan P, Harper H (1961) Clinical and biochemical observations on an apparent non-fatal variant of branched-chain ketoaciduria (maple syrup urine disease). *Pediatrics* 25: 72.

- Mueller GM, McKenzie LR, Homanics GE, Watkins SC, Robbins PD, Paul HS (1995) Complementation of defective leucine decarboxylation in fibroblasts from a maple syrup urine disease patient by retrovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2: 461-8.
- Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, Highsmith WE, Jr. (1999) Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis* 20: 1177-85. [pii]
- Naughten ER, Jenkins J, Francis DE, Leonard JV (1982) Outcome of maple syrup urine disease. *Arch Dis Child* 57: 918-21.
- Nellis MM, Danner DJ (2001) Gene preference in maple syrup urine disease. *Am J Hum Genet* 68: 232-7.
- Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Akaboshi I, Indo Y, Endo F, Yoshioka A, Matsuda I (1991) Maple syrup urine disease. Complete defect of the E1 β subunit of the branched chain α -ketoacid 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: 1862-6.
- Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Endo F, Asaka J, Oyama R, Titani K, Matsuda I (1990) Isolation and characterization of a complementary DNA clone coding for the E1 β subunit of the bovine branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex: complete amino acid sequence of the precursor protein and its proteolytic processing. *Biochemistry* 29: 1154-60.
- 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 α and E1 β subunits of the branched-chain α -keto-acid dehydrogenase multienzyme complex. *Biochim Biophys Acta* 1225: 64-70.

- Ono K, Hakozaiki M, Nishimaki H, Kochi H (1987) Purification and characterization of human liver branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. *Biochem Med Metab Biol* 37: 133-41.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2766-70.
- Otulakowski G, Robinson BH (1987) Isolation and sequence determination of cDNA clones for porcine and human lipoamide dehydrogenase. Homology to other disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem* 262: 17313-8.
- Parrella T, Surrey S, Iolascon A, Sartore M, Heidenreich R, Diamond G, Ponzzone A, Guardamagna O, Burlina AB, Cerone R, et al. (1994) Maple syrup urine disease (MSUD): screening for known mutations in Italian patients. *J Inherit Metab Dis* 17: 652-60.
- Patel TB, DeBuysere MS, Barron LL, Olson MS (1981) Studies on the regulation of the branched chain α -keto acid dehydrogenase in the perfused rat liver. *J Biol Chem* 256: 9009-15.
- Paxton R, Kuntz M, Harris RA (1986) Phosphorylation sites and inactivation of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase isolated from rat heart, bovine kidney, and rabbit liver, kidney, heart, brain, and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 244: 187-201.
- Pettit FH, Yeaman SJ, Reed LJ (1978) Purification and characterization of branched chain α -keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 4881-5.
- Podebrad F, Heil M, Reichert S, Mosandl A, Sewell AC, Bohles H (1999) 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2[5H]-furanone (sotolone) -the odour of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 22: 107-14.

- Reed LJ, Damuni Z, Merryfield ML (1985) Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain α -keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation-dephosphorylation. *Curr Top Cell Regul* 27: 41-9.
- Russell GC, Guest JR (1991) Sequence similarities within the family of dihydrolipoamide acyltransferases and discovery of a previously unidentified fungal enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1076: 225-32.
- Sallan SE, Cottom D (1969) Peritoneal dialysis in maple syrup urine disease. *Lancet* 2: 1423-4.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7.
- Schadewaldt P, Bodner A, Brosicke H, Hammen HW, Wendel U (1998) Assessment of whole body L-leucine oxidation by noninvasive 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 (1999) Significance of L-Alloisoleucine in Plasma for Diagnosis of Maple Syrup Urine Disease. *Clin Chem* 45: 1734-40.
- Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U (2001) Whole-body L-leucine oxidation in patients with variant form of maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 49: 627-35.
- Scherer SW, Otulakowski G, Robinson BH, Tsui LC (1991) Localization of the human dihydrolipoamide dehydrogenase gene (DLD) to 7q31-q32. *Cytogenet Cell Genet* 56: 176-7.
- Schulman JD, Lustberg TJ, Kennedy JL, Museles M, Seegmiller JE (1970) A new variant of maple syrup urine disease (branched chain ketoaciduria). Clinical and biochemical evaluation. *Am J Med* 49: 118-24.

- Scriver CR, Mackenzie S, Clow CL, Delvin E (1971) Thiamine-responsive maple-syrup-urine disease. *Lancet* 1: 310-2.
- Senapathy P, Shapiro MB, Harris NL (1990) Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol* 183: 252-78.
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16: 325-32.
- Silberberg DH (1969) Maple syrup urine disease metabolites studies in cerebellum cultures. *J Neurochem* 16: 1141-6.
- Snyderman SE (1988) Treatment outcome of maple syrup urine disease. *Acta Paediatr Jpn* 30: 417-24.
- Snyderman SE, Norton P, Roitman E, Holt L, Jr (1964) Maple syrup urine disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics* 34: 454.
- Suggs SV, Hirose T, Myake EH, Kawashima MJ, Johnson KI, Wallace, RB (1981) Using purified genes. *ICN-UCLA Symp Mol Cell Biol* 23: 683-93.
- 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.
- Tsuruta M, Mitsubuchi H, Mardy S, Miura Y, Hayashida Y, Kinugasa A, Ishitsu T, Matsuda I, Indo Y (1998) Molecular basis of intermittent maple syrup urine disease: novel mutations in the E2 gene of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. *J Hum Genet* 43: 91-100.

- Wendel U, Becker K, Przyrembel H, Bulla M, Manegold C, Mench-Hoinowski A, Langenbeck U (1980) Peritoneal dialysis in maple-syrup-urine disease: studies on branched- chain amino and keto acids. *Eur J Pediatr* 134: 57-63.
- Wendel U, Claussen U (1979) Antenatal diagnosis of maple-syrup-urine disease. *Lancet* 1: 161-2.
- Wendel U, Langenbeck U, Lombeck I, Bremer HJ (1982a) Maple syrup urine disease -therapeutic use of insulin in catabolic states. *Eur J Pediatr* 139: 172-5.
- 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: 293-6.
- Wendel U, Langenbeck U, Seakins JW (1989) Interrelation between the metabolism of L-isoleucine and L-allo- isoleucine in patients with maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 25: 11-4.
- Wendel U, Rudiger HW, Passarge E, Mikkelsen M (1973) Maple syrup urine disease: rapid prenatal diagnosis by enzyme assay. *Humangenetik* 19: 127-8.
- Wendel U, Saudubray JM, Bodner A, Schadewaldt P (1999) Liver transplantation in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 158 Suppl 2: S60-4.
- Westall R, Dancis J, Miller S (1957) Maple syrup urine disease. *Am J Dis Child* 94: 571.
- Williamson JR, Walajtys-Rode E, Coll KE (1979) Effects of branched chain α -ketoacids on the metabolism of isolated rat liver cells. I. Regulation of branched chain α -ketoacid metabolism. *J Biol Chem* 254: 11511-20.
- Wynn RM, Chuang JL, Sansaricq C, Mandel H, Chuang DT (2001) Biochemical basis of type IB (E1 β) mutations in maple syrup urine disease. A prevalent allele in patients from the Druze kindred in Israel. *J Biol Chem* 276: 36550-6.

- Wynn RM, Davie JR, Chuang JL, Cote CD, Chuang DT (1998) Impaired assembly of E1 decarboxylase of the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex in type IA maple syrup urine disease. *J Biol Chem* 273: 13110-8.
- Wynn RM, Davie JR, Cox RP, Chuang DT (1992) Chaperonins groEL and groES promote assembly of heterotetramers ($\alpha_2\beta_2$) of mammalian mitochondrial branched-chain α -keto acid decarboxylase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267: 12400-3.
- Wynn RM, Song JL, Chuang DT (2000) GroEL/GroES promote dissociation/reassociation cycles of a heterodimeric intermediate during $\alpha_2\beta_2$ protein assembly. Iterative annealing at the quaternary structure level. *J Biol Chem* 275: 2786-94.
- Yeaman SJ (1986) The mammalian 2-oxoacid dehydrogenase: A complex family. *Trends Biochem Sci* 11: 293.
- Yeaman SJ (1989) The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem J* 257: 625-32.
- Zhang B, Edenberg HJ, Crabb DW, Harris RA (1989) Evidence for both a regulatory mutation and a structural mutation in a family with maple syrup urine disease. *J Clin Invest* 83: 1425-9.
- Zhang B, Healy PJ, Zhao Y, Crabb DW, Harris RA (1990) Premature translation termination of the pre-E1 α subunit of the branched chain α -ketoacid dehydrogenase as a cause of maple syrup urine disease in Polled Hereford calves. *J Biol Chem* 265: 2425-7.
- Zhang B, Kuntz MJ, Goodwin GW, Harris RA, Crabb DW (1987) Molecular cloning of a cDNA for the E1 α subunit of rat liver branched chain α -ketoacid dehydrogenase. *J Biol Chem* 262: 15220-4.

Zhao Y, Kuntz MJ, Harris RA, Crabb DW (1992) Molecular cloning of the E1 β subunit of the rat branched chain α -ketoacid dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1132: 207-10.

Zneimer SM, Lau KS, Eddy RL, Shows TB, Chuang JL, Chuang DT, Cox RP (1991) Regional assignment of two genes of the human branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex: the E1 β gene (BCKDHB) to chromosome 6p21-22 and the E2 gene (DBT) to chromosome 1p31. *Genomics* 10: 740-7.

Anhang

Tabelle I: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNS des E1 α -Gens.

Exon Nr.	PCR-Produkt Länge (bp)	Sequenz		Sequenz		Annealing-Temperatur (°C)
		Primer Sense (5'-3')	Position	Primer Antisense (5'-3')	Position	
1	182	gaccgctgagtggttag	Exon 1	gcctggggcccaggctactc	Intron 1	58
2	320	tcgttctgatgcagggtctc	Intron 1	gtggaggcacagatagacgt	Intron 2	58
3	135	ccacgtctatctgtgcctcc	Intron 2	ctagtctgtccccacgcac	Intron 3	58
4	149	cgggccactccacccccag	Intron 3	caaaccacggacagacgtac	Intron 4	60
5	202	attgcctcctcccctcctag	Intron 4	acagggcatgcatcctcac	Intron 5	55
6	247	caccctctcatcccctgcag	Intron 5	gcatccagcagagcccatac	Intron 6	58
7	240	tcgtgatgttcttatctcagc	Intron 6	gtcagtctgtgggatgct	Intron 7	57
8	210	ccccttgcctctgtgcag	Intron 7	tccggccgggcaccctcac	Intron 8	55
9	243	tagcctgccactgcccctgt	Intron 8	tctcgggtacctgaggatgg	Exon 9	60

Tabelle II: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNS des E1 β -Gens.

Exon Nr.	PCR-Produkt Länge (bp)	Sequenz		Sequenz		Annealing-Temperatur (°C)
		Primer Sense (5'-3')	Position	Primer Antisense (5'-3')	Position	
1	255	ctgcatagcctgagaatc	Exon 1	ccgagtgggcagctcccag	Intron 1	58
2	108	tttgattttcacagggc	Intron 1	acatatcagggttacctg	Intron 2	50
3	99	aatactgttttcagtaa	Intron 2	taggtattacttaccat	Intron 3	47
4	164	ctttctattttaaggaa	Intron 3	tgttcattcactacctg	Intron 4	42
5	186	ctttctgaccctcagatt	Intron 4	cataaatgaacatacctt	Intron 5	48
6	139	aatctgttttgcagggtg	Intron 5	aaagaaaatctttacctg	Intron 6	50
7	128	ctgttctgtatttagcgg	Intron 6	atcaatgctactacctg	Intron 7	56
8	141	ttctcttatttcaggtt	Intron 7	ccattatattacacctt	Intron 8	48
9	117	tctttctcttcagtct	Intron 8	caaaaattactctacctg	Intron 9	48
10	216	tgactctgtctgcaggag	Intron 9	cagtacgttaatgtcagg	Intron 10	55

Tabelle III: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNS und Teilen der cDNS des E2-Gens.

Exon Nr.	PCR-Produkt		Sequenz			Annealing-Temperatur (°C)	
	Länge (bp)	Sequenz	Primer Sense (5'-3')	Position	Primer Antisense (5'-3')		Position
1	114		gagtctctccagttgcg	(-43)-(-26)	atctgcccacacgtgctt	Intron 1	60
2	108		gagataagccggtatggttg	Intron 1	ccggctagaaatacacagtc	Intron 2	52
3	293		cctctgcctgagaacatt	Intron 2	aaatggattcccactatcc	Intron 3	55
4	322		gatctgtacttatgactg	Intron 3	taattggaccacaatgac	Intron 4	52
5	341		ctccataccattaggatagtg	Intron 4	gtacactcctatacaatctcaga	Intron 5	52
6	373		actgtcagttgatcaaattcc	Intron 5	ctactactgaggtagcttcc	Intron 6	58
7	378		aaagggtttaactgagag	Intron 6	aagagcaaaactctgtctc	Intron 7	50
8	205		cttattgttcaattctc	Intron 7	gtctctaactacaagcac	Intron 8	50
8 (cDNS)	162		cgtggaattaaactctcc	c.901-918	caaaccctgctcagtatc	c.1045-1062	55
9	375		gatggcagtggaaggtgatc	Intron 8	ggaacaaatgccaagtgac	Intron 9	52
10	210		agtcacttggcattgttccc	Intron 9	ctctcattgttagtccctg	Intron 10	52
11	273		cttgagctctgaacaagtg	Intron 10	caagaatgtcttatcagt	Exon 11	52

Lebenslauf

Name Marco Henneke
Geburtsdatum 14. Januar 1974
Geburtsort Remscheid
Familienstand ledig

Schulbildung

1980-1984 Städt. Grundschule Ferdinand-Lassalle-Str.,
Wuppertal
1984-1990 Städt. Gymnasium a.d. Siegesstr., Wuppertal
1990-1993 Städt. Leibniz-Gymnasium, Remscheid
Juni 1993 Abitur

Zivildienst

August 1993-Oktober 1994 Malteser-Hilfsdienst, Solingen
Bereich Krankentransport/Rettungsdienst
Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium

Oktober 1994 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der
Heinrich Heine-Universität Düsseldorf
September 1996 Ärztliche Vorprüfung
August 1997 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 2000 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Juni 2001 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

August 2001-Januar 2002 Arzt im Praktikum, Medizinische Klinik I
Sana-Klinikum Remscheid GmbH
seit Februar 2002 Arzt im Praktikum, Zentrum für Kinderheilkunde der
Heinrich Heine-Universität Düsseldorf

Zusammenfassung – Klinische und molekulare Charakterisierung von Patienten mit Ahornsirup-Krankheit vorgelegt von Marco Henneke

Die vorliegende klinisch-experimentelle Arbeit untersucht den Phänotyp und den Genotyp von Patienten mit Ahornsirup-Krankheit. Hierzu wurden 24 Patienten klinisch und biochemisch charakterisiert. Drei der sechs die Komponenten des Multienzymkomplexes der verzweigt-kettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase kodierenden Gene, in denen bereits zum Phänotyp der Ahornsirup-Krankheit führende Defekte aus der Literatur bekannt sind, wurden bei diesen Patienten auf das Vorhandensein von Mutationen untersucht: das E1 α -Gen, das E1 β -Gen und das E2-Gen. Der Genotyp der einzelnen Patienten wurde dem klinisch-biochemischen Phänotyp gegenübergestellt. Zum Nachweis der Mutationen wurden vor allem die SSCP-Screeninguntersuchung und die Sequenzierung von PCR-Produkten etabliert und optimiert.

Die klinisch-biochemische Charakterisierung der 24 Patienten ergab die Einteilung in eine Gruppe von 17 Patienten mit der schweren klassischen Verlaufsform der Ahornsirup-Krankheit und eine Gruppe von sieben Patienten mit mildereren varianten Verlaufsformen der Erkrankung. Bei 13 Patienten konnte in beiden Allelen für eines der drei in Frage kommenden Gene eine Mutation nachgewiesen werden. Bei sechs Patienten konnte nur ein verändertes Allel identifiziert werden. Bei fünf Patienten konnte jeweils in keinem der möglichen sechs Allele ein krankheitsrelevantes Mutationsereignis aufgedeckt werden. Insgesamt wurden 21 unterschiedliche Mutationen gefunden, davon sieben im E1 α -Gen, zehn im E1 β -Gen und vier im E2-Gen. Im E1 α -Gen zeigten sich ferner zwei unterschiedliche Polymorphismen. 15 der 21 detektierten Mutationen wurden erstmals im Rahmen dieser Arbeit beschrieben. Sechs der nachgewiesenen Mutationen sind bereits aus der Literatur bekannt, darunter die gesondert hervorzuhebende sogenannte Mennoniten-Mutation Y393N. Es besteht eine Korrelation des klinischen Phänotyps mit dem biochemischen Phänotyp. Es ergibt sich jedoch keine sichere Beziehung zwischen dem Genotyp und dem klinisch-biochemischen Phänotyp der Patienten. Die in dieser Arbeit durchgeführte molekulare Charakterisierung von Patienten mit Ahornsirup-Krankheit erweitert das Verständnis der pathogenetischen Grundlagen der Erkrankung und ist grundlegende Voraussetzung für neue richtungsweisende kausale Therapieansätze.