

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Ertan Mayatepek

Relevanz verminderter Aktivität  
der Very-Long-Chain Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase  
bei Neugeborenen

Dissertation

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

vorgelegt von  
Ulrike Johanna Haußmann

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referentin: Univ.-Prof. Dr. Spiekerkötter

Korreferentin: Prof. Dr. Royer-Pokora

Meinem Vater Werner Haußmann in Dankbarkeit gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

ter Veld, Frank; Mueller, Martina; Kramer, Simone; Haussmann, Ulrike; Herebian, Diran; Mayatepek, Ertan et al. (2009): **A novel tandem mass spectrometry method for rapid confirmation of medium- and very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in newborns.** In: *PLoS ONE* 4 (7), S. e6449

Spiekerkoetter, Ute; Haussmann, Ulrike; Mueller, Martina; ter Veld, Frank; Stehn, Maren; Santer, Rene; Lukacs, Zoltan (2010): **Tandem mass spectrometry screening for very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: the value of second-tier enzyme testing.** In: *J. Pediatr* 157 (4), S. 668–673.

Hoffmann, Lars; Haussmann, Ulrike; Mueller, Martina; Spiekerkoetter, Ute (2012): **VLCAD enzyme activity determinations in newborns identified by screening: a valuable tool for risk assessment.** In: *J. Inherit. Metab. Dis* 35 (2), S. 269–277.

# Relevanz verminderter Aktivität der Very-Long-Chain Acyl-Coenzym-A-Dehydrogenase bei Neugeborenen (Zusammenfassung/Abstract)

vorgelegt von Ulrike Johanna Haußmann, 2012

## Ziel:

Das Enzym Very-Long-Chain Acyl-Coenzym-A-Dehydrogenase (*VLCAD*) ist das Schrittmacherenzym der mitochondrialen Fettsäureoxidation. Ein autosomal-rezessiv vererbter Mangel der *VLCAD* kann zu unterschiedlich schweren Phänotypen mit variierendem Manifestationsalter und Krankheitsverlauf führen. Prophylaktische diätetische Maßnahmen können das Auftreten von Symptomen verzögern oder vollständig verhindern. Seit 2003 wurde der *VLCAD*-Mangel auch in das erweiterte Neugeborenencreening aufgenommen. Dabei werden neben klassischen *VLCAD*-Mangel-Patienten mit Enzymrestaktivitäten < 10% eines gesunden Referenzkollektivs auch solche Kinder auffällig, die höhere Enzymaktivitäten zwischen 10% und 50% aufweisen. Die Bedeutung dieser Befunde ist unklar und soll im Rahmen dieser Studie durch die molekulargenetische Charakterisierung und die Analyse der vorliegenden Mutationen und Genotypen geklärt werden.

## Methoden:

Im Rahmen der Konfirmationsdiagnostik wird eine Enzymumsatzmessung des *VLCAD*-Enzyms durchgeführt. Bei Kindern mit Residualaktivitäten zwischen 10% und 50% wurden alle *VLCAD*-Exone und die angrenzenden Intronbereiche sequenziert. Die Mutationen wurden in der Kristallstruktur des Enzyms (*McAndrew et al., 2008*) lokalisiert und mit Hilfe der Ergebnisse der Enzymumsatzmessung, *in silico*-Mutationsanalyseprogrammen und Literaturangaben zum Phänotyp charakterisiert.

## Ergebnisse:

Von April 2007 bis Dezember 2008 wurden 34 Kinder mit positivem Neugeborenencreening und Enzymaktivitäten zwischen 10% und 50% identifiziert und molekulargenetisch untersucht. Fünf Kinder trugen jeweils zwei Mutationen und lagen in Aktivitätsbereichen zwischen 12% und 22%, bei 19 Kindern wurde jeweils eine Mutation gefunden (25% bis 50%) und bei zehn Kindern lag keine Mutation vor (31% bis 50%). Insgesamt wurden 24 verschiedene Mutationen entdeckt: fünf Nullmutationen und 19 *Missense*-Mutationen. Die Charakterisierung der *Missense*-Mutationen mit Hilfe der o.g. Analysekriterien ergab in vier Fällen eindeutige Ergebnisse bezüglich der Dignität, bei den restlichen Mutationen konnte keine eindeutige Klassifizierung vorgenommen werden.

## Fazit:

Die Enzymaktivitätsmessung ist der Goldstandard in der Konfirmationsdiagnostik bei auffälligem Neugeborenencreening mit dem Verdacht auf einen *VLCAD*-Mangel. Darüber hinaus liefert diese Untersuchung weitere Hinweise hinsichtlich des Erkrankungsrisikos der betroffenen Kinder. Je niedriger die Enzymaktivität, desto wahrscheinlicher entwickeln die Patienten Symptome. Ab 30% Enzymaktivität kann ein *VLCAD*-Mangel sicher ausgeschlossen werden. Das Erkrankungsrisiko in einem Aktivitätsbereich von 20% bis 30% bleibt aktuell noch unklar. Aufgrund der ausgeprägten molekularen Heterogenität beim *VLCAD*-Mangel kann eine bestimmte Mutation nur selten einem Schweregrad zugeordnet werden, sodass ein Rückschluss vom Genotyp auf den Phänotyp kaum möglich ist.

## Abkürzungsverzeichnis

ACAD-9	Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase 9
ADP	Adenosindiphosphat
AGS	Adrenogenitales Syndrom
APE	Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Endokrinologie
APS	Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
bp	base pairs
CACT	Carnitin-Acylcarnitin-Translokase
cDNA	coding deoxyribonucleic acid
CoA	Coenzym A
CPT I	Carnitin-Palmitoyl-Coenzym A-Transferase I
CPT II	Carnitin-Palmitoyl-Coenzym A-Transferase II
Cys	Cystein
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäureester
ETF	Elektronen-transferierendes Flavoprotein
FAD	Flavinadenindinukleotid
GA I	Glutarazidurie Typ I
G-BA	Gemeinsamer Bundesausschuss
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure/Glutamat
Gly	Glycin
His	Histidin
HPA	Hyperphenylalaninämie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IVA	Isovalerianazidämie
kDa	Kilo-Dalton (atomare Maßeinheit)
LCAD	Long-Chain Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase
LCHAD	Long-Chain-3-OH Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MCAD	Medium-Chain Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase
MCT-Fett	Medium-Chain-Triglyceride-Fett
Met	Methionin
MMDB	Molecular Modeling Database
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
NAD <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH+H <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NCBI	National Center for Biotechnology Information

PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Phe	Phenylalanin
PKU	Phenylketonurie
Pro	Prolin
SCAD	Short-Chain Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase
Ser	Serin
SOP	Standard Operating Procedure
TBE-Puffer	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Borsäure-Ethyldiamintetraessigsäureester-Puffer
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Val	Valin
VLCAD	Very-Long-Chain Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Das Enzym Very-Long-Chain-Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase (VLCAD).....	2
1.1.1	VLCAD und ihre Rolle in der mitochondrialen $\beta$ -Oxidation.....	2
1.1.2	Struktur und Funktion der VLCAD .....	6
1.2	Very-Long-Chain Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase-Mangel (VLCAD-Mangel).....	11
1.2.1	Symptome und Charakteristika des VLCAD-Mangels.....	12
1.2.2	Diagnostik des VLCAD-Mangels.....	13
1.2.3	Therapeutische Optionen beim VLCAD-Mangel.....	16
1.3	Fragestellung .....	18
2.	Studienteilnehmer, Material und Methoden.....	19
2.1	Studienteilnehmer.....	19
2.2	Material und Methoden .....	20
2.2.1	Erhebung der Acylcarnitinprofile .....	20
2.2.2	Enzymatische Bestimmung der VLCAD-Restaktivität .....	20
2.2.3	Molekulargenetische Analyse der Studienteilnehmer-DNA .....	21
3.	Ergebnisse.....	29
3.1	Studienteilnehmer.....	29
3.1.1	Übersicht aller Studienteilnehmer .....	29
3.1.2	Einteilung der Studienteilnehmer nach Anzahl der identifizierten Mutationen.....	32
3.2	Mutationen.....	33
3.2.1	Nullmutationen .....	33
3.2.2	Missense-Mutationen.....	34
4.	Diskussion.....	49
4.1	Enzymaktivität als Parameter zur Unterscheidung zwischen VLCAD-Mangel-Patienten und gesunden Kindern.....	50
4.2	Mutationen.....	53
4.2.1	Nullmutationen .....	53
4.2.2	Missense-Mutationen.....	54
4.3	Korrelation von Genotyp und Phänotyp .....	56
4.4	Zusammenfassung.....	57
5.	Literaturverzeichnis.....	58

# 1. Einleitung

Die *Very-Long-Chain Acyl-Coenzyme A-Dehydrogenase (VLCAD)* ist ein Enzym der mitochondrialen Fettsäureoxidation. Sie ist für den ersten Schritt der  $\beta$ -Oxidation langkettiger Acyl-Coenzyme As (Acyl-CoAs) mit einer Kettenlänge von 14 bis 18 Kohlenstoffatomen zuständig. Der Genlocus liegt auf Chromosom 17, Region 17p13 (Aoyama *et al.*, 1996). Das Enzym wird nach der Proteinbiosynthese in die mitochondriale Matrix eingeschleust, wo es als membrangebundenes Homodimer das Schrittmacherenzym in der  $\beta$ -Oxidation langkettiger Fettsäuren darstellt.

Ein Mangel des Enzyms wird durch Mutationen auf dem *VLCAD*-Gen hervorgerufen. Der Defekt folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang. Je nach Art und Lokalisation der Mutation im Protein ist die Residualaktivität des Enzyms unterschiedlich stark beeinträchtigt (vgl. Andresen *et al.*, 1999). Aufgrund der Aufnahme des *VLCAD*-Mangels in das erweiterte Neugeborenencreening im Jahr 2003 können Patienten bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome identifiziert werden, sodass eine Therapie frühzeitig eingeleitet werden kann. Als Screeningparameter gelten die C14-Carnitine, insbesondere ein erhöhter C14:1-Carnitin-Wert (Liebig *et al.*, 2006). Es ist notwendig, dass in kataboler Stoffwechsellage am 2. und 3. Lebenstag gescreent wird. In anaboler Stoffwechsellage können auch bei *VLCAD*-Mangel-Patienten Normalwerte dieser Parameter erhoben werden (vgl. Screeningrichtlinien (s.u.), Schymik *et al.*, 2006). Darüber hinaus kann eine massiv aktivierte Fettsäureoxidation bei Gesunden, wie sie z.B. nach längerem Fasten auftritt, auch zu erhöhten C14-Metaboliten führen. Somit ist bei einem positiven Neugeborenencreening-Befund eine weitere Diagnostik notwendig, um zwischen *VLCAD*-Mangel-Patienten und gesunden Neugeborenen sicher zu unterscheiden (Arnold *et al.*, 2009). Die Messung der Palmitoyl-Coenzyme A (Palmitoyl-CoA)-Oxidationsrate gibt den Umsatz des Substrates Palmitoyl-CoA an, das vornehmlich von der *VLCAD* katalysiert wird. Anhand der Umsatzrate kann die Restaktivität des Enzyms angegeben werden, die schwere von milden Verlaufsformen unterscheidet. Für sehr niedrige Restaktivitäten < 10% ist die Diagnose eindeutig gesichert. Seit Implementierung des erweiterten Neugeborenencreenings werden jedoch zunehmend mehr Patienten mit mildereren, teils asymptomatischen Phänotypen und Residualaktivitäten > 10% identifiziert, deren klinische Relevanz unklar ist.

In der folgenden Arbeit wird eine molekulargenetische Charakterisierung des *VLCAD*-Gens von Neugeborenen mit einer *VLCAD*-Residualaktivität zwischen 10% und 50% vorgenommen und deren Stellenwert für die zukünftige Diagnostik des *VLCAD*-Mangels beschrieben. Die detektierten Mutationen werden dabei nach biochemischen Gesichtspunkten sowie mit Hilfe von Kenntnissen über die *VLCAD*-Struktur und von *in silico*-Analyseprogrammen weiter untersucht.

## 1.1 Das Enzym Very-Long-Chain-Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase (VLCAD)

### 1.1.1 VLCAD und ihre Rolle in der mitochondrialen $\beta$ -Oxidation

Im Rahmen der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation werden Fettsäuren aktiviert, in die Mitochondrien transportiert und dort im eigentlichen  $\beta$ -Oxidationszyklus bis auf die Stufe des Acetyl-CoA (Acetyl-Coenzym A) verkürzt. Dabei wird durch einen Elektronentransfer aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat Adenosintriphosphat (ATP) generiert.

Die Aktivierung der Fettsäuren erfolgt durch Enzyme der Familie der Acyl-CoA-Synthetasen bzw. Thiokinasen. Dabei wird unter ATP-Verbrauch ein Coenzym A-Rest (CoA-Rest) an die Fettsäure angefügt, sodass ein Acyl-CoA entsteht. Diese Reaktion wird durch die Carnitin-Palmitoyl-CoA-Transferase I (CPT I) katalysiert (vgl. Abb. 1.1). Coenzym-A (CoA) ist ein Pantothersäure-Derivat, das mit der Carboxylgruppe von Fettsäuren Thioester bildet und bei zahlreichen Reaktionen des Fettstoffwechsels bei der Übertragung von Fettsäuren eine Rolle spielt.

Für den Transport in die Mitochondrien wird der CoA-Rest der aktivierten Fettsäuren durch ein Carnitin ausgetauscht. Mithilfe des *Carnitine carrier proteins* (Carnitin-Acylcarnitin-Translokase) kann das Acylcarnitin dann aus dem Cytosol in die mitochondriale Matrix transportiert werden. Dort wird das Carnitin wieder durch einen CoA-Rest ersetzt. Diese Reaktion wird durch die Carnitin-Palmitoyl-CoA-Transferase II (CPT II) katalysiert (vgl. Abb. 1.1).

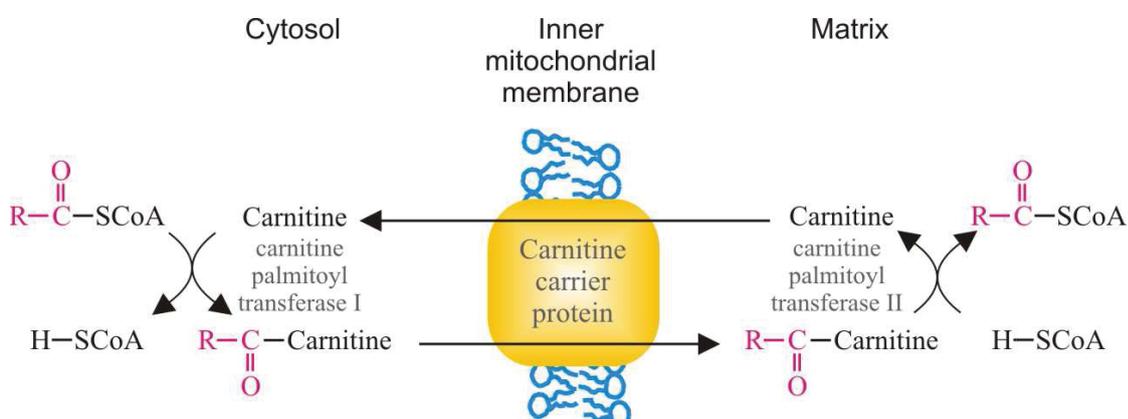


Abb. 1.1: Transport von Fettsäuren aus dem Cytosol ins Mitochondrium (nach Donald und Judith G. Voet, *Biochemistry*, 3rd Edition; 2004; Figure 25-11 „Transport of fatty acids into the mitochondrion“, S. 916, mit freundlicher Genehmigung des Global Rights Dept., John Wiley & Sons, Inc.; Darstellung mit Hilfe von CorelDRAW)

Grund für diesen aufwendigen Transport ist die sehr viel selektivere Durchlässigkeit der inneren Mitochondrienmembran im Vergleich zur äußeren. Viele polare Moleküle und Ionen können diese Membran nicht frei passieren. Es existiert daher eine Vielzahl von Transporterproteinen, die einen sehr kontrollierten Austausch zwischen Cytosol und mitochondrialer Matrix sicherstellen, so auch das *Carnitine carrier protein*.

Das Acyl-CoA wird im Mitochondrium schließlich in vier Reaktionsschritten unter Kürzung um jeweils zwei Kohlenstoffatome abgebaut (vgl. a. Abb. 1.2).

1. Eine Acyl-CoA-Dehydrogenase bildet unter Reduktion von FAD zu FADH<sub>2</sub> eine Doppelbindung zwischen dem  $\alpha$ - und dem  $\beta$ -C-Atom. So entsteht ein trans- $\Delta^2$ -Enoyl-CoA.
2. Die Enoyl-CoA-Hydratase hydriert das trans- $\Delta^2$ -Enoyl-CoA zu einem 3-L-Hydroxyacyl-CoA.
3. Die 3-L-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase oxidiert das 3-L-Hydroxyacyl-CoA unter Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH+H<sup>+</sup> zu einem  $\beta$ -Ketoacyl-CoA.
4. Unter Zugabe von CoA spaltet die  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Thiolase das  $\beta$ -Ketoacyl-CoA in ein Acetyl-CoA und ein um zwei Kohlenstoff-Atome gekürztes Acyl-CoA. Dieses kürzere Acyl-CoA kann nun auf gleiche Weise weiter gespalten werden, indem es den beschriebenen Zyklus erneut durchläuft.

Der erste Schritt dieser Reaktionsfolge wird durch eine Enzym-Familie von Acyl-CoA-Dehydrogenasen katalysiert, von der aktuell fünf verschiedene Enzyme (*SCAD*, *MCAD*, *LCAD*, *VLCAD*, *ACAD-9*, s. unten) bekannt sind. Die Schritte 2-4 werden durch einen Enzymkomplex durchgeführt, der als mitochondriales trifunktionales Protein bekannt ist (*Uchida et al., 1992*).

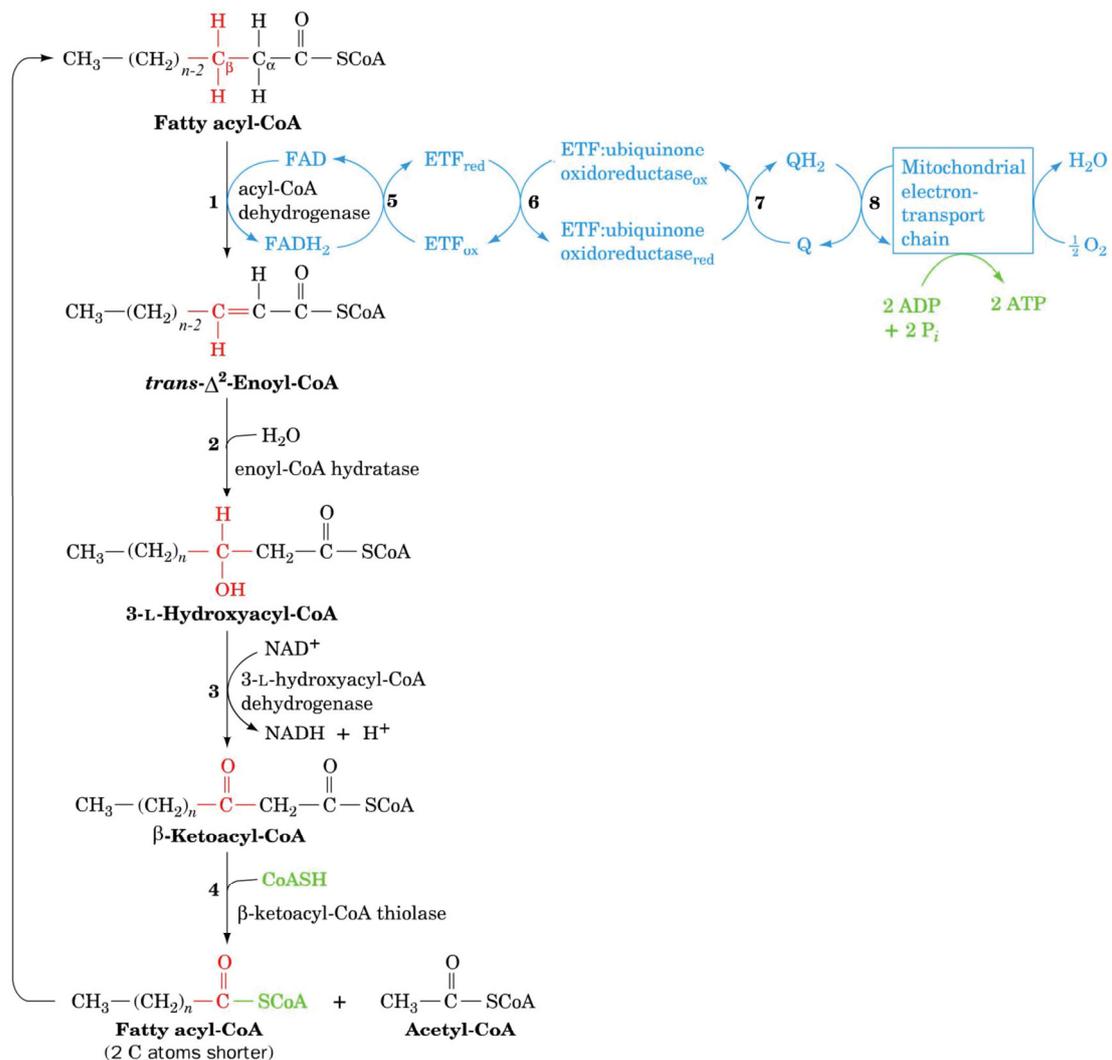


Abbildung 1.2: Die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation der Acyl-CoAs (Donald und Judith G. Voet, *Biochemistry*, 3rd Edition; 2004; Figure 25-12 „The  $\beta$ -oxidation pathway of fatty acyl-CoA“, S. 917, mit freundlicher Genehmigung des Global Rights Dept., John Wiley & Sons, Inc.)

Das Enzym *VLCAD* ist eine der fünf bisher bekannten Acyl-CoA-Dehydrogenasen, die den ersten Schritt der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation (vgl. Abb. 1.2) durchführt. Während die *VLCAD* eine Substratspezifität für Acyl-CoAs mit einer Kettenlänge von 12 bis 18 Kohlenstoffatomen aufweist, setzen drei weitere Enzyme dieser Familie Acyl-CoAs mit kürzerer Kohlenstoffkettenlänge um: *Short-Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase* (*SCAD*) verstoffwechselt C4 bis C6 Acyl-CoAs, *Medium-Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase* (*MCAD*) baut Acyl-CoAs mit einer Kohlenstoffkette von 6 bis 10 C-Atomen ab, und die Substratspezifität der *Long-Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase* (*LCAD*) liegt bei einer Kohlenstoffkettenlänge im Bereich zwischen der Spezifität von *VLCAD* und *MCAD*. Somit besteht eine überlappende Spezifität zwischen *VLCAD* und *LCAD*; allerdings ist die enzymatische Aktivität der *VLCAD* bei langkettigen Acyl-CoAs mehr als zehnmal so hoch wie die der *LCAD* (Izai et al., 1992).

Neben diesen vier Acyl-CoA-Dehydrogenasen ist noch ein fünftes Enzym bekannt, das zunächst mit dem Abbau ungesättigter Acyl-CoAs in Verbindung gebracht wurde, nämlich die Acyl-CoA-Dehydrogenase 9 bzw. ACAD-9 (*Ensenauer et al., 2005*). Neuere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass dieses Enzym eine wesentliche Rolle für die Anordnung von Komplex I der Atmungskette spielt (*Nouws et al., 2010*). Für fast jedes dieser Enzyme sind angeborene Enzymdefekte beschrieben. Eine Ausnahme stellt die *LCAD* dar. Nach Entdeckung der *VLCAD* im Jahr 1992 (*Izai et al., 1992*) stellte sich heraus, dass Patienten mit ursprünglich diagnostiziertem *LCAD*-Mangel stattdessen tatsächlich einen *VLCAD*-Mangel aufwiesen (z.B. *Yamaguchi et al., 1993*). Es wird vermutet, dass das Enzym *VLCAD* einen Mangel der *LCAD* kompensieren kann und ein isolierter *LCAD*-Mangel somit nicht zu klinischer Manifestation führt.

Bedeutsam ist auch, dass die *VLCAD* das Schlüsselenzym der  $\beta$ -Oxidation ist. Sie baut die langkettigen Acyl-CoAs ab, die durch die Nahrung oder die endogene Lipolyse anfallen. Erst wenn diese Acyl-CoAs in der  $\beta$ -Oxidation zu kürzerkettigen Acyl-CoAs verstoffwechselt wurden, setzen auch *MCAD* und *SCAD* die  $\beta$ -Oxidation fort.

Ist das Enzym *VLCAD* nicht in der Lage, seine Substrate zu oxidieren, kommt es zu einer Akkumulation von langkettigen Acyl-CoAs in den Mitochondrien. Durch das *Carnitine carrier protein* können diese langkettigen Acyl-CoAs als Acylcarnitine die Mitochondrien verlassen und in erhöhten Konzentrationen im Blut gemessen werden. Dies macht man sich bei der Diagnostik des *VLCAD*-Mangels mithilfe der Tandem-Massenspektrometrie zunutze.

## 1.1.2 Struktur und Funktion der VLCAD

Seit der Entdeckung der VLCAD 1992 (Izai et al., 1992.) wurden neben der vollständigen Sequenzierung der VLCAD-cDNA (Aoyama et al., 1995; Andresen et al., 1996), welche Mutationsanalysen des VLCAD-Gens ermöglichte, Analogien der VLCAD zu anderen Acyl-CoA-Dehydrogenasen der  $\beta$ -Oxidation beobachtet, auf deren Basis verschiedene Rückschlüsse auf mögliche Funktionsverluste der VLCAD bei Vorliegen bestimmter Mutationen vermutet wurden. McAndrew et al. (2008) veröffentlichten die Kristallstruktur der VLCAD, die zusätzlich Informationen über strukturelle und funktionelle Eigenschaften der VLCAD lieferte.

### 1.1.2.1 Molekulargenetischer Aufbau des VLCAD-Gens

Das Gen, auf dem die VLCAD kodiert ist, liegt auf Chromosom 17, Region 17p13 (Aoyama et al., 1996). Dieser Genlocus hat 20 Exone. Alle diese Exone sind zwischen 62 und 199 Nukleotide lang (vgl. Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Exonlängen der 20 VLCAD-Exone:

Exon Nr.	Anzahl Basenpaare
1	62
2	76
3	66
4	73
5	65
6	135
7	145
8	130
9	126
10	199
11	105
12	87
13	63
14	102
15	98
16	73
17	73
18	73
19	76
20	141

Somit besteht die *cDNA* der *VLCAD* aus insgesamt 1968 Nukleotiden, die für 655 Aminosäuren zuzüglich Stopcodon kodieren. Für die Nomenklatur dieser Arbeit wurden die DNA- und Proteinsequenzen des *NCBI* zugrunde gelegt; die Nukleotid-*ID* lautet NM\_000018.2, die zugehörige Protein-*ID* lautet NP\_000009.1. Die *cDNA* und die korrespondierenden Aminosäuren sind in Abb. 1.3 dargestellt (s.u.).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGCAGGCGGCTCGGATGGCCGCGAGCTTGGGGCGGCAGCTGCTGAGGCTCGGGGCGGAAGCTCGCGGCTCACGGCGCTCCTGGGGCAGCCCCGGCCG 100
M Q A A R M A A S L G R Q L L R L G G G S S R L T A L L G Q P R P G
GCCCTGCCCGCGGCCCTATGCCGGGGGTGCCGCTCAGCTGGCTTGGACAAGTCAGATTCCCACCCCTCTGACGCTCTGACCAGGAAAAAACCGGCCAA 200
P A R R P Y A G G A A Q L A L D K S D S H P S D A L T R K K P A K
GGCGGAATCTAAGTCCTTGTCTGTGGGAATGTTCAAAGGCCAGCTCACCACAGATCAGGTGTTCCCATACCCGTCCTGCTCAACGAAGAGCAGACACAG 300
A E S K S F A V G M F K G Q L T T D Q V F P Y P S V L N E E Q T Q
TTTCTTAAAGAGCTGGTGGAGCCTGTGTCCCGTTTCTTCGAGGAAGTGAACGATCCCGCAAGAATGACGCTCTGGAGATGGTGGAGGAGACCCTTGGC 400
F L K E L V E P V S R F F E E V N D P A K N D A L E M V E E T T W Q
AGGGCCTCAAGGAGCTGGGGCCCTTTGGTCTGCAAGTGCACAGTGGGTGGTGGGCTTTGCAACACCCAGTACGCCCGTTTGGTGGAGATCGT 500
G L K E L G A F G L Q V P S E L G G V G L C N T Q Y A R L V E I V
GGGCTGATGACCTTGGCGTGGGCATTACCCCTGGGGGCCATCAGAGCATCGGTTTCAAAGGCATCCTGCTCTTTGGCACAAGGCCAGAAAAGAAAA 600
G M H D L G V G I T L G A H Q S I G F K G I L L F G T K A Q K E K
TACCTCCCAAGCTGGCATCTGGGGAGACTGTGGCCGCTTCTGTCTAACCAGAGCCCTCAAGCGGGTCAGATGACGCTCCATCCGAACTCTGCTGTGC 700
Y L P K L A S G E T V A A F C L T E P S S G S D A A S I R T S A V P
CCAGCCCTGTGAAAAATACTATAACCTCAATGGAAGCAAGCTTTGGATCAGTAATGGGGCCCTAGCAGACATCTTCACGGCTCTTGGCAAGACACCACT 800
S P C G K Y Y T L N G S K L W I S N G G L A D I F T V F A K T P V
TACAGATCCAGCCACAGGAGCCGTTGAAGGAGAAGATCACAGCTTTTGTGGTGGAGAGGGGCTTCGGGGCATTACCCATGGGCCCTGAGAAGAAGATG 900
T D P A T G A V K E K I T A F V V E R G F G G I T H G P P E K K M
GGCATCAAGGCTTCAAACACAGCAGAGGTGTTCTTTGATGGAGTACGGGTGCCATCGGAGAAGCTGCTGGGTGAGGTTGGGAGTGGCTTCAAGGTTGCCA 1000
G I K A S N T A E V F F D G V R V P S E N V L G E V G S G F K V A M
TGCACATCTCAACAATGGAAGGTTTGGCATGGCTGCGGCCCTGGCAGGTACCATGAGAGGCATCATTGCTAAGCGGTAGATCATGCCACTAATCGTAC 1100
H I L N N G R F G M A A A L A G T M R G I I A K A V D H A T N R T
CCAGTTTGGGGAGAAAATTCACAACTTTGGGCTGATCCAGGAGAAGCTGGCACGGATGGTTATGCTGCAATGTAACCTGAGTCCATGGCTTACATGGTG 1200
Q F G E K I H N F G L I Q E K L A R M V M L Q Y V T E S M A Y M V
AGTGCTAACATGGACCAGGAGCCACGGACTTCCAGATAGAGGCCCCATCAGCAAAATCTTTGGCTCGGAGGCAGCCTGGAAGGTGACAGATGAATGCA 1300
S A N M D Q G A T D F Q I E A A I S K I F G S E A A W K V T D E C I
TCCAAATCATGGGGGATGGGCTTCAATGAAGAACCTGAGATAGAGCGTGTGCTCCGAGATCTTCGCACTTCCGGATCTTTGAGGGGACAAATGACAT 1400
Q I M G G M G F M K E P G V E R V L R D L R I F R I F E G T N D I
TCTTCGGCTGTTTGTGGCTCTGACGGGCTGTATGGACAAAAGGAAAGGAGCTCTCTGGGCTTGGCAGTGTCTTAAAGAATCCCTTTGGGAATGCTGGCCTC 1500
L R L F V A L Q G C M D K G K E L S G L G S A L K N P F G N A G L
CTGCTAGGAGAGGCAGCAAAACAGCTGAGGCGGGCAGGGCTGGGCAGCGGCTGAGTCTCAGCGGACTTGTCCACCCCGAGTTGAGTCGGAGTGGCG 1600
L L G E A G K Q L R R R A G L G S G L S L S G L V H F E L S R S G E
AGCTGGCAGTACGGGCTCTGGAGCAGTTTCCCACTGTGGTGGAGGCCAAGCTGATAAAAACACAGAGGGGATTGTCAATGAACAGTTTCTGCTGCAGCG 1700
L A V R A L E Q F A T V V E A R L I K H K K G I V N E Q F L L Q R
GCTGGCAGACGGGCCATCGACCTCTATGCCATGGTGGTGGTTCTCTCGAGGGCCTCAAGATCCCTGAGTGAAGGGCCACCCACGGCCAGCATGAGAAA 1800
L A D G A I D L Y A M V V V L S R A S R S L S E G H P T A Q H E K
ATGCTCTGTGACACCTGGTGTATCGAGGCTGACGCTCGGATCCGAGAGGGCATGGCCGCCCTGCACTGACCCCTGGCAGCAAGAGCTCTACCCCAACT 1900
M L C D T W C I E A A A R I R E G M A A L Q S D P W Q Q E L Y R N F
TCAAAGCATCTCCAAGGCCCTTGGTGGAGCGGGTGGTGTGCTCACCAGCAACCCACTTGGCTTCTGA
K S I S K A L V E R G G V V T S N P L G F *

```

Abb. 1.3: Die *cDNA*-Sequenz der *VLCAD* (*NCBI*, NM\_000018.2) und die entsprechende Proteinsequenz (*NCBI*, NP\_000009.1). Darstellung mithilfe von [http://www.biophp.org/minitools/dna\\_to\\_protein/demo.php](http://www.biophp.org/minitools/dna_to_protein/demo.php).

### 1.1.2.2 Aufbau und Struktur des VLCAD-Proteins

Das Enzym VLCAD ist (wie die ACAD-9) ein Homodimer, bestehend aus zwei 67 kDa-Monomeren (McAndrew et al., 2008), das an die innere mitochondriale Membran gebunden ist, während SCAD, MCAD und LCAD lösliche Homotetramere der mitochondrialen Matrix sind (McAndrew et al., 2008, Souri et al., 1998, Izai et al., 1992). Alle diese Enzyme verwenden Flavinadenindinukleotid (FAD) als Elektronenakzeptor, das über das Elektronen-transferierende Flavoprotein (ETF), ETF:Ubiquinon-Oxidoreduktase und Quinon die aufgenommenen Elektronen den Proteinen der mitochondrialen Atmungskette zuführt (vgl. Abb. 1.2). Im Fall der VLCAD sind das 2 mol FAD pro 1 mol Enzym, während LCAD, MCAD und SCAD 4 mol FAD pro 1 mol Enzym besitzen (Souri et al., 1998, Ikeda et al., 1985).

Das Transkript aus der VLCAD-cDNA beinhaltet ein sogenanntes *leader peptide* mit einer Länge von 40 Aminosäuren, das bis zur Fertigstellung des Enzyms abgespalten wird (Souri et al., 1998). In der in dieser Arbeit verwendeten Protein-Sequenz (NCBI, Protein-ID NP\_000009.1) ist dieses *leader peptide* enthalten.

Bei Betrachtung der Kristallstruktur (McAndrew et al., 2008) ergeben sich bei der VLCAD verschiedene strukturelle Bereiche, die unterschiedliche Funktionen übernehmen:

1. Das katalytische Zentrum, welches die Kürzung der Kohlenstoffkette um zwei C-Atome durchführt,
2. die Bindungsstelle der langkettigen Acyl-CoA-Substrate (Substratbindungsstelle),
3. Strukturen, welche die Spezifität der VLCAD für eine bestimmte Kohlenstoffkettenlänge vorgeben,
4. Motive, die für die Bindung von FAD an die VLCAD verantwortlich sind,
5. der Bereich der Membranbindung des Proteins und
6. Strukturen, welche zur Dimerbildung mit einem anderen VLCAD-Protein beitragen.

In Abb. 1.4 sind verschiedene Strukturen des VLCAD-Monomers markiert, die für die genannten Funktionen zuständig sind (Struktur und funktionelle Zuordnung mit Hilfe früherer Arbeiten (Referenzen s. Legende), Darstellung der VLCAD mit Hilfe der Kristallstruktur (MMDB ID 62408, PDB 3B96 (McAndrew et al., 2008)) und des Programms Cn3D 4.1 (Wang et al., 2000), Beschriftungen mit Hilfe des Ulead Photo Express 5SE-Bildbearbeitungsprogramms).

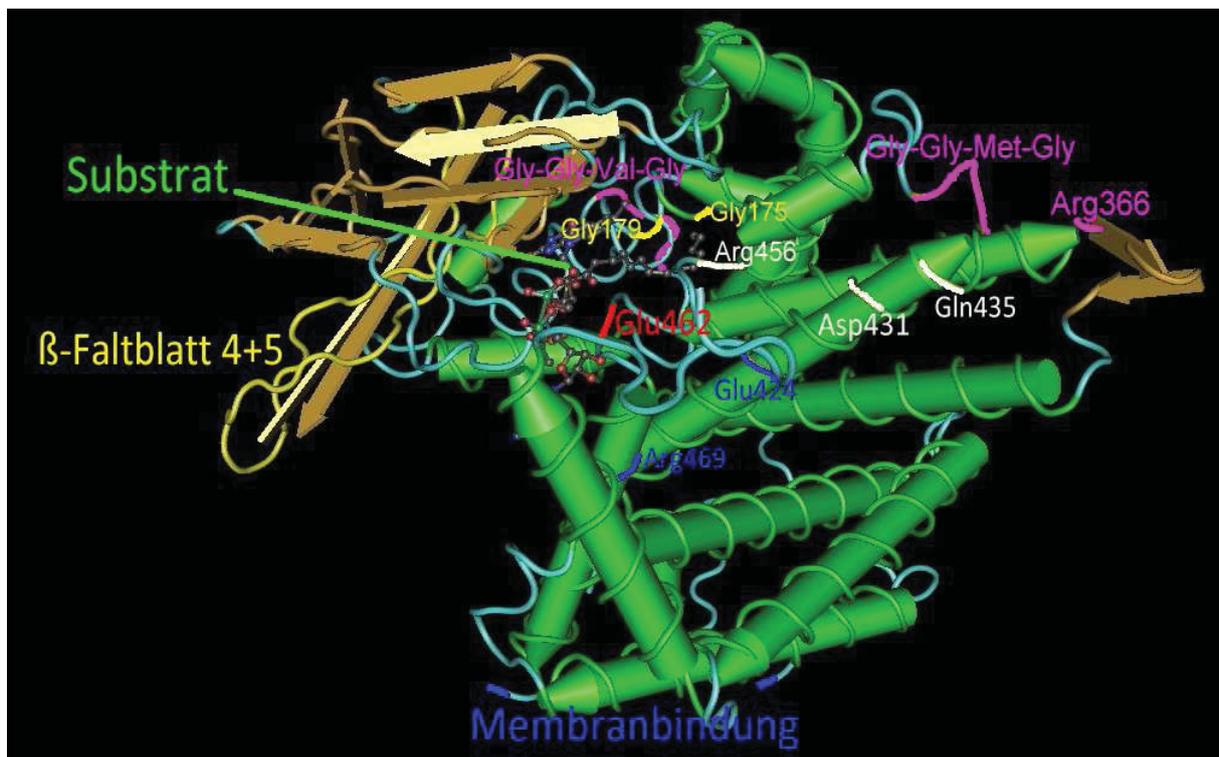


Abb. 1.4: Übersicht von verschiedenen funktionellen Strukturen des VLCAD-Monomers

**Katalytisches Zentrum:**

Glu462: katalytischer Aminosäurerest (Souri et al., 1998; McAndrew et al., 2008).

Glu424 und Arg469: Durch Bildung einer Salzbrücke wird das katalytische Zentrum (Glu462) korrekt positioniert (McAndrew et al., 2008).

**Substrat:**

Sehr langkettiges Acyl-CoA an der Substratbindungsstelle (mit vielen hydrophoben Aminosäureresten).

**Substratbindung und Kohlenstoffkettenlängenspezifität:**

Gly175, Gly179: Reste, die die Basis der Substratbindungsstelle formen (McAndrew et al., 2008).

$\beta$ -Faltblätter 4+5: Struktur, die für die Bevorzugung sehr langkettiger Acyl-CoAs zuständig ist (McAndrew et al., 2008).

**FAD-Bindung:**

Gly-Gly-Val-Gly (Pos. 151-154) / Gly-Gly-Met-Gly (Pos. 438-441): Das Gly-Gly-X-Gly-Motiv ist als Bindungsmotiv für FAD bekannt (Indo et al., 1991); Gly441 weist zudem eine Interaktion mit Arg366 auf (Andresen et al., 1996).

**Membranbindung:**

Die Reste 486-519 sind nicht in der Kristallstruktur darstellbar und gelten als Membranbindungsstelle (McAndrew et al., 2008).

**Dimerbildung:**

Arg456: interagiert mit den Resten Asp431 und Gln435 des anderen VLCAD-Monomers (McAndrew et al., 2008).

Das katalytische Zentrum der *VLCAD* liegt in Analogie zu anderen Acyl-CoA-Dehydrogenasen am Glutamatrest an Position 462 (Glu462) (nach *Souri et al., 1998*; bestätigt von *McAndrew et al., 2008*).

Die Substratbindung wird von verschiedenen Bereichen des Enzyms übernommen. Die Aminosäuren Gly175 und Gly179 formen die Basis der Substratbindungshöhle (*McAndrew et al., 2008*). Wegen der hydrophoben Acylkette des Acyl-CoAs ist die Substratbindungsstelle durch viele hydrophobe Aminosäurenreste gekennzeichnet.

In der Kristallstruktur der *VLCAD* sind zwei Domänen enthalten, die eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aufweisen. Diese Domänen liegen relativ weit entfernt vom katalytischen Zentrum des Enzyms. Allerdings tragen die  $\beta$ -Faltblätter 4 und 5 der größeren dieser beiden Domänen dazu bei, dass die *VLCAD* im Vergleich zu anderen Acyl-CoA-Dehydrogenasen langkettigere Acyl-CoAs als Substrat bevorzugt (Substratlängenspezifität) (*McAndrew et al., 2008*). Auf diesen beiden  $\beta$ -Faltblättern sind zwei *Missense*-Mutationen lokalisiert, die sehr häufig beim *VLCAD*-Mangel auftreten, nämlich p.Thr260Met ( $\beta$ -Faltblatt 4) und p.Val283Ala ( $\beta$ -Faltblatt 5) (erstmalig beschrieben von *Andresen et al., 1996*).

Für die Bindung des Elektronenakzeptors FAD gibt es ebenfalls strukturelle Korrelate im *VLCAD*-Protein. Im Zusammenhang mit der Bindung des Nukleotidanteils der FAD sind hochkonservierte Glycin-Motive des Musters Gly-Gly-X-Gly von Bedeutung, die bei Acyl-CoA-Dehydrogenasen beschrieben sind (*Indo et al., 1991*). Dieses Motiv ist zweimal in der Aminosäuresequenz der *VLCAD* aufzufinden, nämlich Gly-Gly-Val-Gly an den Positionen 151-154 und Gly-Gly-Met-Gly an den Positionen 438-441. Es bestehen Hinweise auf eine Interaktion zwischen dem Glycin an Position 441 und dem Arginin an Position 366, die zur Bindung des FADs beiträgt (*Andresen et al., 1996*).

*McAndrew et al. (2008)* ordneten im Rahmen der Analyse der Proteinstruktur der *VLCAD* die Membranbindungsstelle den Aminosäuren an den Positionen 486 bis 519 zu.

Für die Dimerbildung ist eine Interaktion des Aminosäurerests Arg456 mit Asp431 und Gln435 des anderen *VLCAD*-Monomers von Bedeutung (*McAndrew et al., 2008*).

## **1.2 Very-Long-Chain Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase-Mangel (VLCAD-Mangel)**

Beim *Very-Long-Chain-Acyl-Coenzym A Dehydrogenase*-Mangel (VLCAD-Mangel) ist die VLCAD nicht in der Lage, in hinreichendem Maße langkettige Fettsäuren (C14 bis C18) zu verstoffwechseln und die kürzerkettigen Reaktionsprodukte der weiteren  $\beta$ -Oxidation zuzuführen. Somit sind die ATP-Gewinnung und damit auch die Ketonkörperbildung aus langkettigen Triacylglyceriden je nach Schwere des Enzymdefekts eingeschränkt oder vollständig aufgehoben.

Der VLCAD-Mangel wird autosomal-rezessiv vererbt. Es existiert eine große Vielfalt von Mutationen auf dem VLCAD-Gen. Allein *Andresen et al.* zeigten im Jahr 1999 58 verschiedene Mutationen bei 55 Patienten, und seither wurden noch zahlreiche weitere Mutationen identifiziert. Auch wenn manche Mutationen häufiger als andere auftreten, liegt beim VLCAD-Mangel keine prävalente Mutation vor (im Gegensatz zu anderen Fettsäureoxidationsstörungen, wie zum Beispiel MCAD-Mangel, SCAD-Mangel, LCHAD-Mangel und CPT-II-Mangel (*Gregersen et al., 2000*)). Seit Einführung des erweiterten Neugeborenen Screenings wurde allerdings gehäuft die Mutation p.Val283Ala bei milden oder asymptomatischen Phänotypen identifiziert, was in diesem Fall eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation zulässt. Aufgrund der Vielfalt der Mutationen der VLCAD, die teilweise nur in Einzelfällen auftreten, ist es jedoch sehr schwierig, eine bestimmte Mutation einem konkreten Schweregrad zuzuordnen. Nach *Andresen et al., 1999* werden Nullmutationen und *Missense*-Mutationen unterschieden. Nullmutationen sind solche Mutationen, die die Spleißregion betreffen oder durch Deletionen zu einem vollständigen Ausfall des betroffenen VLCAD-Allels führen. *Missense*-Mutationen sind Punktmutationen, die zur Veränderung einer einzelnen Aminosäure des Enzyms führen. Die Effekte solcher Mutationen können je nach Lage und biochemischer Veränderung zwischen einer annähernd normalen Enzymfunktion und einer schweren Veränderung der Enzymstruktur mit fast komplettem Ausfall des Allels, ähnlich einer Nullmutation, variieren.

### 1.2.1 Symptome und Charakteristika des VLCAD-Mangels

Das Krankheitsbild des VLCAD-Mangels ist nicht einheitlich. Vor der Screening-Ära wurde zwischen drei Phänotypen unterschieden (nach Vianey-Saban et al., 1998):

Der schwere, kardiale Phänotyp manifestiert sich häufig bereits in der Neugeborenenzeit, manchmal schon Stunden nach der Geburt. Im Vordergrund stehen hier eine Kardiomyopathie, Herzrhythmusstörungen, eine Hepatopathie (Reye-ähnliche Symptome) und eine hypoketotische Hypoglykämie.

Ein weiterer, milderer Phänotyp, der sich etwas später in den ersten Lebensjahren äußert, ist die hepatische Form des VLCAD-Mangels. Leitsymptom ist hier die hypoketotische Hypoglykämie, die insbesondere im Rahmen von Krankheiten oder nach längerem Fasten auftritt.

Der dritte, ebenfalls mildere Phänotyp betrifft ausschließlich die Skelettmuskulatur (myopathischer Phänotyp) in Form von Myopathie und episodischen Rhabdomyolysen. Er manifestiert sich in der Regel erst im Jugend- und Erwachsenenalter. Meist werden diese Symptome durch verstärkte körperliche Aktivität oder Krankheit ausgelöst.

Langzeitbeobachtungen haben gezeigt, dass auch beim kardialen und hepatischen Phänotyp im weiteren Verlauf der Krankheit die myopathische Komponente im Vordergrund steht.

Seit Einführung des erweiterten Neugeborenen Screenings ist der überwiegende Teil der Patienten bei der Geburt asymptomatisch beziehungsweise verbleibt asymptomatisch aufgrund rechtzeitiger prophylaktischer Maßnahmen. Unklar ist, welche Patienten im Verlauf ihres Lebens Symptome entwickeln werden. Da seit Einführung des Screenings wesentlich mehr Kinder mit einem VLCAD-Mangel identifiziert werden als zuvor und viele milde/aktuell asymptomatische Phänotypen aufweisen, ist davon auszugehen, dass manche Patienten ein Leben lang asymptomatisch verbleiben. Eine genaue Charakterisierung der Patienten ist daher notwendig, um frühzeitig Informationen über die zu erwartende Prognose zu erhalten.

## 1.2.2 Diagnostik des VLCAD-Mangels

Der VLCAD-Mangel äußert sich in der Regel erst dann klinisch, wenn die Patienten katabol werden, z.B. im Rahmen von Infekten, verlängerten Fastenperioden oder stärkerer körperlicher Belastung. Dabei treten die oben beschriebenen Symptome auf, je nach Schweregrad des Krankheitsbildes und Phänotyp. Patienten, die milde betroffen sind, weisen auch erst in diesen Situationen biochemische Veränderungen auf.

Zur Früherkennung genetisch bedingter Enzymdefekte wurde das Neugeborenencreening implementiert. Guthrie stellte bereits 1963 eine einfache Screeningmethode zur Früherkennung der Phenylketonurie bei Neugeborenen vor (*Guthrie et al., 1963*). Die erste Richtlinie zum Neugeborenencreening wurden 1997 von der gemeinsamen, ständigen Kommission für Neugeborenencreening (der Arbeitsgemeinschaften für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS) und für Pädiatrische Endokrinologie (APE) der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin) herausgegeben (*Harms et al., 1997*) und umfasste die folgenden Erkrankungen: Phenylketonurie (PKU), klassische Galaktosämie, Hypothyreose, Biotinidasemangel und adrenogenitales Syndrom (AGS); die letzten beiden Krankheiten wurden jedoch nur in einigen Bundesländern gescreent. In den darauffolgenden Jahren verbesserten sich die Möglichkeiten der Labordiagnostik, sodass das Screening auf zusätzliche Zielkrankheiten erweitert werden konnte. Diese Erweiterung des Screenings wurde durch die Einführung der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) möglich. Durch diese Analysemethode können Fettsäuren und organische Säuren in Form ihrer Carnitinverbindungen (Acylcarnitine) quantifiziert werden. Aminosäurekonzentrationen im Blut können direkt gemessen werden.

Das Neugeborenencreening wird in Deutschland seit 2005 verbindlich und für alle Bundesländer gleich durch die Kinder-Richtlinie des gemeinsamen Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen (G-BA) geregelt. Am 11. März 2011 wurde vom Bundesministerium für Gesundheit eine Anpassung des erweiterten Neugeborenencreenings an das Gendiagnostikgesetz herausgegeben (*Bundesministerium für Gesundheit, 2011*).

Das Probenmaterial ist natives kapilläres oder venöses Blut, das auf eine Filterpapierkarte getropft wird, die dann bei Raumtemperatur (ohne Erhitzen) trocknen muss. Die Probenentnahme sollte unbedingt zwischen der 48. und 72. Lebensstunde, nicht aber vor der 36. Lebensstunde erfolgen. Das Screeningblut sollte auf jeden Fall vor bestimmten therapeutischen Maßnahmen wie Bluttransfusionen, Katecholamininfusionen und Kortikosteroidbehandlungen entnommen werden. Bei Frühgeborenen vor der vollendeten 32. Schwangerschaftswoche muss ein abschließendes

Zweitscreening im korrigierten Alter von vollendeten 32 Schwangerschaftswochen erfolgen (vgl. Screeningrichtlinien, *Bundesministerium für Gesundheit, 2011*).

In Tabelle 1.2 sind die Zielkrankheiten, die aktuell im Neugeborenencreening enthalten sind, mit der Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Krankheitsgruppen aufgeführt.

*Tabelle 1.2: Screeningkrankheiten nach Anpassung des erweiterten Neugeborenencreenings an das Gendiagnostikgesetz 2011*

Gruppe	Krankheit
Endokrinopathien	Hypothyreose Adrenogenitales Syndrom (AGS)
Aminoazidopathien	Phenylketonurie (PKU) und Hyperphenylalaninämie (HPA) Ahornsirupkrankheit
Organoazidopathien	Isovalerianazidämie (IVA) Glutarazidurie Typ I (GA I)
Fettsäureoxidationsstörungen und Carnitinzyklusdefekte	<i>Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (MCAD)</i> <i>Very Long-Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (VLCAD)</i> <i>Long-Chain-3-OH-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (LCHAD)</i> Carnitin-Palmitoyl-CoA-Transferase 1-Mangel (CPT-I) Carnitin-Palmitoyl-CoA-Transferase 2-Mangel (CPT-II) Carnitin-Acylcarnitin-Translokase-Mangel (CACT)
Andere	Galaktosämie Biotinidase-Mangel

Für die Diagnostik des *VLCAD*-Mangels ist das Acylcarnitin-Profil von Bedeutung. Erhöhte C14-Acylcarnitine deuten auf einen *VLCAD*-Mangel hin; der entscheidende Wert ist hierbei das C14.1 (*Liebig et al., 2006*).

Durch die Tandem-massenspektrometrische Auswertung der Trockenblutkarte kann also bereits vor dem Auftreten erster Symptome die Verdachtsdiagnose *VLCAD*-Mangel gestellt werden, wenn die oben genannten Parameter charakteristischerweise verändert sind (*Wood et al., 2001*). Allerdings können Patienten, die an einer milden Form des *VLCAD*-Mangels leiden, bei erneuter Probeentnahme nach dem vollendeten dritten Lebensstag unauffällige Acylcarnitinprofile aufweisen, wenn sie sich zu diesem Zeitpunkt (im Gegensatz zum zweiten und dritten Lebensstag) in einer anabolen Stoffwechsellage befinden (*Schymik et al., 2006*). Zudem ist es möglich, dass Kinder mit *VLCAD*-Mangel-typischen Veränderungen im Acylcarnitinprofil des Neugeborenencreenings gar nicht an dieser Krankheit leiden (*Spiekerkoetter et al., 2010, Liebig et al., 2006*).

Aus diesem Grund ist nach einem auffälligen Neugeborenen-Screening eine weiterführende Diagnostik notwendig. Essentielle Bestätigungsdiagnostik ist die Enzymanalyse, bei bekannten Mutationen auch die Molekulargenetik (*Spiekerkoetter et al., 2010*). In den USA stimmte eine Gruppe von Experten im Rahmen eines Delphi-Protokolls für die klinische Praxis aufgrund des niedrigen positiven Vorhersagewerts des erhöhten C14:1-Carnitins ebenfalls einer weiterführenden Diagnostik zu, wobei keine Einigkeit über eine bestimmte Reihenfolge der Zusatzuntersuchungen (Enzymatik vs. molekulargenetische Untersuchung des *VLCAD*-Gens) erzielt werden konnte (*Arnold et al., 2009*). Hierzu mag die nicht flächendeckende Verfügbarkeit der enzymatischen Untersuchung der *VLCAD*-Aktivität beigetragen haben.

Im Stoffwechsellabor der Universitätskinderklinik Düsseldorf wird nach einem *VLCAD*-Mangelverdächtigen ersten Screening (ggf. nach Wiederholung des Screenings) eine Bestimmung der Enzymrestaktivität in Lymphozyten durchgeführt. Liegt diese unter 10% eines gesunden Vergleichskollektivs, ist die Diagnose eines *VLCAD*-Mangels gesichert. Im Fall einer erniedrigten Enzymaktivität von 10% bis 30% ist zusätzlich eine molekulargenetische Untersuchung indiziert. Dieses Prozedere entspricht der Konfirmationsdiagnostik bei Verdacht auf angeborene Stoffwechselkrankheiten von 2010, herausgegeben durch die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (*Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS), 2010*).

### 1.2.3 Therapeutische Optionen beim VLCAD-Mangel

Bisher gibt es keine kausale Therapie des VLCAD-Mangels. Allgemein ist eine kohlenhydratreiche, fettreduzierte Diät sinnvoll. Um katabole Stoffwechsellagen zu vermeiden, sollten VLCAD-Mangel-Patienten regelmäßige kleinere Mahlzeiten einnehmen, da längere Nüchternphasen mit Lipolyse, Akkumulation toxischer Metabolite und dem Risiko einer Hypoglykämie einhergehen. Auch die Substitution von Nahrungsfett durch sog. MCT-Fett (Medium-Chain-Triglyceride-Fett) wird angewandt, da aus diesen synthetischen mittelkettigen Fettsäuren auch bei völlig fehlender VLCAD-Aktivität Energie gewonnen werden kann. Das erste Enzym der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation mittelkettiger Fettsäuren ist die *Medium Chain Acyl-CoA-Dehydrogenase (MCAD)*, die beim VLCAD-Mangel völlig intakt ist. Allerdings ist es bisher unklar, ob die Substitution dieser Fettsäuren im Überschuss möglicherweise zu anderen unerwünschten Nebenwirkungen führt. Derzeit wird an der Universitätskinderklinik Düsseldorf zu dieser Fragestellung an einem VLCAD-Mausmodell geforscht.

Im Rahmen von Experten-Workshops werden die genannten Therapieempfehlungen regelmäßig diskutiert und auf den Stand der neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse gebracht (z.B. *Spiekerkoetter et al., 2009, Arnold et al., 2009*). Die aktuellen diätetischen Therapieempfehlungen beim symptomatischen VLCAD-Mangel umfassen eine Restriktion langkettiger Fettsäuren und ggf. eine Substitution mit MCT-Fett, insbesondere im Rahmen körperlicher Aktivität (*Spiekerkoetter et al., 2009*). Bei bisher asymptomatischen VLCAD-Mangel-Patienten, die im Neugeborenen-Screening aufgefallen sind, wurde die Empfehlung zur Restriktion langkettiger Fettsäuren gelockert, da im Rahmen des Familienscreenings auch zunehmend betroffene, nicht vordiagnostizierte Geschwister identifiziert werden konnten, die auch ohne prophylaktische diätetische Maßnahmen symptomfrei sind (*Spiekerkoetter et al., 2009*). Aktuelle Studien erforschen, welche Patienten ein erhöhtes Risiko einer metabolischen Entgleisung tragen.

Über die prophylaktischen diätetischen Maßnahmen hinaus gibt es auch medikamentöse Ansätze, die jedoch zu großen Teilen noch genauer erforscht werden müssen, bevor sie außerhalb von Studien therapeutisch genutzt werden können:

Der Einsatz von Carnitin wird kontrovers diskutiert. Im Mausmodell zeigte sich unter Carnitin-Behandlung von VLCAD-Knock-Out-Mäusen eine signifikante Akkumulation von potentiell toxischen

Acylcarnitinen in verschiedenen Geweben, ohne niedrige Carnitinspiegel im Blut und besonders in den Geweben aufzufüllen (*Primassin et al., 2008*).

In mit Bezafibraten behandelten Fibroblasten-Zellkulturen von Patienten mit verschiedenen genotypischen Varianten des *VLCAD*-Mangels war nicht nur bei Kontrollen, sondern auch bei einigen *VLCAD*-Mangel-Patienten eine erhöhte Verstoffwechslung von (9,10)-Palmitat messbar (*Gobin-Limballe et al., 2007*). Allerdings sprachen nicht alle Patienten auf diese Behandlung an, und bei den sehr schwerwiegenden Mutationen, zum Beispiel Nullmutationen, war der Abbau von (9,10)-Palmitat in den Zellkulturen auch nach der Bezafibratbehandlung kaum verändert. Hieraus schlussfolgern die Autoren der Studie, dass Bezafibrate die Residualaktivität von *VLCAD* steigern können, wenn die Proteinstabilität durch die Mutation nur milde beeinträchtigt ist, wie es bei milden Phänotypen der Fall ist. Weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven sind notwendig.

Im *Knock-Out*-Mausmodell gelang darüber hinaus eine hepatische und kardiale Expression von *VLCAD* durch eine Adenovirus-assoziierte Gen-Therapie (*Merritt et al., 2009*). Falls sich der Ansatz auf den Menschen übertragen lässt, könnte dies eine kurative Therapie darstellen.

### 1.3 Fragestellung

Durch die Aufnahme des *VLCAD*-Mangels in das Neugeborenen-Screening können nun *VLCAD*-Mangel-Patienten diagnostiziert und therapiert werden, noch bevor sie die ersten klinischen Symptome entwickeln. Aufgrund geringerer Spezifität des Screenings werden jedoch auch Kinder identifiziert, die gesund sind. Die relativ hohe Rate an gesunden Kindern mit auffälligem Acylcarnitinprofil ist dadurch zu erklären, dass katabole Stoffwechsellagen mit erhöhtem Fettsäureabbau bei Gesunden ein dem *VLCAD*-Mangel ähnliches Acylcarnitinprofil aufweisen. Um zwischen gesunden Kindern und Patienten zu unterscheiden, sind somit weitere Untersuchungen notwendig. Die Enzymaktivitätsbestimmung in Lymphozyten hat sich hier als Goldstandard erwiesen, da molekulare Heterogenität besteht. Eine Residualaktivität unter 10% weist eindeutig auf einen *VLCAD*-Mangel hin. Bei Enzymaktivitäten von 10% bis 30% bestehen Unsicherheiten in der Interpretation. Patienten mit Enzymaktivitäten >10% weisen mildere Phänotypen auf, und auch Heterozygote zeigen vereinzelt erniedrigte Enzymrestaktivitäten, die im Bereich von >20% bis 30% liegen; in der Regel sind die Enzymaktivitäten heterozygoter Träger jedoch > 30%. Heterozygotie für eine Mutation im *VLCAD*-Gen hat keine klinische Relevanz. Zur sicheren Klassifizierung von Individuen mit *VLCAD*-Restaktivitäten zwischen 10% und 50% wurde eine molekulargenetische Charakterisierung vorgenommen. Spezielle Fragestellungen der Arbeit waren:

1. Ist es durch Bestimmung der Enzymrestaktivität alleine möglich, eine eindeutige Unterscheidung zwischen Kindern mit symptomatischem *VLCAD*-Mangel und gesunden Kindern vorzunehmen?
2. Lassen sich die Enzymrestaktivitäten und Mutationen korrelieren?
3. Ergeben die Lokalisation der Mutationen in der Kristallstruktur des Enzyms und eine *in silico*-Analyse weitere Kriterien, um auf diese Weise den Schweregrad bestimmter Mutationstypen zu identifizieren?

## 2. Studienteilnehmer, Material und Methoden

### 2.1 Studienteilnehmer

Von April 2007 bis Dezember 2008 wurden im Stoffwechsellabor der Klinik für Allgemeine Pädiatrie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Kinder, die im Neugeborenen Screening mit einem für den VLCAD-Mangel charakteristischen Acylcarnitinprofil auffielen, einer weiterführenden Diagnostik unterzogen. Zunächst wurde im Rahmen der Bestätigungsdiagnostik die VLCAD-Residualaktivität in Lymphozyten ermittelt (n=176). Bei der enzymatischen Untersuchung zeigten 7 Kinder (4%) eine VLCAD-Residualaktivität < 10%; 34 Kinder (20%) hatten Enzymrestaktivitäten zwischen 10% und 50%; und bei den restlichen 135 Kindern (76%) wurden Enzymrestaktivitäten > 50% gemessen. Die 34 Kinder mit Restaktivitäten zwischen 10% und 50% wurden in die Studie aufgenommen. Das Neugeborenen Screening erfolgte bei 32 der 34 Studienteilnehmer in deutschen akkreditierten Neugeborenen Screeninglaboren. Ein Studienteilnehmer wurde in Kanada gescreent (Studienteilnehmer Nr. 7). Eine weitere Studienteilnehmerin (Nr. 25) wurde aus der Kontrollgruppe aufgrund verminderter Aktivität rekrutiert. Diese Studienteilnehmerin ist die einzige, die nicht im Neugeborenen Screening identifiziert wurde.

Bei diesen 34 Kindern wurde zusätzlich die molekulargenetische Untersuchung der Exone des VLCAD-Gens durchgeführt. Die molekulargenetische Untersuchung erfolgte nach mündlicher Aufklärung und Zustimmung der Eltern; eine entsprechende Stellungnahme der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf liegt unter der Studiennummer 4149 vor.

## **2.2 Material und Methoden**

### **2.2.1 Erhebung der Acylcarnitinprofile**

Alle Studienteilnehmer wurden in akkreditierten Neugeborenen-Screening-Laboren nach den Screening-Richtlinien gescreent. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie.

### **2.2.2 Enzymatische Bestimmung der VLCAD-Restaktivität**

Die Bestimmung der VLCAD-Residualaktivität erfolgte nach der Standard-Arbeitsanweisung (SOP) zur Analyse der VLCAD-Enzymaktivität des Stoffwechsellabors der Universitätskinderklinik Düsseldorf (vgl. a. *Liebig et al., 2006*) und wurde von Fachpersonal im Stoffwechsellabor durchgeführt. Dazu wurde der Umsatz des VLCAD-Substrats C16:0-CoA zu C16:1-CoA und C16:OH-CoA von Studienteilnehmern im Vergleich zu gesunden Probanden durchgeführt. Diese Vorgehensweise ist Teil der Standard-Abklärung eines auffälligen Screeningbefundes. Aus allen im Stoffwechsellabor untersuchten Blutproben wurden diejenigen mit Enzymaktivitäten zwischen 10% und einschließlich 50% für die Studie rekrutiert.

Zunächst wurden Lymphozyten aus Ethyldiamintetraessigsäureester-Blut (EDTA-Blut) des Patienten isoliert, indem EDTA-Blut der Studienteilnehmer mit 3 ml Ficoll-Plaque™ Plus in einem Leucosep®-Gefäß zentrifugiert wurde. Nach Hinzufügen von Ammoniumchlorid-Erythrozyten-Lysis-Puffer wurden die Lymphozyten mehrfach pelletiert und erneut resuspendiert. Zuletzt wurde der Überstand bei -80°C eingefroren. Die Lymphozyten mussten innerhalb von 48 Stunden nach der Entnahme aus dem Blut isoliert werden, da Einflussfaktoren wie zum Beispiel Temperaturschwankungen auf dem Probentransport die Qualität der Lymphozyten verschlechtern.

Nach der Proteinbestimmung nach Bradford (mit dem *BioRad protein assay*) und dem Lösen der Ferrocenium-Hexafluorophosphat-Kristalle (artifizieller Elektronenakzeptor) wurde der VLCAD-Enzym-Assay mit 30µg Protein und 4 µl 5 mM C16:0-CoA für exakt 5 Minuten durchgeführt und mit 100 µl Acetonitril (bei -20°C) gestoppt.

Zuletzt wurde die quantitative HPLC-Analyse von OH-C16-CoA, von C16:1-CoA und von C16:0-CoA mit Hilfe der Waters 2690 Separationsmodule, des Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector und eines Computers durchgeführt. Basierend auf diesen Daten wurde die prozentuale Enzym-Restaktivität, gemessen an einem gesunden Vergleichskollektiv, errechnet.

## **2.2.3 Molekulargenetische Analyse der Studienteilnehmer-DNA**

### **2.2.3.1 Gewinnung der Studienteilnehmer-Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus EDTA-Blut oder Trockenblutkarten**

Für die weiterführende molekulargenetische Analyse wurde die Desoxyribonukleinsäure (DNA) der Studienteilnehmer aus EDTA-Blut oder aus Trockenblutkarten isoliert. Die DNA-Isolation aus EDTA-Blut wurde nach dem „Blood and Body Fluid Spin Protocol“ des QIAamp® DNA Mini Kit, Cat. No. 51306 (QIAgen, Hilden, Deutschland) durchgeführt; für die DNA-Isolation aus Trockenblutkarten wurde das Protokoll „Isolation of Genomic DNA from Dried Blood Spots“ des QIAamp® DNA Micro Kit, Cat. No. 56304 (QIAgen, Hilden, Deutschland) verwendet. Bei den Zentrifugationsschritten wurde die Heraeus Biofuge fresco (DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, England) verwendet.

### **2.2.3.2 Amplifikation der 20 Exone des VLCAD-Gens**

Die 20 Exone des VLCAD-Gens wurden aus der Studienteilnehmer-DNA amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland synthetisiert und sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die Exone 3 und 4, 12 und 13, 14 und 15 sowie 16 und 17 wurden dabei jeweils gemeinsam in der gleichen PCR-Reaktion amplifiziert.

Tabelle 2.1: Primer zur Amplifikation der Exone des VLCAD-Gens

Exon	Sequenz Primer Sense (Forward)	Sequenz Primer Antisense (Reverse)	Annealing-Temperatur
1	5' – GGC GTG CAG GAC GCC AGA GCT – 3'	5' – GCC GCG AGC TTG GGG CGG CAG – 3'	65,0 °C
2	5' – GGC ACC GGG CCG GCA CTG AAC C – 3'	5' – CCG ATG GCG GGC GCC GAA G – 3'	65,0 °C
3, 4	5' – GTC CCT TCC CTG AAC TTG CTA ACC – 3'	5' – CCT GGC CCC ACC CAG CTC TGA TTA TTC – 3'	58,0 °C
5	5' – CAG CCT GGC CTG ACC AGC CTG TCC – 3'	5' – CAC CTC ACC AGG GAC CAA GCC C – 3'	65,0 °C
6	5' – CAA AAG GAG CCT GGA TGT GGG ATC C – 3'	5' – GGC AAA AGA GCT GAG TCT GCC AAG C – 3'	65,0 °C
7	5' – GCA GCC AGT GAC AAC CCC AGA TTC – 3'	5' – GTG TGC CCC CCA ATC CCT GGC TCT – 3'	65,0 °C
8	5' – GGG ACT TTG AAG CTC ATC AGA ACT – 3'	5' – CCT GGA ATT GGG CGG AGG AGA AGG – 3'	65,0 °C
9	5' – CCC GTC CTC CAC GCC CTG AAT ATC C – 3'	5' – GTC CTG CCC CTC AGT CCT AAG CTC C – 3'	65,0 °C
10	5' – CAC ACC TCT GCT TTC CCA CAC TGC C – 3'	5' – CTG TTT GGG TTA CCT AGG GAC TCG G – 3'	65,0 °C
11	5' – GGG AGA CTG CAG AAC CAC ACT GAA CC – 3'	5' – GGG AAG AAA GCC CCA GGG CTC CAG GGA G – 3'	58,0 °C
12, 13	5' – GCC AAG TCT GAC AAA GCC CTT TGC A – 3'	5' – GCC GAG GCT CTG AGA AGA CCG TCC TG – 3'	58,0 °C
14, 15	5' – GGT AGG CAC ATC TCA GCA CGG G – 3'	5' – CCT CCC CTG GCT CTG GCC CTA AG – 3'	58,0 °C
16, 17	5' – GCC AAC TAA CCA GTC ATT CTC CCT C – 3'	5' – GGA GGG GCG GAA TGG TGT AGA GCT CAC – 3'	58,0 °C
18	5' – GGA GGC AAG CTG ATA AAA CAC AAG AAG G – 3'	5' – GGT CCG GGG GAC GCC GAG TCC GTA AGG – 3'	65,0 °C
19	5' – CCA TGG TGG TGG TTC TCT CGA GG – 3'	5' – CCT GCA CCT CCA GCC CTC ACC – 3'	65,0 °C
20	5' – CCT GGT GTA TCG AGG TGA GAC TCG G – 3'	5' – CTT TGG GAG GGA GGC TGG CAG C – 3'	65,0 °C

Für die Amplifikation der DNA wurde der REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> (Catalog Number R 2523, SIGMA®, Saint Louis, Missouri 63103 USA) mit Primern und DNA wie im Folgenden beschrieben angesetzt:

20 µl REDTaq Ready Mix PCR Reaction Mix, with MgCl<sub>2</sub>, Catalog Number R2648

15 µl Water, PCR Reagent, Catalog Number W1754 (SIGMA®)

1,5 µl Forward-Primer

1,5 µl Reverse-Primer

2 µl DNA

Lediglich für Exon 18 wurde ein alternativer Ansatz verwendet:

20 µl REDTaq *Ready Mix PCR Reaction Mix*, with MgCl<sub>2</sub>, Catalog Number R2648

7 µl *Water, PCR Reagent*, Catalog Number W1754

2,5 µl *Forward-Primer*

2,5 µl *Reverse-Primer*

8 µl *DNA*

Die Ansätze wurden bis zum Beginn der *PCR*-Programme bei 4°C vorbereitet. Zusätzlich wurde für jedes Primerpaar ein zweiter Ansatz ohne *DNA* pipettiert, um sicherzustellen, dass das Amplifikat von der hinzupipettierten *DNA* stammte.

Die *PCR*-Ansätze wurde im Biometra T3 Thermoblock (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland) nach folgenden Programmen amplifiziert (s. Tabelle 2.2 und Tabelle 2.3):

*Tabelle 2.2: Programm für die Exone 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 18, 19, 20:*

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
Denaturierung	95,0°C	5 Minuten
33 Zyklen:		
- Denaturierung	95,0°C	45 Sekunden
- <i>Annealing</i>	65,0°C	45 Sekunden
- Polymerisierung	72,0°C	1 Minute
Pause	72,0°C	10 Minuten

*Tabelle 2.3: Programm für die Exone 3 und 4, 11, 12 und 13, 14 und 15, 16 und 17:*

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
Denaturierung	95,0°C	5 Minuten
45 Zyklen:		
- Denaturierung	95,0°C	30 Sekunden
- <i>Annealing</i>	58,0°C	30 Sekunden
- Polymerisierung	72,0°C	30 Sekunden
Pause	72,0°C	10 Minuten

Die optimalen *Annealing*-Temperaturen (vgl. Tabelle 2.1) wurden mit Hilfe folgender Formel für jedes der 16 Primerpaare ermittelt:

$$T_m = G/C - \text{Anteil}[\% \cdot ^\circ\text{C}] \cdot 0,41 + 69,3^\circ\text{C} - \frac{650}{\text{Oligonukleotidlänge}(bp)} [^\circ\text{C}]$$

### 2.2.3.3 Auftrennung, Analyse und Gelextraktion der amplifizierten DNA

Die amplifizierte DNA (s. 2.2.3.2) wurde auf einem 2%igen Agarose-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde hergestellt aus 2 g Agarose (my-Budget Universal Agarose 5000, Art. Nr. 10-35-1020, Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland) auf 100 ml 1xTBE-Puffer (216g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 110 g Borsäure, 80 ml EDTA (0,5 M, pH 8) auf 20 l aqua dest.). Für die Herstellung des Gels wurden (mit Ausnahme der Agarose, s.o.) Chemikalien von der Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Orientierung wurde auf das Gel eine 100 bp-DNA-Leiter aufgetragen (100 bp DNA ladder, Cat. No. 15628-050, invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California 92008, U.S.A.). Die Auftrennung erfolgte bei 120V mit dem Biometra® Standard Power Pack P25 (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland).

Zur Analyse wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (200 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (100 mg/ml) auf 500 ml aqua dest.) über einen Zeitraum von 15 Minuten gefärbt. Mit Hilfe der UV-Lampe Biometra Ti1 Transillumination (Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland) wurde die amplifizierte DNA im Gel identifiziert und ausgeschnitten.

Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit, Cat. No. 28706 (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach dem „QIAquick Gel Extraction Kit Protocol“. Dabei wurden der Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und die Heraeus Biofuge fresco (DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, England) verwendet.

### 2.2.3.4 Markierung der amplifizierten *DNA* mit Hilfe Fluoreszenzmarkierter Nukleotide

Die Sequenzierungs-PCR wurde mit Hilfe des ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA 94404, U.S.A.) nach folgendem Rezept angesetzt:

- 12 µl *HPLC*-Wasser
- 3 µl Puffer
- 2 µl ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction mix
- 1 µl *Primer* (*Forward* oder *Reverse*)
- 2 µl amplifizierte *DNA*

Für Exon 18 wurde alternativ folgender Ansatz verwendet:

- 4,5 µl *HPLC*-Wasser
- 3 µl Puffer
- 2 µl ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction mix
- 2,5 µl *Primer* (*Forward* oder *Reverse*)
- 8 µl amplifizierte *DNA*

Auf diese Weise wurden von jedem Exon zwei Reaktionen durchgeführt – eine mit dem *Sense-Primer*, die andere mit dem *Antisense-Primer*.

Die Sequenzierungs-PCR erfolgte nach dem in Tabelle 2.4 beschriebenen Schema.

Tabelle 2.4: Programm für die Sequenzierungs-PCR:

Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	96,0°C	40 Sekunden
33 Zyklen:		
- Denaturierung	96,0°C	15 Sekunden
- <i>Annealing</i>	53,0°C	5 Sekunden
- Polymerisierung	60,0°C	4 Minuten
Pause	4,0°C	

### 2.2.3.5 Aufreinigung und Vorbereitung der Proben zur Sequenzierung

Die Probenaufreinigung wurde mit Hilfe des DyeEx™ 2.0 Spin Kit, Cat. No. 63206 (QIAgen, Hilden, Deutschland) nach dem „DyEx 2.0 Spin Protocol for Dye Terminator Removal“ durchgeführt.

Die so aufgereinigte *DNA* wurde mit Formamid im Verhältnis 1:1 (10 µl *DNA* auf 10 µl Formamid) gemischt und mit Hilfe des ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer Typ 310-3 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA 94404, U.S.A.) sequenziert.

### 2.2.3.6 Auswertung der Sequenzierung

Die *DNA*-Sequenzen der 20 Exone sowie die unmittelbar an die Exone angrenzenden Intronsequenzen wurden manuell mit der Sequenz des *VLCAD*-Gens aus dem National Center for Biotechnology Information (*NCBI*; Nukleotid-*ID* NM\_000018.2) abgeglichen. Punktmutationen innerhalb der Exons wurden nach dem zu erwartenden Aminosäureaustausch im Protein charakterisiert und entsprechend der *NCBI*-Nomenklatur (*NCBI*, Protein-*ID* NP\_000009.1) benannt.

Einschränkend sei hier angemerkt, dass die Mutationsanalyse auf die *VLCAD-cDNA* und die die Exone flankierenden Intronsequenzen (jeweils 25 Nukleotide vor und nach dem jeweiligen Exon) beschränkt ist. Andere Mutationen, wie z.B. Mutationen in der Promotorregion und in der Mitte der Introne, werden hierbei nicht erfasst.

### 2.2.3.7 Charakterisierung der Mutationen

Die Mutationen wurden in *Missense*- und Nullmutationen unterteilt. Bei den *Missense*-Mutationen wurden darüber hinaus die *VLCAD*-Kristallstruktur (nach *McAndrew et al., 2008*) sowie verschiedene *in silico*-Analyseprogramme zu einer weiterführenden Auswertung angewendet.

### 2.2.3.8 *in silico*-Analyse der *Missense*-Mutationen

Alle *Missense*-Mutationen wurden mit Hilfe von vier online verfügbaren Programmen einer *in silico*-Analyse unterzogen. Die verwendeten Programme waren PolyPhen, PMut, SNPs3D und SNAP.

Das Programm PolyPhen (verfügbar unter <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) trifft Voraussagen basierend auf direkten physikalischen und vergleichenden Berechnungen und differenziert zwischen gutartigen (*benign*), möglicherweise schädigenden (*possibly damaging*) und wahrscheinlich schädigenden (*probably damaging*) Mutationen (*Ramensky et al., 2002, Sunyaev et al., 2001, Sunyaev et al., 2000*).

PMut (<http://mmb.pcb.ub.es/PMut/>) unterscheidet zwischen neutralen (*neutral*) und pathologischen (*pathological*) Mutationen und berechnet dies mit Hilfe verschiedener Sequenzinformationen basierend auf neuronalen Netzwerken; zusätzlich wird ein Reliabilitätsindex angegeben (von 0=geringe bis 9=hohe Reliabilität) (*Ferrer-Costa et al., 2004*).

SNPs3D (<http://www.snps3d.org/>) errechnet einen *Score* aus der Entropie und der Konservierung bestimmter Sequenzabschnitte bei verschiedenen Spezies, wobei negative *Scores* eine gravierende Veränderung anzeigen, während positive *Scores* darauf hindeuten, dass die Mutationen die Proteinstruktur wenig beeinflussen (*Yue et al., 2006*).

Das Programm SNAP (<http://rostlab.org/services/snap/>) basiert wie PMut auf neuronalen Netzwerken und macht sich verschiedene, *in silico* abgeleitete Proteininformationen zunutze, um Aussagen über die Effekte bestimmter Mutationen zu machen. Es unterscheidet zwischen neutralen (*neutral*) und nicht neutralen (*non-neutral*) Mutationen und gibt zusätzlich einen Reliabilitätsindex (von 0=geringe bis 9=hohe Reliabilität) und einen Genauigkeitswert (zwischen 50% und 100%) für die Ergebnisse an (*Bromberg et al., 2007*).

### 2.2.3.9 Betrachtung der *Missense*-Mutationen in der *VLCAD*-Kristallstruktur

Die *Missense*-Mutationen wurden mit Hilfe des Programms Cn3D 4.1 (Wang *et al.*, 2000) und der Kristallstruktur der *VLCAD* (MMDB ID 62408, PDB ID 3B96, McAndrew *et al.*, 2008) auf ihre Position im Enzym untersucht. Die Abbildungen im Ergebnisteil wurden aus der Darstellung der Kristallstruktur in Cn3D 4.1 (Wang *et al.*, 2000) erstellt. Die Beschriftungen erfolgten mit Hilfe des *Ulead Photo Express 5SE*-Bildbearbeitungsprogramms.

Die Mutationen (mit Ausnahme der Intronmutationen) wurden nach ihrer Lokalisation im Enzym betrachtet. Zur näheren Charakterisierung dienten Erkenntnisse über die funktionellen Bereiche der *VLCAD* aus früheren Arbeiten; diese sind als Referenzen bei den jeweiligen Mutationen aufgeführt.

## 3. Ergebnisse

Bei allen 34 Studienteilnehmern wurde eine komplette Sequenzierung der Exone des *VLCAD*-Gens vorgenommen; hierbei zeigten sich drei verschiedene Gruppen, nämlich homozygote bzw. *compound*-heterozygote Patienten mit zwei Mutationen, heterozygote Träger mit einer Mutation und Kinder ohne Mutation der *VLCAD*. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind zunächst im Abschnitt 3.1 in Verbindung mit den Enzymaktivitäten dargestellt. In Abschnitt 3.2 werden die vorliegenden Mutationen analog zu *Andresen et al.* (1999) in Null- und *Missense*-Mutationen eingeteilt. Die *Missense*-Mutationen wurden darüber hinaus mit Hilfe der Kristallstruktur der *VLCAD* (nach *McAndrew et al.*, 2008) und mit Hilfe von vier verschiedenen *in silico*-Analyseprogrammen näher charakterisiert (vgl. Material und Methoden, Absatz 2.2.3.8).

### 3.1 Studienteilnehmer

#### 3.1.1 Übersicht aller Studienteilnehmer

Tabelle 3.1. zeigt die Ergebnisse der Sequenzierung in Korrelation mit den jeweils detektierten Enzymaktivitäten.

Die fünf Studienteilnehmer mit doppelter Enzymaktivitätsmessung wiesen in den beiden Assays verschiedene Werte auf, die beide in der Tabelle angegeben sind. Bei der Erstellung der Reihenfolge der Studienteilnehmer wurde jeweils die höhere Enzymaktivität zugrunde gelegt. Die Enzymaktivitäten sind in großem Maße von der Lymphozytenqualität abhängig. Die Lymphozytenqualität wird durch verschiedene Variablen beeinflusst, z.B. durch das Intervall zwischen Abnahme und Analyse, sowie durch die Temperatur während des Transports. Der höhere Wert wurde gewählt, da bei minderer Qualität von einer geringeren Enzymrestaktivität ausgegangen werden muss.

Tabelle 3.1: Alle Studienteilnehmer, sortiert nach Enzymaktivität (aufsteigend)

Studienteilnehmer	Geschlecht	Enzymaktivität	Allel 1: Mutation	Allel 1: Aminosäuren-Austausch	Allel 2: Mutation	Allel 2: Aminosäuren-Austausch	Gruppe		
							Patient	Mutations-träger	Wildtyp
1	männlich	12%	<b>c.848T&gt;C, p.Val283Ala</b>	aliphatisch/hydrophob → aliphatisch/hydrophob	<b>c.848T&gt;C, p.Val283Ala</b>	aliphatisch/hydrophob → aliphatisch/hydrophob	X		
2	männlich	13%	<b>c.848T&gt;C, p.Val283Ala</b>	aliphatisch/hydrophob → aliphatisch/hydrophob	c.1072A>G, p.Lys358Glu	basisch → sauer	X		
3	männlich	21%	<b>c.1844G&gt;A, p.Arg615Gln</b>	Basisch → saures Amid	c.911C>T, p.Ala304Val	aliphatisch/hydrophob → aliphatisch/hydrophob	X		
4	weiblich	21%	c.1591C>T, p.Arg531Trp	basisch → aromatisch/hydrophob	c.1269+1G>A	Kein AS-Tausch	X		
5*	männlich	22% (15%)	c.339C>A, p.Phe113Leu	aromatisch/hydrophob → aliphatisch/hydrophob	<b>c.848T&gt;C, p.Val283Ala</b>	aliphatisch/hydrophob → aliphatisch/hydrophob	X		
6*	weiblich	25% (23%)	<b>c.779C&gt;T, p.Thr260Met</b>	aliphatisch/hydrophil → hydrophob	Wildtyp	---		X	
7	männlich	26%	<b>c.1405C&gt;T, p.Arg469Trp</b>	basisch/hydrophil → aromatisch/hydrophob	Wildtyp	---		X	
8	männlich	28%	c.1532G>A, p.Arg511Gln	Basisch → saures Amid	Wildtyp	---		X	
9*	männlich	29% (21%)	c.922G>T, p.Ala308Ser; c.925G>A, p.Glu309Lys; c.928_930 delinsCAC, p.Val310His	aliphatisch/hydrophob → aliphatisch/hydrophil; sauer → basisch; aliphatisch/hydrophob → basisch	Wildtyp	---		X	
10	männlich	29%	<b>c.553G&gt;A, p.Gly185Ser</b>	aliphatisch/hydrophob → aliphatisch/hydrophil	Wildtyp	---		X	
11	männlich	29%	<b>c.779C&gt;T, p.Thr260Met</b>	aliphatisch/hydrophil → hydrophob	Wildtyp	---		X	
12	männlich	29%	<b>c.1375C&gt;T, p.Arg459Trp</b>	basisch/hydrophil → aromatisch/hydrophob	Wildtyp	---		X	

13	weiblich	29%	c.1072G>C, p.Gly343Arg	aliphatisch/hydrophob → basisch	Wildtyp	---		X	
14*	weiblich	30% (13%)	c.1269+1G>A	Kein AS-Tausch	Wildtyp	---		X	
15	weiblich	31%	c.1009C>T, p.Leu337Phe	aliphatisch/hydrophob → aromatisch/hydrophob	Wildtyp	---		X	
16	männlich	31%	Wildtyp	---	Wildtyp	---			X
17	männlich	31%	Wildtyp	---	Wildtyp	---			X
18	männlich	32%	c.1434+4delA	Kein AS-Tausch	Wildtyp	---		X	
19	weiblich	33%	c.533T>C, p.Leu178Pro	basisch/hydrophil → hydrophob	Wildtyp	---		X	
20	männlich	34%	c.565_587del	Kein AS-Tausch	Wildtyp	---		X	
21	weiblich	34%	Wildtyp	---	Wildtyp	---			X
22*	männlich	36% (17%)	c.1077+1G>T	Kein AS-Tausch	Wildtyp	---		X	
23	männlich	36%	Wildtyp	---	Wildtyp	---			X
24	männlich	37%	<b>c.1367G&gt;A</b> , <b>p.Arg456His</b>	basisch/hydrophil → basisch	Wildtyp	---		X	
25	weiblich	39%	<b>c.1844G&gt;A</b> , <b>p.Arg615Gln</b>	Basisch → saures Amid	Wildtyp	---		X	
26	männlich	39%	<b>c.848T&gt;C</b> , <b>p.Val283Ala</b>	aliphatisch/hydrophob → aliphatisch/hydrophob	Wildtyp	---		X	
27*	weiblich	42% (27%)	<b>c.1096C&gt;T</b> , <b>p.Arg366Cys</b>	basisch → hydrophob	Wildtyp	---		X	
28	männlich	45%	Wildtyp	---	Wildtyp	---			X
29	männlich	46%	Wildtyp	---	Wildtyp	---			X
30	männlich	47%	Wildtyp	---	Wildtyp	---			X
31	männlich	47%	Wildtyp	---	Wildtyp	---			X
32	männlich	48%	Wildtyp	---	Wildtyp	---			X
33	weiblich	50%	<b>c.1182+1G&gt;A</b>	Kein AS-Tausch	Wildtyp	---		X	
34	männlich	50%	Wildtyp	---	Wildtyp	---			X

**Fett kursiv gedruckte Mutationen** sind bereits in der Literatur beschrieben (Verweise s.u.)

Bei den mit \* gekennzeichneten Patienten wurde die Enzymaktivität doppelt gemessen; der zweite Wert ist in Klammern angegeben.

### 3.1.2 Einteilung der Studienteilnehmer nach Anzahl der identifizierten Mutationen

Die oben genannten Studienteilnehmer lassen sich nach ihrem Genotyp in drei verschiedene Gruppen einteilen: Die erste Gruppe besteht aus fünf Kindern, die entweder homozygot eine Mutation oder *compound*-heterozygot zwei verschiedene Mutationen tragen. In der zweiten Gruppe sind 19 Kinder, die eine Mutation heterozygot tragen. Die verbleibenden zehn Studienteilnehmer der dritten Gruppe zeigten keine Mutation auf dem *VLCAD*-Gen.

Bei den Studienteilnehmern aus der ersten Gruppe wurden zusätzlich die Eltern oder zumindest ein Elternteil molekulargenetisch untersucht, sofern entsprechende Blutproben vorhanden waren. Die Mutter von Studienteilnehmer 2 ist heterozygot für die Mutation p.Val283Ala. Ihre *VLCAD*-Enzymaktivität betrug 47%. Beim Vater konnte keine Untersuchungen durchgeführt werden, da kein Blut oder *DNA* zur Verfügung stand. Die Mutter von Studienteilnehmer 4 ist Trägerin der Mutation p.Arg531Trp; der Vater hat die Mutation c.1269+1G>A weitergegeben. Da von den Eltern von Studienteilnehmer 4 nur *DNA* zur Untersuchung eingesandt wurde, war eine Enzymumsatzmessung nicht möglich. Bei Studienteilnehmer 5 sind von beiden Elternteilen sowohl Enzymaktivitäten als auch die molekulargenetischen Untersuchungsergebnisse vorhanden: Die Mutter ist heterozygot für die Mutation p.Val283Ala und hat eine Enzymaktivität von 41%. Beim Vater wurde die Mutation p.Phe113Leu festgestellt; seine Enzym-Restaktivität beträgt 51%.

Von den Studienteilnehmern 1 und 3 war kein elterliches Blut für die Untersuchung verfügbar.

## 3.2 Mutationen

Im Rahmen der Studie wurden bei 24 von 34 Teilnehmern insgesamt 22 verschiedene Mutationen gefunden. Im Folgenden werden diese Mutationen in Analogie zu *Andresen et al., 1999* in Nullmutationen und *Missense*-Mutationen eingeteilt. Die Lokalisation der *Missense*-Mutationen in der Kristallstruktur der *VLCAD* und die *in silico*-Analyseergebnisse werden ebenfalls dargestellt.

### 3.2.1 Nullmutationen

In dieser Studie wurden fünf verschiedene Nullmutationen bei sechs verschiedenen Studienteilnehmern entdeckt. Dabei handelt es sich um vier Mutationen im Bereich unterschiedlicher Spleißregionen und um eine Deletionsmutation bei Studienteilnehmer 20.

#### 3.2.1.1 Mutationen an den Spleißregionen der *VLCAD*

Die vier Intronmutationen, die die Spleißregionen betreffen, zeigten sich in den Intronen 10, 11, 12 und 14. Die genannten Mutationen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Mutationen der Spleißregionen

Mutation	Studienteilnehmer	Enzymaktivität(en)
c.1077+1G>T	22	36% (heterozygot)
c.1182+1G>A	33	50% (heterozygot)
c.1269+1G>A	4 14	21% (+ p.Arg531Trp) 30% (heterozygot)
c.1434+4delA	18	32% (heterozygot)

Bisher ist von diesen Mutationen lediglich die Mutation c.1182+1G>A vorbeschrieben (*Strauss et al., 1995*).

### 3.2.1.2 Deletionsmutation bei Studienteilnehmer 20

Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Deletion von insgesamt 23 Basen auf Exon 7 (c.565\_587del). Da hier eine Leserasterverschiebung stattfindet, ist auch diese Mutation als Nullmutation zu werten. Die *VLCAD*-Restaktivität dieses Studienteilnehmers betrug 34%.

### 3.2.2 *Missense*-Mutationen

Sechzehn der Mutationen dieser Studie sind *Missense*-Mutationen, bei denen eine Base ausgetauscht ist und somit durch das veränderte Basentriplett eine andere Aminosäure translatiert wird. In einem Fall (Studienteilnehmer 9) sind auf drei aufeinanderfolgenden Basentriplets fünf von neun Basen verändert, was in einer Folge von drei veränderten Aminosäuren bzw. drei aufeinanderfolgenden *Missense*-Mutationen resultiert. Diese wurden zu den *Missense*-Mutationen gezählt, sodass insgesamt 19 verschiedene *Missense*-Mutationen charakterisiert werden konnten. Alle diese Mutationen wurden nach ihren biochemischen Veränderungen und ihrer Lage im Enzym beurteilt und von vier *online* verfügbaren *in silico*-Analyseprogrammen auf ihre potentiellen Effekte auf die Enzymfunktion untersucht (s.o.). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: *in silico*-Analyse der Missense-Mutationen:

Mutation	PolyPhen	PMut (mit Reliabilitätsindex)	SNPs3D	SNAP (mit Reliabilitätsindex und Genauigkeit in %)
p.Phe113Leu	gutartig	neutral (4)	0,97	neutral (4/85%)
p.Leu178Pro	wahrscheinlich schädigend	neutral (1)	-1,39	nicht neutral (2/70%)
p.Gly185Ser	wahrscheinlich schädigend	pathologisch (0)	-1,09	nicht neutral (5/87%)
p.Thr260Met	wahrscheinlich schädigend	neutral (6)	-0,77	nicht neutral (3/78%)
p.Val283Ala	möglicherweise schädigend	neutral (7)	-2,20	nicht neutral (2/70%)
p.Ala304Val	möglicherweise schädigend	neutral (5)	-1,73	nicht neutral (1/63%)
p.Ala308Ser	gutartig	neutral (4)	0,81	neutral (6/92%)
p.Glu309Lys	möglicherweise schädigend	neutral (2)	-1,37	nicht neutral (0/58%)
p.Val310His	wahrscheinlich schädigend	neutral (1)	-2,83	nicht neutral (4/82%)
p.Leu337Phe	wahrscheinlich schädigend	neutral (5)	-2,34	nicht neutral (2/70%)
p.Gly343Arg	möglicherweise schädigend	pathologisch (0)	-0,83	nicht neutral (4/82%)
p.Lys358Glu	möglicherweise schädigend	neutral (4)	2,68	neutral (4/85%)
p.Arg366Cys	wahrscheinlich schädigend	neutral (1)	-4,49	nicht neutral (7/96%)
p.Arg456His	wahrscheinlich schädigend	neutral (1)	-2,16	nicht neutral (5/87%)
p.Arg459Trp	wahrscheinlich schädigend	pathologisch (5)	-1,58	nicht neutral (5/87%)
p.Arg469Trp	wahrscheinlich schädigend	pathologisch (4)	-3,82	nicht neutral (4/82%)
p.Arg511Gln	gutartig	neutral (1)	k.A.	neutral (5/89%)
p.Arg531Trp	wahrscheinlich schädigend	pathologisch (4)	-0,70	neutral (2/69%)
p.Arg615Gln	gutartig	neutral (7)	1,14	neutral (2/69%)

Die farbliche Kodierung der Analyseergebnisse zeigt die prognostizierte Dignität der Veränderungen an: rot = eher schädigend, grün = eher gutartig, gelb = unklar (bei Analyse durch PolyPhen)

Die Tabelle zeigt, dass die Angaben der verschiedenen Programme zu den einzelnen Mutationen oft widersprüchlich sind. Nur in sieben Fällen sind die Angaben eindeutig: Für die Mutationen p.Phe113Leu, p.Ala308Ser, p.Arg511Gln und p.Arg615Gln werden bei allen Programmen günstige Prognosen angegeben; bei den Mutationen p.Gly185Ser, p.Arg459Trp und p.Arg469Trp werden ausnahmslos ungünstige Veränderungen der *VLCAD* erwartet. Die prognostizierten Veränderungen sind in der Tabelle rot, gelb und grün gedruckt, wobei rot für eher schädigend, grün für eher gutartig und gelb für die unklare Variante (bei der Analyse durch PolyPhen) steht.

### 3.2.2.1 *Missense*-Mutationen in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum

Das katalytische Zentrum der VLCAD ist, in Analogie zur Struktur anderer Acyl-CoA-Dehydrogenasen, am Glutamat an Position 462 (Glu462) lokalisiert (erstmalig beschrieben von *Souri et al., 1998*; bestätigt von *McAndrew et al., 2008*). In direkter Nähe (3 Aminosäuren vom aktiven Zentrum entfernt) konnte bei Studienteilnehmer 12 eine *Missense*-Mutation identifiziert werden (p.Arg459Trp). Zudem zeigte sich bei Studienteilnehmer 7 die Mutation p.Arg469Trp; für diese Position ist eine Salzbrückenbildung mit Glu424 beschrieben, die zur korrekten räumlichen Positionierung des Glutamats an Position 462 beiträgt (*McAndrew et al., 2008*). Ihre Lokalisationen im Verhältnis zum aktiven Zentrum werden in Abb. 3.1 verdeutlicht; die Korrelationen mit der Enzymaktivität werden in Tabelle 3.4 gezeigt.

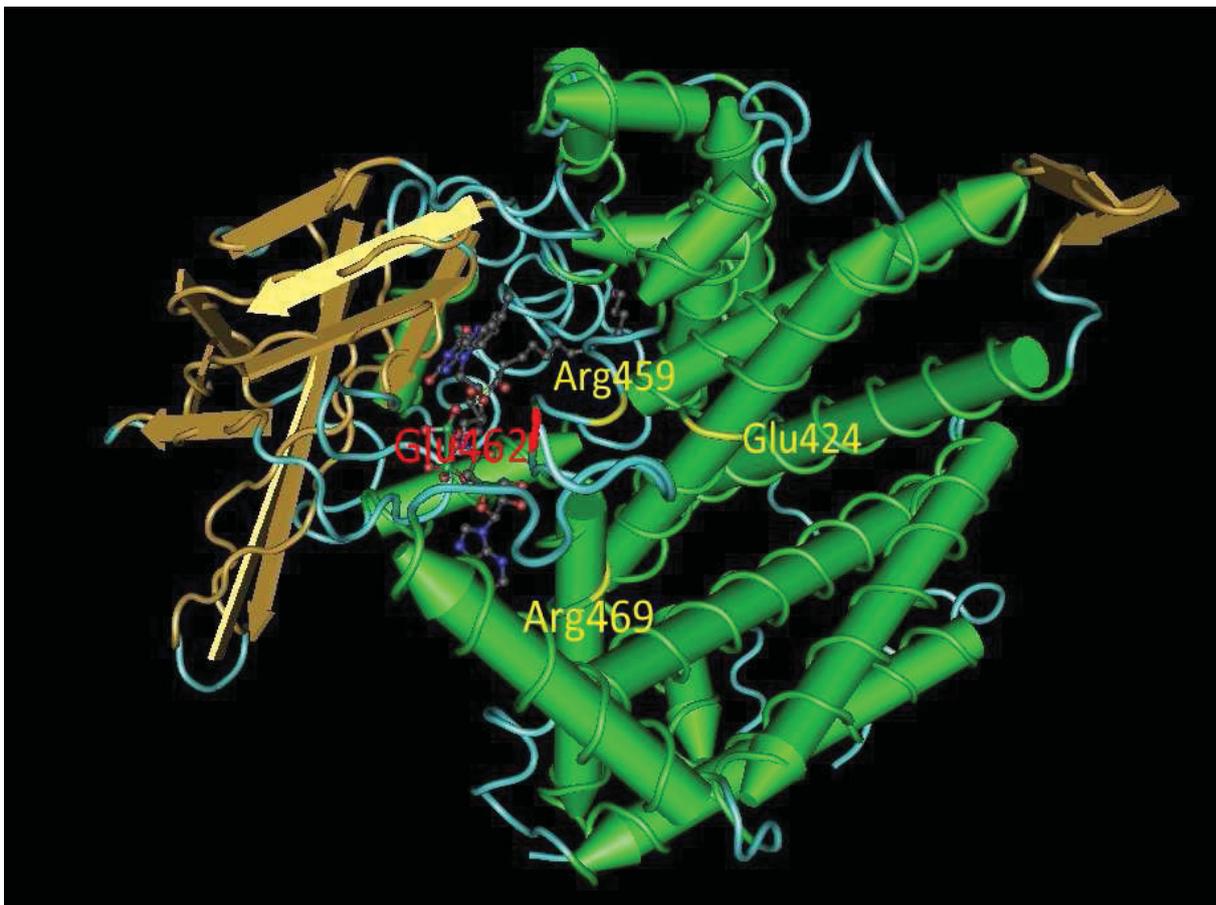


Abb. 3.1: Mutationen in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum.

Rot markiert: Glu462 (das katalytische Zentrum).

Gelb markiert: Lokalisation der Aminosäuren Arg459 und Arg469, die durch Punktmutationen bei jeweils einem Studienteilnehmer ausgetauscht sind, sowie der Aminosäure Glu424, die eine Salzbrücke mit Arg469 bildet.

Tabelle 3.4: Mutationen in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum

Mutation	Studien- teilnehmer	Enzymaktivität(en)	Aminosäurenaustausch	<i>in silico</i> - Analyse
p.Arg459Trp	12	29% (heterozygot)	basisch/hydrophil→ aromatisch/hydrophob	4x pathologisch
p.Arg469Trp	7	26% (heterozygot)	basisch/hydrophil→ aromatisch/hydrophob	4x pathologisch

Bei beiden Mutationen liegt der Austausch der Aminosäure Arginin gegen ein Tryptophan vor, was biochemisch betrachtet eine deutliche Veränderung darstellt. Beide Mutationen sind bereits vorbeschrieben (z.B. *Andresen et al., 1999, McAndrew et al., 2008*). Die heterozygot vorliegenden Mutationen führen zu einer deutlichen Einschränkung der VLCAD-Enzymaktivität.

Alle vier verwendeten *in silico*-Analyseprogrammen prognostizieren eine relevante Veränderung der VLCAD.

### 3.2.2.2 *Missense*-Mutationen im Bereich der Substratbindungsstelle

In diese Gruppe fallen insgesamt fünf Mutationen von fünf verschiedenen Studienteilnehmern. Bei vier Teilnehmern lag jeweils eine der Mutationen p.Leu178Pro, p.Gly185Ser, p.Leu337Phe und p.Gly343Arg heterozygot vor. Studienteilnehmer 3 zeigte die Mutation p.Ala304Val *compound*-heterozygot zusammen mit einer weiteren *Missense*-Mutation (p.Arg615Gln). Die Lage dieser fünf Mutationen im Bereich des Enzyms, der für die Substratbindung zuständig ist, zeigt Abb. 3.2; die zugehörigen Studienteilnehmer und Enzymaktivitäten sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

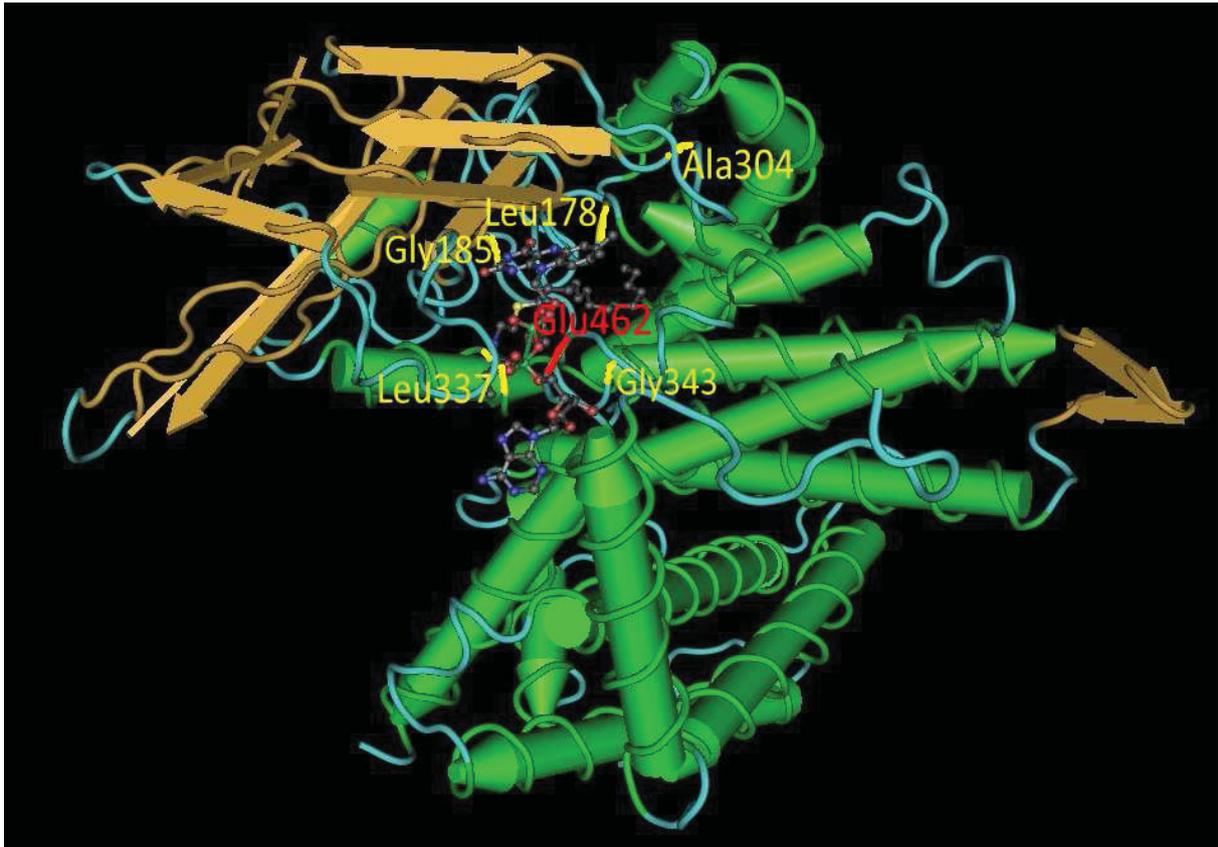


Abb. 3.2: Mutationen im Bereich der Substratbindungshöhle.

Rot markiert: Glu462 (das katalytische Zentrum).

Gelb markiert: Lokalisation von Aminosäuren im Bereich der Substratbindung, die durch Punktmutationen bei manchen Studienpatienten ausgetauscht sind.

Tabelle 3.5: Mutationen im Bereich der Substratbindungshöhle

Mutation	Studien- teilnehmer	Enzymaktivität(en)	Aminosäurenaustausch	<i>in silico</i> - Analyse
p.Leu178Pro	19	33% (heterozygot)	basisch/hydrophil → hydrophob	3x pathologisch, 1x neutral
p.Gly185Ser	10	29% (heterozygot)	aliphatisch/hydrophob → aliphatisch/hydrophil	4x pathologisch
p.Ala304Val	3	21% (+ p.Arg615Gln)	aliphatisch/hydrophob → aliphatisch/hydrophob	2x pathologisch, 1x grenzwertig, 1x neutral
p.Leu337Phe	15	31% (heterozygot)	aliphatisch/hydrophob → aromatisch/hydrophob	3x pathologisch, 1x neutral
p.Gly343Arg	13	29% (heterozygot)	aliphatisch/hydrophob → basisch	3x pathologisch, 1x grenzwertig

An diesen fünf Positionen im Protein ist entweder ein Leucin (p.Leu178Pro, p.Leu337Phe), ein Glycin (p.Gly185Ser, p.Gly343Arg) oder ein Alanin (p.Ala304Val) gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht. Leucin, Glycin und Alanin sind jeweils aliphatische, hydrophobe Aminosäuren. Bei den Mutationen p.Ala304Val und p.Leu337Phe findet jeweils ein Austausch gegen eine hydrophobe Aminosäure statt, nämlich gegen das aliphatische Valin bzw. das aromatische Phenylalanin. Die Mutationen p.Leu178Pro, p.Gly185Ser und p.Gly343Arg führen an ihren Lokalisationen zum Austausch gegen Aminosäuren mit hydrophiler Seitenkette, nämlich Prolin, Serin oder Arginin.

p.Gly185Ser ist die einzige dieser Mutationen, die bisher als *Missense*-Mutation beschrieben wurde (erstmalig bei *Andresen et al., 1999*). Alle vier *in silico*-Analyseprogramme stufen diese Mutation als schädigend ein.

Die Mutation p.Leu178Pro wird von drei der vier *in silico*-Analyseprogrammen als schädigende Veränderung eingestuft (vgl. Tabelle 3.3). Zudem bestehen Hinweise darauf, dass das Leucin an Position 178 eine hydrophobe Tasche für das für die Substratbindung wichtige Glycin an Position 185 bildet (*Gobin-Limballe et al., 2010*).

Die Mutation p.Ala304Val wurde bisher nicht in dieser Form beschrieben. Allerdings haben Untersuchungen von *Gobin-Limballe et al. 2010* ergeben, dass der Austausch des Alanins an Position 304 gegen ein hydrophiles Threonin (p.Ala304Thr) zu einer Verminderung der Enzymstabilität bei gleichbleibender Proteinstruktur führt. Threonin ist eine deutlich hydrophilere Aminosäure als Valin, welches (wie Alanin) eine hydrophobe Aminosäure ist. Alle vier *in silico*-Analyseprogramme prognostizierten die Mutation p.Ala304Val als günstig (vgl. Tabelle 3.3).

Bei der Mutation p.Leu337Phe liegt ein Austausch des hydrophoben Leucins gegen ein ebenfalls hydrophobes Phenylalanin vor, sodass biochemisch gesehen keine gravierende Veränderung zu erwarten ist. Die *in silico*-Mutationsanalyseprogramme zeigten kein einheitliches Ergebnis, wobei die Vorhersagen einen Trend zu einer ungünstigen Veränderung prognostizieren (vgl. Tabelle 3.3).

Im Fall der Mutation p.Gly343Arg liegt ein Austausch des hydrophoben Glycins gegen ein hydrophiles Arginin vor. Drei der vier *in silico*-Analyseprogramme stellen diese Mutation (mit insgesamt eher geringer Reliabilität) als pathologisch dar, das vierte Programm (PolyPhen) klassifiziert die Mutation als möglicherweise schädigend (vgl. Tabelle 3.3).

Bei vier dieser fünf Mutationen (p.Leu178Pro, p.Gly185Ser, p.Leu337F, p.Gly343Arg) sind die Träger heterozygot, die Mutation p.Ala304Val liegt bei Studienteilnehmer 3 *compound*-heterozygot mit p.Arg615Gln vor. Bei allen fünf betroffenen Studienteilnehmern ist bislang keine klinische Symptomatik bekannt. Alle vier heterozygot vorliegenden Mutationen führen bei ihren Trägern zu Enzymresidualaktivitäten zwischen 29 und 33% und somit zu einer deutlichen Reduktion der Enzymaktivität.

Bei Studienteilnehmer 3 liegt noch eine zweite Mutation vor (p.Arg615Gln); mit beiden Mutationen zusammen besteht dennoch eine hohe Enzymrestaktivität von 21%. Da kein elterliches Blut vorhanden ist, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Mutationen auf jeweils einem Allel lokalisiert sind oder ob möglicherweise beide Mutationen auf dem gleichen Allel liegen und das zweite Allel keine Mutation trägt.

### 3.2.2.3 Mutationen an Strukturen, die für die Substratlängenspezifität der VLCAD verantwortlich sind

In der Kristallstruktur der VLCAD befinden sich zwei Domänen, die eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aufweisen. Die erste, größere dieser  $\beta$ -Faltblatt-Domänen ist nach McAndrew *et al.* (2008) für die Bevorzugung sehr langkettiger Acyl-CoAs verantwortlich, insbesondere die Untereinheiten 4 und 5. Auf dieser Domäne sind zwei *Missense*-Mutationen lokalisiert, die sehr häufig beim VLCAD-Mangel auftreten, nämlich p.Thr260Met ( $\beta$ -Faltblatt 4) und p.Val283Ala ( $\beta$ -Faltblatt 5) (die Mutationen wurden erstmals von Andresen *et al.* (1996) beschrieben). Ihre Lokalisation im Protein ist in Abb. 3.3 dargestellt; die zugehörigen Patienten und Enzymaktivitäten sind in Tabelle 3.6 zu finden.

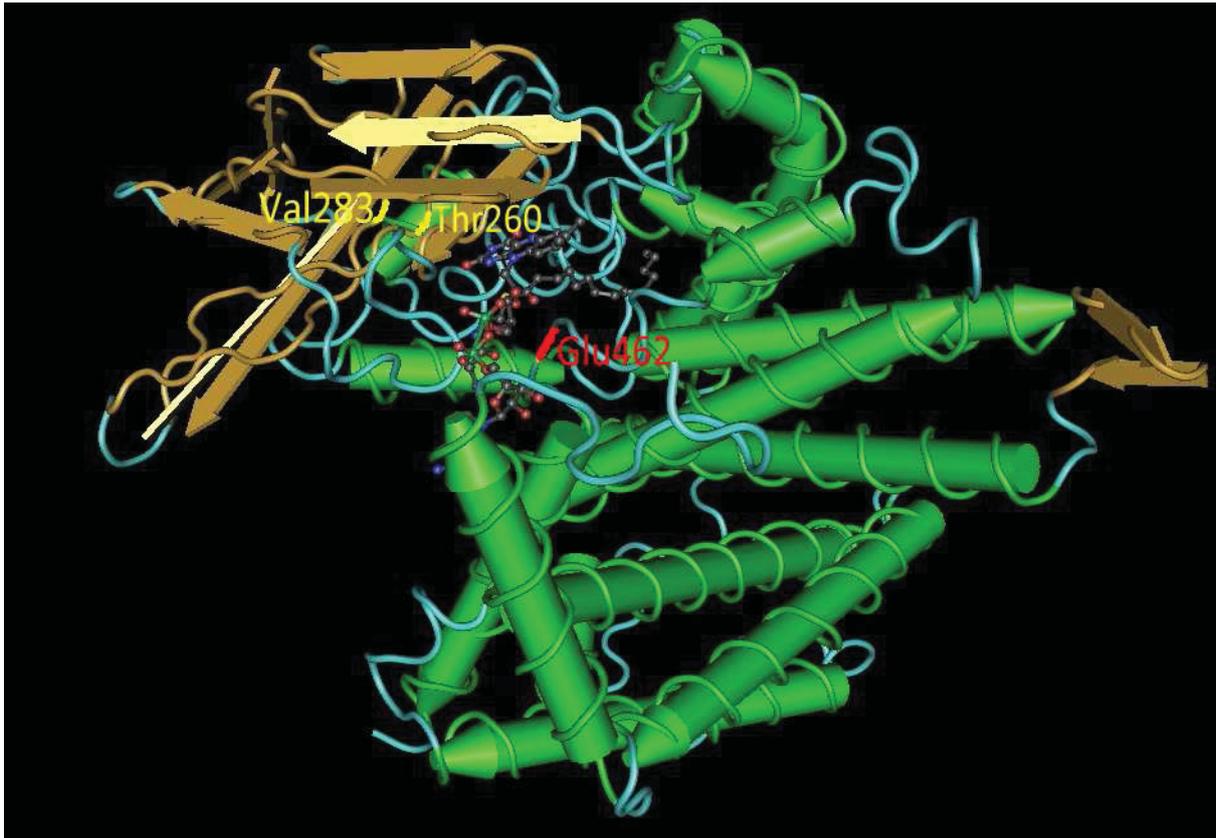


Abb. 3.3: Mutationen auf Domänen, die für die bevorzugte Substratlänge des Enzyms verantwortlich sind.

Rot markiert: Glu462 (das katalytische Zentrum).

Gelb markiert: Lokalisation von Aminosäuren, die durch Punktmutationen bei mehreren Studienpatienten ausgetauscht sind.

Tabelle 3.6: Mutationen auf Domänen, die für eine bevorzugte Substratlänge des Enzyms verantwortlich sind

Mutation	Studien- teilnehmer	Enzymaktivität(en)	Aminosäurenaustausch	<i>in silico</i> - Analyse
p.Thr260Met	6 11	25% (heterozygot) 29% (heterozygot)	aliphatisch/hydrophil → hydrophob	3x pathologisch, 1x neutral
p.Val283Ala	1 2 5 26	12% (homozygot) 13% (+ p.Lys358Glu) 22% (+ p.Phe113Leu) 39% (heterozygot)	aliphatisch/hydrophob → aliphatisch/hydrophob	2x pathologisch, 1x grenzwertig, 1 x neutral

p.Thr260Met geht mit einem Austausch des hydrophilen Threonins gegen das hydrophobe Methionin einher. Die Enzymaktivitäten bei den beiden heterozygoten Studienteilnehmern 6 und 11 liegen bei

25% und 29%. Bei der *in silico*-Analyse stuften drei von vier Programmen die Mutation als ungünstig ein; PMut klassifizierte p.Thr260Met als neutral (vgl. Tabelle 3.3).

Bei der Mutation p.Val283Ala ist das aliphatische Valin gegen das ebenfalls aliphatische Alanin ausgetauscht, was biochemisch gesehen einer geringen Veränderung entspricht. Die heterozygote Enzymaktivität liegt bei Studienteilnehmer 26 bei 39%; auch homozygot bzw. *compound*-heterozygot lagen die Enzymaktivitäten zwischen 12% und 22%. Im Rahmen der *in silico*-Analysen wurde die Mutation einmal als neutral, einmal als grenzwertig und zweimal als nicht-neutral klassifiziert (vgl. Tabelle 3.3).

#### 3.2.2.4 *Missense*-Mutation an einem FAD-Bindungsmotiv

Die *VLCAD* bindet *in vivo* nicht nur an langkettige Acyl-CoAs, sondern auch an FAD als Elektronenakzeptor. Im Zusammenhang mit der Bindung des Nukleotidanteils der FAD sind Glycin-Motive des Musters Gly-Gly-X-Gly beschrieben und bei Acyl-CoA-Dehydrogenasen zu finden (*Indo et al., 1991*). Dieses Motiv ist zweimal in der Aminosäuresequenz der *VLCAD* aufzufinden, nämlich Gly-Gly-Val-Gly an Positionen 141-144 und Gly-Gly-Met-Gly an Positionen 438-441. Von letzterer Gruppe ist eine Interaktion zwischen dem Glycin an Position 441 und dem Arginin an Position 366 bekannt, die zur Bindung des FAD beiträgt (*Andresen et al., 1996*).

Unter den Studienteilnehmern gibt es eine heterozygote Trägerin für eine Mutation im Bereich dieser FAD-Bindungsdomänen, nämlich Studienteilnehmerin 27 mit der Mutation p.Arg366Cys. Diese Mutation wurde bereits von *Andresen et al. (1999)* beschrieben. Hier ist das basische positiv geladene Arginin gegen das schwefelhaltige, hydrophobe Cystein ausgetauscht. Die Lokalisation dieser Mutation im Protein ist in Abb. 3.4 dargestellt; Tabelle 3.7 zeigt die Studienteilnehmerin und ihre Mutation. Die *in silico*-Analyseprogramme bezeichnen diese Mutation hauptsächlich als schwerwiegend (vgl. Tabelle 3.3).

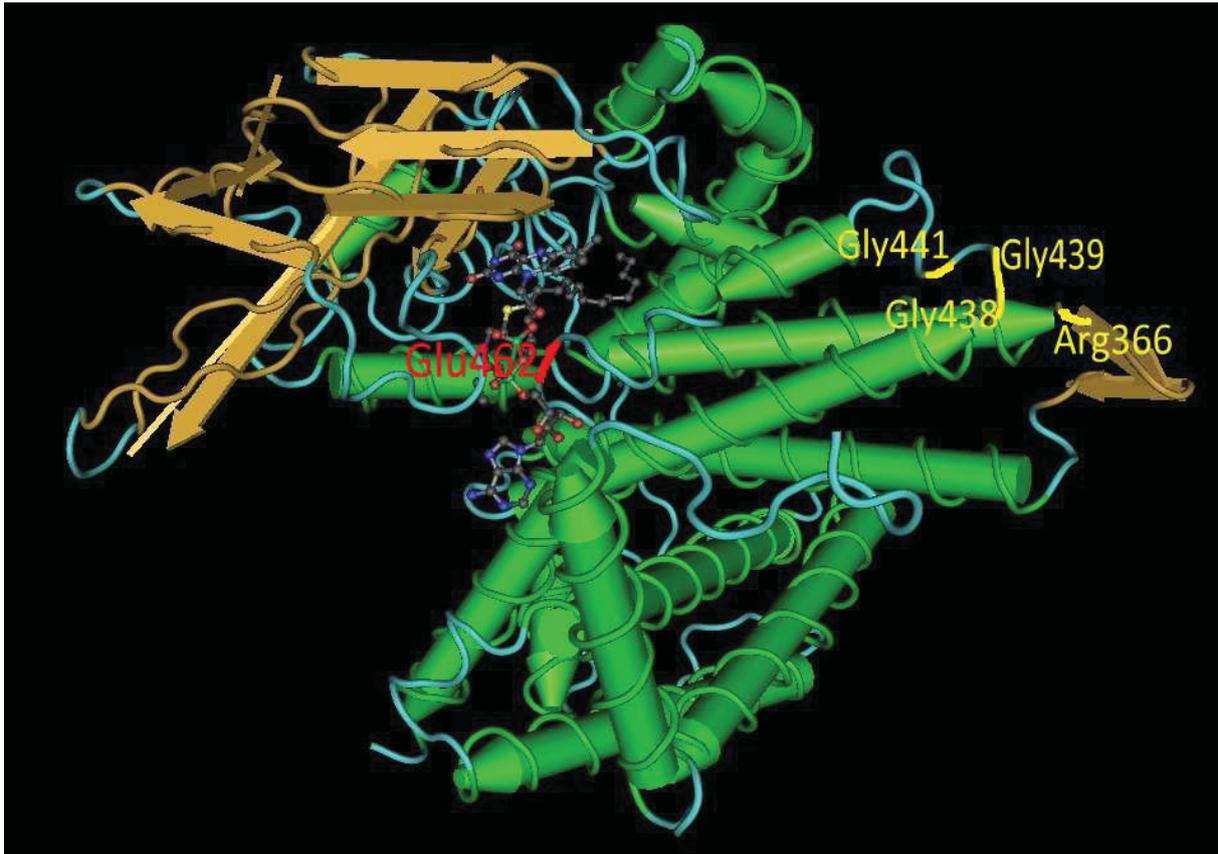


Abb. 3.4: Mutation im Bereich von FAD-Bindungsmotiven.

Rot markiert: Glu462 (das katalytische Zentrum).

Gelb markiert: Lokalisation von Aminosäuren, die an der FAD-Bindung beteiligt sind. An Arg366 wurde bei einer Studienteilnehmerin eine Mutation gefunden.

Tabelle 3.7: Mutationen an FAD-Bindungsmotiven

Mutation	Studien- teilnehmer	Enzymaktivität	Aminosäurenaustausch	<i>in silico</i> - Analyse
p.Arg366Cys	27	42% (heterozygot)	basisch → hydrophob	3x pathologisch, 1x grenzwertig

### 3.2.2.5 *Missense*-Mutation im Bereich der Dimerbildung

Die *VLCAD* ist ein Homodimer. In der Kristallstruktur der *VLCAD* zeigt sich, dass ein Arginin an Position 456 durch Ausbildung einer Salzbrücke mit der Asparaginsäure an Position 431 und einer Wasserstoffbrücke zum Glutamin an Position 435 des anderen Dimers ausbildet und somit wesentlich zur Dimerbildung beiträgt (McAndrew *et al.*, 2008).

Bei Studienteilnehmer 24 zeigte sich eine Mutation an der Position Arg456. Hier ist das basische Arginin gegen das ebenfalls basische Histidin ausgetauscht (p.Arg456His). Die Lokalisation der *Missense*-Mutation sowie die der beiden Aminosäuren, mit denen Bindungen der Quartärstruktur bestehen, sind in Abb. 3.5 gezeigt. Die zugehörige Enzymaktivität betrug 37% (vgl. Tabelle 3.8). Bei den *in silico*-Analyseprogrammen wurde die Mutation in drei von vier Fällen als ungünstig ausgewertet; nur bei PMut galt die Mutation mit geringer Reliabilität als neutral (vgl. Tabelle 3.2).

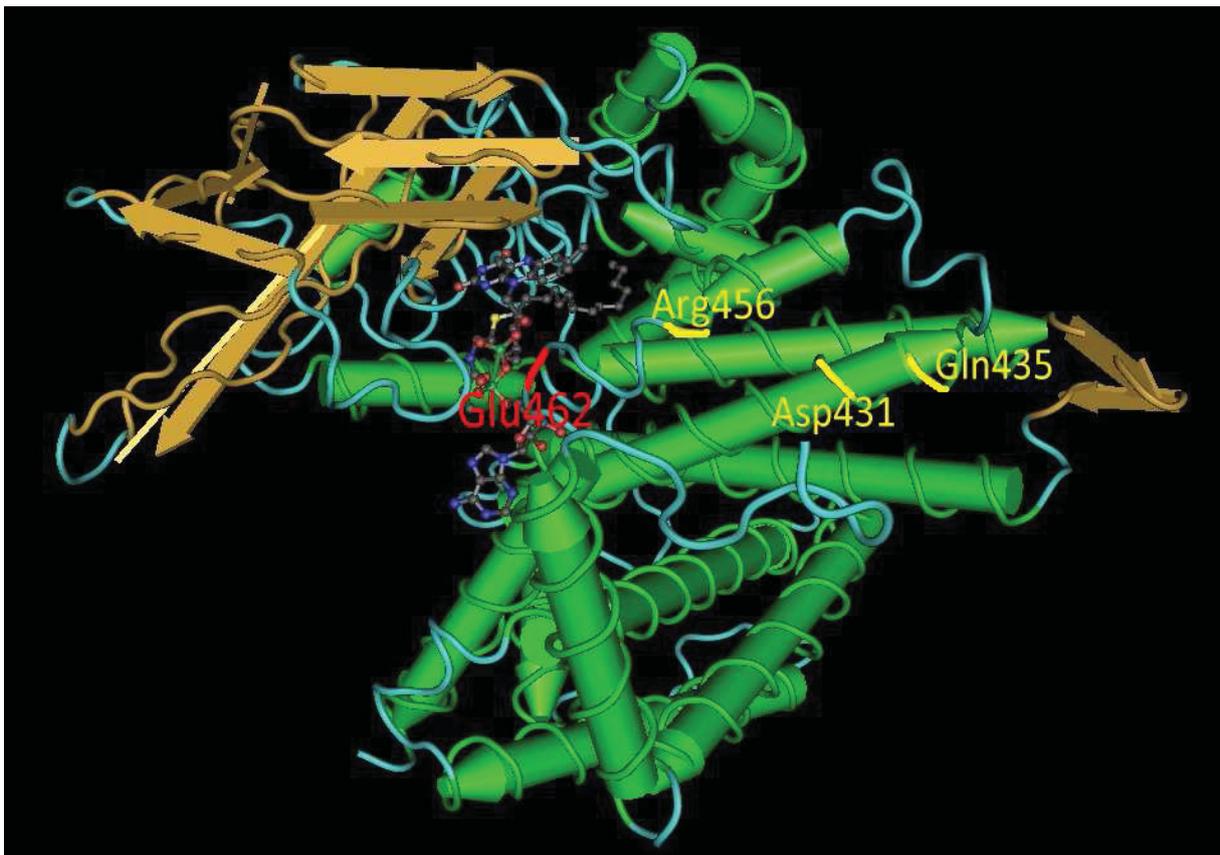


Abb. 3.5: Mutation in einem Bereich, der für die Dimerbildung verantwortlich ist.

Rot markiert: Glu462 (das katalytische Zentrum).

Gelb markiert: Lokalisationen von Aminosäuren, die für die Ausbildung des Homodimers verantwortlich sind; an Arg456 wurde eine *Missense*-Mutation gefunden.

Tabelle 3.8: Mutationen in Bereichen der Dimerbildung

Mutation	Studien- teilnehmer	Enzymaktivität	Aminosäurenaustausch	<i>in silico</i> - Analyse
p.Arg456His	24	37% (heterozygot)	basisch → basisch	3x pathologisch, 1x neutral

### 3.2.2.6 *Missense*-Mutation im Bereich der Membranbindung

In der Kristallstruktur des VLCAD-Proteins (nach McAndrew *et al.*, 2008) ist dieser Abschnitt des Proteins nicht dargestellt. Er gilt als Bereich der VLCAD, der für die Bindung des Enzyms an die innere mitochondriale Membran zuständig ist (McAndrew *et al.*, 2008). In diesem Bereich liegt die *Missense*-Mutation p.Arg511Gln (vgl. Tabelle 3.9), die einen Austausch des Arginins an Position 511 gegen Glutamin bedeutet, also der Austausch einer basischen Aminosäure gegen ein saures Amid. Diese Mutation wurde bisher nicht anderweitig publiziert und von drei *in silico*-Analyseprogrammen als neutral dargestellt. In SNP3Ds wurde kein Ergebnis angegeben (vgl. Tabelle 3.3).

Tabelle 3.9: Mutationen der Membranbindungsregion

Mutation	Studien- teilnehmer	Enzymaktivität	Aminosäurenaustausch	<i>in silico</i> - Analyse
p.Arg511Gln	8	28% (heterozygot)	basisch → saures Amid	3x neutral, 1x kein Ergebnis

### 3.2.2.7 Weitere Missense-Mutationen

Neben den bereits oben erwähnten Mutationen traten im Rahmen dieser Studie zusätzlich weitere Mutationen auf, die sich keiner bestimmten Struktur der *VLCAD* zuordnen lassen. Diese Mutationen sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

Tabelle 3.10: Weitere Mutationen

Mutation	Studien- teilnehmer	Enzymaktivität(en)	Aminosäurenaustausch	<i>in silico</i> - Analyse
p.Phe113Leu	5	22% (+ p.Val283Ala)	aromatisch/hydrophob →aliphatisch/hydrophob	4x neutral
p.Ala308Ser	9	29% (heterozygot auf einem Allel mit p.Glu309Lys und p.Val310His)	aliphatisch/hydrophob→ aliphatisch/hydrophil	4x neutral
p.Glu309Lys	9	29% (heterozygot auf einem Allel mit p.Ala308Ser und p.Val310His)	sauer→ basisch	2x pathologisch, 1x grenzwertig, 1x neutral
p.Val310His	9	29% (heterozygot auf einem Allel mit p.Ala308Ser und p.Glu309Lys)	aliphatisch/hydrophob→ basisch	3x pathologisch, 1x neutral
p.Lys358Glu	2	13% (+ p.Val283Ala)	basisch→ sauer	3x neutral, 1x grenzwertig
p.Arg531Trp	4	21% (+ c.1269+1 G>A)	basisch→ aromatisch/hydrophob	3x pathologisch, 1x neutral
p.Arg615Gln	3 25	21% (+p.Ala304Val) 39% (heterozygot)	basisch → saures Amid	4x neutral

Bei der Mutation p.Phe113Leu, die bisher noch nicht in anderen Publikationen beschrieben wurde, handelt es sich um den Austausch der aromatischen Aminosäure Phenylalanin gegen die verzweigt-kettige Aminosäure Leucin. Beides sind hydrophobe Aminosäuren mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften. p.Phe113Leu liegt compound-heterozygot mit der als mild bekannten Mutation p.Val283Ala bei Patient 5 vor. Die Vermutung, dass es sich dabei um milde Mutationen handelt, wird sowohl durch die Enzymaktivität des Studienteilnehmers selbst (mit 22% für einen *compound*-heterozygoten Patienten hoch) als auch durch die Enzymaktivitäten der Eltern unterstützt. Die Mutter trägt bei einer Enzymrestaktivität von 41% die Mutation p.Val283Ala, der

Vater weist eine 51%ige Restaktivität bei heterozygotem Vorliegen von p.Phe113Leu auf. Alle vier *in silico*-Analysen der Mutation prognostizieren eine neutrale, gutartige Mutation (vgl. Tabelle 3.3).

Die Mutation p.Lys358Glu liegt bei Studienteilnehmer 2 in Kombination mit der gehäuft auftretenden Mutation p.Val283Ala vor. Die Enzymaktivität betrug bei diesem Patienten 13%. Die biochemische Betrachtung des Aminosäureaustausches bei p.Lys358Glu zeigt, dass aufgrund der sauren Eigenschaften des Glutamats, das die basische Aminosäure Lysin ersetzt, eine schwerwiegendere Mutation vorliegt. Es liegt keine weitere Enzymatik von Studienteilnehmern oder Trägern der Mutation p.Lys358Glu vor, da keine für eine Enzymatik verwertbaren elterlichen Blutproben verfügbar waren (die Mutter ist Trägerin der Mutation p.Val283Ala, der zweiten Mutation dieses Patienten). Die *in silico*-Analyseprogramme zeigen in drei Fällen eine Einordnung der Mutation als neutral und in einem Fall als möglicherweise schädigend (vgl. Tabelle 3.3.). Auch diese Mutation wurde bei diesem Patienten erstmalig entdeckt.

Die bisher nicht publizierte Mutation p.Arg531Trp tritt bei Studienteilnehmerin 4 in *Compound*-Heterozygotie mit der Intronmutation c.1269+1 G>A auf. Die gemessene Enzymaktivität liegt bei 21%. Der Austausch des basischen, hydrophilen Arginins gegen das aromatische Tryptophan zeigt eine deutliche biochemische Veränderung. Aufgrund der Einsendung von *DNA* (statt EDTA-Blut) der Eltern war keine enzymatische Untersuchung der Mutter möglich, die heterozygote Trägerin von p.Arg531Trp ist, sodass die Schwere dieser Mutation anhand enzymatischer Werte nicht weiter charakterisiert werden kann. Die vier *in silico*-Analyseprogramme ergeben in drei von vier Fällen eine ungünstige Veränderung der Proteinstruktur; nur das Programm SNAP ermittelte eine neutrale Veränderung mit geringer Reliabilität (vgl. Tabelle 3.3).

Die Mutation p.Arg615Gln, die schon vor dieser Studie bekannt war (erstmalig beschrieben durch *Mathur et al., 1999*), trat im Rahmen dieser Studie bei zwei verschiedenen Teilnehmern auf: Bei Studienteilnehmer 3 lag sie in *Compound*-Heterozygotie mit der Mutation p.Ala304Val vor, bei der Teilnehmerin 25 trat sie heterozygot auf. Die Enzymatik beträgt bei Teilnehmer 3 21%, bei der heterozygoten Teilnehmerin 25 39%. Bei Studienteilnehmer 3 liegt zusätzlich noch die bisher unbekannte Mutation p.Ala304Val vor (s.o.). Es liegen keine Berichte über klinische Symptome dieser beiden Studienteilnehmer vor. Biochemisch liegt der schwerwiegende Austausch einer basischen Aminosäure gegen ein saures Amid vor. Alle *in silico*-Analyseprogramme ordneten die Mutation p.Arg615Gln als neutral bzw. gutartig ein. (vgl. Tabelle 3.3).

Neben diesen *Missense*-Mutationen liegt bei Studienteilnehmer 9 noch eine außergewöhnliche Mutation vor, die als Folge von drei *Missense*-Mutationen gewertet werden kann. Hier sind auf drei aufeinanderfolgenden Basentriplets insgesamt fünf *DNA*-Basen vertauscht, was in dem Austausch von drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren resultiert: Das aliphatische hydrophobe Alanin an Position 308 wird durch das ebenfalls aliphatische, durch seine OH-Gruppe jedoch hydrophile Serin ersetzt. Die vier *in silico*-Analyseprogramme klassifizieren diese Mutation als neutral bzw. gutartig. Das saure Glutamat an Position 309 wird gegen ein basisches Lysin ausgetauscht, und an Position 310 zeigt sich anstelle des aliphatischen, hydrophoben Valins das basische Histidin. Diese beiden Mutationen wurden bei der *in silico*-Analyse vorwiegend als nicht-neutral klassifiziert (vgl. Tabelle 3.3). Somit liegen hier drei veränderte Aminosäuren mit im Vergleich zum Wildtyp-Protein teilweise deutlich veränderten biochemischen Eigenschaften vor. Diese veränderten Aminosäuren liegen in der ersten, größeren  $\beta$ -Faltblatt-Domäne, ohne dass sie sich einer speziellen funktionellen Struktur der *VLCAD* zuordnen lassen. Die Residualaktivität des Studienteilnehmers betrug 29%. Der Vater, der ebenfalls Träger dieser Mutationsfolge ist, zeigte eine Residualaktivität von 37%. Eine *in silico*-Analyse des Zusammenspiels dieser drei Mutationen ist bei den verwendeten Programmen nicht möglich.

## 4. Diskussion

Die vorgelegte Studie beschäftigt sich mit einer aktuellen Fragestellung, denn seit Einführung des erweiterten Neugeborenen Screenings werden zunehmend mehr Kinder mit dem Verdacht auf einen  *VLCAD*-Mangel identifiziert, die im Rahmen der enzymatischen Konfirmationsdiagnostik höhere Restaktivitäten aufweisen als zuvor klinisch diagnostizierte Patienten. In dieser Studie wurde der Fokus auf die Kinder gelegt, die durch das Screening nicht eindeutig als klassische  *VLCAD*-Mangel-Patienten diagnostiziert werden konnten (Aktivität > 10%), die aber dennoch eine deutlich verminderte Enzymaktivität im Vergleich zu Gesunden aufwiesen. Die klinische Relevanz dieser Befunde ist derzeit unbekannt. Die molekulargenetische Charakterisierung dieser Kinder hat ergeben, dass ein großer Teil nur jeweils eine heterozygote Mutation aufweist. Milde  *VLCAD*-Mangel-Phänotypen sind bekannt, und auch diese Patienten weisen deutlich höhere Residualaktivitäten auf als Patienten mit dem klassischen Phänotyp. Die vorgelegte Studie zeigt, dass sich die Residualaktivitäten von Kindern mit milden Phänotypen und zwei Mutationen mit denen bekannter gesunder Anlageträger mit nur einer Mutation zum Teil überschneiden. Es stellt sich die Frage, welche Kinder ein erhöhtes Risiko tragen, im Verlauf ihres Lebens Symptome zu entwickeln.

#### **4.1 Enzymaktivität als Parameter zur Unterscheidung zwischen VLCAD-Mangel-Patienten und gesunden Kindern**

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Studie, lassen sich die Studienteilnehmer anhand der gemessenen Enzymaktivitäten der VLCAD in drei verschiedene Gruppen einteilen:

- Gruppe I mit Enzymrestaktivitäten zwischen 10% und 20%
- Gruppe II mit Enzymrestaktivitäten zwischen 20% und 30%
- Gruppe III mit Enzymrestaktivitäten über 30%

Gruppe I umfasst die Studienteilnehmer 1 und 2 mit Enzymrestaktivitäten von 12% und 13%. Beide sind Träger der *Missense*-Mutation p.Val283Ala, einmal homozygot, einmal *compound*-heterozygot mit der *Missense*-Mutation p.Lys358Glu. Das Fehlen klinischer Symptome und die lediglich biochemischen Auffälligkeiten bei Studienteilnehmer 2 (erhöhte Fettsäuremetabolite im Blut) zeigen, dass bei diesen Enzymaktivitäten nicht von einem schweren frühkindlichen Phänotyp ausgegangen werden kann. Die auffälligen Laborparameter deuten jedoch auf eine mildere Form des VLCAD-Mangels hin, die in katabolen Stoffwechsellagen, z.B. bei fieberhaften Infekten und prolongierten Fastenperioden, zu Symptomen führen kann. Auch in der Literatur sind klinisch auffällige Patienten mit der Mutation p.Val283Ala vorbeschrieben worden; die Symptome beschränkten sich hier jedoch auf Hypoglykämien in kataboler Stoffwechsellage (*Spiekerkoetter et al., 2003*). Somit besteht für diese Gruppe eindeutig das Risiko, im Verlauf des Lebens Symptome eines VLCAD-Mangels zu entwickeln.

Gruppe II umfasst die Studienteilnehmer 3 bis 13. Darunter fallen drei Kinder, die *compound*-heterozygot für zwei verschiedene *Missense*-Mutationen sind (Studienteilnehmer 3 bis 5), und acht Kinder, bei denen nur eine Mutation gefunden wurde (Studienteilnehmer 6 bis 13). Dabei handelt es sich in allen Fällen um *Missense*-Mutationen mit einem Austausch von Aminosäuren. Unklar ist allerdings, ob die Studienteilnehmer mit einer Mutation tatsächlich nur Träger sind oder ob die zweite Mutation durch die Untersuchung der VLCAD-cDNA nicht erfasst wurde. Da klassisch heterozygote Probanden (Eltern von VLCAD-Mangel-Patienten) in der Regel Aktivitäten > 30% aufweisen (*Hoffmann, Haussmann et al., 2012*), ist eher davon auszugehen, dass die zweite Mutation

nicht gefunden wurde. Demnach besteht wahrscheinlich ein Erkrankungsrisiko bei Kindern mit Residualaktivitäten von 20% bis 30%. Derzeit fehlen jedoch verlässliche Daten über den Langzeitverlauf von Kindern mit solchen Befunden. Diese sind schwer zu erheben, da bei der Verdachtsdiagnose „VLCAD-Mangel“ immer auch prophylaktische Maßnahmen eingeleitet werden, die das Auftreten von Symptomen verhindern. Trotz dieses möglicherweise asymptomatischen Phänotyps sollten diese Kinder an ein Stoffwechselzentrum angebunden werden, um den weiteren Verlauf zu dokumentieren, Symptome frühzeitig zu erkennen und mögliche biochemische Parameter zu erfassen.

Gruppe III beinhaltet die Studienteilnehmer 14 bis 34. Bei elf dieser Studienteilnehmer wurde eine einzelne Mutation gefunden, die restlichen zehn Teilnehmer tragen keine Mutation in den untersuchten Bereichen des VLCAD-Gens. Man kann die Verteilung der Mutationen allerdings nicht auf bestimmte Aktivitätsbereiche eingrenzen; so ist Studienteilnehmerin 33 mit einer Enzymaktivität von 50% Trägerin der Intronmutation c.1182+1 G>A, während Studienteilnehmer 16 bei einer Enzymaktivität von 31% keine Mutation auf den untersuchten Bereichen des VLCAD-Gens zeigt. Dieser Aktivitätsbereich entspricht dem Bereich, in dem heterozygote Eltern anzusiedeln sind, deren Trägerstatus erst durch das Familienscreening entdeckt wurde und die zuvor vollkommen asymptomatisch waren (32% bis 75% Residualaktivität, vgl. *Hoffmann, Haussmann et al., 2012*). Die breite Streuung der Aktivitätswerte bei den Studienteilnehmern und Eltern mit nur einer Mutation lässt sich einerseits durch unterschiedliche Schweregrade der einzelnen Mutationen erklären. Außerdem kann der Einfluss von „Modifier Genes“ (vgl. *Dipple et al., 2000*) zu unterschiedlichen Aktivitätswerten selbst bei gleichem Genotyp führen. Da ab 30% Enzymaktivität maximal eine Mutation gefunden wurde und in vielen Fällen auch keine Mutation auf der VLCAD-cDNA vorlag, kann man bei Aktivitäten > 30% von gesunden Kindern ausgehen, die auch bei Katabolismus kein Risiko einer metabolischen Entgleisung tragen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Enzymaktivitätsmessung einen sehr guten diagnostischen Parameter darstellt, um das Erkrankungsrisiko der beim Screening auffälligen Kinder weiter einzugrenzen. Dies unterstützt frühere Arbeiten, die den Nutzen einer enzymatischen Untersuchung als Diagnosesicherung bei auffälligem Neugeborenencreening belegen (*ter Veld et al., 2009, Tajima et al., 2008*). In einer anderen Studie werden bei der Diagnostik des VLCAD-Mangels außerhalb des Neugeborenencreenings Acylcarnitinprofile und speziell die C14:1-Carnitin-Konzentrationen im Blut als diagnostischer Goldstandard postuliert (*Laforêt et al., 2009*), obwohl bekannt ist, dass Patienten

in anaboler Stoffwechsellage unauffällige Acylcarnitinprofile aufweisen können (vgl. a. *Spiekerkoetter et al., 2010*). Die Diagnose eines VLCAD-Mangels basierend auf einem positiven Neugeborenenenscreening allein ist unzulässig (*Liebig et al., 2006, Schymik et al., 2006*). Durch Testung der Enzymaktivität ist eine schnelle und zuverlässige Konfirmationsdiagnostik möglich (*Spiekerkoetter et al., 2010*). Die Daten dieser Studie zeigen, dass die Enzymaktivitätsmessung darüber hinaus auch eine Einteilung in verschiedene Schweregrade des VLCAD-Mangels ermöglicht (vgl. a. *Hoffmann, Haussmann et al., 2012*):

Enzymaktivitäten < 10% sichern die Diagnose eines (potentiell schweren) VLCAD-Mangels.

Im Bereich zwischen 10% und 20% Enzymrestaktivität liegen Patienten mit mildereren Phänotypen, aber dennoch eindeutigem Erkrankungsrisiko vor, die prophylaktisch behandelt werden müssen.

Im Bereich zwischen 20% und 30% Enzymaktivität ist das Erkrankungsrisiko unklar. In vielen Fällen wurde hier auch nur eine Mutation identifiziert, aber es finden sich auch Kinder mit zwei Mutationen (vgl. a. *Hoffmann, Haussmann et al., 2012*). Im Aktivitätsbereich von 20% bis 30% kann die molekulargenetische Analyse zusätzliche wertvolle Informationen liefern, und im Fall von zwei Mutationen sollten katabole Stoffwechsellagen vermieden werden.

Ab 30% Enzymaktivität besteht kein Erkrankungsrisiko.

Insgesamt ist die enzymatische Testung der VLCAD-Aktivität aufgrund der Möglichkeit, das Erkrankungsrisiko abzuschätzen, ein überlegener diagnostischer Parameter. Eine solche Einteilung kann durch die molekulargenetische Mutationsanalyse aufgrund der molekularen Heterogenität nicht getroffen werden.

## 4.2 Mutationen

Die Vielzahl der in dieser Studie auftretenden Mutationen verdeutlicht, wie heterogen der Genotyp des *VLCAD*-Mangels ist. Obgleich bereits im Jahr 1999 58 bekannte Mutationen veröffentlicht wurden (vgl. *Andresen et al., 1999*) und in den darauffolgenden Jahren noch weitere Mutationen entdeckt wurden, konnten auch in dieser Studie einige bisher unbekannte Mutationen identifiziert werden.

### 4.2.1 Nullmutationen

Die in dieser Arbeit beschriebenen Intron-Mutationen sowie die Deletion von Studienteilnehmer 20 sind nach *Andresen et al. (1999)* als Nullmutationen zu werten. Über die Spleißregion im Allgemeinen ist folgendes bekannt: Eine Voraussetzung für korrektes Spleißen sind die Donorstelle (5'-Ende des Introns) und die Akzeptorstelle (3'-Ende des Introns). Eine Intronsequenz beginnt mit GT/GU (5') und endet mit AG (3'). Der 3'-Akzeptorstelle geht die pyrimidinreiche Konsensussequenz voraus (*Stryer, Biochemie, 4. Auflage 1996*). Alle in dieser Studie entdeckten Intron-Mutationen betreffen die Donorstelle des Introns. Die Mutation c.1182+1 G>A wurde von *Strauss et al. (1995)* bereits mit dem schweren Phänotyp korreliert, und im *Human Trifunctional Protein* sind Mutationen an Position 1 bzw. 3 der Donorseite (5') des Introns bekannt, die zum Auslassen des vorangehenden Exons führen (*Brackett et al., 1995*). Hieraus lässt sich erkennen, dass die in dieser Studie gefundenen Intronmutationen voraussichtlich mit schweren Primärstrukturveränderungen des Enzyms einhergehen. Die Deletion von 23 Basen mit fehlender Donorstelle des Introns lässt einen ähnlichen Effekt vermuten. Eine Restfunktion der *VLCAD* erscheint hierbei unmöglich.

## 4.2.2 Missense-Mutationen

*Missense*-Mutationen sind nach *Andresen et al.* (1999) Mutationen, bei denen durch eine Punktmutation eine bestimmte Aminosäure an einer Stelle des Proteins gegen eine andere ausgetauscht wird. Abhängig von den Eigenschaften der veränderten Aminosäure und der Lage im Protein decken *Missense*-Mutationen ein breites Spektrum ab, das von geringen strukturellen Auswirkungen bis hin zur vollständigen Funktionslosigkeit des Proteins variiert. Die Auswertung der einzelnen *Missense*-Mutationen mit Hilfe der Enzymaktivitätsmessung, der biochemischen Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäuren, der Lokalisation und der *in silico*-Analyseprogramme zeigt, dass diese Beurteilungskriterien häufig zu widersprüchlichen Aussagen führen. Nur in wenigen Fällen gibt es eine Übereinstimmung aller dieser Kriterien, nämlich bei den Mutationen p.Phe113Leu, p.Gly185Ser, p.Arg459Trp und p.Arg469Trp. p.Phe113Leu zeigt in allen angewandten Kriterien einen milden bzw. neutralen Effekt. Allerdings ist über den Phänotyp bislang nicht viel bekannt, sodass eine endgültige Zuordnung eines Schweregrades nicht erfolgen sollte. p.Gly185Ser, p.Arg459Trp und p.Arg469Trp scheinen besonders schwerwiegende Strukturveränderungen des Proteins zu bewirken. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der bisherigen Literatur zu diesen drei Mutationen:

Die Mutation p.Gly185Ser wurde von *Gobin-Limballe et al.* (2010) als schwere Mutation für die Konformation der Substratbindungsstelle charakterisiert, da das hydrophobe Glycin an Position 185 durch ein hydrophiles Serin ersetzt wird.

Beim heterozygoten Vorliegen der Mutation p.Arg459Trp (ohne Nachweis einer zweiten Mutation) wurde ein fulminanter klinischer Verlauf beobachtet (*Pons et al., 2000*), während in unserer Studie ein Patient mit identischem Genotyp, bei dem keine klinischen Symptome bekannt sind, eine Restaktivität von 29% zeigte. Ob in dem von *Pons et al. (2000)* beschriebenen Fall noch weitere „Modifier“ (vgl. *Dipple et al., 2000*) oder heterozygote Mutationen in anderen Genen im Sinne einer synergistischen Heterozygotie (nach *Vockley et al., 2000*) die klinische Symptomatik verstärkt haben, oder ob weitere klinische Trigger (wie z.B. schwerer Katabolismus) vorgelegen haben, die den schweren Verlauf begünstigt hätten, ist nicht bekannt.

Bereits *Andresen et al. (1999)* assoziierten die Mutation p.Arg469Trp mit dem schweren frühkindlichen Phänotyp. Auch in jüngeren Publikationen wurde diese Mutation als schwerwiegend

eingestuft (Goetzman et al., 2007, Gobin-Limballe et al., 2007). Das Arginin an Position 469 bewirkt eine korrekte Positionierung des aktiven Zentrums an Position 462 (McAndrew et al., 2008).

Die anderen *Missense*-Mutationen dieser Studie lassen sich nicht einheitlich als mild bzw. schwer einschätzen (s. a. die Ausführungen zu den einzelnen Mutationen im Kapitel 3.2.2). Somit erlauben neu aufgetretene *Missense*-Mutationen keine Prognose ihrer Dignität. Lediglich die häufig auftretenden Mutationen p.Val283Ala und p.Thr260Met lassen sich aufgrund der größeren Fallzahlen besser charakterisieren:

p.Val283Ala führt bei homozygotem und *compound*-heterozygotem Vorliegen zu Enzymaktivitäten > 10% und heterozygot zu Enzymaktivitäten von 39% bei Kindern und 41-47% bei den heterozygoten Eltern. Dies deutet in Zusammenschau mit der geringfügigen biochemischen Veränderung auf eine milde Mutation hin, auch wenn die Ergebnisse der *in silico*-Analyseprogramme nicht eindeutig waren. Bereits Andresen et al. (1999) stuften p.Val283Ala als milde Mutation ein, was sich auch in jüngeren Arbeiten bestätigte (z.B. Spiekerkoetter et al., 2003).

Die Mutation p.Thr260Met zeigte in dieser Studie ohne Vorliegen einer zweiten Mutation bereits deutlich verminderte Enzymaktivitäten (bei den zwei betroffenen Studienteilnehmern lag die Aktivität < 30%). Da p.Thr260Met zudem mit einer gravierenden biochemischen Veränderung einhergeht und die Ergebnisse der *in silico*-Analyseprogramme vorwiegend pathologisch waren, deutet hier vieles auf eine schwere Mutation hin. p.Thr260Met galt zunächst als eher milde Mutation (Andresen et al., 1999), wurde aber in jüngeren Publikationen als verhältnismäßig schwerwiegend mit deutlich reduzierten Enzymrestaktivitäten klassifiziert (Goetzmann et al., 2007, Gobin-Limballe et al., 2007, Gobin-Limballe et al., 2010).

### 4.3 Korrelation von Genotyp und Phänotyp

Wie bereits im vorangehenden Abschnitt gezeigt wird, ist der Effekt einzelner Mutationen auf die VLCAD-Aktivität kaum vorhersagbar. Den Versuchen, die Dignität bestimmter Mutationen zu definieren (z.B. *Andresen et al., 1999, Gobin Limballe et al., 2007, Gobin-Limballe et al., 2010*), stehen klinische Berichte gegenüber, in denen der Phänotyp der Patienten durch den Genotyp nicht zu erwarten war: *Coughlin et al. (2010)* beschrieben den frühen Tod eines Patienten, der *compound-heterozygot* für zwei Mutationen im VLCAD-Gen war und dabei die eigentlich als mild eingestufte Mutation p.Val283Ala trug. Der Patient fiel nach einer unauffälligen Schwangerschaft lediglich am ersten Lebensstag durch Trinkunlust auf und verstarb nach 38 Stunden im Rahmen einer schweren Hypoglykämie (Glukose im Blut < 10mg/dl). Bei der Obduktion zeigte sich eine *Steatosis hepatis* ohne Hinweise auf ein kardiales oder anderes Organversagen, das Acylcarnitinprofil *post mortem* entsprach dem eines VLCAD-Mangel-Patienten. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für diese Beobachtung: Den größten Einfluss auf das Outcome haben Lebensumstände und das Ausmaß und die Frequenz kataboler Zustände. Die beschriebene Falldemonstration legt nahe, dass auch Patienten mit ansonsten milden Mutationen im schweren Katabolismus versterben können, wenn dem Organismus nur Fettsäuren zur Energieproduktion angeboten werden. Bei manchen Krankheitsbildern existieren genetische Varianten, die trotz rezessiven Erbgangs einen sogenannten „*dominant negative effect*“ aufweisen und bereits bei heterozygotem Vorliegen zum Auftreten der Krankheit führen (vgl. *Veale et al., 2010*). Diese Option ist bei dem vorliegenden Fall jedoch unwahrscheinlich. Ferner gibt es Hinweise darauf, dass bei Erkrankungen mit vermeintlich monogenetischem Erbgang (nach den Mendel'schen Regeln) noch weitere Einflussfaktoren bestehen, beispielsweise durch sogenannte „*Modifier Genes*“, die den Phänotyp mitbestimmen (*Dipple et al., 2000*). Außerdem erfasst die molekulargenetische Untersuchung der VLCAD zwar die Exone und die flankierenden Intronsegmente, aber nicht die Promotorregion.

Beim MCAD-Mangel gibt es Hinweise darauf, dass *Missense*-Mutationen neben Einschränkungen der Enzymaktivität auch zu einer verminderten Stabilität des Enzyms durch thermische Effekte führen (*Maier et al., 2009*). Auch beim Enzym VLCAD sind solche Effekte möglich. Unklar ist daher, welche Effekte Fieber auf die Proteinstabilität und damit Enzymfunktion bei Vorliegen einer Mutation hat. Zusammengefasst zeigt sich, dass sowohl die Effekte einer einzelnen Mutation als auch die Auswirkungen des Genotyps eines Patienten auf seinen Phänotyp nicht sicher vorhersagbar sind. Dies zeigt die Komplexität des VLCAD-Mangels, die sich in seiner molekulargenetischen Heterogenität und in seinen stark variablen klinischen Erscheinungsformen widerspiegelt. Die Funktionsanalyse durch Enzymaktivitätsmessung hingegen ermöglicht eine Einteilung hinsichtlich des zu erwartenden

Phänotyps. Nicht zuletzt spielen verschiedene Trigger, die Katabolismus auslösen, eine entscheidende Rolle für die klinische Präsentation und das *Outcome*.

#### **4.4 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung einer verminderten *VLCAD*-Aktivität mit Hilfe der molekulargenetischen Untersuchung sowie der Korrelation der Ergebnisse mit der Struktur des *VLCAD*-Proteins, *in silico*-Analysen, biochemischen Betrachtungen und Aussagen früherer Arbeiten zum Phänotyp charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die Diagnostik des *VLCAD*-Mangels mit Hilfe der Enzymumsatzmessung nicht nur die Diagnosesicherung, sondern auch eine Abschätzung des Erkrankungsrisikos erlaubt. Bei < 10% Restaktivität liegt ein klassischer *VLCAD*-Mangel vor. Auch zwischen 10% und 20% Aktivität haben die Patienten ein eindeutiges Erkrankungsrisiko bei milderem Phänotypen. Im Aktivitätsbereich zwischen 20% und 30% ist das Erkrankungsrisiko unklar, und eine molekulargenetische Analyse kann zusätzliche Informationen liefern, da in solchen Fällen sowohl eine als auch zwei Mutationen vorliegen können. Um das Erkrankungsrisiko von Patienten in diesem Aktivitätsbereich besser eingrenzen zu können, sind Langzeitstudien und Verlaufsbeobachtungen mit größeren Patientenkollektiven notwendig. Bei > 30% *VLCAD*-Enzymaktivität besteht kein Risiko, an einem *VLCAD*-Mangel zu erkranken.

Die Studie zeigt außerdem, dass es nicht möglich ist, mit Hilfe der Molekulargenetik eine Aussage über den Phänotyp zu treffen. Auch bei zwei Mutationen auf dem *VLCAD*-Gen liegt ein breites Spektrum an Enzymrestaktivitäten vor. Ferner ist die Charakterisierung des Schweregrades einzelner Mutationen aufgrund der ausgeprägten molekularen Heterogenität und des hohen Grads an *Compound*-Heterozygotie in vielen Fällen unmöglich. Auch der Einfluss von „*Modifier Genes*“ kann durch die genetische Analyse nicht erfasst werden. Bei der Molekulargenetik ist außerdem zu beachten, dass beim *VLCAD*-Mangel der Schweregrad der Mutationen nicht ausschließlich die Prognose bestimmt, sondern dass vor allem die Lebensumstände, das Vorhandensein von Triggerfaktoren und das Auftreten kataboler Stoffwechsellagen den Krankheitsverlauf und das *Outcome* erheblich beeinflussen. Allerdings kann eine molekulargenetische Untersuchung im beschriebenen Grenzbereich von 20% bis 30% *VLCAD*-Enzymaktivität eine sinnvolle Zusatzdiagnostik darstellen.

## 5. Literaturverzeichnis

- Andresen, B. S.; Bross, P.; Vianey-Saban, C.; Divry, P.; Zobot, M. T.; Roe, C. R. et al. (1996): Cloning and characterization of human very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase cDNA, chromosomal assignment of the gene and identification in four patients of nine different mutations within the VLCAD gene. In: *Hum. Mol. Genet* 5 (4), S. 461–472.
- Andresen, B. S.; Olpin, S.; Poorthuis, B. J.; Scholte, H. R.; Vianey-Saban, C.; Wanders, R. et al. (1999): Clear correlation of genotype with disease phenotype in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. In: *Am. J. Hum. Genet* 64 (2), S. 479–494.
- Aoyama, T.; Soury, M.; Ueno, I.; Kamijo, T.; Yamaguchi, S.; Rhead, W. J. et al. (1995): Cloning of human very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase and molecular characterization of its deficiency in two patients. In: *Am. J. Hum. Genet* 57 (2), S. 273–283.
- Aoyama, T.; Wakui, K.; Fukushima, Y.; Orii, K. O.; Hashimoto, T. (1996): Assignment of the human mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase gene (LCACD) to 17p13 by in situ hybridization. In: *Genomics* 37 (1), S. 144–145.
- Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS) (2010): Konfirmationsdiagnostik bei Verdacht auf angeborene Stoffwechselkrankheiten aus dem Neugeborenen-Screening; AWMF-Leitlinien-Register Nr. 027/021. Hg. v. Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen und medizinischen Fachgesellschaften (AWMF-Leitlinien-Register Nr. 027/021).
- Arnold, Georgianne L.; van Hove, Johan; Freedenberg, Debra; Strauss, Arnold; Longo, Nicola; Burton, Barbara et al. (2009): A Delphi clinical practice protocol for the management of very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. In: *Mol. Genet. Metab* 96 (3), S. 85–90.
- Brackett, J. C.; Sims, H. F.; Rinaldo, P.; Shapiro, S.; Powell, C. K.; Bennett, M. J.; Strauss, A. W. (1995): Two alpha subunit donor splice site mutations cause human trifunctional protein deficiency. In: *J. Clin. Invest* 95 (5), S. 2076–2082.
- Bromberg, Yana; Rost, Burkhard (2007): SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. In: *Nucleic Acids Res* 35 (11), S. 3823–3835.
- Bundesministerium für Gesundheit (2011): Bekanntmachung eines Beschlusses des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Kinder-Richtlinien: Anpassung des erweiterten Neugeborenen-Screenings an das Gendiagnostikgesetz (GenDG); BAnz. Nr. 40 (Seite 1013) vom 11.03.2011. Hg. v. Bundesministerium für Gesundheit.
- Coughlin, Curtis R.; Ficicioglu, Can (2010): Genotype-phenotype correlations: sudden death in an infant with very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. In: *J. Inherit. Metab. Dis.* Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-009-9041-6>, zuletzt geprüft am 17.02.2013.
- Dipple, K. M.; McCabe, E. R. (2000): Modifier genes convert "simple" Mendelian disorders to complex traits. In: *Mol. Genet. Metab* 71 (1-2), S. 43–50.
- Dipple, K. M.; McCabe, E. R. (2000): Phenotypes of patients with "simple" Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics. In: *Am. J. Hum. Genet* 66 (6), S. 1729–1735.
- Ensenauer, Regina; He, Miao; Willard, Jan-Marie; Goetzman, Eric S.; Corydon, Thomas J.; Vandahl, Brian B. et al. (2005): Human acyl-CoA dehydrogenase-9 plays a novel role in the mitochondrial beta-oxidation of unsaturated fatty acids. In: *J. Biol. Chem* 280 (37), S. 32309–32316.
- Ferrer-Costa, C.; Orozco, M.; La Cruz, X. de (2004): Sequence-based prediction of pathological mutations. In: *Proteins* 57 (4), S. 811–819.

- Gobin-Limballe, S.; Djouadi, F.; Aubey, F.; Olpin, S.; Andresen, B. S.; Yamaguchi, S. et al. (2007): Genetic basis for correction of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency by bezafibrate in patient fibroblasts: toward a genotype-based therapy. In: *Am. J. Hum. Genet* 81 (6), S. 1133–1143.
- Gobin-Limballe, Stéphanie; McAndrew, Ryan P.; Djouadi, Fatima; Kim, Jung-Ja; Bastin, Jean (2010): Compared effects of missense mutations in Very-Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase deficiency: Combined analysis by structural, functional and pharmacological approaches. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1802 (5), S. 478–484.
- Goetzman, Eric S.; Wang, Yudong; He, Miao; Mohsen, Al-Walid; Ninness, Britanni K.; Vockley, Jerry (2007): Expression and characterization of mutations in human very long-chain acyl-CoA dehydrogenase using a prokaryotic system. In: *Mol. Genet. Metab* 91 (2), S. 138–147.
- Gregersen, N.; Andresen, B. S.; Bross, P. (2000): Prevalent mutations in fatty acid oxidation disorders: diagnostic considerations. In: *Eur. J. Pediatr* 159 Suppl 3, S. S213-8.
- Guthrie R.; Susi A. (1963): A Simple Phenylalanine Method For Detecting Phenylketonuria In Large Populations Of Newborn Infants. In: *Pediatrics* 32, S. 338–343.
- Harms, E.; Grüters, A.; Jorch, G.; et al (1997): Richtlinien zur Organisation und Durchführung des Neugeborenen Screenings auf angeborene Stoffwechselstörungen und Endokrinopathien in Deutschland. In: *Monatsschrift Kinderheilkunde* 145, S. 770-772.
- Hoffmann, Lars; Haussmann, Ulrike; Mueller, Martina; Spiekerkoetter, Ute (2012): VLCAD enzyme activity determinations in newborns identified by screening: a valuable tool for risk assessment. In: *J. Inherit. Metab. Dis* 35 (2), S. 269–277.
- Ikeda, Y.; Okamura-Ikeda, K.; Tanaka, K. (1985): Purification and characterization of short-chain, medium-chain, and long-chain acyl-CoA dehydrogenases from rat liver mitochondria. Isolation of the holo- and apoenzymes and conversion of the apoenzyme to the holoenzyme. In: *J. Biol. Chem* 260 (2), S. 1311–1325.
- Indo, Y.; Yang-Feng, T.; Glassberg, R.; Tanaka, K. (1991): Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding human long-chain acyl-CoA dehydrogenase and assignment of the location of its gene (ACADL) to chromosome 2. In: *Genomics* 11 (3), S. 609–620.
- Izai, K.; Uchida, Y.; Orii, T.; Yamamoto, S.; Hashimoto, T. (1992): Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. In: *J. Biol. Chem* 267 (2), S. 1027–1033.
- Laforêt, Pascal; Acquaviva-Bourdain, Cécile; Rigal, Odile; Brivet, Michèle; Penisson-Besnier, Isabelle; Chabrol, Brigitte et al. (2009): Diagnostic assessment and long-term follow-up of 13 patients with Very Long-Chain Acyl-Coenzyme A dehydrogenase (VLCAD) deficiency. In: *Neuromuscul. Disord* 19 (5), S. 324–329.
- Liebig, Michaela; Schymik, Ina; Mueller, Martina; Wendel, Udo; Mayatepek, Ertan; Rüter, Jos et al. (2006): Neonatal screening for very long-chain acyl-coA dehydrogenase deficiency: enzymatic and molecular evaluation of neonates with elevated C14:1-carnitine levels. In: *Pediatrics* 118 (3), S. 1065–1069.
- Maier, Esther M.; Gersting, Søren W.; Kemter, Kristina F.; Jank, Johanna M.; Reindl, Maria; Messing, Dunja D. et al. (2009): Protein misfolding is the molecular mechanism underlying MCADD identified in newborn screening. In: *Hum. Mol. Genet* 18 (9), S. 1612–1623.
- Mathur, A.; Sims, H. F.; Gopalakrishnan, D.; Gibson, B.; Rinaldo, P.; Vockley, J. et al. (1999): Molecular heterogeneity in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing pediatric cardiomyopathy and sudden death. In: *Circulation* 99 (10), S. 1337–1343.
- McAndrew, Ryan P.; Wang, Yudong; Mohsen, Al-Walid; He, Miao; Vockley, Jerry; Kim, Jung-Ja P. (2008): Structural basis for substrate fatty acyl chain specificity: crystal structure of human very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. In: *J. Biol. Chem* 283 (14), S. 9435–9443.

- Merritt, J. Lawrence; Nguyen, Tien; Daniels, Jan; Matern, Dietrich; Schowalter, David B. (2009): Biochemical correction of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency following adeno-associated virus gene therapy. In: *Mol. Ther* 17 (3), S. 425–429.
- Nouws, Jessica; Nijtmans, Leo; Houten, Sander M.; van den Brand, Mariël; Huynen, Martijn; Venselaar, Hanka et al. (2010): Acyl-CoA dehydrogenase 9 is required for the biogenesis of oxidative phosphorylation complex I. In: *Cell Metab* 12 (3), S. 283–294.
- Pons, R.; Cavadini, P.; Baratta, S.; Invernizzi, F.; Lamantea, E.; Garavaglia, B.; Taroni, F. (2000): Clinical and molecular heterogeneity in very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. In: *Pediatr. Neurol* 22 (2), S. 98–105.
- Primassin, Sonja; ter Veld, Frank; Mayatepek, Ertan; Spiekerkoetter, Ute (2008): Carnitine supplementation induces acylcarnitine production in tissues of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice, without replenishing low free carnitine. In: *Pediatr. Res* 63 (6), S. 632–637.
- Ramensky, Vasily; Bork, Peer; Sunyaev, Shamil (2002): Human non-synonymous SNPs: server and survey. In: *Nucleic Acids Res* 30 (17), S. 3894–3900.
- Schymik, Ina; Liebig, Michaela; Mueller, Martina; Wendel, Udo; Mayatepek, Ertan; Strauss, Arnold W. et al. (2006): Pitfalls of neonatal screening for very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency using tandem mass spectrometry. In: *J. Pediatr* 149 (1), S. 128–130.
- Souri, M.; Aoyama, T.; Yamaguchi, S.; Hashimoto, T. (1998): Relationship between structure and substrate-chain-length specificity of mitochondrial very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. In: *Eur. J. Biochem* 257 (3), S. 592–598.
- Spiekerkoetter, U.; Lindner, M.; Santer, R.; Grotzke, M.; Baumgartner, M. R.; Boehles, H. et al. (2009): Management and outcome in 75 individuals with long-chain fatty acid oxidation defects: results from a workshop. In: *J. Inherit. Metab. Dis* 32 (4), S. 488–497.
- Spiekerkoetter, U.; Lindner, M.; Santer, R.; Grotzke, M.; Baumgartner, M. R.; Boehles, H. et al. (2009): Treatment recommendations in long-chain fatty acid oxidation defects: consensus from a workshop. In: *J. Inherit. Metab. Dis* 32 (4), S. 498–505.
- Spiekerkoetter, Ute; Hausmann, Ulrike; Mueller, Martina; ter Veld, Frank; Stehn, Maren; Santer, Rene; Lukacs, Zoltan (2010): Tandem mass spectrometry screening for very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: the value of second-tier enzyme testing. In: *J. Pediatr* 157 (4), S. 668–673.
- Spiekerkoetter, Ute; Sun, Bin; Zytkevich, Thomas; Wanders, Ronald; Strauss, Arnold W.; Wendel, Udo (2003): MS/MS-based newborn and family screening detects asymptomatic patients with very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. In: *J. Pediatr* 143 (3), S. 335–342.
- Strauss, A. W.; Powell, C. K.; Hale, D. E.; Anderson, M. M.; Ahuja, A.; Brackett, J. C.; Sims, H. F. (1995): Molecular basis of human mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing cardiomyopathy and sudden death in childhood. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92 (23), S. 10496–10500.
- Stryer, Lubert (1996): Biochemie. 4. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl (Spektrum-Lehrbuch).
- Sunyaev, S.; Ramensky, V.; Bork, P. (2000): Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. In: *Trends Genet* 16 (5), S. 198–200.
- Sunyaev, S.; Ramensky, V.; Koch, I.; Lathe, W.; Kondrashov, A. S.; Bork, P. (2001): Prediction of deleterious human alleles. In: *Hum. Mol. Genet* 10 (6), S. 591–597.
- Tajima, Go; Sakura, Nobuo; Shirao, Kenichiro; Okada, Satoshi; Tsumura, Miyuki; Nishimura, Yutaka et al. (2008): Development of a new enzymatic diagnosis method for very-long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency by detecting 2-hexadecenoyl-CoA production and its application in tandem mass spectrometry-based selective screening and newborn screening in Japan. In: *Pediatr. Res* 64 (6), S. 667–672.

ter Veld, Frank; Mueller, Martina; Kramer, Simone; Haussmann, Ulrike; Herebian, Diran; Mayatepek, Ertan et al. (2009): A novel tandem mass spectrometry method for rapid confirmation of medium- and very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in newborns. In: *PLoS ONE* 4 (7), S. e6449.

Uchida, Y.; Izai, K.; Orii, T.; Hashimoto, T. (1992): Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein. In: *J. Biol. Chem* 267 (2), S. 1034–1041.

Veale, Emma L.; Rees, Kathryn A.; Mathie, Alistair; Trapp, Stefan (2010): Dominant negative effects of a non-conducting TREK1 splice variant expressed in brain. In: *J. Biol. Chem* 285 (38), S. 29295–29304.

Vianey-Saban, C.; Divry, P.; Brivet, M.; Nada, M.; Zobot, M. T.; Mathieu, M.; Roe, C. (1998): Mitochondrial very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical characteristics and diagnostic considerations in 30 patients. In: *Clin. Chim. Acta* 269 (1), S. 43–62.

Vockley, J.; Rinaldo, P.; Bennett, M. J.; Matern, D.; Vladutiu, G. D. (2000): Synergistic heterozygosity: disease resulting from multiple partial defects in one or more metabolic pathways. In: *Mol. Genet. Metab* 71 (1-2), S. 10–18.

Voet, Donald; Voet, Judith G. (2004): *Biochemistry*. 3. Aufl. Hoboken, NJ: Wiley.

Wang, Y.; Geer, L. Y.; Chappay, C.; Kans, J. A.; Bryant, S. H. (2000): Cn3D: sequence and structure views for Entrez. In: *Trends Biochem. Sci* 25 (6), S. 300–302.

Wood, J. C.; Magera, M. J.; Rinaldo, P.; Seashore, M. R.; Strauss, A. W.; Friedman, A. (2001): Diagnosis of very long chain acyl-dehydrogenase deficiency from an infant's newborn screening card. In: *Pediatrics* 108 (1), S. E19.

Yamaguchi, S.; Indo, Y.; Coates, P. M.; Hashimoto, T.; Tanaka, K. (1993): Identification of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in three patients previously diagnosed with long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. In: *Pediatr. Res* 34 (1), S. 111–113.

Yue, Peng; Melamud, Eugene; Moul, John (2006): SNPs3D: candidate gene and SNP selection for association studies. In: *BMC Bioinformatics* 7, S. 166.

## **Danksagung**

Ich danke Frau Prof. Dr. Ute Spiekerkötter aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie der Uniklinik Düsseldorf ganz herzlich für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die Möglichkeit, die Experimente im Stoffwechsellabor der Universitätskinderklinik Düsseldorf durchzuführen, und für die konstruktive und umfangreiche Unterstützung bei der Bearbeitung dieses Themas.

Ich danke Frau Prof. Dr. Royer-Pokora vom Institut für Humangenetik und Anthropologie der Uniklinik Düsseldorf für die freundliche und konstruktive Übernahme des Korreferats.

Martina Müller danke ich für die gute Einarbeitung und Aufnahme im Stoffwechsellabor der Universitätskinderklinik Düsseldorf sowie für ihre tatkräftige und geduldige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente im Stoffwechsellabor.

Darüber hinaus möchte ich allen aktuellen und früheren Mitarbeitern der AG Spiekerkötter und des Stoffwechsellabors für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Insbesondere danke ich Dr. Lars Hoffmann für die Zusammenarbeit bei unserer Publikation und für Ratschläge im Labor und beim Verfassen der Dissertationsschrift, und Dr. Frank ter Veld und Dr. Sara Tucci für ihre Motivation und inspirierenden Ratschläge bei der Ausarbeitung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, Ilse, Ute und Peter Haußmann, die mich stets unterstützt und begleitet haben.

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

25. Februar 2013, Ulrike Johanna Haußmann