

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. Mayatepek

Charakterisierung Neugeborener mit dem Verdacht eines Medium-chain acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) – Mangels im Screening

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Simone Baur

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. U. Spiekerkötter
Korreferentin: Priv.- Doz. Dr. V. Keitel- Anselmino

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

F. ter Veld, M. Mueller, S. Kramer, U. Hausmann, D. Herebian, E. Mayatepek, M.D. Laryea, S. Primassin, U. Spiekerkoetter, A Novel Tandem Mass Spectrometry Method for Rapid Confirmation of Medium- and Very Long-Chain acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Newborns, PLoS ONE 4(7): 1- 7, 2009

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Einführung	6
1.2 Biochemie	7
1.3 Molekulargenetik	9
1.4 Neugeborenen- Screening	9
1.5 Klinisches Bild	11
1.6 Therapie	12
1.7 Historische Entwicklung und aktueller Stand der Literatur	12
1.8 Fragestellung	14

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten	15
2.2 Molekulargenetik	15
2.2.1 DNA- Extraktion aus EDTA- Vollblut	15
2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	15
2.2.3 Gelelektrophorese	17
2.2.4 Gel- DNA- Extraktion	17
2.2.5 Sequenzierungs- PCR	18
2.2.6 Aufreinigung	18
2.2.7 ABI	18
2.2.8 Sonstige Materialien	19
2.3 Acylcarnitine	19
2.4 Organische Säuren im Urin	19
2.5 Enzymaktivität	19

3 Ergebnisse

3.1 Mutationen	21
3.2 Enzymatik	23
3.3 Acylcarnitine	24
3.4 Organische Säuren	39
3.5 Körperliche Entwicklung	42
3.6 Klinische und laborchemische Auffälligkeiten	45

4 Diskussion

46

5 Zusammenfassung

52

6 Literaturverzeichnis

54

7	Abbildungsverzeichnis	58
8	Tabellenverzeichnis	59
9	Danksagung	60
10	Lebenslauf	61
11	Eidesstattliche Erklärung	63

1 Einleitung

1.1 Einführung

1976 wurde erstmals ein Patient mit Medium chain acyl-CoA – Dehydrogenase (MCAD)- Mangel beschrieben. Derzeit liegt die Prävalenz bei 1:10000- 1: 20000 (Wilcken et al. 2003, Waddell et al. 2006, Rhead 2006). Es handelt sich dabei um einen Defekt in der mitochondrialen β - Oxidation, der bewirkt, dass keine mittelkettigen Fettsäuren mehr abgebaut werden können. Folglich stauen sich Metabolite vor dem Defekt an und sind schließlich in Blut und Urin nachweisbar (z.B.: als Acylcarnitine, Acylglycin, Dicarbonsäuren).

Der Defekt ist auf Chromosom 1 lokalisiert. Eine krankheitsauslösende Mutation wurde zum ersten Mal 1991 identifiziert (Gregersen et al. 1991). Dabei handelt es sich um einen Austausch von Adenin gegen Guanin an Position 985 d es MCAD- Gens. 80% der Patienten sind homozygot und 18% heterozygot für diese Mutation, weshalb man sie auch als prävalent bezeichnet. Vor allem seit Einführung des Neugeborenen- Screenings im Jahr 2002 in Deutschland (seit 2005 Regelleistung der gesetzlichen Krankenkassen) wurden weitere Mutationen entdeckt. Im Screening fallen MCAD- Patienten durch ein erhöhtes Octanoylcarnitin (C8:0) auf.

Das klinische Bild dieser Erkrankung vor der Screening Ära war sehr heterogen und reichte von asymptomatischen bis hin zu letalen Verläufen. Durch bestimmte Auslöser (z.B. Fasten, Infektionen), die zu einer katabolen Stoffwechsellage führen, kommt es zu Hypoglykämien. Langzeitfolge schwerer oder protrahierter Hypoglykämien können Enzephalopathie, Epilepsie und Entwicklungsverzögerung sein. Durch Vermeidung dieser Auslöser haben die Patienten in der Regel eine gute Langzeitprognose. Die wichtigste Therapieoption ist demnach längere Nahrungskarenzen zu unterbinden. Eine Supplementierung der Patienten mit Carnitin zur Therapie eines möglichen sekundären Carnitin-Mangels ist umstritten.

1.2 Biochemie

Die Medium chain acyl-CoA Dehydrogenase ist ein Enzym der mitochondrialen β -Oxidation, bei der Fettsäuren mit dem Ziel der Energiegewinnung zu Acetyl-CoA abgebaut werden. Während des Fastens kommen 80- 90% der zellulären Energie aus der β -Oxidation (Sim et al. 2002). Da ihre Glykogenreserven noch nicht so groß sind, sind vor allem Neugeborene bei längerer Nüchternperiode auf diesen Stoffwechselweg angewiesen (Sim et al. 2002).

Da Fettsäuren relativ reaktionsträge Verbindungen sind, müssen sie zuerst in einer ATP- abhängigen Reaktion, die sowohl extra- als auch intramitochondrial ablaufen kann, aktiviert werden. Der größte Teil des Acyl- CoA entsteht im Cytosol. Der überwiegende Teil der Enzyme der β -Oxidation ist allerdings im mitochondrialen Matrixraum lokalisiert, so dass ein Transport des Acyl- CoAs durch die normalerweise nicht passierbare Innenmembran erforderlich ist. Dazu wird die langkettigen Fettsäure unter Freisetzung von CoA an Carnitin gebunden. Das Acyl- Carnitin kann mit Hilfe einer Translokase in den mitochondrialen Matrixraum gelangen, wo Coenzym A erneut auf den Fettsäurerest übertragen und Carnitin regeneriert wird (Abbildung 1).

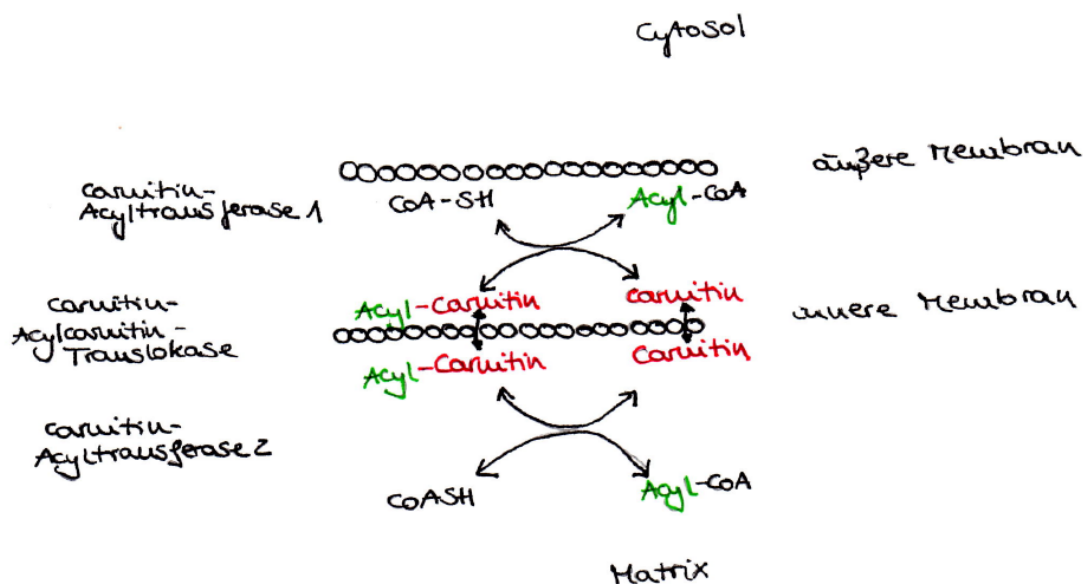


Abbildung 1: Carnitin als Carrier im Transport langkettiger Fettsäuren durch die mitochondriale Innenmembran (modifiziert nach Löffler, Petrides, 2003)

Anschließend durchläuft das Acyl- CoA einen Kreislauf mit vier Reaktionsschritten (erste Oxidation, Hydratisierung, zweite Oxidation, thiolytische Abspaltung des Acetyl- CoA vom β -C-Atom), an dessen Ende Acetyl- CoA und ein um zwei C-Atome verkürztes Acyl- CoA stehen, welches erneut in den Kreislauf eintritt (Abbildung 2). Das erste Enzym dieser Reaktionskette ist die Acyl-CoA- Dehydrogenase.

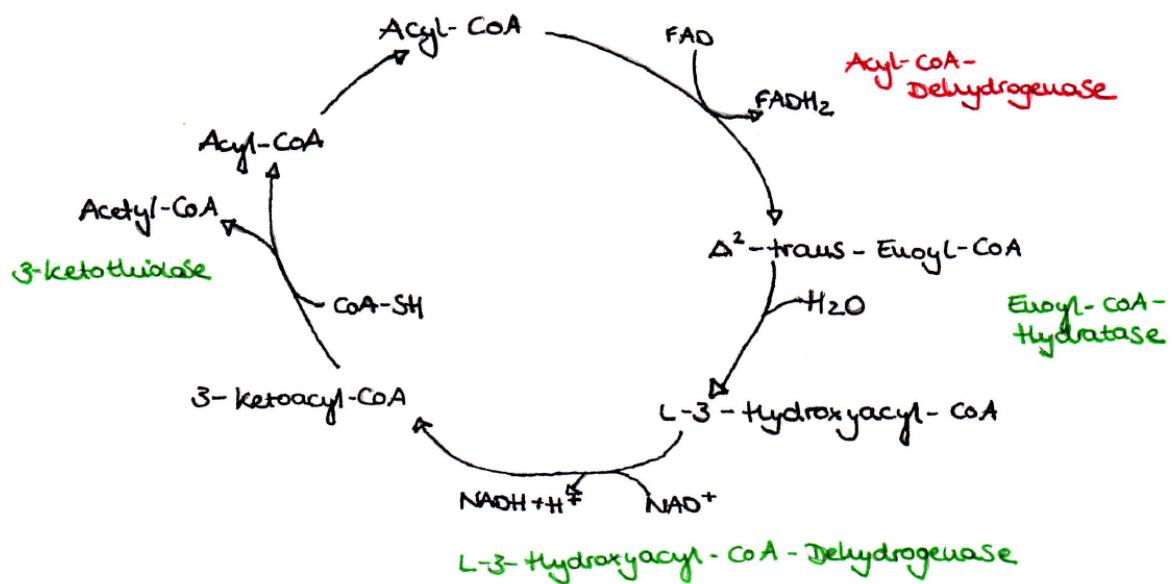


Abbildung 2: Abbau geradzahliger Fettsäuren durch die β -Oxidation (modifiziert nach Löffler, Petrides, 2003)

Je nach Länge der aktivierten Fettsäure existieren verschiedene Enzyme, die sich jedoch in ihrer Substratspezifität überlappen.

SCAD \rightarrow C4- C6

MCAD \rightarrow C4- C12

LCAD \rightarrow C8- C18

VLCAD \rightarrow C12- C16

(Coates and Tanka 1992)

In peripheren Geweben wird das Acetyl- CoA in den Citratzyklus eingeschleust. In der Leber wird es über den HMG- CoA- Weg in Ketone umgewandelt, die wasserlöslich sind und ins Blut abgegeben werden, so dass sie peripheren Geweben als Energiequelle dienen. Acetyl- CoA ist ein geeignetes Substrat zur Deckung des Energiebedarfs vieler extrahepatischer Gewebe.

Bei einem Mangel an MCAD stauen sich die mittelkettigen Fettsäuren vor diesem Reaktionsschritt an. An Carnitin gebunden können die akkumulierenden Acyl- Gruppen die Mitochondrien verlassen und sind schließlich im Blut nachweisbar. Diese werden zum Teil in Acylglycine, Acylcarnitine und Dicarbonsäuren umgewandelt. Auf diese Weise wird eine höhere Löslichkeit erreicht und eine Ausscheidung im Urin möglich gemacht (Coates and Tanka, 1992). Weiterhin besteht auch eine gewisse Toxizität der Fettsäuren, die durch die beschriebenen Ausscheidungsvorgänge verringert werden kann (Duran 1986).

1.3 Molekulargenetik

Das MCAD- Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 in der Region 31 lokalisiert (Matsubara et al. 1986) und 38kbp groß (Gregersen et al. 2004). Die Nukleotidsequenz wurde erstmals von Kelly et al. 1987 beschrieben. Die kodierende Region besteht aus 1263 Nukleotiden gegliedert in 12 Exone und kodiert für 421 Aminosäuren. Das entstehende Flavoenzym ist 42- 43kDa groß (Kelly et al. 1987). Mutationen können sowohl im Bereich der Exone als auch in den Intronregionen liegen. Erstmals wurde 1991 eine krankheitsverursachende Mutation beschrieben (Gregersen et al., 1991). Dabei handelt es sich um einen Austausch von Adenin gegen Guanin an der Stelle 985 der DNA. Die Mutation bewirkt einen Austausch von Lysin gegen Glutamat an Position 304 des Enzyms. Dieser Austausch liegt weder in der Substrat- noch in der FAD- bindenden Region, so dass eine Störung der tetrameren Struktur wahrscheinlich ist (Coates and Tanka 1992), die zu Instabilität und Funktionseinschränkung führt (Gregersen et al. 2004). In den folgenden Jahren zeigte sich, dass diese Mutation sehr häufig bei MCAD- Patienten vorkommt. 80 % der Patienten sind homozygot und 18% heterozygot für diese prävalente Mutation (Carpenter et al. 2001, Gergersen et al. 2004). Des Weiteren fand man ein Überwiegen bei Kaukasiern (Coates and Tanka 1992) bei bestehendem Nord- West- Gefälle der Erkrankung (de Vries 1996).

Seitdem wurden allerdings auch andere Mutationen identifiziert, die – ausgehend von klinischen Beobachtungen- teilweise zu mildereren Krankheitsverläufen zu führen scheinen (Waddell et al. 2006). Zu diesen seit Beginn des Screenings neu entdeckten Mutationen gehören unter anderem 199T>C, 245insT, 157C>T, 347G>T, 1137T>A, 1140insG, 799G>A, 616C>T, 504A>C, 155C>T, 127G>A, 583G>A, 608T>G, 797A>G, 1124T>C, 842G>C, 433A>T, 1001G>A, 730T>C, 698T>C, 1012insTAGAATGAGTTAC, 1067T>C, 447G>A, 387delG, 1001G>A, 472T>C, 387+1delG del1102–1105, 583G>A, 742A>G, 850–2A>G, 583G>A, 311A>G, 1237C>A, 1203delA, 577A>G, 1191delT, 817G>A, 742A>G, 850–2A>G, 734C>T, 617G>A, IVS6+7A>G, 1067T>C, 984A>G, 253G>T, 250C>T, IVS3+5G>T, 890A>G und 694C>T (Rhead et al. 2006).

1.4 Neugeborenen- Screening

Im Englischen bedeutet das Wort Screening „Sieben“. Es handelt sich also um die Untersuchung einer großen Population, bei der diejenigen, die krank sind, herausgefiltert werden sollen. Voraussetzungen für eine solche Art von Untersuchung ist 1., dass es einen einfachen Test gibt, mit dem man die einzelnen Erkrankungen schon im asymptomatischen Stadium erkennen kann, und 2., dass ein Nutzen, nämlich die Möglichkeit einer frühzeitigen Therapie und daraus folgend eine Minimierung der Folgeschäden und Komplikationen, entsteht (Screening Kriterien von Wilson und Jungner 1968). Beim Neugeborenen- Screening handelt es sich also um eine Präventionsmaßnahme zur Früherkennung von Erkrankungen in der Neugeborenenperiode.

Das erste flächendeckende Screening wurde in der Bundesrepublik Deutschland zwischen 1969 und 1970 für die PKU (Phenylketonurie) eingeführt. 1997 wurde die Untersuchung ausgeweitet: PKU, Galaktosämie, Biotinidasemangel, Hypothyreose, Adrenogenitales Syndrom (Richtlinien zur Organisation und Durchführung des Neugeborenen Screenings auf angeborene Stoffwechselstörungen und

Endokrinopathien in Deutschland, Deutsche Gesellschaft für Neugeborenen-Screening e.V., 1997). Durch die Entwicklung der Tandem- Massenspektrometrie, die seit 2002 von der Ständigen Screening Kommission (Screening- Richtlinien 2002, Deutsche Gesellschaft für Neugeborenen-Screening e.V.) empfohlen wird, konnte das Spektrum der Zielkrankheiten erweitert werden (Tabelle 1).

Seitdem werden die Neugeborenen auf folgende Krankheiten untersucht:

Tabelle 1: Übersicht über die im Neugeborenen- Screening erfassten Erkrankungen

Endokrinopathien	Angeborene Hypothyreose Adrenogenitales Syndrom	
Stoffwechselerkrankungen	Biotinidasemangel Klassische Galaktosämie	
	Aminoazidopathien und Harnstoffzyklusdefekte	PKU Ahornsirupkrankheit (MSUD)
	Fettsäureoxidationsdefekte	MCAD- Mangel VLCAD- Mangel LCHAD- Mangel mTFP- Mangel
	Carnitinzyklusdefekte	Carnitin- Palmitoyl- Transferase I/II Defekt CACT- Mangel
	Organoazidurien	Glutarazidurie Typ I Isovalerianazidurie

Seit 1.4.2005 ist das erweiterte Neugeborenen- Screening durch einen Beschluss des gemeinsamen Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen eine Regelleistung der gesetzlichen Krankenversicherungen.

Untersucht wird kapilläres Fersen- oder venöses Blut, welches auf eine Filterpapierkarte getropft wird. Die Abnahme sollte zwischen der 49. und 72. Lebensstunde erfolgen. Allerdings gilt auch eine Abnahme ab der 37. Lebensstunde als regelrecht. Bei Frühgeborenen < 32. SSW muss in jedem Fall ein zweites Screening erfolgen.

Bei MCAD- Patienten findet sich im Blut eine erhöhte Konzentration von Octanoylcarnitin (C8:0). Bei der Urinanalyse lässt sich eine erhöhte Ausscheidung von Hexanoylglycin und Dicarbonsäuren feststellen. Als Konfirmationsdiagnostik erfolgen Molekulargenetik oder Enzymatik („Konfirmationsdiagnostik bei Verdacht auf angeborene Stoffwechselerkrankungen aus dem Neugeborenen-Screening“, AWMF Leitlinie, 2010).

Eine Evidenz der klinischen Effektivität des Screenings fehlt jedoch weiterhin, da man dazu randomisierte kontrollierte Studien benötigen würde, deren Design aber auf Grund der niedrigen Inzidenz sehr schwierig ist. Dass Screening sinnvoll ist, zeigt die klinische Erfahrung (Wilcken et al. 2003).

1.5 Klinisches Bild

Das klinische Bild des MCAD- Mangels vor der Screening- Ära war sehr heterogen und reichte von asymptomatischen bis zu letalen Verläufen (Gregersen et al. 2004). Vor Einführung des Neugeborenen- Screenings betrug die Mortalität 25%. Eine Entwicklungsverzögerung trat bei 30-40% der Patienten auf (Wilcken et al. 2003). Das mittlere Alter bei einem unerwarteten Tod betrug 18,5 Monate (Wang et al. 1999). Die Prognose ist nach Diagnosestellung günstig (Sim et al. 2002), sodass die Sterblichkeit bei den für die prävalente Mutation homozygoten Patienten nach Einführung des Screenings auf <7% gesunken ist (Rhead 2006).

Allgemein können sich Störungen der Fettsäureoxidation ähnlich präsentieren wie ein Reye- Syndrom. Pathologisch finden sich hier Ähnlichkeiten wie eine fettige Infiltration der Organe, v. a. Leber, Niere und Myokard, und ein Hirnödem (Howat et al. 1985).

Beim Reye- Syndrom handelt es sich um „eine akute, nicht- entzündliche Enzephalopathie unklarer Genese mit Entwicklung eines akuten Leberversagens unter dem histologischen Bild einer mikrovesikulären Fettinfiltration der Leber“ (B. Rodeck, 2007, Gastroenterologie und Hepatologie, Reye- Syndrom, In: E. Mayatepek, Hrsg., Pädiatrie, 1. Auflage, München: Elsevier, S.592). Auslösend kann ein viraler Infekt oder auch die Therapie mit Acetylsalicylsäure sein. In der Folge kommt es zu Erbrechen, Krampfanfällen, zunehmendem Bewusstseinsverlust und Symptomen der Leberdysfunktion.

Meist manifestiert sich ein MCAD- Mangel zwischen dem 3. Lebensmonat und dem 6. Lebensjahr. Patienten können aber bereits in der Neugeborenenperiode symptomatisch werden (Carpenter 2001). In der Regel ist ein auslösendes Ereignis für die Symptomatik erforderlich; z.B.: Fasten, Infektionen/ Krankheiten und Impfungen (Wang et al. 1999). Es können folgende Phänomene auftreten: Hypoglykämie (mit 90% das häufigste Symptom), Hypoketonämie, Hypocarnitinämie, Transaminasenerhöhung, Hepatomegalie, milde Hyperammonämie, Lethargie, Enzephalopathie, Apnoe, Herz- und/oder Atemstillstand, Epilepsie, plötzlicher Tod (Wang et al. 1999). Die Entwicklung einer Kardiomyopathie und Skelettmypathie - wie von Störungen der Oxidation langkettiger Fettsäuren bekannt - ist nicht beschrieben (Coates and Tanka 1992, Gregersen et al. 2004, Wilcken et al. 1994). Als Langzeitfolgen können Entwicklungs- und Verhaltensänderungen, chronische Muskelschwäche, Wachstumsverzögerung, Aufmerksamkeitsdefizit und Zerebralparalyse auftreten. (Wang et al.1999). Höheres Alter bei Diagnosestellung und hohe Frequenz vorangegangener Stoffwechsellentgleisungen stellen nach Wang et al. Risikofaktoren für die Entwicklung derartiger Langzeitkomplikationen dar. Beschrieben werden zudem Faktoren, die die Wahrscheinlichkeit für ein Aufmerksamkeitsdefizit erhöhen: Epilepsie, Enzephalopathie, Hyperammonämie und höheres Alter bei Erstdiagnose. Sermon et al. beschrieben 2000 ein follow- up mit einem Spektrum von geringgradigen Leistungseinschränkungen in der Schule bis hin zu ernsthaften Beeinträchtigungen wie Epilepsie, Hemiplegie und Entwicklungsrückstand. Häufig

würden sich Spät- bzw. Langzeitschäden dadurch entwickeln, dass sich schon vor Diagnosestellung eine Enzephalopathie entwickelt habe (Pourfarzam et al. 2001) bzw. es zu einer metabolischen Dekompensation gekommen sei (Hsu et al. 2008). Deshalb ist ein Screening so enorm wichtig.

Neben den schon beschriebenen finden sich auch noch weitere Laborveränderungen: metabolische Azidose, niedrige Plasma- und Gewebsspiegel von Carnitin (Coates and Tanka 1992) und eine charakteristische Ansammlung verschiedener Metabolite im Plasma. Die Akkumulation von C8:0- Carnitin ist weitgehend wegweisend (Roe et al. 1985).

1.6 Therapie

Durch schnelle Diagnosestellung und konsequente Behandlung lässt sich eine gute Langzeitprognose erzielen (Überlebensrate nach Diagnosestellung fast 100% (Gregersen et al. 2000)). Grundpfeiler der Therapie sind die Vermeidung von Fasten bzw. metabolischem Stress und eine adäquate Kalorienzufuhr (Coates and Tanka 1992). Besonders im Rahmen von Infektionen (z.B. der Atemwege oder des Gastrointestinaltrakts) ist dies sehr wichtig (Carpenter et al. 2001). Auf diese Weise konnten Morbidität und Mortalität gesenkt werden (Carpenter et al. 2001), so dass sich hieraus ein klarer Benefit des Screenings ergibt. Häufig erhalten die Eltern einen Managementplan, aus dem hervorgeht, wie lang Fastenperioden sein dürfen und was im Falle einer längeren Nahrungskarenz zu tun ist (Waddell et al. 2006). Einige Programme bieten den Eltern ein Blutzucker- Messgerät für zu Hause an (Rhead 2006). Notfallpläne sehen eine intravenöse Gabe von Glukose vor (Rhead 2006), welche meist zu einer schnellen Normalisierung des Allgemeinzustandes führt.

In den 70er Jahren wurde erstmals die Rolle des Carnitins für diese Stoffwechselerkrankungen untersucht. Es wurde ein erniedrigter Carnitin-Spiegel im Muskel und Plasma gemessen. Daraus ergab sich ein Interesse an einer Behandlung mit Carnitin zur Unterstützung der Ausscheidung der nicht metabolisierten Fettsäuren als Ester, wobei sich dies in ersten Beschreibungen als nicht effektiv erwies (Kelley et al. 1994). Andere Fallbeispiele (Roe et al. 1985) zeigten, dass durch die Supplementierung von Carnitin normale Plasmaspiegel erreicht werden können. Nach Rhead 2006 wird eine Carnitin- Dosis von 20- 100 mg/ kg Körpergewicht als empfohlene Therapie angegeben. In anderen Studien ist diese Behandlung nicht Routine (Wilcken et al. 2007). Nach Sim et al. 2002 ist die Carnitin-Substitution umstritten. Auch laut Schulze et al. 2003 ist es nicht sicher, ob eine spezifische Behandlung des MCAD- Mangels erforderlich ist.

1.7 Historische Entwicklung und aktueller Stand der Literatur

Der erste MCAD- Patient wurde 1976 von Gregersen et al. beschrieben, zwischen 1982 und 1984 folgten 200 weitere Fallbeschreibungen (Wang et al. 1999). Matsubara et al. gelang es 1986, das MCAD- Gen auf Chromosom 1 zu lokalisieren. Eine Sequenzierung erfolgte 1987 durch Kelly et al.. Bereits 1985 beschrieben Roe et al. eine für den MCAD- Mangel typische Akkumulation von Octanoylcarnitin (C8:0). 1990/ 91 wurde erstmals eine krankheitsverursachende Mutation, nämlich g.985A>G, von vier unabhängigen Forschungsgruppen, unter anderem Kelly et al. und Gregersen et

al., identifiziert (Gregersen et al. 2000). De Vries et al. zeigten 1996, dass diese Mutation überwiegend bei Kaukasiern vorkommt.

Erstmals wurde 1989 die Tandem- Massenspektrometrie als Screeningmethode für metabolische Erkrankungen von Millington et al. entdeckt. In Teilen Australiens existiert das Screening bereits seit 1998 (Wilcken et al. 2003). In Deutschland ist das Neugeborenen- Screening seit 2003 etabliert. Die Inzidenz des MCAD- Mangels ist seit Einführung des Screenings etwa 2-3mal so hoch wie vor der Screening- Ära (Rhead 2006). Weiterhin konnten Morbidität und Mortalität seitdem deutlich gesenkt werden. Durch das Screening fallen nun auch jene Patienten auf, die früher einer rein klinischen Diagnostik aufgrund eines möglicherweise lebenslang asymptomatischen Verlaufs entgangen wären (Wilcken et al. 2003). Für die in diesem Rahmen entdeckten Mutationen wurde deshalb der Begriff „milde“ Mutationen gewählt (Derks et al. 2007).

Derzeit wird die Prävalenz auf 1: 10000- 1: 20000 geschätzt (Wilcken et al. 2003, Waddell et al. 2006, Rhead 2006).

1.8 Fragestellungen

Folgende Fragestellungen liegen der vorliegenden Studie zugrunde:

1. Haben alle Kinder mit MCAD- typischem Acylcarnitinprofil im Neugeborenen- Screening tatsächlich genannten Enzymdefekt?
2. Welche Methode ist die geeignete Konfirmationsdiagnostik bei Verdacht auf einen MCAD- Mangel im Neugeborenen- Screening?
3. Wie viele Patienten haben in welchem Lebensalter ein erniedrigtes freies Carnitin?
4. Wie viele Patienten sind symptomatisch? Gibt es Unterschiede zwischen den Kindern, die im Neugeborenen- Screening aufgefallen sind, und denen, die vor der Screening- Ära geboren wurden?
5. Gibt es eine Korrelation zwischen Mutation und Enzymatik, klinischem Phänotyp oder Carnitin- Werten?

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Es wurden Patienten in die Studie eingeschlossen, die entweder im Neugeborenen-Screening oder im Rahmen eines Familienscreenings aufgrund eines pathologischen Acylcarnitinprofils auffällig wurden. Zur Konfirmation der Verdachtsdiagnose erfolgten: Sequenzierung des MCAD Gens, Analyse der Ausscheidung organischer Säuren im Urin und Umsatzmessung des Enzyms Medium-chain acyl-CoA Dehydrogenase in Lymphozyten.

Ein Votum der Ethikkommission für vorliegende Studie war nicht notwendig, da es sich bei den diagnostischen Maßnahmen um das festgelegte diagnostische Follow-up bei pathologischem Befund im Neugeborenen-Screening handelte (AWMF Leitlinien zum Neugeborenen Screening 2010).

Die Patienten befanden sich in Behandlung in der Universitätskinderklinik Düsseldorf. Die klinischen Daten im Verlauf der Erkrankung wurden aus den Patientenakten erhoben.

2.2 Molekulargenetik

2.2.1 DNA-Extraktion aus EDTA- Vollblut

Material: QIAamp® DNA Mini Kit (250), QIAGEN GmbH, Hilden

Die DNA- Extraktion aus venösem, mit EDTA versetztem Vollblut der Patienten erfolgte nach der Anweisung der Firma Qiagen mittels DNA Mini Kit. Zur Kontrolle der DNA- Reinheit und Bestimmung der Konzentration wurde eine Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 260nm- 280nm mit Hilfe eines Photometers durchgeführt (DU® 640B Spectrophotometer, Beckmann Coulter™, USA; Präzisions Küvetten aus Quarzglas SUPRASIL®, Hellma®, Müllheim).

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Material: REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix with MgCl₂, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA

Primer (100 pmol/ µl), MWG- Biotech AG, Ebersberg

Es wurde eine PCR der Patienten- DNA mit dem Ziel, die einzelnen Exone und angrenzenden Intronbereiche des MCAD- Gens zu amplifizieren, durchgeführt. Dazu wurden genspezifische Oligonukleotide mit einer Länge zwischen 18 und 23 Basenpaaren (bp) verwendet (Tabelle 2). Dabei wurden Exon 3 und Exon 4 zuerst von gemeinsamen Primern amplifiziert. Im Verlauf wurde für Exon 4 ein eigener Primer verwendet. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden zur besseren Amplifikation auch neue Primer für Exon 8 verwendet, mit denen man ein kleineres Fragment erhielt. Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 40µl enthielt 25ng/µl DNA, 1,5µl 5'-Primer, 1,5µl 3'-Primer, 20µl PCR Reaction Mix, der die Taq- Polymerase und die dNTPs beinhaltet, und 13µl Puffer, welcher auch zu dem REDTaq®ReadyMix™ gehört.

Tabelle 2: Primersequenzen

Exon	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Antisense (5'-3')	Schmelz Temperatur,
------	------------------------------	----------------------------------	---------------------

Nr.			(C°)
1	GGGAGTATGTCAAGGC CGTG	CCACAATACCCATGTTCCAGC	61; 60
2	GGTCAAACCAGTTGCTGTAC	ACAGTGGACTGGTTCTACTC	57
3 / 4	GTCTGAGTTTCTGATAATCAAGG	CTTACTCATATGCATTCCAG	57; 53
4	CTTCTAGTATCCAGTCCC	CTTACTCATTAGCATTCC	54; 49
5	CACATGTAGATATTATATTGC	CCAACTTCTTCAGGAGTAAC	50; 55
6	CATTTTGAATTATAGCATCTCTGA	TGAAAAGGAATAGCACCT	54; 54
7	CAATCCTGTTTCCAAACAGTCA	GGCCTTCCAGGTCCACAAAC	57; 61
8	GCATTCACCATGTGTTATTTGCC	CAAACAAATGTTTTTATTAAGGAAAG	59; 54
8neu	GATATTATCACCATTATCCGG	TAATATTTGGGGCCCTAATC	54; 53
9	GGTAATTGCAGAAAGTCATG	GAGAAACACACTGAACATAC	53
10	GTACACTCCCTAACATAGAC	CCACATTATCTTCTTGCTATC	55; 54
11	GCAAGCCCGTCACTATAAAAATG	GGCTCACAGCCATATATGACAG	59; 60
12	ATTACAACACACCTTATGCTACTG	AGTAAAGTGGTAAAGAAAC	58; 53

Die einzelnen Schritte der PCR wurden im T3-Thermocycler der Firma Biometra®, Göttingen, wie aus Tabelle 3 ersichtlich, durchgeführt.

Tabelle 3: einzelne Schritte der PCR

Exon	Anzahl der Zyk- len	Dauer (min.)	Temperatur (°C)	
1 und 12	1	5	96	Denaturierung
	40	0,75	94	Denaturierung
		0,5	53	Annealing
		0,75	72	Elongation
	1	10	72	Nachelongation
2,3/4,4,5,6,7,8,9,10,	1	5	96	Denaturierung

11				
	30	0,75	94	Denaturierung
		0,75	50	Annealing
		0,75	72	Elongation
	1	10	72	Nachelongation

Für die jeweiligen Primer wurde eine individuelle Anlagerungstemperatur (T_m) mit der Formel

$T_m = G/C\text{- Anteil (\%)} \times 0,41 + 69,3^\circ\text{C} - 650 / \text{Primerlänge (bp)}$ ermittelt.

2.2.3 Gelelektrophorese

Material: my- Budget Universal Agarose, Bio- Budget Technologies GmbH, Krefeld

100bp- Leiter, Invitrogen®, Karlsruhe

Zur Auftrennung der einzelnen DNA- Fragmente diente die Gelelektrophorese. Das dazu verwendete Gel enthielt Agarose in einer 2%- Konzentration in 100ml 1x TBE- Puffer (110mM Tris-HCL, 89mM Borsäure, 2mM Na-EDTA) gelöst. Der für diese Methode erforderliche Laufpuffer war bereits im PCR Reaction Mix enthalten. Als Längenstandard diente eine 100bp- Leiter, die am Rand des Gels mitlief. Bei 200mA lief das Gel mit max. 120 Volt für 60- 120 Minuten und wurde danach in einem Ethidiumbromidbad (0,5µg/l) für 10- 15 Minuten gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA, so dass die unterschiedlichen Banden unter UV-Licht von 365nm beurteilt werden konnten (UV- Transluminator GE-FLX- 20L, AGS, Heidelberg). Zur Dokumentation wurde ein Foto des Gels angefertigt (Polaroid- Kamera- System- DS- 34, AGS, Heidelberg).

2.2.4 Gel- DNA-Extraktion

Material: QIAquick® Gel Extraction Kit (250), QIAGEN GmbH, Hilden

Die in den einzelnen Banden des Agarosegels enthaltene DNA der jeweiligen Exone wurde gemäß der Anweisung des Herstellers aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt.

2.2.5 Sequenzierungs- PCR

Material: Big Dye® Terminator Kit, Applied Biosystem, Darmstadt

Um die einzelnen DNA- Fragmente beurteilen zu können wurde eine „Cycle“- Sequenzierung durchgeführt, die mit der sogenannten Dye- Terminator- Methode arbeitet. Dabei werden dNTPs

(Desoxyribonukleosidtriphosphate) verwendet, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehen sind. Diese werden bei der Amplifikation in die jeweiligen DNA- Strängen eingebaut und können so vom Sequenziergerät gemessen werden. Auf diese Weise ist es möglich die Basenabfolge der einzelnen Exone zu ermitteln.

Die Sequenzierungs- PCR hatte das Ziel die 3'- und 5'- Stränge der Exone zu amplifizieren und die fluoreszenzmarkierten dNTPs einzubauen.

Der Ansatz mit einem Volumen von 20µl enthielt 2µl Big Dye®, 3µl Puffer, 2µl DNA, 1µl des 5'- oder 3'- Primers und 12µl Wasser.

Die einzelnen Schritte der PCR erfolgten im T3-Thermocycler der Firma Biometra® in Göttingen nach folgenden Schema:

Heizdeckel 95°C

1 Zyklus 96°C für 40 Sekunden (Denaturierung)

25 Zyklen bestehend aus jeweils drei Teilen 96°C für 15 Sekunden (Denaturierung)

53°C für 5 Sekunden (Annealing)

60°C für 4 Minuten (Elongation)

2.2.6 Aufreinigung

Material: DyeEx™ 2.0 Spin Kit (250), QIAGEN GmbH, Hilden

Die Produkte der Sequenzierungs- PCR wurden nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.7. ABI PRISM™ Genetic Analyzer

Material: Formamid (500ml), Calbiochem, San Diego, Californien, USA

ABI PRISM™ Genetic Analyzer, Applied Biosystem, Darmstadt

POP-6™, Applied Biosystem, Darmstadt

Zur Auswertung der Proben mit Hilfe des ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer wurden 10µl des Eluats (aus der Aufreinigung) mit 10µl Formamid versetzt.

Über eine Kapillare wurden die einzelnen Proben injiziert und schließlich mittels Kettenabbruchmethode analysiert. Der ABI wertete die Bruchstücke aufgrund ihrer Fluoreszenz aus. Die Daten waren über ein Computersystem zugänglich. Auf diese Weise entstand eine vollständige Darstellung der Basenabfolge jedes der 12 Exone sowohl in 3'- als auch in 5'- Richtung.

2.2.8 sonstige Materialien

Biofuge fresco, Heraeus, Hanau

Nuclease- free water, Promega, Madison, USA

2.3 Acylcarnitine

Die Acylcarnitinbefunde aus dem Neugeborenenenscreening wurden von den verschiedenen Screening-Laboren übermittelt. Die Bestimmung der Acylcarnitine im Verlauf erfolgte aus Trockenblut mittels Tandem- Massenspektrometrie (Zytkovicz et al. 2001) im Labor der Kinderklinik der Universitätsklinik Düsseldorf. Die Daten wurden mir für vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Von Interesse für die vorliegende Studie waren das freie Carnitin (C0), Octanoylcarnitin (C8:0), Decanoylcarnitin (C10:0) und der Quotient aus C8:0 und C10:0.

2.4 Organische Säuren im Urin

Die Bestimmung der organischen Säuren im Urin wird ebenfalls routinemäßig in der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt. Hierbei wird ein gering modifiziertes Verfahren der von Hoffmann et al. 1989 beschriebenen Methode mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GCMS) durchgeführt. Es werden unter anderem die Metabolite Hexanoylglycin, Suberinsäure und Adipinsäure begutachtet. Diese Ergebnisse waren für die Arbeit zugänglich.

2.5 Enzymaktivität

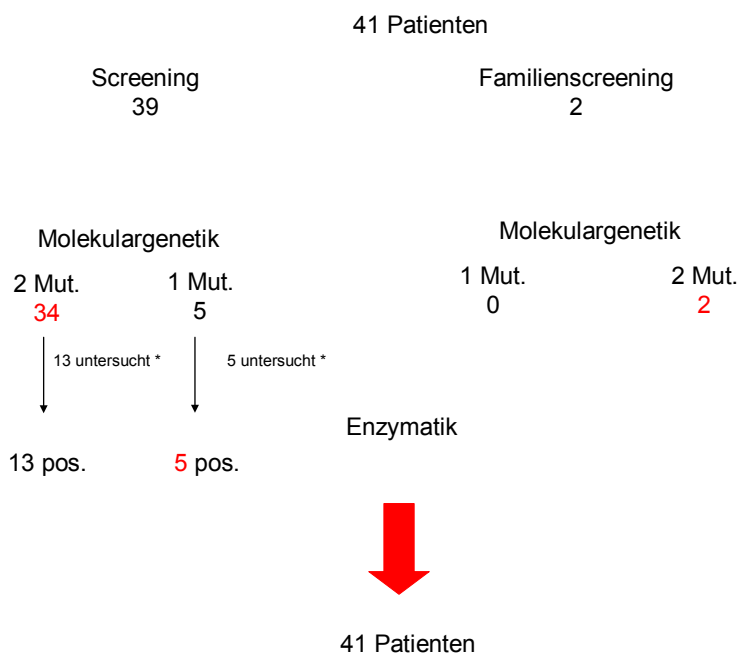
Die Bestimmung der residualen Enzymaktivität der Medium- chain acyl- CoA Dehydrogenase erfolgte aus Lymphozyten. Diese werden aus EDTA- Blut der Patienten mittels Zentrifugation und Zugabe verschiedener Puffer (ter Veld et al. 2009) gewonnen und mit spezifischen Substraten (C8:OH-CoA, C8:1-CoA and C8:0-CoA) versetzt (ter Veld et al. 2009) Die Messung der Octanoyl- CoA- Oxidation erfolgte mittels High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC) und Tandem- Massenspektrometrie. Die Ergebnisse wurden für diese Studie zur Verfügung gestellt.

3 Ergebnisse

Es wurden 41 Patienten in die Studie aufgenommen. Einen Überblick gibt Abbildung 3. 39 waren durch ein pathologisches Acylcarnitinprofil im Neugeborenenenscreening auffällig geworden. Zwei Patienten wurden im Rahmen des Familienscreenings bei Diagnose eines MCAD- Mangels bei einem Geschwisterkind diagnostiziert. Zur weiteren Diagnostik und vor allem zur Konfirmation des

Screeningbefundes wurde eine molekulargenetische Analyse durchgeführt. Bei 5 Kindern wurde hierbei nur eine Mutation gefunden. Besonders in diesen Fällen war eine Bestimmung der residualen Enzymaktivität entscheidend. Auch bei 13 Patienten mit zwei Mutationen wurde die Octanoylcarnitin-Oxidation gemessen.

Abbildung 3: Überblick über Patientenkollektiv, welches durch Screening, Molekulargenetik und Enzymatik charakterisiert wurde



* Bestimmung der Enzymaktivität aus Lymphozyten

3.1 Mutationen

Von 41 Patienten waren 22 homozygot für die prävalente Mutation 985A>G und weitere 8 wiesen neben dieser noch eine weitere Mutation auf (Tabelle 4). Drei Patienten waren homozygot für 157C>T, einer für 799G>A und einer für 245insT. Ein Kind wies den Genotyp 199T>C/1140insG auf. Des Weiteren konnte bei 5 Kindern nur eine Mutation gefunden werden (3 x 985A>G, 2 x 245insT).

Außerdem fanden sich bei 8 Patienten einige Mutationen in den an das jeweilige Exon grenzenden Intronbereichen (Tabelle 4).

Bei einigen Kindern fanden sich Polymorphismen.

Nr	Allel 1	Allel 2	Intronmutationen	Polymorphismen
1	g.985A>G	g.985A>G		
2	g.985A>G		IVS 2-32C>G he, IVS 3+10T>C he, IVS 5+32 C>G he, IVS 6-14 A>G he, IVS 7-22 C>A he	V387V heterozygot
3	g.985A>G	g.985A>G		
4	g.985A>G	g.985A>G		
5	g.985A>G	g.985A>G		
6	g.985A>G	g.985A>G		
7	g.985A>G	g.985A>G		
8	g.985A>G	g.985A>G		
9	g.985A>G		IVS 2-32C>G he, IVS 3+10T>C he, IVS 5+32 C>G he, IVS 6-14 A>G he, IVS 7-22 C>A he	V387V heterozygot
10	g.245insT		IVS 2-32C>G he, IVS 3+10T>C he, IVS 5+32C>G he, IVS 7-22C>A he, IVS 9+2T>C he	V387V heterozygot
11	g.245insT		IVS 2-32C>G he, IVS 3+10T>C he, IVS 5+32C>G he, IVS 7-22C>A he, IVS 9+2T>C he	V387V heterozygot
12	g.985A>G	g.985A>G		
13	g.157C>T	g.157C>T		
14	g.985A>G	g.985A>G		
15	g.985A>G	g.199T>C		
16	g.985A>G	g.985A>G		
17	g.985A>G			
18	g.985A>G	g.347G>T	IVS 1-34T>C he, IVS 3-20T>C he, IVS 3+10 T>C he, IVS 5+32 C>G he	Thr351Thr hetero
19	g.985A>G	g.985A>G		
20	g.985A>G	g.985A>G		
21	g.985A>G	g.985A>G		
22	g.157C>T	g.157C>T		
23	g.157C>T	g.157C>T		
24	g.985A>G	g.1137T>A		V387V heterozygot
25	g.985A>G	g.985A>G		
26	g.199T>C	g.1140insG	IVS 3+10T>C he	V387V heterozygot
27	g.985A>G	g.245insT	IVS 2-32C>G he, IVS 3+10T>C he, IVS 5+32C>G he, IVS 7-22C>A he, IVS 8+32G>C he	V387V heterozygot
28	g.985A>G	g.985A>G		
29	g.245insT	g.245insT		
30	g.985A>G	g.985A>G		
31	g.985A>G	g.199T>C		
32	g.985A>G	g.985A>G		
33	g.985A>G	g.199T>C		
34	g.985A>G	g.985A>G	IVS 2-9 T>A he	
35	g.799G>A	g.799G>A		
36	g.985A>G	g.616C>T		
37	g.985A>G	g.985A>G		
38	g.985A>G	g.985A>G		
39	g.985A>G	g.985A>G		
40	g.985A>G	g.985A>G		
41	g.985A>G	g.199T>C		

Tabelle 4: Ergebnis der molekulargenetischen Untersuchung

3.2 Enzymatik

Von 18 der 41 Kinder wurde eine Analyse der residualen Aktivität des MCAD- Enzyms durchgeführt. Es zeigten sich Aktivitäten zwischen 0,34% und 13,19%.

Am bedeutsamsten war diese Analyse bei den 5 Kindern, bei denen in der genetischen Analyse lediglich eine Mutation gefunden wurde. Es zeigte sich bei allen eine niedrige residuale Aktivität des MCAD- Enzyms, so dass die Diagnose eines MCAD- Mangels gestellt werden konnte (2 Patienten mit 245insT/ -: 0,57% und 1,19%, 3 Patienten mit 985A>G/ -: 5%, 5,99% und 5,44%).

Korrelation der Residualaktivität mit dem Genotyp:

Bei den übrigen 13 Patienten, von denen Lymphozyten zur Messung der Restaktivität isoliert wurden, fiel eine Korrelation der Enzymaktivität mit dem jeweiligen Genotyp auf (Abbildung 4). Bei den Patienten, die homozygot für die prävalente Mutation waren, wurden Aktivitäten unter 3% gemessen (0,34%-2,14%).

Die beiden Patienten, die den molekulargenetischen Befund 985A>G/199T>C aufwiesen, hatten eine Enzymaktivität von 9,7% bzw. 11,17%. Die höchste Restaktivität fand sich bei Patient 26 (199T>C/1140insG) mit 13,19%.

Der Patient, der homozygot für 799G>A war, wies eine Restaktivität von 7,14% auf, bei Patient 13 (157C>T homozygot) fanden sich 8,78%. Patient 18 (985A>G/ 347G>A) zeigte eine Aktivität von 1,03%.

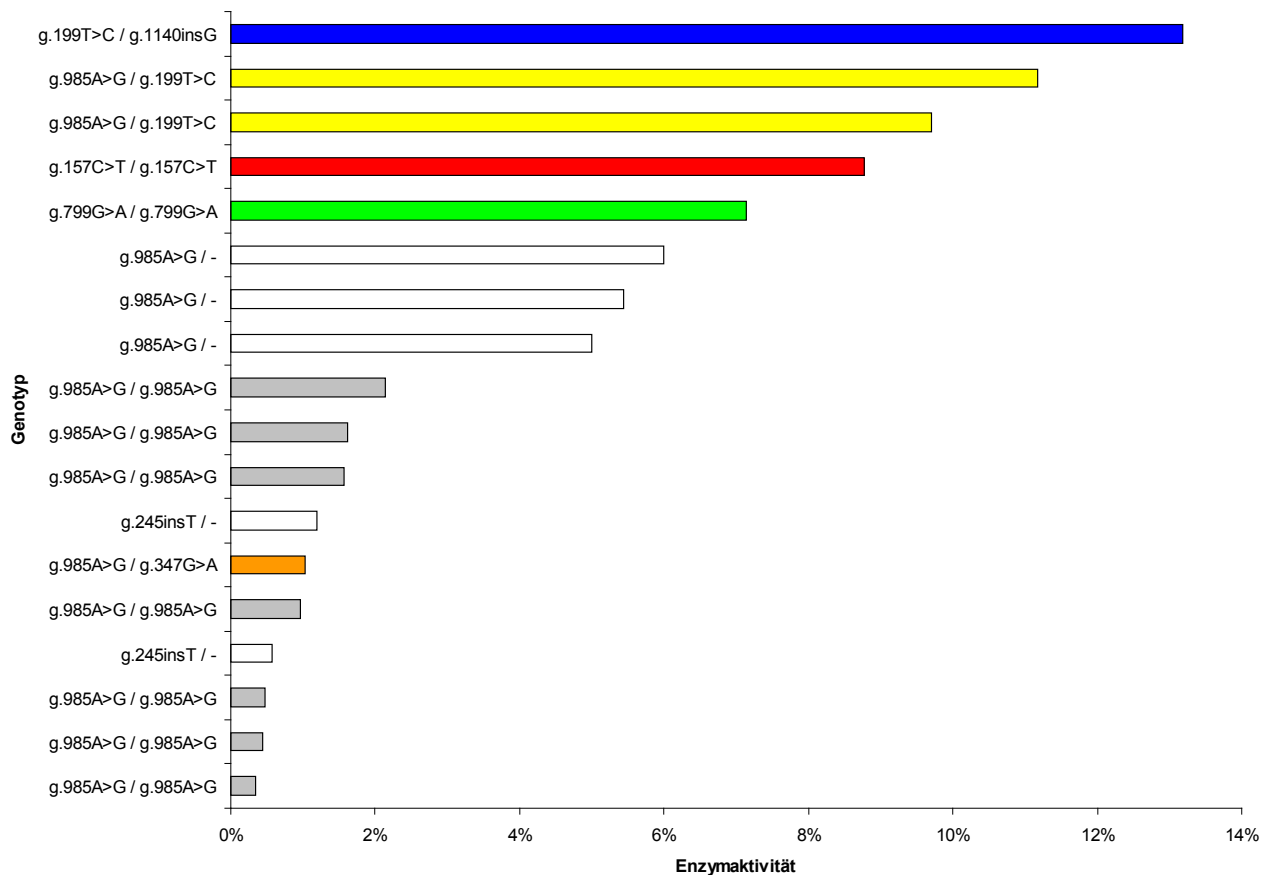


Abbildung 4: Korrelation Enzymaktivität/ Genotyp

Farbenerklärung (gültig für die gesamte Arbeit):

grau: 985A>G/985A>G

rot: 157C>T/157C>T

grün: 799G>A/799G>A

gelb: 985A>G/199T>C

blau: 199T>C/1140insG

orange: 985A>G/ sonstige

weiß: nur eine Mutation gefunden

türkis: 245insT/ 245insT

3.3 Acylcarnitine

Screening:

Von 30 Patienten lagen die Befunde aus dem Neugeborenen- Screening vor. Die Daten waren teilweise unvollständig.

C8:0 → n= 30

C10:0 → n= 28

C0 → n= 26

Freies Carnitin im Screening

Der Messwert für das freie Carnitin befand sich bei allen Patienten im Normbereich mit einer mittleren Plasmakonzentration von 36,1 $\mu\text{mol/l}$. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem C0-Plasmaspiegel und dem Genotyp der Patienten wie aus Abbildung 5 hervorgeht.

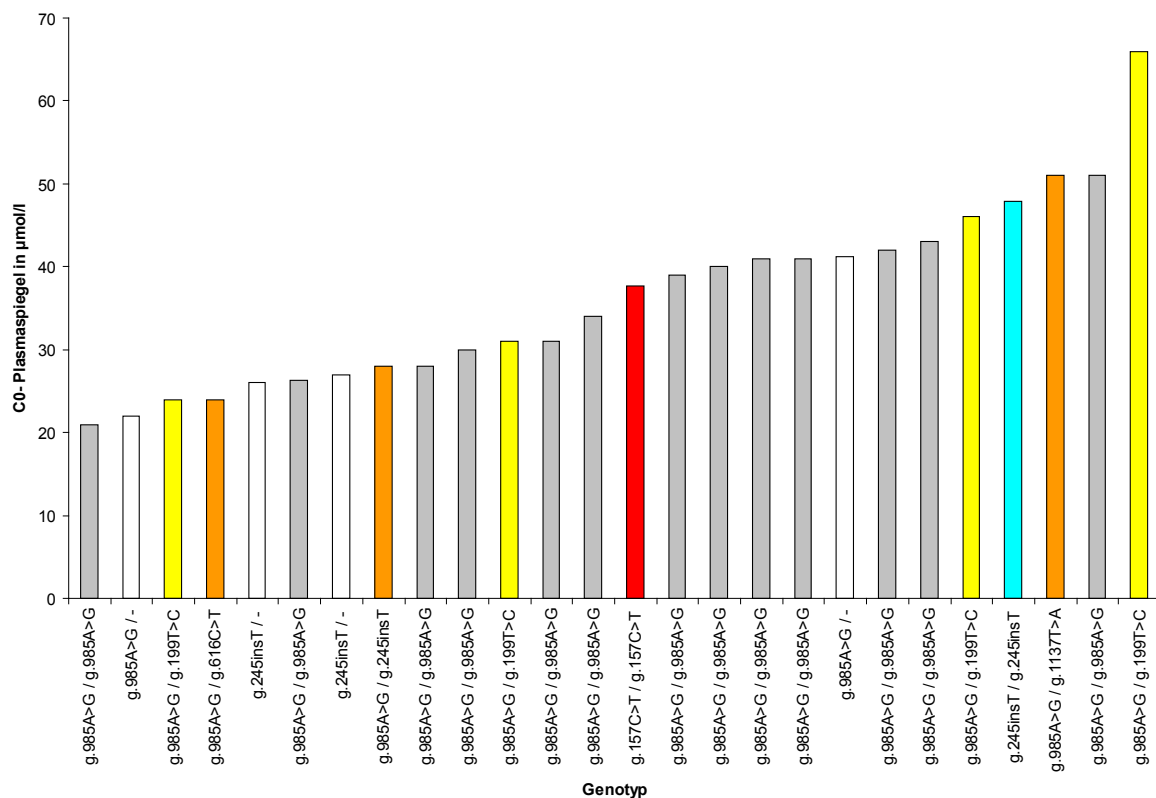


Abbildung 5: Korrelation C0- Plasmaspiegel/ Genotyp

Bei der Zusammenstellung der residualen MCAD- Enzymaktivität der Patienten und deren C0- Plasmaspiegel zeigte sich ebenfalls keine Beziehung (Abbildung 6).

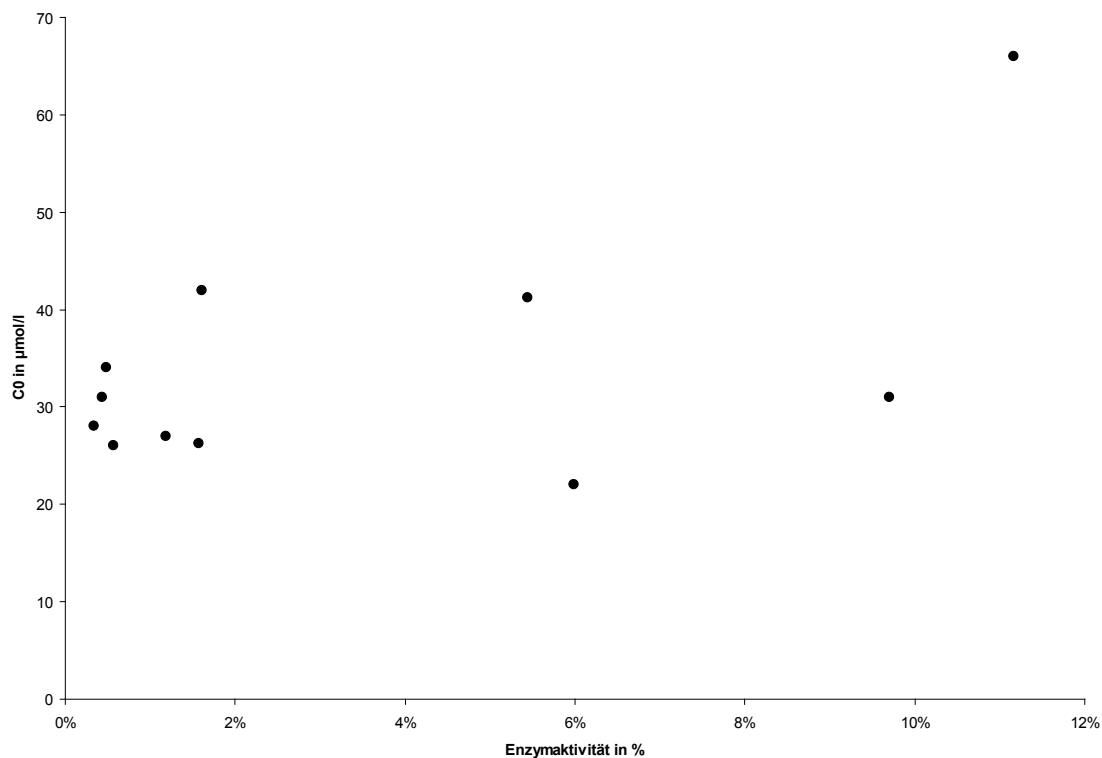


Abbildung 6: Korrelation C0- Plasmaspiegel/ Enzymaktivität

Octanoyl- Carnitin im Screening

Das C8:0 Carnitin war bei allen Patienten im Screening erhöht. Es fiel eine sehr große Spannweite auf (C8:0 lag zwischen 0,9µmol/l und 35,65µmol/l). Die mittlere C8:0- Konzentration im Trockenblut betrug 8,55µmol/l.

Bei der Korrelation der C8:0- Werte mit den Ergebnissen der genetischen Analyse zeigte sich, dass für die prävalente Mutation homozygote Patienten tendenziell ein höheres C8:0 hatten als Patienten mit als mild beschriebenen Genotypen (Abbildung 7). Alle Kinder mit einem Octanoylcarnitin > 8µmol/l waren entweder homozygot für die prävalente Mutation, wiesen eine Nullmutation homozygot (245insT/245insT) oder eine Compound Heterozygotie für 985A>G/245insT auf. Die Patienten mit dem Genotyp 985A>G/199T>C zeigten ein C8:0 unter 5µmol/l. In diesem Bereich fanden sich auch die Kinder mit 799G>A/799G>A, 157C>T/157C>T und 985A>G/616C>T.

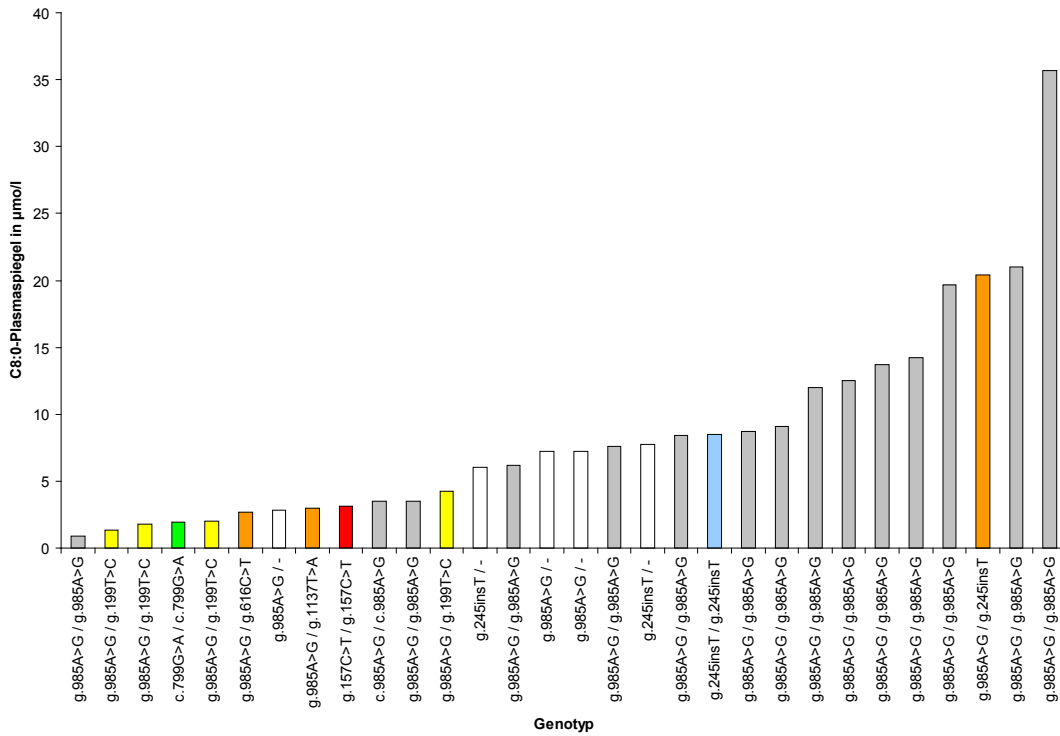


Abbildung 7: Korrelation C8:0- Plasmaspiegel/ Genotyp

Bei der Korrelation der residualen MCAD- Enzymaktivität mit den Messwerten des C8:0 aus dem Screening konnte ein deutlicher Zusammenhang herausgestellt werden. Je niedriger die Restaktivität, desto höhere Werte wurden für das Octanoylcarnitin gemessen (Abbildung 8).

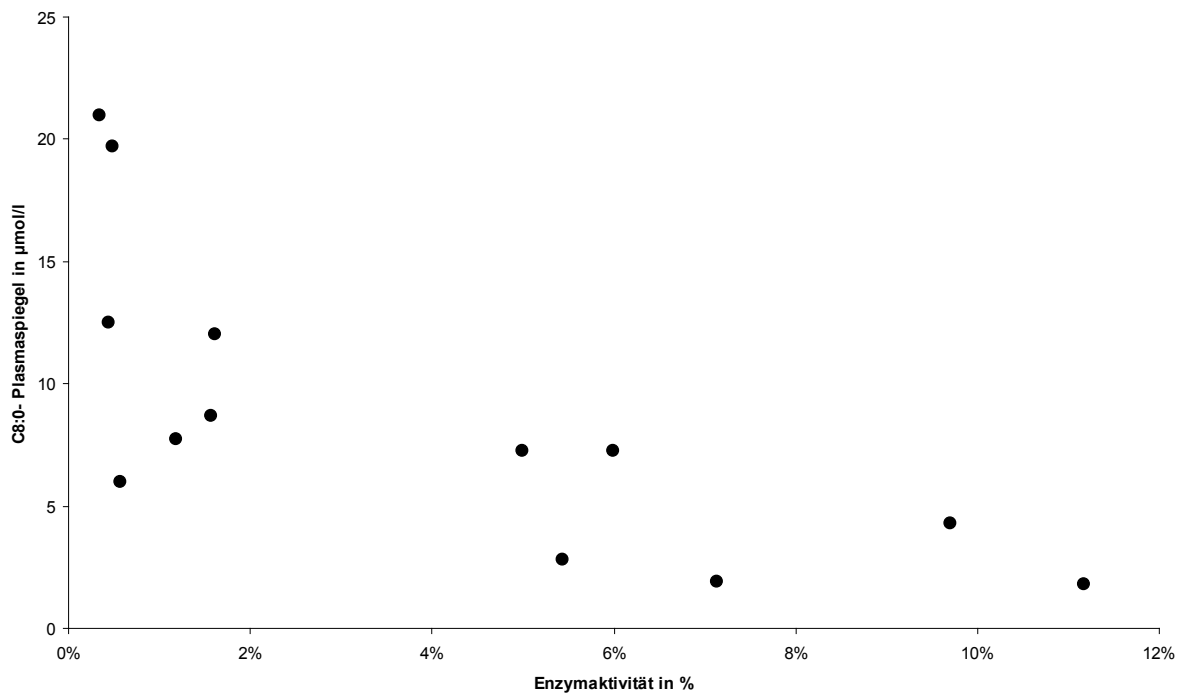


Abbildung 8: Korrelation C8:0- Plasmaspiegel/ Enzymaktivität

Decanoyl- Carnitin im Screening

Die vorliegenden C10:0- Werte lagen zwischen 0,4 μ mol/l und 2,88 μ mol/l (mittlerer C10:0- Plasmaspiegel 0,98 μ mol/l). Auch hier wurde der Zusammenhang des C10:0 mit den Resultaten der molekulargenetischen Untersuchung und den Messungen der Octanoylcarnitin- Oxidation untersucht (Abbildung 9). Hierbei zeigte sich, dass zwar alle Neugeborenen ein erhöhtes C10:0 aufwiesen, dass es aber zwischen den Genotypen und den C10:0- Plasmacarnitinspiegeln keinen deutlichen Zusammenhang gibt. Die höchsten C10:0- Werte fanden sich bei Kindern mit dem Genotyp 985A>G/985A>G, allerdings gab es auch Patienten mit diesem molekulargenetischem Befund, die sich im mittleren und unteren Bereich der Range fanden. Die Patienten mit 799A>G/799A>G, 157C>T/157C>T und 985A>G/616C>T wiesen Werte im unteren Bereich auf. Kinder mit der 199T>C- Mutation zeigten C10:0- Werte im mittleren und oberen Teil des gemessenen Spektrums.

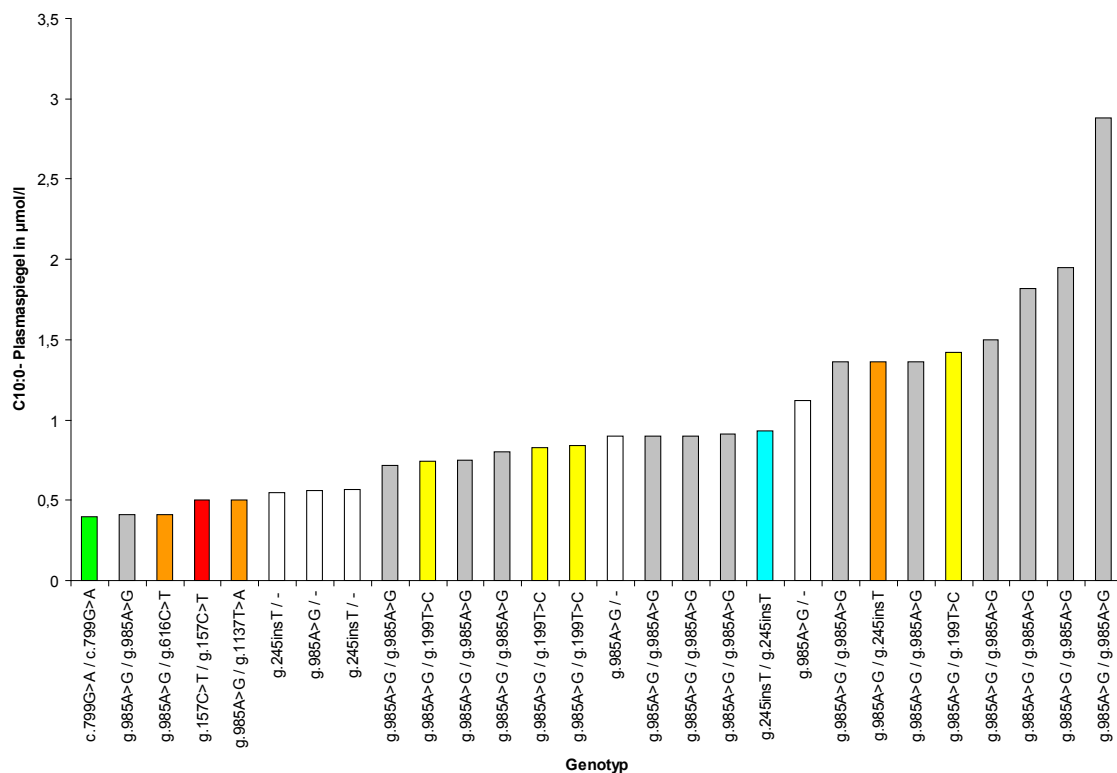


Abbildung 9: Korrelation C10:0- Plasmaspiegel/ Genotyp

Bei der Korrelation der C10:0- Plasmaspiegel mit der residualen MCAD- Enzymaktivität war kein Zusammenhang erkennbar (Abbildung 10).

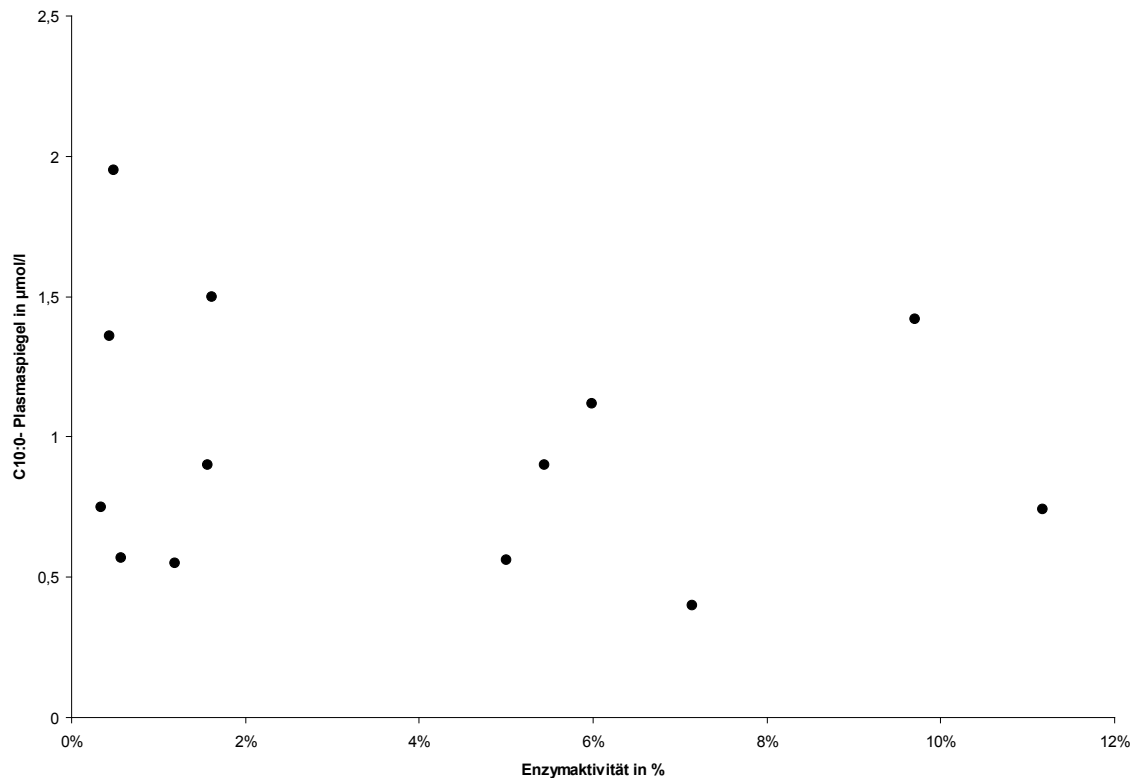


Abbildung 10: Korrelation C10:0- Plasmaspiegel/ Enzymaktivität

C8:0/ C10:0 im Screening

Aus den vorhandenen C8:0- und C10:0- Werten konnte für 28 Kinder der Quotient C8:0/C10:0_berechnet werden.

Alle Patienten mit einem C8:0/C10:0 > 7 waren entweder homozygot für die prävalente Mutation oder wiesen eine Nullmutation auf (985A>G/245insT, 245insT/245insT). Allerdings lagen auch drei der Patienten, bei denen nur eine Mutation gefunden wurde, in diesem Bereich. Ihre Restaktivitäten betragen 0,57%, 1,19% und 5%. Alle Patienten mit 985A>G/199T>C hatten eine C8:0/C10:0- Ratio unter 4 (Abbildung 11).

Acylcarnitine im zeitlichen Verlauf:

Die Acylcarnitine wurden ebenfalls im Verlauf betrachtet. Dabei wurden ein Wert am Ende des vollendeten ersten Lebensjahres erhoben und alle Messungen darüber hinaus bis zum Ende des Betrachtungszeitraums im Oktober 2008 (Alter der Patienten zu diesem Zeitpunkt ein Monat bis 12 Jahre) in eine Kategorie „>1. Lebensjahr“ zusammengefasst.

Octanoyl- Carnitin im zeitlichen Verlauf

Dabei ließ sich feststellen, dass das C8:0 nicht bei allen Patienten konstant erhöht war. 8 Kinder zeigten im betrachteten Zeitraum (von Geburt bis zum Ende des Betrachtungszeitraums im Oktober 2008 (Alter der Kinder 1 Monat – 12 Jahre)) eine Normalisierung des C8:0. 4 dieser Patienten waren homozygot für die prävalente Mutation. Außerdem zeigten zwei Kinder den Genotyp 157C>T/157C>T, einer 985A>G/199T>C und einer 199T>C/1140insG.

Im ersten Lebensjahr wiesen die Kinder, die prävalent für die homozygote Mutation waren, C8:0- Werte zwischen 0,85µmol/l und 7,24µmol/l auf. Bei einem Patienten dieser Gruppe konnte ein Wert im Normbereich erhoben werden. Dagegen fand sich bei den Patienten mit der 199T>C- Mutation eine Erhöhung des C8:0 lediglich im Bereich von 0,45µmol/l und 0,9µmol/l. Die Kinder mit den milden Mutationen 799G>A, 157C>T und 616C>T zeigten Werte zwischen 0,44µmol/l und 2,57µmol/l (Tabelle 5, Abbildung 13 und 14).

Tabelle 5: C8:0-Plasmaspiegel im ersten Lebensjahr

Nr	Allel 1	Allel 2	C8	µmol/l			Median
1	g.985A>G	g.985A>G					
2	g.985A>G	-	2,51	1,72	0,94	2,7	1,97
3	g.985A>G	g.985A>G	4,55				4,55
4	g.985A>G	g.985A>G					
5	g.985A>G	g.985A>G	1,42	2,16	1,06		1,55
6	g.985A>G	g.985A>G	2,30	3,04	0,53		1,96
7	c.985A>G	c.985A>G	7,24	2,09			4,67
8	g.985A>G	g.985A>G	3,05				3,05
9	g.985A>G	-	1,48	0,88			1,18
10	g.245insT	-	1,60	0,68			1,14
11	g.245insT	-					
12	g.985A>G	g.985A>G	1,48				1,48
13	g.157C>T	g.157C>T	1,65	0,9	0,79		1,11
14	g.985A>G	g.985A>G	3,40	3,5	3,5	5,2	3,9
15	g.985A>G	g.199T>C					
16	g.985A>G	g.985A>G	2,80	2,52			2,66
17	g.985A>G	-	1,59				1,59
18	g.985A>G	g.347G>A	4,76	1			2,88
19	g.985A>G	g.985A>G	3,13	1,29			2,21
20	g.985A>G	g.985A>G	0,85				0,85
21	g.985A>G	g.985A>G	1,10				1,1
22	g.157C>T	g.157C>T					
23	g.157C>T	g.157C>T					
24	g.985A>G	g.1137T>A	1,28	2,2	2,18		1,89
25	g.985A>G	g.985A>G	2,92				2,92
26	g.199T>C	g.1140insG	0,48	0,58			0,53
27	g.985A>G	g.245insT	2,50	2,5	4,02		3,01
28	g.985A>G	g.985A>G	2,18	3,29	3,8		3,09
29	g.245insT	g.245insT					
30	g.985A>G	g.985A>G	2,64	7,1			4,87

31	g.985A>G	g.199T>C	0,45			0,45
32	g.985A>G	g.985A>G	0,88	1,15	2,78	1,6
33	g.985A>G	g.199T>C				
34	g.985A>G	g.985A>G	n	2,91		2,91
35	c.799G>A	c.799G>A	2,57			2,57
36	g.985A>G	g.616C>T	0,82	0,44		0,63
37	g.985A>G	g.985A>G	2,80	3,40		3,1
38	g.985A>G	g.985A>G				
39	g.985A>G	g.985A>G	1,82	2,72		2,27
40	g.985A>G	g.985A>G	6,30	4,75		5,53
41	g.985A>G	g.199T>C	0,54	0,9	0,9	0,78

n= normwertig

Der Mittelwert wurde aus den pathologisch erhöhten Werten errechnet.

Mittelwert der für die prävalente Mutation homozygoten: 2,86µmol/l

Mittelwert der Patienten mit milden Mutationen: 1,01µmol/l

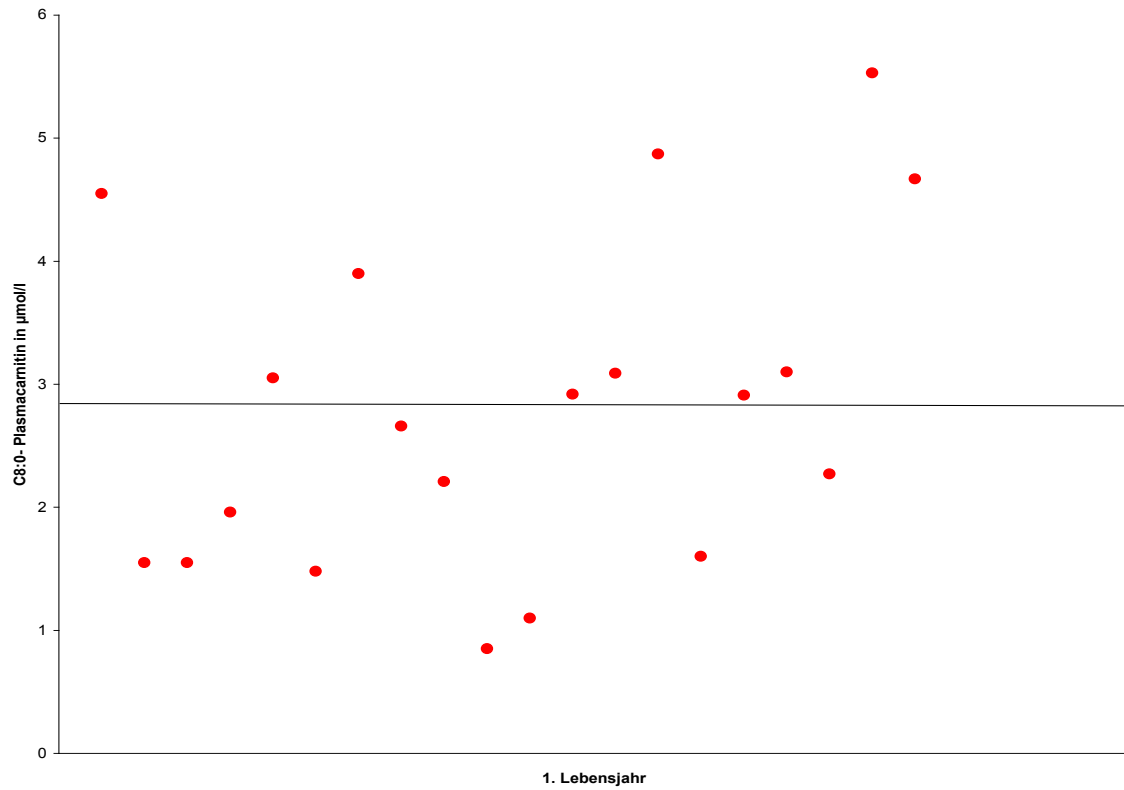


Abbildung 13: C8:0 im 1. Lebensjahr bei für die prävalente Mutation homozygoten Kindern
(bei Vorliegen mehrerer Messwerte eines Patienten wurde der Mittelwert verwendet)

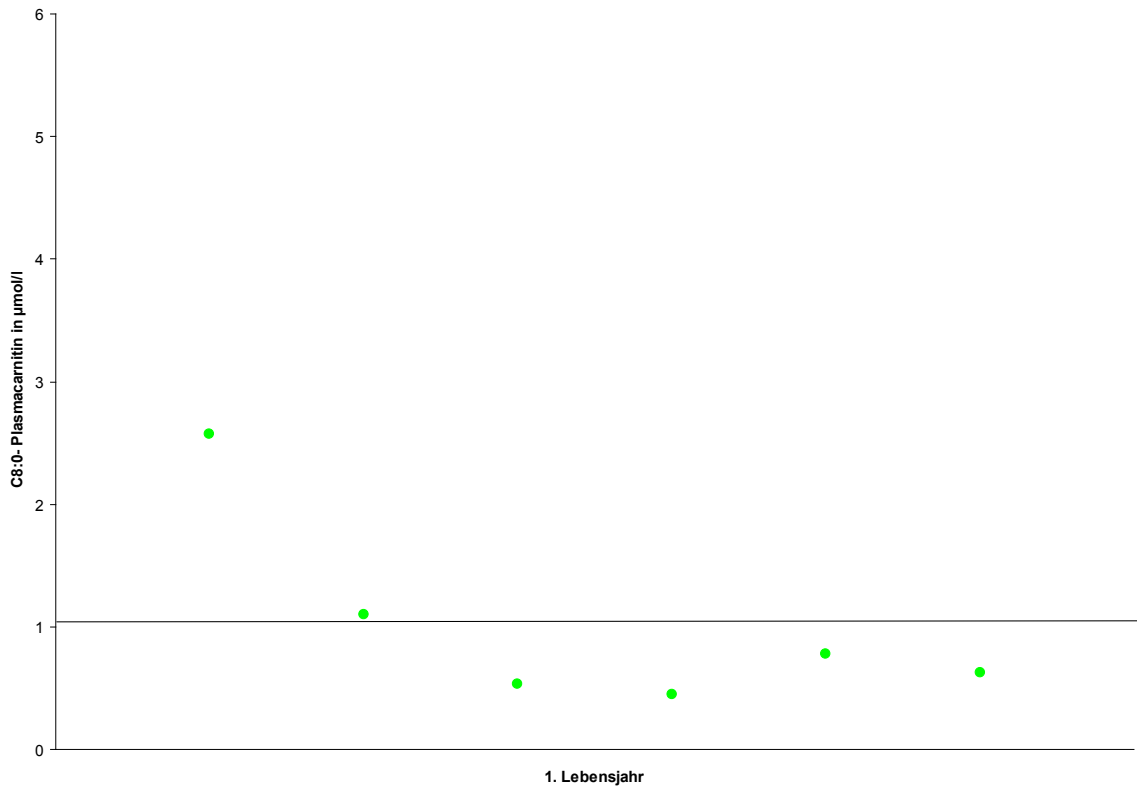


Abbildung 14: C8:0 im 1. Lebensjahr bei Kindern mit milden Mutationen (199T>C, 799G>A, 157C>T, 616C>T)
(bei Vorliegen mehrerer Messwerte eines Patienten wurde der Mittelwert verwendet)

Über das erste Lebensjahr hinaus wurden für die Patienten mit dem Genotyp 985A>G/985A>G Werte zwischen 0,47µmol/l und 4,81µmol/l gemessen. Drei Kinder zeigten an einem der Messpunkte ein C8:0 im Normbereich (Tabelle 6, Abbildung 15). Bei Patienten mit mildereren Mutationen wie 799G>A, 157C>T, 616C>T und 199T>C zeigte sich ein C8:0 zwischen 0,41µmol/l und 2,28µmol/l (Tabelle 6, Abbildung 16). Auch in dieser Gruppe fiel eine Normalisierung des C8:0 bei drei Patienten auf.

Tabelle 6: C8:0- Plasmaspiegel > 1. Lebensjahr

Nr	Allel 1	Allel 2	C8	µmol/l				Median
1	g.985A>G	g.985A>G	1,55	n				1,55
2	g.985A>G	-						
3	g.985A>G	g.985A>G						
4	g.985A>G	g.985A>G	1,79					1,79
5	g.985A>G	g.985A>G						
6	g.985A>G	g.985A>G	0,6					0,6
7	c.985A>G	c.985A>G						
8	g.985A>G	g.985A>G						
9	g.985A>G	-						
10	g.245insT	-						
11	g.245insT	-	2,55	1,64	6,44			3,54
12	g.985A>G	g.985A>G	1,81	3,23	1,37	n	0,77	1,79
13	g.157C>T	g.157C>T	0,41	n				0,41
14	g.985A>G	g.985A>G	2,98					2,98
15	g.985A>G	g.199T>C						
16	g.985A>G	g.985A>G	1,6	2,59	1,64	1,86	0,94	1,72
17	g.985A>G	-	1,13					1,13
18	g.985A>G	g.347G>A	5,57					5,57
19	g.985A>G	g.985A>G						
20	g.985A>G	g.985A>G						
20	g.985A>G	g.985A>G						
21	g.985A>G	g.985A>G						
22	g.157C>T	g.157C>T	n	0,66				0,66
23	g.157C>T	g.157C>T	0,68					0,68
24	g.985A>G	g.1137T>A						
25	g.985A>G	g.985A>G						
26	g.199T>C	g.1140insG	0,54	n				0,54
27	g.985A>G	g.245insT	1,81					1,81
28	g.985A>G	g.985A>G	3,54					3,54
29	g.245insT	g.245insT						
30	g.985A>G	g.985A>G	1,48					1,48
31	g.985A>G	g.199T>C						
32	g.985A>G	g.985A>G	0,47					0,47
33	g.985A>G	g.199T>C						
34	g.985A>G	g.985A>G						
35	c.799G>A	c.799G>A	1,9	1,08				1,49
36	g.985A>G	g.616C>T	2,28					2,28
37	g.985A>G	g.985A>G	4,81	3,9	1,49	n		3,4
38	g.985A>G	g.985A>G						
39	g.985A>G	g.985A>G	1,24	2,88	4,43			2,85
40	g.985A>G	g.985A>G	1,58					1,58
41	g.985A>G	g.199T>C	0,45					0,45

n= normwertig

Der Mittelwert wurde aus den pathologisch erhöhten Werten errechnet.

Mittelwert der für die prävalente Mutation homozygoten: 1,98µmol/l

Mittelwert der Patienten mit milden Mutationen: 0,93µmol/l

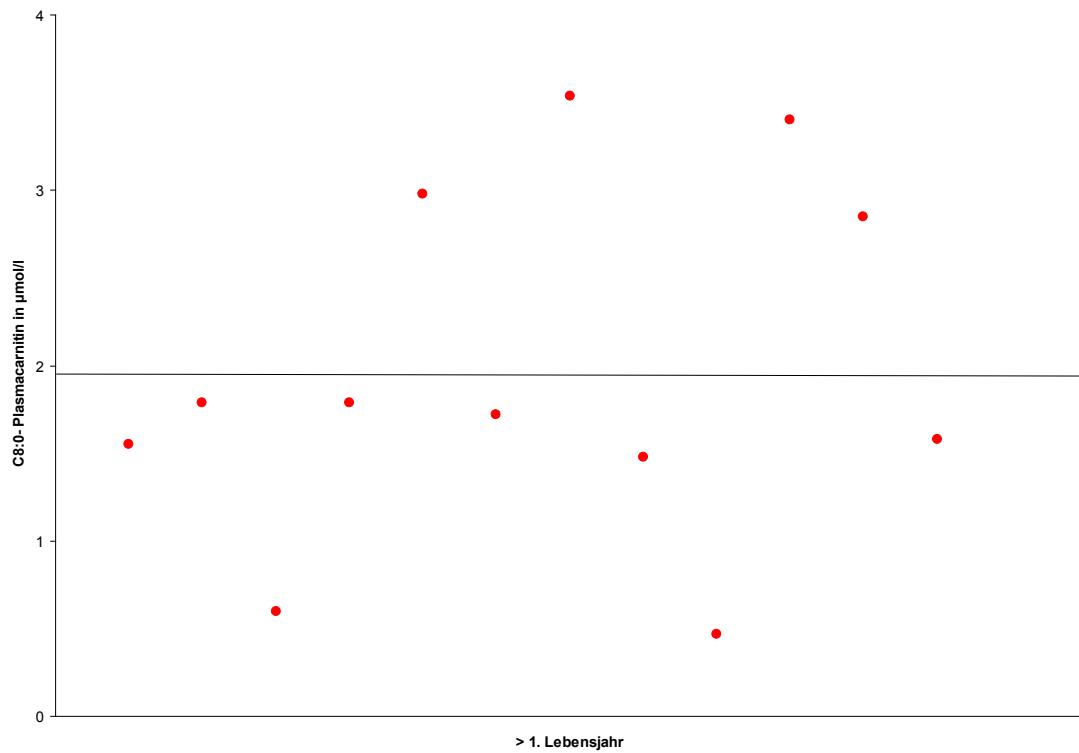


Abbildung 15: C8:0 nach dem 1. Lebensjahr bei für die prävalente Mutation homozygoten Kindern
(bei Vorliegen mehrerer Messwerte eines Patienten wurde der Mittelwert verwendet)

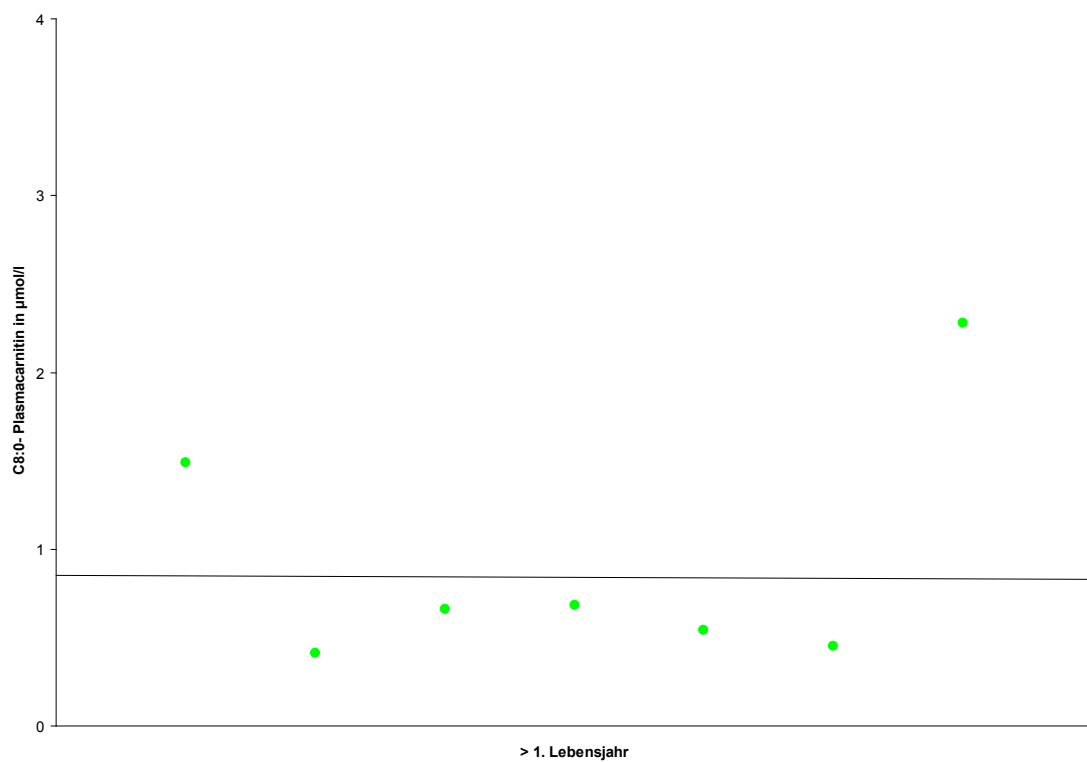


Abbildung 16: C8:0 nach dem 1. Lebensjahr bei Kindern mit milden Mutationen (199T>C, 799G>A, 616C>T, 157C>T)
(bei Vorliegen mehrerer Messwerte eines Patienten wurde der Mittelwert verwendet)

Zusammenfassend fiel auf, dass es im Verlauf zu einer Normalisierung des C8:0 kommen konnte und dass tendenziell Patienten mit mildem Genotyp einen niedrigeren C8:0- Plasmaspiegel aufwiesen.

Decanoyl- Carnitin im zeitlichen Verlauf

Das C10:0 wurde bei 31 Kindern in einem Intervall von 2-3 Wochen nach der Geburt erneut bestimmt und lag bei drei Patienten im Normbereich. Alle anderen Patienten wiesen ein erhöhtes C10:0 auf. Im ersten Lebensjahr und darüber hinaus wurde das Decanoylcarnitin ebenfalls bestimmt und war bei der Mehrheit der Patient unabhängig vom molekulargenetischen Befund erhöht.

Freies Carnitin im zeitlichen Verlauf

Die Messwerte für das freie Carnitin wurden ebenfalls im weiteren Verlauf quantitativ betrachtet. Dabei wurden zudem klinischen Daten hinzugezogen. Hier war vor allem von Bedeutung, ob eine Supplementierung mit Carnitin erfolgte.

Von 39 der 41 Patienten lagen Messwerte des C0 vor. Dabei war das freie Carnitin bei 25 Kindern im gesamten betrachteten Zeitraum im Normbereich. Folglich fand sich bei 14 Kindern ein erniedrigtes freies Carnitin. 9 dieser Patienten waren homozygot für die prävalente Mutation. Außerdem fanden sich in dieser Gruppe folgenden Genotypen: 985A>G/-, 245insT/-, 157C>T/157C>T, 985A>G/347G>A, 199C>T/1140insG (Tabelle 7).

Von diesen 14 erhielten 3 Kinder eine Substitution.

1.) Bei Patient 11 (245insT/-) wurde im Alter von 2 Jahren und 5 Monaten eine niedriges Carnitin festgestellt und daraufhin mit einer Substitutionsbehandlung begonnen. Die Dosis lag bei 32mg pro kg Körpergewicht pro Tag. Fünf Monate später lag das freie Carnitin wieder im Normbereich.

2.) Bei Patient 16 (985A>G/985A>G) wurde die Supplementierung nach einem Wert unterhalb der Norm im 6. Lebensmonat mit einer Dosis von 30mg/ kg Körpergewicht (KG)/ Tag begonnen. Hier allerdings blieb das Carnitin trotz Substitution niedrig. Erstmals im Normbereich lag es im Alter von 3 Jahren. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Carnitin nur noch bei Bedarf gegeben. Im 5. Lebensjahr wurde es erneut erniedrigt gemessen.

3.) Das dritte Kind war homozygot für die prävalente Mutation. Eine Carnitin-Supplementierung in einer Dosis von 30- 40mg/ kg wurde prophylaktisch ohne Vorliegen eines erniedrigten freien Carnitins begonnen. Nach Beendigung der Substitutionsbehandlung im fünften Lebensjahr wurde erstmals ein erniedrigtes freies Carnitin gemessen. Klinisch zeigten sich keine Auffälligkeiten.

Bei den anderen 11 Patienten, die eine erniedrigtes freies Carnitin aufwiesen und keine Substitution erhielten, trat der Abfall zwischen dem 9. Lebenstag und 6. Lebensjahr auf. In zwei Fällen wurde wiederholt eine Erniedrigung gemessen (Abbildung 17). Bei vier der Patienten lag das freie Carnitin bei der nächsten Messung auch ohne Substitutionsbehandlung wieder im Normbereich (Pat. 2 mit 985A>G/ -, Pat. 18 985A>G/ 347G>A, Pat. 20 985A>G/985A>G, Pat. 32 985A>G/ 985A>G).

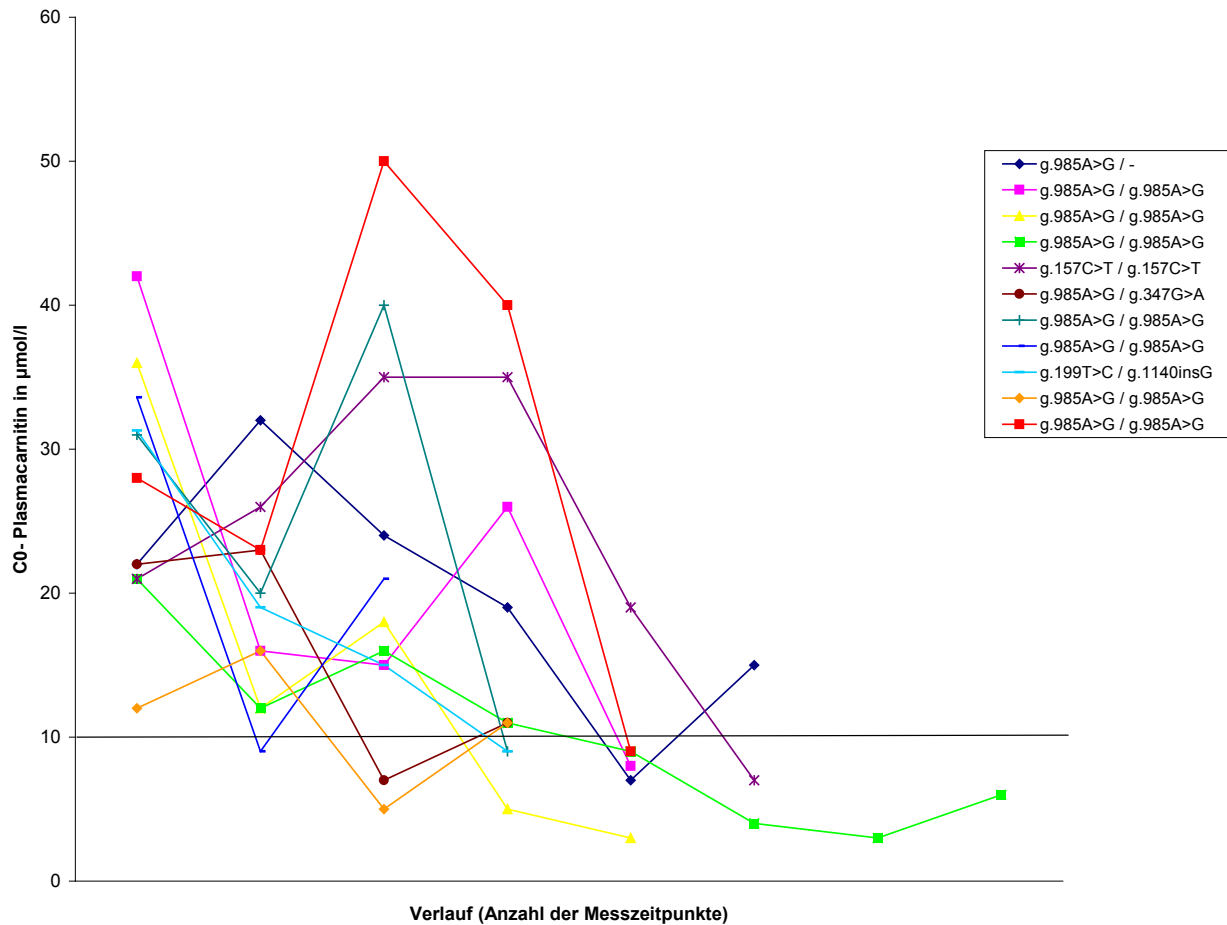


Abbildung 17: Freies Carnitin im Verlauf bei Patienten ohne Substitutionsbehandlung, bei denen ein erniedrigtes C0 gemessen wurde.

Insgesamt erfolgte die Therapie mit Carnitin in 7 Fällen, von denen 2 – wie oben bereits beschrieben – ein erniedrigtes C0 vor Therapiebeginn aufwiesen. Bei 5 Patienten lag der C0- Wert bei Therapiebeginn im Normbereich. Bei einem Patienten wurde nach Absetzen der Therapie ein erniedrigtes C0 gemessen (Abbildung 18).

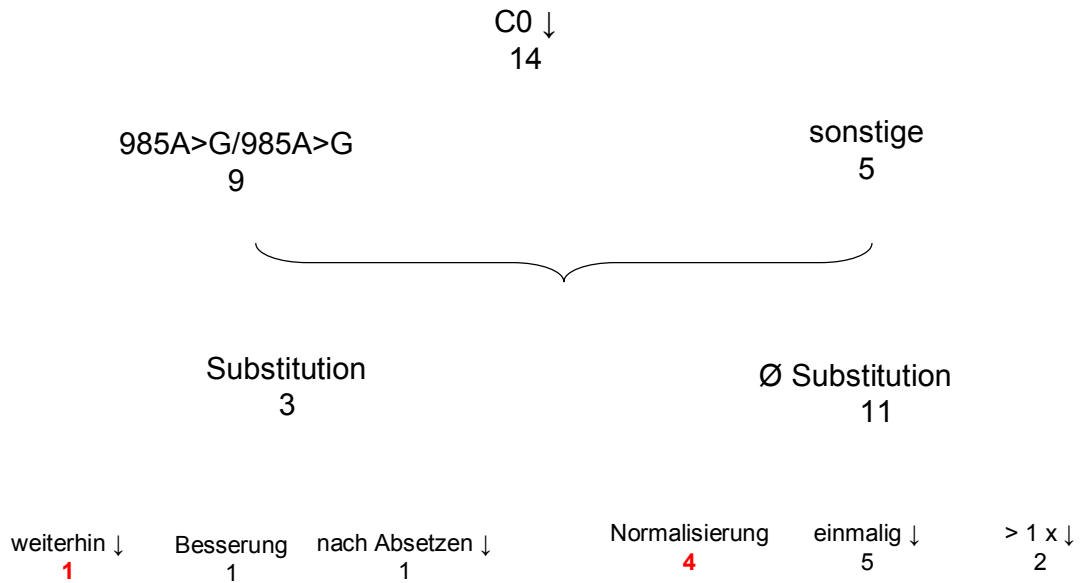


Abbildung 18: Überblick freies Carnitin

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Gruppe der Patienten, die homozygot für die prävalente Mutation waren, von insgesamt 21 Kindern nur bei 9 ein erniedrigtes freies Carnitin gemessen wurde (entspricht 42,8%). Von den Patienten (insgesamt 9), die milde Mutationen (157C>T, 799G>A, 199T>C, 616C>T) aufweisen, konnte bei zweien ein erniedrigter Wert gemessen werden (entspricht 22,2%).

Tabelle 7: Freies Carnitin im Verlauf in µmol/l

Nr.	Allel 1	Allel 2	Sub									
1	g.985A>G	g.985A>G	Ø	43	31	16						
2	g.985A>G	-	Ø	22	32	24	19	7	15			
3	g.985A>G	g.985A>G	Ø	41	33	14						
4	g.985A>G	g.985A>G	Ø	11								
5	g.985A>G	g.985A>G	Ø	42	16	15	26	8				
6	g.985A>G	g.985A>G	Ø	36	12	18	5	3				

7	g.985A>G	g.985A>G	∅	19	19							
8	g.985A>G	g.985A>G	∅	39	33	33						
9	g.985A>G	-	∅	41,2	25	16	12					
10	g.245insT	-	∅	26	20	17	10					
11	g.245insT	-	√	27	11	16	10	8	12			
12	g.985A>G	g.985A>G	∅	21	12	16	11	9	4	3	6	
13	g.157C>T	g.157C>T	∅	21	26	35	35	19	7			
14	g.985A>G	g.985A>G	√	21	21	27	27	22	23	24		
15	g.985A>G	g.199T>C	∅	31	12							
16	g.985A>G	g.985A>G	√	26,3	16	6	8	9	3	11	8	5
17	g.985A>G	-	∅	23	19	10						
18	g.985A>G	g.347G>A	∅	22	23	7	11					
19	g.985A>G	g.985A>G	∅	31	20	40	9					
20	g.985A>G	g.985A>G	∅	33,6	9	21						
21	g.985A>G	g.985A>G	√	40	28	20	21					
22	g.157C>T	g.157C>T	∅	38	21	23						
23	g.157C>T	g.157C>T										
24	g.985A>G	g.1137T>A	∅	51	48	32	11	25				
25	g.985A>G	g.985A>G	∅	30	11	12						
26	g.1140insG	g.199T>C	∅	31,3	19	15	9					
27	g.985A>G	g.245insT	√	28	17	14	23	11				
28	g.985A>G	g.985A>G	∅	41	15	16	12	15	14			
29	g.245insT	g.245insT	∅	48	28							
30	g.985A>G	g.985A>G	∅	34	17	15	10	17				
31	g.985A>G	g.199T>C	∅	46	22	18						
32	g.985A>G	g.985A>G	∅	12	16	5	11					
33	g.985A>G	g.199T>C	∅	24	12							
34	g.985A>G	g.985A>G	∅	51	36	50						
35	g.799G>A	g.799G>A	∅	20	29	24	12					
36	g.985A>G	g.616C>T	∅	24	20	28	12	10				

37	g.985A>G	g.985A>G	√	28	25	24	26	8	5			
38	g.985A>G	g.985A>G										
39	g.985A>G	g.985A>G	√	14	51	21	12	15	17			
40	g.985A>G	g.985A>G	∅	28	23	50	40	9				
41	g.985A>G	g.199T>C	∅	66	44	62	62	31				

Sub= Substitution mit Carnitin; ∅= keine Substitution erfolgt; √= Carnitingabe erfolgt

Rot markiert → erniedrigtes freies Carnitin

Von Patient 23 und 38 lagen keine Werte vor

3.4 Organische Säuren

Von 31 der 41 Patienten wurden die organischen Säuren im Urin bei einer der Vorstellungen in der Stoffwechselambulanz bestimmt. Die Kinder waren zum Zeitpunkt der Analyse zwischen 8 Tage und 8 Jahre alt. Es wurde besonders auf die MCAD- typischen Metabolite Suberinsäure, Adipinsäure und Hexanoylglycin geachtet. Die Daten wurden qualitativ und nicht quantitativ ausgewertet.

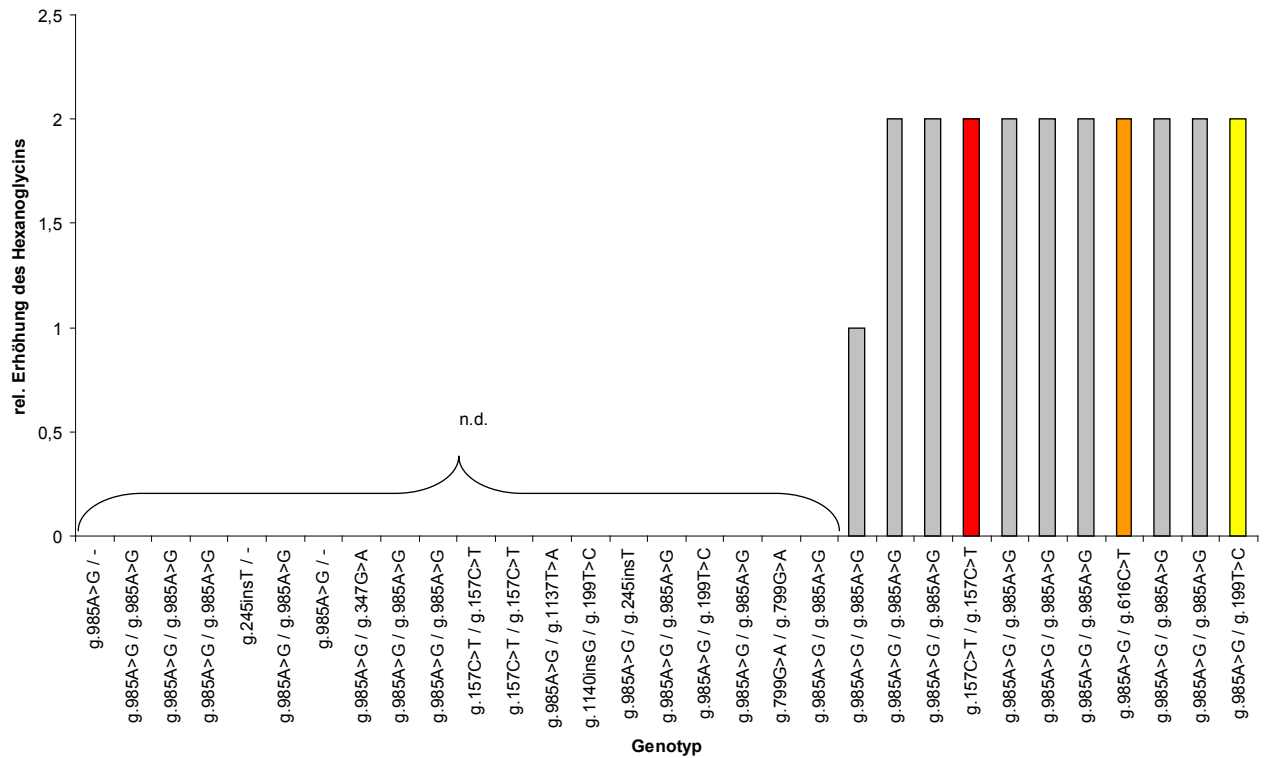
Keiner der drei Metabolite war bei allen Patienten erhöht. 4 Patienten wiesen einen Normalbefund auf (Patient 22 mit 157C>T/157C>T, Patient 23 mit 157C>T/157C>T, Patient 24 mit 985A>G/1137T>A und Patient 26 1140insG/199T>C).

Eine Erhöhung aller drei organischen Säuren im Urin wurde bei 6 Patienten gefunden. Davon waren 4 homozygot für die prävalente Mutation. Ein Patient hatte den Genotyp 985A>G/616C>T und einer war homozygot für 157C>T (Patient 13). Von den 15 Patienten, die eine Erhöhung zweier Metabolite zeigten, waren 10 homozygot für 985A>G. Bei den verbliebenen 6 Patienten konnte lediglich der Anstieg eines Metaboliten festgestellt werden (3 mit dem Genotyp 985A>G/985A>G).

Bezogen auf die einzelnen Mutationen kann man sagen, dass von den drei Patienten mit dem Genotyp 157C>T/157C>T zwei einen Normalbefund aufwiesen, wohingegen bei dem dritten Patienten alle drei Metabolite im Urin erhöht waren. Von drei Patienten mit der milden 199C>T- Mutation lagen Befunde vor, in einem Fall handelte es sich um einen Normalbefund. Ein Kind wies eine einfache Erhöhung von Adipinsäure und Hexanoylglycin auf, der dritte Patient eine einfache Erhöhung der Adipinsäure.

Hexanoylglycin

Hexanoylglycin war bei 11 Kindern erhöht. Im Vergleich der drei untersuchten Metabolite zeigte sich hier die geringste Ausscheidung. Die Werte waren im Vergleich zum Normwert nur einfach, bei einem Patienten (Patient 3 985A>G/985A>G) sogar nur leicht erhöht. 8 dieser Patienten waren homozygot für die prävalente Mutation, 2 wiesen neben der prävalenten eine andere Mutation auf (199T>C bzw. 616C>T) und einer war homozygot für 157C>T. Ein Zusammenhang zwischen der jeweiligen Mutation und der Höhe der Ausscheidung dieses Metaboliten über die Niere war nicht feststellbar. Darauf weist auch die Tatsache hin, dass unter den 20 Kindern ohne eine Erhöhung dieses Metaboliten alle Genotypen vertreten waren (Abbildung 19).



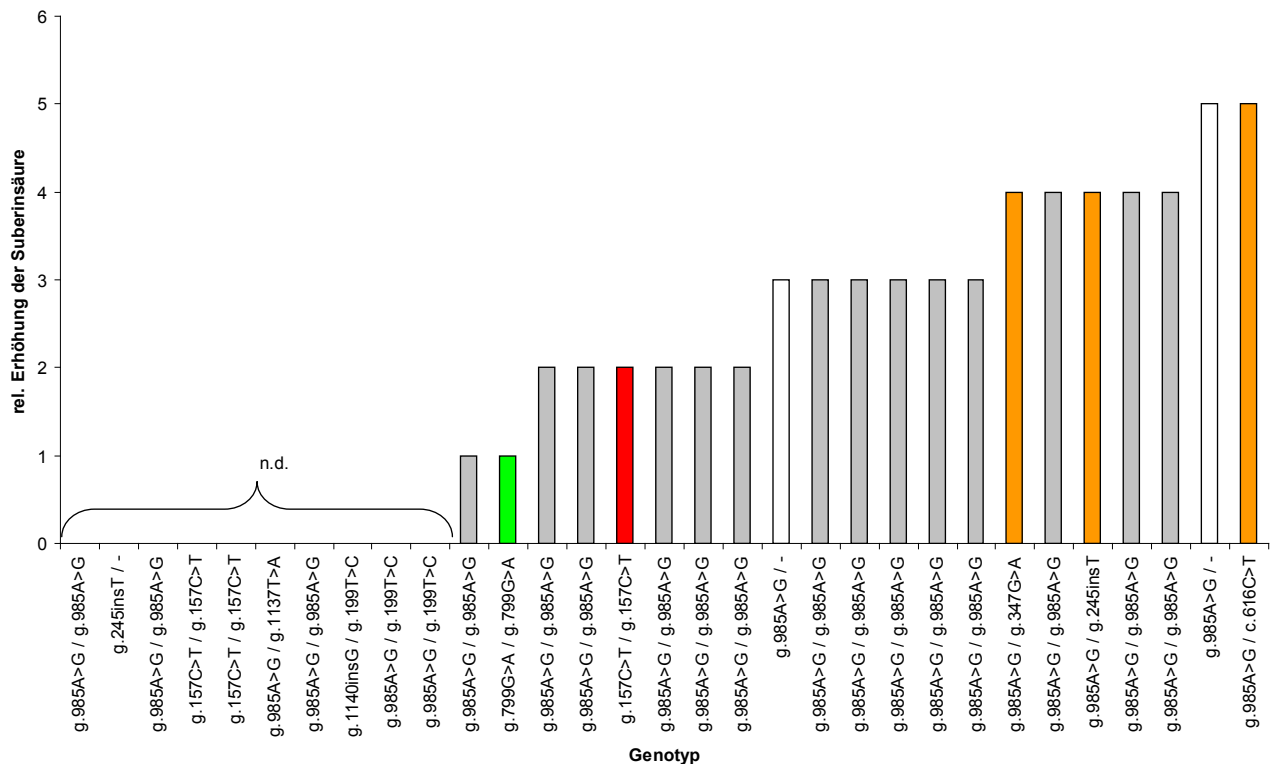
n.d.= nicht detektierbar

1= leicht erhöht, 2= einfach erhöht

Abbildung 19: Korrelation Hexanoylglycin im Urin/ Genotyp

Suberinsäure

Die deutlichsten Abweichungen vom Normwert fanden sich bei der Messung der Suberinsäure, welche bis zu vierfach angestiegen war. Eine Erhöhung dieses Metaboliten fand sich bei 21 Kindern. Von diesen waren 14 homozygot für die prävalente Mutation. Die höchsten Werte fanden sich bei Patient 17 (985A>G/ -) und bei Patient 36 (985A>G/616C>T). Nur leicht erhöht war die Suberinsäure hingegen bei 2 Patienten (985A>G/985A>G, 799G>A/799G>A). Es scheint kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem Anstieg dieses Metaboliten im Urin zu bestehen, da sich Patienten mit dem Genotyp 985A>G/985A>G sowohl unter denen mit dreifacher Erhöhung als auch bei den Kindern mit nur leichtem Anstieg oder Normalbefund fanden. Des Weiteren zeigten zwei der Kinder mit 157C>T/157C>T einen Normalbefund, während der dritte Patient mit diesem molekulargenetischen Befund eine einfache Erhöhung zeigte. Alle Kinder mit 199T>C wiesen bei der Betrachtung dieses Metaboliten normale Spiegel im Urin auf (Abbildung 20).



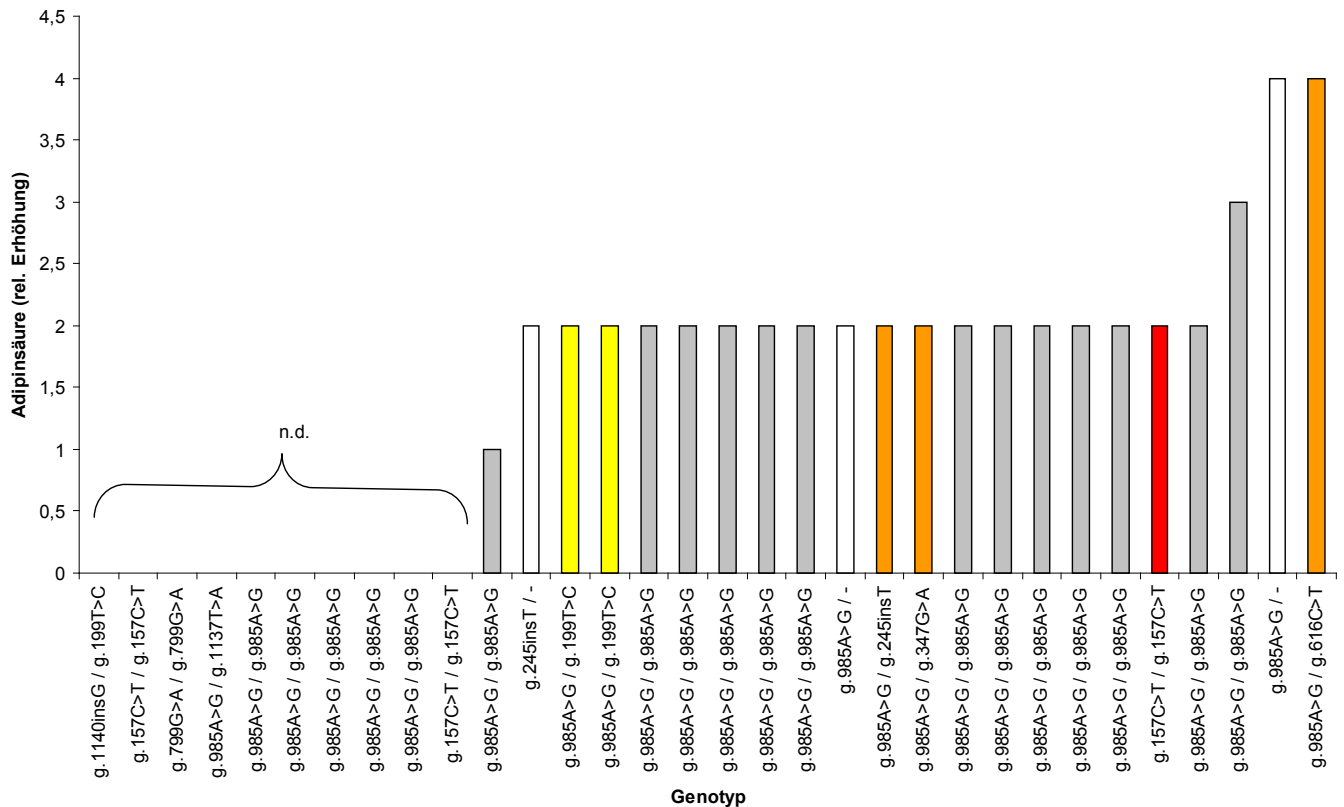
n.d.= nicht detektierbar

1= leicht erhöht, 2= einfach erhöht, 3= zweifach erhöht, 4= dreifach erhöht

Abbildung 20: Korrelation Suberininsäure im Urin/ Genotyp

Adipinsäure

Die Adipinsäure wurde bei 22 der 31 untersuchten Kinder im Urin vermehrt ausgeschieden. Davon waren 13 homozygot für die prävalente Mutation. Die höchsten Werte (das dreifache der Norm) zeigten sich hier bei denselben Patienten, bei denen auch die Suberininsäure am stärksten erhöht war (Patient 16 985A>G/-, Patient 36 985A>G/616C>T). Nur eine leichte Ausscheidung von Adipinsäure fand sich hingegen im Urin von Patient 12 (985A>G/985A>G). Bei allen anderen Kindern zeigte sich eine einfache Erhöhung (außer bei Patient 30 985A>G/985A>G – zweifach). Hierunter waren sowohl Kinder mit dem Genotyp 985A>G/985A>G als auch die mit 985A>G/199T>C, eins mit 157C>T/157C>T und zwei weitere, die neben der prävalenten noch eine andere Mutation aufwiesen (245insT bzw. 347G>A). Zusammenfassend ließ sich auch hier keine Zusammenhang zwischen molekulargenetischem Befund und Ausscheidung von Adipinsäure feststellen (Abbildung 21).



n.d. = nicht detektierbar

1= leicht erhöht, 2= einfach erhöht, 3= zweifach erhöht, 4= dreifach erhöht

Abbildung 21: Korrelation Adipinsäure im Urin/ Genotyp

3.5 Körperliche Entwicklung

Von 38 der insgesamt 41 untersuchten Kinder standen Daten bezüglich der körperlichen Entwicklung zur Verfügung. Die Informationen wurden aus den Ambulanzakten der Kinderklinik der Uniklinik Düsseldorf gewonnen. Zum Zeitpunkt der letzten Vorstellung waren die Patienten zwischen 1 Monat und 12 Jahren alt, davon 14 Mädchen und 24 Jungen.

Geburt:

Informationen über das **Gewicht** bei Geburt lagen von 34 Patienten vor. Bei Geburt zwischen der 37.-40.Schwangerschaftswoche lag es im Mittel bei 3481,9 g (2410- 4700g). Insgesamt lagen 22 Kinder oberhalb der 50. Perzentile, davon waren 10 homozygot für die prävalente Mutation. Am leichtesten war Patient 33 (985A>G/199T>C) mit 2410g und am schwersten Patient 29 (245insT/ 245insT) mit 4700g. Patient 33 war damit auch das einzige Kind, welches sich auf der 3. Perzentile befand und Patient 29 das einzige mit einem Gewicht über der 97. Perzentile. Es fiel auf, dass die Kinder, die homozygot für die prävalente Mutation waren, über den gesamten Gewichtsbereich bis zu 4010g vertreten waren. Auch in Bezug auf die vier Patienten mit dem Genotyp 985A>G/199T>C ließ sich dies feststellen (2410g, 3100g, 3660g, 4150g).

Es lässt sich abschließend sagen, dass kein Zusammenhang zwischen der Mutation und dem Geburtsgewicht besteht (Abbildung 22).

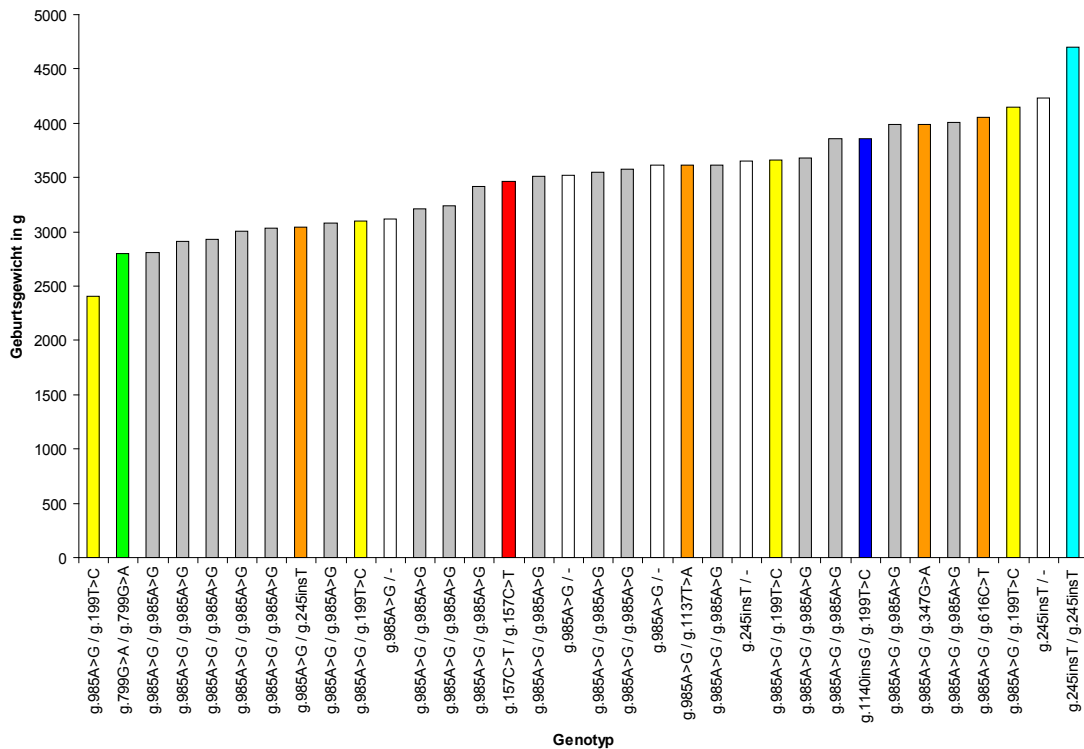


Abbildung 22: Korrelation Geburtsgewicht/ Genotyp

Eine Angabe zur **Geburtslänge** lag von 30 Patienten vor, wobei sie im Mittel 52cm betrug (46- 58cm). 26 Kinder lagen über der 50. Perzentile, 14 davon waren homozygot für die prävalente Mutation. Nur ein Kind lag unter- bzw. innerhalb der 3. Perzentile und war damit am kleinsten (Pat.33 985A>G/ 199T>C). Am größten war Patient 29 (245insT/ 245insT) mit 58cm. Bei Kind 29 wurde ein pränatal nicht nachgewiesener Gestationsdiabetes der Mutter für die Körpermaße verantwortlich gemacht. Wie auch beim Gewicht gab es eine breite Verteilung der für die prävalente Mutation homozygoten Patienten bis hin zu 55cm (Abbildung 23) . Kinder mit dem Genotyp 985A>G/199T>C fanden sich im gesamten Messbereich (46cm, 52cm, 56cm, 56cm).

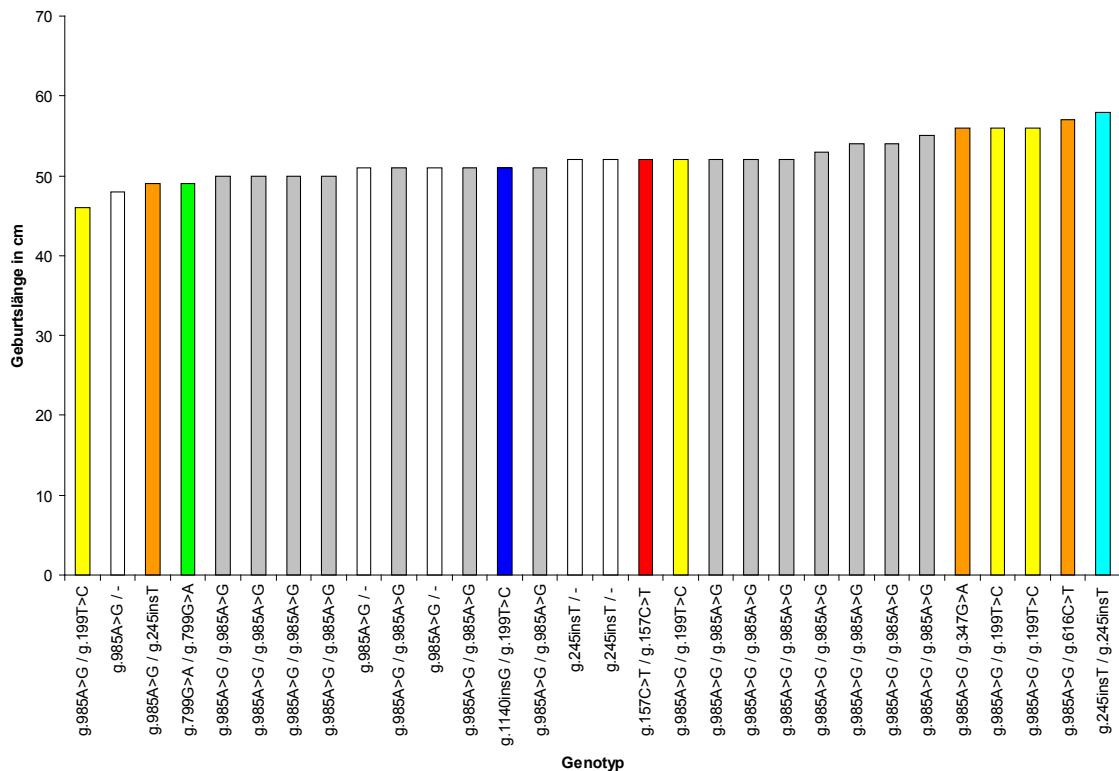


Abbildung 23: Korrelation Geburtslänge/ Genotyp

Weiterer Verlauf:

Im weiteren Verlauf wurde die körperliche Entwicklung bei vollendetem erstem Lebensjahr und beim Zeitpunkt der letzten Vorstellung erfasst.

Im Alter von einem Jahr wurden 7 Kinder in der Ambulanz gewogen. Das mittlere **Gewicht** betrug 10144,3g (6540- 13200g), 6 Patienten lagen über der 50. Perzentile.

Auch die **Körpergröße** wurde im Alter von einem Jahr nur bei 7 Kindern gemessen. Die mittlere Länge betrug 76,3cm (67- 81,8cm). Ein Verlauf oberhalb der 50. Perzentile zeigte sich bei 4 Patienten.

Mit Hilfe dieser Angaben lässt sich kein Zusammenhang zwischen den Genotypen und der körperlichen Entwicklung der Kinder im ersten Lebensjahr herstellen.

Aktuell konnten von 36 Kindern Gewicht und von 35 die Länge erfasst werden. Da die Kinder derzeit alle unterschiedlich alt sind, wurde bei der Auswertung nur auf die Perzentilen und deren Verlauf geachtet.

Es lagen 27 Kinder bezüglich des Gewichts und 25 bezogen auf die Länge über der 50. Perzentile. Kein Kind lag unter der 3. Perzentile. Es ließ sich anhand der Angaben bei der letzten Vorstellung kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp der Kinder und der körperlichen Entwicklung herstellen.

3.6 klinische und laborchemische Auffälligkeiten

Diese Informationen wurden den Akten entnommen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Anzahl der stationären Aufenthalte, Hypoglykämien, Transaminasenerhöhungen, neurologische Entwicklung und Carnitinsupplementierung gelegt. Bei zwei Kindern war eine Akteneinsicht nicht möglich.

Hypoglykämien

Von den 39 Kindern hatten 4 bisher eine manifeste Hypoglykämie, davon ein Kind mehrfach. Von den 4 Patienten waren 2 homozygot für 985A>G, einer homozygot für 799G>A und einer wies eine Nullmutation auf (985A>G/245insT). Das Kind, bei dem eine Unterzuckerung häufiger auftrat, hatte den Genotyp 985A>G/985A>G.

Die Unterzuckerungen ereigneten sich in diesem gescreenten Patientenkollektiv im Rahmen von Infekten der oberen Atemwege oder des Gastrointestinaltrakts, in deren Folge es zu einer unzureichenden Nahrungsaufnahme kam. Bei Kind 35 (799G>A/799G>A) trat die Hypoglykämie im Rahmen einer E.coli-Sepsis auf. In zwei Fällen zeigten sich im Rahmen der Hypoglykämie auch neurologische Auffälligkeiten (Apathie, von der Mutter beschrieben als „komisches Zeug geredet“). Bei keinem Kind wurden neurologische Folgeschäden beschrieben.

In einem weiteren Fall wurde eine fragliche Hypoglykämie (da nicht nachgewiesen, hier nicht zu den manifesten Hypoglykämien gezählt) von der Mutter beschrieben. Dieses Kind wies ebenfalls den molekulargenetischen Befund 985A>G/985A>G auf. Es starb im Alter von 8 Monaten offensichtlich während einer zu langen Nüchternperiode.

35 Kinder zeigten keine hypoglykämischen Episoden, von diesen 35 waren 17 homozygot für die prävalente Mutation. Auch die Kinder, die homozygot für 157C>T waren, und die, deren Genotyp die Mutation 199T>C enthält, gehörten in diese Gruppe.

Stationäre Behandlung

18 der 39 Kinder mussten im beobachteten Zeitraum stationär behandelt werden, 3 davon mehrfach. Der häufigste Grund für die stationäre Aufnahme waren Infekte jeglicher Art, in deren Rahmen es oft zu Nahrungsverweigerungen kam, die eine engmaschige Kontrolle der Stoffwechsellage erforderlich machten. Wie oben beschrieben, traten in 4 Fällen Hypoglykämien auf, wodurch eine Infusionstherapie mit Glukose notwendig wurde. Bei anderen Kindern wurde diese rein prophylaktisch verabreicht. Patient 29 (245insT/245insT) wurde wegen einer respiratorischen Anpassungsstörung 5 Tage nach der Geburt aufgenommen. Eine Hypoglykämie wurde allerdings nicht festgestellt.

10 der Patienten in stationärer Behandlung waren homozygot für die prävalente Mutation, zwei waren homozygot für 157C>T und einer für 799G>A. Des Weiteren fanden sich die Genotypen mit den Nullmutationen (245insT/ -, 985A>G/245insT, 245insT/245insT) und die mit der in der Literatur als mild beschriebene Mutation 199T>C (985A>G/199T>C, 1140insG/199T>C).

Neurologische Auffälligkeiten

Neurologische Auffälligkeiten zeigten sich in 2 Fällen (beide Patienten homozygot für die prävalente Mutation), wobei die Klinik im Zusammenhang mit einer Hypoglykämie auftrat (Patient 14 → Apathie, Patient 16 → Somnolenz, „komisches Zeug reden“). Neurologische Folgeschäden - wie bei nicht gescreenten Patienten beschrieben - fanden sich in diesem Kollektiv nicht.

Allgemeine Besonderheiten

Bei der Durchschau der Akten wurde des Weiteren auf allgemeine Besonderheiten geachtet. Es fiel auf, dass Eltern in 8 Fällen während eines Infektes ihren Kindern Maltodextrin gaben und eine Genesung zu Hause möglich war. Bei drei Patienten erfolgte dies sogar mehrfach. Es kam in diesen Fällen nicht zu einer Hypoglykämie. Für die prävalente Mutation homozygot waren 5 Kinder.

Bei 5 anderen Kindern fanden sich Infekte in der Anamnese, die auch ohne Maltodextringabe problemlos abheilten. 2 dieser Patienten waren homozygot für 985A>G.

Laborchemische Auffälligkeiten

Außerdem wurde bei der Durchschau der Akten auf die Laborwerte, dabei besonders auf die Transaminasen, geachtet. Bei 11 Patienten wurden diese gemessen. In 5 Fällen zeigten sich pathologische Werte zu einem der Messzeitpunkte. Bei einem Patienten (157C>T/157C>T) zeigte sich eine isolierte Erhöhung der γ GT, bei einem (985A>G/985A>G) eine isolierte Erhöhung der GOT und zweimal (985A>G/985A>G, 245insT/245insT) ein alleiniger Anstieg der GPT. Bei Patient 16 waren GOT und GPT erhöht. 3 der 5 Patienten waren also homozygot für die prävalente Mutation und ein Kind mit der als mild beschriebenen Mutation 157C>T zeigte ebenfalls erhöhte Leberwerte.

4 Diskussion

Diese Studie hat gezeigt, dass als Konfirmationsdiagnostik für den MCAD- Mangel bei auffälligem Acylcarnitinbefund im Neugeborenen- Screening neben einer genetischen Analyse eine Bestimmung der Enzymaktivität aus Lymphozyten durchaus sinnvoll sein kann. Mit Hilfe der Charakterisierung des Genotyps konnte in dieser Arbeit bei einigen erkrankten Patienten nur eine Mutation diagnostiziert werden. Dies kann z.B. darin begründet sein, dass eine weitere Mutation im Bereich des Introns liegt und sich somit der Sequenzierung entzieht oder es sich um eine größere Deletion handelt, die nicht erkannt werden kann. In diesen Fällen ist die enzymatische Analyse unerlässlich, um Patienten auch als solche zu erkennen. Zudem können bereits Rückschlüsse auf den Schweregrad der Erkrankung geschlossen werden.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass Kinder mit als mild beschriebenen Mutationen sowohl klinisch als auch biochemisch (Acylcarnitine, organische Säuren) nicht in jedem Fall unauffällig sind. Auch in dieser Patientengruppe wurden erniedrigte Werte für das freie Carnitin, eine erhöhte Ausscheidung der organischen Säuren im Urin und erhöhte Leberwerte gemessen. Ein Patient erlitt im betrachteten Zeitraum im Rahmen einer Sepsis sogar eine Hypoglykämie.

Eine Substitutionsbehandlung mit Carnitin, welche bei MCAD-Mangel kontrovers diskutiert wird, ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit als nicht notwendig anzusehen.

Die Ergebnisse der dargestellten Follow-up Studie sollten vor allem der Klärung der Frage dienen, welche Untersuchung am sinnvollsten durchzuführen ist, um einen für den MCAD-Mangel positiven Screeningbefund zu bestätigen. Zuerst ist dazu zu bemerken, dass alle Patienten aus diesem Kollektiv mit positivem Befund im Neugeborenen-Screening auch tatsächlich an einem MCAD-Mangel litten. Entgegen der in der Literatur (Derks et al. 2007) beschriebenen Fälle gab es also keine falsch positiven Befunde. In der sich anschließenden molekulargenetischen Untersuchung fand sich bei 5 Kindern nur eine Mutation, sodass diese - bei alleiniger Bestätigung durch eine genetische Analyse - als gesund diagnostiziert worden wären. Die Konsequenz daraus ist, dass sich eine molekulargenetische Untersuchung allein in einigen Fällen zur Konfirmationsdiagnostik nicht eignet. In einigen Studien wurden die positiv gescreenten Kindern sogar nur auf die prävalente Mutation 985A>G untersucht, in anderen wurde zusätzlich noch nach der als mild beschriebenen Mutation 199T>C gesucht. Hierbei diagnostiziert man laut Maier et. al. 2005 nur 58% der Patienten.

In diesem Patientenkollektiv fand sich die prävalente Mutation in 22 von 41 Fällen homozygot (53,6%). Dies entspricht der in der Literatur (Leonard et al. 2009) beschriebenen Häufigkeit, die sich seit Beginn der Screening-Ära verringert hat (von bis zu 80% vor Screening (=klinisch diagnostizierte Patienten) auf ca. 55- 65% in einigen gescreenten Kollektiven, Rhead et al. 2006). Von Hsu et al. 2008 wurde für die Mutation 199T>C seit Screeningbeginn eine Trägerfrequenz von 1:500 beschrieben. Von Grosse et al. wurde 2006 in einem Kollektiv in 16% der Fälle diese Mutation gefunden. In dem hier dargestellten Kollektiv wiesen 5 der 41 Patienten (12,2%) diese Mutation auf. Es fand sich also eine ähnliche Prävalenz. Die Inzidenz scheint mit dem ethnischen Hintergrund der Bevölkerung zu korrelieren (Grosse et al. 2006).

Alle in diesem Kollektiv gefundenen Mutationen wurden bereits an anderer Stelle beschrieben (Rhead 2006, Derks et al. 2006, Smith et al. 2010). Eine Ausnahme davon bilden die Mutationen 1140insG und 1137T>A.

Die auf die molekulargenetische Analyse folgende Bestimmung der residualen Enzymaktivität erwies sich als geeignete Konfirmationsdiagnostik. Hier konnten auch die 5 Kinder, bei denen nur eine Mutation gefunden wurde, als Patienten identifiziert werden. Daraus lässt sich schließen, dass bei positivem Screeningbefund und nicht eindeutiger genetischer Charakterisierung eine enzymatische Untersuchung folgen sollte.

Wie schon in der Literatur dargestellt zeigte sich eine Korrelation zwischen Genotyp und Restaktivität. Laut Grosse et al. 2006 handelt es sich bei Aktivitäten unter 5% um ein klassisches MCAD, bei Restaktivitäten zwischen 5 und 35% um einen milden MCAD-Mangel.

Die Mutation 245insT wurde schon von Maier et. al. 2005 aufgrund der Klinik der Patienten als eine der prävalenten Mutation in ihrem Schweregrad vergleichbare Mutation beschrieben. Dies konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden.

Bei beiden Kindern mit dem Genotyp 245inT/- wurden sehr niedrige Restaktivitäten (0,57%, 1,19%) gemessen.

Die Mutationen 616C>T, 199T>C, 799G>A finden sich bei Rhead et al. 2006. Allerdings wird dort keine Aussage über den jeweiligen Phänotyp gemacht. Maier et al. ordnen 616C>T und 799G>A einer Gruppe zu, die in ihrem biochemischen Profil den Kindern mit der 199T>C- Mutation vergleichbar ist. Auch Zschocke et al. beschreiben den Genotyp 799G>A/799G>A als mild.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten für 799G>A/799G>A und 157C>T/157C>T Restaktivitäten von 7,14% bzw. 8,78% gemessen werden, was vermuten lässt, dass es sich hierbei um milde Mutationen handelt. Alle Kinder mit der 199T>C- Mutation hatten eine Enzymaktivität >9%.

Dagegen fand sich bei einem Kind mit 985A>G/347G>A eine Aktivität von 1,03%, was nahe legt, dass es sich hierbei um eine Mutation handelt, die in ihrem Schweregrad der prävalenten Mutation vergleichbar ist. Smith et al. beschrieben 2010 einen symptomatischen Patienten mit diesem Genotyp.

Welchen Einfluss die hier gefundenen Intronmutationen haben bleibt unklar. In der Literatur konnten hierzu keine Aussagen gefunden werden. Interessant ist, dass von den 5 Kindern mit nur einer Mutation 4 eine oder mehrere dieser Intronmutationen aufwiesen.

Die zusätzlich durchgeführte Analyse MCAD- typischer organischer Säuren im Urin erwies sich als nicht sinnvoll zur Bestätigung eines positiven Befundes im Neugeborenen- Screening. Es zeigte sich, dass die drei betrachteten Metabolite Adipinsäure, Suberinsäure und Hexanoylglycin nicht bei allen Patienten erhöht waren. Keiner der drei Metabolite wurde bei allen Patienten vermehrt ausgeschieden. Im Gegensatz zu Beschreibungen in der Literatur war die krankheitsspezifische organische Säure Hexanoylglycin am seltensten nachweisbar. Bei Derks et al. 2007 war das Hexanoylglycin bei Patienten immer pathologisch verändert, Smith et al. und Hsu et al. beschrieben ebenfalls eine konstante Ausscheidung dieses Metaboliten. In der Literatur wird beispielsweise neben den hier erfassten Metaboliten auch noch 3- Phenylpropionylglycin aufgeführt (Horvath et al. 2008). Dieser Metabolit wurde hier nicht betrachtet. Des Weiteren ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Ausscheidung der einzelnen Metabolite und dem Genotyp des jeweiligen Patienten nachweisen. Dies steht im Gegensatz zur Studie von Waddell et al. 2006. Dort wurde gezeigt, dass Patienten mit 985A>G/985A>G eine höhere Hexanoylglycin- Ausscheidung zeigten als andere. Andere Studien zeigten eine durchaus variable Ausscheidung der organischen Säuren (Horvath et al. 2008, Maier et al. 2005) oder stellten heraus, dass eine erhöhte Ausscheidung nur bei schlechtem Allgemeinzustand des Kindes feststellbar war (Roe et al. 1985, Leonard et al. 2009). Dieser Annahme widersprachen allerdings Wilcken et al. 1994 und Lee et al. 2005. Dort wurde eine Ausscheidung von Hexanoylglycin und Suberylglycin auch bei asymptomatischen Kindern nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der genannten Punkte die organischen Säuren nicht zur Bestätigungsdiagnostik geeignet sind. Ein zweites wichtiges Ergebnis der Betrachtung der organischen Säure ist, dass auch als mild beschriebene Genotypen eine erhöhte Ausscheidung organischer Säuren zeigen können.

Abschließend bleibt festzustellen, dass das erste Ziel dieser Studie - eine geeignete Konfirmationsdiagnostik zu finden - erfüllt ist. Es stellte sich heraus, dass, wenn die molekulargenetischen Untersuchung lediglich eine Mutation zeigt, die Analyse der Aktivität der MCAD eine sichere Aussage ermöglicht und bei molekularer Heterogenität zudem einen Hinweis auf den möglichen Schweregrad des Enzymdefekts des jeweiligen Kindes zulässt.

Bei genauer Betrachtung der Acylcarnitine im Screening ließ sich feststellen, dass das C8:0 bei allen Patienten erhöht war. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe der C8:0 Konzentration im Neugeborenen- Screening und dem jeweiligen Genotyp. Tendenziell hatten Kinder, die homozygot für die prävalente Mutation waren, ein höheres C8:0 (wie auch von Hsu et al. 2008 beschreiben: $>5\mu\text{mol/l}$ klassischer MCAD- Mangel, $<5\mu\text{mol/l}$ kein 985A>G mehr) als z.B. die Kinder mit der als mild beschriebenen Mutation 199T>C. Dies zeigte sich ebenfalls im zeitlichen Verlauf und wurde bereits von Horvath et al. 2008 und Zytkovicz et al. 2001 gezeigt. Auch die residuale Enzymaktivität korrelierte mit der Höhe des C8:0 im Screening. Je niedriger die Restaktivität, desto höher die C8:0- Konzentration. Daher kann von der Höhe der C8:0- Konzentration auf den möglichen Schweregrad des Enzymdefektes geschlossen werden. Allerdings muss dies im Verlauf nicht immer zutreffen.

Bei Verdacht auf einem MCAD- Mangel wird zunächst immer das C8:0 bestimmt. Als alleiniges Diagnostikum reicht dies allerdings vor allem bei Kindern, die in höherem Lebensalter im Rahmen eines Familienscreenings untersucht werden oder bei denen verspätet ein Neugeborenen- Screening durchgeführt wird, nicht aus, da es im Verlauf zur Normalisierung der C8:0- Konzentration kommen kann. In diesem Kollektiv wurden bei 8 Kindern im Verlauf Werte im Normbereich erhoben. 4 davon waren sogar homozygot für die prävalente Mutation, 4 wiesen einen milden Genotyp auf.

Ein Kind (985A>G/ 199T>C) zeigte bereits zwei Wochen nach der Geburt ein normales C8:0.

C10:0 korrelierte im Gegensatz zu C8:0 weder gut mit der Restaktivität noch mit dem Genotyp und wurde schon von Zytkovicz et al. 2001 als unzuverlässiger Marker beschrieben.

Dagegen fand sich beim Quotienten aus C8:0 und C10:0 ein guter Zusammenhang zur residualen Enzymaktivität. Zum Beispiel hatten alle Patienten mit 985A>G/199T>C eine C8:0/C10:0- Ratio unter 4. Dies entspricht Smith et al., die beschrieben, dass Patienten, die nicht homozygot für die prävalente Mutation sind, eine Ratio < 5 aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich folgendes sagen: C8:0 korreliert mit Enzymatik und Genotyp ebenso wie C8:0/ C10:0. Dies fanden auch Waddell et al. 2006.

Bei der Betrachtung des C0 sollte vor allem die Frage beantwortet werden, welche Kinder eine Erniedrigung des freien Carnitins in welchem Lebensalter und unter welchen Bedingungen zeigen und ob eine Substitutionsbehandlung einen positiven Effekt bewirkt. In der Literatur wird über die Bedeutung der Behandlung der MCAD- Patienten mit Carnitin kontrovers diskutiert. Laut Walter et. al. 2003 gaben 39% der von ihnen befragten Zentren in der MCAD- Therapie Carnitin. Einige substituierten routinemäßig, andere bei Symptomen oder ab einem bestimmten Alter mit variierender Dosis zwischen 25 und 300mg/ kg Körpergewicht. Andere Autoren heben den Mangel an Nebenwirkungen der Carnitingabe als Argument für eine Substitutionsbehandlung hervor. Bei Winter 2003 zeigten 8 von 9 Kindern jedoch Symptome im Sinne von Nebenwirkungen (Krämpfe, Muskelschmerzen, GIT- Beschwerden, Schweißgeruch). Allerdings wurden hier auch positive Effekte wie Erhöhung von Muskelkraft, Widerstandsfähigkeit, Wachheit und Reduktion von Hypoglykämien beschrieben. In anderen Studien hingegen zeigten sich keinerlei Nebenwirkungen dieser Therapie (Lee et. al. 2005). Des Weiteren sind die Konsequenzen einer Carnitinerniedrigung bisher nicht klar und es gibt keine Evidenz, dass Kinder mit Substitution ein besseres Outcome haben (Leonard et al. 2009).

In dieser Studie zeigten alle Patienten im Screening ein C0 im Normbereich.

Im weiteren Verlauf allerdings zeigten 14 Kinder ein erniedrigtes freies Carnitin. Neun Patienten waren homozygot für die prävalente Mutation. 7 dieser Kinder wiesen bereits im ersten Lebensjahr einen erniedrigten Carnitinspiegel auf.

Daraus lässt sich schließen, dass Patienten, die homozygot für die prävalente Mutation sind, früher einen Abfall des freien Carnitins erleiden. Bei Patient 18 (985A>G/347G>A, Aktivität 1,03%) wurde im Alter von 5 Monaten ein erniedrigtes freies Carnitin gemessen. Hierbei scheint es sich - wie bereits beschrieben - um einen Genotyp zu handeln, der mit dem Schweregrad der prävalenten Mutation vergleichbar ist. Des Weiteren fiel auf, dass auch Patienten mit in der Literatur als mild beschriebenen Mutationen Carnitinniedrigungen aufwiesen, allerdings später und grundsätzlich seltener (bei 22,2% der Kinder mit milden Mutationen und 42,8% der mit der prävalenten Mutation wurde ein niedriges freies Carnitin gemessen).

Insgesamt fanden sich zur Zeit der Erniedrigung des freien Carnitins bei 5 der 14 Kindern klinische Auffälligkeiten. Es handelte sich um fieberhafte Infekte oder Diarrhoen. Patient 10 (245insT/ -) hatte 3 Monate zuvor eine eitrige Tonsillitis.

Daraus lässt sich schließen, dass die Klinik allein nicht ausschlaggebend für ein niedriges freies Carnitin zu sein scheint und dass der Genotyp 985A>G/ 985A>G häufiger und früher mit einem Abfall des C0 assoziiert ist. Allerdings sollte auch bei Patienten mit mildem Genotyp eine Kontrolle des freien Carnitins erfolgen.

10 der 14 Patienten mit erniedrigtem freien Carnitin erhielten keine Substitution. Bei vier Kindern (2 x 985A>G/985A>G, 985A>G/ -, 985A>G/347G>A) fand sich auch ohne Carnitin- Substitution bei der nächsten Messung ein Wert im Normbereich. Da bei 7 Kindern der Carnitinabfall auf einen Wert unterhalb des Normbereichs erst bei der letzten betrachteten Messung auftrat, kann in diesen Fällen nicht beurteilt werden, ob sich auch hier eine Normalisierung ohne Gabe von Carnitin eingestellt hätte. 3 Kinder mit einem erniedrigten Carnitin im betrachteten Zeitraum erhielten eine Substitutionsbehandlung. In allen drei Fällen lag die Dosis zwischen 30 und 40mg/kg Körpergewicht/ Tag. Laut Rhead et al. 2006 schreiben die meisten Follow- up- Programme eine Dosis zwischen 20 und 100mg/ kg/ Tag vor. Der Verlauf zeigte, dass diese Behandlung bei einem Patienten nicht den gewünschten Effekt erzielte und das freie Carnitin trotzdem unterhalb des Normwerts blieb. Das Kind war homozygot für die prävalente Mutation. Warum die Substitution nicht den gewünschten Effekt zeigte, bleibt unklar. Es könnte an einer zu niedrigen Dosis oder der falschen Einnahme seitens des Patienten liegen.

Abschließend muss man sagen, dass in diesem Patientenkollektiv eine Gabe von Carnitin nicht als sinnvoll zu beurteilen ist, da es erstens durch die Substitution nicht immer zu einer Normalisierung des Carnitinspiegels im Plasma kam, zweitens alle Kinder bis zum betrachteten Zeitpunkt das gleiche Outcome hatten und drittens eine Normalisierung des freien Carnitins auch ohne Substitution zu beobachten war, selbst bei Patienten, deren Genotyp als schwerwiegend eingeordnet wird. Die Kinder, die eine Erniedrigung des freien Carnitins zeigten und keine Substitution erhielten, entwickelten sich im betrachteten Zeitraum genauso gut wie die, die die ganze Zeit über ein normales C0 aufwiesen, oder diejenigen, die eine erfolgreiche Supplementation erhielten. Aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraums ist die Aussagekraft diesbezüglich sicherlich stark eingeschränkt. Dies entspricht einer Studie von Huidekoper et al. 2006, in der es zwischen einer Gruppe mit Supplementation von Carnitin und einer ohne während zweistündiger moderater körperlicher Anstrengung keine Unterschiede in der

klinischen Symptomatik gab. Allerdings wurde dort postuliert, dass sich vermutlich Unterschiede bei kurzen Höchstleistungen oder bei Anstrengungen > 2 Stunden zeigen würden. Beide Gruppen zeigten keine klinischen Symptome. Nach Leonard et al. 2009 gibt es aber bislang keine Evidenz, dass Patienten, die eine Carnitintherapie erhalten, ein besseres Outcome haben.

In der Arbeit wurden zuletzt auch klinische und laborchemische Auffälligkeiten betrachtet. Entscheidend war dabei, dass nur 4 der 39 Kinder überhaupt in dem betrachteten Zeitraum symptomatisch im Sinne einer Hypoglykämie waren. Dies entspricht der in der Literatur beschriebenen Tatsache, dass seit Beginn des Screenings viel weniger Kinder klinisch manifest werden (Schatz et al. 2010). 2 dieser Kinder waren homozygot für 985A>G, ein Kind homozygot für 799G>A und ein Kind hatte den Genotypen 985A>G/ 245insT. Die Mutation 799G>A ist von Maier et al. 2005 biochemisch als mild beschrieben. Allerdings fanden auch sie Patienten mit diesem Genotyp, die durchaus klinische Auffälligkeiten zeigten. Dies weist abermals daraufhin, dass auch bei mit Hilfe des Acylcarnitinprofils oder der Enzymaktivitätsmessung als mild erachteten Mutationen Vorsicht geboten ist. Dass Kinder, die homozygot für die prävalente Mutation sind, klinisch unauffällig waren, zeigt, dass es scheinbar noch andere Trigger für eine klinische Präsentation gibt. Smith et al. 2010 sprechen in diesem Zusammenhang von Umweltfaktoren und Epigenetik. Im Gegensatz zu den Kindern, die vor der Screening- Ära mit Hypoglykämien, häufig auch als erstes Symptom, auffielen, fanden sich hier keinerlei neurologische Folgeschäden (1/10 der nicht gescreenten Kinder erleidet nach einer metabolischen Krise laut Grosse et al. 2006 ernsthafte Spätschäden). Außerdem verliefen die Hypoglykämien milder. In zwei Fällen wurde ein leichte Apathie und Verwirrtheit beschrieben. Es kam in keinem Fall zu Krampfanfällen oder Bewusstlosigkeit, welche bei Kindern vor Beginn des Screenings durchaus vorkamen (Wang et al. 1999). Wang et al. beschrieben 1999 als Langzeitschäden Entwicklungs- und Wachstumsverzögerungen. Insgesamt werden bei ungescreenten Kindern viel häufiger ernsthafte Dekompensationen und Todesfälle beobachtet (Wilcken et. al. 2007). Allerdings konnten Wilcken et al. keinen Unterschied im kognitiven Outcome feststellen.

Es fiel auch auf, dass insgesamt 18 der 39 Kinder im Verlauf stationär behandelt wurden. Häufigster Grund waren Infekte jeglicher Art, in deren Rahmen die Kinder zu Hause nichts mehr gegessen hatten. Da es nur in 4 Fällen zu einer manifesten, aber milden Hypoglykämie kam, lässt sich daraus schließen, dass diese prophylaktischen Aufnahmen in die Klinik sinnvoll waren, da auf diese Weise schwerwiegende Krankheitsmanifestationen verhindert werden konnten. Von Derks wurde 2007 festgestellt, dass eine manifeste Hypoglykämie nicht unbedingt das erste Symptom einer Dekompensation sein muss und dass die Fastentoleranz interindividuell durchaus sehr verschieden sein kann. Den Eltern kommt also ebenfalls eine entscheidende Bedeutung zu, wie auch van Hove et. al. beschrieben. Entscheidend ist eine gute Aufklärung über das Krankheitsbild (Therapie Guidelines van Hove 2009). In einigen Fällen konnten die Eltern eine stationäre Aufnahme durch Gabe von Maltodextrin verhindern. Wie wichtig dieses ist, zeigte auch der Tod eines Kindes, welches offensichtlich während einer zu langen Nüchternperiode verstarb. In der Literatur werden seit Beginn des Screenings nur noch sehr wenige Todesfälle beschrieben (nach Rhead 2006 Abfall der Mortalität auf <7%).

Da diese prophylaktischen Maßnahmen die Lebensqualität kaum beeinflussen, sollte jeder Familie ein Notfallplan zukommen unabhängig vom Genotyp des erkrankten Kindes (siehe auch Leonard et. al. 2009).

Es gibt auch Fälle, die sich erst im Erwachsenenalter manifestieren (wie zum Beispiel von Feillet et al. 2003 beschrieben). Ein solcher Fall war auch in diesem Patientenkollektiv zu finden. Der Vater eines gescreenten Kindes wurde als Patient identifiziert. Es fand sich bei ihm der Genotyp 985A>G/127G>A. Er hatte bis zu diesem Zeitpunkt keine klinischen Symptome bemerkt. Solche Fälle finden sich ebenfalls in der Literatur. Smith et al. beschrieben 2010 einen 36 Jahre alten Mann, der bis zur Diagnosestellung nur an gelegentlichen Kopfschmerzen gelitten hatte. Eine MCAD- typische Klinik war nicht bekannt. Man kann daraus schließen, dass es sich bei 127G>A um eine milde Mutation handelt. Hsu et al. beschrieben 2008 ein Kind mit dem Genotyp 985A>G/127G>A, welches nach einem initial erhöhten C8:0 später eine Normalisierung zeigte. Auch Smith et al. berichteten von asymptomatischen Patienten mit diesem Genotyp, die ein niedriges Octanoylcarnitin aufwiesen.

In der Studie konnte gezeigt werden, dass auch Kinder mit milden Mutationen durchaus biochemische (freies Carnitin, organische Säuren) und klinische Auffälligkeiten (Hypoglykämie bei Patient 35) zeigen können, allerdings seltener als Kinder mit der prävalenten Mutation. Der Fall des Vaters von Kind 1 zeigt jedoch, dass die Bezeichnung „mild“ durchaus ihre Berechtigung hat, da es hier nie zu klinischen Auffälligkeiten gekommen ist.

5 Zusammenfassung

Der MCAD- Mangel ist eine Störung der Fettsäureoxidation, bei der mittelkettige Fettsäuren nicht oder nicht vollständig abgebaut werden können und sich vor dem Enzymblock anstauen. Gerade in Fastenperioden oder im Verlauf von Infekten wird diese Erkrankung manifest, zum Beispiel in Form von Hypoglykämien. Seit der MCAD- Mangel in das Neugeborenen- Screening aufgenommen wurde, werden deutlich weniger schwere Verläufe beobachtet und nun auch andere Mutationen gefunden, die vor der Screening-Ära nicht beschrieben wurden. Die Pathogenität dieser Mutationen ist unbekannt.

Wenn ein Neugeborenes im Screening durch ein pathologisches Acylcarnitinprofil auffällt, das auf einen MCAD Mangel hinweist, wird zunächst eine molekulargenetische Charakterisierung durchgeführt. In der vorliegenden Studie konnte bei 5 von 41 Kindern jedoch nur eine Mutation gefunden werden. Erst durch Analyse der Restaktivität des Enzyms aus Lymphozyten konnten auch diese 5 Kinder als Patienten identifiziert werden. Es gibt erste Hinweise, dass die Residualaktivität mit dem zu erwartenden Phänotyp und Schweregrad der Erkrankung korreliert. Kinder mit einer Aktivität <3% waren homozygot für die prävalente Mutation oder wiesen andere als schwerwiegend zu beurteilende Mutationen auf (245insT, 347G>A).

Die Bestimmung der organischen Säuren ist als Konfirmationsdiagnostik nicht geeignet, da sowohl Patienten mit der prävalenten Mutation und erwartetem klassischen Phänotyp Normalbefunde als auch Patienten mit mildem Genotyp pathologische Werte zeigten. Rückschlüsse auf den Genotyp konnten anhand der organischen Säuren nicht gezogen werden.

Die Bestimmung der Acylcarnitine eignet sich zur Konfirmationsdiagnostik ebenfalls nicht, da 8 Patienten eine Normalisierung des C8:0 im Verlauf (ein Kind schon 2 Wochen nach der Geburt) zeigten.

Allerdings gibt es Hinweise, dass Patienten mit deutlich erhöhten C8:0 Konzentrationen im Screening in der Regel den klassischen Phänotyp mit prävalenter Mutation aufweisen.

Ein erniedrigtes freies Carnitin (C0) zeigten im Verlauf 14 Kinder, darunter auch Patienten mit als milde klassifiziertem Genotyp. In diesem Kollektiv erhielten 3 Kinder eine Substitutionsbehandlung, lediglich in einem Fall zeigte sich daraufhin eine Normalisierung des Carnitinspiegels. Bei 4 Patienten normalisierte sich das C0 auch ohne Therapie wieder. Zu bemerken ist, dass Kinder mit 985A>G/985A>G scheinbar früher und häufiger ein niedriges freies Carnitin aufweisen, teilweise ohne ersichtlichen Auslöser (Infekt, etc.). Ein erniedrigtes Carnitin kann nach den Ergebnissen dieser Studie auch durch endogene Biosynthese und alimentär ohne zusätzliche Supplementierung normalisiert werden.

Klinische Symptome in Form von Hypoglykämien waren in dem Kollektiv nur bei 4 Kindern zu beobachten. Dies ist in erster Linie dadurch zu erklären, dass bei Diagnose im Screening prophylaktische Maßnahmen eingeleitet werden, die eine metabolische Entgleisung auch bei klassischen Phänotypen verhindern. Insgesamt beeinflussen exogene Faktoren (wie Krankheiten, verlängerte Fastenperioden etc.) den klinischen Verlauf in beträchtlichem Maße. Es ist aktuell unklar, welche im Screening identifizierten Kinder mit neuen Mutationen tatsächlich ein erhöhtes Risiko einer metabolischen Entgleisung tragen.

6 Literaturverzeichnis

K. **Carpenter**, V. Wiley, K.G. Sim, D. Heath and B. Wilcken, Evaluation of newborn screening for medium-chain acyl-CoA deficiency in 275000 babies
Arch Dis Child Fetal Neonatal;85:F105–F109, 2001

P.M. **Coates**, K. Tanaka, Molecular basis of mitochondrial fatty acid oxidation defects,
J. Lipid Res. 33: 1099-1110, 1992

- T.G. J. **Derks**, D.-J. Reijngoud, H.R. Waterham, W.-J. M. Gerver, M.P. Van Den Berg, P. J. J. Sauer, G. P.A. Smit, The natural history of medium- chain acyl- CoA dehydrogenase deficiency in the Netherlands: clinical representation and outcome, *J Pediatr* 148: 665-70, 2006
- T.G. J. **Derks**, F.J. van Spronsen, J.P. Rake, C.S. van der Hilst, M.M. Span, G.P.A. Smit, Safe and unsafe duration of fasting for children with MCAD deficiency, *Eur J Pediatr* 166: 5–11, 2007
- M. **Duran**, M. Hofkamp, W.J. Rhead, J.-M. Saudubray, S.K. Wadman, Sudden Child Death and 'Healthy' Affected Family Members With Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency, *Pediatrics* 78:1052-1057, 1986
- F. **Feillet**, G. Steinmann, C. Vianey-Saban, C. de Chillou, N. Sadoul, E. Lefebvre, M. Vidailhet, P.E. Bollaert, Adult presentation of MCAD deficiency revealed by coma and severe arrhythmias, *Intensive Care Med* 29:1594–1597, 2003
- N. **Gregersen**, R. Lauritzen, K. Rasmussen, Suberylglycine excretion in the urine from a patient with dicarboxylic aciduria, *Clinica Chimica Acta* 70: 417- 425, 1976
- N. **Gregersen**, B.S. Andresen, P. Bross, V. Winter, N. Rüdiger, S. Engst, E. Christensen, D. Kelly, A.W. Strauss, S. Kelvraa, L. Bolund, S. Ghisla, Molecular characterization of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: identification of a lys329 to glu mutation in the MCAD gene, and expression of inactive mutant enzyme protein in *E. coli*, *Human genetics* 86: 545-551, 1991
- N. **Gregersen**, B.S. Andresen, P. Bross, Prevalent mutations in fatty acid oxidations disorders: diagnostic considerations, *Eur J Pediatr* 159: 213- 218, 2000
- N. **Gregersen**, P. Bross, B.S. Andresen, Genetic defects in fatty acid β -oxidation and acyl-CoA dehydrogenases Molecular pathogenesis and genotype–phenotype relationships, *Eur. J. Biochem.* 271: 470–482, 2004
- S.D. **Grosse**, M.J. Houry, C.L. Greene, K.S. Crider, R.J. Pollitt, The epidemiology of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: An update, *Genet Med* 8(4):205–212, 2006
- G. **Hoffmann**, S. Aramaki, E. Blum- Hoffmann, W. L. Nyhan, L. Sweetman, Quantitative analysis for organic acids in biological samples: Batch isolation followed by gas chromatographic- mass spectrometric analysis, *Clin. Chem.* 35/4: 587- 595, 1989
- G.A. **Horvath**, S. Olpin, A.G.F. Davidson, B.S. Andresen, S.G. Stockler-Ipsiroglu, J. Palaty, Y.P. Lillquist, J. Nelson, P.J. Waters, H.Vallance, Newborn Screening for MCAD Deficiency: Experience of the First Three Years in British Columbia, Canada, *Revue Canadienne de santé publique* vol. 99, no. 4: 276- 280, 2008
- J.L.K. van **Hove**, W. Zhang, S.G. Kahler, C.R. Roe, Y.-T. Chen, N. Terada, D.H. Chace, A.K. lafolla, J.-H. Ding, D.S. Millington, Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency: Diagnosis by Acylcarnitine Analysis in Blood, *Am. J. Hum. Genet.* 52:958-966, 1993
- J.L.K. van **Hove**, S. Myers, K.V. Kerckhove, C. Freehauf, L. Bernstein, Acute nutrition management in the prevention of metabolic illness: A practical approach with glucose polymers, *Molecular Genetics and Metabolism* 97: 1–3, 2009
- A. **Howat**, M.J. Bennett, S. Variend, L. Shaw, P.C. Engel, Defects of metabolism of fatty acids in the sudden infant death syndrome, *Britisch medical journal* Vol. 290: 1771- 1773, 1985

- H.-W. **Hsu**, T.H. Zytovicz, A.M. Comeau, A.W. Strauss, D. Marsden, V.E. Shih, G.F. Grady, R.B. Eaton, Spectrum of Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency Detected by Newborn Screening, *Pediatrics* 121: 1108-1114, 2008
- H.H. **Huidekoper**, J. Schneider, T. Westphal, F.M. Vaz, M. Duran, F.A. Wijburg, Prolonged moderate-intensity exercise without and with L-carnitine supplementation in patients with MCAD deficiency, *J Inherit Metab Dis* 29: 631–636, 2006
- R.I. **Kelley**, The Role of Carnitine Supplementation in Valproic Acid Therapy, *Pediatrics* 93: 891-892, 1994
- D.P. **Kelly**, J.-J. Kim, J.J. Billadello, B.E. Hainline, T.W. Chu, A.W. Strauss, Nucleotide sequence of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase mRNA and its expression in enzyme-deficient human tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 84: 4068-4072, 1987
- D.P. **Kelly**, A.J. Whelan, M.L. Ogden, R. Alpers, Z. Zhang, G. Bellus, N. Gregersen, L. Dorland, A.W. Strauss, Molecular characterization of inherited medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 87: 9236-9240, 1990
- P.J. **Lee**, E.L. Harrison, M.G. Jones, S. Jones, J.V. Leonard, R.A. Chalmers, I-Carnitine and exercise tolerance in medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD) deficiency: A pilot study, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28: 141-152, 2005
- J.V. **Leonard**, C. Dezateux, Newborn screening for medium chain acyl CoA dehydrogenase deficiency, *Arch. Dis. Child* 94: 235-238, 2009
- E.M. **Maier**, B. Liebl, W. Röschinger, U. Nennstiel-Ratzel, R. Fingerhut, B. Olgemöller, U. Busch, N. Krone, R. v. Kries, A.A. Roscher, Population Spectrum of ACADM Genotypes Correlated to Biochemical Phenotypes in Newborn Screening for Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency, *Human Mutation* 25:443- 452, 2005
- Y. **Matsubara**, J.P. Kraus, T.L. Yang-Feng, U. Francke, L.E. Rosenberg, K. Tanaka, Molecular cloning of cDNAs encoding rat and human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase and assignment of the gene to human chromosome 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 83: 6543-6547, 1986
- D.S. **Millington**, N. Kodo, D.L. Norwood, C.R. Roe, Tandem Mass Spectrometry: A new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism, *J. Inher. Metab. Dis.* 13: 321- 324, 1990
- M. **Pourfarzam**, A. Morris, M. Appleton, A. Craft, K. Bartlett, Neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, *Lancet* 358: 1063–64, 2001
- W.J. **Rhead**, Newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: A global perspective, *J Inherit Metab Dis* 29: 370–377, 2006
- B. **Rodeck**, Gastroenterologie und Hepatologie, Reye- Syndrom, *In: E. Mayatepek, Hrsg., Pädiatrie, 1. Auflage, 2007, München: Elsevier, S.592*
- C.R. **Roe**, D.S. Millington, D.A. Maltby, T.B. Bohan, S.G. Kahler, R. A. Chalmers, Diagnostic and therapeutic implications of medium- chain acylcarnitines in the medium- chain acyl- CoA dehydrogenase deficiency, *Pediatric Research* Vol. 19 No. 5: 459- 466, 1985
- U.A. **Schatz**, R. Ensenauer, The clinical manifestation of MCAD deficiency: challenges towards adulthood in the screened population, *J Inherit Metab Dis* 33: 513–520, 2010

- A. **Schulze**, M. Lindner, D. Kohlmüller, K. Olgemöller, E. Mayatepek, G.F. Hoffmann, Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications, *Pediatrics* 111: 1399-1406, 2003
- K. **Sermon**, P. Henderix, W. Lissens, A. de Vos, M. Vandervorst, A. Vanderfaeillie, E. Vamos, A. van Steirtgehem, I. Liebaers, Preimplantation genetic diagnosis for medium- chain acyl- CoA dehydrogenase deficiency, *Molecular Human Reproduction* vol. 6 no. 12: 1165- 1168, 2000
- K.G. **Sim**, J. Hammond, B. Wilcken, Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid β -oxidation disorders, *Clinica Chimica Acta* 323: 37–58, 2002
- E.H. **Smith**, C. Thomas, D. McHugh, D. Gavrilov, K. Raymond, P. Rinaldo, S. Tortorelli, D. Matern, W.E. Highsmith, D. Oglesbee, Allelic diversity in MCAD deficiency: The biochemical classification of 54 variants identified during 5 years of ACADM sequencing, *Molecular Genetics and Metabolism* 100: 241–250, 2010
- F. ter **Veld**, M. Mueller, S. Kramer, U. Haussmann, D. Herebian, E. Mayatepek, M.D. Laryea, S. Primmassin, U. Spiekerkoetter, A Novel Tandem Mass Spectrometry Method for Rapid Confirmation of Medium- and Very Long-Chain acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Newborns, *PLoS ONE* 4(7): 1- 7, 2009
- H.G. de **Vries**, K. Niezen-Koning, J.W. Kliphuis, G.P.A. Smit, H. Scheffer, L.P. ten Kate, Prevalence of carriers of the most common medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency mutation (G985A) in The Netherlands, *Hum Genet* 98: 1–2, 1996
- L. **Waddell**, V. Wiley, K. Carpenter, B. Bennetts, L. Angel, B.S. Andresen, B. Wilcken, Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: Genotype–biochemical phenotype correlations, *Molecular Genetics and Metabolism* 87: 32–39, 2006
- J.H. **Walter**, L-Carnitine in inborn errors of metabolism: What is the evidence?, *J. Inherit. Metab. Dis.* 26: 181-188, 2003
- S.S. **Wang**, P.M. Fernhoff, W.H. Hannon, M.J. Khoury, Medium chain acyl- CoA dehydrogenase deficiency: Human genome epidemiology review, *Genetics in Medicine* 1(7): 332- 339, 1999
- B. **Wilcken**, J. Hammond, M. Silink, Morbidity and mortality in medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency, *Arch. Dis. Child.* 70: 410-412, 1994
- B. **Wilcken**, V. Wiley, J. Hammond, K. Carpenter, Screening Newborns for Inborn Errors of Metabolism by Tandem Mass Spectrometry, *N Engl J Med* 348: 2304-12, 2003
- B. **Wilcken**, M. Haas, P. Joy, V. Wiley, M. Chaplin, C. Black, J. Fletcher, J. McGill, A. Boneh, Outcome of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: a cohort study, *Lancet* 369: 37–42, 2007
- Wilson**, James Maxwell Glover; Jungner, Gunnar, Principles and practice of screening for disease / Principles and practice of screening for disease, Geneva; World Health Organization; *Public Health Papers (WHO)*, 34: 163, 1968
- S.C. **Winter**, Treatment of carnitine deficiency, *J. Inherit. Metab. Dis.* 26: 171-180, 2003

J. **Zschocke**, A. Schulze, M. Lindner, S. Fiesel, K. Olgemöller, G.F. Hoffmann, J. Penzien, J.P.N. Ruiten, R.J.A. Wanders, E. Mayatepek, Molecular and functional characterisation of mild MCAD deficiency, *Hum Genet* 108 :404–408, 2001

T.H. **Zytkovicz**, E.F. Fitzgerald, D. Marsden, C. A. Larson, V.E. Shih, D.M. Johnson, A.W. Strauss, A. M. Comeau, R.B. Eaton, G.F. Grady, Tandem Mass Spectrometric Analysis for Amino, Organic, and Fatty Acid Disorders in Newborn Dried Blood Spots: A Two-Year Summary from the New England Newborn Screening Program, *Clinical Chemistry* 47:11: 1945–1955, 2001

„Konfirmationsdiagnostik bei Verdacht auf angeborene Stoffwechselkrankheiten aus dem Neugeborenenenscreening“, AWMF Leitlinie, 2010).

Screening- Richtlinien 1997 und 2002, Deutsche Gesellschaft für Neugeborenenenscreening e.V.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Carnitin als Carrier im Transport langkettiger Fettsäuren durch die mitochondriale Innenmembran, modifiziert nach Löffler, Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 2003, Springer, S.441

Abbildung 2: : Abbau geradzahliger Fettsäuren durch die β - Oxidation, modifiziert nach Löffler, Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 2003, Springer, S. 440

Abbildung 3: Überblick über Patientenkollektiv, welches durch Screening, Molekulargenetik und Enzymatik eingegrenzt wurde (selbst erstellt)

Abbildung 4: Korrelation Enzymatik- Genotyp

Abbildung 5: Korrelation C0- Plasmaspiegel/ Genotyp

Abbildung 6: Korrelation C0- Plasmaspiegel/ Enzymaktivität

Abbildung 7: Korrelation C8- Plasmaspiegel/ Genotyp

Abbildung 8: Korrelation C8- Plasmaspiegel/ Enzymaktivität

Abbildung 9: Korrelation C10- Plasmaspiegel/ Genotyp

Abbildung 10: Korrelation C10- Plasmaspiegel/ Enzymaktivität

Abbildung 11: Korrelation C8/ C10- ratio/ Genotyp

Abbildung 12: Korrelation C8/ C10- ratio/ Enzymaktivität

Abbildung 13: C8 im 1. Lebensjahr bei für die prävalente Mutation homozygoten Kindern

Abbildung 14: C8 im 1.Lebensjahr bei Kindern mit milden Mutationen (199T>C, 799G>A, 157C>T)

Abbildung 15: C8 nach dem 1. Lebensjahr bei für die prävalente Mutation homozygoten Kindern

Abbildung 16: C8 nach dem 1.Lebensjahr bei Kindern mit milden Mutationen (199T>C, 799G>A, 157C>T)

Abbildung 17: Freies Carnitin im Verlauf bei Patienten ohne Substitutionsbehandlung, bei denen ein erniedrigtes C0 gemessen wurde

Abbildung 18: Überblick freies Carnitin

Abbildung 19: Korrelation Hexanoylglycin im Urin/ Genotyp

Abbildung 20: Korrelation Suberinsäure im Urin/ Genotyp

Abbildung 21: Korrelation Adipinsäure im Urin/ Genotyp

Abbildung 22: Korrelation Geburtsgewicht/ Genotyp

Abbildung 23: Korrelation Geburtslänge/ Genotyp

Abbildung 4- 23 aus gesammelten Daten eigenständig erstellt

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die durch das Neugeborenen- Screening erfassten Erkrankungen

Tabelle 2: Primersequenzen (Primer bestellt bei MWG/ Operon)

Tabelle 3: einzelne Schritte der PCR

Tabelle 4: Ergebnis der molekulargenetischen Untersuchung (selbst durchgeführt)

Tabelle 5: C8-Plasmaspiegel im ersten Lebensjahr

Tabelle 6: C8- Plasmaspiegel > 1. Lebensjahr

Tabelle 7: Freies Carnitin im Verlauf

Tabellen 1 und 3 selbst erstellt

Tabelle 5-7 aus den erhobenen Daten erstellt

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Ute Spiekerkötter für die Überlassung des vorliegenden Themas, die kontinuierliche Motivation, Betreuung und unendliche Geduld.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Priv.- Doz. Dr. Keitel- Anselmino für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Des Weiteren möchte ich mich bei Martina Müller für die freundschaftliche Aufnahme im Stoffwechsellabor und die intensive und ausführliche Anleitung zur experimentellen Arbeit bedanken. Sie stand für Fragen und Hilfestellung stets geduldig zur Verfügung. Ohne ihre kompetente Anleitung wäre die Zeit im Labor sicher nicht so positiv verlaufen.

Insbesondere gilt mein Dank meiner Familie und meinem Ehemann Christoph Baur, die mich durch das Studium begleitet und unermüdlich unterstützt haben.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Simone Sabrina Baur, geb. Kramer
Anschrift	Ickerswarderstr. 24 40589 Düsseldorf
Geburtsdatum	29.08.1985
Geburtsort	Düsseldorf
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Verheiratet
Konfession	Römisch- katholisch

Ausbildung

Grundschule	1991- 95, Düsseldorf
Gymnasium	1995 - 2004, Düsseldorf Abschluss: Abitur (NC: 1,5)
Hochschule	2004 - 2010 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Examen: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 09/06 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 11/10
Praktika	08/04- 09/04 Pflegepraktikum 02/05- 03/05 Pflegepraktikum 08/05- 09/05 Pflegepraktikum
Famulaturen	26.02.- 12.03.07 Neonatologie, Uniklinik Düsseldorf 19.07.- 17.08.07 Gastroenterologie und Allgemeine Innere, Städtisches Klinikum Solingen 21.08.- 04.09.07 Pädiatrische Onkologie, Uniklinik Düsseldorf 11.02.- 25.02.08 Anästhesiologie, Marienhospital Düsseldorf

	26.02.- 11.03.08 Allgemeinchirurgie, Marienhospital Düsseldorf
	25.08.- 08.09.08 Gynäkologie, Krankenhaus Gerresheim
	09.09.- 23.09.09 Zentralambulanz, Lukaskrankenhaus Neuss
PJ	1. Terial 31.08.09- 18.12.09 Innere Medizin (Gastroenterologie/ Kardiologie), Lukaskrankenhaus Neuss
	2. Terial 21.12.09- 09.04.10 Gynäkologie, Lukaskrankenhaus Neuss
	3. Terial 12.04.10- 30.07.10 Chirurgie (Allgemein- und Viszeralchirurgie/ Unfallchirurgie), Lukaskrankenhaus Neuss
Dissertation	Charakterisierung Neugeborener mit dem Verdacht eines Medium-chain acyl- CoA Dehydrogenase (MCAD) – Mangels im Screening
Nebentätigkeiten	von SS06 bis WS 07/08 Studentische Hilfskraft im Institut für Anatomie der Universität Düsseldorf, makroskopischer Kurs
	01.04.05- 30.06.07 pflegerische Hilfskraft im Krankenhaus Benrath
Zusatzqualifikationen	WS 07/08 Kurs Abdomensonographie, Klinik für Gastroenterologie, Hepato- logie und Infektiologie, Uniklinik Düsseldorf
	11/ 09 bis 01/ 10 Ultraschallkurs Abdomensonografie, medizinische Klinik II, Lukaskrankenhaus Neuss

11 Eidstattliche 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.

25.06.2013, Simone Baur

Unterschrift