

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

**Klinische, biochemische und molekulargenetische Charakterisierung
von Patienten mit nicht-klassischen, varianten Formen der
Ahornsirupkrankheit (MSUD)**

D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt von
Nadine Flaschker

2006

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

**Klinische, biochemische und molekulargenetische Charakterisierung
von Patienten mit nicht-klassischen, varianten Formen der
Ahornsirupkrankheit (MSUD)**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt von
Nadine Flaschker

2006

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg (amtierender Dekan)

Referent: Prof. Dr. Udo Wendel

Korreferent: Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.06 und 16.09.06

Für meine lieben Eltern

I. Einleitung.....	1
1.1. Historie der Ahornsirupkrankheit.....	1
1.2. Genetischer Hintergrund.....	2
1.3. Multienzymkomplex der BCKA-DH.....	3
1.4. Der pathogenetische Mechanismus.....	5
1.5. Alloisoleucin- ein diagnostischer Parameter	7
1.6. Klinische Phänotypen	8
1.6.1. Die klassische Form der MSUD.....	9
1.6.2. Verschiedene variante Formen der MSUD	10
1.7.1. Diagnostik	13
1.7.2. Therapie	14
1.8. Molekulargenetik.....	15
1.9. Zielsetzung der Arbeit	17
II. Patienten, Material und Methoden.....	18
2.1. Klinische Analyse und Methode.....	18
2.1.1. Patienten	18
2.1.2. Ermittlung von klinischen und biochemischen Daten	18
2.1.3. Zuteilung der Patienten zu einem Phänotyp von varianter MSUD	19
2.1.4. Statistische Auswertung:.....	19
2.2. Molekulargenetische Untersuchung, Material und Methode	20
2.2.1. Patienten zur Genotypbestimmung.....	20
2.2.2. Material	20
2.2.3. Methoden	21
2.2.3.1. Isolierung von mRNA	21
2.2.3.2. Reverse Transkription von mRNA	21
2.2.3.3. Isolierung von genomischer DNA	22
2.2.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.2.3.5. Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese	25
2.2.3.6. Aufreinigung von DNA-Fragmenten durch Säulenchromatographie	25
2.2.3.7. Sequenzier-Polymerasekettenreaktion (Cycle-Sequencing).....	26
2.2.3.8. Elektrophoretische Datenanalyse am ABI 310	27
2.2.3.9. Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNaPshot)	27
III. Ergebnisse	30
3.1. Klinische und biochemische Charakterisierung der Patienten.....	30
3.1.1. Patienten	30
3.2. Gruppeneinteilung anhand klinischer und biochemischer Daten.....	36
3.2.1. Sehr milde und asymptomatische Variante (Gruppe A): 4 Patienten.....	36
3.2.2. Milde Variante (Gruppe B): 6 Patienten.....	37
3.2.3. Schwere Variante (Gruppe C): 7 Patienten.....	38
3.2.4. Früh behandelte Kinder (Gruppe D): 4 Patienten.....	39
3.2.5. Statistische Gruppen-Unterschiede	40

3.3. Beschreibung der Mutationen bei Patienten mit varianter MSUD	41
3.3.1. Beschreibung und Anzahl von Punktmutationen, Stoppmutationen und Deletionen in den jeweiligen Genen	42
3.3.1.1. Mutationen im E1 α -Gen	42
3.3.1.2. Polymorphismen im E1 α -Gen	46
3.3.1.3. Mutationen im E1 β -Gen	47
3.3.1.4. Mutationen im E2-Gen	51
IV. Diskussion	54
4.1. Neue Eingruppierung der varianten Formen der Ahornsirupkrankheit.....	54
4.2. Molekulargenetische Charakterisierung der Mutationen.....	57
4.2.1. Mutationen vom Typ IA	58
4.2.2. Mutationen vom Typ IB	59
4.2.3. Mutationen vom Typ II	60
4.3. Mögliche Auswirkungen/Effekte der Mutationen:	62
4.3.1. Mutationen im E1 α -Gen (Typ IA)	63
4.3.2. Mutationen im E1 β -Gen (Typ IB)	70
4.3.3. Mutationen im E2-Gen (Typ II)	77
4.4. Genotyp/Phänotyp-Korrelation.....	80
V. Zusammenfassung	83
VI. Abkürzungsverzeichnis/Synonyme:.....	92
VII. Literaturverzeichnis.....	93
VIII. Anhang	98
8.1. Tabelle A: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der c DNA des E1 α -Gens.....	98
8.2. Tabelle B: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der c DNA des E1 β -Gens.....	98
8.3. Tabelle C: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der c DNA des E1 β -Gens	99
8.4. Tabelle D: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der c DNA des E2-Gens	99
8.5. Tabelle E: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des E1 α -Gens	100
8.6. Tabelle F: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des E1 β -Gens.....	100
8.7. Tabelle H: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des E2-Gens.....	101
8.8. Tabelle E: Oligonukleotide zur SNaPshot-Sequenzierung der c DNA.....	101
8.9. Patientenfragebogen	102
Lebenslauf	104
Veröffentlichungen/Vorträge	105
Danksagung	106
Kurzfassung/Abstract.....	107
Eidesstattliche Erklärung.....	108

I. Einleitung

1.1. Historie der Ahornsirupkrankheit

Die Ahornsirupkrankheit wurde erstmals 1954 durch Menkes beschrieben (Menkes *et al.*, 1954). Damals wurde man erstmals auf eine Familie aufmerksam, bei der 4 von 6 Kindern innerhalb der ersten Lebenswoche an einer neonatalen metabolischen Enzephalopathie erkrankten und schließlich im Koma verstarben. Histopathologisch wiesen die verstorbenen Kinder einen Mangel an Myelin und eine ausgeprägte spongiöse Degeneration der weißen Hirnsubstanz auf. Gleichzeitig mit der neurologischen Symptomatik ließ sich ein intensiver süßlicher, ahornsirupartiger Geruch des Urins feststellen, eine weitere charakteristische Gemeinsamkeit (Westall, 1955). Aufgrund dieser Spezifität erhielt die Erkrankung ihren Namen Ahornsirupkrankheit, englisch MSUD (maple syrup urine disease). Vor einigen Jahren konnte die Substanz Sotolone, die auch in Ahornsirup enthalten ist, für diesen charakteristischen Geruch verantwortlich gemacht werden (Podebrad *et al.*, 1999). Somit trägt die Ahornsirupkrankheit ihren Namen zu Recht, obwohl der wenig gebräuchliche Name Leuzinose in vielerlei Hinsicht der bessere für diese Stoffwechselstörung wäre (Langenbeck *et al.*, 1984).

1960 konnte der bis dahin unbekannte Pathomechanismus der Ahornsirupkrankheit aufgeklärt werden. Es konnte bei den oben beschriebenen Kindern ein Enzymdefekt, sowohl in den Lymphozyten, als auch in den Fibroblasten nachgewiesen werden (Dancis *et al.*, 1960). Der Enzymdefekt führt zu einer stark verminderten Aktivität der Decarboxylierung von verzweigtkettigen α -Ketosäuren. Auf Grund dessen kommt es sowohl im Blut als auch im Gewebe zu stark erhöhten Konzentrationen der verzweigtkettigen α -Ketosäuren (branched chain α -keto acid, BCKA) und der zugehörigen Aminosäuren (branched chain amino-acids, BCAA) (Westall *et al.*, 1958). Die ausgeprägte Aktivitätsminderung der verzweigtkettigen α -Ketosäuren-

Dehydrogenase (branched chain α -ketoacid-dehydrogenase, BCKA-DH) ließ sich in Leukozyten und Fibroblasten der erkrankten Kinder nachweisen. In den Zellen ihrer Eltern war eine solche Aktivitätsminderung nicht zu finden. Sie waren phänotypisch unauffällig, weshalb für die Ahornsirupkrankheit ein autosomal rezessiver Erbgang postuliert wurde. Die soeben beschriebenen Kinder litten an der schweren klassischen Form der Ahornsirupkrankheit.

1961 wurde erstmals über eine von der klassischen Ahornsirupkrankheit abweichende, variante Form berichtet. Diese Verlaufsform war nur durch phasenweise auftretende metabolische Dekompensationen charakterisiert. Während solcher Episoden konnten hohe Plasmaspiegel der verzweigtkettigen Aminosäuren nachgewiesen werden (Morris *et al.*, 1961). Später wurden weitere, in der klinischen Ausprägung differierende variante Verlaufsformen der Ahornsirupkrankheit beschrieben.

1.2. Genetischer Hintergrund

Die Ahornsirupkrankheit ist mit einer geschätzten Inzidenz von 1:185.000 Neugeborenen in der weltweiten Bevölkerung eine seltene Stoffwechselkrankheit (Chuang und Shih, 2001). Sie kommt in allen Ethnien mit unterschiedlicher Manifestation vor. Bei den Mennoniten in Pennsylvanien wird sie aufgrund eines Foundereffekts (Foundermutation) mit einer Inzidenz von 1:176 Neugeborenen beschrieben (DiGeorge *et al.*, 1982). Des weiteren werden deutlich erhöhte Inzidenzen in Populationen mit einer Tradition für konsanguine Eheschließungen (Cousinenehe) festgestellt, so in der Türkei (etwa 1:50.000) und in anderen islamischen Ländern (Simon *et al.*, 2005).

Die MSUD wird autosomal-rezessiv vererbt. Die Krankheitsmerkmale kommen nur bei Vorliegen zweier krankheits-verursachender Allele (Homozygotie oder Compound-Heterozygotie für mutierte Allele) an einem Genlocus zur Ausprägung.

1.3. Multienzymkomplex der BCKA-DH

Die BCKA-DH ist ein Makromolekül mit einer molekularen Masse von 4×10^3 kDa und befindet sich an der inneren Mitochondrienmembran aller Gewebe (Yeaman *et al.*, 1984). Dieser Komplex besteht aus fünf katalytischen Untereinheiten:

der E1, E2, E3-Untereinheit, sowie einer Phosphatase und einer Kinase.

-E1-Untereinheiten: die Thiaminpyrophosphat-abhängige BCKA-Decarboxylase

- Sie besteht aus einem Heterotetramer (α_2, β_2) und besitzt die molekulare Masse von 170 kDa (E1 α : 91 kDa, E1 β :75,6 kDa)

-E2-Untereinheit: die Dihydrolipoyl Transacylase

- Sie bildet ein Homopolymer (α_{24}) und besitzt eine molekulare Masse von 46,7 kDa

-E3-Untereinheit: die Dihydrolipoyl Dehydrogenase

- Sie bildet ein Homodimer (α_2) und besitzt eine molekulare Masse von 110 kDa.

-BCKA-DH-Kinase:

- Sie besitzt eine molekulare Masse von 43kDa.

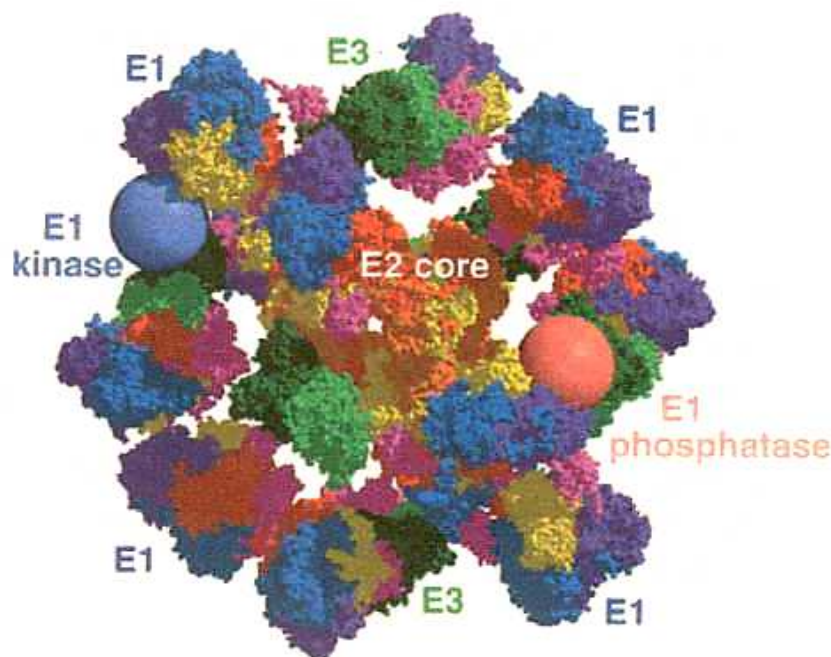
-BCKA-DH-Phosphatase:

- Sie besitzt eine molekulare Masse von 460 kDa.

Im Multienzymkomplex befinden sich um den mit 24 Kopien kubisch angeordneten E2-Kern 12 Kopien von E1 und 6 Kopien von E3 (Abb. 1). Die Phosphatase und Kinase sind über Ionenbindungen mit der E1-Untereinheit verbunden (Chuang und Shih, 2001). Während E1 und E2 spezifisch für die Katalyse der verzweigtkettigen α -Ketosäuren durch den Multienzymkomplex sind, ist E3 ein Bestandteil weiterer hochkonservierter

α -Ketosäure-Dehydrogenasen, welche spezifisch für die Katalyse von Pyruvat und α -Ketoglutarat (Pyruvat-Dehydrogenase, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase) sind. Es wird deutlich, dass bei einem genetischen Defekt, der die E3 Untereinheit betrifft, außer einer Erhöhung der verzweigtkettigen α -Keto- und Aminosäuren auch erhöhte Konzentrationen von Pyruvat und Laktat sowie von α -Ketoglutarat in den Körperflüssigkeiten vorliegen (Chuang und Shih, 2001). Deshalb wird der E3-Mangel als eigenständiges Krankheitsbild bezeichnet und findet im Rahmen dieser Arbeit keine Berücksichtigung.

Abbildung 1: Der Multienzymkomplex



Darstellung der dreidimensionalen Struktur und Anordnungen der fünf katalytischen Untereinheiten innerhalb des Multienzymkomplexes. (Entnommen aus *Æversson et al.*, 2000).

Des weiteren gehören dem Multienzymkomplex zwei spezifische aktivitätsregulierende Enzyme an – eine inaktivierende Kinase und eine aktivierende Phosphatase (Reed *et al.*, 1985). Dabei dient als Substrat der Phosphorylierung/Dephosphorylierung ein Serinrest innerhalb der E1 α -Untereinheit (Paxton *et al.*, 1986). Die Expression der spezifischen

Kinase wird über hormonelle und metabolische Komponenten reguliert (Danner *et al.*, 1998).

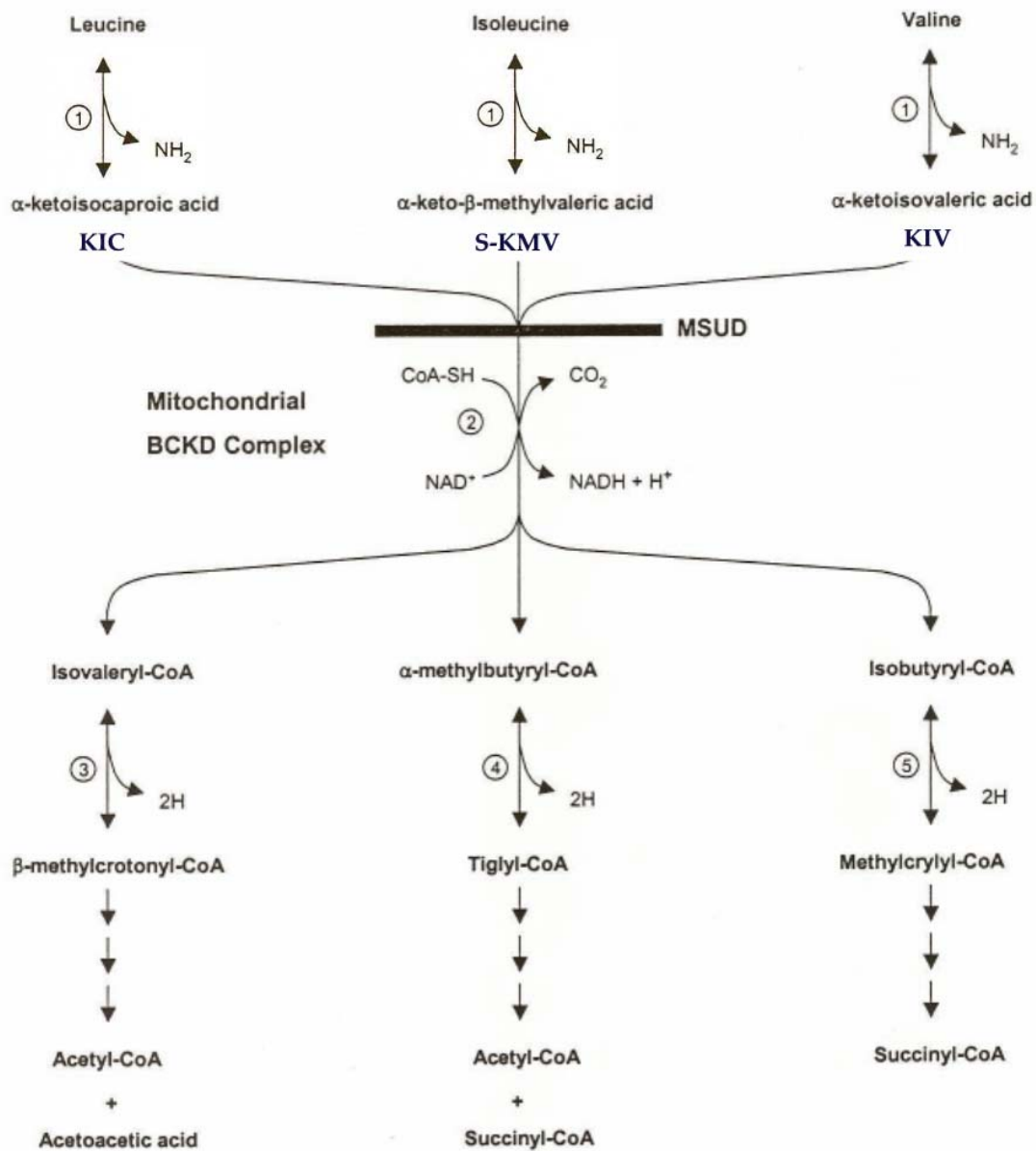
Die Aktivität des BCKA-DH Komplexes wird über drei Mechanismen reguliert:

- 1.) durch Produkte und Substrate bzw. Substratanaloga des Enzyms (Williamson *et al.*, 1979; Danner *et al.*, 1982)
- 2.) über eine reversible Phosphorylierung/ Dephosphorylierung
- 3.) über eine Regulation der Genexpression (Chuang *et al.*, 1983; Chinsky *et al.*, 1994).

1.4. Der pathogenetische Mechanismus

Der Ahornsirupkrankheit (MSUD, MIM #248600, McKusick, 1995) liegen verschiedene autosomal-rezessiv vererbte Defekte innerhalb des Multienzymkomplexes der verzweigtkettigen α -Ketosäuren-Dehydrogenase (BCKA-DH) zugrunde. Die reduzierte Aktivität der BCKA-DH führt zu einer deutlichen Einschränkung oder fast vollständigen Blockade des Abbaus der verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA) Leucin, Valin und Isoleucin auf der Stufe ihrer α -Ketosäuren (BCKA) (α -Ketoisocaproinsäure KIC, α -Keto- β - α -Ketoisovalerylsäure KIV, Methylvalerylsäure KMV) (Abb. 2). Letztere werden aus den entsprechenden Aminosäuren, welche Bestandteile von Nahrungs- und Gewebsproteinen sind, durch reversible Transaminierung gebildet. Infolge des gestörten Stoffwechselschritts kommt es zusätzlich zum Anstieg der endogen aus Isoleucin entstehenden, nicht proteinogenen Aminosäure L-Alloisoleucin.

Abbildung 2.: Der betroffene Stoffwechselweg



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

In Abhängigkeit vom Ausmaß des Enzymaktivitätsmangels existieren verschiedene Schweregrade der MSUD. Bei der schwersten (klassischen) Form fehlt die Enzymaktivität nahezu vollständig ($< 2\%$ Restaktivität in Fibroblastenkulturen; Dancis *et al.*, 1972; Schadewaldt *et al.*, 1989); bei den verschiedenen, leichter verlaufenden varianten Formen (intermediäre, intermittierende Formen) betragen die Enzymaktivitäten zwischen 2 und 30% der Norm (Dancis *et al.*, 1972; Schadewaldt *et al.*, 1989). Die temporär oder permanent stark erhöhten BCKA- und BCAA-Spiegel können zu schwerwiegenden Funktionsstörungen bzw. Schäden am Zentralnervensystem als ausschließlich betroffenem Organ führen (Snyderman *et al.*, 1988).

Unter den verzweigtkettigen Substanzen besitzt das Substanzpaar Leucin/KIC (α -Ketoisocaproinsäure) die stärkste Neurotoxizität. Diese beiden Substanzen liegen bei der klassischen MSUD in äquimolaren Plasmakonzentrationen vor (Langenbeck *et al.*, 1978).

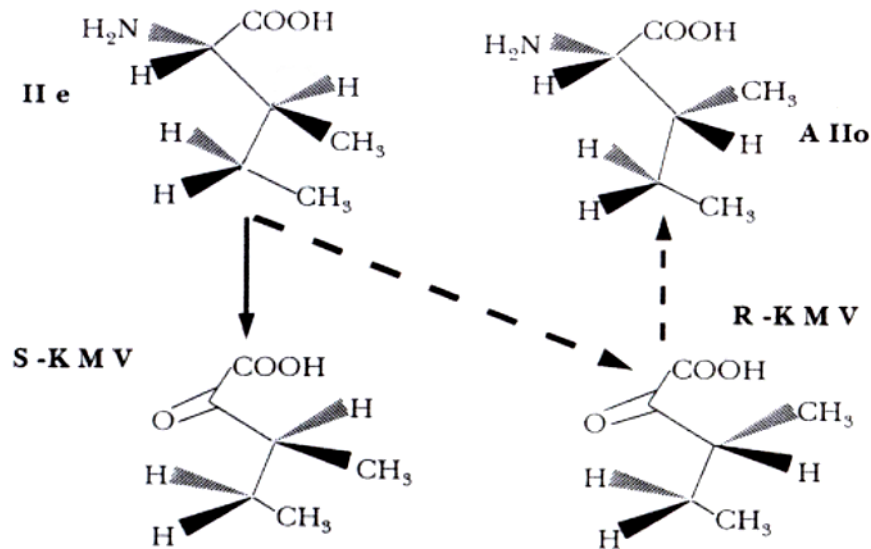
Bei allen Formen der MSUD ist Leucin von allen drei Aminosäuren immer am stärksten erhöht. Grund dafür ist, dass Eiweiß deutlich mehr Leucin als Valin und Isoleucin enthält und dass bei gestörtem Abbau der BCAA die Elimination von Leucin und der zugehörigen Ketosäure (KIC) aus dem Körper sehr viel langsamer verläuft als die von Valin und Isoleucin (Langenbeck *et al.*, 1984).

1.5. Alloisoleucin- ein diagnostischer Parameter

Sobald die Aktivität der BCKA-DH eingeschränkt ist, kommt es unter anderem auch zu einem Anstieg von Alloisoleucin, einer endogen aus Isoleucin gebildeten BCAA, die nicht in Protein enthalten ist und auch nicht in körpereigenes Protein eingebaut wird. Bei der Transaminierung von L-Isoleucin entstehen die beiden chiralen α -Ketosäuren, S- und R-KMV (α -Keto- β -Methylvalerylsäure), wobei R-KMV in sehr viel geringerer

Konzentration als S-KMV gebildet wird. Durch reversible Transaminierung entsteht aus R-KMV Alloisoleucin und aus S-KMV Isoleucin (Abb.3).

Abbildung 3: Mechanismus der Alloisoleucinbildung *in vivo*



Schematische Darstellung der Transaminierung von L-Isoleucin zu den beiden chiralen α-Ketosäuren S- und R-KMV (α-Keto-β-Methylvalerylsäure). Ile steht für Isoleucin, Allo für Alloisoleucin. (Entnommen aus der Broschüre: Ahornsirupkrankheit = Maple Syrup Urine Disease (MSUD), Milupa).

Alloisoleucin ist auch bei gesunden Individuen vorhanden, aber nur in sehr geringer Plasmakonzentration ($<2,0 \pm 0,5 \mu\text{mol/l}$) (Schadewaldt *et al.*, 1999). Signifikant erhöhte Alloisoleucinspiegel konnten letztendlich nur bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit nachgewiesen werden. Man kann das Vorliegen erhöhter Alloisoleucin-Konzentrationen als pathognomonisch für die MSUD bezeichnen. Demnach erhärtet das Vorliegen einer erhöhten Alloisoleucinkonzentration im Plasma bei Personen mit nur mäßig erhöhten BCAA, die Diagnose der MSUD (Schadewaldt *et al.*, 1999).

1.6. Klinische Phänotypen

Aufgrund der klinischen Symptomatik bzw. des klinischen Verlaufs, des Ausmaßes der erforderlichen Therapie, der Beeinflussung der Plasma BCAA-Spiegel durch Thiamin (Kofaktor der BCKA-Decarboxylase) sowie einiger biochemischer Parameter werden

derzeit vier klinische Phänotypen der MSUD unterschieden: eine klassische Form, eine sog. intermediäre Variante, eine sog. intermittierende Variante und eine Thiamin-abhängige Variante (Scriver *et al.*, 1971; Chuang und Shih, 2001).

1.6.1. Die klassische Form der MSUD

Typischerweise wird das Neugeborene mit klassischer MSUD ab dem 4. Lebenstag lethargisch, sobald Leucin und KIC kritische Konzentrationen in Blut und Geweben überschreiten. Das Kind zeigt Trinkschwäche und entwickelt eine progrediente neurologische Symptomatik im Sinne einer metabolischen Enzephalopathie mit Hypo- und Areflexie, eine Rumpfhypotonie bei gleichzeitiger Muskeltonuserhöhung der Extremitäten, eine vorgewölbte Fontanelle (als Zeichen eines Hirnödems), zerebrale Krampfanfälle, respiratorische Insuffizienz und wird schließlich ohne Dramatik tiefkomatös. Mit Auftreten der neurologischen Symptomatik beginnt das Neugeborene intensiv süßlich, ahornsirupartig zu riechen. Während dieser Phase ist ein typisches EEG-Muster mit kammähnlichem Rhythmus vorhanden (Korein *et al.*, 1994). Das Hirnödem ist in der cerebralen Bildgebung (CT, MRT) sichtbar (Brismar *et al.*, 1990). In Abhängigkeit von Höhe und Dauer der Konzentrationen an neurotoxischen Metaboliten sind diese Symptome unter adäquater Therapie mit rascher Senkung der Metabolite reversibel oder münden in neurologische Defektsyndrome, die von einer Intelligenzminderung bis hin zur spastischen Zerebralparese reichen können (Snyderman, 1988; Kaplan *et al.*, 1991; Hilliges *et al.*, 1993).

Im Allgemeinen werden die Neugeborenen mit klassischer MSUD in der zweiten Lebenswoche aufgrund der Enzephalopathie diagnostiziert. Sie sind dann schon kritisch krank und komatös. Die Verdachtsdiagnose erfolgt eher selten aufgrund des immer bestehenden typischen, ahornsirupartigen Geruchs. Die Bestätigung der Diagnose erfolgt mittels Aminosäurenanalyse im Plasma, die im allgemeinen einen Leucinspiegel von > 2500 µmol/l aufdeckt (Normbereich <140 µmol/l). Die Spiegel für Valin und Isoleucin

sowie für das als pathognomonisch geltende Alloisoleucin sind ebenfalls deutlich über der Norm erhöht, bleiben aber meist $< 900 \mu\text{mol/l}$. Gleichzeitig sind in Plasma und Urin auch die entsprechenden Ketosäuren stark erhöht. Die Restaktivität der BCKA-DH in kultivierten Hautfibroblasten oder Lymphozyten beträgt bei der klassischen MSUD $\leq 2\%$ der Norm (Dancis *et al.*, 1972; Schadewaldt *et al.*, 1989).

1.6.2. Verschiedene variante Formen der MSUD

In etwa 20% der Fälle von MSUD liegt aufgrund einer höheren Restaktivität der BCKA-DH eine leichtere Variante, mit milderem klinischen Verlauf, vor. Bei der sogenannten *intermittierenden Form* (Scriver *et al.*, 1971; Chuang und Shih, 2001) reagieren die Kinder oftmals erst im Alter von einigen Monaten oder im Kleinkindesalter auf Infekte, Impfungen, Operationen oder auf plötzliche, übermäßige Proteinzufuhr mit akuten neurologischen Symptomen wie Ataxie, Somnolenz und Koma und entwickeln eine Ketoazidose. Solche außergewöhnlichen Stoffwechselbelastungen lassen die sonst nur leicht erhöhten Metabolitspiegel in den neurotoxischen Bereich ansteigen (Chuang und Shih, 2001). Der typische Ahornsirupgeruch tritt auf und im Urin werden die BCKA in großen Mengen ausgeschieden. Oft wird die richtige Diagnose erst nach mehreren Episoden gestellt. Einige Kinder verstarben in solchen Krisen. Im Allgemeinen entwickelten sie sich aber neurologisch und geistig normal. Bei dieser Variante wird die Restaktivität der BCKA-DH im Bereich von 5-20% angegeben (Chuang und Shih, 2001).

1961 beschrieben Morris *et al.* erstmals ein 24 Monate altes Mädchen mit einer solchen intermittierenden Form der MSUD. Das Kind zeigte wiederholt Ataxie und Lethargie während Infektionen der oberen Luftwege mit Otitis media. In solchen Episoden konnten hohe BCAA- und BCKA-Spiegel im Plasma und Urin nachgewiesen werden. Auch roch der Urin charakteristisch nach Ahornsirup (Morris *et al.*, 1961). In der Literatur sind mehrere Patienten mit dieser Verlaufsform beschrieben (Chuang und Shih, 2001). Therapeutisch wurde während dieser Episoden die Proteinzufuhr mit der

Nahrung unterbrochen und auch in symptomfreien Intervallen eine gewisse Restriktion des Nahrungsproteins vorgenommen. In der Regel entwickelten sich diese Kinder normal und wiesen später weder geistige noch neurologische Störungen auf.

Bei der sogenannten *intermediären Form* (Scriver *et al.*, 1971; Chuang und Shih, 2001), fallen die Patienten meist zum Ende des ersten Lebensjahres mit einer verzögerten psychomotorischen Entwicklung auf, ohne daß es zum episodenhaften, Krankheitsverlauf gekommen wäre. Diese Kinder litten wahrscheinlich langfristig und unkontrolliert an hohen BCAA und BCKA- Spiegeln in Blut und Gewebe. Bei dieser klinischen Variante wurden Restaktivitäten für die BCKA-DH in Fibroblasten von 3-30% gemessen (Chuang und Shih, 2001).

Die erste Patientin mit einer intermediären Variante wurde 1970 von Schulman *et al.* beschrieben. Sie fiel im Alter von 19 Monaten mit einer psychomotorischen Retardierung, neurologischen Symptomen und einem ahornsirupartigen Geruch des Urins auf. Unter einer normalen Ernährung war es zu einer psychomotorischen Entwicklungsstörung gekommen. Im Plasma und Urin waren konstant hohe Spiegel von BCAA und BCKA vorhanden. Unter einer Diät mit eingeschränktem Proteingehalt waren die klinische Symptomatik sowie die hohen BCAA und BCKA-Spiegel in den Körperflüssigkeiten rückläufig (Schulman *et al.*, 1970).

Bis heute wurden mehr als 20 Fälle mit einer intermediären Variante in der Literatur beschreiben. Bei ihnen standen ein psychomotorischer und neurologischer Entwicklungsrückstand im Vordergrund; seltener wurde über akute enzephalopathische Episoden berichtet. Drei Patienten fielen bereits als Neugeborene mit einer Ophtalmoplegie auf (Chhabria *et al.*, 1979). Eine Patientin wurde erst mit 19 Jahren diagnostiziert. Sie wies lediglich eine Intelligenzminderung auf. Man konnte auch bei ihr konstant hohe BCAA- und BCKA-Spiegel im Plasma und Urin nachweisen (Scriver *et al.*, 1971).

Bisher wurde das wiederholt postulierte Vorkommen von Thiamin-abhängigen MSUD-Varianten, die auf pharmakologische Dosen von Thiamin (Cofaktor im Enzymkomplex) mit einem drastischen Abfall des Plasmaleucin reagieren, nur einmal bestätigt (Chuang und Shih, 2001). Es handelt sich um ein Kind mit einer milden intermittierenden Variante, welches auf eine Thiamingabe hin mit einem drastischen Abfall der Leucinkonzentration im Plasma reagierte (Scriver *et al.*, 1971).

Bei kritischer Analyse der Literatur lassen sich aufgrund des klinischen Phänotyps somit nur zwei nicht-klassische MSUD-Varianten herausarbeiten. Die Charakteristika sind in der folgenden Tabelle gegenübergestellt:

Tabelle 1: Klassifizierung varianter Formen der MSUD

Klinischer Phänotyp	Zeitpunkt: Diagnosestellung	Symptomatik / Verlauf	Biochemische Parameter	Restaktivität: BCKA-DH (% d. Norm)
Intermediär	0,5-2 Jahre	Psychomotorisch & neurologisch auffällig. Weniger akute enzephalopathische Episoden. Bleibender Hirnschaden	BCAA permanent ↑	3-30
Intermittierend	0,5-7 Jahre	Episodisch Enzephalopathien zu Zeiten eines katabolen Stress. Normale Entwicklung	Im symptomfreien Intervall BCAA normal	5-20

(modifiziert nach Chuang und Shih, 2001).

Wahrscheinlich wird mit einer solchen Klassifizierung nicht das gesamte Spektrum der MSUD-Varianten erfasst. Vermutlich gibt es, wie auch bei anderen angeborenen Stoffwechselstörungen, z.B. bei der milden Hyperphenylalaninämie, Isovalerialaninidämie und Citrullinämie (Scriver und Kaufman, 2001; Ensenaer *et al.*, 2004; Haberle *et al.*, 2002;) eine grosse klinische Vielfalt mit auch asymptomatischen Fällen, in Abhängigkeit von der Enzym-Aktivitätsminderung.

1.7.1. Diagnostik

Bei der klassischen MSUD ist der rasche Anstieg der verzweigtkettigen Amino- und Ketosäuren nach der Geburt Folge des Katabolismus und der begonnenen Milchnahrung. Im Allgemeinen ist das Neugeborene bei Diagnosestellung kritisch krank und in der Regel deckt die zur Diagnosesicherung erforderliche Analyse der Plasmaamino­säuren hohe Leucinspiegel (2000-5000 $\mu\text{mol/l}$) auf. Valin, Isoleucin und Alloisoleucin sind in deutlich geringeren Konzentrationen vorhanden. Im Urin ist der α -Ketosäuren anzeigende Dinitrophenylhydrazin (DNPH)-Test stark positiv.

Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit fallen entweder durch eine psychomotorische Retardierung und neurologische Symptomatik im ersten Lebensjahr auf oder während einer Episode von katabolem Stress. Die Plasmaleucinspiegel sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung stark erhöht und liegen etwa zwischen 500 und 1500 $\mu\text{mol/l}$ (Chuang und Shih, 2001). Bei Verdacht auf eine MSUD-Variante spricht das Vorliegen eines erhöhten Alloisoleucinspiegels im Plasma ($> 5 \mu\text{mol/l}$) während des Zeitpunkts der Diagnosestellung für eine MSUD (Schadewaldt *et al.*, 1999). Differentialdiagnostisch ist Alloisoleucin der spezifischste und sensitivste Parameter der varianten Verlaufsformen zur Abgrenzung von anderen durch Katabolismus ausgelösten ketoazidotischen Zuständen. Durch einen ausgeprägten Gewebskatabolismus kann es bei interkurrenten Erkrankungen auch bei Individuen ohne Ahornsirupkrankheit zu erhöhten Spiegeln der verzweigtkettigen Plasmaamino­säuren, wahrscheinlich jedoch ohne Erhöhung von Alloisoleucin, kommen (Hambraeus *et al.*, 1972; Held *et al.*, 1976).

Für eine Abschätzung des Schweregrades der Ahornsirupkrankheit kann das Konzentrationsverhältnis von Alloisoleucin zu Isoleucin im Plasma unter steady-state-Bedingungen des Organismus (Wendel *et al.*, 1989; Schadewaldt *et al.*, 1989) sowie die Restaktivität in kultivierten Hautfibroblasten, angegeben als $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Leucin-

Dekarboxylierung (Wendel *et al.*, 1981) herangezogen werden. Des weiteren gibt es Spezialuntersuchungen, wie die Messung der Eliminationskonstante K_e nach einer oralen Alloisoleucin-Belastung (Schadewaldt *et al.*, 1991) und die Messung der *in vivo* Ganzkörper-Leucinoxidation mittels stabiler Isotope (Schadewaldt *et al.*, 2001).

Seit 2002 können sowohl die klassische als auch die varianten Formen der MSUD im Neugeborenenenscreening auf angeborene Stoffwechselstörungen bereits am 3. Lebenstag aus Trockenblut mittels Tandem-Massenspektrometrie aufgedeckt werden. Dadurch gelingt es, betroffene Neugeborene präsymptomtisch oder mit erst leichten Symptomen aufzuspüren. Auch früher war mancherorts ein Neugeborenenenscreening auf MSUD mittels Guthrie-Test (mikrobieller Hemmtest mit Trockenblut) etabliert. Mit dieser Methode können die Ergebnisse aber meist erst in der zweiten Lebenswoche erhalten werden.

Bei einer Risikoschwangerschaft, d.h. in einer Familie mit einem bereits an MSUD erkrankten Kind, kann die Pränataldiagnostik ab der 8. SSW. aus Chorionzotten erfolgen. Enzymaktivitätsmessungen oder molekulargenetische Untersuchungen sind die Basis der Diagnostik.

1.7.2. Therapie

Die Therapie der klassischen MSUD besteht in einer lebenslangen, sehr stark in natürlichem Protein eingeschränkten Diät. Ziel ist es, die Plasmakonzentrationen der BCAA und ihrer Metabolite möglichst in den Normbereich abzusenken. Dabei muss in Abhängigkeit von Alter und Wachstumsrate immer eine ausreichende Zufuhr der drei essentiellen BCAA Leucin, Valin und Isoleucin über natürliches Protein zur Gewährleistung eines normalen Wachstums und einer normalen körperlichen Entwicklung des Kindes verabreicht werden (Snyderman *et al.*, 1964); Chuang und Shih, 2001). Aus diesem Grund müssen ständig spezielle Aminosäurengemische, die frei von

Leucin, Valin und Isoleucin und zusätzlich mit Mineralien und Vitaminen angereichert sind, zum Ausgleich der sehr geringen Proteinzufuhr substituiert werden. Während episodischer Stoffwechselkrisen, ausgelöst durch katabolen Stress mit einem starken Anstieg der BCAA in Blut und Geweben, muss die Zufuhr von Proteinen mit der Nahrung vorübergehend weiter reduziert werden. Außerdem kann in schweren Fällen der Katabolie durch die Behandlung mit Insulin i.v. und Glukose i.v. entgegengewirkt werden (Wendel *et al.*, 1982). In Einzelfällen sind auch extrakorporale Maßnahmen zur Entfernung hoher BCAA- und BCKA- Spiegel erforderlich (Jouvet *et al.*, 1997).

Die Therapie der varianten Verlaufsformen besteht, dem Schweregrad angepasst, entweder aus einer Diät, wie bei der klassischen MSUD, oder aus einer moderat proteinreduzierten Ernährung und der Vermeidung von Proteinexzessen. In besonders schweren Fällen von Stoffwechselentgleisung mit sehr hohen Leucinspiegeln, die auch bei varianten Formen der MSUD vorkommen können, ist die Proteinzufuhr mit der Nahrung vorübergehend auszusetzen. Eine parenterale Flüssigkeitszufuhr (Glukose/Elektrolyte) kann für einige Tage erforderlich werden.

1.8. Molekulargenetik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden molekulargenetische Analysen an zwei der bereits beschriebenen katalytischen Untereinheiten des BCKA-DH Komplexes durchgeführt. Hierbei handelt es sich um die E1b-Untereinheit, welche sich wiederum aus E1 α - und E1 β -Untereinheiten zusammensetzt, sowie um die E2 -Untereinheit.

Die für die jeweiligen Untereinheiten kodierenden Gene liegen auf unterschiedlichen Chromosomen. Das E1 α -Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert und ist kartiert unter 19q13.1-q13.2 (Crabb *et al.*, 1989; Fekete *et al.*, 1989). Das E1 β -Gen befindet sich auf Chromosom 6 (6q21-p22) (Mitsubuchi *et al.*, 1991; Zneimer *et al.*, 1991). Das E2-Gen liegt auf Chromosom 1 (1p31) (Herring *et al.*, 1991; Lau *et al.*, 1991; Zneimer *et al.*, 1991). Das

Gen für die BCKA-DH Kinase wurde dem Chromosom 16 zugeordnet (Chuang *et al.*, 2002). Dort ist es unter 16p11.2 kartiert. Das humane BCKA-DH Phosphatase-Gen konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt keine chromosomale Zuordnung finden.

Die Genom-Datenbank (National Center for Biotechnology Information; NCBI-Blast Search) beinhaltet zur Zeit (NCBI, GenBank, Stand 12/2005) die cDNA Referenzsequenzen **NM_000709** für E1 α , **NM_183050** für E1 β und **NM_001918** für E2. Das humane E1 α -Gen (GenBank L08634) besteht aus 9 Exonen und ist mehr als 55 kb lang (Dariush *et al.*, 1991; Chuang *et al.*, 1993). Das E1 β -Gen ist über 100kb lang und besitzt 10 Exonen (Gen Bank D90382-D90391; Mitsubuchi *et al.*, 1991). Das E2-Gen ist 68kb lang und besteht aus 11 Exonen (GenBank X15069/X68104; Lau *et al.*, 1992).

In Abhängigkeit von der betroffenen Untereinheit wird die Ahornsirupkrankheit derzeit in 4 verschiedene molekulargenetische Formen unterteilt. Hierbei handelt es sich um den Typ IA (MIM #608348), dem krankheitsverursachende Mutationen im E1 α -Gen zugrunde liegen. Des weiteren handelt es sich um den Typ IB (MIM #248611), dem krankheitsverursachende Mutationen im E1 β -Gen zugrunde liegen. Dem Typ II (MIM #248610) liegen krankheitsverursachende Mutationen im E2-Gen zugrunde. Typ III (MIM #248900) beschreibt Mutationen, die im E3-Gen liegen. Für bislang noch nicht gefundene Mutationen im BCKA-DH Kinase und Phosphatase-Gen sind die Bezeichnungen Typ IV und V vorbehalten.

Derzeit sind für die verschiedenen Formen der MSUD über 80 krankheitsverursachende Mutationen in der Literatur beschrieben. Die meisten sind mit dem klassischen Phänotyp assoziiert (Ævarsson *et al.*, 2000; Edelmann *et al.*, 2001; Nellis *et al.*, 2001; Henneke *et al.*, 2003; Chuang und Shih, 2001).

Ein Teil der bekannten Mutationen sind auch mit dem intermediär-varianten und intermittierend-varianten Phänotyp assoziiert. Hierfür wurden bisher hauptsächlich

Mutationen im E1 α - (Typ IA) und im E2-Gen (Typ II) gefunden (Nellis *et al.*, 2001). Bislang wurden im E1 β -Gen (Typ IB) für variante Formen 5 Mutationen beschrieben, die hauptsächlich dem intermediären Phänotyp zugeordnet werden (Edelmann *et al.*, 2001, Hennecke *et al.*, 2003, Rodriguez-Pombo *et al.*, 2005). Bei allen MSUD-Patienten, bei denen der Genotyp bezüglich der Krankheit bekannt wurde, bestand entweder eine Homozygotie oder eine „compound“- Heterozygotie für mutierte Allele an jeweils einem Genlocus (für eine der drei Untereinheiten). Die Kombination sehr vieler unterschiedlicher Allele kann die hohe Variabilität des klinischen Phänotyps bei der MSUD erklären.

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist es:

1. bei 21 Patienten mit einer varianten Form der MSUD anhand der klinischen und biochemischen Parameter eine Einteilung in verschiedene Schweregrade vorzunehmen, um dadurch Aufschluss über das gesamte Spektrum der nicht-klassischen MSUD zu erhalten,
2. aus den zu definierenden Gruppen von Schweregraden jeweils 2-3 Patienten molekulargenetisch zu charakterisieren,
3. die Auswirkungen/Effekte der gefundenen Mutationen in Bezug auf die Tertiärstruktur der Untereinheiten des Multienzymkomplexes zu deuten,
4. eine Genotyp –Phänotyp- Korrelation zu erarbeiten.

II. Patienten, Material und Methoden

2.1. Klinische Analyse und Methode

2.1.1. Patienten

Es wurden 21 Patienten unterschiedlicher ethnischer Herkunft im Alter von 2,5 bis 31 Jahren mit einer nicht-klassischen varianten Form der MSUD in die Studie aufgenommen. Diese Patienten wurden in Deutschland, Österreich und der Schweiz in verschiedenen pädiatrisch-metabolischen Zentren betreut.

2.1.2. Ermittlung von klinischen und biochemischen Daten

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

Es wurden Daten zu Art und Alter bei der klinischen Manifestation (Symptome, Plasma-BCAA-Spiegel) erhoben, außerdem Details zur Behandlung (Art der Diät, Leucintoleranz, Plasmaleucinkonzentrationen unter der Behandlung), sowie Aspekte der psychomotorischen Entwicklung und zum intellektuellen und psychosozialen „Outcome“ (Schul-und Berufskarriere, Lebensweise).

Da die Patienten in verschiedenen Zentren behandelt wurden, sind die von den Zentren erstellten Werte der Plasma BCAA mittels verschiedener Geräte und nach verschiedenen Messmethoden (Aminosäurenanalysator, HPLC) bestimmt worden. Des weiteren wurde nicht in jedem Zentrum Alloisoleucin gemessen. Die BCKA-DH

Restaktivität wurde in intakten kultivierten Fibroblasten mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierten Leucin als Substrat ($1\text{-}^{14}\text{C}$ -Leucin-Dekarboxylierung) entweder in einem Mikrottestsystem (Wendel *et al.*, 1981) oder nach der Methode von Schadewaldt *et al.* (Schadewaldt *et al.*, 1989) bestimmt. Des weiteren konnten einige wenige Patienten durch die Untersuchung der *in vivo* Ganzkörper-Leucin-Oxidation (WBLO) mittels ^{13}C -markiertem Leucin (Schadewaldt *et al.*, 2001) und der metabolischen Alloisoleucin-Eliminationskonstante (Ke) nach einer Alloisoleucin-Belastung näher charakterisiert werden (Schadewaldt *et al.*, 1991).

2.1.3. Zuteilung der Patienten zu einem Phänotyp von varianter MSUD

Die 21 Patienten wurden anhand des klinischen Schweregrades einer von drei Phänotyp-Gruppen zugeteilt:

- Gruppe A** = sehr milde asymptomatische Variante,
- Gruppe B** = milde Variante (dem intermittierenden Phänotyp der Literatur entsprechend),
- Gruppe C** = schwere Variante (dem intermediären Phänotyp der Literatur entsprechend),

sowie einer **Gruppe D**, in die Kinder aufgenommen wurden, die frühzeitig seit der Diagnosestellung in der Neugeborenen-Periode (z.B. im Neugeborenenenscreening) behandelt bzw. überwacht wurden.

2.1.4. Statistische Auswertung:

Die Daten wurden mit Hilfe des SPSS-12 (SPSS Inc, Chicago, IL) analysiert. Der Wilcoxon-Rangsummentest wurde für den Vergleich innerhalb der verschiedenen Gruppen (A-D) herangezogen und ggf. nach Mann-Whitney adjustiert. Für eine

statistisch signifikante Differenz zwischen den unabhängigen Gruppen steht ein Wert von $p < 0,05$.

2.2. Molekulargenetische Untersuchung, Material und Methode

2.2.1. Patienten zur Genotypbestimmung

13 Patienten wurden molekulargenetisch untersucht. Dabei wurden die drei Gene für die E1 α -, E1 β - und E2-Untereinheit des BCKA-DH Enzymkomplexes sequenziert. Bei acht Patienten wurde darüber hinaus auch der Genotyp der Eltern bestimmt.

2.2.2. Material

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

Merck (Darmstadt), Sigma Aldrich Chemie GMBH (Deisenhofen). Die Elektrophorese-Geräte bzw. deren Zubehör wurden von den Firmen OWI-Separations System Biorad (München) und Gibco BRL GmbH (Eggenstein) verwendet. Für photometrische Messungen wurden das Beckmann-Coulter DU 640B Spectrophotometer, sowie Hellma-Präzisionsküvetten, Quarzglas Suprasil und für die Zentrifugation Geräte der Firma Eppendorf (Hamburg) und Beckmann (Klosterneuburg) verwendet. Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

2.2.3. Methoden

2.2.3.1. Isolierung von mRNA

Materialien: PAXgeneTM-RNA-Validation-Kit, Qiagen, (Hilden)

PAXgeneTMBlood RNA Kit, Qiagen, (Hilden)

Die RNA wird aus Vollblut über das PAXgeneTM- RNA- Validation- Kit- System gewonnen. Dieses spezielle Vacutainersystem ist mit einem Stabilisator versehen, der es ermöglicht, die RNA bis zu einer Woche degenerationsfrei zu konservieren.

Die Isolierung der RNA erfolgt mittels des PAXgeneTMBlood-RNA- Kit nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde bei 260 und 280 nm photometrisch gemessen.

2.2.3.2. Reverse Transkription von mRNA

Materialien: Oligo(dT)15, Roche ®

Superscript TM II RNase H⁻Reverse Transkriptase Invitrogen®

Die primären RNA-Transkripte wurden zunächst verkürzt, da sie biologisch inaktive Sequenzen beinhalten. Dies geschieht mittels reverser Transkription, wobei die m-RNA an beiden Enden modifiziert und gespleißt wird. Bei diesem Vorgang werden eingeschobene, nichtkodierende Sequenzen (Introns) herausgeschnitten und die verbleibenden, kodierenden Sequenzen (Exons) wieder zusammengefügt. Die entstandene cDNA trägt nun ausnahmslos die Information für die lineare Aminosäuresequenz der Proteine. Die RNA-Transkription wird mittels eines modifizierten Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Dazu werden 4 µl zellulärer RNA (bekannter Konzentration) mit 3 µl Oligo dT (8 nmol) in 15 µl RNase freiem Wasser gelöst und für 10 min bei 65 °C denaturiert. Die Probe wird auf Eis inkubiert und 14 µl Master Mix, welcher 6 µl 5x Puffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3 bei Raumtemperatur, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 3 µl DTT (0,1 M), 1,5 µl dNTPs (10 mM) und 2 µl Superscript (200 U/µl) enthält, zugegeben. Die reverse Transkription erfolgt bei 37° C während 60 min. Danach werden die Proben für 10 min bei 65° C erneut denaturiert. Die gebildete cDNA wird bei -20°C tiefgefroren und gelagert.

2.2.3.3. Isolierung von genomischer DNA

Materialien: EDTA-Blut

QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen, (Hilden)

Die genomische DNA wurde aus EDTA-Blut mit Hilfe des QIAamp DNA-Mini-Kit nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Amplifikation von DNA-Fragmenten

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

Hot Star Taq-Polymerase™, Qiagen, (Hilden)

Taq-Polymerase™, Qiagen, (Hilden)

Primer (25 pmol/µl), Firma MWG-Biotech, (Ebersberg)

Die Amplifikation der cDNA bzw. DNA erfolgt mit spezifischen Oligonukleotiden, die eine Länge von 16 bis zu 23 bp haben. E1α, E1β und E2 sind in jeweils 4-7 Primerpaare für die Amplifikation von Fragmenten mit einer Länge von ~360 bp pro Primerpaar

aufgeteilt. Bei Amplifikation genomischer DNA sind die Gene E1 α , E1 β und E2 jeweils in 9-11 Primerpaare für eine Fragmentlänge von 117-378 bp aufgeteilt. Die Nukleotidsequenzen und spezifische Anlagerungstemperatur der verwendeten Oligonukleotide für die cDNA bzw. der DNA werden im Anhang in den Tabellen A bis E beschrieben.

Der spezifische Schmelzpunkt wird als T_M – Wert beschrieben und wird nach folgender Formel berechnet: $T_M = G + C \times 4 + A + T \times 2$

Die spezifische Anlagerungstemperatur wird als T_A – Wert beschrieben und wird nach folgender Formel berechnet: $T_A = T_M - 4^\circ \text{C}$

Reaktionsansatz für cDNA:

In den 34 μl Reaktionsansatz werden 27,5 μl Aqua dest., 4 μl Puffer (10mM Tris-HCL, 50 mM KCL und 0,1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl_2), 1,5 μl dNTP's und 1 μl Taq-Polymerase (Hot-Star-Taq 5 U/ μl) gemischt. Die Ansätze werden mit 3 μl cDNA und jeweils 1,5 μl (25pmol/ μl) des 5'-und 3'-Oligonukleotids versetzt. Die Reaktionsansätze sind für E1 α , E1 β und E2 gleich; die Ansätze werden im Trio-Thermoblock der Firma Biometra Göttingen wie folgt inkubiert:

1 Zyklus	95° C 15min
35 Zyklen	95° C 1min (Denaturierung)
	X° C 1min (Primer-Anlagerung)
	55° C 2min (Primer-Verlängerung)
1 Zyklus	72° C 2min
	4° C ∞

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

Bei Verwendung der Hot-Star-Taq-Polymerase (5U/ μ l) ist zu beachten, dass sie wegen ihrer Lipidhüllschicht 15min bei 95°C inkubiert werden muss, um die Aktivität einzuleiten. Damit ist ihre Spezifität gegenüber der normalen Taq-Polymerase erhöht. Desweiteren besteht ein Vorteil darin, dass die Matrizen – DNA über eine längere Zeit bei einer höheren Temperatur und damit leichter vollständig denaturiert werden kann. Eine Einschränkung der Enzymaktivität tritt bei der erhöhten Temperatur auch über einen längeren Zeitraum nicht ein. Die DNA-Fragmente können nun elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Reaktionsansatz mit genomischer DNA:

In den 34 μ l Reaktionsansatz werden 28 μ l Aqua dest, 4 μ l Puffer (10mM Tris-HCL, 50 mM KCL und 0,1% Triton X-100, 1,5 mM MgCL₂) 1,5 μ l dNTP's und 1 μ l Taq-Polymerase gemischt. Die Ansätze werden mit 3 μ l g DNA und jeweils 1,5 μ l (25pmol// μ l) des 5'-und 3'-Oligonukleotids versetzt. Die Reaktionsansätze sind für E1 α , E1 β und E2 gleich.

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

1 Zyklus	96° C 5min
30 Zyklen	94° C 45 sec (Denaturierung)
	X° C 1min (Primer-Anlagerung)
	72° C 45 sec (Primer-Verlängerung)
1 Zyklus	72° C 3min
	4° C ∞

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

Die DNA-Fragmente können nun elektrophoretisch aufgetrennt werden.

2.2.3.5. Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese

Material: Agarosegel, Peglab Biotechnologie GmbH, (Erlangen)
123bp-Leiter, Invitrogen ®

Die Prozentigkeit des Gels beträgt je nach Auftrennung 1-2%. Es werden 10µl Laufpuffer (30% Glycerin, 0,25% Xylencyanol, 0,25 % Bromphenolblau) mit 40µl amplifizierter DNA-Fragmente verdünnt. Die gesamte Menge wird auf das Agarosegel gegeben. Die Elektrophorese wird bei 200mA (mit nicht mehr als 120V) in 1x TBE-Puffer (89 mM Tris-HCL, 89 mM Borsäure, 2mM Na-EDTA) für ca. 90-180 Minuten durchgeführt. Als DNA-Längenstandard wird die 123-bp-Leiter zugegeben.

Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgt nach 10-15 minütiger Inkubation des Agarosegels in einer 0,5µg/ml Ethidiumbromidlösung mit nachfolgender Anregung des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids bei 365 nm unter UV-Licht. (UV-Transluminator GE-FLX-20L, Firma AGS, Heidelberg). Das spezifische Bandenmuster wird photographisch dokumentiert. (Polaroid-Kamera-System DS-34, AGS, Heidelberg).

2.2.3.6. Aufreinigung von DNA-Fragmenten durch Säulenchromatographie

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

Die aus dem Agarosegel isolierten, spezifischen PCR-Produkte werden gewogen und mit der dreifachen Menge ihres Gewichtes mit QG-Puffer (pH <7,5) für 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Danach wird die Menge von Isopropanol hinzugegeben, die dem 1-fachen Gelvolumenanteil entspricht. Der gesamte Ansatz wird über die QIAquick-Säulen gegeben. Über mehrere im Protokoll vorgesehene Waschschrte wird das PCR-Produkt, welches sich im Filter der QIAquick-Säule befindet, aufgereinigt. Für die

Eluation der DNA werden 30µl EB-Puffer (10mM Tris-HCL, pH 8,5) verwendet. Bei allen Zwischenschritten erfolgt eine 1-minütige Zentrifugation bei 14.000 x g.

2.2.3.7. Sequenzier-Polymerasekettenreaktion (Cycle-Sequencing)

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

Das Big Dye Terminator Kit enthält verschiedene Nukleotide, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehen sind. Mit Hilfe der "Cycle"-Sequenzierreaktion werden die markierten Nukleotide in das aufgereinigte DNA-Fragment eingebaut. Der Gesamtansatz einer Sequenzierprobe-Probe (20µl) setzt sich zusammen aus:

1µl isoliertem DNA-Fragment (je nach Konzentration des Amplifikates werden die Fragmente 1:2-1:6 mit Aqua dest. verdünnt) 2µl Big Dye Reagenz und 1 µl Primer (25 pmol/µl), 3µl Sequenzier-Puffer und 13µl RNA`se freiem Wasser.

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

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

Der Heizdeckel hat eine Temperatur von 95°C.

2.2.3.8. Elektrophoretische Datenanalyse am ABI 310

Materialien: DyeEx Spin Columns, Qiagen, (Hilden)

High-dye-Formamid™, Applied Biosystems, (Weiterstadt)

POP-6™, Applied Biosystems, (Weiterstadt)

Die Proben werden mittels DyeEx Spin Columns nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das gesamte Eluat wird mit 15µl High-dye-Formamid versetzt. Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach der Kettenabbruchmethode mittels Didesoxynukleotide. Die Abbruchprodukte werden mit Hilfe des automatischen Sequenziergerätes, ABI PRISM™ 310 Genetic-Analyzer (Applied Biosystems), aufgetrennt, der die Fluoreszenz der Nukleotide über einen Laserscanner analysiert. Die automatische Analyse der Laufdaten erfolgt unter Verwendung des Programmes Genescan Multianalyst, Version 3.1.2 (Applied Biosystems).

2.2.3.9. Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNaPshot)

Material: ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit, Applied Biosystems

POP-4™, Applied Biosystems, (Weiterstadt)

Die spezifischen Oligonukleotide sind so gewählt, dass sie sich exakt vor dem zu amplifizierenden Nukleotid in der cDNA anlagern. Die ausschließliche Verwendung von Didesoxynukleotiden verhindert nach Anlagerung eine fortlaufende Synthese der Sequenz durch die Polymerase. So findet lediglich eine intensive Amplifikation des interessierenden Nukleotids statt.

Zu 15µl des PCR Produktes werden 5µl Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)(5U/µl) und 2µl Exonuklease I (2U/µl) hinzugegeben und folgendem Temperaturprofil unterzogen:

1 Zyklus:	37°C	1h
	75°C	15 Minuten
	4°C	∞

Der Heizdeckel hat eine Temperatur von 95°C.

3µl aus dem gereinigten PCR-Produkt werden zu 5µl Multiplex Ready Reaction Mix (Ampli Taq® DNA-Polymerase, fluoreszenzmarkierte dNTPs und Reaktionspuffer) und 1µl SNaPshot Primer (0,2 pmol/µl) gegeben und mit 1µl aqua dest. zu einem 10µl Ansatz zusammengestellt und wie folgt im Thermocycler behandelt:

25 Zyklen:	96°C	10 Sekunden (Denaturierung)
	52°C	5 Sekunden (Primer-Anlagerung)
	60°C	30 Sekunden (Primer-Verlängerung)
	4°C	∞

Der Heizdeckel hat eine Temperatur von 95°C.

Abschließend wird zu diesem gesamten Ansatz je 1µl Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (5U/µl) hinzugefügt. Für diesen Restverdau wird folgendes Temperaturprofil verwendet:

1 Zyklus:	37°C	1h
	75°C	15 Minuten
	4°C	∞

Der Heizdeckel hat eine Temperatur von 95°C.

1µl dieses SnaPshot-Produktes wird mit 12µl Formamid gemischt und bei 95°C für 2 min inkubiert.

Die Datenaufnahme erfolgt automatisch über das Genescan Programm (Applied Biosystems) des ABI PRISM™ 310 Genetic-Analyzer (Applied Biosystems), die Datenanalyse erfolgt unter Verwendung des Programmes Multianalyst, Version 3.1.2 (Applied Biosystems).

III. Ergebnisse

3.1. Klinische und biochemische Charakterisierung der Patienten

3.1.1. Patienten

Es wurden von 21 Patienten, die an der varianten Form der Ahornsirupkrankheit leiden, anhand eines Fragebogens klinische und biochemische Daten erfasst und ausgewertet. Von diesen sind 6 Patienten türkischer Herkunft, worunter 2 Kinder konsanguiner Eltern sind. Ein Patient hat einen türkischen Vater und eine deutsche Mutter. Zwei Patienten sind österreichischer Herkunft und ein Patient stammt aus der Schweiz. Die übrigen 11 Patienten sind deutscher Herkunft. Diese Patienten wurden in 15 verschiedenen pädiatrisch-metabolischen Zentren betreut.

Das Patientenkollektiv wurde anhand folgender Daten in unterschiedliche klinische Phänotypen und damit Schweregrade eingeteilt: Erstdiagnosezeitpunkt, Art der klinischen Manifestation und Höhe des Leucinspiegels, sowie der Leucinspiegel im Verlauf, und die Alloisoleucin/Isoleucin-Ratio. Bei einigen Patienten konnten auch weitere *in vivo* und *in vitro* erhobene Messdaten herangezogen werden. Anhand dieser Parameter konnten vier Gruppenkollektive herausgearbeitet werden. Die Gruppen werden mit den Buchstaben A-D beschrieben:

Gruppe A =	sehr milde, asymptomatische Variante
Gruppe B =	milde Variante
Gruppe C =	schwere Variante
Gruppe D =	Kollektiv von im Neugeborenen-Screening oder prospektiv diagnostizierten Kindern, die früh behandelt bzw. verfolgt

wurden.

Die ermittelten Patientendaten sind in den Tabellen 2-5 aufgelistet: In Tabelle 2 werden das Alter des Kindes sowie die Plasmaspiegel der verzweigtkettigen Aminosäuren bei Diagnosestellung dargestellt. Die Therapie und die darunter beschriebenen Plasmaleucinspiegel sowie der klinische Verlauf werden in Tabelle 3 dargestellt. In Tabelle 4 sind die psychomotorische und kognitive Entwicklung der Patienten unter Therapie dargestellt und, soweit dies möglich war, der schulische und berufliche Werdegang. Tabelle 5 stellt die biochemische Charakterisierung der Patienten dar. Die letztgenannte Tabelle enthält Angaben zur Alloisoleucin-Eliminationskonstanten (K_e) nach oraler Alloisoleucinbelastung, zu der Restaktivität der BCKA-DH, zu der Ganzkörperleucinoxidation sowie zur Alloisoleucin-/Isoleucin- Ratio im Plasma.

Tabelle 2: Symptomatik, Alter und Plasma-BCAA-Spiegel bei Diagnosestellung

Patient/ Geschlecht	Geburtsjahr	Alter bei Diagnose	Symptomatik bei Diagnosestellung	Leucin μmol/l	Valin μmol/l	Isoleucin μmol/l	Alloisoleucin μmol/l
Gruppe A							
T.S. w	1977	20 LT	NG-Screening* Leicht muskuläre Hypertonie, Trinkschwäche, Maggigeruch	821	705	315	162
N.D. m	1978	22 LT	NG-Screening* keine Symptomatik	427	462	168	8
K.S. m	1979	15 LT	NG-Screening* keine Symptomatik	283	376	130	10
H.A. m	1996	59 LT	NG-Screening* keine Symptomatik	587	555	259	38
Gruppe B							
A.R. w	1982	0,5 Jahre	Akute Enzephalopathie Somnolenz, Krampfanfall	1922	966	608	n.b.
H.H. m	1985	7 Jahre	Akute Enzephalopathie Halluzinationen, Episoden mit 3½ und 7 Jahren	532	505	231	77
W.L. w	1990	4 Jahre	Akute Enzephalopathie Koma, schwere Ketoazidose	2229	851	509	n.b.
H.P. m	1990	4 Jahre	Akute Enzephalopathie Früher bereits Episoden	1291	862	432	90
S.M. w	1993	5 Jahre	Akute Enzephalopathie Somnolenz, Ataxie	1623	1137	627	233
G.D. w	1993	7 Jahre	Akute Enzephalopathie Ataxie, Krampfanfälle frühere Episode mit 18 Monaten	1795	1378	657	119
Gruppe C							
K.D. w	1974	22 LT	NG-Screening* Trinkschwäche, Somnolenz	1216	856	435	253
M.Y. w	1977	60 LT	Trinkschwäche, leichte neurologische Zeichen, Maggigeruch	1100	465	616	n.b.
B.V. w	1980	4 Jahre	Psychomotorische Retardierung, Ataxie, Somnolenz, Maggigeruch bereits vorher ketoazidotische Episoden	757	632	257	n.b.
S.B. w	1980	27LT	NG-Screening* keine Symptomatik	1677	1376	641	n.b.
C.S. w	1986	1,9 Jahre	Leichte psychomotorische Retardierung	808	760	366	107
B.M. w	1998	5Jahre	Schwere psychomotorische Retardierung , seit 5. Lebensmonat bekannte Diagnose im Alter von 5 Jahren Übersiedlung nach Deutschland	1834	638	536	n.b.
T.N. m	1998	11 LT	Trinkschwäche, Somnolenz, Hirnödeme, komatöser Zustand	1391	644	296	450
Gruppe D							
W. C. w	1999	14 LT	NG-Screening# keine Symptomatik	497	466	181	50
L.P. m	2001	11 LT	NG-Screening# keine Symptomatik	445	348	158	156
H.E. m	2003	6 LT	NG-Screening# keine Symptomatik	339	301	104	301
T.H. w	2001	3 LT	Keine Symptomatik, bekannte pos. Familienanamnese	645	502	190	21

LT: Lebenstag; n.b.: BCAA-Spiegel wurden im Plasma nicht bestimmt; m: männlich, w: weiblich

*Neugeborenen-Screening mittels Guthrie-Test ; # Neugeborenen-Screening mittels Tandem MS

Tabelle 3: Therapie, Plasmaleucinspiegel und Entgleisungen im Verlauf

Patient/ Geschlecht	Therapie	Supplement von BCAA freier Aminosäure Mischung	Entgleisungen nach Diagnosestellung Leucin in μM	Leucin unter Therapie/ Verlauf in μM
Gruppe A				
T.S. w	Meiden von hoher Proteinaufnahme	-	keine	<230
N.D. m	Meiden von hoher Proteinaufnahme	-	bei Infektionen Leucin:500-600	<350
K.S. m	Meiden von hoher Proteinaufnahme	-	keine	153-230
H.A. m	Meiden von hoher Proteinaufnahme	-	keine	190-267
Gruppe B				
A.R. w	Moderate Proteinrestriktion	(+)	bei Infektionen Leucin:>581 Wiederholte Episoden von Laktatazidose	175-293
H.H. m	Moderate Proteinrestriktion	-	keine	200-250
W.L. w	Strikte MSUD-Diät	+	bei Infektionen Leucin: 350-1091	38-160
H.P. m	Moderate Proteinrestriktion Thiamin:200mg	-	bei Infektionen Leucin:997-1291	120-400
S.M. w	Moderate Proteinrestriktion	-	keine	100-350
G.D. w	Proteinrestriktion	(+)	keine	120-430
Gruppe C				
K.D. w	Strikte MSUD-Diät, schlechte Compliance in der Kindheit	+	bei Infektionen Leucin: >618	38-500
M.Y. w	Strikte MSUD-Diät, gute Compliance in der Kindheit	+	Infektionen	<500
B.V. w	Strikte MSUD-Diät, Sehr gute Compliance in der Kindheit	+	bei Infektionen Leucin:>700	25-290
S.B. w	Strikte MSUD-Diät, Sehr gute Compliance in der Kindheit	+	keine	214-427
C.S. w	in ersten Jahren Proteinrestriktion, später keine Diät	-	keine	Therapie: 380 Unbehandelt: 800
B.M. w	Strikte MSUD-Diät ab 5. Lebensjahr	+	seit Diät mit 5 J. keine	87-360
T.N. m	Proteinrestriktion	+	bei Infektionen Leucin: 350-1184	74-176
Gruppe D				
W. C. w	Proteinrestriktion	+	keine Diätcompliance Leucin >400	100-300
L.P. m	Proteinrestriktion	+	bei Infektionen Leucin: 530	260-280
H.E. m	Proteinrestriktion	+	bei Infektion Leucin > 1045	132-455
T.H. w	Proteinrestriktion	+	keine	27-155

MSUD-Diät: BCAA-freie Aminosäuremischung

(+: nur temporär Zusatz von BCAA-freier Aminosäure Mischung; m: männlich; w: weiblich)

Tabelle 4: Kognitive und psychomotorische Entwicklung

Patient/ Geschlecht	Alter in Jahren	Psychomotorische Entwicklung	Schule/Beruf	Lebensführung
Gruppe A				
T.S. w	27	altersentsprechend	Gesamtschule bis 10. Klasse, jetzt Lagerarbeiterin	selbstständig
N.D m	26	altersentsprechend	Realschule ,Maurer	selbstständig
K.S. m	25	altersentsprechend	Realschule Fachoberschule in der Lehre?	selbstständig
H.A.* m	8	altersentsprechend	k.A.	selbstständig
Gruppe B				
A.R. w	22	altersentsprechend	Hauptschule Berufsschule, z.Z.Sekretärin	selbstständig
H.H. m	19	altersentsprechend	Hauptschule	selbstständig
W.L. w	14	altersentsprechend	Realschule	selbstständig
H.P. m	14	altersentsprechend IQ n.Kramer:120	Realschule	selbstständig
S.M. w	11	Altersentsprechend IQ n.Kramer:110	Weiterführende Schule	selbstständig
G.D. w	11	aufmerksamkeits- Konzentrationsdefizit, HAWIK: Gesamt IQ 93	Weiterführende Schule	selbstständig
Gruppe C				
K.D.** w	30	k.A.	k.A.	k.A.
M.Y. w	27	altersentsprechend	Gymnasium Studium abgebrochen	selbstständig
B.V. w	24	Extrapyramidale Bewegungsstörungen	Sonderschule Hauswirtschaftsschule Berufsförderungswerk,Förderlehrgang	?
S.B. w	24	altersentsprechend	Real-Gesamtschule Speditionskauffrau	selbstständig
C.S.* w	18	mentale Retardierung	k.A.	k.A.
B.M.** w	5	Psychomotorisch und geistig schwerst retardiert	Seit 2003 in Deutschland	-
T.N. m	6	altersentsprechend	Kindergarten	-
Gruppe D				
W. C. w	5	altersentsprechend IQ:103	Kindergarten	-
L.P. m	3	altersentsprechend	-	-
H.E. m	0,8	altersentsprechend	-	-
T.H. w	3	altersentsprechend	-	-

k.A.: keine Angaben
 IQ: Intelligenzquotient
 *: konsanguine Eltern
 **: wahrscheinlich konsanguine Eltern
 -: noch keine Angaben möglich
 m: männlich;
 w: weiblich

Tabelle 5: Biochemische Charakterisierung

Patient/ Geschlecht	Alloisoleucin- Clearance Ke (d ⁻¹) ¹ X	BCKD- Aktivität in % ²	Ganzkörperleucinoxidation in % ³	Alloisoleucin-/Isoleucin- Ratio im Plasma ⁴
Gruppe A				
T.S. w		13		0,13
N.D m	0,555	19-25	77	0,09
K.S. m		17		0,12
H.A. m		20		0,14
Gruppe B				
A.R. w	0,637	4		
H.H. m		7-9	86	0,09
W.L. w				
H.P. m		20	49	0,17
S.M. w		10		0,16
G.D. w		4		0,23
Gruppe C				
K.D. w	0,195	2-3	<10	0,56
M.Y. w	0,104	3-4		0,38
B.V. w				
S.B. w		2,5		
C.S. w		7		0,3
B.M. w				
T.N. m				0,14
Gruppe D				
W. C. w				0,22
L.P. m	9			0,25
H.E. m				0,17
T.H. w				0,07

¹Eliminationskonstante Ke (d⁻¹) nach Alloisoleucinbelastung. Normalkontrollen: Ke: 1,89 ± 0,43 (n=5) ; Klassische MSUD: Ke: 0,089± 0,008 (Schadewaldt *et al.*; 1989)

²BCKA-DH-Aktivitätsmessung in % der Norm aus kultivierten Fibroblasten

³Ganzkörperleucinoxidation in % der Norm (Schadewaldt *et al.*; 2001)

⁴Alloisoleucin-/ Isoleucin-Ratio im Plasma. Klassische MSUD mit einer Restaktivität unter 2% BCKA-DH weist eine Alloisoleucin-/Isoleucin-Ratio von 0,59 bis 0,72 auf (Wendel *et al.*; 1989)

3.2. Gruppeneinteilung anhand klinischer und biochemischer Daten

3.2.1. Sehr milde und asymptomatische Variante (Gruppe A): 4 Patienten

Alle vier Personen wurden im Neugeborenen-Screening (Guthrie-Test) zwischen dem 15. und 59. Lebenstag diagnostiziert. In einem Fall wurden leichte Symptome vermerkt, alle anderen Personen waren asymptomatisch. Die Plasma-Leucinkonzentration zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag zwischen 283 und 821 $\mu\text{mol/l}$ (Mittelwert $\pm$ SD: 530 $\pm$ 231 $\mu\text{mol/l}$). (s.Tab. 2)

Klinischer Verlauf:

Alle Personen waren ohne spezifische Behandlung, es wurde lediglich die Vermeidung einer hohen Proteinaufnahme empfohlen. Die beiden ältesten Patienten, inzwischen 25 und 27 Jahre alt, verloren den engen Kontakt zu einem Metabolischen Zentrum im Alter von 3 Jahren. Die Blutproben, welche in verschiedenen Altersstufen untersucht wurden, zeigten konstant leicht erhöhte BCAA-Konzentrationen (einschließlich Allo-Isoleucin). Es wurden durchschnittliche Plasma-Leucinkonzentrationen von $< 350\mu\text{mol/l}$ ermittelt (Tab. 3). Bisher hat keine Person eine enzephalopathische Episode während interkurrenter Erkrankungen entwickelt. Die psychomotorische und neurologische Entwicklung dieser Patienten ist altersentsprechend normal. Alle Patienten wiesen eine normale Schulkarriere auf (Tab. 4). Die drei ältesten Patienten leben ein unauffälliges Leben als Erwachsene. Zwei dieser Patienten (männlich) sind verheiratet und haben Kinder.

Biochemische Charakteristika:

In dieser Gruppe lag die Restaktivität der BCKA-DH in kultivierten Fibroblasten zwischen 13 und 20 % der Norm (Mittelwert $\pm$ SD: 17,3 $\pm$ 3,1). Damit liegt sie am höchsten innerhalb des gesamten Studienkollektivs. Das Alloisoleucin-/Isoleucin-Verhältnis im Plasma liegt zwischen 0,09 und 0,14 (Mittelwert $\pm$ SD: 0,12 $\pm$ 0,02) und

zeigt damit die tiefsten Werte aller Gruppen an (Tab. 5). Beide Messdaten sprechen für eine relativ hohe Restaktivität der BCKA-DH. Zusätzlich deuten die Daten bei einem Patient (N.D.) zur Ganzkörperleucinoxidation sowie zur metabolischen Alloisoleucin-Clearance (Ke) auf eine relativ hohe Restaktivität der BCKA-DH im Organismus hin.

3.2.2. Milde Variante (Gruppe B): 6 Patienten

Diagnose:

Bei allen sechs Patienten wurde die Diagnose während einer enzephalopathischen Episode, ausgelöst durch katabolen Stress während fieberhafter Infektionen zwischen dem 5. Lebensmonat und dem 7. Lebensjahr, gestellt. Drei Patienten hatten bereits retrospektiv, vor Diagnosestellung, enzephalopathische Episoden (zwischen 18 und 40 Monaten). Die Plasma-Leucinkonzentrationen während dieser Episoden waren bei allen Patienten stark erhöht. Bei fünf Patienten lagen die Leucinspiegel zwischen 1291 und 2290 $\mu\text{mol/l}$ (Tab. 2). Bei einem Patienten (H.H.) wurde die Messung erst zwei Tage nach Beginn einer Notfallbehandlung mit großen Mengen von Kohlenhydraten durchgeführt, deshalb konnten hier nur relativ niedrige Plasma-BCAA-Konzentrationen gemessen werden. Das klinische Bild dieser Patientengruppe passt gut zu dem „intermittierenden klinischen Verlauf“, wie er in der Literatur beschrieben ist (Scriver *et al.*, 1971; Chuang und Shih, 2001).

Klinischer Verlauf:

Die meisten Patienten erhielten eine moderate Protein-eingeschränkte Diät. Nur ein Patient (W.L.) erhielt die volle MSUD-Diät (sehr geringer Proteingehalt der Nahrung mit einem großen Zusatz an BCAA-freier Aminosäure-Mischung). Die Patienten W.L. und H.P. zeigten nach Diagnosestellung und Behandlungsbeginn weitere metabolische Krisen. A.R. zeigte mehrfach laktazidotische Episoden. Unter proteineingeschränkter Diät waren die BCAA-Konzentrationen im Plasma (einschließlich Allo-Isoleucin) konstant oberhalb der Norm. Im wesentlichen lagen die Werte für Leucin unterhalb von

300 $\mu\text{mol/l}$ (Tab. 3). Die psychomotorische Entwicklung sowie die Schulkarriere verliefen normal (Tab. 4). Eine Patientin (A.R.) hat ein phänotypisch gesundes Mädchen zur Welt gebracht. Genotypisch konnte die bei der Mutter in homozygoter Form vorliegende Mutation bei dem Kind in heterozygoter Form nachgewiesen werden.

Biochemische Charakteristika:

In dieser Gruppe betrug die Restaktivität der BCKA-DH in intakten Fibroblasten zwischen 4 und 20 % der Norm (Mittelwert $\pm$ SD: $9,0 \pm 6,6$). Die Alloisoleucin-/Isoleucin-Ratio im Plasma lag zwischen 0,09 und 0,23 (Mittelwert $\pm$ SD: $0,16 \pm 0,07$) (Tab. 5). Zusätzliche Parameter, wie die metabolische Alloisoleucin-Clearance (A.R.), oder die Ganzkörperleucinoxidation (H.H. und H.P.) sprechen ebenfalls für eine relativ hohe Restaktivität der BCKA-DH.

3.2.3. Schwere Variante (Gruppe C): 7 Patienten

Diagnose:

Zwei Patienten wurden im Neugeborenen-Screening mittels Guthrie-Test, zwei weitere wurden im Alter zwischen dem 22. und 60. Lebenstag aufgrund einer klinischen Manifestation diagnostiziert. Die Patienten zeigten zu diesem Zeitpunkt leichte neurologische und enzephalopathische Symptome und rochen charakteristisch nach Ahornsirup. Die restlichen Patienten wurden zwischen dem 21. Lebensmonat und dem 4. und 5. Lebensjahr diagnostiziert. Während die Kinder, die im 2. Lebensjahr diagnostiziert wurden, im Verlauf nur eine leichte psychomotorische Retardierung aufwiesen, zeigten die Patienten mit späterer Diagnosestellung eine deutliche psychomotorische Retardierung. In dieser Patientengruppe lag der Plasma-Leucinspiegel bei Diagnosestellung zwischen 757 und 1834 $\mu\text{mol/l}$ (Mittelwert $\pm$ SD: 1255 ± 409 ; Tab. 2). Das klinische Bild dieser Patienten-Gruppe entsprach in einigen Fällen dem sogenannten „intermediären“ Phänotyp der Literatur (Chuang und Shih 2001).

Klinischer Verlauf:

Alle Patienten wurden mit einer vollen MSUD-Diät (sehr geringe Zufuhr von natürlichem Protein in der Nahrung mit einem großen Zusatz an BCAA-freier Aminosäure-Mischung) behandelt. Die Leucin-Aufnahme variierte zwischen 800 und 1800 mg/Tag (Tab. 3). Die Diät wurde in der Kindheit unterschiedlich strikt eingehalten. Die Patienten S.B. und M.Y. zeigten eine gute „Compliance“, demgegenüber wiesen die Patienten K.D. und C.S., beide türkischer Herkunft, eine relativ schlechte „Compliance“ auf. Bei diesen beiden Patienten war später die intellektuelle Leistung deutlich eingeschränkt (Tab. 4). Die Patienten B.V. und B.M. waren trotz guter „Diät-Compliance“ mental retardiert. Beide Patienten waren relativ alt bei Diagnosestellung und zeigten bereits zu diesem Zeitpunkt eine irreversible Hirnschädigung.

Biochemische Charakteristik:

In dieser Gruppe betrug die Restaktivität der BCKA-DH in intakten Fibroblasten zwischen 2,5 und 7 % der Norm (Mittelwert $\pm$ SD: $3,9 \pm 2,1$) (Tab. 5). Die Alloisoleucin-/Isoleucin-Ratio im Plasma liegt zwischen 0,27 und 0,56 (ausgenommen Patient T.N., der wegen der frühen klinischen Manifestation als schwere Variante klassifiziert wurde), was eine niedrige bis sehr niedrige Restaktivität der BCKA-DH anzeigt. Parameter wie die metabolische Alloisoleucin-Clearance (M.Y. und K.D.) sowie die Ganzkörperleucinoxidation (K.D.) weisen ebenfalls auf eine geringe Restaktivität der BCKA-DH im Organismus hin (Tab. 5).

3.2.4. Früh behandelte Kinder (Gruppe D): 4 Patienten*Diagnose:*

Ein Patient (T.H.) wurde prospektiv diagnostiziert und behandelt. Die restlichen drei Patienten wurden im Neugeborenen-Screening mittels Tandem-MS zwischen dem 6. und 14. Lebenstag diagnostiziert. Alle Patienten waren zu diesem Zeitpunkt asymptomatisch (Tab. 2).

Klinischer Verlauf:

Drei Patienten wurden sehr früh mit einer protein-restriktiven Diät behandelt, welche auch eine bestimmte Menge von BCAA-freier Aminosäure-Mischung enthält. Ziel der Behandlung war es, den Plasma-Leucinspiegel unter 300 µmol/l zu halten. Bisher zeigten die Patienten eine unbeeinträchtigte Entwicklung. Der Patient H.E. wies im Alter von 2,3 Jahren während katabolem Stress eine enzephalopathische Krise bei Plasma-Leucinspiegel von 1045 µmol/l auf (Tab. 3).

Biochemische Charakteristika:

Die Plasma-Leucinspiegel waren bei Diagnosestellung nur leicht erhöht und lagen zwischen 339 und 645 µmol/l (Mittelwert $\pm$ SD: 482 $\pm$ 127). Die Alloisoleucin/Isoleucin-Ratio im Plasma war unterschiedlich (zwischen 0,07 und 0,25; Tab. 5) und weist damit auf eine mögliche Vermischung von Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad in dieser Gruppe hin.

3.2.5. Statistische Gruppen-Unterschiede

Die Plasmaleucin-Konzentration zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war signifikant höher bei Patienten aus der Gruppe mit milder Variante (Gruppe B; $p = 0.038$) als bei Patienten aus der Gruppe der sehr milden asymptomatischen Form (Gruppe A). Es bestanden ebenfalls signifikante Unterschiede für die Leucin-Konzentrationen zwischen der Gruppe der schweren Variante (Gruppe C) und der Gruppe A. Die Leucinkonzentration der Gruppe C war signifikant höher ($p = 0,024$) als die der Gruppe A. Die Konzentrationen bei Diagnosestellung waren in den Gruppen B ($p = 0,001$) und C ($p < 0,001$) auch signifikant höher als bei den Patienten der Gruppe D. Zwischen den Gruppen A und D und auch zwischen den Gruppen B und C bestanden keine statistisch-signifikanten Unterschiede. Es ließen sich jedoch eindeutige Unterschiede im Zeitpunkt der klinischen Diagnosestellung zwischen den Gruppe B und C herausarbeiten. Infolge der Ungenauigkeit der Angaben wurde jedoch auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Die Restaktivität der BCKDA-DH war signifikant höher und die Alloisoleucin/Isoleucin-Ratio signifikant niedriger in den Gruppen A und B als in Gruppe C (0,015).

3.3. Beschreibung der Mutationen bei Patienten mit varianter MSUD

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei 13 Patienten die Mutationsanalyse durchgeführt. In Tabelle 6 ist die Verteilung der Mutationen auf die drei untersuchten Gene unter Bezugnahme auf den jeweiligen Schweregrad einer varianten Form dargestellt.

Tabelle 6: Genotypen der 13 Patienten mit einer varianten MSUD

Patient	Ethnische Herkunft	Gen/Exon	Mutation Nukleotid	Mutation Protein	Anzahl Allele	Vater	Mutter	Klinischer Phänotyp
N.D.	D	E1β/4 E1β/7	c.415C>T c.879G>A	P123L G278S	1 1	n.b. n.b.	n.b. n.b.	Asymptomatisch
K.S.	D	E1β/7 E1α/2	c.879G>A c.144C>A	G278S P39H	2 1	n.b. n.b.	n.b. n.b.	Asymptomatisch
H.A.	TR	E1α/7	c.1011G>A	A328T	2	n.b.	n.b.	Asymptomatisch
A.R.	A	E2/6	c.760-786del	G249-K257 del	2	mt	mt	Milde Variante
W.L.	D	E1β/5 E1β/8	c.549C>T c.895T>C	R168C V283A	1 1	wt mt	mt wt	Milde Variante
H.P.	D	E1β/4 E1β/6	c.436T>G c.777T>C	V130G Y244H	1 1	n.b. n.b.	n.b. n.b.	Milde Variante
G.D.	CH	E1β/7 E1β/7 E2/9	c.879G>A c.855-868del c.1164G>A	G278S f.shift ab 269 G384S	1 1 1	wt mt wt	mt wt 2mt	Milde Variante
C.D.	E	E2/2 E2/7	c.89-90delAT c.841T>G	f.shift ab 25 F276C	1 1	wt mt	mt wt	Milde Variante
M.Y.	D	E1α/9	c.1263G>A	V412M	2	mt	mt	Schwere Variante
S.B.	D	E2/9 E1α/4	c.1164G>A c.504C>G	G384S R159W	1 1	n.b. n.b.	wt mt	Milde Variante
B.M.	TR	E1α/2 E1α/6	c.144C>A c.786G>A	P39H A253T	1 2	n.b. mt	n.b. mt	Schwere Variante
B.T.	TR	E1α/6	c.786G>A	A253T	2	mt	mt	Prospektiv diagnostiziert Schwere Variante Geschwister von B.M.
H.E.	D/TR	E1β/3 E1β/5 E1α/2 E2/9	c.378C>T c.645C>G c.144C>A c.1164G>A	R111X P200A P39H G384S	1 1 1 1	n.b. wt mt wt	wt mt mt wt	Milde Variante Neugeborenen-Screening

mt: mutiertes Allel;

wt: Wildtyp

f.shift: frameshift;

n.b.: nicht bestimmt (da kein Material vorhanden)

3.3.1. Beschreibung und Anzahl von Punktmutationen, Stoppmutationen und Deletionen in den jeweiligen Genen

Die DNA für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde bei 13 Patienten aus zellulärer RNA, welche aus Vollblut isoliert wurde, gewonnen. Mittels der reversen Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurden alle 30 Exone der cDNA für die E1 α -, E1 β - und E2-Untereinheiten amplifiziert. Es wurden mittels automatisierter, elektrophoretischer Datenanalyse für jeden Patienten alle Exone der 3 Gene sequenziert und untersucht. Mit Hilfe der Einzelnukleotid-Polymorphismus-Methode (SNaPshot) wurden einzelne Punktmutationen validiert. Zur weiteren Absicherung der molekularen Veränderungen wurde zusätzlich genomische DNA aus Vollblut isoliert, und die entsprechenden Exone amplifiziert. Alle gefundenen Mutationen in E1 α , E1 β und E2 konnten sowohl in der cDNA als auch in der genomischen DNA ermittelt sowie mit der SNaPshot-Methode bestätigt werden.

Die Mutationsbeschreibung erfolgt nach den internationalen Konventionen für die Nomenklatur menschlicher Genmutationen sowie nach den Referenz-cDNA-Sequenzen (NCBI, GenBank, Stand 12/2005) für E1 α , E1 β und E2 (NM_000709, NM_183050 und NM_001918).

3.3.1.1. Mutationen im E1 α -Gen

Exon 2:

Das Exon 2 besitzt eine Länge von 180 bp. An der Nukleotidstelle 144 der cDNA wurde bei 3 Patienten ein Austausch der Base Cytosin gegen Adenin nachgewiesen. Das Triplet CCC (Prolin) kodiert nun aufgrund seiner veränderten Nukleotidsequenz für die Aminosäure Histidin (CAC). 3 Patienten (K.S., B.M., H.E.) waren für diese Mutation in Kodonposition 39 heterozygot.

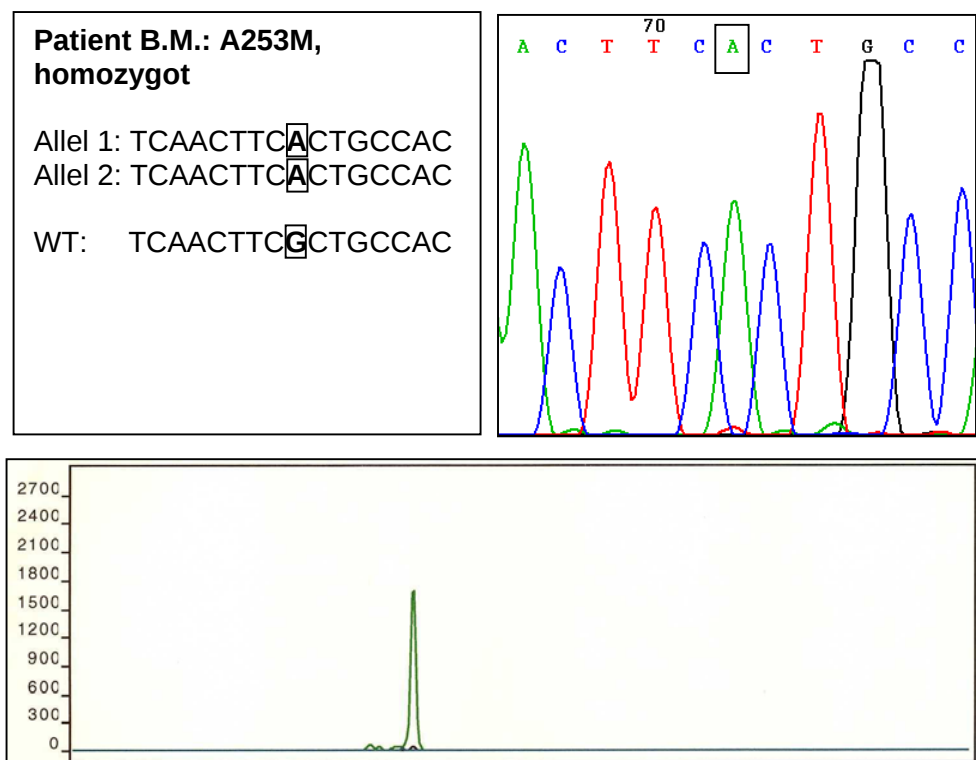
Exon 4:

Exon 4 hat eine Fragmentlänge von 105 bp. In diesem Exon wurde bei einer Patientin (S.B.) ein heterozygoter Basenaustausch von Cytosin gegen Guanin in der Nukleotidposition 504 der cDNA gefunden. Das veränderte Triplet (CGG) kodiert anstatt für die Aminosäure Arginin für Tryptophan (TGG). Diese Mutation R159W war nur heterozygot vorhanden. Ein weiteres verändertes Allel im E1 α -Gen konnte für die Patientin nicht nachgewiesen werden.

Exon 6:

Exon 6 besitzt eine Länge von 204 bp. Bei einem Geschwisterpaar (B.M., B.T.) von konsanguinen Eltern fand sich in der Nukleotidposition 786 der cDNA eine Transition von Guanin zu Adenin. Daraus folgt auf Proteinniveau ein Austausch von Alanin (GCT) in Threonin (ACT) an der Kodonposition 253. Diese Mutation A253T war bei beiden Geschwistern homozygot vorhanden (Abb. 4).

Abbildung 4

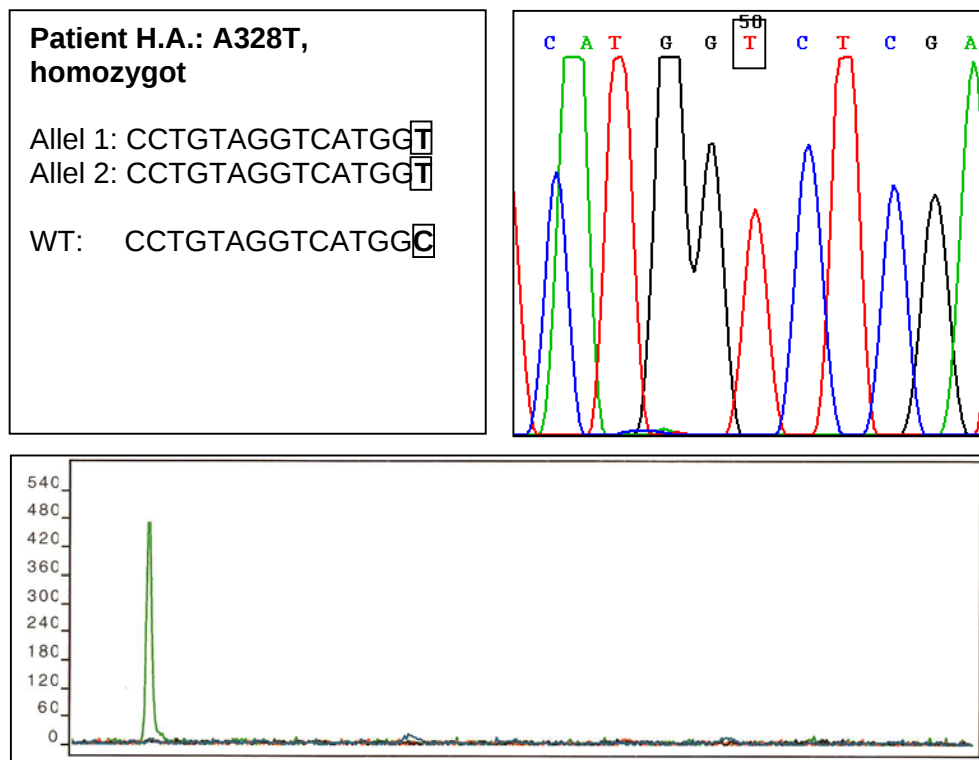


Oben links ist die im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) mutierte Patientensequenz eingerahmt. Oben rechts ist die Mutation über dem entsprechenden Nukleotidelektrophoresesignal markiert; unten wird die Validierung mittels SNaPshot gezeigt (1 Signal = homozygot, 2 überlagernde Signale = heterozygot).

Exon 7:

Exon 7 besitzt eine Länge von 138 bp. In diesem Exon wurde eine Transition von Guanin in Adenin an Position 1011 der cDNA nachgewiesen. Dadurch wird anstatt für Alanin (GCC) Threonin (ACC) kodiert. Diese A328T-Mutation wurde bei einem Patienten (H.A.) in homozygoter Form nachgewiesen (Abb.5).

Abbildung 5

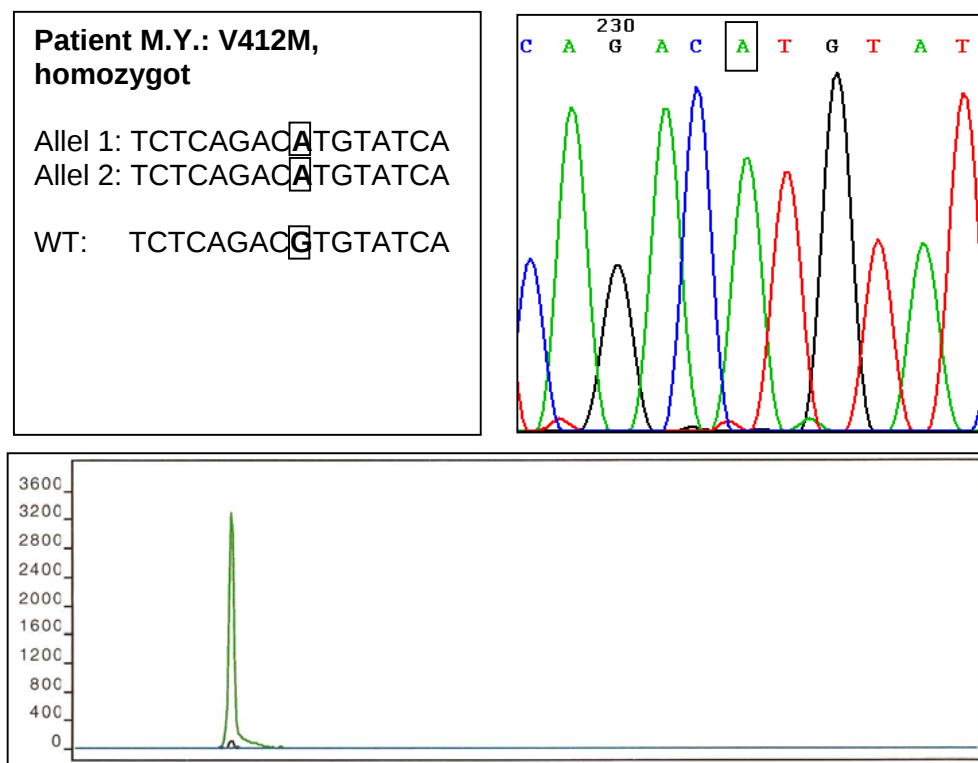


Oben links ist die im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) mutierte Patientensequenz eingerahmt. Oben rechts ist die Mutation über dem entsprechenden Nukleotidelektrophoresesignal markiert; unten wird die Validierung mittels SNaPshot gezeigt (1 Signal = homozygot, 2 überlagernde Signale = heterozygot).

Exon 9:

Die Länge von Exon 9 beträgt 165 bp. In Exon 9 fand sich bei einer Patientin (M.Y.) an der Nukleotidposition c.1263 eine Transition von Guanin in Adenin. Diese Änderung des Tripletts (GTG→ATG) bewirkt einen Austausch der Aminosäure Valin gegen Methionin an Kodonposition 412. Diese V412M-Mutation war bei der Patientin homozygot vorhanden (Abb.6).

Abbildung 6



Oben links ist die im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) mutierte Patientensequenz eingerahmt. Oben rechts ist die Mutation über dem entsprechenden Nukleotidelektrophoresesignal markiert; unten wird die Validierung mittels SNaPshot gezeigt (1 Signal = homozygot, 2 überlagernde Signale = heterozygot).

Bei dem vorliegenden Patientenkollektiv konnte mit dem angewendeten Methodenspektrum in den restlichen Exonen 3, 5 und 8 des E1 α -Gens keine Mutation gefunden werden. Alle Mutationen im E1 α -Gen sind Punktmutationen.

Tabelle 7: Typ IA Mutationen (E1 α -Gen)

Patient	Ethnische Herkunft	Gen	Exon	Mutation an Nukleotid-Position	Mutation an Protein-Position	Anzahl Allele	Vater	Mutter
A.H.	TR	E1 α	7	c.1011G>A	A328T	2	n.b.	n.b.
M.Y.	D	E1 α	9	c.1263G>A	V412M	2	mt.	mt.
B.M.	TR	E1 α	6	c.786G>A	A253T	2	mt	mt
		E1 α	2	c.144C>A	P39H	1	mt	mt
B.T.	TR	E1 α	6	c.786G>A	A253T	2	mt	mt
H.E.	D/TR	E1 α	2	c.144C>A	P39H	1	mt	mt
K.S.	D	E1 α	2	c.144C>A	P39H	1	n.b.	n.b.
S.B.	D	E1 α	4	c.504 C>G	R159W	1	n.b.	mt

mt: heterozygoter Genotyp

n.b.: nicht bestimmt (da kein Material vorhanden)

3.3.1.2. Polymorphismen im E1 α -Gen

Bei genetischen Polymorphismen hat die genetische Grundstruktur an gleichen Stellen unterschiedliche Nukleotidsequenzen, d.h. Basenaustausche, die sich aufgrund der Degeneration des genetischen Codes nicht in der Aminosäuresequenz niederschlagen. Es wurden die folgenden drei genetischen Polymorphismen im E1 α -Gen bei insgesamt 7 Patienten gefunden (Tab. 8):

1. Der Basenaustausch von Cytosin gegen Adenin an Position 63 der cDNA. Sowohl das Triplet CGG als auch das Triplet AGG kodieren für die Aminosäure Arginin. Der R12R Polymorphismus lag bei 2 Patienten in heterozygoter Form vor.

2. Der Basenaustausch von Cytosin gegen Thymin in Position 1001 der cDNA. Beide Triplets kodieren für die Aminosäure Phenylalanin. Der F324F Polymorphismus lag bei 6 Patienten vor. Vier Patienten waren heterozygot und zwei Patienten homozygot.

3. Der Basenaustausch von Adenin zu Guanin in Nukleotidposition 1250 der cDNA. Beide Triplets (CTA und CTG) kodieren für die Aminosäure Leucin. Der L407L Polymorphismus war bei 7 Patienten vorhanden. Fünf Patienten waren heterozygot und zwei Patienten homozygot.

Tabelle 8: Polymorphismen im E1 α -Gen

Patient	Ethnische Herkunft	Gen	Exon	Mutation Nukleotid	Mutation Protein	Anzahl Allele
N.D.	D	E1 α	7	c.1001C>T	F324F	2
		E1 α	9	c.1251A>G	L407L	2
K.S.	D	E1 α	1	c.63 C>A	R12R	1
		E1 α	7	c.1001C>T	F324F	1
		E1 α	9	c.1251A>G	L407L	1
W.L.	D	E1 α	7	c.1001C>T	F324F	1
		E1 α	9	c.1251A>G	L407L	1
H.P.	D	E1 α	7	c.1001C>T	F324F	1
		E1 α	9	c.1251A>G	L407L	1
G.D.	CH	E1 α	9	c.1251A>G	L407L	1
S.B.	D	E1 α	7	c.1001C>T	F324F	2
		E1 α	9	c.1251A>G	L407L	2
H.E.	D/TR	E1 α	1	c.63 C>A	R12R	1
		E1 α	7	c.1001C>T	F324F	1
		E1 α	9	c.1251A>G	L407L	1

3.3.1.3. Mutationen im E1 β -Gen

Exon 3:

Exon 3 hat die Länge von 86 bp. In diesem Exon wurde bei einem Patienten (H.E.) eine Transition von Thymin in Cytosin an Position 378 der cDNA nachgewiesen. Dadurch wird das für Arginin kodierende Basentriplett (CGA) zu einem Stoppkodon (TGA). Die Mutation R111X lag in heterozygoter Form vor, ein weiteres mutiertes Allel fand sich in Exon 3 (P 200A).

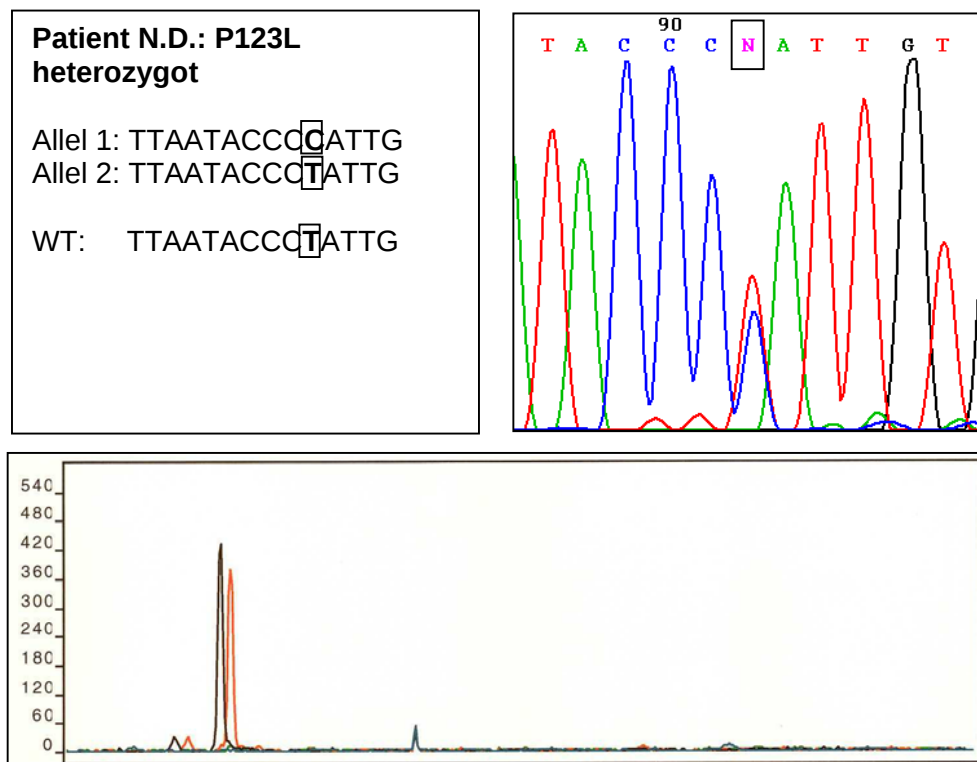
Exon 4:

Das Exon 4 hat eine Länge von 132 bp. In diesem Exon, konnten im vorliegenden Patientenkollektiv zwei Mutationen gefunden werden. Beide nicht verwandten Patienten wiesen ein zweites mutiertes Allel im E1 β -Gen auf.

Eine Mutation (N.D.) befindet sich an der Nukleotidposition 415 der cDNA. Es handelt sich um eine Transition von Cytosin in Thymin, so dass die Aminosäure Prolin (CCA) nun für Leucin (CTA) kodiert. Es entsteht die P123L-Mutation (Abb. 7).

Die zweite Mutation (H.P.) in Exon 4 beschreibt einen Basenaustausch von Thymin in Guanin an Position 436 der cDNA. Diese Veränderung des Triplets (GTT → GGT) bewirkt einen Austausch von Valin in Glycin an Kodonposition 130. Es handelt sich um die V130G-Mutation.

Abbildung 7



Oben links ist die im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) mutierte Patientensequenz eingerahmt. Oben rechts ist die Mutation über dem entsprechenden Nukleotidelektrophoresesignal markiert; unten wird die Validierung mittels SNaPshot gezeigt (1 Signal = homozygot, 2 überlagernde Signale = heterozygot).

Exon 5:

Exon 5 ist ein 153 bp langes Fragment. In diesem Exon wurden zwei verschiedene Punktmutationen bei zwei nicht verwandten Patienten (W.L., H.E.) gefunden. Bei einem (W.L.) fand sich an der Nukleotidposition 549 der cDNA eine Transition von Cytosin in Thymin. Diese Tripletänderung (CGC→TGC) bewirkt einen Aminosäureaustausch von Arginin in Cystein an Kodonposition 168. Dieser Patient wies ein weiteres mutiertes Allel in Exon 8 auf (V283A).

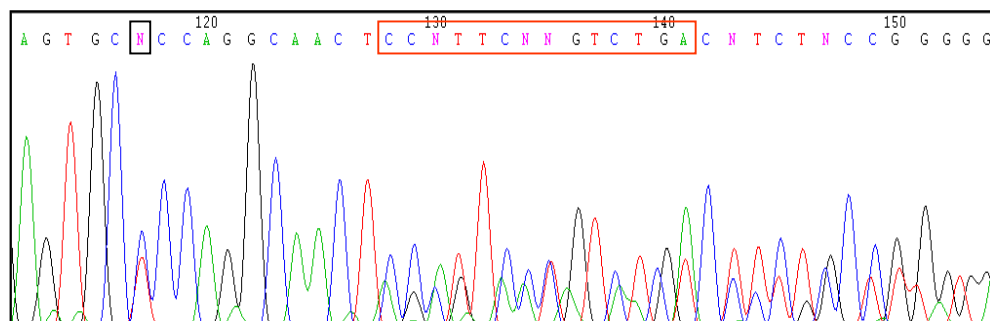
Die zweite Mutation (H.E.) in Exon 5 beschreibt eine Transition von Cytosin zu Guanin an der Nukleotidposition 645 der cDNA. Diese Tripletänderung (CCT→GCT) bewirkt einen Aminosäureaustausch von Prolin gegen Alanin in Kodonposition 200 (P200A).

Exon 6:

Die Länge von Exon 6 beträgt 105 bp. In Exon 6 fand sich bei einem Patienten (H.P.) an der Nukleotidposition 777 der cDNA eine Transition von Thymin zu Cytosin. Diese Änderung des Triplets TAC in CAC bewirkt einen Austausch der Aminosäure Tyrosin in Histidin an Kodonposition 244. Diese Y244H-Mutation war in heretozygoter Form vorhanden, ein zweites mutiertes Allel wies eine Veränderung in Exon 4 auf (V130G).

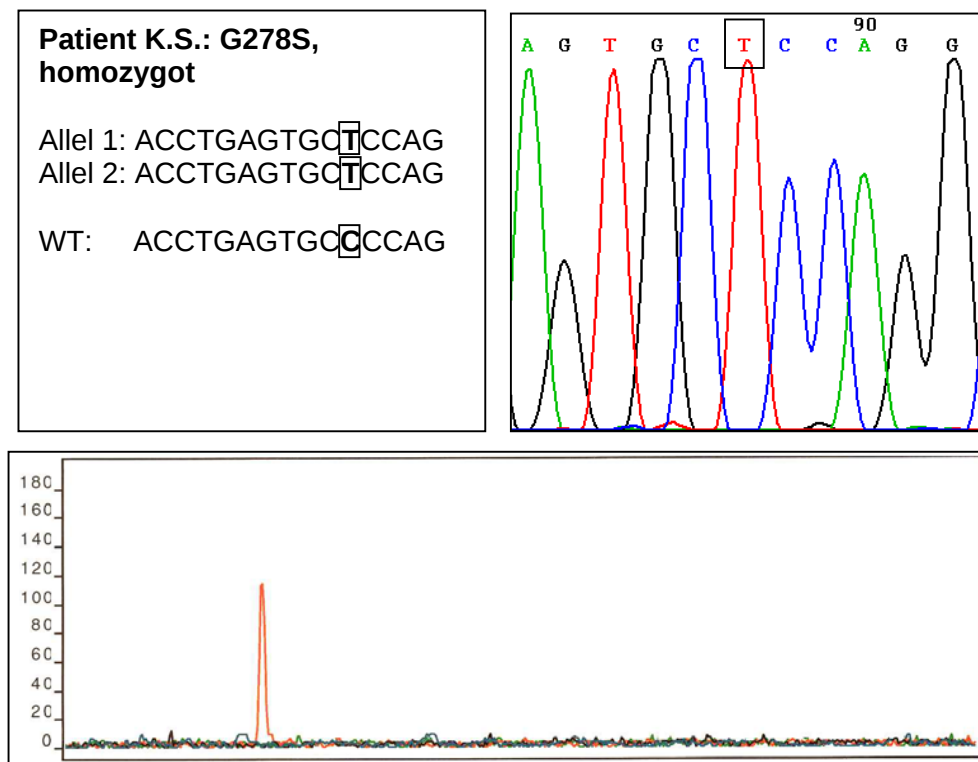
Exon 7:

Dieses Exon hat eine Fragmentlänge von 96 bp. In Exon 7 fand sich bei drei Patienten (N.D., K.S., G.D.) an der Nukleotidposition c.879 eine Transition von Guanin in Adenin. Diese Änderung des Triplets (GGC→AGC) bewirkt einen Austausch der Aminosäure Glycin in Serin an Kodonposition 278. Die G278S-Mutation konnte bei zwei Patienten (N.D., G.D.) in heterozygoter (exemplarisch Abb. 8) und bei einem Patienten (K.S.) in homozygoter Form gefunden werden (Abb. 9). Bei den heterozygot Betroffenen fand sich jeweils ein zweites mutiertes Allel im E1β-Gen. Eine korrespondierende Mutation befindet sich in Exon 4 (P123L) und eine Mutation in Exon 7. Diese beschreibt eine Deletion an Position c.855-868. Dadurch kommt es zu einem Frameshift ab Kodon 269 (Abb. 8).

Abbildung 8

Nukleotidelektrophoresesignalanalyse des Patienten G.D. mit der heterozygoten Mutation G278S (schwarzer Rahmen) und der heterozygoten Deletion c.855-868del (roter Rahmen). Hier dargestellt ist die 3'-5' Analyserichtung, daher ist die Reihenfolge der Mutationen in umgekehrter Reihenfolge wiedergegeben. (1 Signal = homozygot, 2 überlagernde Signale = heterozygot).

Abbildung 9



Oben links ist die im Vergleich zur Wildtypsequenz (WT) mutierte Patientensequenz eingerahmt. Oben rechts ist die Mutation über dem entsprechenden Nukleotidelektrophoresesignal markiert; unten wird die Validierung mittels SNaPshot gezeigt (1 Signal = homozygot, 2 überlagernde Signale = heterozygot).

Exon 8:

Dieses Exon hat eine Länge von 195 bp. In Exon 8 wurde bei einem Patienten (W.L.) eine homozygote Punktmutation gefunden. Es handelt sich um eine Transition von Thymin in Cytosin an Position 895 der cDNA. Diese Triplettänderung (GTG→GCG) beschreibt einen Austausch von Valin in Alanin. Die Mutation wird als V283A gekennzeichnet.

Bei dem vorliegenden Patientenkollektiv konnte mit dem angewendeten Methodenspektrum in den restlichen Exonen 1, 2, 9 und 10 des E1β-Gens keine Mutation gefunden werden.

Bei den im E1β-Gen aufgedeckten Mutationen handelt es sich in acht Fällen um Punktmutationen und in einem Fall um eine Deletion. Es wurden keine Polymorphismen gefunden.

Tabelle 9: Typ IB Mutationen (E1 β -Gen)

Patient	ethnische Herkunft	Gen	Exon	Mutation an Nukleotid-Position	Mutation an Protein-Position	Anzahl Allele	Vater	Mutter
H.E.	D/TR	E1 β	3	c. 378C>T	R111X	1	n.b.	wt
		E1 β	5	c.645C>G	P200A	1	wt	mt
W.L.	D	E1 β	5	c. 549C>T	R168C	1	wt	mt
		E1 β	8	c.895T>C	V283A	1	mt	wt
H.P.	D	E1 β	4	c.436T>G	V130G	1	n.b.	n.b.
		E1 β	6	c.777T>C	Y244H	1	n.b.	n.b.
N.D.	D	E1 β	4	c.415C>T	P123L	1	n.b.	n.b.
		E1 β	7	c.879G>A	G278S	1	n.b.	n.b.
K.S.	D	E1 β	7	c.879G>A	G278S	2	n.b.	n.b.
G.D.	CH	E1 β	7	c.879G>A	G278S	1	wt	mt
		E1 β	7	c.855-868del	f.shift ab Kodon 269	1	mt	wt

mt: mutiertes Allel

wt: Wildtyp

f.shift: frameshift

n.b.: nicht bestimmt (da kein Material vorhanden)

3.3.1.4. Mutationen im E2-GenExon 2:

Exon 2 hat eine Fragmentlänge von 123 bp. In diesem Exon konnte bei einem Patienten (C.D.) an der Nukleotidposition c.89-90 del eine Deletion nachgewiesen werden. Dadurch kommt es zu einem Frameshift ab Kodon 25. Die Mutter ist für diese Mutation heterozygot, der Vater zeigt die Sequenz des Wildtypes. Ein weiters verändertes Exon konnte bei diesem Patienten in Exon 7 des E2-Gen gefunden werden.

Exon 6:

Exon 6 hat eine Länge von 219 bp. Bei einer Patientin (A.R.) wurde in homozygoter Form eine "in frame" Deletion von 27 Basen beginnend ab Position 760 der cDNA (c.760-786del) nachgewiesen. Dieser Mutation liegt auf genomischer Ebene eine homozygote Punktmutation (entspräche auf der cDNA der Position c.761C→T) zu Grunde, wodurch eine neue Spleißsignalstelle entsteht, die die Aminosäuresequenz

von Exon 6 um neun Aminosäuren verkürzt. Durch das Ausspleißen dieses Fragments werden sowohl das mutierte c.761C→T als auch das vorgelagerte c.760G durch die Gesetzmäßigkeiten des Spleißvorgangs mit ausgeschnitten. Ein normalerweise im Intronbereich liegendes Spleißfragment wird immer mit einem "GT"-Signal beginnend ausgeschnitten. Dies hat zur Folge, dass auf der cDNA-Ebene von der ursprünglichen Wildtypsequenz nur noch das c.759G verbleibt, an welches sich die weiteren Nukleotide des Exon 7 anschließen. Da dieses zufällig mit der Sequenz "GC" beginnt, ist mit dem nun vorliegenden Triplet "GGC" wieder ein Glycin kodiert.

Exon 7:

Exon 7 ist 168 bp lang. In diesem Exon konnte an der Nukleotidposition 841 der c.DNA ein Basenaustausch von Thymin in Guanin nachgewiesen werden. Die Änderung des Tripletts TTT in TGT bewirkt einen Austausch der Aminosäure Phenylalanin in Cytosin an Kodonposition 276. Die Mutation konnte in heterozygoter Form gefunden werden. Die Mutter zeigt die Sequenz des Wildtypes, der Vater ist heterozygot für diese Mutation (F276C).

Exon 9:

Exon 9 hat eine Fragmentlänge von 189 bp. Hier konnte die Mutation G384S bei drei Patienten (S.B., G.D., H.E.) in heterozygoter Form nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz zeigte einen Basenaustausch von Guanin in Adenin an in Position 1164 der c.DNA. Damit erfolgt ein Aminosäureaustausch von Glycin (GGT) in Serin (AGT). Bei keinem der drei Patienten konnte ein weiteres mutiertes Allel im E2-Gen, trotz Sequenzierung sämtlicher 11 Exone, gefunden werden. Bei zwei Patienten wurden die Eltern auf diese Mutation hin untersucht, wobei ein Elternpaar die Sequenz des Wildtyps zeigt. Vom zweiten Elternpaar konnte die Mutter als homozygoter Allelträger für G384S identifiziert werden, der Vater war Wildtypträger.

In dem vorliegenden Patientenkollektiv wurde mit dem angewendeten Methodenspektrum in den übrigen Exonen 1, 3, 4, 5, 8, 10 und 11 keine Mutation gefunden.

Bei den oben beschriebenen Mutationen handelt es sich um eine Punktmutation und zwei Deletionen. Es wurden keine Polymorphismen gefunden.

Tabelle 10: Typ II Mutationen (E2-Gen)

Patient	ethnische Herkunft	Gen	Exon	Mutation an Nukleotid Position	Mutation an Protein-Position	Anzahl Allele	Vater	Mutter
A.R.	A	E2	6	c. 760-786 del	G249-K257 del	2	mt	mt
S.B.	D	E2	9	c.1164G>A	G384S	1	n.b.	n.b.
H.E.	D/ T	E2	9	c.1164G>A	G384S	1	wt	wt
G.D.	CH	E2	9	c.1164G>A	G384S	1	wt	hm
C.D.	E	E2	2	c.89-90 delAT	f.shift ab Kodon 25	1	wt	hm
		E2	7	c.841T>G	F276C	1	hm	wt

mt : heterozygoter Genotyp

wt: Wildtyp

hm: homozygote Mutante

n.b.: nicht bestimmt, da kein Material vorhanden

IV. Diskussion

4.1. Neue Eingruppierung der varianten Formen der Ahornsirupkrankheit

Bisher wurden die varianten Formen der MSUD den sogenannten intermittierenden und intermediären Formen zugeteilt (Scriver *et al.*, 1971; Chuang und Shih, 2001). Dabei war nicht genau bekannt, worin die biochemischen Unterschiede bestanden. Eine asymptotische Form, wie sie für viele andere erbliche Stoffwechselstörungen bekannt ist, wurde für die MSUD bisher nicht gesondert beschrieben.

Bei der Untersuchung von 18 Patienten mit einem ganz unterschiedlichen Schweregrad einer nicht-klassischen, varianten MSUD ließ sich unter Zugrundelegung der biochemischen und klinischen Charakteristika eine Einteilung in drei Gruppen vornehmen. Dabei handelt es sich um eine sehr milde, asymptotische Variante (Gruppe A), eine milde Variante (Gruppe B) und eine Gruppe von schweren Varianten (Gruppe C). Die restlichen 3 der insgesamt 21 untersuchten Patienten fielen im Neugeborenen Screening mittels Tandem-MS auf. In welche der drei Gruppen diese Patienten fallen, ist unklar, da sie unmittelbar nach Erhalt eines positiven Screeningbefundes zur Vermeidung einer Symptomatik behandelt bzw. überwacht wurden. Lediglich eines dieser drei Kleinkinder erlitt im Alter von 2 Jahren eine Stoffwechselentgleisung mit enzephalopathischen Symptomen und passt damit in das Bild einer milden Variante mit intermittierendem Erscheinungsbild.

Gruppe A beschreibt die sehr milde, asymptotische Verlaufsform. Die Tatsache, dass 3 der ursprünglich ohne Symptome im Neugeborenen-Screening (mittels Guthrie-Test) identifizierten Patienten bis in die dritte Lebensdekade praktisch ohne Therapie symptomfrei blieben, veranlasst uns auch für die MSUD das Vorkommen einer sehr leichten asymptotischen Variante zu postulieren. Diese Patienten wiesen ständig leicht erhöhte BCAA-Plasmaspiegel auf. Die Konzentrationen stiegen aber niemals

(auch nicht während der häufig im Kindesalter vorkommenden fieberhaften Erkrankungen mit katabolem Stress) in einen neurotoxischen Bereich mit begleitender zentralnervöser Symptomatik. Die biochemischen Parameter deuten darauf hin, dass von allen MSUD-Varianten in dieser Gruppe die höchsten Restaktivitäten für die BCKA-DH vorliegen. Dadurch ist der Organismus trotz Minderung der Enzymaktivität mit Einschränkung im Abbauweg der BCAA noch in der Lage, die anfallenden BCAA, wie sie durch eine im Proteingehalt normale Ernährung, aber auch durch akute Freisetzen aus Gewebeproteinen während kataboler Stresssituationen vorkommen, in einem noch ausreichenden Maße abbauen zu können.

14 von 18 Patienten fielen auf Grund einer klinischen Präsentation auf. 6 von ihnen wurden aufgrund der biochemischen Charakteristika einer **Gruppe (B)** mit milder Verlaufsform zugeordnet. Diese Patienten wiesen klinisch den sogenannten intermittierenden Phänotyp auf. Unter der Belastung mit großen Mengen von aus dem Muskelgewebe freigesetzten BCAA (bei katabolem Stress) kommt es bei diesen Patienten zu einer enzephalopathischen Episode bei hohen BCAA-Spiegeln, welche den intermittierenden Charakter des Krankheitsverlaufs in dieser Gruppe erklärt. Alle 6 Patienten zeigten außerhalb enzephalopathischer Episoden auch ohne wesentliche therapeutische Beeinflussung (Beschränkung des Nahrungsproteins auf das Optimum, Vermeidung einer Proteinüberladung mit der Nahrung) nur leicht erhöhte BCAA-Konzentrationen im Blut. Die eingeschränkte Enzymaktivität reicht offenbar nicht aus, in katablen Situationen die anfallenden BCAA abbauen zu können, während der Organismus mit der weit geringeren Belastung des Körpers durch eine in der täglichen Nahrung enthaltene optimale Proteinmenge noch gut fertig wird. Alle Patienten aus dieser Gruppe wiesen keine entscheidende Störung der psychomotorischen Entwicklung auf.

Die biochemischen Daten in dieser Gruppe wiesen ebenfalls eine relativ hohe Restaktivität der BCKA-DH auf. Die Aktivitätsminderung unterschied sich nicht signifikant von der Höhe der Restaktivität in der asymptomatischen Gruppe. Auch die anderen biochemischen Charakteristika diskriminierten nicht zwischen diesen beiden Gruppen.

Die **Gruppe C** beschreibt die schwere variante Verlaufsform. In dieser Gruppe wiesen die Patienten primär nicht die episodische Manifestation mit einer akuten enzephalopathischen Krise auf wie in Gruppe B, sondern sie werden mit einer gestörten psychomotorischen Entwicklung auffällig. Dies lässt sich wahrscheinlich aufgrund permanent deutlich erhöhter BCAA-Plasmaspiegel erklären. Weiterhin bedeutet dies, dass die Patienten unter einer Ernährung mit einem normalen Protein- und BCAA-Gehalt ständig erhöhte BCAA Blut- und Gewebespiegel haben innerhalb eines neurotoxischen Bereiches, der schleichend zu einer irreversiblen Hirnschädigung führt.

Insgesamt scheint diese Gruppe der schweren varianten Form(en) ein breit gefächertes biochemisches und klinisches Spektrum aufzuweisen. Vermutlich spiegelt sich die gesamte klinische Breite in der unterschiedlich eingeschränkten Restaktivität der BCKDA-DH wider (von 6-7 bis zu 2% der Norm). Der klinische Verlauf in dieser Gruppe weist damit eine Bandbreite auf, die von einem eher milden bis zu einem schweren Verlauf mit nahezu klassischem Charakter reicht.

In jedem Falle benötigen diese Patienten eine mehr oder weniger strenge MSUD-Diät, d.h. eine Ernährung mit einer stark bis sehr stark eingeschränkten Proteinmenge, der immer reichliche Mengen eines BCAA-freien Aminosäuregemischs zugesetzt werden müssen. Je später die Diagnose gestellt wird, desto schwerer wird die geistige und psychomotorische Schädigung sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Patienten untersucht, bei denen die Diagnosevariante MSUD ohne klinische Symptomatik im Neugeborenen Screening mittels Tandem-MS gestellt wurde (**Gruppe D**). Grundsätzlich können sich in dieser Gruppe Kinder mit jedem Varianten-Typ befinden.

Aus der vorliegenden Untersuchung wird deutlich, dass ganz besonders die MSUD-Varianten von einer frühzeitigen Diagnosestellung im Neugeborenen Screening profitieren. Frühzeitig kann die dem jeweiligen Schweregrad angemessene Behandlung/Überwachung gewählt werden, um den Patienten vor zu hohen Plasmaleucin-Spiegeln -sie sollten $< 300 \mu\text{mol/l}$ liegen- (Hoffmann *et al.*, 2005) und damit vor einer Behinderung der Entwicklung oder vor intermittierenden enzephalopathischen Episoden zu schützen.

4.2. Molekulargenetische Charakterisierung der Mutationen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten von den 21 bisher rein biochemisch und klinisch dargestellten Patienten exemplarisch 2-3 Patienten aus jeder Gruppe molekulargenetisch untersucht werden. Diese Analysen wurden für insgesamt 13 Patienten durchgeführt; 2 dieser Patienten (C.D., B.T.) sind aufgrund unvollständiger Angaben in der klinischen und biochemischen Betrachtung unberücksichtigt geblieben. Im Folgenden werden die bei diesen 13 Patienten mit varianter MSUD gefundenen Mutationen in Bezug auf ihre Lokalisation im Gen und ihre Auswirkungen auf die Sekundär-/Tertiärstruktur und die Funktion der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase analysiert. Grundlage dafür ist die röntgen-kristallographische Analyse des E1-Heterotetramers ($\text{E1}\alpha_2\text{E1}\beta_2$), die von Åvarsson publiziert wurde (Åvarsson *et al.*, 2000). Für die E2-Untereinheit wurden derartige Strukturanalysen bisher noch nicht veröffentlicht. Die im Folgenden aus der Literatur zitierten Mutationsbezeichnungen sind auf den Stand von Dezember 2005 aktualisiert worden.

4.2.1. Mutationen vom Typ IA

Für die varianten Formen der MSUD wurden in der Literatur bisher 17 Typ IA-Mutationen beschrieben (Nobukuni *et al.*, 1993; Ævarsson *et al.*, 2000; Chuang und Shih, 2001; Henneke *et al.*, 2003; Rodriguez-Pombo *et al.*, 2005). Dabei handelt es sich bei diesen Mutationen um Punktmutationen infolge eines einzelnen Basenaustausches. Die Verteilung der Mutationen zeigt keine Clusterbildung in bestimmten Genabschnitten.

Von ethnischer Signifikanz mit erhöhter Allelseggregation scheint jedoch die Mutation G290R zu sein. Diese Punktmutation wurde in homozygoter Ausprägung in drei nicht verwandten Hispano-Mexikanern nachgewiesen (Chuang *et al.*, 1995). Bei der türkischen Patientin (K.D.), die bei der eigenen klinischen und biochemischen Analyse der varianten Patienten (Tab.: 2-5) berücksichtigt wurde und eine schwere, nahezu klassische Variante aufweist, wurde G290R in homozygoter Ausprägung nachgewiesen (Henneke *et al.*, 2003). Eine erhöhte Allelfrequenz in der japanischen Bevölkerung zeigen auch vier weitere Typ IA-Mutationen: R159W, Q190K, A253T, I326T (Nobukuni *et al.*, 1993).

Die Mutation P39H wurde erstmals von Hennecke beschrieben (Henneke *et al.*, 2003). Diese Mutation befindet sich in der Mitochondrieneintrittssequenz. Durch teilweise oder vollständige Abspaltung der N-terminalen Mitochondrieneintrittssequenz macht sich diese Mutation im reifen Protein nicht bemerkbar. Des weiteren wird eine nur geringe Homologie unter Mensch, Maus, Ratte und Rind für das Kodon 39 beschrieben (Hu *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1989; McKean *et al.*, 1992; Chuang *et al.*, 1994). Henneke vermutete aus diesen Gründen nur eine geringe bzw. keine Wirkung auf das entstehende Protein.

In der vorliegenden Arbeit wurden 26 Allele des E1 α -Gen von Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit untersucht. Dabei konnten 5 unterschiedliche

Mutationen in insgesamt 12 Allelen nachgewiesen werden (Tab.: 7). Bei allen gefundenen Mutationen handelt es sich um Punktmutationen. Sie sind über das gesamte Gen verteilt. 4 der 5 Mutationen (P39H, R159W, A253T, V412M) sind bereits aus der Literatur bekannt (Nobukuni *et al.*, 1993; Henneke *et al.*, 2003). Die hier neu beschriebene Mutation A328T konnte homozygot bei einem türkischen Patienten mit sehr leichter asymptomatischer Variante nachgewiesen werden. Des weiteren wurden drei Polymorphismen (R12R, F324F, L407L) in insgesamt 15 Allelen nachgewiesen. Zwei der drei Polymorphismen (F324F, L407L) werden in der aktuellen NCBI-Gensequenz aufgeführt.

In dieser Arbeit wurden ca. 30% der bei 13 Patienten mit varianter MSUD nachgewiesenen Mutationen dem E1 α -Gen zugeordnet. Im nachfolgenden Kapitel 4.3. werden die Mutationen ausführlich beschrieben.

4.2.2. Mutationen vom Typ IB

Bislang wurden in der Literatur für das E1 β -Gen bei Patienten mit varianter Ahornsirupkrankheit 5 Mutationen beschrieben (Edelmann *et al.*, 2001; Henneke *et al.*, 2003; Rodriguez-Pombo *et al.*, 2005). Bei 3 der beschriebenen Mutationen handelt es sich um Punktmutationen. Die restlichen zwei Mutationen beschreiben eine Deletion 595-596 (Henneke *et al.*, 2003), die in heterozygoter Ausprägung bei dem Patienten H.H. (s. Tab.: 2-5) mit milder varianter Verlaufsform gefunden wurde, sowie eine Deletion V130del (Rodriguez-Pombo *et al.*, 2005) in der cDNA. Die in der Literatur beschriebenen Mutationen zeigen keine Häufungen in bestimmten Genabschnitten.

In der vorliegenden Arbeit wurden 26 Allele des E1 β -Gens von Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit untersucht. Dabei konnten 9 verschiedene Mutationen in insgesamt 12 Allelen nachgewiesen werden (Tab. 9), wobei 8 in der Literatur bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beschrieben sind. Die neu gefundenen Mutationen sind:

R111X, P123L, V130G, R168C, P200A, Y244H, V283A (als Punktmutationen), sowie die “frameshift“ Deletionsmutation c.855-868del. Sie sind in ihrer Lokalisation über das gesamte Gen verteilt.

Von besonderer Bedeutung ist die Punktmutation G278S. Diese Mutation ist in der Literatur in heterozygoter Ausprägung für variante Formen beschrieben worden (Edelmann *et al.*, 2001; Henneke *et al.*, 2003). Der Patient (H.H.) mit der heterozygoten Mutation G278S (Henneke *et al.*, 2003) wird in der vorliegenden Untersuchung nur in der klinischen und biochemischen Auswertung berücksichtigt. Dieser Patient weist eine milde Variante mit intermittierendem Verlauf auf. G278S tritt bei den hier molekulargenetisch untersuchten Patienten dreimal auf. Für diese Mutation liegt der Verdacht nahe, dass sie gehäuft bei MSUD-Varianten zu finden ist. Die G278S-Mutation wurde bei Patienten deutscher, österreichischer und israelischer Herkunft nachgewiesen.

Die 9 Mutationen für E1 β machen ca. 50% aller in dieser Arbeit gefundenen Mutationen bei Patienten mit varianter MSUD aus. Polymorphismen wurde für E1 β nicht gefunden. Auch die E1 β - Mutationen sollen im Folgenden ausführlich beschrieben werden (4.3.).

4.2.3. Mutationen vom Typ II

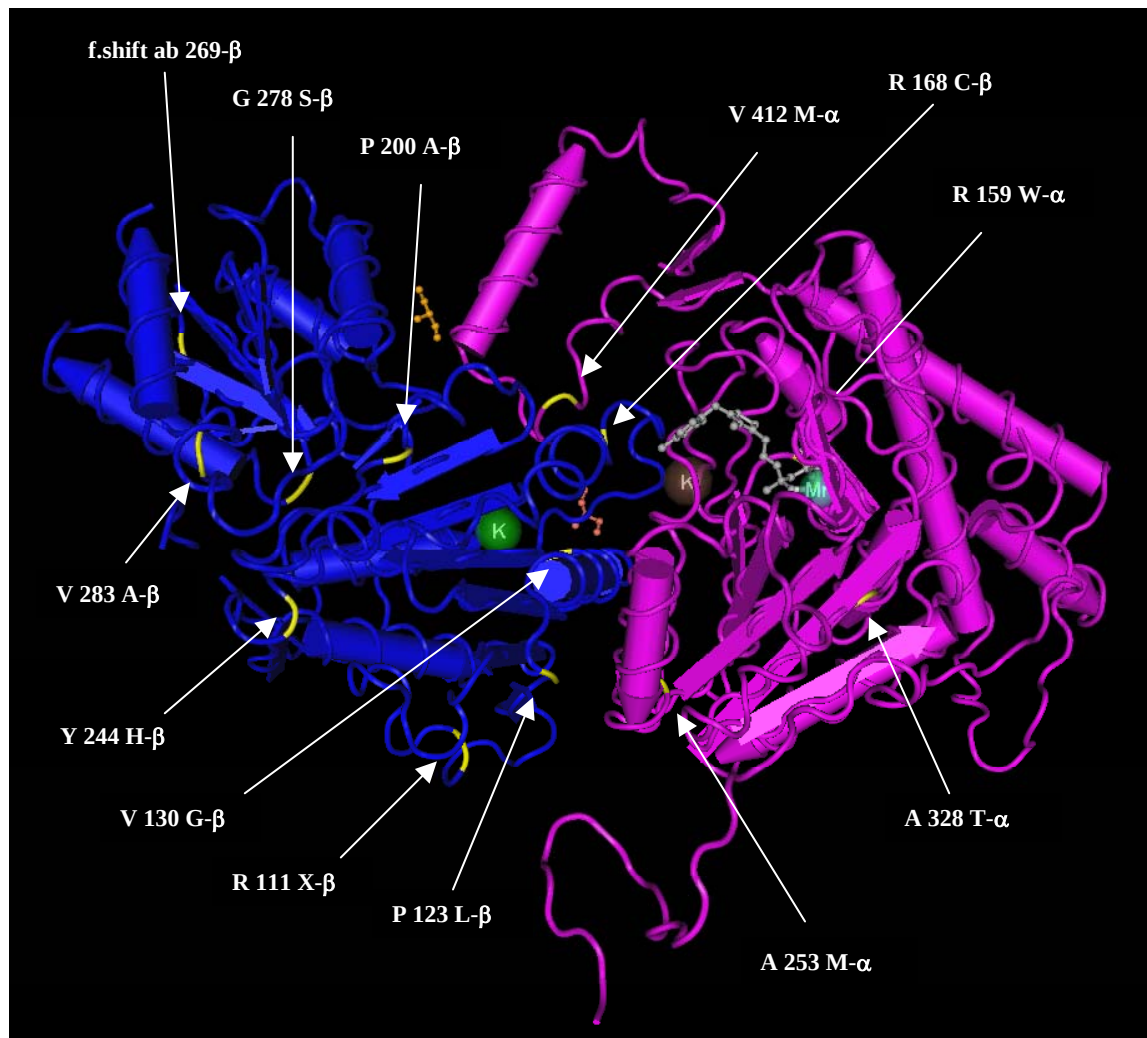
Für das E2-Gen wurden in der Literatur 24 Mutation bei Patienten mit variantem Verlauf der Ahornsirupkrankheit gefunden. 14 Mutationen sind Punktmutationen, 9 werden als Deletionen und eine als Inversion beschrieben (Mitsubuchi *et al.*, 1991; Herring *et al.*, 1992; Fisher *et al.*, 1993; Chuang *et al.*, 1997; Tsuruta *et al.*, 1998; Scriver *et al.*, 2001; Henneke *et al.*, 2003; Rodriguez-Pombo *et al.*, 2005). Auffällig erscheint hier die große Mutationsbereitschaft in langen, nicht kodierenden Intronsegmenten, wodurch eine Aktivierung oder Generierung neuer Spleißregionen zu sekundären Deletionen oder Insertionen führt. Beispielhaft hat die beschriebene Deletion IVS4del[-3,2kb;-14]

eine 17bp große spleißbedingte Insertion in der reifen mRNA zur Folge (Chuang *et al.*, 1997). Zwei weitere Mutationen führen aufgrund von fehlerhaften Spleißvorgängen zum gesamten Verlust des Exon 8, K339K und IVS8del+1g (Mitsubuchi *et al.*, 1991; Herring *et al.*, 1992). Mutationen mit erhöhter Allelseggregation sind die Punktmutation F276C und die Deletion c.89-90 delAT (Fisher *et al.*, 1991; Fisher *et al.*, 1993). Bei der Durchsicht der molekulargenetischen Ergebnisse von E2 wurden in unserem Patientenkollektiv drei aus der Literatur bekannte Mutationen (F276C, c.89-90 delAT und G384S) gefunden (Fisher *et al.*, 1991; Fisher *et al.*, 1993; Tsuruta *et al.*, 1998). Die einzige in der Literatur bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beschriebene Mutation stellt die Deletionen c.760-786 del dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 4 von 18 Mutationen (20%) dem E2-Gen zugeordnet. Polymorphismen wurden für E2 nicht beschrieben.

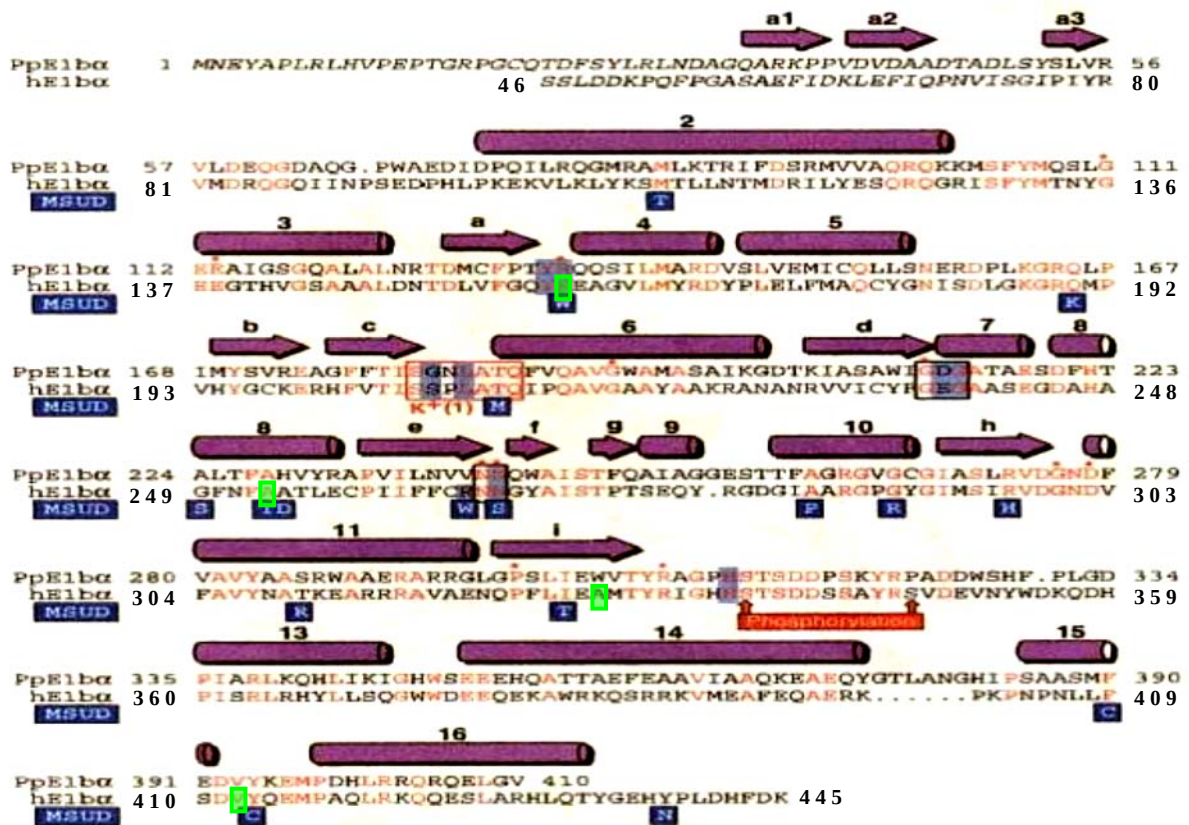
4.3. Mögliche Auswirkungen/Effekte der Mutationen:

Abbildung 10: Lokalisation der Mutationen vom Typ IA und Typ IB



Dreidimensionale Darstellung von E1 α (violett) und E1 β (blau) mit den Positionen der 13 innerhalb dieser Arbeit beschriebenen Mutationen (gelb). Die Mutation P39H- α befindet sich in der mitochondrialen Eintrittssequenz (Präprotein), die nach Eintritt in das Mitochondrium von dem reifen Protein abgetrennt wird, und ist daher hier nicht dargestellt. Typ IA- Mutationen sind mit einem - α und Typ IB-Mutationen mit einem - β gekennzeichnet. (Bearbeitung mit Cn3D 4.1, NCBI)

Abbildung 11: Sekundärstruktur der E1 α -Untereinheit von *Pseudomonas putida* und Mensch



Rot dargestellte Aminosäurereste sind in beiden Sequenzen identisch, schwarz dargestellte sind nicht identisch. Sekundärstrukturelemente sind als Zylinder (α -Helix) und Pfeile (β -Faltblatt) dargestellt. An der Cofaktorbindung beteiligte Aminosäurereste sind bläulich schattiert. Regionen, die an der Bindung der Kaliumionen beteiligt sind, haben einen roten Rahmen. Aus der Literatur bekannte Mutationen sind unterhalb der Sequenz blau angezeigt. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutationen sind mit einem grünen Kästchen umgeben. (Modifiziert aus *Æversson et al.*, 2000).

4.3.1. Mutationen im E1 α -Gen (Typ IA)

P39H

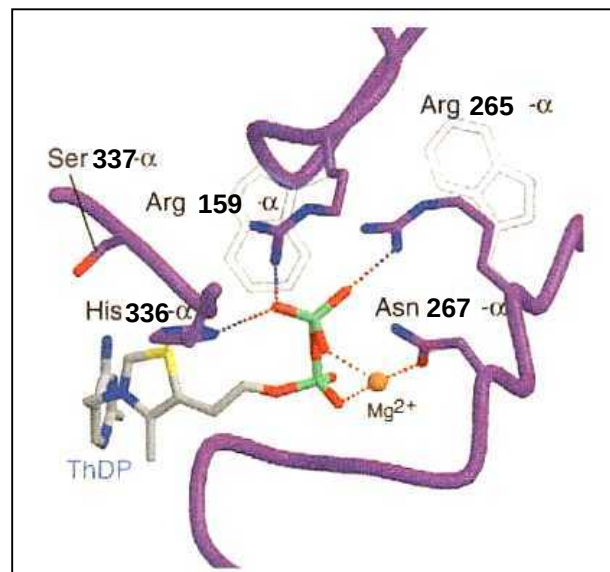
Diese Mutation lag in 3 Fällen vor. Das Kodon 39 liegt in der Mitochondrien-Eintrittssequenz und zeigt bei Mensch, Maus, Ratte und Rind eine nur geringe Homologie von 64-72% (Hu *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1989; McKean *et al.*, 1992; Chuang *et al.*, 1994). Bei der P39H-Mutation wird das neutrale Prolin mit nicht-polarer Seitenkette gegen das positiv geladene Histidin ausgetauscht. Die entsprechende Position bei Ratte und Maus zeigt jeweils einen Serinrest. In der Nukleotidsequenz des Rindes findet sich an dieser Stelle, wie bei dem soeben beschriebenen Aminosäure-

Austausch, sogar ein Histidin. Die vorangehenden und nachfolgenden Positionen sind bei den genannten drei Spezies hochkonserviert. Die Mitochondrieneintrittssequenz ist zwischen 20 und 60 Aminosäuren lang und ist im reifen Protein nicht mehr enthalten. Inwieweit die P39H-Mutation Folgen für den mitochondrialen Import hat, ist letztlich nicht geklärt. Betrachtet man aber die Homologie des Histidinrestes in der Sequenz des Rindes, so dürfte das hier beschriebene Mutationsereignis trotz der hohen Allelfrequenz von eher geringer (bzw. ohne jede) Wirkung sein.

R159W

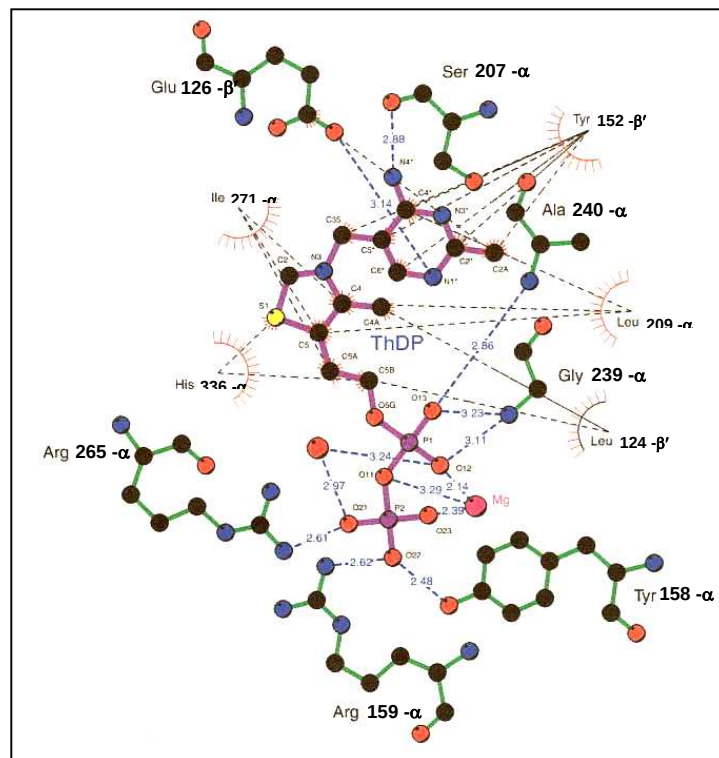
Diese Missense-Mutation beschreibt einen Austausch von Arginin (positiv geladen) gegen Tryptophan (neutrale Aminosäure, nicht-polare Seitenkette). Der hochkonservierte Argininrest 159 gehört zu einer Erkennungssequenz, der zur Kofaktorbindung von E1 beiträgt (Abb. 11,12), indem er das zugehörige Magnesiumion bindet (Ævarsson *et al.*, 2000). Somit übernimmt der geladene Seitenrest des Arginins eine Funktion, die offenbar durch die sehr viel größere und ungeladene Seitenkette des Tryptophans nicht ausgeübt werden kann. Neben dem Verlust der Fähigkeit, das Magnesiumion zu binden, könnte der große Imid-Rest des Tryptophans auch den Übergang des Proteins in seinen aktiven Zustand behindern. Zusätzlich wird wahrscheinlich auch die sterische Änderung der Kofaktorbindung des Thiaminpyrophosphats unterbunden (Abb. 13). Diese Mutation wurde bei einer Patientin (S.B. mit leichter MSUD Variante) in heterozygoter Form nachgewiesen. Ein weiteres verändertes Allel in E1 α wurde bei der Patientin nicht gefunden. Somit kann nichts über die Auswirkung der Mutation auf den Schweregrad einer MSUD gesagt werden. Die Mutation R159W bewirkt nach der Literatur in der japanischen Bevölkerung eine klassische MSUD (Nobukuni *et al.*, 1993).

Abbildung 12: Thiaminpyrophosphatbindungsstelle



Die Aminosäuren Arginin R159- α und R265- α und Aspartat N267- α beteiligen sich mit ihren Seitenketten an einer Erkennungssequenz für die Kofaktorbindung (Kofaktor: ThDP). Durch den Austausch der Aminosäure Arginin in Tryptophan an Position 159 kann es zu sterischen Änderungen kommen, die so die Bindung von Thiaminpyrophosphat (ThDP) verhindern bzw. unmöglich machen. Die schematische Darstellung der Kofaktorbindung unter Berücksichtigung der genauen sterischen Anordnung von α,β' und α',β -Untereinheiten ist in der folgenden Abb.: 13 dargestellt. (Modifiziert aus *Æversson et al.*, 2000).

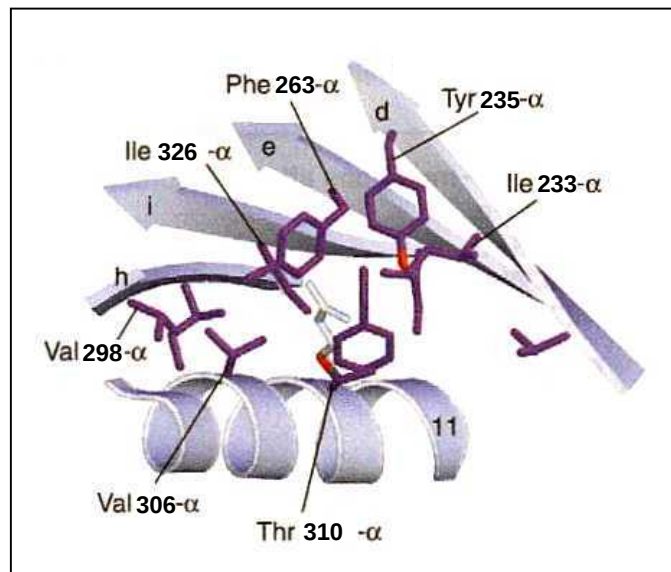
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Kofaktorbindungsstelle



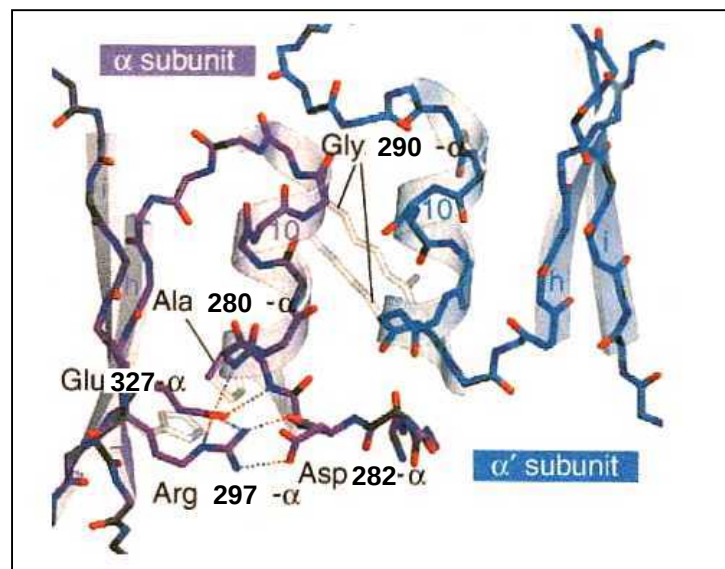
Die Bindungsstelle von Thiaminpyrophosphat wird aus den Untereinheiten α,β' und α',β -gebildet. Die dargestellten Aminosäuren fungieren als Proteinliganden für Magnesiumionen. Unten ist die Aminosäure R 159- α dargestellt. (Modifiziert aus *Æversson et al.*, 2000).

A328T

Die A328T-Mutation (Austausch von Alanin gegen Threonin) befindet sich in der Sekundärstruktur der E1 α -Untereinheit im Bereich des β -Faltblatts i. Die β -Faltblatt-Strukturen i, a, d, e und h, sowie die Seitengruppen der α -Helix-3 und 11 bilden in der Hauptdomäne der α -Untereinheit den hydrophoben Kernbereich (Abb. 11,14). Alanin (neutrale Aminosäure, nicht-polare Seitenkette) wird durch Threonin (neutrale Aminosäure, durch Hydroxylgruppe polare Seitenkette) ersetzt. Dieser Austausch wird wahrscheinlich in der hydrophoben Region nicht toleriert. Es könnte zu sterischen Veränderungen und somit zu einem Stabilitätsverlust des Proteins kommen. Innerhalb des Heterotetramers wird die Kontaktfläche der beiden α - α' Untereinheiten hauptsächlich durch die beiden α -Helices 10 gebildet (Abb. 11,15). Diese α -Helices bilden ein ausgedehntes Netzwerk von Disulfid- und Wasserstoffbrücken, wodurch die präzise Konformation der α - α' Kontaktfläche und damit die Zusammenlagerung zu einem aktiven Heterotetramer sichergestellt wird. Dabei bildet Alanin der Position 328 eine Wasserstoffbrücke mit Glutamin der Position 327 aus. Diese stabilisierende Wasserstoffbrücke kann aufgrund einer ersetzenden Aminosäure mit längerer polarer Seitenkette (Position 328) und der damit verbundenen sterischen Veränderung nicht ausgebildet werden. Somit kann die Bindung der vier Untereinheiten innerhalb des E1-Heterotetramers destabilisiert sein. *Ævarsson* zeigte, dass in der Familie der heterotetrameren E1 Proteine an der Position 326 nur Leucin, Isoleucin und Valin gefunden werden, die alle eine nicht-polare Seitenkette besitzen (*Ævarsson et al.*, 2000). In diesem Proteinbereich scheinen Aminosäuren mit nicht-polarer Seitenkette unerlässlich für die Interaktion der Untereinheiten zu sein. Die A328T-Mutation wurde in homozygoter Form bei H.A., einem Patienten türkischer Herkunft mit konsanguinen Eltern, gefunden. Dieser Junge weist eindeutig eine sehr leichte, während der ersten 9 Lebensjahre asymptomatisch verlaufende MSUD-Varainte auf. Die mehrfach bei Patienten mit „intermediärer“, also schwerer Variante der MSUD gefundene benachbarte I326T-Mutation befindet sich ebenfalls im Bereich des β -Faltblatts i und betrifft ebenfalls den hydrophoben Kern (*Nobukuni et al.*, 1993; *Ævarsson et al.*, 2000).

Abbildung 14: Der hydrophobe Kern in der Hauptdomäne der α - Untereinheit

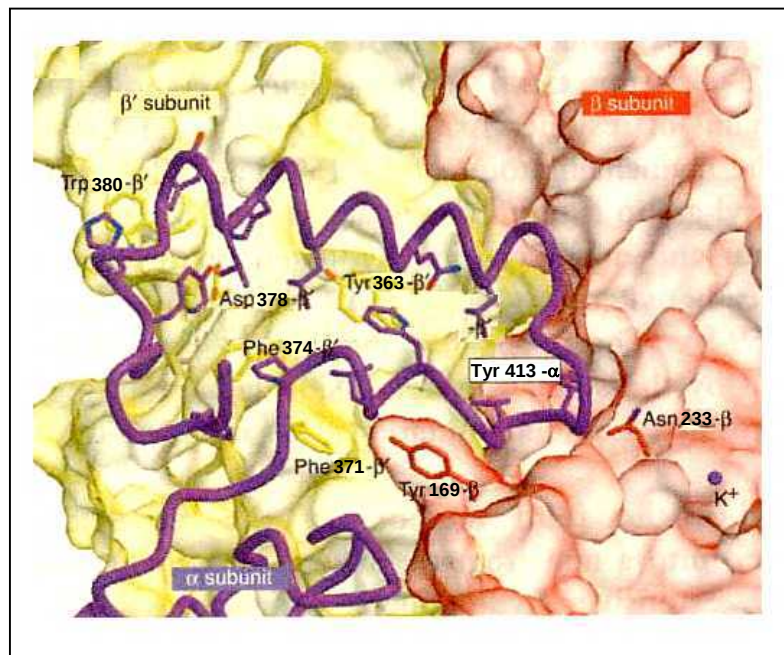
Die hier dargestellten β - Faltblätter (Pfeile) d, e, h, i und die α - Helix 11 (Spirale) bilden unter anderem die Hauptdomäne der α -Untereinheit und damit einen Teil des hydrophoben Kern aus. Die oben dargestellte Mutation A328T befindet sich ebenfalls wie die bereits bekannte Mutation I326T in β -Faltblatt i. Somit könnte angenommen werden, dass aufgrund der sterischen Änderung nicht nur die α - α' -Kontaktfläche direkt, sondern auch die optimale Organisation des hydrophoben Kerns betroffen ist. (Modifiziert aus *Æversson et al.*, 2000).

Abbildung 15: Kontaktfläche der α - α' -Untereinheit

Die α - α' -Untereinheiten des E1b-Tetramers sind über ein Netzwerk von geladenen Gruppen (Disulfidgruppen und Wasserstoffbrücken) der N-terminalen Enden der α - bzw. α' -Helix (10) verbunden. Diese Interaktionen sind unerlässlich für eine präzise Positionierung der α - bzw. α' -Helices und damit für eine korrekte Ausbildung der Kontaktflächen zueinander. Die Aminosäure Glutamin G327- α ist unter anderem an der Kontaktbildung der α -Untereinheiten beteiligt. Aufgrund des Aminosäureaustausches an Position 328 von Alanin (mit apolarer Seitenkette) in Threonin mit großer polarer Seitenkette kann eine korrekte Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung mit der benachbarten Aminosäure an Position 327- α erfolgen. Somit könnte dies einen Effekt auf die exakte Konformation der α - α' -Kontaktfläche haben. (Modifiziert aus *Æversson et al.*, 2000).

V412M

Bei der V412M-Mutation ist Valin (neutrale Aminosäure mit nicht-polarer Seitenkette) gegen die große, schwefelhaltige Aminosäure Methionin (neutrale Aminosäure, nicht-polare Seitenkette) ausgetauscht. Dadurch könnte es zu Wechselwirkungen mit der benachbarten Aminosäure Tyrosin 413 kommen. Die Seitenkette von Tyrosin 413 beteiligt sich an der Taschenbildung der β -Untereinheit, welche von den Seitenkettenresten Asn 233- β , Lys 211- β und Pro 309- β und mit den alpha C-Atomen von Gly 209- β und Ile 210- β gebildet werden (Abb. 16). Die phenolische OH- Gruppe des Tyrosin 413 stellt Wasserstoffbrückenbindungen zu einer Carbonylgruppe (210- β) und zu einer Imingruppe (209- β) her. Es stellt sich somit die Frage, ob die Wechselwirkung der schwefelhaltigen Seitenkette zu Veränderungen der Verbindung des α - β Heterodimers führen. Bei der bekannten Mutation Y413C wird wahrscheinlich angenommen, dass trotz mutierter α -Untereinheit die α -Untereinheit mit der β -Untereinheit ein wahrscheinlich normales Heterodimer und in der Folge ein Heterotetramer bilden kann (Ævarsson *et al.*, 2000). In der Zusammenlagerung des E1-Tetramers betrifft diese Mutation die Zusammenlagerung von α - β' und $\alpha'-\beta$ Untereinheit und somit das α_2 - β_2 Heterotetramer. Eine mögliche Auswirkung auf die Aminosäure 409 aufgrund sterischer Veränderung kann angenommen werden. Dadurch würde es zur Verhinderung der stabilen Aggregation der Untereinheiten zu einem α_2 - β_2 Heterotetramer kommen. Diese würde eher mit einer schweren Verlaufsform übereinstimmen. Die bekannte Mutation F409C beschreibt den gleichen Effekt auf die α_2 - β_2 Heterotetramerbildung und ist bei klassischer Ahornsirupkrankheit bei Hispano-Mexikanern nachgewiesen worden (Chuang *et al.*, 1995). Die V412M-Mutation wurde bereits für die klassische Form der MSUD beschrieben (Henneke *et al.*, 2003). Sie wurde hier bei der Patientin M.Y. in homozygoter Form mit nahezu klassischem Phänotyp gefunden.

Abbildung 16: Interaktion zwischen α - und β -Untereinheit

Darstellung der Kontaktbereiche der kleinen C-terminalen Domäne der α -Untereinheit mit der β - und β' -Untereinheit. Die C-terminale Domäne ist als spirale (violett) mit einzelnen Seitenketten dargestellt. Die β -Untereinheit ist transparent orange und die β' -Untereinheit im Hintergrund transparent gelb gezeigt. Die α -Untereinheit hat somit Kontakt zu beiden β -Untereinheiten und ist mit diesen über eine hohe Prävalenz von aromatischen Seitenresten verbunden. Eingerahmt ist die bekannte Mutation Y413T. Sie betrifft die Kontaktfläche der α - β -Untereinheit. Somit könnte angenommen werden, dass auch die benachbarte Mutation V412M Veränderungen der α - β -Dimersierung zur Folge hat. (Modifiziert aus *Æversson et al.*, 2000).

R12R-Polymorphismus

Dieser Polymorphismus wurde bisher nicht beschrieben. R12R betrifft die Region der Mitochondrieneintrittssequenz (Zhang *et al.*, 1990). Dieser Polymorphismus wurde in 2 von 26 Allelen gefunden.

F324F-Polymorphismus

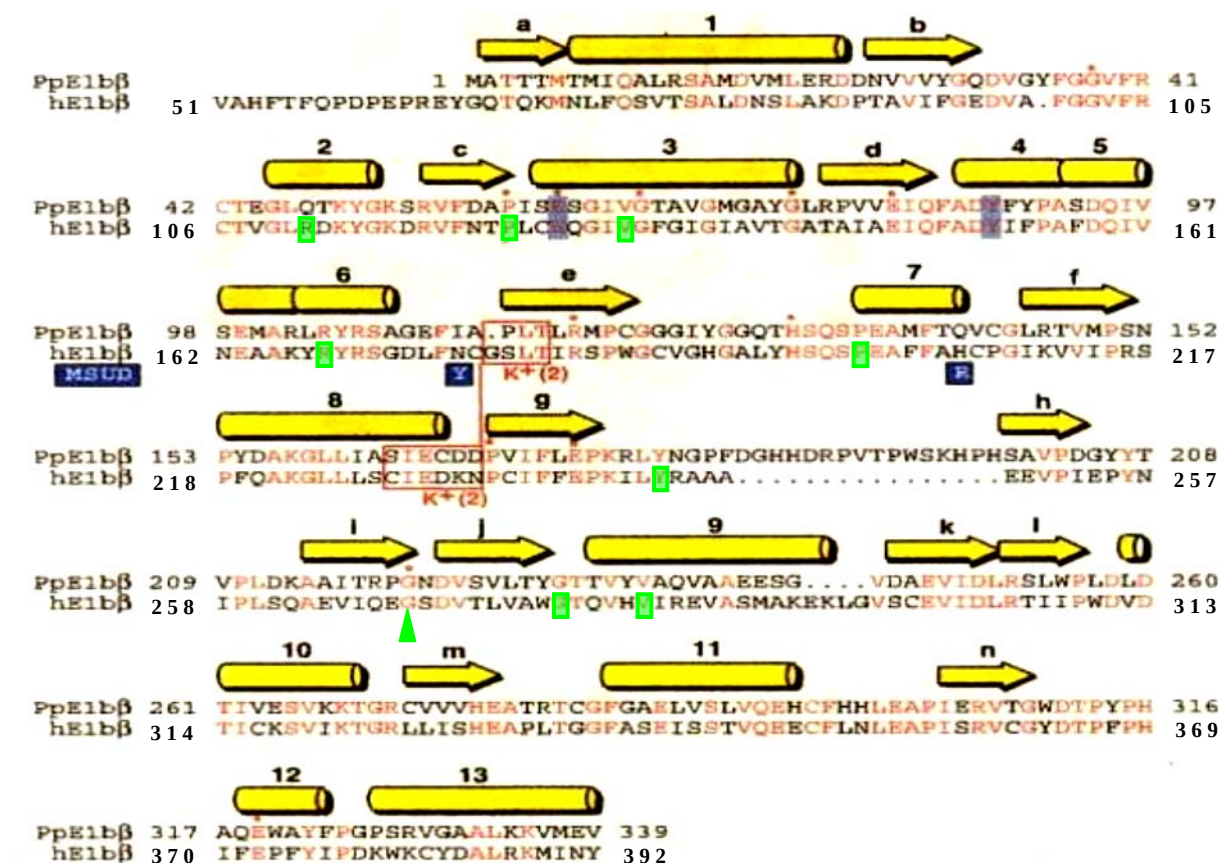
Es handelt sich um einen bereits bekannten Polymorphismus (Henneke *et al.*, 2003), der einen Bereich betrifft, der nicht durch Spleißvorgänge beeinflusst wird (Senapathy *et al.*, 1990). Dieser Polymorphismus konnte in 6 von 26 Allelen gefunden werden. In der Referenz-cDNA (NM_000709) wird dieser Polymorphismus beschrieben.

L407L- Polymorphismus

Auch der L407L Polymorphismus betrifft keine Regionen, die für Spleißvorgänge kodieren. Er ist bereits bekannt (Senapathy *et al.*, 1990; Henneke *et al.*, 2003). Er wurde in 7 von 26 Allelen gefunden. In der Referenz-cDNA (NM_000709) wird dieser Polymorphismus beschrieben.

4.3.2. Mutationen im E1 β -Gen (Typ IB)

Abbildung 17: Sekundärstruktur der E1 β -Untereinheit von *Pseudomonas putida* und Mensch



Rot dargestellte Aminosäurereste sind in beiden Sequenzen identisch, schwarz dargestellte sind nicht identisch. Sekundärstrukturelemente sind als Zylinder (α -Helix) und Pfeile (β -Faltblatt) dargestellt. An der Kofaktorbindung beteiligte Aminosäurereste sind bläulich schattiert. Regionen, die an der Bindung der Kaliumionen beteiligt sind, haben einen roten Rahmen. Aus der Literatur bekannte Mutationen sind unterhalb der Sequenz blau angezeigt. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutationen sind mit einem grünen Kästchen umgeben, der Beginn der neu gefundenen frameshift-Mutation ist mit einem grünen Dreieck markiert. (Modifiziert aus *Æversson et al.*, 2000).

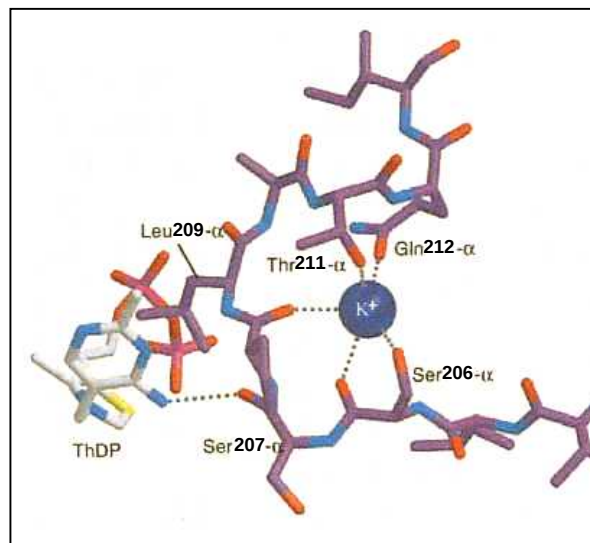
R111X:

Die Mutation R111X wurde bisher noch nicht beschrieben. Arginin 111 liegt im Zentrum von α -Helix-2 in einer nicht konservierten Region (Hu *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1989; Dariush *et al.*, 1991; Costeas *et al.*, 1996; Ævarsson *et al.*, 2000). Durch diese Nonsense-Mutation wird der Code für die geladene Aminosäure Arginin zu einem Stopkodon. Dadurch kommt es zu einem verfrühten Abbruch der Translation. Dem daraus resultierenden Protein fehlen somit ca. 75% seiner eigentlichen Größe. Wie man von "nonsense"-Mutationen weiß (Chuang *et al.*, 1994; Chinsky *et al.*, 1998), führen mutationsbedingte vorzeitige Stoppsignale aufgrund deutlich herabgesetzter Spiegel an mRNA auch zu einer entsprechend herabgesetzten Synthese des verkürzten Proteins. Man kann davon ausgehen, dass mit dieser Mutation (in homozygoter Form) eine klassische MSUD assoziiert wäre. Der Patient (H.E.) ist "compound" heterozygot für R111X und hat zusätzlich eine P200A-Mutation (s. dort).

P123L

Bei dieser Punktmutation wird Prolin durch das „offene“ und kohlenstoffreichere Leucin ersetzt. Das Kodon 123 befindet sich am Ende der β -Faltblattstruktur c. Aufgrund des Aminosäurenersatzes kann es zu Wechselwirkungen mit benachbarten Aminosäuren kommen. Am N-terminalen Ende der α -Helix bindet der Glutaminsäurerest 121- β an das N1-Atom sowie Serin 207- α an das N4-Atom des Pyrimidinrings des Thiaminpyrophosphats. Somit könnte diese Mutation zu Störungen in der Bindung des Kofaktors und dadurch zur Beeinträchtigung der Enzymaktivität der BCKA-DH führen (Abb. 17,18). Diese Mutation wurde bisher nicht beschrieben. Der Patient N.D. mit einer bis ins Erwachsenenalter asymptomatischen Variante der MSUD ist "compound" heterozygot für diese Mutation. Das zweite mutierte Allel befindet sich in Kodonposition 278 und beschreibt den Austausch von Glycin in Serin. Mit welchem Schweregrad von MSUD diese P123L-Mutation assoziiert ist, ist letztlich nur durch detaillierte Funktionsstudien zu klären. Die Mutation G278S wird weiter unten ausführlich beschrieben.

Abbildung 18: Kaliumstabilisierende Schleife der α - Untereinheit mit Beteiligung der Thiaminpyrophosphatbindungsstelle



Das Kaliumion stabilisiert eine Schleife innerhalb der α -Untereinheit, welche an der Bindungsstelle von Thiaminpyrophosphat beteiligt ist. Kalium wird über die Carbonylgruppen der Hauptketten Serin 207- α und Leucin 209- α und über die Seitenketten von Thr 211- α , Glu 212- α und Ser 206- α gebunden. Die Carbonylkette von Serin 207 ist direkt an der Kofaktorbildung beteiligt sowie auch der Glutaminrest 212- α , der durch die benachbarte Mutation P123L- β eine mögliche sterische Änderung erfahren hat. Aufgrund dieser Tatsache können Störungen der Kofaktorbildung angenommen werden. (Modifiziert aus *Ævarsson et al.*, 2000).

V130G:

Bei dieser Punktmutation handelt es sich um einen konservativen Austausch des apolaren Valins (mit langer Seitenkette) durch das apolare Glycin (mit kurzer Seitenkette). Valin 130 befindet sich in einem konservierten Bereich (Mensch und *Pseudomonas putida*) (*Ævarsson et al.*, 2000). Das Kodon 130 befindet sich in der Region von α -Helix 3, die an der Bildung des aktiven Zentrums für die Bindung des Kofaktors Thiaminpyrophosphat an der Kontaktstelle der α - β' und α' - β Untereinheit beteiligt ist (*Ævarsson et al.*, 2000, Abb. 17). Der Bereich von Glutaminsäure 126 bis Glycin 140 ist hoch konserviert, und es sind hier fast ausschließlich neutrale Aminosäuren mit nicht-polaren Seitenketten zu finden. Im vorliegenden Fall wäre wahrscheinlich zu erwarten, dass sich durch eine Aminosäure mit längerer Seitenkette eine fehlerhafte räumliche Anordnung der nachfolgenden Aminosäuren ergibt. Des weiteren könnte die sterische Veränderung infolge des Aminosäureaustausches auch einen Einfluss auf die

unmittelbar davor liegende Glutaminsäure 126 ausüben. Glutaminsäure 126 könnte nicht mehr an den Pyrimidinring des Thiaminpyrophosphat gebunden werden. Die V130G-Mutation wurde bei einem Patienten (H.P.) mit einer milden MSUD-Variante in einem Allel nachgewiesen. Im zweiten Allel für die E1 β -Untereinheit weist er die weiter unten diskutierte Mutation Y244H auf. Für die V130G-Mutation wäre zu klären, mit welchem MSUD-Schweregrad sie assoziiert ist. Sie wurde bisher noch nicht beschrieben.

R168C:

Diese Missense-Mutation beschreibt einen Austausch der positiv geladenen Aminosäure Arginin gegen das schwefelhaltige Cystein mit nicht-polarer Seitenkette. Dieser Austausch befindet sich in einer hochkonservierten Region der α -Helix 6 (Hu *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1989; Dariush *et al.*, 1991; Costeas *et al.*, 1996; Ævarsson *et al.*, 2000). Ævarsson *et al.* beschreiben in ihrer Arbeit die elementare Funktion von Arginin 168: über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken ist es mit seinen Interaktionspartnern an der Stabilität der β -Untereinheit beteiligt. Synchron stellen diese Partner (Asparagin 176- β , Glycin 178- β , Lysin 232- β) eine wichtige K⁺ Bindungsstelle dar. Hier ist die fehlende Bindung zur Carbonylgruppe des Lysin 232- β von besonderer Bedeutung. Durch den Austausch mit Cystein könnte es wegen seiner starken Neigung, Disulfidbrücken auszubilden, zu konformationsändernden Interaktionen mit anderen Aminosäurepartnern kommen. Diese Mutation wurde bei einer Patienten (W.L.) mit einer milden MSUD-Variante in heterozygoter Form gefunden. Die Mutation wurde bisher noch nicht beschrieben. Für die Patientin liegt eine "compound" Heterozygotie mit einer zweiten Mutation (V283A) im E1- β -Gen vor.

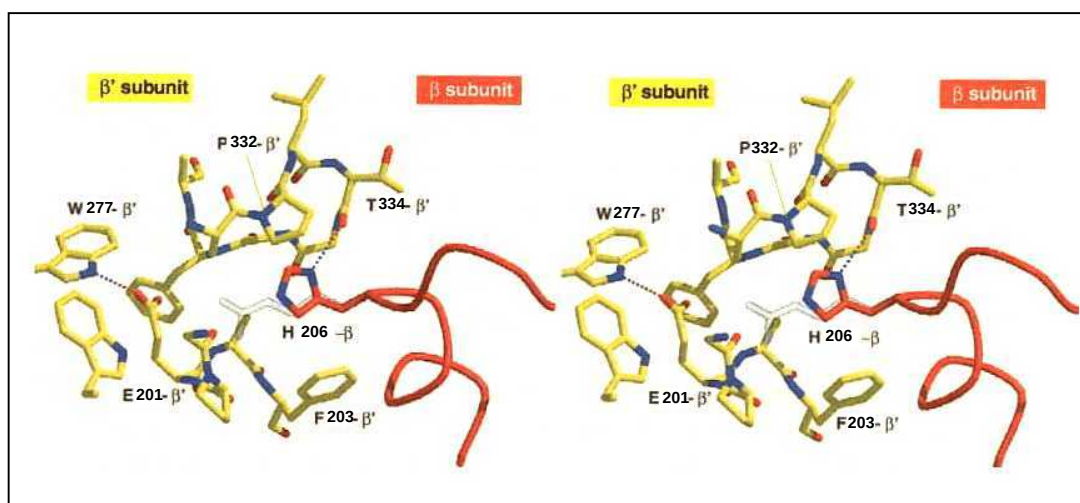
P200A

Diese Punktmutation beschreibt einen Austausch der größeren neutralen Aminosäure Prolin mit nicht-polarer Seitenkette durch die kleinere neutrale Aminosäure Alanin, ebenfalls mit nicht-polarer Seitenkette. Das Kodon 200 befindet sich am Anfang der α -

Helix 7 in E1- β . Die Aminosäuren in dieser Region sind von größter Bedeutung für die Interaktion zwischen zwei β -Untereinheiten (Ævarsson *et al.*, 2000). Wie ein Knopf ins Knopfloch stülpt sich die Seitenkette des benachbarten Histidin 206- β der einen β -Untereinheit in die Tasche der anderen β -Untereinheit, die aus den Seitenketten von Phenylalanin 203- β und Prolin 332- β gebildet wird (Abb. 19). Infolge der möglichen sterischen Änderung der α -Helix 7 durch die Mutation kann die Festigkeit dieser Bindung als wahrscheinlich reduziert angesehen werden.

Diese Mutation wurde hier erstmals in heterozygoter Form bei dem Patienten H.E. mit nachgewiesen. Sie bewirkt wahrscheinlich eine Verminderung der Bindungsintensität zweier β -Untereinheiten und stellt damit eine exakte Zusammenlagerung der Untereinheiten zum enzymatisch aktiven Heterotetramer in Frage. Diese Mutation wurde bisher noch nicht beschrieben. Es ist zu erwarten, dass sie eine milde Variante der MSUD bewirkt, da sie in "compound" heterozygoter Form mit einer "nonsense"-Mutation (R111X) vorliegt. Für die letztgenannte Mutation ist in homozygoter Ausprägung eine stark reduzierte Enzymaktivität und damit eine klassische Form der MSUD zu erwarten.

Abbildung 19: Stereoisomere Sicht der Kontaktfläche der β - β' - Untereinheit



Stereoisomere Sicht auf die Bindungsstelle der β - β' -Untereinheit. Der exakte Sitz der Seitenkette von Histidin ist Voraussetzung für die Taschenbildung, und damit für die korrekte Verbindung zwischen β - und der β' -Untereinheit. Aufgrund der benachbarten P200A-Mutation kann es zu sterischen Veränderungen in der Aminosäuresequenz kommen, die eine Taschenbildung damit unmöglich machen kann. (Modifiziert aus Ævarsson *et al.*, 2000).

Y244H

Bei der Y244H Mutation ist Tyrosin (neutrale Aminosäure mit polarer Seitenkette) durch Histidin (positiv geladene Aminosäure) in Kodonposition 244 ersetzt. Tyrosin ist in dieser Region bei Maus, Mensch, Ratte, Rind und *Pseudomonas putida* konserviert (Zhao *et al.*, 1992; Chinsky *et al.*, 1993; Nobukuni *et al.*, 1993; Chuang *et al.*, 1996; Ævarsson *et al.*, 2000). Im Hinblick auf die Kristallstruktur der E1 β -Untereinheit befindet sich dieses Kodon in einem Verbindungsbereich (242-248) der C-terminalen Domäne (Reste 249-392) und der N-terminalen Domäne (Reste 51-241). Durch den Austausch der neutralen Aminosäure mit aromatischer Seitenkette in eine positiv geladene Aminosäure mit heterozyklischer Seitenkette könnte es zu räumlichen Veränderungen an der Bindungsstelle kommen, zu einer Änderung der Gesamtkonfiguration der E1 β -Untereinheit und damit zu einer Beeinträchtigung der enzymatischen Aktivität. Die Mutation Y244H bewirkt wahrscheinlich eine Veränderung in der Faltung des Proteins und der Bindung des Kofaktors Thiaminpyrophosphat. Sie ist bisher noch nicht beschrieben. Ein Patient mit milder MSUD Variante ist „compound“ heterozygot für die Y224H und die oben bereits erwähnte V130 G-Mutation im E1 β -Gen.

Frameshift ab Kodon 269:

Die c.855-868del Deletion von 14 Basenpaaren ab Kodon 269 wird hier erstmals beschrieben. Kodon 269 befindet sich in dem β -Faltblatt i in einem konservierten Bereich (Zhao *et al.*, 1992; Chinsky *et al.*, 1993; Nobukuni *et al.*, 1993; Chuang *et al.*, 1996; Ævarsson *et al.*, 2000). Durch die Deletion kommt es bei der Translation zu einer Verschiebung des Leserasters und somit ab Kodon 269 zur Generierung einer im Folgenden fehlerhaften neuen Proteinsequenz. In seiner Konsequenz könnte dieser Zustand einer Auswirkung wie bei der Nonsense-Mutation R111X gleichkommen. Im Hinblick auf die Kristallstruktur der gesamten E1-Komponente erscheint es möglich, dass durch diesen Frameshift der Verlust von funktionell wichtigen Bereichen erzwungen wird, zumal hier ein Großteil der C-terminalen Domäne von E1 β und somit

die Bindungsdomäne der E2-Komponente am E1-Heterotetramer betroffen ist (Ævarsson *et al.*, 2000).

G278S

Diese Punktmutation in Kodonposition 278 zeigt einen Austausch von Glycin mit einer apolaren, kleinen Seitenkette gegen Serin mit einem ungeladenen, polaren Seitenrest. Diese Aminosäure ist zwischen Maus, Mensch, Ratte, Rind und *Pseudomonas putida* konserviert (Zhao *et al.*, 1992; Chinsky *et al.*, 1993; Nobukuni *et al.*, 1993; Chuang *et al.*, 1996; Ævarsson *et al.*, 2000). Glycin 278 und Threonin 279 stellen die Verbindung zwischen dem β -Faltblatt j und der α -Helix 9 dar (Abb. 17). Das β -Faltblatt j, ein Sekundärstrukturelement, endet mit der Aminosäure Tryptophan 277, die über ihre Seitenkette eine Wasserstoffbrückenbindung mit Glutaminsäure 201 der β -Untereinheit eingeht. Diese Aminosäure ist wiederum an der Bildung einer hydrophoben „Tasche“, an der sich eine andere β -Untereinheit anlagert, beteiligt (Histidin 206- β). Diese Stelle beschreibt die β - β' -Bindungsstelle innerhalb des Heterotetramers. Durch die G278S-Mutation könnte es zu einer fehlerhaften bzw. destabilisierenden Wechselwirkung der Zusammenlagerung der β -Untereinheiten kommen, und damit zu einer möglichen Auswirkung auf die Enzymaktivität.

In der Literatur ist ein Patient beschrieben, der ein „compound“-heterozygoter Allelträger für die Mutation G278S ist. Dieser Patient trägt im zweiten Allel die Punktmutation R233P (Edelmann *et al.*, 2001). In homozygoter Ausprägung führt die Mutation R233P zu einer klassischen Verlaufsform. Die Tatsache, dass der Patient phänotypisch eine milde Form der MSUD aufweist, deutet darauf hin, dass die G278S-Mutation mit einer leichten MSUD-Variante in Einklang steht. Die gleiche Annahme kann für den Patienten H.H., mit einem milden, klinischen Phänotyp, gelten. Er ist „compound“ heterozygot für die Mutation G278S und für die Deletion 595-596del AG. Der Patient H.H. ist in der Literatur bereits beschrieben worden (Henneke *et al.*, 2003). In dem hier bearbeiteten Patientenkollektiv wurde die G278S-Mutation bei zwei

Patienten mit asymptomatischer Form und bei einem Patienten mit milder Form gefunden. In einem Falle (K.S.) lag diese Mutation in homozygoter Form vor, die zwei anderen Patienten (N.D. und G.D.) waren für diese Mutation „compound“-heterozygot. Bei dem Patienten N.D. trägt das zweite Allel die Mutation P123L, bei der Patientin G.D. einen „frameshift“ ab Kodonposition 269.

V283A

Diese Punktmutation beschreibt einen konservativen Aminosäureaustausch von Valin gegen Alanin. In beiden Fällen handelt es sich um neutrale Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten. Valin ist in dieser Position zwischen Mensch, Ratte, Maus und Rind konserviert (Zhao *et al.*, 1992; Chinsky *et al.*, 1993; Nobukuni *et al.*, 1993; Chuang *et al.*, 1996; Ævarsson *et al.*, 2000). Kodon 283 liegt in Bezug zu den Sekundärstrukturelementen des Proteins im Bereich der α -Helix 9 im Anteil der C-terminalen Domäne (Ævarsson *et al.*, 2000, Abb. 17). Diese Domäne geht zahlreiche Interaktionen mit den anderen drei Untereinheiten bei der Zusammenlagerung zum E1-Heterotetramer ein und beinhaltet die Bindungsstelle für die Bindungsdomäne der E2-Untereinheit. Es ist zu vermuten, dass bei dieser Mutation aufgrund des kleineren und nicht-verzweigten Seitenrests der neuen Aminosäure Alanin wahrscheinlich nicht in gleichem Maße Wechselwirkungen mit den drei Untereinheiten bzw. mit der E2-Untereinheit eingegangen werden können. Ein Patient mit milder MSUD-Variante ist „compound“ heterozygot für die V283A Mutation und die oben bereits beschriebene R168C-Mutation im E1 β -Gen.

4.3.3. Mutationen im E2-Gen (Typ II)

Frameshift ab Kodon 25:

Die c.89-90del AT Deletion ab Kodon 25 ist bereits aus der Literatur bekannt (Fisher *et al.*, 1993). Durch die Deletion kommt es bei der Translation zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einer im Nachfolgenden fehlerhaften Proteinsequenz. Trotz

fehlender kristallographischer E2-Struktur kann angenommen werden, dass aufgrund der sehr frühen Position der Deletion eine wahrscheinlich schwere Beeinträchtigung der nachfolgenden funktionellen Bereiche des Proteins erwartet werden könnte. Welchem klinischen Schweregrad sie entsprechen würde, bleibt letztlich noch ungeklärt, da diese Mutation hier lediglich in heterozygoter Ausprägung vorliegt.

G249 –K257 del:

Trotz fehlender aufgelöster kristallographischer E2-Strukturen lässt die in diesem Fall homozygot vorliegende Mutation aufgrund ihres milden biochemischen und klinischen Phänotyps die Vermutung zu, dass die durch sie bedingte Deletion von neun Aminosäuren das Protein lediglich an einer nicht essentiellen Position beeinflussen könnte. Diese Hypothese wird zusätzlich durch den Umstand unterstützt, dass sich die dargestellte Deletion „in frame“ befindet, so dass der weitere C-terminale Rest des Proteins in der Lage zu sein scheint, seine funktionale Konformität beibehalten zu können.

F276C:

Auch die Auswirkungen des hier bedingt durch eine Punktmutation dargestellten Austausches der essentiellen, aromatischen und unpolaren Aminosäure Phenylalanin zum ebenso unpolaren, schwefelhaltigen Cystein lassen sich aus den oben genannten Gründen ebenfalls nur rein spekulativ ableiten. Es ist nicht auszuschließen, dass das schwefelhaltige Cystein mit seiner starken Neigung, Schwefelwasserstoffbrücken auszubilden (um seinen ubiquitären, proteinstabilisierenden Eigenschaften nachzukommen), eine unnatürliche Konformationsänderung des Proteins erzwingt. Die Trägerin dieser heterozygoten Mutation (C.D.) weist neben der hier beschriebenen Mutation außerdem noch die oben genannte c.89-90del AT Mutation in ebenfalls heterozygoter Ausprägung auf. Selbst beide Mutationen vereint scheinen jedoch, zumindest in den heterozygoten Varianten, nur einen geringen Einfluß auf die klinischen und biochemischen Umstände zu nehmen. Diese Mutationen (F276C und

c.89-90del AT) sind bereits in der Literatur für mehrere Patienten beschrieben worden (Fisher *et al.*, 1991; Fisher *et al.*, 1993).

G384S

Die Punktmutation in Kodonposition 384 beschreibt einen Austausch von Glycin mit einer kleinen, unpolaren Seitenkette durch Serin mit einer polaren Seitenkette. Russel und Guest konnten 1991 bei unterschiedlichen pro- und eukaryonten Spezies in neun von dreizehn Fällen Glycin an der Stelle 384 nachweisen (Russell *et al.*, 1991). Glycin 384 kann somit als konserviert zwischen Mensch, Maus und Ratte angesehen werden. Keine Spezies zeigte an dieser Nukleotidposition einen Serineinbau.

G384S wurde bereits früher in einem Allel eines "compound"-heterozygoten Patienten mit intermittierender (leichter) MSUD-Variante aus Japan beschrieben (Tsuruta *et al.*, 1998). Diese Autoren fanden mittels Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus bei 30 gesunden Kontrollpersonen in genomischer DNA in keinem Allel die G384S-Mutation. Die Mutation befindet sich im Bereich der katalytischen inneren Kerndomäne der E2-Dihydrolipoyl-Transacylase. Damit könnte ein Serineinbau in dieser Position eine Konformationsänderung der Kerndomäne bewirken und damit eine Aktivitätsminderung der E2-Untereinheit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Mutation in heterozygoter Ausprägung bei drei Patienten (H.E., S.B., G.D.) mit unterschiedlichen varianten Phänotypen gefunden. Ein weiteres verändertes E2-Allel konnte aber bei keinem nachgewiesen werden. Bei jedem Patienten sind die krankheitsrelevanten Mutationen entweder in dem E1 α - oder E1 β -Gen zu suchen. Es ist bemerkenswert, dass die Mutter von G.D. die G384S-Mutation in homozygoter Form aufweist. Sie leidet nachgewiesenermaßen nicht an einer MSUD. Die Tatsache, dass diese Mutation in heterozygoter Ausprägung häufig vertreten ist und selbst bei einem Elternteil mit homozygoter Ausprägung klinisch unauffällig

erscheint, spricht sehr dafür, dass diese Mutation auf den klinischen Phänotyp wahrscheinlich keine Auswirkung hat.

4.4. Genotyp/Phänotyp-Korrelation

Anhand der Vielzahl an möglichen Genotypen, die aufgrund von mutationsbedingten Änderungen zu unterschiedlich ausgeprägten Phänotypen führen können, kann in diesem Patientenkollektiv keine sichere Geno-Phänotyp-Korrelation erfolgen. Lediglich ist eine variierende Mutationsverteilung innerhalb der Gruppen festzustellen. E1 α -Mutationen sind hauptsächlich in der Gruppe C, E2-Mutationen nur in Gruppe B zu finden. E1 β -Mutationen kommen sowohl in Gruppe A, B als auch in Gruppe D vor. Wahrscheinlich kann angenommen werden, dass E1 α -Mutationen eher bei Patienten mit schweren varianten Verläufen und Mutationen im E1 β -Gen und solche im E2-Gen eher bei Patienten mit der milden Variante vorkommt. Dies steht im Gegensatz zu der postulierten Annahme, dass hauptsächlich Mutationen vom Typ II (E2- Gen) bei den varianten Formen der MSUD vorkommen (Chuang und Shih 2001).

Die schon in der Literatur beschriebenen Mutationen sowie der durch die Schwere der Mutation bedingte klinische Phänotyp können in diesem Kollektiv nur teilweise bestätigt werden. Die Komplexität des Zusammenspiels von heterozygoten und/ oder homozygoten Mutationen (Kap. 4.3) erklärt die variierenden klinischen Phänotypen. Die in homozygoter Ausprägung bei unserem Patienten gefundene Mutation A328T- α ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Sie wurde bei einem Patienten (A.H.) mit sehr milder asymptomatischer Variante nachgewiesen. Die schon bekannte benachbarte Mutation I326T- α wird jedoch für einen Patienten mit intermediärem Phänotyp beschrieben.

Anhand von biochemischen und klinischen Daten kann davon ausgegangen werden dass die homozygote Mutation V412M- α (konservative Transversion von Valin zu

Methionin) nicht wie von Henneke *et al.* beschrieben mit einem klassischen Phänotyp assoziiert ist (Henneke *et al.*, 2003), sondern wahrscheinlich eher einer varianten Form mit schwerem Verlauf entspricht. Diese Annahme wird durch die Phänotyp-Beschreibung der direkt benachbarten Mutation Y413C unterstützt. Y413C wird bei einem Patienten mit schwerer Variante beschrieben (Ævarsson *et al.*, 2000).

Der konservative, homozygote Austausch von Alanin an Position 253- α zu Methionin wird in der Literatur (Nobukuni *et al.*, 1993; Ævarsson *et al.*, 2000) für die klassische MSUD beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten klinischen Daten für den Patienten (B.M.), der diese Mutation homozygot besitzt, sprechen auch hier eher für eine variante Form mit schwerem Verlauf.

Die schon mehrfach in der Literatur beschriebene Mutation G278S- β und deren assoziierter Phänotyp (intermediäre Verlaufsform) stimmen mit den klinischen Phänotypen unserer Patienten nur teilweise überein. Die Mutation konnte sowohl heterozygot als auch homozygot bei zwei Patienten mit einer milderen, asymptomatischen Form nachgewiesen werden.

Typ II- Mutationen werden in der Literatur überwiegend als Deletionen oder Spleißing-Mutationen beschrieben, so dass hier wahrscheinlich schwerere Auswirkungen auf das reife Protein und damit auf den Phänotyp zu erwarten wären. Da Typ II- Mutationen jedoch hauptsächlich für die variante MSUD beschrieben werden und die E2-Untereinheit in hoher Kopienanzahl vorhanden ist (Homopolymer ($\alpha 24$)), könnte angenommen werden, dass trotz erheblicher Verluste des genetischen Materials eine nur geringe Auswirkung auf die Enzymaktivität stattfindet. Diese Annahme kann durch den klinischen Phänotyp (milde Variante) bei der homozygoten Typ II-Deletion (c.G249-K257del) bestätigt werden. Inwieweit eine wirkliche funktionelle Beeinträchtigung des Multienzymkomplexes durch die Mutation im E2-Gen erfolgt,

kann nach bisheriger Sichtung der Literatur und bei noch fehlender kristallographischer Struktur noch nicht eindeutig hergeleitet werden.

Die Mutationen P39H- α und G384S-E2 werden in der Geno-Phänotyp-Korrelation nicht berücksichtigt, da aus den genannten Gründen (Kapitel 4.3.1; 4.3.3) davon ausgegangen werden kann, dass sie nicht als krankheitsverursachende Mutationen angesehen werden können.

Abschließend kann gesagt werden, dass nur das Zusammenspiel von Aminosäureaustausch, entsprechender Position in der Sekundärstruktur sowie der Allelausprägung für eine prognostische Aussage herangezogen werden kann. Für präzisere Aussagen und damit eine mögliche Geno-Phänotyp-Gegenüberstellung müssten noch mehr Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit genotypischen Analysen und detaillierten Funktionsstudien unterzogen werden.

V. Zusammenfassung

Die Ahornsirupkrankheit MSUD (maple syrup urine disease) wurde erstmals 1954 durch Menkes *et al.* beschrieben. Sie ist mit einer Inzidenz von 1:185.000 Neugeborenen in der weltweiten Bevölkerung eine seltene Stoffwechselkrankheit. Der MSUD liegen autosomal-rezessiv vererbte Defekte innerhalb des Multienzymkomplexes der verzweigtkettigen α -Ketosäuren-Dehydrogenase (BCKA-DH) zugrunde. Die reduzierte Aktivität der BCKA-DH führt zu einer deutlichen Einschränkung bis hin zu einer fast vollständigen Blockade des Abbaus der verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA) Leucin, Valin und Isoleucin auf der Stufe ihrer α -Ketosäuren (α -Ketoisocaproinsäure KIC, α -Keto- β - α -Ketoisovalerylsäure KIV, Methylualerylsäure KMV). Letztere werden aus den entsprechenden Aminosäuren, welche Bestandteile von Nahrungs- und Gewebsproteinen sind, durch reversible Transaminierung gebildet. Infolge des gestörten Stoffwechselschritts kommt es zusätzlich zum Anstieg der endogen aus Isoleucin entstehenden, nicht proteinogenen Aminosäure L-Alloisoleucin. Bei allen Formen ist Leucin von allen oben genannten Aminosäuren in der höchsten Konzentration nachweisbar. Die temporär oder permanent stark erhöhten BCKA-und BCAA-Spiegel können zu schwerwiegenden Funktionsstörungen bzw. Schäden am Zentralnervensystem als ausschließlich betroffenem Organ führen.

Das verstoffwechselnde Enzym die BCKA-Dehydrogenase ist ein Makromolekül mit einer molekularen Masse von 4×10^3 kDa und befindet sich an der inneren Mitochondrienmembran aller Gewebe. Dieser Komplex besteht aus fünf katalytischen Untereinheiten: der E1-, E2- und E3-Untereinheit, sowie einer Phosphatase und einer Kinase. Während E1 und E2 spezifisch für die Katalyse der verzweigtkettigen α -Ketosäuren durch den Multienzymkomplex sind, ist E3 ein Bestandteil weiterer hochkonservierter α -Ketosäure-Dehydrogenasen, welche spezifisch für die Katalyse von Pyruvat und α -Ketoglutarat (Pyruvat-Dehydrogenase, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase) sind.

Von allen Patienten mit MSUD leiden etwa 80% an der schwersten, klassischen Form und 20 % an einer milderer Variante. Aufgrund der klinischen Symptomatik bzw. des

klinischen Verlaufs, des Ausmaßes der erforderlichen Therapie, der Beeinflussung der Plasma BCAA-Spiegel durch Thiamin (Kofaktor der BCKA-Decarboxylase) sowie einiger biochemischer Parameter werden derzeit vier klinische Phänotypen der MSUD unterschieden: eine klassische Form, eine intermediäre Variante, eine intermittierende Variante und eine Thiamin-abhängige Variante. Wahrscheinlich wird aber mit einer solchen Klassifizierung nicht das gesamte Spektrum der MSUD-Varianten erfasst.

Daher soll im Rahmen dieser Arbeit eine Abschätzung des Schweregrades der Ahornsirupkrankheit mit Erfassung des gesamten Spektrum anhand zusätzlicher biochemischer Parameter erarbeitet werden. Insgesamt wurden 21 Patienten unterschiedlicher ethnischer Herkunft im Alter von 2,5 bis 31 Jahren mit einer nicht-klassischen varianten Form der MSUD untersucht und anhand des klinischen Schweregrades einer von drei neu definierten Phänotyp-Gruppen zugeteilt:

Gruppe A = sehr milde asymptomatische Variante,

Gruppe B = milde Variante (dem intermittierenden Phänotyp der Literatur entsprechend),

Gruppe C = schwere Variante (dem intermediären Phänotyp der Literatur entsprechend),

sowie einer **Gruppe D**, in die Kinder aufgenommen wurden, die frühzeitig seit der Diagnosestellung in der Neugeborenen-Periode (z.B. im Neugeborenenenscreening) behandelt bzw. überwacht wurden.

Zur Ermittlung des klinischen Schweregrades wurden Daten zu Art und Alter zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation (Symptome, Plasma-BCAA-Spiegel) erhoben, ausserdem Details zur Behandlung (Art der Diät, Leucintoleranz, Plasmaleucinkonzentrationen unter der Behandlung), sowie Aspekte der psychomotorischen Entwicklung und zum intellektuellen und psychosozialen „outcome“ (Schul-/Berufskarriere, Lebensweise).

Gruppe A: Dieser Gruppe wurden vier Personen aufgrund der Klinik und der biochemischen Parameter zugeordnet. Sie wurden im Neugeborenen Screening (Guthrie-Test) zwischen dem 15. und 59. Lebenstag diagnostiziert. In einem Fall wurden leichte Symptome vermerkt, alle anderen Personen waren asymptomatisch. Die Plasma-Leucinkonzentration zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt zwischen 283 und 821 $\mu\text{mol/l}$ (Mittelwert $\pm$ SD: 530 $\pm$ 231 $\mu\text{mol/l}$). Alle Personen waren ohne spezifische Behandlung, es wurde lediglich die Vermeidung einer hohen Proteinaufnahme empfohlen. Bisher hat keine Person eine enzephalopathische Episode während interkurrenter Erkrankungen entwickelt. Die psychomotorische und neurologische Entwicklung dieser Patienten ist altersentsprechend normal. In dieser Gruppe liegt die Restaktivität der BCKA-DH in kultivierten Fibroblasten zwischen 13 und 20% der Norm (17,3 $\pm$ 3,1%). Damit liegt sie innerhalb des gesamten Studienkollektives am höchsten. Das Alloisoleucin-/Isoleucin-Verhältnis im Plasma liegt zwischen 0,09 und 0,14 (0,12 $\pm$ 0,02), und zeigt damit die tiefsten Werte aller Gruppen an. Beide Messdaten sprechen für eine relativ hohe Restaktivität der BCKA-DH. Zusätzlich deuten die Daten zur Ganzkörperleucinoxidation sowie zur metabolischen Alloisoleucin-Clearance (Ke) bei einem Patient auf eine relativ hohe Restaktivität der BCKA-DH im Organismus hin.

Gruppe B: Hier beträgt die Restaktivität der BCKA-DH zwischen 4 und 20% der Norm (9,0 $\pm$ 6,6). Die Alloisoleucin-/Isoleucin-Ratio im Plasma liegt zwischen 0,09 und 0,23 (0,16 $\pm$ 0,07). Zusätzliche Parameter, wie die metabolische Alloisoleucin-Clearance oder die Ganzkörperleucinoxidation, sprechen ebenfalls für eine relativ hohe Restaktivität der BCKA-DH. Das klinische Bild dieser Patientengruppe passt gut zu dem „intermittierenden klinischen Verlauf“, wie er in der Literatur beschrieben ist. Die meisten Patienten erhielten eine moderate Protein-ingeschränkte Diät. Nur ein Patient erhielt die volle MSUD-Diät (sehr geringer Proteingehalt der Nahrung mit einem großen Zusatz an BCAA-freier Aminosäure-Mischung). Zwei Patienten zeigten nach Diagnosestellung und Behandlungsbeginn weitere metabolische Krisen, einer zeigte mehrfach laktazidotische Episoden. Unter proteineingeschränkter Diät sind die BCAA-Konzentrationen im Plasma (einschließlich Allo-Isoleucin) konstant oberhalb der Norm.

Gruppe C: Sie beschreibt die schwere Variante Form. Zwei Patienten dieser Gruppe wurden im Neugeborenen-Screening mittels Guthrie-Test, zwei weitere zwischen dem 22. und 60. Lebenstag aufgrund einer klinischen Manifestation diagnostiziert. Die Patienten zeigten zu diesem Zeitpunkt leichte neurologische und encephalopathische Symptome und rochen charakteristisch nach Ahornsirup. Die weiteren Patienten dieser Gruppe wurden zwischen dem 21. Lebensmonat und dem 4. bzw. 5. Lebensjahr diagnostiziert. Während die Kinder, die im 2. Lebensjahr diagnostiziert wurden, im Verlauf nur eine leichte psychomotorische Retardierung aufwiesen, zeigten die Patienten mit späterer Diagnosestellung eine deutliche psychomotorische Retardierung. Das klinische Bild dieser Patientengruppe entsprach in einigen Fällen dem sogenannten „intermediären“ Phänotyp der Literatur. Alle Patienten wurden mit einer vollen MSUD-Diät behandelt. Die Leucin-Aufnahme variierte zwischen 800 und 1800mg/Tag. Die Diät wurde in der Kindheit unterschiedlich strikt eingehalten. Zwei dieser Patienten zeigten eine starke mentale Retardierung, da sie bei Diagnosestellung relativ alt waren und somit eine irreversible Langzeitschädigung durch die Akkumulation der neurotoxisch wirkenden Aminosäuren stattgefunden hat. In dieser Patientengruppe liegt der Plasma-Leucinspiegel bei Diagnosestellung zwischen 757 und 1834 μ mol/l ($1255\pm 409\mu$ mol/l). Die Restaktivität der BCKA-DH beträgt in intakten Fibroblasten zwischen 2,5 und 7% der Norm ($3,9\pm 2,1\%$). Die Alloisoleucin-/Isoleucin-Ratio im Plasma liegt zwischen 0,27 und 0,56 (ausgenommen eines Patienten, der wegen der frühen klinischen Manifestation als schwere Variante klassifiziert wurde), was eine niedrige bis sehr niedrige Restaktivität der BCKA-DH anzeigt.

Gruppe D: Ein Patient wurde in diese Gruppe prospektiv diagnostiziert und behandelt. Die restlichen drei Patienten wurden im Neugeborenen-Screening mittels Tandem-MS zwischen dem 6. und 14. Lebenstag diagnostiziert. Alle Patienten waren zu diesem Zeitpunkt asymptomatisch. Drei Patienten wurden sehr früh mit einer protein-restriktiven Diät behandelt. Ziel der Behandlung war es, den Plasma-Leucinspiegel unter 300 μ mol/l zu halten. Bisher zeigen die Patienten eine unbeeinträchtigte Entwicklung. Die Plasma-Leucinspiegel waren bei Diagnosestellung nur leicht erhöht

und liegen zwischen 339 und 645 $\mu\text{mol/l}$ ($482 \pm 127 \mu\text{mol/l}$). Die Alloisoleucin/Isoleucin-Ratio im Plasma zeigt eine grosse Varianz (zwischen 0,07 und 0,25), und weist damit auf eine mögliche Vermischung von Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad in dieser Gruppe hin.

Die statistische Analyse der Gruppen wurde anhand der biochemischen Parameter durchgeführt. Die Plasmaleucin-Konzentration zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist signifikant ($p = 0.038$) höher bei Patienten aus der Gruppe mit milder Variante (Gruppe B), als bei Patienten aus der Gruppe der sehr milden asymptomatischen Form (Gruppe A). Es bestehen ebenfalls signifikante Unterschiede für die Leucin-Konzentrationen zwischen der Gruppe der schweren Variante (Gruppe C) und der Gruppe A. Die Leucinkonzentration der Gruppe C ist signifikant ($p = 0,024$) höher als die der Gruppe A. Bei Diagnosestellung sind die Konzentrationen signifikant in den Gruppen B ($p = 0,001$) und C ($p < 0,001$) höher als bei den Patienten der Gruppe D. Jedoch bestehen zwischen den Gruppen A und D und auch zwischen den Gruppen B und C für die beschriebenen Parametern keine statistisch signifikanten Unterschiede. Lediglich der Zeitpunkt der klinischen Diagnosestellung differiert zwischen Gruppe B und C. Infolge der Ungenauigkeit der Angaben des Diagnosezeitpunktes wurde hier jedoch auf eine statistische Auswertung verzichtet. Die Restaktivität der BCKDA-DH ist signifikant höher und die Alloisoleucin/Isoleucin-Ratio signifikant ($p = 0,015$) niedriger in den Gruppen A und B als in Gruppe C.

Aus der vorliegenden Untersuchung wird deutlich, dass ganz besonders die variante MSUD-Formen von einer frühzeitigen Diagnosestellung im Neugeborenencreening profitieren. Seit 2002 können sowohl die klassische als auch die varianten Formen der MSUD im Neugeborenencreening bereits am 3. Lebenstag aus Trockenblut mittels Tandem-Massenspektrometrie aufgedeckt werden. Dadurch gelingt es, betroffene Neugeborene, präsymptomatisch oder mit erst leichten Symptomen, aufzuspüren. Somit kann eine frühzeitige, dem jeweiligen Schweregrad angemessene

Behandlung/Überwachung gewählt werden, um den Patienten vor zu hohen Plasmaleucin-Spiegeln - sie sollten $<300\mu\text{mol/l}$ betragen - und damit vor einer Behinderung der Entwicklung/intermittierenden enzephalopathischen Episoden zu schützen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob diese biochemische Einteilung mit den molekulargenetischen Ereignissen in Korrelation zu bringen ist?

Zu diesem Zweck wurden exemplarisch 2-3 Patienten aus jeder Gruppe molekulargenetisch untersucht. Diese Analysen wurden bei insgesamt 13 Patienten durchgeführt; 2 dieser Patienten sind aufgrund unvollständiger Angaben in der klinischen und biochemischen Betrachtung unberücksichtigt geblieben. Die bei diesen 13 Patienten mit varianter MSUD gefundenen Mutationen wurden in Bezug auf ihre Lokalisation im Gen und ihrer Auswirkungen auf die Sekundär-/Tertiärstruktur und somit auf die Funktion der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase hin analysiert. Grundlage dafür ist die röntgen-kristallographische Analyse des E1-Heterotetramers ($\text{E1}\alpha_2/\text{E1}\beta_2$), die von *Ævarsson et al.* 2000 publiziert wurde. Für die E2-Untereinheit sind derartige Strukturanalysen bisher noch nicht veröffentlicht worden. Die molekulargenetischen Analysen wurden an zwei der bereits beschriebenen katalytischen Untereinheiten des BCKA-DH Komplexes durchgeführt. Hierbei handelt es sich um die E1b-Untereinheit, welche sich wiederum aus der E1 α - und der E1 β -Untereinheit zusammensetzt, sowie um die E2-Untereinheit. Die im Folgenden aus der Literatur zitierten Mutationsbezeichnungen sind auf den Stand von Dezember 2005 aktualisiert worden.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde zelluläre RNA aus Vollblut isoliert. Mittels der reversen Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurden alle 30 Exone der cDNA für die E1 α -, E1 β - und die E2-Untereinheiten amplifiziert. Mittels automatisierter, elektrophoretischer Datenanalysen konnten für jeden Patienten alle Exone der 3 Gene sequenziert und untersucht werden. Mit Hilfe der Einzelnukleotid-Polymorphismus-Methode (SNaPshot) wurden die einzelnen Punktmutationen

validiert. Zur weiteren Absicherung der molekularen Veränderungen wurde zusätzlich genomische DNA aus Vollblut isoliert, und die entsprechenden Exone amplifiziert. Alle gefundenen Mutationen in E1 α , E1 β und E2 konnten sowohl in der cDNA, als auch in der genomischen DNA ermittelt sowie mit der SNaPshot-Methode bestätigt werden. Darüber hinaus wurde der Genotyp von acht Elternpaaren bestimmt.

In Abhängigkeit von der betroffenen Untereinheit wird die MSUD derzeit molekulargenetisch in verschiedene Formen unterteilt. Hierbei handelt es sich um den Typ IA (MIM #608348), dem krankheitsverursachende Mutationen im E1 α -Gen, des weiteren um den Typ IB (MIM #248611), dem krankheitsverursachende Mutationen im E1 β -Gen zugrund liegen. Dem Typ II (MIM #248610) liegen krankheitsverursachende Mutationen im E2-Gen zugrunde, während Typ III (MIM #248900) Mutationen beschreibt, die im E3-Gen lokalisiert sind. Die Bezeichnungen Typ IV und V sind für bislang noch nicht gefundene Mutationen im BCKA-DH Kinase und Phosphatase-Gen vorbehalten.

Für die varianten Formen der MSUD wurden in der Literatur bisher 17 Typ IA-Mutationen beschrieben. Dabei handelt es sich ausnahmslos um Punktmutationen. Die Verteilung der Mutationen zeigt keine Clusterbildung in bestimmten Genabschnitten. In der vorliegenden Arbeit wurden 26 Allele des E1 α -Gen von Patienten mit varianter Form der MSUD untersucht. Dabei konnten 5 unterschiedliche Mutationen in insgesamt 12 Allelen nachgewiesen werden. Bei allen gefundenen Mutationen handelt es sich um Punktmutationen. Sie sind über das gesamte Gen verteilt. 4 der 5 Mutationen (P39H, R159W, A253T, V412M) sind bereits aus der Literatur bekannt. Die hier neu beschriebene Mutation A328T konnte homozygot bei einem türkischen Patienten mit sehr leichter asymptomatischer Variante nachgewiesen werden. Desweiteren wurden drei Polymorphismen (R12R, F324F, L407L) in insgesamt 15 Allelen nachgewiesen. Zwei der drei Polymorphismen (F324F, L407L) sind bereits in der aktuellen NCBI-Gensequenz aufgeführt.

Bislang wurde in der Literatur für das E1 β -Gen bei Patienten mit varianter Ahornsirupkrankheit 5 Mutationen beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden 26 Allele des E1 β -Gens von Patienten mit varianter Form der Ahornsirupkrankheit untersucht. Dabei konnten 9 verschiedene Mutationen in insgesamt 12 Allelen nachgewiesen werden, wobei 8 in der Literatur bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beschrieben sind. Die neu gefundenen Mutationen sind: R111X, P123L, V130G, R168C, P200A, Y244H, V283A (als Punktmutationen), sowie die "frameshift" Deletionsmutation c.855-868del. Sie sind in ihrer Lokalisation über das gesamte Gen verteilt. Von besonderer Bedeutung ist die in der Literatur in heterozygoter Ausprägung für variante Formen beschriebene Punktmutation G278S. Ein Patient mit der heterozygoten Mutation G278S wurde in der vorliegenden Untersuchung nur in der klinischen und biochemischen Auswertung berücksichtigt. Dieser Patient weist eine milde Variante mit intermittierendem Verlauf auf. G278S tritt drei mal bei den hier molekulargenetisch untersuchten Patienten auf. Für diese Mutation liegt der Verdacht nahe, dass sie gehäuft bei varianten MSUD-Formen zu finden ist. Sie konnte bei Patienten deutscher, österreichischer und israelischer Herkunft nachgewiesen werden.

Für das E2-Gen werden in der Literatur 24 Mutation bei Patienten mit variantem Verlauf der Ahornsirupkrankheit beschrieben. 14 Mutationen sind Punktmutationen, 9 werden als Deletionen und eine als Inversion beschrieben. Auffällig erscheint hier die große Mutationsbereitschaft in den nicht kodierenden Intronsegmenten, wodurch eine Aktivierung oder Generierung neuer Spleissregionen zu sekundären Deletionen oder Insertionen führt. Bei der Durchsicht der molekulargenetischen Ergebnisse von E2 wurden in unserem Patientenkollektiv drei aus der Literatur bekannte Mutationen (F276C, c.89-90 delAT und G384S) gefunden. Die Einzige in der Literatur bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beschriebene Mutation stellt die Deletionen c.760-786 del dar. Die in der Vergangenheit als krankheitsrelevant bezeichnete Mutation (G384S) im E2-Gen hat sich in der vorliegenden Arbeit als nicht krankheitsverursachend herausgestellt.

Da in dem Patientenkollektiv dieser Arbeit E1 α -Mutationen hauptsächlich in der Gruppe C zu finden sind und E2-Mutationen nur in der Gruppe B vorkommen, kann wahrscheinlich angenommen werden, dass E1 α -Mutationen eher mit der schweren varianten Verlaufsformen assoziiert sind, und Mutationen in E1 β und E2 eher mit den mildereren Verläufen (Gruppe A, B). Dies steht im Gegensatz zu der postulierten Annahme, dass hauptsächlich Mutationen vom Typ II (E2-Gen) bei den varianten Formen der MSUD vorkommt. Eine sichere Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp kann jedoch nicht erfolgen. Es ist innerhalb der Gruppen lediglich eine variierende Mutationsverteilung festzustellen. Die Daten dieser Arbeit deuten somit darauf hin, dass die vielfältige Kombination unterschiedlich mutierter Allele ursächlich für die hohe Variabilität des klinischen Phänotyps bei der MSUD ist, nicht jedoch die Manifestation einzelner Mutationen.

VI. Abkürzungsverzeichnis/Synonyme:

μ:	Mikro
p:	Piko
U:	Unit
DNA:	Desoxyribonuklease
cDNA:	komplementäre Desoxyribonuklease
RNA:	Ribonukleinsäure
mRNA:	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
dNTP:	Desoxynukleotidtriphosphat
kb:	Kilobasen
kD:	Kilodalton
NAD:	Nikotinamidadeninidinucleotid
rpm:	Umdrehung pro Minute
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
TPP:	Thiaminpyrophosphat
PCR:	Polymersekettreaktion
BCKA:	branched-chain-ketoacid
BCAA:	branched-chain-amino-acid
DH:	Dehydrogenase
KIV:	α-Ketoisovalerat
KIC:	α-Ketoisocarproate
KMV:	α-Keto-β-Methylvalerat
A:	Adenin
G:	Guanin
C:	Cytosin
T:	Thymin

E1α-, E1β und E2 Mutationen bezeichnen Mutationen vom Typ IA, IB bzw. II.

VII. Literaturverzeichnis

- Ævarsson, A., J.L. Chuang, R.M. Wynn, S. Turley, D.T. Chuang and W.G. Hol (2000): Crystal structure of human -chain alpha-ketoacid dehydrogenase and the molecular basis of multienzyme complex deficiency branched in maple syrup urine disease. *Structure Fold Des* 8:277-291.
- Brismar, J., A. Aqeel, G. Brismar, R. Coates, G. Gascon and P. Ozand (1990): Maple syrup urine disease: findings on CT and MR scans of the brain in 10 infants. *AJNR Am J Neuroradiol* 11:1219-1228.
- Chhabria, S., L.G. Tomasi and P.W. Wong (1979): Ophthalmoplegia and bulbar palsy in variant form of maple syrup urine disease. *Ann Neurol* 6:71-72.
- Chinsky, J., M. Appel, S. Almashanu, P. Costeas, N. Ambulos, Jr. and R. Carmi (1998): A nonsense mutation (R242X) in the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1alpha subunit gene (BCKDHA) as a cause of maple syrup urine disease. Mutations in brief no. 160. Online. *Hum Mutat* 12:136.
- Chinsky, J.M., L.M. Bohlen and P.A. Costeas (1994): Noncoordinated responses of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase subunit genes to dietary protein. *Faseb J* 8:114-120.
- Chinsky, J.M. and P.A. Costeas (1993): Molecular cloning and analysis of the expression of the E1 beta subunit of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase in mice. *Biochim Biophys Acta* 1216:499-503.
- Chuang, D.T., C.W. Hu and M.S. Patel (1983): Induction of the branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex in 3T3-L1 adipocytes during differentiation. *Biochem J* 214:177-181.
- Chuang, J.L., R.P. Cox and D.T. Chuang (1993): Characterization of the promoter-regulatory region and structural organization of E1 alpha gene (BCKDHA) of human branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *J Biol Chem* 268:8309-8316.
- Chuang, J.L., R.P. Cox and D.T. Chuang (1996): Maple syrup urine disease: the E1beta gene of human branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex has 11 rather than 10 exons, and the 3' UTR in one of the two E1beta mRNAs arises from intronic sequences. *Am J Hum Genet* 58:1373-1377.
- Chuang, J.L., R.P. Cox and D.T. Chuang (1997): E2 transacylase-deficient (type II) maple syrup urine disease. Aberrant splicing of E2 mRNA caused by internal intronic deletions and association with thiamine-responsive phenotype. *J Clin Invest* 100:736-744.
- Chuang, J.L., J.R. Davie, J.M. Chinsky, R.M. Wynn, R.P. Cox and D.T. Chuang (1995): Molecular and biochemical basis of intermediate maple syrup urine disease. Occurrence of homozygous G245R and F364C mutations at the E1 alpha locus of Hispanic-Mexican patients. *J Clin Invest* 95:954-963.
- Chuang, J.L., C.R. Fisher, R.P. Cox and D.T. Chuang (1994): Molecular basis of maple syrup urine disease: novel mutations at the E1 alpha locus that impair E1(alpha 2 beta 2) assembly or decrease steady-state E1 alpha mRNA levels of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *Am J Hum Genet* 55:297-304.
- Chuang, D.T. and Shih, V.E. (2001): Maple Syrup Urine Disease (Branched-Chain Ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D (eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn, vol II. McGraw-Hill, New York, pp 1971-2006 (chapter 87).
- Chuang, J.L., R.M. Wynn and D.T. Chuang (2002): The C-terminal hinge region of lipoic acid-bearing domain of E2b is essential for domain interaction with branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase. *J Biol Chem* 277:36905-36908.
- Costeas, P.A. and J.M. Chinsky (1996): Effects of insulin on the regulation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 alpha subunit gene expression. *Biochem J* 318 (Pt 1):85-92.
- Crabb, D.W., L.L. Deaven, M. Luedemann, B. Zhang and R.A. Harris (1989): Assignment of the gene for the E1 alpha subunit of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase to chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 50:40-41.

- Dancis, J., J. Hutzler and M. Levitz (1960): Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine disease. *Biochim Biophys Acta* 43:342-343.
- Dancis, J., M. Levitz and R.G. Westall (1960): intermittent branched-chain ketonuria. Variant of maple-syrup-urine disease. *N. Engl. J. Med* 276:84.
- Dancis, J., J. Hutzler, S.E. Snyderman and R.P. Cox (1972): Enzyme activity in classical and variant forms of maple syrup urine disease. *J Pediatr* 81:312-320.
- Danner, D.J. and C.B. Doering (1998): Human mutations affecting branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase. *Front Biosci* 3:d517-524.
- Danner, D.J., E.T. Sewell and L.J. Elsas (1982): Clofibrilic acid and phenylpyruvic acid as biochemical probes for studying soluble bovine liver branched chain ketoacid dehydrogenase. *J Biol Chem* 257:659-662.
- Dariussh, N., C.W. Fisher, R.P. Cox and D.T. Chuang (1991): Structure of the gene encoding the entire mature E1 alpha subunit of human branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *FEBS Lett* 284:34-38.
- DiGeorge, A.M., I. Rezvani, L.R. Garibaldi and M. Schwartz (1982): Prospective study of maple-syrup-urine disease for the first four days of life. *N Engl J Med* 307:1492-1495.
- Edelmann, L., M.P. Wasserstein, R. Kornreich, C. Sansaricq, S.E. Snyderman and G.A. Diaz (2001): Maple syrup urine disease: identification and carrier-frequency determination of a novel founder mutation in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 69:863-868.
- Ensenauer, R., J. Vockley, J.M. Willard, J.C. Huey, J.O. Sass, S.D. Edland, B.K. Burton, S.A. Berry, R. Santer, S. Grunert, H.G. Koch, I. Marquardt, P. Rinaldo, S. Hahn and D. Matern (2004): A common mutation is associated with a mild, potentially asymptomatic phenotype in patients with isovaleric acidemia diagnosed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 75:1136-1142.
- Fekete, G., R. Plattner, D.W. Crabb, B. Zhang, R.A. Harris, N. Heerema and C.G. Palmer (1989): Localization of the human gene for the E1 alpha subunit of branched chain keto acid dehydrogenase (BCKDHA) to chromosome 19q13.1---q13.2. *Cytogenet Cell Genet* 50:236-237.
- Fisher, C.R., C.W. Fisher, D.T. Chuang and R.P. Cox (1991): Occurrence of a Tyr393----Asn (Y393N) mutation in the E1 alpha gene of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex in maple syrup urine disease patients from a Mennonite population. *Am J Hum Genet* 49:429-434.
- Fisher, C.W., C.R. Fisher, J.L. Chuang, K.S. Lau, D.T. Chuang and R.P. Cox (1993): Occurrence of a 2-bp (AT) deletion allele and a nonsense (G-to-T) mutant allele at the E2 (DBT) locus of six patients with maple syrup urine disease: multiple-exon skipping as a secondary effect of the mutations. *Am J Hum Genet* 52:414-424.
- Goedde H.W., U. Langenbeck, D. Brackertz, W.Keller, T.Rokkones, S. Halvarson, R.Kiil and B.Merton (1970): Clinical and biochemical- genetic aspects of intermittent branched-chain- ketoaciduria. Report of two Scandinavian families. *Acta Paediatr. Scand* 59,83
- Haberle, J., S. Pauli, M. Linnebank, W.J. Kleijer, H.D. Bakker, R.J. Wanders, E. Harms and H.G. Koch (2002): Structure of the human argininosuccinate synthetase gene and an improved system for molecular diagnostics in patients with classical and mild citrullinemia. *Hum Genet* 110:327-333.
- Hambraeus L., O.Westphal and B.Hagberg (1972): Ketotic hypoglycaemia associated with transient branched-chain Aminoacidemia. *Acta Paediatr. Scand* 61: 81-89
- Held K.R., H.J. Sternowsky, S. Singh, C. Plettner and R. Grüttner (1976): Intermittierende verzweigt-kettige Ketoacidurie bei ketotischer Hypoglykämie: Untersuchung zur Lokalisation des biochemischen Defekts. *Mschr. Kinderklinik* 124:59-65
- Henneke, M., N. Flaschker, C. Helbling, M. Muller, P. Schadevaldt, J. Gartner and U. Wendel (2003): Identification of twelve novel mutations in patients with classic and variant forms of maple syrup urine disease. *Hum Mutat* 22:417.

- Herring, W.J., S. Litwer, J.L. Weber and D.J. Danner (1991): Molecular genetic basis of maple syrup urine disease in a family with two defective alleles for branched chain acyltransferase and localization of the gene to human chromosome 1. *Am J Hum Genet* 48:342-350.
- Herring, W.J., M. McKean, N. Dracopoli and D.J. Danner (1992): Branched chain acyltransferase absence due to an Alu-based genomic deletion allele and an exon skipping allele in a compound heterozygote proband expressing maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 1138:236-242.
- Hilliges, C., D. Awiszus and U. Wendel (1993): Intellectual performance of children with maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 152:144-147.
- Hoffmann, B., C. Helbling, P. Schadeewaldt and U. Wendel (2005): Impact of Longitudinal Plasma Leucine Levels on the Intellectual Outcome in Patients with Classic MSUD. *Pediatr. Res.* 59:1-4 (in press)
- Hu, C.W., K.S. Lau, T.A. Griffin, J.L. Chuang, C.W. Fisher, R.P. Cox and D.T. Chuang (1988): Isolation and sequencing of a cDNA encoding the decarboxylase (E1)alpha precursor of bovine branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. Expression of E1 alpha mRNA and subunit in maple-syrup-urine-disease and 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 263:9007-9014.
- Jouvet P., F. Poggi, D. Rabier et. al. (1997): Continuous venoveous haemodiafiltration in the acute phase of neonatal maple syrup urine disease. *J. Inher Metab Dis* 20: 463-472
- Kaplan, P., A. Mazur, M. Field, J.A. Berlin, G.T. Berry, R. Heidenreich, M. Yudkoff and S. Segal (1991): Intellectual outcome in children with maple syrup urine disease. *J Pediatr* 119:46-50.
- Kiil R. and T. Rokkones (1964): Late manifesting variant of branched- chain ketoaciduria (maple syrup urinedisease). *Acta Paediatr.* 53, 356
- Korein, J., C. Sansaricq, M. Kalmijn, J. Honig and B. Lange (1994): Maple syrup urine disease: clinical, EEG, and plasma amino acid correlations with a theoretical mechanism of acute neurotoxicity. *Int J Neurosci* 79:21-45.
- Langenbeck U., U. Wendel, A. Menck-Hoinowski, D. Kuschel, K. Becker, H. Przyrembel and H.J. Bremer (1978): Correlations between branched-chain amino acids and branched -chain α - Ketoacids in blood in maple-syrup- urine disease. *Clin. chim. Acta* 88: 283- 291
- Langenbeck U. (1984): Pathobiochemical and Pathophysiologic Analysis of MSUD Phenotype. Branched Chain Amino and Ketoacids in Health and Disease, pp. 315-334
- Lau, K.S., R.L. Eddy, T.B. Shows, C.W. Fisher, D.T. Chuang and R.P. Cox (1991): Localization of the dihydrolipoamide branched-chain transacylase gene (DBT) of the human branched-chain keto acid dehydrogenase complex to chromosome 1. *Cytogenet Cell Genet* 56:33-35.
- McKean, M.C., K.A. Winkeler and D.J. Danner (1992): Nucleotide sequence of the 5' end including the initiation codon of cDNA for the E1 alpha subunit of the human branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex. *Biochim Biophys Acta* 1171:109-112.
- McKusick, V.A. (1995): Reviews in molecular medicine. *Medicine (Baltimore)* 74:301-304.
- Menkes, J.H., P.L. Hurst and J.M. Craig (1954): A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* 14:462-467.
- Mitsubuchi, H., Y. Nobukuni, F. Endo and I. Matsuda (1991): Structural organization and chromosomal localization of the gene for the E1 beta subunit of human branched chain alpha-keto acid dehydrogenase. *J Biol Chem* 266:14686-14691.
- Morris, M.D., B.D. Lewis, P.D. Doolan and H.A. Harper (1961): Clinical and biochemical observations on an apparently nonfatal variant of branched-chain ketoaciduria (maple syrup urine disease). *Pediatrics* 28:918-923.
- Nataraj, A.J., I. Olivos-Glander, N. Kusakawa and W.E. Highsmith, Jr. (1999): Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis* 20:1177-1185.

- Nellis, M.M. and D.J. Danner (2001): Gene preference in maple syrup urine disease. *Am J Hum Genet* 68:232-237.
- Nobukuni, Y., H. Mitsubuchi, Y. Hayashida, K. Ohta, Y. Indo, Y. Ichiba, F. Endo and I. Matsuda (1993): Heterogeneity of mutations in maple syrup urine disease (MSUD): screening and identification of affected E1 alpha and E1 beta subunits of the branched-chain alpha-keto-acid dehydrogenase multienzyme complex. *Biochim Biophys Acta* 1225:64-70.
- Paxton, R., M. Kuntz and R.A. Harris (1986): Phosphorylation sites and inactivation of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase isolated from rat heart, bovine kidney, and rabbit liver, kidney, heart, brain, and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 244:187-201.
- Podebrad, F., M. Heil, S. Reichert, A. Mosandl, A.C. Sewell and H. Bohles (1999): 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2[5H]-furanone (sotolone)--the odour of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 22:107-114.
- Reed, L.J., Z. Damuni and M.L. Merryfield (1985): Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation-dephosphorylation. *Curr Top Cell Regul* 27:41-49.
- Rodriguez-Pombo, P., Merinero, B., Navarrete, R., Perrez-Cerda, C and Ugarte, M (2005): Molecular and biochemical analysis of MSUD spanish variants. *J. Inherit. Metab. Dis.* 28, suppl. 1:53
- Russell, G.C. and J.R. Guest (1991): Site-directed mutagenesis of the lipoate acetyltransferase of *Escherichia coli*. *Proc Biol Sci* 243:155-160.
- Schadewaldt, P., K. Beck and U. Wendel (1989): Analysis of maple syrup urine disease in cell culture: use of substrates. *Clin Chim Acta* 184:47-56.
- Schadewaldt, P., A. Bodner-Leidecker, H.W. Hammen and U. Wendel (1999): Significance of L-alloisoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease. *Clin Chem* 45:1734-1740.
- Schadewaldt, P., A. Bodner-Leidecker, H.W. Hammen and U. Wendel (2000): Formation of L-alloisoleucine *In Vivo*: An L-[¹³C]Isoleucine Study in Man. *Pediatr Res* 47:271-277.
- Schadewaldt, P., A. Bodner-Leidecker, H.W. Hammen and U. Wendel (2001): Whole-body L-leucine oxidation in patients with variant form of maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 49:627-635.
- Schadewaldt, P., C. Dalle-Feste, U. Langenbeck and U. Wendel (1991): Oral L-alloisoleucine loading studies in healthy subjects and in patients with maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 30:430-434.
- Schulman, J.D., T.J. Lustberg, J.L. Kennedy, M. Museles and J.E. Seegmiller (1970): A new variant of maple syrup urine disease (branched chain ketoaciduria). Clinical and biochemical evaluation. *Am J Med* 49:118-124.
- Scriber, C.R., S. Mackenzie, C.L. Clow and E. Delvin (1971): Thiamine-responsive maple-syrup-urine disease. *Lancet* 1:310-312.
- Scriber, RC and Kaufman, S (2001): Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriber CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn, vol II. McGraw-Hill, New York, pp 1667-1724
- Senapathy, P., M.B. Shapiro and N.L. Harris (1990): Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol* 183:252-278.
- Simon, E., U. Wendel and P. Schadewaldt (2005): Maple syrup urine disease-treatment and outcome in patients of Turkish descent in Germany. *Turk J Pediatr* 47:8-13.
- Snyderman, S.E. (1988): Treatment outcome of maple syrup urine disease. *Acta Paediatr Jpn* 30:417-424.
- Snyderman, S.E., P.M. Norton, E. Roitman and L.E. Holt, Jr. (1964): Maple Syrup Urine Disease, with Particular Reference to Dietotherapy. *Pediatrics* 34:454-472.
- Tsuruta, M., H. Mitsubuchi, S. Mardy, Y. Miura, Y. Hayashida, A. Kinugasa, T. Ishitsu, I. Matsuda and Y. Indo (1998): Molecular basis of intermittent maple syrup urine disease: novel mutations in the E2 gene of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *J Hum Genet* 43:91-100.

- Wendel, U., G. Gamm and U. Claussen (1981): Maple syrup urine disease: alpha-ketoisocaproate decarboxylation activity in different types of cultured amniotic fluid cells. *Prenat Diagn* 1:235-240.
- Wendel, U. and U. Langenbeck (1984): Intracellular levels and metabolism of leucine and alpha-ketoisocaproate in normal and maple syrup urine disease fibroblasts. *Biochem Med* 31:294-302.
- Wendel, U., U. Langenbeck, I. Lombeck and H.J. Bremer (1982): Exchange transfusion in acute episodes of maple syrup urine disease. Studies on branched-chain amino and keto acids. *Eur J Pediatr* 138:293-296.
- Wendel, U., U. Langenbeck, I. Lombeck and H.J. Bremer (1982): Maple syrup urine disease--therapeutic use of insulin in catabolic states. *Eur J Pediatr* 139:172-175.
- Wendel, U., U. Langenbeck and J.W. Seakins (1989): Interrelation between the metabolism of L-isoleucine and L-allo-isoleucine in patients with maple syrup urine disease. *Pediatr Res* 25:11-14.
- Westall, R.G. (1955): The amino acids and other ampholytes of urine. 3. Unidentified substances excreted in normal human urine. *Biochem J* 60:247-255.
- Westall, R.G., E. Roitman, C. De La Pena, L.E. Holt, Jr., H. Rasmussen, F. Gomez and J. Cravioto (1958): The plasma amino acids in malnutrition: preliminary observations. *Arch Dis Child* 33:499-504.
- Williamson, J.R., E. Walajtys-Rode and K.E. Coll (1979): Effects of branched chain alpha-ketoacids on the metabolism of isolated rat liver cells. I. Regulation of branched chain alpha-ketoacid metabolism. *J Biol Chem* 254:11511-11520.
- Yeaman, S.J., K.G. Cook, R.W. Boyd and R. Lawson (1984): Evidence that the mitochondrial activator of phosphorylated branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex is the dissociated E1 component of the complex. *FEBS Lett* 172:38-42.
- Yeaman, S.J. (1986): The mammalian 2-oxoacid dehydrogenase: A complex family. *Trends Biochem Sci* 11: 293.
- Zhang, B., P.J. Healy, Y. Zhao, D.W. Crabb and R.A. Harris (1990): Premature translation termination of the pre-E1 alpha subunit of the branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase as a cause of maple syrup urine disease in Polled Hereford calves. *J Biol Chem* 265:2425-2427.
- Zhang, B., M.J. Kuntz, G.W. Goodwin, H.J. Edenberg, D.W. Crabb and R.A. Harris (1989): cDNA cloning of the E1 alpha subunit of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase and elucidation of a molecular basis for maple syrup urine disease. *Ann N Y Acad Sci* 573:130-136.
- Zhao, Y., M.J. Kuntz, R.A. Harris and D.W. Crabb (1992): Molecular cloning of the E1 beta subunit of the rat branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1132:207-210.
- Zneimer, S.M., K.S. Lau, R.L. Eddy, T.B. Shows, J.L. Chuang, D.T. Chuang and R.P. Cox (1991): Regional assignment of two genes of the human branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex: the E1 beta gene (BCKDHB) to chromosome 6p21-22 and the E2 gene (DBT) to chromosome 1p31. *Genomics* 10:740-747.

VIII. Anhang

8.1. Tabelle A: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der c DNA des E1 α -Gens

Exon Nr.	PCR-Produkt-Länge (bp)	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Sense (3'-5')	Annealing-Temperatur (°C)
1-4	402	GTTAGCCAAGATGGCGGTAG	GAAGGAGATCCGGCCCTGC	55
3-6	396	GCATGACACTGCTTACAC	CGTCCCCCTCACTGGCTGC	55
6-8	372	CAGCCAAGCGGGCCAATGC	GACCTCATCCACCGAGCGG	55
7-nach TGA	389	CGAGGCCATGACCTAGAGG	CTACCTCTCGGGGTAGCTGAG	55
1-		GTTAGCCAAGATGGCGGTAG		61

8.2. Tabelle B: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der c DNA des E1 β -Gens

Exon Nr.	PCR-Produkt-Länge (bp)	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Sense (3'-5')	Annealing-Temperatur (°C)
1-3	367	GCGGCTGCATAGCCTGAG	GCAGCCAACAGTGCATC	61
2-5	379	GGCCAAAGATCCTACTGC	CCACCTTGATTCTGGGC	61
5-8	372	CTTGGGGCTGTGTTGGTC	GTGTCCACATCCCAAGGT	61
8-nach TGA	393	GAGAGGTAGCTTCCATGG	CAAAAAGAGGTAAGTCGGAGGA	61

8.3. Tabelle C: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der c DNA des E1 β -Gens

Exon Nr.	PCR-Produkt-Länge (bp)	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Sense (3'-5')	Annealing-Temperatur (°C)
1	232	CGGCGTGCGGCTGCATA	CTGAGTTTGCCCGTACTCC	?
1-4	228	CCCAGAGGCGGCAGGT	AATCCACAATTCCTTGTTAC	?
5-8	334	CTCTATCATTCTCAGAGTCCT	CCCAAGGTATTATAGTCCTC	61
6-8	259	GGTGGTTATACCCAGAAGC	ACTTCACAAGACACTCCAAG	61
8-10	225	GGTTCATGTGATCCGAGAG	CCACATACTCTTGATATAGGA	61
9/10-nach TGA	180	GGAGGAATGTTTCTTGAACC	CCATATCTAGTCATAATCTTCC	?

8.4. Tabelle D: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der c DNA des E2-Gens

Exon Nr.	PCR-Produkt-Länge (bp)	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Sense (3'-5')	Annealing-Temperatur (°C)
1-4	312	GGCTGCAGTCCGTATGCT	ACTAGTGATGGTAACAGAAGC	61
4-6	311	GAAGGAGATACAGTGTCTCAG	CCATCTTTTCCTGAGCCAAC	53
5-7	284	ACACTGGCAACTCCTGCAGTT	TTCAGGGCTGCAGACATAGTC	53
6-9	307	CCGGTATTACAGGCAAAG	CCCTGCTCAGTATCCATTGC	53
8-10	287	ATCCTTAACGCTTCTGTGGATG	ATTGATCCAAGGGCCCCAATG	53
9-nach TGA	395	GACATCGCCACTGAACTG	GTGCTGGCACAGCTAGGG	60

8.5. Tabelle E: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des E1 α -Gens

Exon Nr.	PCR-Produkt-Länge (bp)	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Sense (3'-5')	Annealing-Temperatur (°C)
1	152	GACCGCTGAGTGGTTGTTAG	GAGTACCTGGGCCCAGGC	58
2	319	TGCTTCTGATGCAGGTGGTCTC	ACGTCTATCTGTGCCTCCAC	58
3	212	TGCCTGTCTCCTCTCTGGT	CTACCTGTGTTTGGGCCA	58
4	248	TGTCATTGCCAGCATAA	TTCTTCCAGGAGCAGCATAG	55
5	297	CCACAGGGCTGAACTGTC	GTCCAGGCCTCAGCTCTT	58
6	339	GTGGGTCATGTGAGTGTAA	ATCATCTCCTCCCTCCC	55
7	269	CCTCGTGCATGTTCTTATC	CAGCCACCGTAGCATCTT	55
8	306	ATCCTCCCTCCTGACCC	AGAGCTTGGGAAGGATTTGT	55
9	349	AGGAGGAAGCAGGGTCC	CCCAGTCAGCTCCCTCTAA	58

8.6. Tabelle F: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des E1 β -Gens

Exon Nr.	PCR-Produkt-Länge (bp)	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Sense (3'-5')	Annealing-Temperatur (°C)
1	260	CTGCATAGCCTGAGAATTCC	CTGGGACTGCCCACCTCGG	58
2	295	CAGCAATTTGCATAATATCTTTC	TGTGGAGCTCAATGGTTAAC	55
3	338	AGAAGTTGAGAAACCTTGATCG	CCCATTGTATGGATGAATTCC	55
4	295	TCTCCATCCCATTATTAGTTTACT	TCAAGTATTGCCGCTACCCT	55
5	340	GAGGAAGAACGGAAGGAGAT	AAACAAACAGGATTCTTGGAA	55
6	322	GCAGCGAGTTTACTGGGATA	TTGGTATTTAGTTTGTCTCAGG	58
7	249	TTTCTGTCTGTATTTAGCGG	AAGTCTGGTCGTACTGATGCT	55
8	249	AATAGTGACATCAGCATTCAACT	GAAATTGTGAGCTATGTGAGCA	55
9	117	TCTTTTCTCTTCAGTCT	CAGGTAGAGTAATTTTGT	55
10	291	TTGCACTATTTCATTTCTGTGAG	CCAAGACACAGCAATCATCA	55

8.7. Tabelle H: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des E2-Gens

Exon Nr.	PCR-Produkt-Länge (bp)	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Sense (3'-5')	Annealing-Temperatur (°C)
1	121	CGTTTCCCATCTCCTGATAG	AAGGTATGAATATAATGG	55
2	301	GAGATAAGCCGGTATGGTTG	GACTGTGTATTCTAGCCGG	52
3	265	CCTCTGCCTGAGAACATTC	GGATAGTGGGAATCCATTT	52
4	305	GATCTGTACTTATGACTG	GTCATTGGGTCCCAATTA	52
5	347	CCATACCATTAGGATAGTTGTG	TCTGAGATTGTATAGGAAGTGTAC	52
6	378	ACTGTCAGTTGATCAAATTCC	GGAAGCTACCTCAGTAGATAAATG	52
7	252	GAGATTGAGAATTAAATAAATG	CAAACAAGGCTTGAGTAGGAC	55
8	222	CTTATTGTTTCAAATTCT	GTGCTTGTAGATTAGAGAC	55
9	273	GATGGCAGTGAAGGTTGATC	GTCACCTGGCATTGTGTTCC	52
10	207	GTCACCTGGCATTGTGTTCC	CAGGGACTAAACACAATGAAGAG	52
11	262	CTTGAGCTCTGAACAAGTG	ACTGATAAGACATTCTTG	52

8.8. Tabelle E: Oligonukleotide zur SNaPshot-Sequenzierung der c DNA

Mutation	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Annealing-Temperatur (°C)
P39H- α	CCCCCCCCCCCCCTGGCTAGATCTACCCCC	52
R159T- α	CCCCCCCCCCCCCTGGTGTTTGGCCAGTAC	52
A253M- α	CCCCCCCCCCCCCATGCCGGCTTCAACTTC	52
A328T- α	CCCCCCCCCCCCCAGCCCTTTCTCATCGAG	52
V412M- α	CCCCCCCCCCCCAACCTGCTCTTCTCAGAC	52
P123L- β	CCCCCCCCAAAAGATAGAGTTTTTAATACCC	52
V130G- β	CCCCCCCCCATTTGTGTGAACAAGGAATTG	52
P200A- β	CCCCCCCCCGGCTCTATCATTCTCAGAGT	52
Y244H- β	CCCCCCCCCCCCCTGTCCAGGCCGAAGTCA	52
G278S- β	CCCCCCCCCGATCACATGAACCTGAGTGC	52
V283A- β	CCCCCCCCCCCCGGGGCACTCAGGTTTCATG	52
G384S-E2	CCCCCCCCCCCCCAGAAATTGGGCTCTGTG	52

8.9. Patientenfragebogen

VARIANTE FORMEN DER MSUD

Name:

Geburtsdatum:

Klinik:

Familienanamnese:

Herkunft der Eltern:

Konsanguinität der Eltern:

Geschwister: -Anzahl:
 -wieviele sind von MSUD nicht betroffen:
 -wieviele sind von MSUD betroffen:

Wurde in der Familie eine Pränataldiagnostik durchgeführt:

Angaben zum Schweregrad der MSUD:

Auftreten erster Symptome:
 -im Alter von:
 -bei welchen Symptomen:
 -wann wurde die Diagnose gestellt:

Plasmaspiegel zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Einheit:);

-Leucin:
-Valin:
-Isoleucin:
-Alloisoleucin:

Welche Diagnostik wurde durchgeführt:

Enzymaktivität in Fibroblasten (% der Norm):

Molekulargenetik:

BCAA-Messungen:

-wurden Verlaufsmessungen durchgeführt:
-bei regelmässiger Messung siehe Tabelle: BCAA - Verlauf

Diätbehandlung:

Art der Diät:

-Normale Ernährung:
-Proteinarme Ernährung:
-Menge Protein g/kg/d:
-Strenge eiweißarme Ernährung mit BCAA freiem AS- Gemisch:
-Menge natürliches Protein g/kg/d:
-BCAA-freies AS-Gemisch:

Beginn der Diät:

Wie lange wurde sie durchgeführt:

Diätcompliance:

Gab es Stoffwechsellentgleisungen:

Körperliche Entwicklung:

Wachstumsdaten:

Datum	Länge in cm	Gewicht in kg

Angaben zur psychomotorischen und kognitiven Entwicklung:

Wurden neurologische Untersuchungen durchgeführt:

-EEG:

-MRT:

-CT:

Besondere Auffälligkeiten in der Entwicklung:

Wurden Intelligenzteste durchgeführt:

-welcher:

-wann:

-Ergebnis:

Schulkarriere:

Berufskarriere:

BCAA-Verlaufsmessung:

Datum	Leucin in $\mu\text{mol/l}$	Isoleucin $\mu\text{mol/l}$	Alloisoleucin $\mu\text{mol/l}$	Valin $\mu\text{mol/l}$	Allo-/Isoleucin-Ratio

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nadine Flaschker	Geburtsort	Düsseldorf
Anschrift	Curieweg 8 40591 Düsseldorf	Familienstand	ledig
Geburtsdatum	08.06.1977	Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1983-1987	katholische Grundschule, Düsseldorf
1987-1996	Geschwister-Scholl-Gymnasium, Düsseldorf (September 1987 / Juli 1996) allgemeine Hochschulreife

Ausbildung und Akademischer Werdegang

1996-1999	Medizinische Einrichtung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Lehranstalt für technische Assistenten in der Medizin Abschluss: examinierte Medizinisch- technische - Laboratoriumsassistentin
Oktober 1999	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
September 2001	Physikum
September 2002	1. Staatsexamen
September 2004	2. Staatsexamen
November 2005	3. Staatsexamen
seit Januar 2006	Assistenzärztin innere Medizin, Spital des Seebezirks, 3280-Meyriez, Schweiz
seit September 2002	Promotion in der Stoffwechselabteilung der Kinderklinik an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Prof. U. Wendel

Studienbegleitende Tätigkeiten:

Februar 2002	Famulatur Klinikum Karnaperstr.Wuppertal, Anästhesie
Februar/März 2003	Famulatur Kinderklinik der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf, Intensivmedizin/ Neonatologie
August 2003	Famulatur Kaiserswerther Diakonie Düsseldorf, Gynäkologie
September 2003	Famulatur Dominikus- Krankenhaus Düsseldorf, Innere Abteilung

Veröffentlichungen/Vorträge

Henneke M, Flaschker N, Helbling C, Muller M, Schadewaldt P, Gartner J, Wendel U.

Identification of twelve novel mutations in patients with classic and variant forms of maple syrup urine disease.

Hum Mutat. 2003 Nov;22 (5):417. PMID: 14517957 [PubMed - indexed for MEDLINE]

E Simon, N Flaschker, P Schadewaldt, U Langenbeck, U Wendel

Variant Maple Syrup Urine Disease (MSUD- the Entire Spectrum)

Eingereicht zur Publikation im J. Inherit Metab. Dis

N. Flaschker, U.Wendel

V17: Klinische, biochemische und molekulargenetische Charakterisierung von Patienten mit nicht-klassischen Varianten der Ahornsirupkrankheit (MSUD).

Abstracts der Beiträge zur 18. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS), Fulda, 10. – 12.3.2004; *Monatsschrift Kinderheilkunde* 6; 2004; S. 713

Danksagung

Sehr herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. Udo Wendel für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung und, die stete Diskussionsbereitschaft sowie für die Durchsicht des Manuskriptes danken.

Herrn Prof. Dr. Schulze-Osthoff, Abteilung für Molekulare Medizin der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Weiterhin danke ich Martina Müller für ihre Hilfestellung bei der praktischen Durchführung der Untersuchungen, sowie den kooperierenden Ärzten für die freundliche Bereitsstellung der Probenmaterials.

Dr. Oliver Feyen danke ich ganz besonders für seine fachliche Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit, für die zahlreichen Anregungen und die unermüdliche Diskussionsbereitschaft, für die Hilfestellung beim Formatieren, ohne die ich vermutlich verzweifelt wäre, für Korrekturlesungen, für Zeit und Geduld. Sein unbeugsamer Optimismus und Einsatz hat sehr zum Gelingen und zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Meinem Bruder und meinen Grossmüttern danke ich von Herzen, für die tatkräftige ausserwissenschaftliche Unterstützung, für die konsequente und unermüdliche Motivation.

Mein ganz besonderer Dank gebührt jedoch meinen Eltern. Ihnen danke ich für die Hilfe und Unterstützung der Bewältigung besonderer Stressphasen und die Erledigung jener Dinge, für die mir oftmals keine Zeit blieb. Nur durch Sie konnte es mir gelingen, meinen beruflichen Weg zu gehen. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Klinische, biochemische und molekulargenetische Charakterisierung von Patienten mit nicht-klassischen, varianten Formen der Ahornsirupkrankheit (MSUD)

Von Nadine Flaschker; Klinik für Allgemeine Pädiatrie der HHU Düsseldorf

Der Stoffwechselerkrankung Maple Syrup Urine Disease (MSUD) liegen unterschiedliche, autosomal rezessiv vererbte Defekte in jeweils einer von drei Untereinheiten des Multienzymkomplexes der verzweigtkettigen, 2-Ketosäuren-Dehydrogenase (BCKA-DH) zugrunde. Dieser mitochondrial lokalisierte Enzymkomplex besteht aus den vier Untereinheiten E1 α , E1 β , E2 und E3 und benötigt Thiaminpyrophosphat als Coenzym. Von allen Patienten mit MSUD leiden etwa 80% an der schwersten, klassischen Form und 20 % an einer milderen Variante.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 21 Patienten mit einer varianten Form der MSUD, hinsichtlich klinischer und biochemischer Parameter charakterisiert. Dabei konnten 17 Patienten einer von 3 Gruppen zugeordnet werden: Gruppe A = sehr milde, asymptotische Variante; Gruppe B = milde Variante; Gruppe C = schwere Variante. Bei 4 Patienten hatte sich infolge frühzeitiger Diagnosestellung im Neugeborenen Screening und sofortigem Therapiebeginn noch kein klinischer Phänotyp ausgebildet. Diese Kinder wurden deshalb einer Gruppe mit unklarem klinischen Phänotyp zugeordnet (Gruppe D). Die Ergebnisse geben Anlass zu der Feststellung, dass Patienten mit den unterschiedlichen MSUD-Varianten von der Diagnostik im Neugeborenen Screening profitieren, da durch gute Beobachtung oder frühzeitigen Beginn einer Therapie unkontrollierte Stoffwechselbedingungen mit dem Risiko einer bleibenden Hirschschädigung vermieden werden können.

Exemplarisch wurden aus jeder Gruppe 2-3 Patienten genotypisch charakterisiert. Hierfür wurden bei insgesamt 13 Patienten die Gene für E1 α , E1 β , und E2 molekulargenetisch untersucht. Bei 12 der 13 Patienten wurden in einem der drei Gene Mutationen entweder in homozygoter oder heterozygoter Form identifiziert. Bei einem Patienten wurde nur ein verändertes Allel gefunden; er blieb somit unaufgeklärt. Insgesamt fanden sich 18 Mutationen, von denen 10 in der Literatur noch nicht beschrieben waren. Für das E1 α -Gen war eine (A328T) von insgesamt 5 Mutationen neu. Für E1 β waren von insgesamt 9 gefundenen Mutationen 8 neu (R111X; P123L; V130G; R168C; P200A; Y244H; V238A und c.855-868 del). Für E2 war eine von insgesamt 4 Mutationen neu (c.760-786 del). Die Zuordnung der Mutationen zu den klinischen Gruppen könnte Hinweise darauf geben, dass Mutationen im E1 α -Gen besonders bei schwereren Varianten vorkommen und Mutationen in den E1 β - und E2-Genen häufig mit milderen Verläufen assoziiert sind. Die früher als krankheitsrelevant bezeichnete Mutation (G384S) im E2-Gen hat sich in der vorliegenden Arbeit als nicht krankheitsverursachend herausgestellt.

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

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in vorgelegter oder ähnlicher Form noch keiner anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den

(Nadine Flaschker)

Klinische, biochemische und molekulargenetische Charakterisierung von Patienten mit nicht-klassischen, varianten Formen der Ahornsirupkrankheit (MSUD)

Von Nadine Flaschker; Klinik für Allgemeine Pädiatrie der HHU Düsseldorf

Der Stoffwechselerkrankung Maple Syrup Urine Disease (MSUD) liegen unterschiedliche, autosomal rezessiv vererbte Defekte in jeweils einer von drei Untereinheiten des Multienzymkomplexes der verzweigtkettigen, 2-Ketosäuren-Dehydrogenase (BCKA-DH) zugrunde. Dieser mitochondrial lokalisierte Enzymkomplex besteht aus den vier Untereinheiten E1 α , E1 β , E2 und E3 und benötigt Thiaminpyrophosphat als Coenzym. Von allen Patienten mit MSUD leiden etwa 80% an der schwersten, klassischen Form und 20 % an einer milderen Variante.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 21 Patienten mit einer varianten Form der MSUD, hinsichtlich klinischer und biochemischer Parameter charakterisiert. Dabei konnten 17 Patienten einer von 3 Gruppen zugeordnet werden: Gruppe A = sehr milde, asymptotische Variante; Gruppe B = milde Variante; Gruppe C = schwere Variante. Bei 4 Patienten hatte sich infolge frühzeitiger Diagnosestellung im Neugeborenen Screening und sofortigem Therapiebeginn noch kein klinischer Phänotyp ausgebildet. Diese Kinder wurden deshalb einer Gruppe mit unklarem klinischen Phänotyp zugeordnet (Gruppe D). Die Ergebnisse geben Anlass zu der Feststellung, dass Patienten mit den unterschiedlichen MSUD-Varianten von der Diagnostik im Neugeborenen Screening profitieren, da durch gute Beobachtung oder frühzeitigen Beginn einer Therapie unkontrollierte Stoffwechselbedingungen mit dem Risiko einer bleibenden Hirschschädigung vermieden werden können.

Exemplarisch wurden aus jeder Gruppe 2-3 Patienten genotypisch charakterisiert. Hierfür wurden bei insgesamt 13 Patienten die Gene für E1 α , E1 β , und E2 molekulargenetisch untersucht. Bei 12 der 13 Patienten wurden in einem der drei Gene Mutationen entweder in homozygoter oder heterozygoter Form identifiziert. Bei einem Patienten wurde nur ein verändertes Allel gefunden; er blieb somit unaufgeklärt. Insgesamt fanden sich 18 Mutationen, von denen 10 in der Literatur noch nicht beschrieben waren. Für das E1 α -Gen war eine (A328T) von insgesamt 5 Mutationen neu. Für E1 β waren von insgesamt 9 gefundenen Mutationen 8 neu (R111X; P123L; V130G; R168C; P200A; Y244H; V238A und c.855-868 del). Für E2 war eine von insgesamt 4 Mutationen neu (c.760-786 del). Die Zuordnung der Mutationen zu den klinischen Gruppen könnte Hinweise darauf geben, dass Mutationen im E1 α -Gen besonders bei schwereren Varianten vorkommen und Mutationen in den E1 β - und E2-Genen häufig mit milderen Verläufen assoziiert sind. Die früher als krankheitsrelevant bezeichnete Mutation (G384S) im E2-Gen hat sich in der vorliegenden Arbeit als nicht krankheitsverursachend herausgestellt.

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

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nadine Flaschker	Geburtsort	Düsseldorf
Anschrift	Curieweg 8 40591 Düsseldorf	Familienstand	ledig
Geburtsdatum	08.06.1977	Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1983-1987	katholische Grundschule, Düsseldorf
1987-1996	Geschwister-Scholl-Gymnasium, Düsseldorf (September 1987 / Juli 1996) allgemeine Hochschulreife

Ausbildung und Akademischer Werdegang

1996-1999	Medizinische Einrichtung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Lehranstalt für technische Assistenten in der Medizin Abschluss: examinierte Medizinisch- technische - Laboratoriumsassistentin
Oktober 1999	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
September 2001	Physikum
September 2002	1. Staatsexamen
September 2004	2. Staatsexamen
November 2005	3. Staatsexamen
seit Januar 2006	Assistenzärztin innere Medizin, Spital des Seebezirks, 3280-Meyriez, Schweiz
seit September 2002	Promotion in der Stoffwechselabteilung der Kinderklinik an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Prof. U. Wendel

Studienbegleitende Tätigkeiten:

Februar 2002	Famulatur Klinikum Karnaperstr.Wuppertal, Anästhesie
Februar/März 2003	Famulatur Kinderklinik der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf, Intensivmedizin/ Neonatologie
August 2003	Famulatur Kaiserswerther Diakonie Düsseldorf, Gynäkologie
September 2003	Famulatur Dominikus- Krankenhaus Düsseldorf, Innere Abteilung

Düsseldorf, Mai 2006

