

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

Der Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD)-Mangel in Deutschland

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Ina Schymik

2007

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat Bernd Nürnberg

Dekan

Referentin: Univ.-Prof. Dr. med. Ute Spiekerkötter

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. W. Nikolas Kühn-Velten

Meiner Oma in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Einführung.....	5
1.2	Historische Entwicklung.....	5
1.3	Biochemie	6
1.4	Molekulargenetik	9
1.5	Klinischer Verlauf	9
1.6	Neugeborenen-Screening	11
1.7	Therapie.....	12
1.8	Fragestellung	14
2	Patienten, Methoden und Material	15
2.1	Patienten.....	15
2.2	Methoden	15
2.2.1	Isolierung genomischer DNS	15
2.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	16
2.2.3	Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese 18	
2.2.4	Aufreinigung von DNS Fragmenten durch Säulenchromatographie .	19
2.2.5	Sequenzier-Polymerasekettenreaktion (Cycle-Sequencing)	20
2.2.6	Elektrophoretische Datenanalyse am ABI 310	20
2.2.7	Enzymatische Bestimmung der VLCAD-Enzymaktivität.....	21
2.3	Material	21
3	Ergebnisse	23
3.1	Patienten, die im Neugeborenen-Screening entdeckt wurden	23
3.1.1	C14:1 Carnitin bei Geburt.....	23
3.1.2	C14:1 Carnitin und freies Carnitin unter Präventionsmaßnahmen ...	24
3.1.3	Mutationen bei Screening-Patienten.....	26
3.1.4	Korrelation der Mutationen mit den C14:1 Werten	28
3.2	Klinisch diagnostizierte Patienten	29
3.2.1	Acylcarnitine bei Diagnosestellung und im Verlauf.....	30
3.2.2	Mutationen bei klinisch diagnostizierten Patienten.....	30
3.3	Vergleich der im Screening identifizierten Kinder mit den klinisch auffällig gewordenen Patienten	31
4	Diskussion.....	32
5	Literatur.....	37
	Danksagung.....	40
	Lebenslauf	41
	Kurzfassung/ Abstract	42

1 Einleitung

1.1 Einführung

Der Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD)-Mangel ist eine autosomal-rezessiv vererbte Störung der Fettsäureoxidation, die durch eine Veränderung im *VLCAD*-Gen, lokalisiert auf dem Chromosom 17, Region 17p13.1, hervorgerufen wird. Diese Veränderung resultiert in einer verminderten oder fehlenden Aktivität der VLCAD.

Die VLCAD ist das Schlüsselenzym der mitochondrialen β -Oxidation langkettiger Fettsäuren und katalysiert den ersten Schritt in der Oxidation der C14-C18-kettigen Fettsäuren. Bei einem Enzymmangel akkumulieren die langkettigen Acyl-CoA in den Mitochondrien und sind nach Bindung an Carnitin als langkettige Acylcarnitine im Blut nachweisbar. Das spezifische Acylcarnitinprofil ist daher diagnostisch wegweisend. Es existieren verschiedene Krankheitsformen unterschiedlicher Schweregrade.

Molekulargenetisch und klinisch besteht eine ausgeprägte Heterogenität. Missense-Mutationen sind in der Regel mit leichteren klinischen Verlaufsformen assoziiert, Nullmutationen mit schwereren Verläufen.

Die klinische Manifestation umfasst eine Kardiomyopathie, eine Hepatopathie und eine Skelettmypathie. Seit der Einführung des erweiterten Neugeborenen-Screenings sind erste Daten zur Prävalenz des Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangels bekannt. Regional verschieden wird die Inzidenz auf 1: 42.500 bis 1: 125.000 geschätzt (Spiekerkoetter et al. 2002, Wilcken et al. 2003). Der VLCAD-Mangel ist der häufigste Defekt in der β -Oxidation langkettiger Fettsäuren.

1.2 Historische Entwicklung

1985 wurden von Hale et al. die ersten Patienten mit einem Mangel der Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase beschrieben. Die VLCAD war zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert und zunächst wurde ein Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (LCAD)-Mangel vermutet. Es bestand die Annahme, die β -Oxidation sei eine aufeinander abgestimmte Reaktion dreier Enzyme, der Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (SCAD), der Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) und der Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (LCAD).

Isai et al. identifizierten 1992 eine vierte Acyl-CoA Dehydrogenase. Sie kam vorzugsweise beim Abbau langkettiger und sehr langkettiger Fettsäuren zum Einsatz. Dieses Enzym wurde Very Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase benannt. Nach ihrer Entdeckung zeigte sich, dass Patienten, bei denen man ursprünglich von einem LCAD-Mangel ausgegangen war, in Wirklichkeit einen VLCAD-Mangel hatten (Hale et al. 1990, Ayoma et al. 1993, Bertrand et al. 1993). Auch Parini et al. beschrieben 1998 einen Jungen mit einem VLCAD- Mangel mit schwerer Kardiomyopathie und Skelettmypathie. Initial war im Jahr 1992 die Diagnose eines LCAD-Mangel gestellt worden.

Mittlerweile sind mehr als 100 Patienten mit klinischer Manifestation eines VLCAD-Mangels beschrieben.

Durch die Einführung des erweiterten Neugeborenen-Screening mittels Tandem-Massen-Spektrometrie (MS/MS) wurden erstmals auch asymptotische Neugeborene mit Mutationen im *VLCAD*-Gen identifiziert. Seit 2003 ist der VLCAD-Mangel bundesweit Bestandteil des Neugeborenen-Screening.

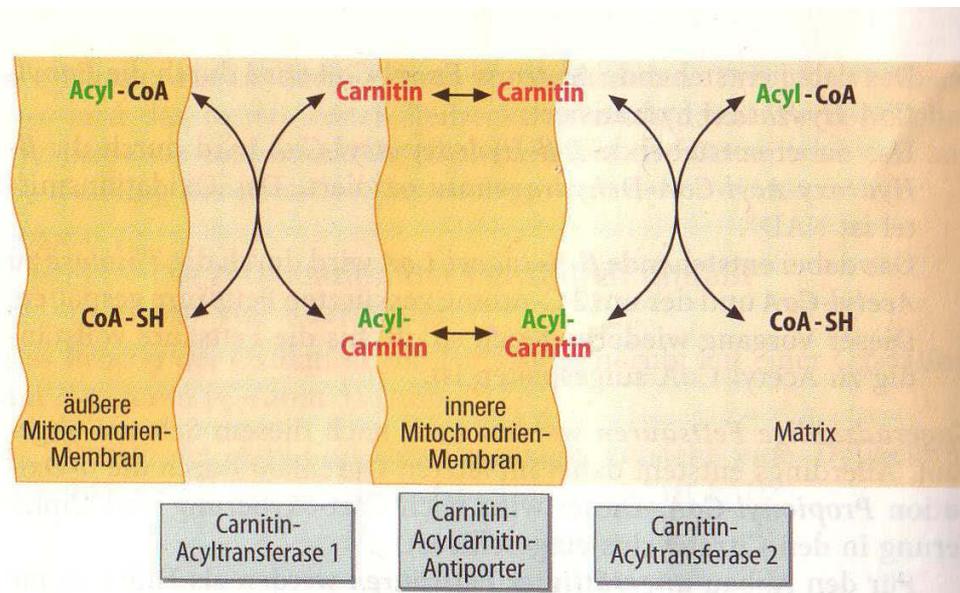
1.3 Biochemie

Die VLCAD katalysiert den ersten Schritt in der mitochondrialen β -Oxidation der langkettigen Fettsäuren. Die Energie aus den Fettsäuren deckt im Fastenzustand bis zu 80 % des gesamten Bedarfs ab.

Während Fastenperioden oder nach längerer körperlicher Anstrengung werden die als Triglyceride im Fettgewebe gespeicherten langkettigen Fettsäuren durch Lipasen freigesetzt. Da sie relativ reaktionsträge Verbindungen sind, müssen sie zunächst im Zytosol zu Acyl-CoA-Estern umgewandelt werden. Die anschließende Oxidation findet in der mitochondrialen Matrix statt. Die innere Mitochondrienmembran ist für die langkettigen Fettsäuren undurchlässig, so dass der Transport anhand eines spezifischen Carnitin-Shuttles erfolgt (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1:

Carnitin als Carrier beim Transport langkettiger Fettsäuren durch die mitochondriale Innenmembran (aus Löffler, Petrides 1998).



Der Fettsäurerest wird vom CoA auf Carnitin übertragen und kann als Acylcarnitin die innere Mitochondrienmembran passieren. Im Mitochondrium wird er wieder auf CoA übertragen.

Die sich anschließende β -Oxidation umfasst vier enzymatische Schritte (siehe Abbildung 2).

die erste Oxidation

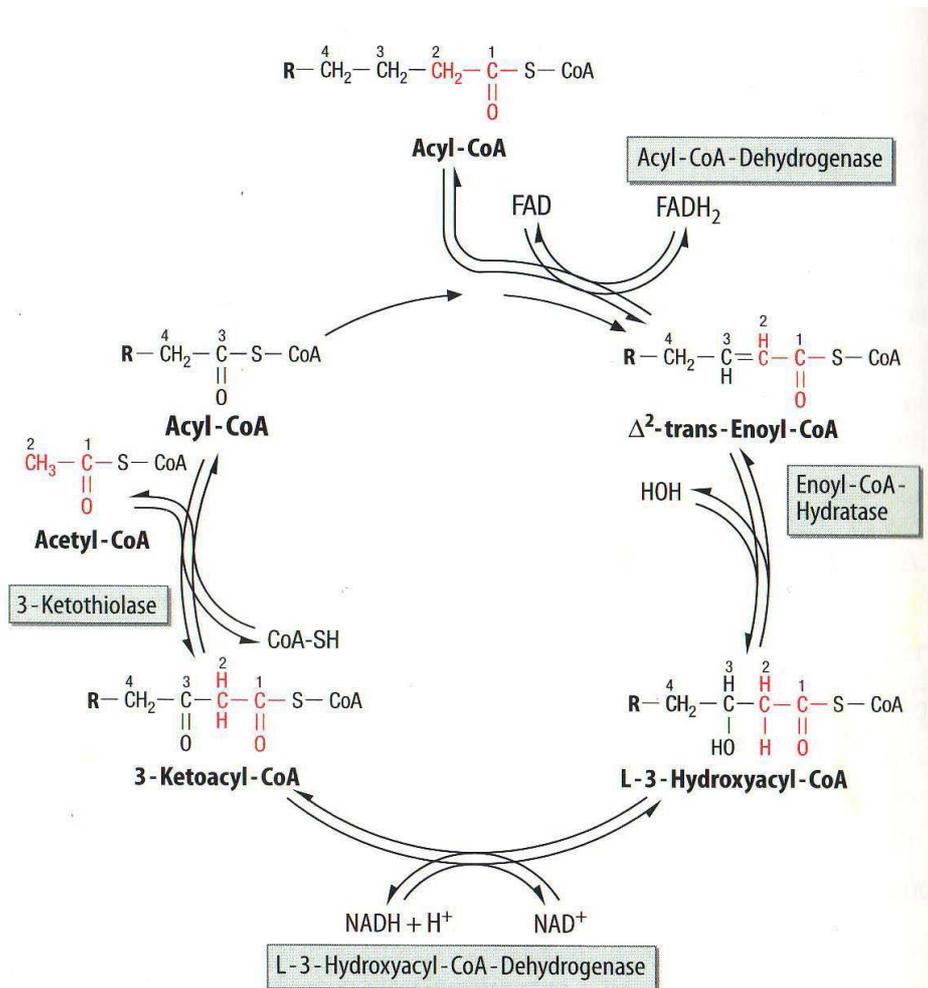
die Hydratisierung

die zweite Oxidation

die anschließende thiolytische Abspaltung eines Acetyl-CoA vom β -C-Atom.

Abbildung 2:

Abbau der Fettsäuren durch mitochondriale β -Oxidation (aus Löffler, Petrides 1998)



Die langkettigen Fettsäuren werden in katabolen Stoffwechsellagen zur Energieproduktion herangezogen. Bei einem Mangel an VLCAD ist keine Energiegewinnung aus Fettsäuren möglich, stattdessen akkumulieren langkettige Acyl-CoA vor dem Enzymblock. An Carnitin gebunden verlassen sie die Mitochondrien und sind im Blut als C14-C18 Acylcarnitine nachweisbar.

Das Acylcarnitinprofil ist mittels Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) im erweiterten Neugeborenen-Screening diagnostisch wegweisend.

Dabei ist das C14:1-Carnitin der wichtigste krankheitsspezifische Marker des VLCAD-Mangels.

1.4 Molekulargenetik

Das *VLCAD*-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiert und hat eine Länge von 5,4 kb. Die kodierende Region besteht aus 20 Exons. Mutationen können sowohl in den Exons als auch in den angrenzenden Introns liegen. Das Spektrum dieser Mutationen ist weit. In einer Studie von Andresen et al. 1999 wurden bei 55 Patienten 58 verschiedene Mutationen identifiziert. Es gibt somit im Gegensatz zum Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel (MCAD), keine prävalente Mutation.

Aufgrund ihrer Auswirkungen auf die Proteinstruktur kann man die Mutationen in zwei Gruppen aufteilen:

Nullmutationen, bei denen die Bildung des VLCAD Proteins komplett gestört ist

Missense-Mutationen, bei denen das Protein zwar gebildet, aber vorzeitig degradiert wird. Hier bleibt eine enzymatische Residualaktivität erhalten.

Die Unterteilung in diese beiden Gruppen ermöglicht eine gewisse Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Missense-Mutationen sind mit leichteren klinischen Verläufen assoziiert, Nullmutationen führen zu schwereren Krankheitsbildern.

.

1.5 Klinischer Verlauf

Der VLCAD-Mangel zeigt eine ausgesprochene klinische Heterogenität mit Beteiligung unterschiedlicher Organsysteme. Krankheitsauslösend sind katabole Stoffwechsellagen in den ersten Lebenstagen, Perioden mit Fieber im Rahmen eines Infekts, längere Fastenperioden und Episoden von Nahrungsverweigerung oder gestörter Nahrungsaufnahme, wie z.B. durch Erbrechen. Energie aus Fettsäuren kann nicht mehr bereitgestellt werden, so dass vor allem Organe mit einem hohen Energieumsatz wie beispielsweise das Herz oder bei körperlicher Aktivität der Skelettmuskel, betroffen sind. Die Folge können eine Kardiomyopathie, Muskelschwäche, Muskelschmerzen und episodische Rhabdomyolysen sein. In der Leber können Lipidakkumulationen und hepatozelluläre Schäden entstehen. Das Auftreten von Hypoglykämien im Rahmen kataboler Stoffwechsellagen ist auf einen gesteigerten Glukoseverbrauch und eine gestörte Glukoneogenese zurückzuführen. Vor der „Screening-Ära“ wurden drei klinische Manifestationsformen unterschieden:

Schwere infantile Verlaufsform :

Hauptsymptome: Kardiomyopathie, Rhythmusstörungen, Reye Syndrom
hypoketotische Hypoglykämie

Nebensymptome : muskuläre Hypotonie

Manifestation: erste Lebensmonate

zusätzliche Symptome im Langzeitverlauf: episodische Rhabdomyolyse und Myopathie

Milde infantile Form

Hauptsymptom: hypoketotische Hypoglykämie

Nebensymptome: muskuläre Hypotonie

Manifestation: erste Lebensjahre

zusätzliche Symptome im Langzeitverlauf: episodische Rhabdomyolysen und Myopathie

Milde adulte Form

Hauptsymptome: Myopathie, episodische Rhabdomyolyse

Nebensymptome: Hypoglykämie

Manifestation: Jugend- und Erwachsenenalter

Wie unterschiedlich die Krankheitsverläufe sind, zeigen zwei Beispiele in der Literatur:

Ayoma et al. (1993) beschrieb einen Patienten im Alter von 4 Monaten mit hypoketotischer Hypoglykämie, Kardiomyopathie und hepatozellulärer Dysfunktion. Das Kind verstarb im Verlauf der Erkrankung. In der Autopsie fand man schwere hepatozelluläre Schäden sowie Lipidakkumulationen in vielen Geweben.

Fukao et al. (2001) berichtete von einem 14-jährigen Mädchen, welches sich mit Myalgien und erhöhten Serumkreatininkinase Werten nach moderater Anstrengung präsentierte. Die ersten Symptome traten im Alter von sechs Jahren auf. Diese Patientin entwickelte bis dahin nie Hypoglykämien, eine Hepatopathie oder eine Kardiomyopathie.

Mit der Einführung des Neugeborenen-Screening für den VLCAD-Mangel wurden erstmals auch asymptotische Kinder identifiziert. Das erweiterte Neugeborenen-Screening ist seit 2003 bundesweit etabliert. In der bisher kurzen Beobachtungszeit von 3 Jahren ist der überwiegende Teil dieser Kinder bis zum heutigen Zeitpunkt mit

prophylaktischen Maßnahmen in Form einer speziellen Diät symptomfrei. Im Rahmen des Familien-Screenings sind bisher auch ältere, asymptomatische Geschwisterkinder mit einem VLCAD-Mangel identifiziert worden.

1.6 Neugeborenen-Screening

Beim Neugeborenen-Screening handelt es sich um eine unkomplizierte Präventionsmaßnahme in der gesamten Bevölkerung zur Früherkennung häufiger, angeborener und therapierbarer, endokriner und metabolischer Erkrankungen in der Neugeborenenperiode. Das Screening gehört zu den sichersten und effektivsten Vorsorgeuntersuchungen. Ziel ist es, Krankheiten schon in der präsymptomatischen Phase zu erkennen und mittels präventiver Maßnahmen die Entwicklung akuter, teilweise lebensbedrohliche Symptome und eventueller Spätfolgen zu verhindern. Tatsächlich hat das Neugeborenen-Screening dazu beigetragen durch eine frühzeitige Behandlung die Morbidität und Mortalität dieser Erkrankungen zu reduzieren.

Das englische Wort „Screening“ bedeutet „Sieben“. Das heißt aus den Testproben aller Kinder müssen die herausgesiebt werden, die auffällig sind.

Als Untersuchungsmaterial benötigt man lediglich wenige Blutstropfen (meist kapillär aus der Ferse der Neugeborenen entnommen), die auf eine Filterpapierkarte (die sogenannte Guthrie- Karte) getropft werden. Der Entnahme-Zeitpunkt muss während des Katabolismus zwischen dem zweiten und dritten Lebenstag (48. - 72. Lebensstunde) liegen.

Mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) können mehr als 40 Marker für Erkrankungen in einem Assay gescreent werden (Zytkovicz et al. 2001). Die hinweisenden Metabolite werden aus den Blutstropfen in eine Methanollösung extrahiert und anschließend analysiert. Der wichtigste Marker um einen VLCAD- Mangel zu identifizieren, ist das Tetradecenoylcarnitin (C14:1), welches bei Vorliegen eines Defektes im Blut erhöht ist. Ein erhöhtes C14:1 Carnitin erfordert eine Kontrolluntersuchung am 5. - 7. Lebenstag. Der Normwert für das C14:1 Carnitin liegt in den verschiedenen Screening-Zentren zwischen 0,21 mmol/l - 0,41 µmol/l.

Seit 2005 haben sich die Screening Kommission der deutschen Gesellschaft für Kinder - und Jugendmedizin und der gemeinsame Bundesausschuss der Krankenkassen auf die folgenden 14 metabolischen und endokrinen Erkrankungen festgelegt:

Konventionelle Testverfahren:

Hypothyreose

Adrenogenitales Syndrom (AGS)

Biotinidase-Mangel

Klassische Galaktosämie (Gal-Uridyltransferase Mangel)

Tandem-Massenspektrometrie:

Aminoazidopathien

Phenylketonurie (PKU) und Hyperphenylalaninämie (HPA)

Ahornsiruperkrankung (MSUD)

Fettsäureoxidations-Defekte

Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase(MCAD)-Mangel

Long-Chain-3-OH Acyl-CoA Dehydrogenase(LCHAD)-Mangel

Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase(VLCAD)-Mangel

Carnitinzyklus-Defekte

Carnitin-Palmitoyl Transferase(CPT)-I-Mangel

Carnitin-Palmitoyl Transferase(CPT)-II-Mangel

Carnitin-Acylcarnitin Translocase-Mangel

Organoazidurien

Glutarazidurie Typ I (GA I)

Isovalerianacidämie (IVA)

1.7 Therapie

Grundbausteine der Therapie sind:

Eine fettreduzierte und fettmodifizierte Diät

Die Vermeidung längerer Nüchternperioden

Die ausreichende Zufuhr von Kohlenhydraten in Krankheitsphasen

Im Rahmen eines Workshops zu dem Thema „Störungen der Oxidation langkettiger Fettsäuren“ im Oktober 2004 in Düsseldorf, bei dem Vertreter von 18

Stoffwechselzentren aus Deutschland, der Schweiz, den Niederlanden und Österreich anwesend waren, wurde folgender Konsensus beschlossen:

Zu 1. -fettreduzierte und fettmodifizierte Diät:

Fette:

Asymptomatische Neugeborene sollen in den ersten 4 - 6 Lebensmonaten zu 50 % mit Muttermilch oder handelsüblicher Säuglingsnahrung und zu 50 % mit einer fettreduzierten und fettmodifizierten Formulanahrung (Monogen der Firma SHS oder Basic-F der Firma Milupa+ MCT-Öl) gefüttert werden. Die Nahrung enthält hinsichtlich des Fettanteils überwiegend (90 %) mittelkettige Fettsäuren (medium chain triglycerides = MCT). Lediglich 10 % des Fettanteils sind langkettige Fettsäuren. Eine fettreduzierte Diät erfordert die zusätzliche Zufuhr essentieller Fettsäuren. In den ersten Lebensmonaten sind dies 3,5 g pro Tag. Am besten eignen sich Walnuss-, Weizenkeim-, oder Sojaöl.

Ab dem fünften Monat (bei Zufütterung von Beikost) wird eine Reduzierung der Fettmenge auf 30 - 40 % der Gesamtenergie empfohlen. Üblicherweise beträgt im Kleinkindalter die Energie, die aus den Fettsäuren gewonnen wird, 40 - 45 % der Gesamtenergie. Wichtig ist auch hier, dass die Fettmenge nicht nur reduziert wird, sondern auch mittelkettige Fettsäuren gegeben werden. Die Menge an MCT sollte 15 % der Gesamtenergie betragen, die übrigen 15 – 20 % entfallen auf langkettige Fettsäuren.

Bei symptomatischen Kindern sollte bei der Ernährung in den ersten vier Lebensmonaten komplett auf Muttermilch und / oder handelsübliche Säuglingsnahrung verzichtet werden. Es sollen ausschließlich spezielle Formulanahrungen mit MCT Fetten (z.B. Monogen) verabreicht werden.

Ab dem fünften Lebensmonat ist eine Reduzierung der Fettmenge auf 25 - 30 % der Gesamtenergiemenge zu empfehlen. Hiervon entfallen 20 – 25 % der Energie auf MCT-Fette.

Kohlenhydrate:

Es gibt keine Empfehlung für eine generelle nächtliche Dauersondierung mit Kohlenhydraten, sowie für eine Anreicherung der Nahrung mit zusätzlichen Kohlenhydraten tagsüber.

Proteine:

Sie sollen 15 - 20 % der Gesamtenergie sowohl bei asymptomatischen als auch bei Kindern mit Symptomen betragen.

Vitamine und Mineralstoffe:

Eine generelle Substitution wird nicht empfohlen.

Zu 2.- Vermeidung längerer Nüchternperioden:

Wichtig ist vor allem die Vermeidung längerer Nüchternperioden und kataboler Stoffwechsellagen. Neugeborene sollen alle 3 Stunden eine Mahlzeiten bekommen. Säuglinge < 6 Monaten sollen alle 4 Stunden, auch nachts, gefüttert werden. Kinder älter als 6 Monate, können nachts maximal 8 Stunden nüchtern sein.

Bei Kindern von 12 Monaten bis 3 Jahren sollen die Mahlzeiten tagsüber alle 4 Stunden erfolgen. In der Nacht ist eine 8 - 10 stündliche Nüchternperiode nicht zu überschreiten. Auch ab dem 3. Lebensjahr soll eine Nüchternzeit von 10 Stunden nachts nicht wesentlich überschritten werden.

Zu 3. - die ausreichende Zufuhr von Kohlenhydraten in Krankheitsphasen:

Im Rahmen von Krankheiten ist auf eine ausreichende Zufuhr von Kohlenhydraten zu achten. Diese erfolgte durch Anreicherung der Nahrung oder Getränke mit Maltodextrin. Eine frühzeitige intravenöse Kohlenhydrat-Zufuhr bei rezidivierendem Erbrechen oder Nahrungsverweigerung ist zu erwägen.

1.8 Fragestellung

In unserer Studie untersuchten wir zwei Gruppen von Patienten:

asymptomatische Neugeborene, die anhand erhöhter C14:1 Acylcarnitine im Neugeborenen-Screening mit dem Verdacht auf einen VLCAD-Mangel entdeckt wurden

Patienten, bei denen die Diagnose vor der „Screening-Ära“ aufgrund klinischer Manifestationen gestellt wurde.

Beide Gruppen wurden klinisch, molekulargenetisch, enzymatisch und biochemisch charakterisiert, um die Diagnose zu bestätigen, den vorliegenden Phänotyp einzuschätzen und eine mögliche Genotyp-Phänotyp Korrelation zu bestimmen.

Wichtige Fragen dieser Studie sind:

Gibt es Parameter, die eine frühzeitige Aussage über Prognose und Verlauf der Krankheit ermöglichen?

Spielt dabei die Höhe der Acylcarnitine im Screening und im weiteren Verlauf eine Rolle?

Zeigt sich eine Genotyp-Phänotyp Korrelation der im Screening identifizierten Neugeborenen?

Inwieweit unterscheiden sich Mutationen zwischen Screening-Patienten und Patienten mit klinischen Manifestationen?

Wie wichtig ist die molekulargenetische Charakterisierung für die Diagnosestellung des VLCAD-Mangels?

2 Patienten, Methoden und Material

2.1 Patienten

Das Blut der Patienten wurde uns von verschiedenen Kinderkliniken und niedergelassenen Kinderärzten Deutschlands zugesandt. Klinische Daten wurden im Rahmen eines einheitlichen Fragebogens retrospektiv erhoben, der von den behandelnden Ärzten ausgefüllt wurde.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung genomischer DNS

Materialien: QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden

Die DNS wurde aus heparinisierem Vollblut mittels QIAamp® DNA MiniKit der Firma Qiagen GmbH (Hilden) nach Anweisung des Herstellers isoliert.

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der gewonnenen DNS erfolgte anhand photometrischer Messungen mit einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm (Beckmann Coulter DU 640B Spectrophotometer).

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Materialien: Primer (100 pmmol/μl), Firma MWG-Biotech, Ebersberg, Taq-Polymerase, dnTPs, 10 x Puffer

Die Amplifikation der genomischen DNS erfolgte mit Hilfe von genspezifischen Oligonukleotiden mit einer Länge von 21 - 29 Basenpaaren (bp). Die Fragmentlänge aller PCR-Produkte lag zwischen 142 und 277 bp. Die Tabelle 1 zeigt die für die Amplifikation der genomischen DNS des VLCAD-Gens verwendeten Oligonukleotide. Dabei wurden Exon 1 und 2, 3 und 4, 12 und 13, 14 und 15 sowie 16 und 17 jeweils von gemeinsamen Primerpaaren amplifiziert.

Abbildung 3:

Oligonukleotidsequenzen

Exon Nr.	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Antisense (5'-3')	Annealing-Temperatur (C°)
1,2			65
3,4	GTCCCTTCCCTGAACTTGCTAACCG	CCTGGCCCCACCCAGCTCTGATTATCC	65
5	CAGCCTGGCCTGACCAGCCTGTCC	CACCTCACCAGGGACCAAGCCC	65
6	CAAAAGGAGCCTGGATGTGGGATCC	GGCAAAAGAGCTGAGTCTGCCAAGC	65
7	GCAGCCAGTGACAACCCAGATTCC	GTGTGCCCCCAATCCCTGGCTCTCC	65
8	GGGACTTTGAAGCTCATCAGAACTTGGG	CCTGGAATTGGGCGGAGGAGAAGG	65
9	CCCGTCCTCCACGCCCTGAATATCC	GTCTGCCCCCTCAGTCCTAAGCTCC	65
10	CACACCTCTGCTTTCCACACTGCC	CTGTTTGGGTTACCTAGGGACTCGG	65
11	GGGAGACTGCAGAACCACACTGAACC	GGGAAGAAACGCCAGGGCTCCAGGGAG	58
12,13	GCAAGTCTGACAAAGCCCTTTGCAAT	GCCGAGGCTCTCAGAAGACCGTCCTG	58
14,15	GGATGGCACATCTCAGCACGGG	CCTCCCCTGGCTCTGGCCCTAAG	58
16,17	GGCAACTAACCAGTCATTCTCCCTC	GGAGGGGCGGAATGGTGTAGAGCTCAC	58
18	GGAGGCCAAGCTGATAAAACACAAGAAG G	CCAGGCCCCCTGCGGCTCAGGCATTCC	65
19	CCATGGTGGTGGTTCTCTCGAGG	CCTGCACCTCCAGCCCTCACC	65
20	CCTGGTGTATCGAGGTGAGACTCGG	CTTTGGGAGGGAGGCAGGCAGC	65

In einem Reaktionsansatz von 40 µl Gesamtvolumen wurden 100 ng genomische DNS mit je 1,5 µl (10 pmol/µl) des 5'-Primers und des 3'-Primers, 1,5 µl des Desoxy-Nukleotidtriphosphat-Gemisches (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, jeweils 10 mM), 1 µl DNS-Polymerase(5 U/µl) und 4 µl des 10x PCR-Puffers mit Aqua dest. versetzt.

Die Inkubation der Ansätze erfolgte im Trio-Thermoblock der Firma Biometra Göttingen nach folgendem Schema

Exon 1/2, 3/4, 5,6,7,8,9,10,18,19,20:

1 Zyklus bei	95°C für 5 min(Denaturierung)
33 Zyklen bei	95°C für 45 sec (Hybridisierung)
	65°C für 45 sec (Elongation)
	72°C für 1 min (abschließende Synthese)

Die PCR endet mit einer 10-minütigen Inkubationszeit bei 72°C.

Exons 11, 12/13, 14/15, 16/17:

1 Zyklus bei	95°C für 5 min (Denaturierung)
45 Zyklen bei	95°C für 30 sec (Hybridisierung)
	58°C für 30 sec (Elongation)
	72°C für 30 sec (abschließende Synthese)

Die PCR endet mit einer 10 - minütigen Inkubationszeit bei 72°C.

Für die einzelnen Oligonukleotidpaare wurde eine individuelle optimale Anlagerungstemperatur (T_m) ermittelt (siehe Tabelle I). Als T_m -Basiswert diente die Berechnung nach folgender Formel:

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

Die Charakterisierung der PCR Produkte erfolgte durch gelelektrophoretische Methoden.

2.2.3 Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese

Materialien: Agarosegel, Peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen 100 bp-Leiter, Invitrogen®

Die Auftrennung der DNS Fragmente erfolgte in einem Agarosegel. Agarose wurde in einer Konzentration von 2 % in 100 ml 1x TBE-Puffer(110 mM Tris-HCL, 89 mM Borsäure, 2 mM Na-EDTA) gelöst.

10 µl Laufpuffer (30 % Glycerin, 0,25 % Xylencyanol, 0,25 % Bromphenolblau) wurden mit 35 µl amplifizierten DNS Fragmenten verdünnt und auf das Gel aufgetragen. Als DNS-Längenstandard diente die 100 bp-Leiter.

Die Elektrophorese wurde bei 200 mA mit maximal 120 V für 60 - 120 Minuten durchgeführt.

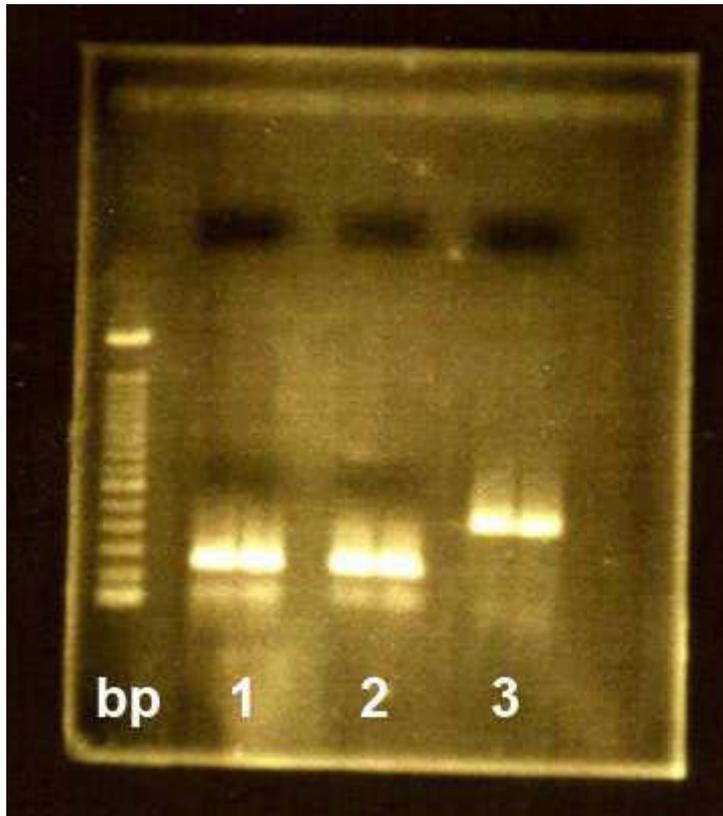
Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte durch 10 - 15 minütige Inkubation des Agarosegels in einer 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung mit nachfolgender Anregung des in die DNS interkalierten Ethidiumbromids bei 365 nm unter UV-Licht.

(UV-Transluminator GE-FLX-20L, Firma AGS, Heidelberg)

Das spezifische Bandenmuster wurde fotografisch dokumentiert. (Polaroid-Kamera-System-DS-34, AGS Heidelberg).

Abbildung 4:

Spezifisches Bandenmuster



bp:

100-Basenpaarleiter
(Längenstandard)

Nr. 1-3:

Proben der PCR-Produkte

2.2.4 Aufreinigung von DNS Fragmenten durch Säulenchromatographie

Materialien: QIAquick® Gel Extraction Kit, Qiagen Hilden

Die aus dem Agarosegel isolierten, spezifischen PCR Produkte wurden mittels QIAquick® Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt.

2.2.5 Sequenzier-Polymerasekettenreaktion (Cycle-Sequencing)

Material: Big Dye ® Terminator. Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem Weiterstadt

Die Sequenzierung wurde mit der „Dye-Terminator“-Methode durchgeführt.

Dabei wird in einer „Cycle“-Sequenzierreaktion mit Hilfe des „Dye-Terminator“-Sequenzierkits fluoreszierende Nukleotide in das aufgereinigte DNS-Fragment eingebaut und anschließend vom Sequenziergerät gemessen.

Das Big Dye Terminator Kit ® enthält verschiedene Nukleotide, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehen sind. Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden 1 µl der isolierten DNS-Fragmente mit 10 pmol Primer und 8 µl Premix versetzt. Die Sequenzierung erfolgte in einem Trio-Thermalblock der Firma Biometra Göttingen:

25 Zyklus bei	96°C für 40 sec (Denaturierung)
45 Zyklen bei	96°C für 15 sec (Hybridisierung)
	53°C für 5 sec (Elongation)
	60°C für 4 min (abschließende Synthese)

2.2.6 Elektrophoretische Datenanalyse am ABI 310

Materialien: DyeEx Spin Columns, Qiagen, Hilden

High dye Formamid™, Applied Biosystems, Weiterstadt

POP-6™, Applied Biosystems, Weiterstadt

Die Proben wurden mittels DyeEx Spin Columns nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Anschließend wurden 5 µl des Eluats mit 15 µl High-dye Formamid versetzt.

Die DNS- Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode mittels Didesoxynukleotiden . Die Abbruchprodukte wurden 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 erfolgte unter Verwendung des Programms Genescan Multianalyst, Version 3.1.2 (Applied Biosystems).

2.2.7 Enzymatische Bestimmung der VLCAD-Enzymaktivität

2.2.7.1 Isolierung der Lymphozyten

Material: Leucosep (Greiner bio-1), Frickenhausen

Die Lymphozytenisolierung aus EDTA-Blut erfolgte mittels Leucosep (Greiner bio-1, Frickenhausen) nach Angaben des Herstellers.

Nach Zugabe von Ficoll Paque Plus Solution erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 2000 rpm. Die Lymphozytenschicht wurde abpipettiert und mit 10 ml Ammonium-Chlorid-Puffer versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Lymphozyten bei 2000 rpm erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Das Lymphozyten-Pellet wurde in 10 ml 0,9 %igem Natriumchlorid gelöst und bei 2000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Es erfolgte eine Lösung des verbleibenden Pellets in

1 ml 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung und eine abschließende Zentrifugation bei höchster Umdrehung (13000 rpm) für 10 Minuten. Das resultierende Pellet wurde zu Messungen der VLCAD-Enzymaktivität weiterverwendet.

2.2.7.2 Messung der VLCAD-Enzymaktivität

Die Messungen der Enzymaktivität in Lymphozyten erfolgte durch Frau Dr. Diplom-Biologin Michaela Liebig.

Dabei wurden die isolierten Lymphozyten zunächst in einer Pufferlösung bei einer Proteinkonzentration von 2 – 3 mg/ml gelöst. Die Enzymreaktion startete mit der Zugabe des spezifischen Substrats Palmitoyl-CoA (C16CoA). Die Palmitoyl-CoA Oxidation wurde nach 5 Minuten durch Zugabe von HCl gestoppt. Nach anschließender Neutralisierung konnte das Ausmaß des Umsatzes von C16CoA nach C16:1 CoA und C16:OH CoA gemessen werden. Die Messung erfolgte mittels High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC) (Liebig et al. 2006).

2.3 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 *Elektrophoresen* wurden von den Firmen OWI-Seperations System Biorad (München) und Gibcom BRL GmbH (Eggenstein) verwendet.

Photometrische Messungen wurden mit dem Beckmann Coulter DU 640B Spectrophotometer, sowie Hellma-Präzisionsküvetten, Quarzglas Suprasil durchgeführt.

Zur *Zentrifugation* standen Geräte der Firma Eppendorf (Hamburg) und Beckmann (Klosterneuburg) zur Verfügung.

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

3 Ergebnisse

Patienten

In unserer Studie untersuchten wir 16 Kinder, bei denen aufgrund biochemischer Parameter (Neugeborenen-Screening) oder klinischer Symptome der Verdacht auf einen VLCAD-Mangel bestand. Alle 16 Kinder wurden molekulargenetisch charakterisiert, bei 12 / 16 Kindern wurde die Diagnose zusätzlich enzymatisch bestätigt.

Im Folgenden wurden die Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt:

Asymptomatische Neugeborene mit erhöhten C14:1 Carnitin Werten im Screening (n = 10) + 2 Geschwisterkinder, die im Familien-Screening auffällig wurden

Klinisch symptomatische Patienten (n = 4)

3.1 Patienten, die im Neugeborenen-Screening entdeckt wurden

Bei 10 Kindern fanden sich erhöhte C14:1 Carnitin Werte im Neugeborenen-Screening. Alle Kinder waren in den ersten Lebenstagen klinisch unauffällig. Zwei Kinder dieser Gruppe wurden durch das Familien-Screening (Patient 8, 11) identifiziert.

3.1.1 C14:1 Carnitin bei Geburt

Bei drei Neugeborenen (Patienten 1, 3, 9) lag das C14:1 zum Zeitpunkt der Geburt unter 1 $\mu\text{mol/l}$, jedoch oberhalb des durchschnittlichen Cut-off Wertes von 0,25 $\mu\text{mol/l}$. Bei allen anderen war das C14:1 deutlich über 1 $\mu\text{mol/l}$.

Bei 9 / 10 Kindern zeigte das Zweitscreening nach wenigen Tagen ebenfalls erhöhte Werte. Bei einem Patienten war die Kontrolluntersuchung am 5. Lebenstag unauffällig (Abbildung 5, Patient 9).

3.1.2 C14:1 Carnitin und freies Carnitin unter Präventionsmaßnahmen

Nach Diagnosestellung erhielten Patienten 1 - 7, 10 und 12 eine fettreduzierte und fettmodifizierte Diät. Die Nahrung bestand im ersten Lebenshalbjahr zu 50 % aus Muttermilch und zu 50 % aus MCT-haltiger Säuglingsnahrung (Monogen, Firma SHS). Patient 9 wurde von Geburt an ausschließlich mit Muttermilch gefüttert. Die im Familien-Screening aufgefallenen Patienten 8 und 11 erhielten, auch nach der Diagnosestellung normale Nahrung.

Bei allen drei Patienten mit C14:1 Carnitin Werten $< 1 \mu\text{mol/l}$ normalisierten sich diese Werte im Verlauf intermittierend. Erhöhte Werte zeigten sich vor allem im Rahmen von Infekten, ohne dass sich klinische Symptome entwickelten.

4 / 7 Patienten mit initialen Acylcarnitinen $> 1 \mu\text{mol/l}$ zeigten ebenfalls im Verlauf intermittierend normalisierte Werte.

Bei drei Patienten (Patient 4, 5 und 10) wurden im Verlauf konstant erhöhte Werte von $0,3 \mu\text{mol/l}$ bis zu $13,4 \mu\text{mol/l}$ gemessen.

1 / 12 Kindern wurde in dieser Gruppe symptomatisch. Patient 4 präsentierte sich im Rahmen eines Infektes mit einer Hypoglykämie. Die Konzentration von C14:1 Carnitin im Blut war zu jeder Zeit stark erhöht, bis auf das 13-fache der Norm. Zusätzlich lag temporär ein erniedrigtes freies Carnitin ($< 5 \mu\text{mol/l}$) vor. Der Patient erhielt seit Diagnosestellung eine strenge fettreduzierte und fettmodifizierte Diät.

Abbildung 5:

C14:1 Carnitin im Screening und Verlauf

Patient	C14:1 [$\mu\text{mol/l}$] screening (norm)	C14:1 [$\mu\text{mol/l}$] Alter:1-52Wochen (n=norm)	N ^c	Aktuelles Alter	Palmitoyl-CoA oxidation nmol/mg/min
1	0,3 (< 0,21)	n-2,2 (< 0,21)	10	14 M	0,9
2	1,7 (< 0,25)	n-0,61 (< 0,25)	7	2 J	< 0,6
3	0,58 (< 0,21)	n.v.	n.v.	4 J	< 0,6
4	2,3	0,32 - 13,4 (< 0,25)	14	2 J	< 0,6
5	2,3 (< 0,3)	0,3-2,4 (< 0,3)	7	4 M	< 0,6
6	2,9 (< 0,54)	n.v.	n.v.	5 M	< 0,6
7 ^a	2,1 (< 0,44)	n.v.	n.v.	3,5 J	0,3
8 ^{a d}	n.v.	n.v.	n.v.	6,5 J	0,4
9	0,7 (< 0,25)	n-1,2 (< 0,25)	5	4 M	<0,6
10 ^b	4,1 (< 0,54)	n.v.	n.v.	2,5 J	n.v.
11 ^{b d}	n.v.	2,6 (< 0,54)	n.v.	9 J	n.v.
12	1,0 (< 0,54)	n-1,7 (< 0,34)	4	3,5 J	n.v.

^a Geschwister

^b Geschwister

^c Anzahl der gemessenen Werte

^d im Familien-Screening identifiziert

n.v. = nicht verfügbar

3.1.3 Mutationen bei Screening-Patienten

Bei den 10 im Neugeborenen-Screening und den 2 im Familien-Screening identifizierten Kindern fanden sich Mutationen auf 23 / 24 Allelen. Lediglich bei einem Patienten konnte nur auf einem Allel eine Mutation nachgewiesen werden. Bei 7 / 12 Patienten wurden die Mutationen bei beiden Elternteilen heterozygot nachgewiesen.

Es zeigte sich ein breites Spektrum an Mutationen. Überwiegend handelte es sich um Missense-Mutationen (20 / 23). 10 / 12 Kinder waren compound heterozygote Träger, 2 / 12 trugen die Mutation homozygot auf beiden Allelen.

Patient 4 war das einzige Kind dieser Gruppe mit klinischen Symptomen. Es trug die T220M Mutation homozygot. Diese Mutation ist bei Patienten in der Literatur mit leichten und schweren klinischen Verläufen assoziiert (Andresen et al. 1996, 1999).

Der Austausch von Alanin in Prolin bei den Geschwistern 7 und 8 ist als schwer zu bezeichnen, da Prolin zum Abbruch der Helix führt.

Die A306 Frameshift-Mutation bei Patienten 10 und 11 resultierte in der Insertion eines Stop Codons und ist damit eine Nullmutation.

Patient 12 war Träger der R573W Mutation. Diese Mutation ist in der Literatur als Nullmutation vorbeschrieben (Souri et al., Strauss et al.). Sie liegt in der Dimerizations-Domäne des Proteins und beeinflusst die Proteinstruktur (Spiekerkoetter et al. 2003).

Abbildung 6:

Mutationen bei Patienten, die im Neugeborenen-Screening identifiziert wurden

Patienten, im NG Screening entdeckt	<u>Allel 1</u> Amino-Säuren- Austausch	Mutation	<u>Allel 2</u> Amino Säuren- Austausch	Mutation
1	Q119R *	476A>G		
2	V243A *	848T>C	Y351C	1172A>G
3	V243A *	848T>C	V243A *	848T>C
4	T220M *	779C>T	T220M *	779C>T
5	G153R	577G>C	I373R	4084T>C
6	A121T	481G>A	V243A *	848T>C
7 ^a	Y161C	602A>G	A450P *	1468G>C
8 ^a	Y161C	602A>G	A450P *	1468G>C
9	G36Q	227G>A	L165P	614T>C
10 ^b	A306frameshift	1035insC	G605N	1934G>A
11 ^b	A306frameshift	1035insC	G605N	1934G>A
12	R527S	1700G>A	R573W *	1837C>T

* Mutationen, die aus der Literatur bekannt sind, sind fettgedruckt

^a Geschwister

^b Geschwister

3.1.4 Korrelation der Mutationen mit den C14:1 Werten

Drei von zehn Patienten, die im Screening auffällig wurden, hatten initial Acylcarnitinwerte $<1 \mu\text{mol/l}$.

Bei Patient 1 konnten wir nur eine Mutation, die Q119R Missense-Mutation finden, die schon bei einem klinisch diagnostizierten Kind gefunden wurde (Andresen et al. 1999).

Bei dem zweiten Kind mit C14:1 Carnitin Werten im Screening $< 1 \mu\text{mol/l}$ fanden wir homozygot die V243A Mutation. Diese Mutation ist ebenfalls schon aus der Literatur bekannt. Sie gilt als milde Mutation, die mit Hypoglykämien und Muskelschwäche einhergehen kann (Andresen et al. 1996, Mathur et al. 1999).

Der dritte Patient zeigte sich als heterozygoter Träger zweier Missense-Mutationen. Beide Mutationen sind in der Literatur nicht bekannt. Dieses Kind zeigte im Zweitscreening normalisierte C14:1 Carnitin- Werte.

Zusammenfassend sind alle drei Kinder mit Acylcarnitinen $< 1 \mu\text{mol/l}$ ausschließlich Träger von Missense-Mutationen. Sie sind bis zum jetzigen Zeitpunkt klinisch asymptomatisch.

Sieben von zehn Kindern fielen im Screening mit einem C14:1 Carnitin $> 1 \mu\text{mol/l}$ auf.

Bei 5 / 7 Patienten konnten wir auf beiden Allelen Missense-Mutationen finden. Zwei Patienten trugen heterozygot die V243A Missense-Mutation. Wie oben erwähnt, fanden wir diese Mutation bei einem Patienten mit C14:1 Carnitin $< 1 \mu\text{mol/l}$.

Bei einem Patienten konnten wir auf beiden Allelen die T220M Mutation finden. Diese ist in der Literatur mit milden und schweren klinischen Verläufen assoziiert (Andresen et al. 1996, 1999). Der Patient zeigte bei allen Messungen erhöhte Werte. Im Gegensatz zu allen anderen Kindern aus der Screening-Gruppe blieb das Kind nicht asymptomatisch.

Bei zwei von sieben Kindern fanden wir neben einer Missense-Mutation eine schwerwiegende Nullmutation (Patient 10,12). Patient 10 fiel im Screening mit einem deutlich erhöhten C14:1 Carnitin Wert auf.

3.2 Klinisch diagnostizierte Patienten

Vier Patienten wurden in die Studie aufgenommen, nachdem bei ihnen aufgrund klinischer Symptome der Verdacht auf einen VLCAD-Mangel gestellt wurde. Bei allen Patienten wurde die Diagnose gleichzeitig enzymatisch gesichert. Sie präsentierten sich in den ersten Lebensmonaten mit den unten aufgeführten Kardinalsymptomen (Abbildung 4). Bei 3 / 4 Kindern wurde der VLCAD-Mangel vor der „Screening-Ära“ diagnostiziert.

Patient 15 wurde auffällig, nachdem er in der 80. Lebensstunde in ein hypoglykämisches Koma fiel und reanimiert werden mußte.

Das Ergebnis des Screenings war zu diesem Zeitpunkt noch nicht verfügbar.

Bei den Patienten 13 und 16 war die Kardiomyopathie als Leitsymptom nach Beginn einer fettreduzierten und fettmodifizierten Diät und der Vermeidung von Fastenperioden vollständig reversibel (Spiekerkoetter et al. 2003).

Abbildung 7:

Patienten mit klinischen Symptomen

Patienten	Klinische Manifestation	Kardinalsymptom	Gegenwärtige Symptomatik	Aktuelles Alter	Palmitoyl-CoA oxidation nmol/mg/min
13	3 Monate	Hypertrophe Kardiomyopathie	Myopathie	5,5	0,3
14	3 Monate	Kardiomyopathie, ALTE	Myopathie	5	n.v.
15	3 Tage	Hypoglykämie	n.v.	2,5	n.v.
16	4 Monate	Hypertrophe Kardiomyopathie	Myopathie	7,5	0,3

n.v. =Daten nicht verfügbar

ALTE: Apparent Life Threatening Event

3.2.1 Acylcarnitine bei Diagnosestellung und im Verlauf

Acylcarnitin- Messungen waren von Patienten 13, 14 und 16 vorhanden. Im Alter von 4,5 und 5 Jahren wurden bei Patient 14 C14:1 Konzentrationen >1 µmol/l gemessen, die somit weit über der Norm lagen. Patient 13 präsentierte sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit C14-C18-Carnitin Werten bis zu 20 µmol/l, bei Patient 16 wurden Werte bis zu 30 µmol/l gemessen. Das freie Carnitin war jeweils erniedrigt. Bei den letztgenannten Patienten wurden mit Beginn der Therapie und dem Rückgang der Symptomatik C14-C18-Carnitine im Bereich von 3 - 5 µmol/l gemessen. Genaue Angaben über die C14:1 Konzentrationen lagen nicht vor.

Intermittierend kam es erneut zu einem starken Anstieg (20 - 30 µmol/l) der langkettigen Acylcarnitine. Bei beiden Patienten wurde unter der Therapie ein erniedrigtes freies Carnitin gemessen.

3.2.2 Mutationen bei klinisch diagnostizierten Patienten

Wir fanden Mutationen auf 8 / 8 Allelen. 3 / 4 Patienten waren homozygote Träger, Patient 15 war compound heterozygot für die bekannte T220M Mutation und Träger einer Nullmutation auf dem anderen Allel. Von den insgesamt fünf verschiedenen Mutationen sind drei schon in der Literatur als schwere Mutationen bei klinisch diagnostizierten Kindern vorbeschrieben (mit * markiert). Bei den verbleibenden zwei neuen Mutationen handelt es sich jeweils um Insertionen eines Stop-Codons.

Abbildung 8:

Mutationen bei klinisch diagnostizierten Kindern

Klinisch identifizierte Patienten	Allel 1 Amino-Säuren-Austausch	Mutation	Allel 2 Amino-Säuren-Austausch	Mutation
13	Y201ter	602Ains	Y201ter	602Ains
14	<i>R416H</i> *	1367G>A	<i>R416H</i> *	1367G>A
15	W93ter	398G>A	<i>T220M</i> *	779C>T
16	<i>S70P</i> *	T327-28 GT>CC	<i>S70P</i> *	T327-28 GT>CC

3.3 Vergleich der im Screening identifizierten Kinder mit den klinisch auffällig gewordenen Patienten

Im Vergleich der beiden Patientengruppen findet man in beiden Gruppen Mutationen, die in der Literatur mit schweren Verlaufsformen einhergehen. Die Screening-Patienten tragen neben einer schweren Mutation allerdings auf dem anderen Allel überwiegend eine mildere Missense-Mutation (z.B. Patienten 7, 8, 10, 11 und 12). Die Patienten, die aufgrund ihrer klinischen Symptome diagnostiziert worden, sind in drei von vier Fällen homozygote Träger von vermeintlich schwerwiegenden Mutationen (Patient 13, 14, 16). Patient 15 ist compound heterozygot für die T220M Mutation und die W93ter Mutation. Beide Mutationen sind mit schweren Manifestationen assoziiert. Patient 4 (aus der Screening-Gruppe), der ebenfalls trotz Präventivmaßnahmen klinische Symptome entwickelte, ist homozygoter Träger dieser Mutation. Beide Patienten mit der T220M Mutation präsentierten sich mit einer Hypoglykämie.

Vergleicht man die Restenzymaktivität des VLCAD-Proteins in beiden Gruppen, so lassen sich keine nennenswerten Unterschiede feststellen. Patient 1, bei dem wir nur auf einem Allel eine Mutation finden konnten, zeigte die höchste gemessene Restaktivität des VLCAD-Enzyms mit 0.9 nmol/mg/min. Bei dieser Residualaktivität ist allerdings dennoch von einem VLCAD-Mangel und nicht von einem Heterozygotenstatus auszugehen.

Bei Messungen der Acylcarnitine im Verlauf hatten die Kinder, die aufgrund klinischer Symptome auffällig wurden, vor Diagnosestellung extrem erhöhte Werte für die langkettigen Acylcarnitine. In den Kontrollmessungen nach Beginn der Therapie, blieben die Werte weiterhin mäßig erhöht (Beurteilung ist eingeschränkt, da Daten nicht vollständig verfügbar sind). In der anderen Gruppe normalisierten sich die Werte intermittierend. Nur bei den Patienten 4, 5 und 11 wurden bei jeder Kontrolle Werte oberhalb der Norm gemessen. Alle drei Patienten waren im Screening mit Werten > 1 aufgefallen.

Das freie Carnitin war bei den Patienten, die im Screening auffielen, in einem von zehn Fällen erniedrigt (Patient 4). Dieses Kind zeigte als einziges klinische Symptome.

In der Gruppe der klinisch auffällig gewordenen Kinder konnte bei 3 Patienten (Daten nicht komplett verfügbar) ein erniedrigtes freies Carnitin zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Seit Einführung des erweiterten Neugeborenen-Screening ist die Prävalenz des VLCAD-Mangels gestiegen (Spiekerkoetter et al. 2003). Der Defekt wird am 2. – 3. Lebensstag anhand des krankheitsspezifisch erhöhten C14:1 Carnitins mittels MS/MS identifiziert. Bei der Diagnosestellung durch das Neugeborenen-Screening ist der überwiegende Teil der Patienten asymptomatisch. Mortalität und Morbidität der Krankheit konnten deutlich gesenkt werden. Jedoch ist unklar, ob die frühzeitige Diagnose der Krankheitsmanifestation auch langfristig vorbeugen kann.

Die weitere Verlaufsbeobachtung der im Screening entdeckten asymptomatischen Kinder in unserer Studie zeigt, dass diese in der überwiegenden Zahl der Fälle unter prophylaktischen Maßnahmen über einen Zeitraum von bis zu 5 Jahren klinisch unauffällig verblieben. Auch ältere betroffene Geschwisterkinder sind bisher bis zu einem Alter von 9 Jahren asymptomatisch. Da es vor der „Screening Ära“ verschiedene Verlaufsformen unterschiedlicher Schweregrade gab (Vianey-Saban et al. 1998, Andresen et al. 1999), sind Parameter, die es ermöglichen, frühzeitig Aussagen über die Verlaufsform und Prognose zu machen, von großem Interesse.

Der Genotyp und/oder das Ausmaß der Erhöhung pathologischer Acylcarnitine (insbesondere C14:1-Carnitin) zum Zeitpunkt des Screenings beziehungsweise im weiteren Verlauf können solche Parameter sein. Wir untersuchten, ob eine Korrelation zwischen Genotyp, der Höhe der C14:1 Carnitin Konzentration, einem sekundär erniedrigten freien Carnitin und der klinischen Verlaufsform besteht.

In unserer Studie fielen im Neugeborenen-Screening 3 / 10 Kindern mit erhöhtem C14:1 Carnitin Werten $< 1 \mu\text{mol/l}$ auf (Liebig et al. 2006). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind alle asymptomatisch. Bei 7 / 10 wurden initial C14:1 Werte $> 1 \mu\text{mol/l}$ gemessen. 1 / 7 Kindern wurde mit klinischen Symptomen auffällig (Patient 4). Im Verlauf normalisierte sich bei 6 / 10 Kindern das C14:1 unter therapeutischen Maßnahmen intermittierend. Keiner von ihnen zeigt bisher Symptome. Drei Kinder präsentierten sich auch unter Therapie konstant mit erhöhten Werten (von einem Kind sind keine Daten im Verlauf verfügbar). Eines dieser Kinder wurde symptomatisch. Auffällig war, dass dieser Patient als einziger der Gruppe intermittierend ein erniedrigtes freies Carnitin aufwies. Während Fastenperioden oder im Rahmen von Infekten werden verstärkt langkettige Fettsäuren aus dem Fettgewebe freigesetzt. Die langkettigen Acyl-CoA Verbindungen akkumulieren in den Mitochondrien, wo sie aufgrund des VLCAD-Mangels nicht weiter abgebaut werden können. Um die Mitochondrien zu verlassen erfolgt eine Umwandlung in Acyl-Carnitin-Ester. Diese werden mit dem Urin ausgeschieden. Als Folge dessen

ist das freie Carnitin erniedrigt nachweisbar. Es liegt ein sogenannter sekundärer „Carnitin-Mangel“ vor (Spiekerkoetter et al. 2005, van Vlies et al. 2005).

Insgesamt lassen die Ergebnisse keine Korrelation zwischen der Höhe des C14:1 Carnitins im Blut bei der Diagnose und dem Schweregrad der Erkrankung zu. Einzig ein erniedrigtes freies Carnitin bei der Diagnosestellung oder im weiteren Verlauf deutet auf eine schwerere Verlaufsform hin. Diese Beobachtung bedarf jedoch weiterer Validierung mit größeren Patientenzahlen. Intermittierende Normalisierung der langkettigen Acylcarnitine im Blut kann auf einen milden Verlauf hindeuten.

Hinsichtlich des Genotyps liegen bei im Screening identifizierten Kindern überwiegend Missense-Mutationen vor. Bei Missense-Mutationen im *VLCAD*-Gen besteht in der Regel eine gewisse Residualaktivität des VLCAD-Enzyms. Auch in der Literatur sind derartige Mutationen mit eher milden Phänotypen assoziiert (Andresen et al. 1999, Spiekerkoetter et al. 2003), wobei die Lage der Mutation im Protein auch eine wichtige Bedeutung hinsichtlich der Stabilität des Proteins hat.

In unserer Studie konnten wir in der Gruppe der im Screening identifizierte Kinder auf 19 / 20 Allelen Mutationen nachweisen und auf 15 / 19 mildere Missense-Mutationen (insgesamt 8 unterschiedliche). Vier dieser eher milden Missense-Mutationen sind bereits in der Literatur bei klinisch auffälligen Patienten beschrieben worden.

Bei den übrigen 4 / 19 Mutationen handelt es sich um die A450P Mutation, die zum Helixabbruch führt. Sie ist in der Literatur mit einem hepatischen Phänotyp assoziiert (Mathur et al. 1999). Beide Kinder unserer Studie tragen auf dem zweiten Allel eine milde Missense-Mutation, die phänotypbestimmend ist.

Die A306 Frameshift-Mutation ist in der Literatur nicht bekannt. Durch Insertion einer Base kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters. In unserer Studie fanden wir diese Mutation bei einem bis heute asymptomatischen Geschwisterpaar. Das im Familien-Screening identifizierte jetzt 9-jährige Geschwisterkind erhält bis heute keine fettreduzierte Diät. Die G605N Mutation auf dem anderen Allel bestimmt als milde Missense Mutation den bisherigen klinischen Verlauf.

Die T220M Mutation ist in der Literatur mit milden (Myopathie) und schweren Verläufen (hypertrophe Kardiomyopathie, Hypoglykämie) assoziiert. Die Mutation konnte bisher homozygot sowie auch heterozygot nachgewiesen werden (Bertrand et al. 1993, Largilliere et al. 1995, Mathur et al. 1999). Aufgrund ihrer Lage im Protein beeinträchtigt die Mutation die Proteinstruktur vermutlich sehr stark. Der Austausch einer einzelnen Aminosäure in der Dimerisationsdomäne wirkt sich deutlich auf die Stabilität des Proteins aus (Andresen, Bross et al. 1996, Spiekerkoetter et al. 2003). In unserer Studie ist Patient 4 der Screening-Gruppe homozygoter Träger dieser Mutation. Es ist das einzige im Screening identifizierte

Kind, welches trotz therapeutischer Maßnahmen, Symptome in Form von Hypoglykämien entwickelte. Daneben fanden wir diese Mutation bei Patient 15, der vor der „Screening Ära“ durch klinische Symptome (schwere Hypoglykämien, Reye-ähnliches Syndrom) diagnostiziert wurde. Im Vergleich unserer Ergebnisse mit der Literatur ist die T220M damit insgesamt als schwerwiegende Mutation einzustufen, bei der davon auszugehen ist, dass sich im Verlauf klinische Symptome entwickeln.

Die R573W Mutation wurde bereits als schwer vorbeschrieben (Strauss et al. 1995, Souri et al. 1996, Mathur et al. 1999). Die Einführung einer aromatischen Aminosäure (Arginin wird hier durch Tryptophan ersetzt) hat vermutlich einen signifikanten Einfluss auf die Proteinstruktur und Proteinstabilität (Strauss et al., Mathur et al. 1999).

Symptome bei Vorliegen dieser Mutation umfassen hypoketotische Hypoglykämie, hypertrophe Kardiomyopathie und das „sudden infant death syndrome (SIDS)“ (Strauss et al. 1995).

Der Patient mit der R573W Mutation auf einem Allel ist bis zum jetzigen Zeitpunkt unter prophylaktischen Maßnahmen asymptomatisch. Die auf dem zweiten Allel befindliche leichtere Missense-Mutation ist hier voraussichtlich phänotypbestimmend.

Die am häufigsten vorkommende Mutation (4 / 19 Allelen) in der Gruppe der im Screening identifizierten Kinder ist die vorbeschriebene V243A Mutation. V243A ist in der Literatur als Mutation beschrieben, die in milden klinischen Phänotypen resultiert. (Mathur et al. 1999, Andresen et al. 1996, 1999). Symptome umfassen Hypoglykämien in den ersten Lebensstagen (Andresen et al. 1996), oder late-onset Myopathien (Andresen et al. 1999). Obwohl die klinischen Symptome milde sind, zeigen Studien an COS-7 Zellen einen signifikant reduzierten VLCAD-Proteingehalt (Andresen et al. 1996). In unserer Studie sind bis zum heutigen Zeitpunkt alle Kinder (1 / 3 Kindern ist homozygoter Träger) mit der V243A Mutation unter prophylaktischen Maßnahmen asymptomatisch verblieben. Boneh et al. beschrieb 2005 einen V243A homozygoten Patienten, der sich im Alter von 48 Stunden mit Symptomen in Form von Hypoglykämien und abnormalen Bewegungen präsentierte. Nach altersentsprechender Entwicklung traten mit 6 Jahren erneut Symptome in Form von Rhabdomyolysen auf.

Prophylaktische Maßnahmen scheinen indiziert zu sein, da diese Patienten doch unzweifelhaft ein Risiko für eine spätere klinische Manifestation oder metabolische Krisen im Rahmen von Infekten oder Fastenperioden tragen. Auf der anderen Seite entwickeln diese Patienten unter konsequent durchgeführter Therapie möglicherweise niemals Symptome.

Der Vergleich der Genotypen von Screening-Patienten und klinisch diagnostizierten Patienten ergab deutliche Unterschiede hinsichtlich der Pathogenität der Mutationen. In der Gruppe der klinisch diagnostizierten Patienten handelt es sich bei 5 / 8 Mutationen um Nullmutationen.

3 / 4 der klinisch diagnostizierten Kinder sind homozygote Träger. Die R416H Mutation ist in der Literatur bisher heterozygot beschrieben. Sie wurde bisher als Missense-Mutation klassifiziert und mit einem milden Krankheitsbild assoziiert (Andresen et al. 1999). Unser Patient wurde identifiziert, nachdem er in den ersten Lebensstunden in ein hypoglykämisches Koma fiel und reanimationspflichtig wurde. Es ist daher anzunehmen, dass die R416H Mutation bei homozygoten Trägern zu einer Manifestation von schwerwiegenden Symptomen führen kann.

Die in dieser Arbeit durchgeführte biochemische und molekulargenetische Charakterisierung zur Erarbeitung möglicher Prognosefaktoren für asymptotische Neugeborene mit einem VLCAD-Mangel lässt derzeit nur bei der T220M Mutation und V243A Mutation eine Prognose über den weiteren Verlauf zu. Die T220M Mutation führte als einzige Mutation in unserer Studie zu konstant erhöhten Acylcarnitinen, einem intermittierend erniedrigten freien Carnitin und klinischen Symptomen. Trotz prophylaktischen Maßnahmen ist daher die Entwicklung klinischer Symptome bei homozygotem Vorliegen dieser Mutation wahrscheinlich.

Frühzeitiger, konsequenter Therapiebeginn ist für Patienten mit der T220M Mutation von großer Wichtigkeit, um schwere Manifestationen zu vermeiden. Im Gegensatz dazu können Symptome bei Patienten mit der V243A Mutation vermutlich mit frühzeitigem konsequentem Therapiebeginn komplett vermieden werden.

Zusammenfassend lässt sich bei allen initial asymptotischen Patienten eine klinische Manifestation zu einem späteren Zeitpunkt nicht ausschließen. Der Anstieg der Prävalenz in den letzten Jahren lässt jedoch vermuten, dass viele Kinder asymptotisch verbleiben und ohne Neugeborenen-Screening nicht identifiziert werden. Auch die Ergebnisse des Familien-Screenings unserer Studie unterstützen diese Vermutung. Zwei Kinder wurden im Alter von 3 und 7 Jahren im

Familien-Screening identifiziert und sind ohne diätetische Maßnahmen bis heute asymptotisch. Eine wichtige Beobachtung ist, dass Infekte oder andere katabole Stoffwechsellagen Manifestationsauslöser sind und unbedingt adäquat behandelt werden müssen.

Darüber hinaus ist es von großer Wichtigkeit, auch in Zukunft Neugeborene mit erhöhten Aylcarnitinen im Screening molekulargenetisch und enzymatisch zu charakterisieren, um eine sichere Diagnose stellen zu können. Bei der Analyse der Acylcarnitine handelt es sich zunächst lediglich um einen Verdacht auf einen

VLCAD-Mangel, der sich nicht immer bestätigt (Liebig et al. 2006). Vorzugsweise sollte die Diagnose bei Kindern mit einem auffälligen Acylcarnitinprofil enzymatisch gesichert werden. Bei der molekulargenetischen Untersuchung fanden wir bei einem Patienten nur eine Mutation, hinweisend auf einen Heterozygotenstatus. In der Enzymatik zeigte sich aber ganz deutlich eine stark verminderte Restaktivität. Aufgrund der molekularen Heterogenität können bei dem VLCAD-Mangel vermeintliche Patienten durch ausschließliche molekulare Diagnostik falsch klassifiziert werden.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist es nicht möglich, die Höhe des Risikos einer symptomatischen Erkrankung zu definieren. Es sollte hervorgehoben werden, dass auch Neugeborene mit vermeintlich milden Mutationen klinische Symptome entwickeln können. Durch die Identifizierung dieser Kinder im Neugeborenen-Screening kann frühzeitig therapeutisch interveniert und eine mögliche Manifestation verhindert werden.

5 Literatur

Andresen, B. S., Bross, P., Vianey-Saban, C., Divry, P., Zobot, M. T., Roe C.R., Nada, M.A. et al. (1996): Cloning and characterization of human very long-chain acyl-CoA dehydrogenase cDNA, chromosomal assignment of the gene and identification in four patients of 9 different mutations within this gene. *Hum Mol Genet* 5: 461-472

Andresen B.S., Olpin S., Poorthuis B. J. et al. (1999): Clear correlation of genotype with disease phenotype in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Am J Hum Genet* 64: 479–494

Aoyama, T., Uchida, Y., Kelley, R.I., Marble, M., Hofman, K., Tonsgard, J. H., Rhead, W. J. et al. (1993): A novel disease with deficiency of mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 1369-1372

Bertrand, C., Largilliere, C., Zobot, M. T., Mathieu, M., Vianey-Saban, C. (1993): Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of newborn error of mitochondrial fatty acid oxidation in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1180: 327-329

Boneh, A., Andresen, B. S., Gregersen, N., Ibrahim, M., Tzanakos, N., Peters, H., Yapfite –Lee, J., Pitt, J. J. (2006): VLCAD deficiency: Pitfalls in newborn screening and confirmation of diagnosis by mutation analysis. *Mol Gen and Metab* 88:166-170

Izai, K., Uchida, Y., Orii, T., Yamamoto, S., Hashimoto, T. (1992): Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. Purification and properties of very long-chain acyl- coenzyme A dehydrogenase. *J Biol Chem* 267: 1027-1033

Liebig, M., Schymik, I., Mueller, M., Wendel, U., Mayatepek, E., Ruitter, J., Strauss, A. W., Spiekerkoetter, U. (2006): Neonatal screening for Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Enzymatic and molecular evaluation of neonates with elevated C14:1-carnitine levels. *Pediatrics* 118:1065-1069

- Mathur, A., Sims, H. F., Gopalakrishnan, D., Gibson, B., Rinaldo, P., Vockley, J., Strauss, A. W. (1999): Molecular heterogeneity in very long-chain acyl- CoA dehydrogenase deficiency causing pediatric cardiomyopathy and sudden death. *Circulation* 99:1337-1343
- Schymik, I., Liebig, M., Mueller, M., Wendel, U., Mayatepek, E., Strauss, A. W., Wanders, R., Spiekerkoetter, U. (2006): Pitfalls of neonatal screening for Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase deficiency using tandem mass spectrometry. *J Pediatr*. 149:128-30
- Souri, M., Aoyama, T., Orii, K., Yamaguchi, S., Hashimoto, T. (1996): Mutation analysis of very long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (VLCAD) deficiency: identification and characterization of mutant VLCAD cDNAs from four patients. *Am J Hum Genet* 158: 97-106
- Spiekerkoetter, U., Sun, B., Zytovic, T., Wanders, R., Strauss, A. W., Wendel, U. (2003): MS/MS-based newborn and family screening detects asymptomatic patients with very-long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Pediatr*. 143: 335-42
- Spiekerkoetter, U., Tenenbaum, T., Heusch, A., Wendel, U. (2003): Cardiomyopathy and pericardial effusion in infancy point to a fatty acid β -oxidation defect after exclusion of an underlying infection. *Pediatr Cardiol* 24: 295-297
- Spiekerkoetter, U., Tokunaga, C., Wendel, U. et al. (2003): Changes in blood carnitine and acylcarnitine profiles of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice subjected to stress. *Eur J Clin Invest*. 112: 1005–1015
- Strauss, A. W., Powell, C. K., Hale, D. E. et al. (1995): Molecular basis of human mitochondrial very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing cardiomyopathy and sudden death in childhood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 10496–10500

- Vianey-Saban, C., Divry, P., Brivet, M., Nada, M., Zobot, M. T., Mathieu, M., Roe, C. R. (2003): Mitochondrial very long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical characteristics and diagnostic consideration in 30 patients. *Clin Chim Acta* 1998, 269:43-62
- Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med*. 348: 2304–2312
- Yamaguchi, S., Indo, Y., Coates, P. M., Hashimoto, T., Tanaka, K. (1993): Identification of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in three patients previously diagnosed with long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res*. 34: 111-113
- Zytkovicz, T. H., Fitzgerald, E. F., Marsden, D. et al. (2001): Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic and fatty acid oxidation disorders in newborn dried blood spots: two-year summary from the New England screening program. *Clin Chem*. 47: 1945–1955

Danksagung

Mein ganz großer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. U. Spiekerkötter für die Überlassung des vorliegenden Themas und der stets freundlich motivierenden und inspirierenden Betreuung. Ihr entgegengebrachtes Vertrauen machte es mir möglich, wissenschaftliches Arbeiten kennen zu lernen.

Herrn Prof. Dr. med. Kühn-Velten danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Ganz besonders möchte ich mich bei Martina Müller für die freundschaftliche Aufnahme im Stoffwechsellabor und die intensive, kompetente und vor allem geduldige Unterstützung bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit in dieser Form sicher nie so zustande gekommen. Mein Dank gilt auch Elke Dieckmann für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Annette und Ralf danke ich ganz herzlich für ihre Unterstützung sowie für ihre konsequente Motivation.

Insbesondere danke ich meiner Familie, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mir stets den nötigen Rückhalt gegeben hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Ina Schymik geboren am 18. April 1979 in Ratingen
Familienstand	ledig
Schulausbildung	
August 1985 - Juli 1989	Grundschule, Albert-Schweitzer-Schule, Ratingen
August 1989 - Juni 1998 Juni 1998	Gymnasium, Geschwister-Scholl-Schule Ratingen Abitur
Universitäre Ausbildung	
April 2000 - März 2002	Vorklinisches Studium der Medizin, Universität Düsseldorf
März 2002	Physikum
April 2002 - November 2006	Klinisches Studium der Medizin, Universität Düsseldorf
März 2003	Erstes Staatsexamen
März 2005	Zweites Staatsexamen
Oktober 2005 – September 2006	Praktisches Jahr
	Chirurgie: Städtische Kliniken Düsseldorf, Krankenhaus Benrath
	Innere Medizin: Städtische Kliniken Düsseldorf, Krankenhaus Benrath
	Anästhesie: Städtische Kliniken Düsseldorf, Krankenhaus Benrath
November 2006	Drittes Staatsexamen
Berufliche Tätigkeit	
Seit Januar 2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Charité CVK, Berlin
Berlin, Juli 2008	

Der Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD)- Mangel in Deutschland (Kurzfassung/ Abstract)

vorgelegt von Ina Schymik

Der Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)-Mangel ist eine Störung der Fettsäureoxidation. VLCAD ist das Schlüsselenzym im Abbau C14 – C18 - kettiger Fettsäuren. Bei einem Mangel akkumulieren die langkettigen Acyl-CoA in den Mitochondrien und sind im Blut als Acylcarnitine nachweisbar.

Es existieren verschiedene Krankheitsformen unterschiedlicher Schweregrade. Die klinische Manifestation umfasst eine Kardiomyopathie, eine Hepatopathie und eine Skelettmypathie. Auch molekulargenetisch besteht eine ausgeprägte Heterogenität. Missense-Mutationen sind in der Regel mit leichteren klinischen Verlaufsformen, Nullmutationen mit schweren Verläufen assoziiert.

Die vorliegende Arbeit untersuchte zwei Gruppen von Patienten mit einem Mangel der VLCAD. Insgesamt wurden 16 Kinder molekulargenetisch charakterisiert. Die Patienten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Zum einen asymptotische Neugeborene, die anhand erhöhter C14:1 Acylcarnitine im Neugeborenen-Screening mit dem Verdacht auf einen VLCAD-Mangel entdeckt wurden, zum anderen Patienten, bei denen die Diagnose vor der „Screening-Ära“ aufgrund klinischer Manifestationen gestellt wurde.

Im Vergleich der beiden Patientengruppen fand man in beiden Gruppen Mutationen, die in der Literatur mit schweren Verlaufsformen einhergehen. Die Screening-Patienten trugen neben einer schweren Mutation allerdings auf dem anderen Allel überwiegend eine mildere Missense-Mutation, die phänotyp bestimmend scheint. Nur einer der zwölf Kinder entwickelte trotz präventiver Maßnahmen bisher klinische Symptome. Die Patienten, die aufgrund ihrer klinischen Symptome diagnostiziert worden, waren in drei von vier Fällen homozygote Träger von vermeintlich schwerwiegenden Mutationen (Nullmutationen). Ein frühzeitiger, konsequenter Therapiebeginn ist für diese Patienten von großer Wichtigkeit, um schwere Manifestationen zu vermeiden.

Bei allen initial asymptotischen Kindern mit vermeintlich milden Mutationen lässt sich eine klinische Manifestation zu einem späteren Zeitpunkt aber nicht ausschließen. Durch die Identifizierung dieser Kinder im Neugeborenen-Screening kann frühzeitig therapeutisch interveniert und eine mögliche Manifestation verhindert werden.

Gez. Univ.-Prof. Dr. med. Ute Spiekercötter