Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. E. Mayatepek

Störungen des Mitochondrialen Trifunktionellen Proteins

Genotyp-Phänotyp Analyse

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von:
Astrid Sperk

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit
Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf, Dekan
Referent: Prof. Dr. Ute Spiekerkötter
Korreferent: Prof. Dr. Ralf Kubitz

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 3

1.1 Einführung 3

1.2 Historische Perspektive 5

1.3 Fettsäurenoxidation 6

1.4 Multienzymkomplex 9

1.5 Genetischer Defekt 10

1.6 Klinische Phänotypen 12

1.7 Diagnose und Therapie 14

1.7.1 Diagnose 14

1.7.2 Therapie 15

1.8 Zielsetzung der Arbeit 17

2 Patienten, Material und Methoden 18

2.1 Patienten 18

2.2 Material 19

2.3 Methoden 20

2.3.1 Isolierung genomischer DNS 20

2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) 21

2.2.3 Agarosegelelektrophorese 25

2.2.4 Säulenchromatographie zur Aufreinigung der DNS-Fragmente 26

2.2.5 Sequenzier-Polymerasekettenreaktion (Cycle-Sequenzing) 27

2.2.6 Elektrophoretische Datenanalyse am ABI 310 28

2.2.7 Restriktionshydrolyse 29

2.2.8 Pränataldiagnostik 29

3 Ergebnisse 31

3.1 Molekulargenetik 31

3.2 Klinische Präsentation 34

3.3 Genotyp-Phänotyp Korrelation 36

4 Diskussion 38

5 Literaturverzeichnis 42

Danksagung 46

Lebenslauf 47

Zusammenfassung 48

1. Einleitung

1.1 Einführung

Der Mitochondriale Trifunktionelle Protein (MTP)-Mangel ist ein genetischer Defekt der ß-Oxidation langkettiger Fettsäuren. Fettsäurenoxidationsstörungen gehören zu den häufigsten angeborenen Stoffwechselerkrankungen mit einer Gesamtprävalenz von 1:10.000 Geburten (Schulze et al. 2003). Der MTP-Mangel ist eine vergleichsweise seltene Erkrankung mit einer Prävalenz von 1:150.000 bis 1:250.000 (Sander et al. 2005). Der Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel im Vergleich tritt mit einer Prävalenz von 1:20.000 auf. Es werden Abbaustörungen der kurz-, mittel- und langkettigen Fettsäuren unterschieden.

Das Mitochondriale Trifunktionelle Protein ist ein Enzymkomplex und besteht aus zwei Untereinheiten (α und ß). Der MTP-Komplex beherbergt drei Enzyme: die 2,3-Long-Chain-Enoyl-CoA Hydratase, die Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (LCHAD) und die Long-Chain 3-Keto-Acyl-CoA Thiolase (LKAT). Vom MTP-Mangel mit einem Verlust der Aktivität aller drei Enzyme des Komplexes wird der isolierte LCHAD-Mangel unterschieden. Diesem liegt die homozygote E474Q Mutation in der katalytischen LCHAD-Domäne der α-Untereinheit zugrunde. Mittlerweile wurden auch 2 Patienten mit einem isolierten LKAT-Mangel identifiziert (Das et al. 2006).
Oxidationsstörungen langkettiger Fettsäuren, wie der MTP-Mangel, manifestieren sich mit heterogenen Phänotypen unterschiedlicher Schweregrade. Klinische Manifestationsformen sind: ein Reye-ähnliches Syndrom mit Enzephalopathie und Hepatopathie, eine hypoketotische Hypoglykämie, Kardiomyopathie, Skelettmyopathie und periphere Neuropathie.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung einer möglichen Genotyp-Phänotyp Korrelation, um auf dieser Basis prognostische Aussagen über den zu erwartenden klinischen Verlauf zu machen.

1.2 Historische Perspektive

Der erste Patient mit einem Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase-Defekt (LCHADD) wurde 1989 von Wanders et al. beschrieben. Es handelte sich um ein Kind, welches mit 3 Jahren am plötzlichen Kindstod verstarb und eine Akkumulation der langkettigen 3-Hydroxy-Fettsäuren im Blut aufwies. Inzwischen sind über 100 Patienten mit diesem Enzymdefekt publiziert.

Im Jahre 1992 wurde der erste Patient mit einem Mangel aller drei MTP-Enzyme beschrieben (Wanders et al. 1992). Kamijo et al. identifizierten beide MTP-Gene (α- und ß-Untereinheit) 1994, welche beide auf dem Chromosom 2p23 lokalisiert sind (Kamijo et al. 1994, Yang et al. 1996). Ijlst et al. beschrieben 1994 die häufige 1528G>C Mutation der α-Untereinheit und konnten 1996 zeigen, dass diese genau in der katalytischen Domäne des LCHAD-Proteins liegt und damit zum isolierten Verlust der Aktivität der Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase führt (Ijlst et al. 1994/1996). Brackett et al. definierten 1995 weitere Mutationen in der α-Untereinheit des Trifunktionellen Proteins (Brackett et al. 1995), die in einem kompletten MTP-Mangel resultieren.

Ushikubo et al. fanden heraus, dass auch Mutationen in der ß-Untereinheit zum kompletten MTP-Mangel führen (Ushikubo et al. 1996). 2006 wurde der erste Patient mit einem isolierten LKAT-Defekt beschrieben (Das et al. 2006). Isolierte Mutationen in der α-Untereinheit, wie auch isolierte Mutationen in der ß-Untereinheit, beeinflussen die Stabilität des gesamten MTP-Komplexes (Spiekerkötter et al. 2003).

1.3 Fettsäurenoxidation

Neben den Kohlenhydraten und Eiweißen gehören Lipide zu den wichtigsten Nahrungsbestandteilen des Menschen, können aber auch selbst im Körper synthetisiert werden. Fette übernehmen vielfältige und unerlässliche Funktionen des Körpers. Sie stellen als Triacylglyceride den größten Energiespeicher des Organismus dar und können unter Energiegewinnung wieder abgebaut werden. Langkettige Fettsäuren sind integrale Bestandteile dieser Triacylglyceride die, bei Nahrungsmangel und nach Verbrauch der Glykogenreserven während längerer Fastenperioden, mittels Mitochondrialer Fettsäureoxidation abgebaut werden und so zur Deckung des Energiebedarfes beitragen. Fettsäuren entstehen durch Lipolyse aus Triacylglyceriden, die vor allem im Fettgewebe durch die Lipoproteinlipase katalysiert wird. Da Fettsäuren jedoch sehr reaktionsträge Verbindungen sind, müssen sie vor Eintritt in den Stoffwechsel aktiviert werden. Diese Aktivierung erfolgt im Zytosol der Zellen durch Bildung von Acyl-Coenzym-A (Acyl-CoA) unter ATP-Verbrauch.

Die Oxidation der Fettsäuren findet in der Matrix der Mitochondrien statt. Um dorthin zu gelangen, müssen die äußere und innere Mitochondrienmembran überwunden werden. Dies geschieht mit Hilfe des Carnitin-Transportsystems, welches aus drei Komponenten besteht: der Carnitin-Palmitoyl-Transferase I (CPT I), der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT) und der Carnitin-Palmitoyl-Transferase II (CPT II). Um die äußere Membran passieren zu können, werden die langkettigen aktivierten Acyl-CoA durch die CPT I zu Acylcarnitinen umgewandelt. Der Transport der Acylcarnitine über die innere Mitochondrienmembran wird durch CACT katalysiert. Die Rückveresterung zu Acyl-CoA findet auf der Innenseite der inneren Membran mit Hilfe der CPT II statt.

In der nun folgenden ß-Oxidation durchlaufen die aktivierten Fettsäuren mehrere Zyklen. Am Ende eines jeden Zyklus werden sie um zwei C-Atome verkürzt, bzw. ein Acetyl-CoA wird abgespalten. Acetyl-CoA wird in den Citratzyklus eingeschleust oder in Ketonkörper umgewandelt.

Langkettige Fettsäuren haben eine Kettenlänge von 12 bis 18 C-Atomen. Es existieren spezifische Enzyme für langkettige, mittel- und kurzkettige Fettsäuren.

Die mitochondriale ß-Oxidation umfasst vier enzymatische Schritte:

1. die erste Oxidation
2. die Hydratisierung
3. die zweite Oxidation und anschließend
4. die thiolytische Abspaltung eines Acetyl-CoA vom ß-C-Atom

Durch die Very-Long-Chain-Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD) wird Acyl-CoA zu Enoyl-CoA oxidiert. Diese Reaktion ist FAD abhängig. Enoyl-CoA wird durch die 2,3-Long-Chain-Enoyl-CoA Hydratase zu 3-Hydroxyacyl-CoA hydratisiert. Durch die Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase entsteht NAD abhängig 3-Ketoacyl-CoA. Dieses wird durch die Long-Chain 3-Keto-Acyl-CoA Thiolase in Acetyl-CoA und die um 2 C-Atome verkürzte Fettsäure umgewandelt (siehe Abb. 1).

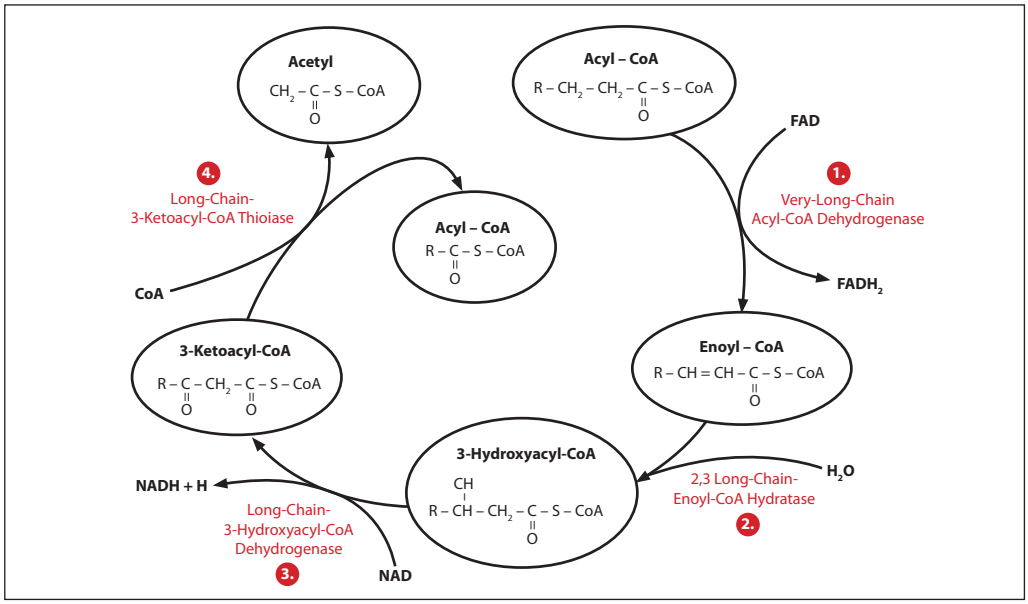

Abb. 1: Mitochondriale ß-Oxidation langkettiger Fettsäuren
Dargestellt ist ein Oxidationszyklus bestehend aus vier Enzymreaktionen. Die Enzyme, welche die letzten drei Schritte der ß-Oxidation der langkettigen Fettsäuren katalysieren, bilden einen Multienzymkomplex, das Mitochondriale Trifunktionelle Protein (MTP).

Die langkettigen Fettsäuren werden in katabolen Stoffwechsellagen zur Energieproduktion herangezogen. Bei Mangel eines der Enzyme der ß-Oxidation ist keine Energiegewinnung aus Fettsäuren möglich; langkettige Acyl-CoA akkumulie-

ren vor dem Enzymblock. Sie verlassen die Mitochondrien nach Bindung an Carnitin und sind im Blut als C12 bis C18 Acylcarnitine nachweisbar. Dieser Nachweis ist Grundlage der Acylcarnitin-Analyse mittels Tandem-Massenspektrometrie und wird zu diagnostischen Zwecken, z. B. auch im Neugeborenenscreening herangezogen.

1.4 Multienzymkomplex

Die Enzyme, welche die letzten drei Schritte der ß-Oxidation der langkettigen Fettsäuren katalysieren, bilden einen Multienzymkomplex. Dieser Komplex wird Mitochondriales Trifunktionelles Protein (im europäischen Sprachgebrauch als MTP, im Amerikanischen als TFP abgekürzt) genannt. Das Trifunktionelle Protein ist ein Oktamer und besteht aus vier α- und vier ß-Untereinheiten.

Die α-Untereinheit beherbergt die Long-Chain-Enoyl-CoA Hydratase am N-terminalen Ende und die Long-Chain-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (LCHAD) am COOH-Ende. Die ß-Untereinheit beherbergt die Long-Chain-3-Ketoacyl-CoA Thiolase (LKAT) (Ushikubo et al. 1996).

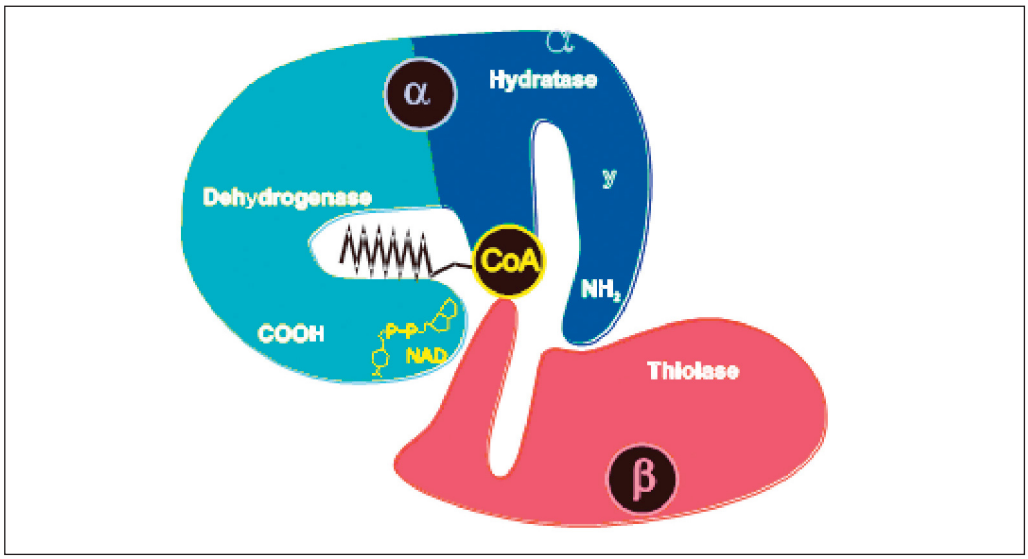

Abb. 2: Das Mitochondriale Trifunktionelle Protein

1.5 Genetischer Defekt

Die Gendefekte des Mitochondrialen Trifunktionellen Proteins folgen, wie die meisten Stoffwechselerkrankungen, einem autosomal rezessiven Erbgang. Die beiden Untereinheiten des Trifunktionellen Proteins werden von 2 getrennten Genen in der gleichen Region von Chromosom 2p23 kodiert (Yang et al. 1996). Mutationen in beiden Genen führen zu einer Aktivitätsminderung bzw. zum Aktivitätsverlust der MTP-Enzyme und damit zur Blockade des Abbaus der langkettigen Fettsäuren. Langkettige Fettsäuren, insbesondere deren Hydroxyverbindungen, akkumulieren im Körper als Hydroxyacylcarnitine bzw. Hydroxyacyl-CoA Ester. Die α-Untereinheit (HADHA) umfasst 20 Exons, die ß-Untereinheit (HADHB) 16 Exons. Mutationen können sowohl in den Exons, als auch in den angrenzenden Introns liegen. Es werden missense Mutationen und Null-Mutationen beschrieben.

Es sind drei unterschiedliche Krankheiten des MTP-Komplexes bekannt: der isolierte LCHAD-Mangel, der isolierte LKAT-Mangel und der komplette MTP-Mangel, wobei der isolierte LKAT-Mangel bisher nur bei 2 Patienten weltweit identifiziert werden konnte (Das et al. 2006).
Der MTP-Mangel ist definiert als Minderung bzw. Verlust der Aktivitäten aller drei Enzyme des Komplexes, wobei zugrunde liegende Mutationen sowohl in der α-Untereinheit als auch in der ß-Untereinheit liegen können. Mutationen in der α- und ß-Untereinheit haben dabei ähnliche Auswirkungen auf die Stabilität des gesamten MTP-Komplexes (Spiekerkötter et al. 2003). Insgesamt besteht deutliche molekulare Heterogenität (Spiekerkötter et al 2003).
Der LCHAD-Mangel führt isoliert zu einem Verlust der Aktivität der Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase. Hierbei kommt es zu einem Basenaustausch von Guanin zu Cytosin; Glutamat an Position 474 wird damit durch Glutamin ersetzt.
60% (Ibdah et al. 1999) bis 86% (den Boer et al. 2002) dieser Patienten weisen auf beiden Allelen die prävalente E474Q (1528G>C) Mutation in der α-Untereinheit

auf, welche in der katalytischen Region der LCHAD-Domäne in Exon 15 lokalisiert ist. Die übrigen Patienten weisen Compound-Heterozygotie mit zumindest einer 1528G>C Mutation auf.

In einer Studie von Spiekerkötter et al. konnte gezeigt werden, dass Patienten mit heterozygoter 1528G>C Mutation und einer zweiten pathogenen Mutation in der α-Untereinheit als α-MTP-Mangel klassifiziert werden müssen, da die Analysen der Enzymaktivitäten dieser Patienten jeweils eine deutliche Reduktion aller 3 MTP-Enzyme zeigen (Spiekerkötter et al. 2003).

1.6 Klinische Phänotypen

Sowohl der isolierte LCHAD-Mangel als auch der MTP-Mangel manifestieren sich durch sehr heterogene Phänotypen.

Es werden drei Manifestationsformen unterschieden:

Tabelle 1: Phänotypen bei Störungen des MTP-Komplexes

1. Schwere infantile Form	
Hauptsymptome	Kardiomyopathie, Herzrhythmusstörungen, Reye-ähnliche Symptome, hypoketotische Hypoglykämie
Assoziierte Symptome	Muskuläre Hypotonie
Manifestationsalter	In den ersten Lebensmonaten
Langzeitkomplikationen	Episodische Rhabdomyolyse und Myopathie, periphere Neuropathie, Retinopathie
2. Milde infantile Form	
Hauptsymptome	Hypoketotische Hypoglykämie
Assoziierte Symptome	Muskuläre Hypotonie, milde Kardiomyopathie
Manifestationsalter	In den ersten Lebensmonaten
Langzeitkomplikationen	Episodische Rhabdomyolyse und Myopathie, periphere Neuropathie, Retinopathie
3. Milde adulte Form	
Hauptsymptome	Episodische Rhabdomyolyse und Myopathie
Assoziierte Symptome	Muskuläre Hypotonie, milde Kardiomyopathie
Manifestationsalter	Schulalter, Adoleszenz und junges Erwachsenenalter
Langzeitkomplikationen	Periphere Neuropathie, Retinopathie

Patienten mit schweren Verlaufsformen werden meistens in den ersten Lebensmonaten, während kataboler Zustände wie Fasten oder Infektionen, symptomatisch. Es kommt zu einer hypoketotisch-hypoglykämischen Entgleisung durch mangelnde Ketonkörperbildung und Hemmung der Glukoneogenese. Außerdem sind verschiedene Organsysteme beteiligt. Betroffen sind vor allem Organe mit einem hohen Energieumsatz, da Energie aus den Fettsäuren nicht mehr bereitgestellt werden kann.

Bei schweren Verlaufsformen liegt eine Kardiomyopathie, Enzephalopathie und Hepathopathie vor. Hepatozelluläre Schäden entstehen vermutlich durch Lipidakkumulation. Die schwere frühmanifeste Verlaufsform des MTP-Mangels ist in der Mehrzahl der Fälle letal.

Periphere Neuropathie und Retinopathie sind Langzeitkomplikationen, welche im Vergleich zu anderen langkettigen Fettsäureoxidationsstörungen ausschließlich bei Störungen des MTP-Komplexes auftreten und möglicherweise auf die Akkumulation toxischer Hydroxyverbindungen zurückzuführen sind (Spiekerkötter et al. 2004).

Seit bundesweiter Einführung des erweiterten Neugeborenenscreenings im Jahre 2003, welches am 2. bis 3. Lebenstag mittels Tandem-Massenspektrometrie durchgeführt wird, werden bei der Diagnosestellung auch asymptomatische Neugeborene identifiziert.

1.7 Diagnose und Therapie

1.7.1 Diagnose

Das krankheitsspezifische Acylcarnitin Profil im Blut zeigt eine erhöhte Konzentration des Hydroxypalmitoylcarnitins (C16 OH), des Hydroxyhexadecenoylcarnitins (C16:1 OH), des Hydroxyoctadecanoylcarnitins (C18 OH) und des Hydroxyoctadecenoylcarnitins (C18:1 OH) an (Vreken et al. 1999).

Im Rahmen des Neugeborenenscreenings kann bereits mittels Tandem-Massenspektrometrie das krankheitsspezifische Profil im Blut detektiert werden. Seit 2005 haben die Screening-Kommission der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin und der gemeinsame Bundesausschuss der Krankenkassen 14 metabolische und endokrine Erkrankungen definiert, welche im Screening getestet werden. Hierzu gehören auch der LCHAD-Mangel und der MTP-Mangel.
Durch die Acylcarnitin Analyse mittels Tandem-Massenspektronomie können ein LCHAD-Mangel und ein MTP-Mangel nicht voneinander unterschieden werden. Bei pathologisch erhöhtem Acylcarnitin muss eine Bestätigungsdiagnostik, durch Enzymanalyse in Fibroblasten oder Lymphozyten oder durch eine Mutationsanalyse beider MTP-Gene, erfolgen. Da beim LCHAD-Mangel eine prävalente Mutation vorliegt, sollte immer mit der Mutationsanalyse und Suche nach dieser Mutation (1528G>C) begonnen werden.
Im Urin sind 3-Hydroxydicarboxyl Fettsäuren der Kettenlänge C6 bis C16 nachweisbar. Eine Pränataldiagnostik aus Chorionzotten ist bei Störungen des MTP-Komplexes, durch Messung der MTP-Enzymaktivitäten oder die Mutationsanalytik bei bekannten Mutationen des Indexpatienten, möglich.

1.7.2 Therapie

Die Therapie bei Störungen des MTP-Komplexes besteht aus einer fettreduzierten und fettmodifizierten normokalorischen Diät, aus der Vermeidung langer Fastenperioden und der ausreichenden Kohlenhydratzufuhr im Rahmen von Erkrankungen.

Fette:
Sowohl symptomatische als auch asymptomatische Patienten sollen bis zum 4. Lebensmonat keine Muttermilch oder Säuglingsmilch, sondern nur Spezial-Formula Nahrung mit mittelkettigen Triglyzeriden (MCT-Fetten) erhalten, welche den gesamten Bedarf an Nährstoffen in diesem Alter abdeckt. Ab dem 5. Monat soll eine Reduktion der Fettmenge auf 25 bis 30% der Gesamtenergie erfolgen, wobei davon 20 bis 25% auf MCT-Fette und 3 bis 4% auf essentielle Fettsäuren entfallen. Es muss auf eine größtmögliche LCT-Reduktion geachtet werden.

Proteine:
Proteine sollen 15 bis 20% der Gesamtenergie ausmachen.

Kohlenhydrate:
Eine generelle Anreicherung der Nahrung mit Kohlenhydraten (z. B. Maltodextrin) oder eine zusätzliche nächtliche Kohlenhydratzufuhr (z. B. Mondamin) sind nicht notwendig. Eine Supplementierung von Maltodextrin erfolgt nur bei besonderer klinischer Notwendigkeit im Rahmen von Krankheiten mit erhöhtem Energiebedarf und eingeschränkter Nahrungsaufnahme.

Vitamine und Mineralstoffe:
Auch Vitamine und Mineralstoffe werden nur bei nachgewiesenem Mangel im Blut substituiert.

Unter diesen Therapiemaßnahmen sind Kardiomyopathie und Hepatopathie komplett reversibel. Auch das Auftreten einer hypoketotischer Hypoglykämie ist vermeidbar. Eine periphere Neuropathie und Retinopathie ist allerdings durch die beschriebenen therapeutischen Maßnahmen derzeit nicht vollständig vermeidbar (Spiekerkötter et al. 2003); wobei die Durchführung einer strikten fettreduzierten und fettmodifizierten Diät wie vorgegeben nur in den wenigsten Fällen zufriedenstellend erfolgt.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit umfasst die molekulargenetische Charakterisierung aller uns zugewiesener Patienten mit klinischem und/oder biochemischem Hinweis auf eine Störung des MTP-Komplexes. Gleichzeitig erfolgte die Charakterisierung des klinischen Phänotyps anhand eines Fragebogens. Die Daten wurden von den betreuenden Ärzten zur Verfügung gestellt.

Ziel der Studie ist es, eine mögliche Genotyp-Phänotyp Korrelation zu definieren, um bereits bei Diagnosestellung prognostische Hinweise über den zu erwartenden Phänotyp der Krankheit geben zu können. Darüber hinaus sollen andere mögliche Prognosefaktoren erarbeitet werden.

Fragen:

- Besteht eine Genotyp-Phänotyp Korrelation?
- Welche Rolle spielt die molekulargenetische Untersuchung?
- Gibt es andere Parameter für Verlauf und Prognose?
- Welche Unterschiede bestehen zwischen LCHAD- und MTP-Mangel?
- Kann das Neugeborenenscreening Letalität und Morbidität verhindern?

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Es wurden 16 Patienten deutscher, türkischer und indischer Herkunft mit einem Mitochondrialen Trifunktionellen Protein-Mangel (MTP-Mangel) klinisch und molekulargenetisch untersucht. Bei allen Kindern lag ein für den MTP-Mangel spezifisches Acylcarnitin Profil vor. Die klinische Charakterisierung erfolgte durch die Auswertung eines einheitlichen Fragebogens. Es wurden Geschlecht, Herkunft, Alter bei Beginn der Symptomatik, Diagnosezeitpunkt und klinische Präsentation erfasst.

Alle 16 Patienten wurden molekulargenetisch untersucht. Die Sequenzierung erfolgte mittels genomischer DNS aus EDTA-Blut. Alle 20 Exons der α-MTP-Untereinheit und alle 16 Exons der β-MTP-Untereinheit, sowie deren flankierende Introns wurden sequenziert. Bei 8 Patienten wurde auch der Genotyp der Eltern bestimmt.

Eine molekulargenetische Pränataldiagnostik aus Chorionzotten wurde bei 3 Familien bei einer weiteren Schwangerschaft durchgeführt.

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). Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotetech bezogen. Elektrophoresen wurden in Gelkammern der Firma (Portsmouth, USA) durchgeführt. Für die photometrischen Messungen wurde das Beckmann-Coulter DU 640B Spektrophotometer und für die Zentrifugation wurden Geräte der Firma Eppendorf (Hamburg) verwendet.

2.3 Methoden

2.3.1 Isolierung genomischer DNS

Material:

- QIAamp DNAMini Kit (Qiagen)

Die Isolierung genomischer DNS erfolgte aus EDTA-Blut mittels des QIAamp DNAMini Kit (Qiagen). Es wurden 200 µl Blut mit 20 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer versetzt. Das entstandene Gemisch wurde geschüttelt und anschließend für 10 Minuten bei 56°C im Heizblock inkubiert. Danach wurden 200 µl Ethanol beigefügt und erneut geschüttelt. Die nun vorliegende Mischung wurde auf eine mitgelieferte Säule gegeben und für 1 Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde die Säule auf ein neues Gefäß gesetzt und 500 µl AW1-Puffer hinzupipettiert. Wieder erfolgten eine einminütige Zentrifugation bei 8.000 rpm, die Positionierung der Säule auf ein neues Gefäß und die Zugabe von 500 µl AW2-Puffer. Nun folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei maximaler Umdrehung (13.000 rpm). Das Gemisch in der Säule wurde auf ein neues Gefäß gegeben und 200 µl AE-Puffer zur Elution hinzugegeben. Anschließend wurde es für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und zuletzt für 1 Minute nochmals bei 8.000 rpm zentrifugiert, um ein Absetzen der DNS auf dem Grund des Gefäßes zu erreichen, und damit die DNA Gewinnung aus der Lösung zu erleichtern. Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNS wurde photometrisch bei 260 und 280 nm gemessen.

2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Materialien:

- Primer (100 pmol/µl), Firma MWG-Biotech, Ebersberg
- Taq-Polymerase
- dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)
- 10 x Puffer

Die Amplifikation der genomischen DNS erfolgte mit Hilfe von genspezifischen Oligonukleotiden, welche eigenst entwickelt wurden. Die Oligonukleotide hatten eine Länge von 19 bis 30 Basenpaaren (bp). Die Fragmentlänge aller PCR-Produkte lag zwischen 160 und 450 bp. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Oligonukleotide werden in Tabelle 1 und 2 beschrieben. Exon 2 und 3 der α-Untereineit wurden von gemeinsamen Primerpaaren amplifiziert.

Tabelle 2: Oligonukleotidsequenzen der α-Untereinheit

Exon Nr.	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Antisense (3'-5')	Annealing-Temp. (C°)	Produktlänge (bp)
1	TTTAGTCAGGCAGTG-CTCCAGG (22 bp)	CAGTCCCGGCAG-GAGTTCT (19 bp)	58	230
2,3	GGTACTACAGAAAT TGTTTCGCA (23 bp)	GGGATACATCTTTC-CCATTCAGG (23 bp)	58	340
4	CAAAATAG-CATTTGATGGTGG-TACG (25 bp)	ACTGTGCCCAG-CACTTCTACT(21 bp)	58	320
5	GATGCATGATAG-GATAAGTGTATAGTG-AAT (30 bp)	GGACAGTGTCT-CAATAACTTTAGAA-TATCT (30 bp)	58	270
6	CTTATCCATCT-CAAGTTGC-TACTAAGTTAC (30 bp)	AACAGATCTAAA-GAGGGCATATAGCTT-CAC (30 bp)	60	240
7	CTTATCTATGCTGTT-GACAAATAGCA (26 bp)	GCCTGGCCTAA-GAGGTTAACTCTT (24 bp)	58	320
8	CTTTGGCTTTGGCAA GTCTGGGTT (24 bp)	CCACTTCCTCATTTTG AATCTACAGC (26 bp)	58	300

9	GAGCAGTTCTTGCA GATAGCTAG (23 bp)	CATGGTCCAGAATGG CAATAAGG (23 bp)	58	320
10	CAGCATTATTGTA CATCTCGCC (22 bp)	CAGAGGATTG GATCTTTAGTT TTCCTTTAACT (32 bp)	58	190
11	GACTGTGAAGTTC TACCTTTTCTCATTCCC (30 bp)	ATCTTCAAAG CCTCTGTGAACTTTG CACAC (30 bp)	58	220
12	AGTTGTGCCTGCAT TAGTTGGT (22 bp)	GGAATCCGTGATGG-CAAGAACAA (23 bp)	58	360
13	AACACAGGTGTGCT CTGGCCCAT (23 bp)	GCCCAGCCTTTGAA TAGTCCTT (22 bp)	58	380
14	GGCCCAGGTGTCACT-CATTAG CTTTGATG TGG (32 bp)	CAAGCTGTAAGCCTT TATCAGTGAATCTGA (30 bp)	60	250
15	TCCTAGCAGAGAAGG AATGCTCTC (24 bp)	CAAAGTCTGGT CATTTGCCCCAGA (24 bp)	58	320
16	AAGGTAGAGTGTT TCAGACTCAGTC CCAGC (30 bp)	AGTGGAAGATGCCG CAAACACTCTGGA GAG (30 bp)	60	180
17	GATTTGGGCTGC CCTTCCCCTGAGGTC CCT (30 bp)	AACTAATGGTGC TAGTTATGTTTCCTT GAG (30 bp)	60	280
18	TCCCTGAGAACAAA TAGTAACACTCCCTTT (30 bp)	AGAGAAAGTCAATT TCCAGGCATTAGC CAC (30 bp)	58	200
19	CGACTTCCATTCTG CATCTGCGG CTCTGGC (30 bp)	AGGCTAAAGTGAG CTTCCTTCCCAACCTG (29 bp)	64	270
20	AGGTTGGGAAGG AAGCTCACTT (22 bp)	ATCTAGACACCACTCT GTTGGAGAA (25 bp)	58	300

Tabelle 3: Oligonukleotidsequenzen der ß-Untereinheit

Exon Nr.	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Antisense (3'-5')	Annealing-Temp. (C°)	Produktlänge (bp)
1	CCCTTTCTGGGCAG-GACCCG (20bp)	GGCGACAGTTG-CGGGGAAGGAAGTG (25bp)	58	170
2,3	GCCATGGATGAGGT-TATCAGAGTTC (25bp)	GTTCATGTGCT-CATAAAAAGGGGAG (25bp)	58	450
4	CTTAAAGCTGTCCA-GACCAAAACG (24bp)	GACTGCTATCCAAA-TATTAGTCCACT (26bp)	58	230
5	GTAGCAG-CATGTGTTTGAT-GATCTC (25bp)	AAACTGGAG-AAAGTGCCTTTAATG-AA (26bp)	58	210
6	GATCTCTGGCACTG-CCTTGATGTG (24bp)	GTGATTCTCCTAT-CACTCTTTAAAC (25bp)	58	200
7	CATGATGCCCTTC-CCTTATAGTG (23bp)	GGAGAATAATTAA-CATGTACTGTCTG (26bp)	58	180
8	GCTGATAACTGT-CATTCAGCTTTTTAA (27bp)	CTAAATCTCTG-CAGTGGGATGCC (23bp)	58	330
9	CCTCTGCTTGTCTTG-GACTTGATTG (25bp)	GCAATTCAGAACTC-CCTAATAAGTG (25bp)	58	360
10	GGAGAAGATA-TATAAGGCTTGTGG (24bp)	TAGGCTTTTCTACA-GAGAGTACAG (24bp)	58	240
11+12	CTGGAGAAA-GACCTCCAGACAGG (23bp)	GGCTTAATATACTCT-CAAACCAGTG (25bp)	58	400
13	CTCAGTTTGGGGAA-TATGAAGGAGC (25bp)	AAACCATGCCTTGCTC TCTCCCAC(24bp)	58	250
14	CCTGGCCGATTTGTT-CAACTTTAA (24bp)	GGTAACTAAGATC-CAATTATTAACGTGC (28bp)	58	260
15	GGACTCCTGACTT-TTAATATTGACC (25bp)	ATTCCAAGAAAAT-GACTCTCTGGAGG (26bp)	58	390
16	CTCTGCTGTCCCTG-TACTAGGTGG (24bp)	GGCATTGCCTAGTGT-GAGTGTTGC (24bp)	58	160

bp: Basenpaare

Es wurden 28,5 µl Aquadest, 4 µl 10 x Puffer (enthält 15 mM MgCl2), 1,5 µl dNTPs (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGPT, dTTP) und 1 µl Taq-Polymerase (5 Units/µl) zu 35 µl Reaktionsansatz gemischt. Die Ansätze wurden mit 2 µl DNS und jeweils 1,5 µl des 5'- und 3'-Oligonukleotides versetzt. Die Reaktionsansätze waren für beide Gene gleich. Die Ansätze wurden im Trio-Thermalblock der Firma Biometra Göttingen wie folgt inkubiert:

Tabelle 4: PCR-Reaktionsschema

α-Untereinheit: Exone 1, 2/3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 20	
Initialdenaturierung	95°C für 5 Min.
40 Zyklen (zur exponentiellen Anreicherung)	
Denaturierung	95°C für 30 Sek.
Hybridisierung der Primer	58°C
Elongation/Synhese	72° für 30 Sek.
Abschließende Synthese	72° für 10 Min.
α-Untereinheit: Exone 6, 14, 16, 17	
Initialdenaturierung	95°C für 5 Min.
40 Zyklen (zur exponentiellen Anreicherung)	
Denaturierung	95°C für 30 Sek.
Hybridisierung der Primer	60°C
Elongation/Synhese	72°C für 30 Sek.
Abschließende Synthese	72°C für 10 Min.
α -Untereinheit: Exon 19	
Initialdenaturierung	95°C für 5 Min.
35 Zyklen (zur exponentiellen Anreicherung)	
Denaturierung	95°C für 30 Sek.
Hybridisierung der Primer	64°C
Elongation/Synhese	72°C für 30 Sek.
Abschließende Synthese	72°C für 10 Min.
ß-Untereinheit: alle Exone	
Initialdenaturierung	95°C für 5 Min.
45 Zyklen (zur exponentiellen Anreicherung)	
Denaturierung	95°C für 30 Sek.
Hybridisierung der Primer	58°C

Elongation/Synhese	72°C für 30 Sek.
Abschließende Synthese	72°C für 10 Min.

Der Heizdeckel hatte eine Temperatur von 95°C.

Für die einzelnen Oligonukleotidpaare wurde eine individuelle optimale Anlagerungstemperatur (Tm) ermittelt (siehe Tabelle 2 und 3). Als Tm-Basiswert diente die Berechnung nach folgender Formel:
Tm = G/C Anteil (%) x 0,41 + 69,3°C - 650/Primerlänge (bp)

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Material:

- Qualex-Gold-Agarose (Peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- 100bp-Leiter (Invitrogen)
- Blaumarker

Bei dieser Methode der Identifikation von Amplikons wurden Horizontal-gelapparaturen der Firma Owl Separation Systems für Gele mit 10 Probentaschen verwendet. Es wurde zunächst 2 g Agarose in 100 ml 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris-HCL, 89 mM Borsäure, 2 mM Na-EDTA) aufgelöst und die erhaltene Masse in die mit Plastikgelkämmen bestückte Gelapparatur gegossen. 40 µl der amplifizierten DNS-Fragmente wurden zusammen mit 7 µl Blaumarker (30% Glycerin, 0,25% Xylencyanol, 0,25% Bromphenolblau) in die vorgeformten Geltaschen aufgetragen. Als DNS-Längenstandard wurde die 100 bp Leiter zugegeben. Die Elektrophorese wurde bei 200 mA mit nicht mehr als 120 V in 1 x TBE-Puffer für ca. 120 bis 200 Minuten durchgeführt. Nach Inkubation des Agarosegels, in einer 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung für 10 bis 20 Minuten, erfolgte die Darstellung der PCR-Produkte durch 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 mittels des Polaroid-Kamera-Systems DS-34, AGS Heidelberg photographisch dokumentiert.

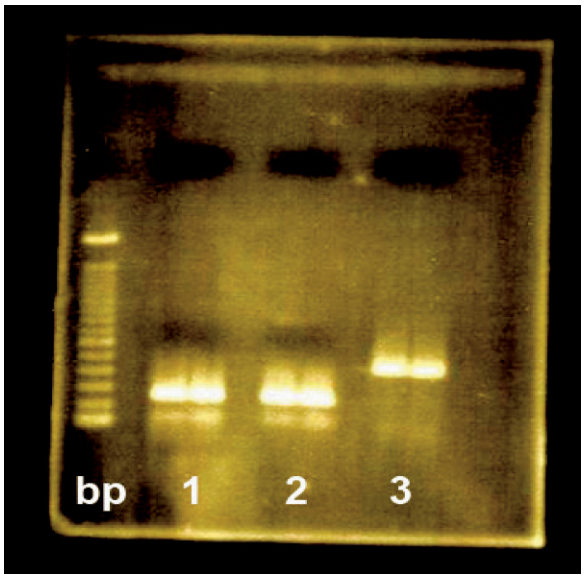

Abb.3: spezifisches Bandenmuster
bp: 100 Basenpaarleiter (Längenstandard)
1 – 3: Proben der PCR-Produkte

2.2.4 Säulenchromatographie zur Aufreinigung der DNS-Fragmente

Material:

- QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen Hilden

Die aus dem Agarosegel isolierten, spezifischen PCR-Produkte wurden gewogen und mit der 3-fachen Menge ihres Gewichtes mit QG-Puffer (pH < 7,5) für 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Danach wurde Isopropanol, in der Menge entsprechend dem einfachen Gelvolumenanteil, zugegeben und das erhaltene Gemisch auf eine vorgefertigte Säule aus dem Qiagen-Kit gebracht. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde erneut unter Zugabe von 500 µl QG-Puffer gewaschen. Dieses Prozedere wiederholte sich mit 750 µl PE-Puffer. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde ein weiteres Mal zentrifugiert und die Säule auf ein

neues Gefäß gegeben. Für die Eluation der DNS wurden 30 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCL, pH 8,5) auf die Säulen pipettiert, eine Minute inkubiert und abschließend für eine Minute zentrifugiert.

2.2.5 Sequenzier-Polymerasekettenreaktion (Cycle-Sequenzing)

Material

- Big Dye Terminator v.1.1 Cycle Sequenzing Kit, Applied Biosystem Weiterstadt

Für den Reaktionsansatz wurden 13 µl Aquadest, 3 µl 5fach Puffer, 1 µl Primer, 1 µl DNS und 2 µl Big Dye Reagenz gemischt. Das Big Dye Reagenz enthielt verschiedene Nukleotide, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehen waren und durch die Sequenzierreaktion in das aufgereinigte DNS-Fragment eingebaut wurden. Der Ansatz wurde im Trio-Thermalblock der Firma Biometra Göttingen mit folgenden Reaktionsschritten durchgeführt:

Tabelle 5: Sequenzier-PCR-Reaktionsschema

Sequenzier-Polymerasekettenreaktion (Cycle-Sequenzing)	
Initialdenaturierung	96°C für 4 Min.
25 Zyklen (zur exponentiellen Anreicherung)	
Denaturierung	96°C für 10 Sek.
Primer-Anlagerung	50°C für 5 Sek.
Primer-Verlängerung	60°C für 4 Min.
„Final hold"	4°C für ∞

Der Heizdeckel hatte eine Temperatur von 95°C.

2.2.6 Elektrophoretische Datenanalyse am ABI 310

Material:

- DyeEx 2.0 Spin Kit, Qiagen, Hilden
- Formamid, Calbiochem, San Diego
- Genetic Analyser Sample Tubes, Applied Biosystems, Weiterstadt
- POP-6, Applied Biosystems, Weiterstadt
- Puffer (Buffer (10x) with EDTA), Applied Biosystems, Weiterstadt

Die Aufreinigung der Proben erfolgte mittels DyeEx 2.0 spin columns nach Angaben des Herstellers. Die mitgelieferten Säulen wurden geschüttelt, 3 Minuten bei 2.700 rpm zentrifugiert und auf ein neues Gefäß gegeben. Anschließend wurde die PCR-Probe auf die Säulen gegeben und erneut 3 Minuten bei 2.700 rpm zentrifugiert. 10 µl des Eluates wurden mit 10 µl Formamid gemischt, in Genetic Analyser Cups gegeben und mit Hilfe des automatischen Sequenziergerätes ABI PRISM 310 Genetic-Analyzer (Applied Biosystems) analysiert. Die DNS-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode mittels Didesoxynukleotide.
Durch Zusatz der vier Didesoxynukleotide kam es zu einem basenspezifischen Kettenabbruch. Die entstehenden Produkte wurden über einen Laserscanner analysiert. Die automatische Analyse der Laufdaten erfolgt unter Verwendung des Programms Genscan Multianalyst, Version 3.1.2 (Applied Biosystems).

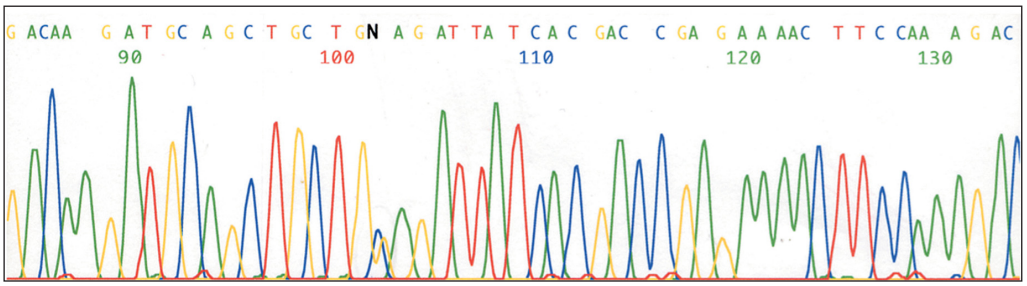

Abb. 4: Sequenzanalyse von Exon 15 mit der typischen heterozygoten Mutation E474Q

2.2.7 Restriktionshydrolyse

Material:

- Endonukleasen, New England BioLabs

Zur Bestätigung der gefundenen Mutationen wurde zusätzlich eine Restriktionshydrolyse für die häufige LCHAD-Mutation E474Q in Exon 15 durchgeführt. Bakterielle Restriktions-Endonukleasen erkennen eine pallindromische Nukleotidsequenz der DNA und spalten die DNA innerhalb dieser. Die Mutation E474Q bildet mit den angrenzenden Nukleotiden eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym PST I (Providencia stuartii) (CTGCA‡G). Nach Verdau bilden sich bei Vorliegen der homozygoten Mutation 3 Fragmente mit jeweils einer Länge von 123, 117 und 83 Basenpaaren.
Zur Isolierung der DNS, sowie für PCR und Gelelektrophorese wurden die bisher beschriebenen Verfahrensschritte verwendet und daher nicht mehr gesondert aufgeführt. Für die Restriktionshydrolyse wurden 8 µl PCR-Produkt, 0,5 µl Restriktionsenzym, 1 µl 10-fach Puffer (NE Buffer 3) und 1 µl Purified BSA 10 x nach den Angaben des Enzymherstellers verwendet.
Die Inkubation erfolgte 2 Stunden bei 37°C. Das Produkt wurde mit 2 µl Blaumarker auf ein 2%-iges Agarosegel gegeben. Anhand der entstandenen Fragmente konnte die Mutation in Exon 15 (E474Q) nachgewiesen oder ausgeschlossen werden.

2.2.8 Pränataldiagnostik

Von 3 Familien, die in der Vergangenheit ein Kind durch Mitochondrialen Trifunktionellen Protein-Mangel verloren hatten und bei erneuter Schwangerschaft eine vorgeburtliche Diagnostik erbaten, wurde uns Chorionzotten-DNA zur Pränataldiagnostik zugesandt.
Im Vorfeld wurde eine Kontamination der Probe mittels Mikrosatellitenanalyse in den entsprechenden Instituten für Humangenetik ausgeschlossen. Aufgrund

der bekannten Mutationen der Indexpatienten sequenzierten wir zunächst die entsprechenden Exone in der elterlichen DNA und dann in der fetalen DNA. Die Verfahrensschritte zur Isolierung der DNS, die Durchführung der PCR, Gelelektrophorese und Sequenzierung wurden bereits beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Molekulargenetik

Es wurden 16 Patienten deutscher, türkischer und indischer Herkunft mit klinischem und biochemischem Hinweis auf einen MTP-Mangel in unsere Studie aufgenommen. Da der MTP-Mangel einem autosomal-rezessiven Vererbungsmodus folgt, müssen bei jedem Patienten zwei mutierte Allele vorliegen. Bei 2 Patienten konnte trotz kompletter Sequenzierung beider MTP-Gene nur ein mutiertes Allel nachgewiesen werden (Patient 8 und 16). Die folgende Tabelle zeigt alle nachgewiesenen Mutationen in den α- und ß-Untereinheiten:

Tabelle 6: Mutationen der Patienten mit MTP-Mangel

Patienten- Nr.	Diagnose	Allel 1			Allel 2		
		Exon	Mutation	Amino-säuren-austausch	Exon	Mutation	Amino-säuren-austausch
Mutationen in der α-Untereinheit							
1	LCHAD	15	1528G>C	E474Q	15	1528G>C	E474Q
2	LCHAD	15	1528G>C	E474Q	15	1528G>C	E474Q
3	LCHAD	15	1528G>C	E474Q	15	1528G>C	E474Q
4	LCHAD	15	1528G>C	E474Q	15	1528G>C	E474Q
5	LCHAD	15	1528G>C	E474Q	15	1528G>C	E474Q
6	α-MTP	19	2035A>C	T643P	19	2035G>C	T643P
7	α-MTP	14	1418C>A	A437D	14	1418C>A	A437D
8	α-MTP	15	1528G>C	E474Q			
9	α-MTP	15	1528G>C	E474Q	7	IVS7 +12G>C	
10	α-MTP	15	1528G>C	E474Q	3	157C>T	R17W
11	α-MTP	15	1528G>C	E474Q	3	157C>T	R17W
12	α-MTP	9	871C>T	R255W	12	1138T>C	S344P
13	α-MTP	15	1528G>C	E474Q	9	871C>T	R255W**
Mutationen in der β-Untereinheit							
14	-MTP	5	182G>C	R28H*	4	IVS4 -3C>G	
15	-MTP	3	88-91 delTCCC		3	88-91 delTCCC	
16	-MTP	3	IVS3+4A>T				

*** Vorbeschriebene Mutation Spiekerkötter et al 2003**
**** Vorbeschriebene Mutation Ibdah et al. 1998**

Es wurden insgesamt 30 Mutationen auf 32 untersuchten Allelen nachgewiesen. Davon 25 in der α-Untereinheit und 5 in der ß-Untereinheit.

α-Untereinheit:

Von 13 Patienten mit Mutationen in der α-Untereinheit präsentierten sich 5 mit einem isolierten LCHAD-Mangel und der homozygoten 1528 G>C Mutation, die zu folgendem Aminosäurenaustausch führt: E474Q. Von 8 weiteren Patienten waren wiederum 5 heterozygot für die 1528G>C Mutation. Bei den anderen Mutationen handelte es sich um 9 missense Mutationen und eine splice site Mutation. Die R255W (871 C>T) Mutation in Exon 9 war als einzige Mutation in der Literatur vorbeschrieben (Ibdah et al. 1998). Bei einem Patienten wurde lediglich eine Mutation in der kodierenden DNS gefunden. Die zweite Mutation befand sich in der angrenzenden Intronregion (Patient 9). Bis auf die 1528G>C Mutation bestand molekulare Heterogenität.

ß-Untereinheit:

Ein ß-MTP-Mangel wurde bei insgesamt 3 Patienten diagnostiziert. Auf 4 von 6 Allelen fanden sich splice site Mutationen beziehungsweise Deletionen, welche die Proteinstabilität stark beeinflussen. Die missense Mutation R28H (Patient 14) war ebenfalls als schwere Mutation vorbeschrieben. Sie ist in der Dimerisationsdomäne des Proteins lokalisiert (Spiekerkötter et al. 2003). Insgesamt lag auch in der ß-Untereinheit molekulare Heterogenität vor.

Polymorphismen:

Bei 6 Patienten konnten Polymorphismen (heterozygot) nachgewiesen werden, welche überwiegend in der ß-Untereinheit lagen. Nur einer, Patient 9, zeigte einen Polymorphismus in der α-Untereinheit des Proteins (siehe Tabelle 7). Als Polymorphismus bezeichnet man das Auftreten einer Genvariante. Sie beruht auf Mutationen, die voraussichtlich keine schwerwiegende Konsequenz für die Funktion des Genproduktes haben. Da verschiedene Basentripletts die gleiche Aminosäure kodieren, hat nicht jeder Basenaustausch in der DNA zwingend einen Aminosäureaustausch im Protein zur Folge.

Tabelle 7: Polymorphismen

Patient	Diagnose	Exon	Polymorphismus
9	α-MTP	6	474C>T
6	ß-MTP	IVS15	IVS15-88A>T
7	ß-MTP	IVS15	IVS15-88A>T
8	ß-MTP	IVS15	IVS15-88A>T
14*	ß-MTP	2	-32insT
16	ß-MTP	2/3	Insertion CTA

*** Dieser Polymorphismus war bereits vorbeschrieben (Spiekerkötter et al. 2003)**

Pränataldiagnostik

Im Rahmen der Studie führten wir bei 3 Familien eine molekulargenetische Pränataldiagnostik durch (Patient 1, 6 und 14). Patient 14 zeigte Heterozygotie für die väterliche Mutation IVS4-3C>G und Patient 6 für die T643P-Mutation in Exon 19, die beide Eltern heterozygot aufwiesen. Der dritte Patient trug den Wildtyp. Damit waren zwei der zu erwartenden Kinder Anlageträger für einen Trifunktionellen Protein-Mangel. Alle Kinder waren damit gesund. Die Schwangerschaften wurden ausgetragen.

Tabelle 8: Ergebnisse der Pränataldiagnostik

	Patient 1	Patient 6	Patient 14
Indexpatient	homozygot E474Q	homozygot T643P Exon 19	R28H; IVS -3C>G
Mutter	heterozygot E474Q	heterozygot T643P Exon 19	heterozygot R28H
Vater	heterozygot E474Q	heterozygot T643P Exon 19	heterozygot IVS -3C>G
Fet	Wildtyp	heterozygot T643P Exon 19	heterozygot IVS -3C>G

3.2 Klinische Präsentation

Von den 16 Patienten waren 11 Jungen und 5 Mädchen. Die Patienten 10 und 11 waren Geschwister. 9 Patienten waren deutscher Herkunft (Patient 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 2, 14), 6 Patienten türkischer (Patient 1, 3, 6, 13, 15, 16) und ein Patient indischer Herkunft (Patient 7). Das Alter bei Beginn der Symptomatik lag zwischen dem 1. Lebenstag und dem 3. Lebensjahr, wobei sich die meisten Patienten (14 von 16) im 1. Lebensjahr manifestierten. Die Diagnosestellung erfolgte zwischen dem 3. Lebenstag, durch das erweiterte Neugeborenenscreening und dem Alter von 11 Jahren.

Bei 7 der 16 Patienten konnte die Diagnose MTP- bzw. LCHAD-Mangel erst post mortem gestellt werden. Insgesamt 8 der 16 untersuchten Patienten verstarben (50%), davon 3 mit einem LCHAD-Mangel, 4 mit einem α-MTP-Mangel und 1 Patient mit einem ß-MTP-Mangel. 5 von 8 Patienten verstarben im 1. Lebensjahr. 9 Patienten manifestierten sich mit einer hypoketotischen Hypoglykämie, 7 präsentierten sich mit einer Kardiomyopathie und 7 mit einer Myopathie. Eine periphere Neuropathie entwickelten 4 und eine Retinopathie 2 Patienten.
Bei 6 Patienten wurde die Diagnose durch das erweiterte Neugeborenenscreening gestellt. Von diesen blieb 1 Patient mit einem LCHAD-Mangel und 1 Patient mit einem α-MTP-Mangel unter prophylaktischen Maßnahmen bis zum Alter von 2 Jahren asymptomatisch. Ein asymptomatischer Patient mit einem LCHAD-Mangel und Diagnose durch das erweiterte Neugeborenenscreening, verstarb im Alter von 3 Monaten im Rahmen eines Infektes. Es kam zu einer beatmungspflichtigen Ateminsuffizienz und einem Herzstillstand. 3 von 6 der im Screening identifizierten Patienten waren bei der Diagnose bereits symptomatisch, Patientin 16 mit einem ß-MTP-Mangel wurde bereits am 2. Lebenstag reanimationspflichtig.

Hinsichtlich der bestehenden Klassifikation (siehe Tabelle 1) präsentierten sich 10 Patienten mit einer schweren infantile Manifestationsform: 3 von 10 Patienten mit einem LCHAD-Mangel, 4 mit einem α-MTP-Mangel und 3 mit einem ß-MTP-Mangel. 4 Patienten wurden der milden infantilen Manifestationsform zugeordnet,

davon 1 Patient mit einem LCHAD-Mangel und 3 weitere mit einem α-MTP-Mangel. 2 Patienten blieben auch im weiteren Verlauf asymptomatisch (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Klinische Manifestation von MTP-Patienten mit Mutationen in der α- und β-Untereinheit

Patient	Diagnose	Geschlecht	Symptombeginn	Diagnose Stellung	Verstorben	Kardiomyopathie	Myopathie	Neuropathie	Retinopathie	Hypoglykämie	Manifestationsform
1[1,2]	LCHAD	männl.	postnatal	7. M (p.m.)	+	+	+	-	-	-	schwer infantil
2[1]	LCHAD	männl.	3. M.	Screening	+	-	-	-	-	+	schwer infantil
3[4]	LCHAD	weibl.	postnatal	10. M	+	+	+	-	-	+	schwer infantil
4	LCHAD	männl.	postnatal	Screening	-	-	-	-	-	+	mild infantil
5 [1]	LCHAD	männl.	asympt.	Screening	-	-	-	-	-	-	asympt.
6 [1,2]	α-MTP	männl.	1. M.	1M (p.m.)	+	+	-	-	-		schwer infantil
7[5]	α-MTP	männl.	18. M.	3. Lj. (p.m.)	+	+	+	+			schwer infantil
8	α-MTP	männl.	1. Lj.	11. Lj.	-	-	+	+	+	+	mild infantil
9	α-MTP	weibl.	2. M.	3. M.	-	-	+	+	+	+	mild infantil
10[3]	α-MTP	männl.	postnatal	15. M.	-	-	+	-	-	+	mild infantil
11[3]	α-MTP	weibl.	asympt.	Screening	-	-	-	-	-	-	asympt.
12[1]	α-MTP	männl.	3. Lj.	7. Lj. (p.m)	+	+	+	+		+	schwer infantil
13	α-MTP	männl.	?	p.m.	+	+	-	-	-	-	schwer infantil
14[1,2]	β-MTP	weibl.	3. M.	p.m.	+	+	-	-	-	-	schwer infantil
5[1]	β-MTP	männl.	3. Lt.	Screening	-	+	+	-	-	+	schwer infantil
16[1,6]	β-MTP	weibl.	2. Lt.	Screening	-	+	-	-	-	+	schwer infantil

M.: Monat, Lt.: Lebenstag, Lj.: Lebensjahr, p.m.: post mortem, asympt.: asymptomatisch

1 Eltern wurden sequenziert
2 Pränataldiagnostik erfolgt
3 Geschwister wurden sequenziert
4 plötzlicher Tod im Rahmen eines Infektes
5 beatmungspflichtige Ateminsuffizienz, Herzstillstand
6 kardiopulmonale Reanimation am 2.Lt

3.3 Genotyp-Phänotyp Korrelation

LCHAD-Mangel:

5 der 16 Patienten trugen die Diagnose eines isolierten LCHAD-Mangels mit der homozygoten E474Q Mutation. Bei allen 5 Patienten zeigten sich sehr unterschiedliche klinische Verläufe. 1 Patient wurde im Screening diagnostiziert und verblieb unter prophylaktischen Maßnahmen bis zum Alter von 3 Monaten asymptomatisch. 2 Patienten wurden trotz auffälligem Screeningbefund symptomatisch; einer davon starb im Alter von 3 Monaten im Rahmen eines Infektes ohne therapeutische Maßnahmen, der andere zeigte eine eher milde Verlaufsform. Im ersten Lebensjahr verstarben 2 weitere Patienten mit einer schweren infantilen Manifestationsform.

Zusammenfassend kam es also bei identischer homozygoter E474Q Mutation zu asymptomatischen, milden und auch letalen Verläufen.

α-MTP-Mangel:

Auch bei den 8 Patienten mit α-MTP-Mangel zeigten sich die drei Manifestationsformen. Es verstarben 4 von 8 Patienten (6, 7, 12, 13), von denen ein Patient heterozygot für die E474Q Mutation war. Die Patienten 8, 9 und 10 zeigten eher milde Verläufe und sind ebenfalls heterozygot für die 1528G>C Mutation. Patient 11 blieb asymptomatisch.

Die Patienten 10 und 11 waren Geschwister. Bei Patient 10, dem älteren der zwei Geschwister, wurde die Diagnose sehr spät gestellt (mit 15 Monaten). Er war psychomotorisch stark retardiert, wies rezidivierende Hypoglykämien und eine Myopathie auf. Patient 11 wurde im Neugeborenenscreening diagnostiziert und blieb unter therapeutischen Maßnahmen asymptomatisch. Beide zeigten heterozygot die 1528G>C (E474Q) Mutation und eine missense Mutation in Exon 3 (R17W). Die Patienten 12 und 13 manifestierten sich mit sehr schweren Verläufen. Beide wiesen heterozygot eine Mutation in Exon 9 auf, welche vermutlich die Proteinstabilität stark beeinflusst. Exon 9 kodiert den verknüpfenden Bereich zwischen der NH2-terminalen Long-Chain Hydroxyacyl-CoA Hydratase und

der COOH-terminalen Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (Ibdah et al. 1998).

ß-MTP-Mangel

Alle 3 Patienten mit einem ß-MTP-Mangel manifestierten sich mit einer schweren klinischen Verlaufsform. Bei den zugrunde liegenden Mutationen handelt es sich um schwere splice site Mutationen, Deletionen und die vorbeschriebene R28H Mutation. Trotz schwerer Mutationen sind die Patienten die im Neugeborenenscreening identifiziert wurden nicht verstorben.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 16 Patienten mit einer Störung des MTP-Komplexes klinisch und molekulargenetisch charakterisiert, mit der Frage nach einer möglichen Genotyp-Phänotyp Korrelation und einer möglichen prognostischen Vorhersage des weiteren Krankheitsverlaufes.

Diese Studie zeigt, dass die klinische Verlaufsform des MTP- bzw. LCHAD-Mangels unabhängig von der Art und der Lokalisation der Mutation im Protein ist. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es nicht möglich, anhand der zugrunde liegenden Mutation, das Risiko und die Präsentationsform einer symptomatischen Erkrankung abzuschätzen.
Bemerkenswert ist auch, dass sich bei 5 Patienten unserer Studie mit einem isolierten LCHAD-Mangel sehr unterschiedliche Phänotypen zeigten, obwohl alle Patienten die gleiche homozygote E474Q Mutation auf Exon 15 der α-Untereinheit aufwiesen. Es wurden schwere infantile Manifestationsformen (3 von 5), milde infantile Manifestationsformen (1 von 5) und auch asymptomatische Verläufe (1 von 5) beobachtet. Die Beobachtungen unserer Studie entsprechen den Aussagen der Untersuchung von den Boer et al. (2002). Es liegt also nahe, dass noch andere Faktoren, wie katabole Stoffwechsellagen im Rahmen von Infekten, als mögliche Auslöser einer klinischen Symptomatik in Betracht gezogen werden müssen und den klinischen Verlauf der Erkrankung nachhaltig beeinflussen.
Die Frequenz und das Ausmaß dieser metabolischen Entgleisungen scheinen hier von großer Bedeutung zu sein. Da der alleinige Nachweis einer bestimmten Mutation nicht ausreicht, um Vorhersagen über den zu erwartenden klinischen Verlauf zu treffen, bedeutet dies auch, dass die Therapiemaßnahmen für alle Patienten, auch für solche, die sich initial asymptomatisch präsentieren, gleichermaßen streng sein müssen. Zur weiteren Klärung dieses Verdachts müssen noch weitere Studien mit größeren Patientengruppen über einen längeren Zeitrahmen erfolgen.
Auch bei den α-MTP Patienten wurden, unabhängig von den zugrunde liegenden Mutationen, Verlaufsformen unterschiedlicher Schweregrade beobachtet.

Anders als zuvor vermutet (Spiekerkötter et al. 2003) resultierten, wie in dieser Studie gezeigt, auch missense Mutationen in letalen Phänotypen.

Eine wichtige Beobachtung war weiterhin, dass alle Patienten mit Mutationen in der α-Untereinheit, die keine heterozygote E474Q Mutation aufwiesen, im Verlauf der Krankheit verstarben (4 von 4).

In der Gruppe der ß-MTP-Patienten fiel ebenfalls auf, dass alle Patienten Nonsense-Mutationen aufwiesen. Es wurden nur splice site Mutationen bzw. Deletionen gefunden, welche die Proteinstabilität stark beeinflussen. Die nachgewiesene R28H Mutation ist ebenfalls als schwere Mutation vorbeschrieben, da sie in der Dimerisationsdomäne des Proteins liegt (Spiekerkötter et al. 2003). Alle Patienten mit Mutationen in der ß-Untereinheit in unserer Studie präsentierten sich entsprechend mit einer schweren infantilen Manifestationsform.
Insgesamt sind beim LCHAD-Mangel, wie auch beim α- und ß-MTP-Mangel, sowohl schwere, als auch leichtere Manifestationsformen vorbeschrieben (Spiekerkötter et al. 2003, den Boer 2002).

Eine wichtige Beobachtung in unserem Patientenkollektiv ist, dass milde Verläufe nur dann vorliegen, wenn mindestens eine Mutation an Position E474 der α-Untereinheit liegt. Auch in vorherigen Studien wurde der isolierte LCHAD-Mangel im Vergleich zum kompletten MTP-Mangel als gutartigerer Enzymdefekt beschrieben. Den Boer et al. zeigten in einer Studie, in welcher 21 Patienten mit MTP-Mangel anhand eines Fragebogens untersucht wurden, dass der MTP-Mangel als schwerer anzusehen ist, als der isolierte LCHAD-Mangel (den Boer et al. 2002/2003). Die Mortalität beim MTP-Mangel lag bei 76% im Gegensatz zu 38% beim LCHAD-Mangel, auch bestand ein früheres Manifestationsalter.

Die Ergebnisse zur Letalität bestätigen sich in unserer Studie nicht.
Die Letalität war mit 3 von 5 in der Gruppe der Patienten mit LCHAD-Mangel sehr hoch. Die Letalität lag in der Gesamtgruppe mit 8 von 16 ebenso hoch.
Trotz Diagnose durch das Neugeborenenscreening ist ein letaler Verlauf be-

schrieben (1 von 6), obwohl insgesamt eine deutliche Senkung der Letalität seit Einführung des Neugeborenenscreenings zu verzeichnen ist. Vor der Screening-Ära wurde bei 6 von 16 Patienten die Diagnose erst post mortem gestellt.

Festzustellen ist leider auch, dass trotz Neugeborenenscreening 3 von den verbliebenen 5 Kindern im Verlauf Symptome entwickelt haben, im Gegensatz zum VLCAD-Mangel, bei welchem sehr viele asymptomatische Verläufe nach Identifizierung durch das Neugeborenenscreening beschrieben wurden (Spiekerkötter et al. 2003, Schymik et al. 2006). Ein Patient wurde bereits am 2. Lebenstag vor Erhalt des Screeningbefundes symptomatisch und musste kardiopulmonal reanimiert werden. Für akute schwere Verläufe des MTP-/LCHAD-Mangels kann das Neugeborenenscreening also zu spät erfolgen.

Das junge Präsentationsalter, die hohe Morbidität und Mortalität kann, zum einen durch die Toxizität der Long-Chain Hydroxyacyl-CoA Ester und Hydroxyacylcarnitine, zum anderen durch die Unfähigkeit, Ketonkörper und ATP zu bilden, erklärt werden. Dies führt zu einem Energiemangel bei einer Reihe verschiedener Organe. Im Vergleich hierzu werden bei anderen Störungen der ß-Oxidation wie z. B. dem MCAD-Mangel keine toxischen Acyl-CoA bzw. Acylcarnitin-Verbindungen produziert und es ist möglich Ketonkörper noch in geringen Mengen zu bilden. Morbidität und Mortalität liegen beim MCAD-Mangel, seit Einführung des erweiterten Neugeborenenscreenings, nahezu bei Null (Wilcken et al. 2008).

Aufgrund der insgesamt hohen Letalität des MTP-Mangels (8 von 16 = 50%) vor der Screening-Ära und der deutlichen Senkung der Letalität seit Beginn des Screenings, ist für diese Erkrankung das Neugeborenenscreening jedoch unverzichtbar. Schwere Stoffwechselentgleisungen und hypoketotische Hypoglykämien können, durch Vermeidung langer Fastenperioden und ausreichender Kohlenhydratzufuhr im Rahmen von Infekten, vermieden werden. Unter prophylaktischen Diätmaßnahmen blieben 2 Patienten der Studie bislang, bis zum Alter von 2 Jahren, vollkommen asymptomatisch.

Kardiomyopathie und Hepathopathie sind unter einer fettreduzierten und fettmodifizierten Diät reversibel. Leider sind Langzeitkomplikationen, wie Neuropathie und Retinopathie, therapeutisch derzeitig nicht zufriedenstellend beeinflussbar (Spiekerkötter et al. 2003). Ein unverzichtbarer Aspekt der molekulargenetischen Untersuchung des Index-Patienten ist die Möglichkeit der Pränataldiagnostik bei weiterem Kinderwunsch der Eltern. Eine Pränataldiagnostik ist beim LCHAD-/MTP-Mangel aufgrund der vielen nicht sicher vorhersehbaren Symptome und der neurologischen Langzeitkomplikationen bei weiteren Schwangerschaften unbedingt anzuraten.

Zusammenfassend ist bei Störungen des MTP-Komplexes anhand des Genotyps keine sichere Vorhersage des Phänotyps möglich. Patienten mit einem LCHAD-Mangel, sowie Patienten mit einem MTP-Mangel, können sich bei gleichem Genotyp mit einem schweren oder leichten Phänotyp manifestieren. Auch sind Patienten mit einem LCHAD-Mangel genauso schwer betroffen, wie Patienten mit einem vollständigen MTP-Mangel. Anderseits sind milde bzw. asymptomatische Verlaufsformen nur bei Patienten beschrieben, die mindestens eine E474Q Mutation aufweisen.
Die molekulargenetische Untersuchung des Index-Patienten dient daher mittlerweile in erster Linie der Bestätigung der Diagnose, sowie der Möglichkeit einer Pränataldiagnostik bei weiterem Kinderwunsch der Eltern. Durch das Neugeborenenscreening für Störungen des MTP-Komplexes konnte die Mortalität und Morbidität der Krankheit deutlich gesenkt werden, obwohl es nicht vollends gelungen ist, trotz Kenntnis der Diagnose letale Verläufe zu verhindern. Anhand der erworbenen Daten dieser Studie wird jedoch die Bedeutung des erweiterten Neugeborenenscreenings insgesamt sehr deutlich.

5 Literaturverzeichnis

Brackett JC, Sims HF, Rinaldo P, Sharpiro S, Powell CK, Bennett MJ, Strauss AW.
Two α-subunit donor splice site mutations cause human trifunctional protein deficiency. J Clin Invest 1995; 95:2076-2082.

Das AM, Illsinger S, Lücke T, Hartmann H, Ruiter JP, Steuerwald U, Waterham HR, Duran M, Wanders RJ.
Isolated mitochondrial long-chain ketoacyl-CoA thiolase deficiency resulting from mutations in the HADHB gene. Clin Chem 2006; 52(3):530-4

Den Boer ME, Wanders RJ, Morris AA, Ijlst L, Heymanns HS, Wijburg FA.
Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients. Pediatrics 2002; 109:99-104.

Den Boer MEJ, Dionis-Vici C, Chakrapani A, van Thuijl AO, Wanders RJ, Wijburg FA.
Mitochondrial trifunctional protein deficiency: a severe fatty acid oxidation disorder with cardiac and neurologic involvement. J Pediatr 2003; 142:684-689.

Ibdah JA, Tein I, Dionisi-Vici C, Bennet MJ, Ijlst LI, Gibson B, Wanders RJ, Strauss AW.
Mild trifunctional protein deficiency is associated with progressive neuropathy and myopathy and suggests a novel genotype-phenotype correlation. J Clin Invest 1998; 102:1193-1199

Ibdah JA, Bennett MJ, Rinaldo P, Zhao Y, Gibson B, Sims HF, Strauss AW.
A fetal fatty-acid oxidation disorder as a cause of liver disease in pregnant women. N Engl J Med 1999; 340:1723-1731

Ijlst L, Wanders RJ, Ushikubo S, Kamijo T, Hashimoto T.
Molecular basis of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of the major disease-causing mutation in the α-subunit of the mi-

tochondrial trifunctional protein. Biochem Biophys Acta.1994; 1215(3):347-50

Ijlst L, Ruiter JPN, Hoovers JMN, Jakobs ME, Wanders RJA.
Common missense mutation G1528C in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency.J Clin Invest 1996; 98:1028-33

Kamijo T, Aoyama T, Komiyama A, Hashimoto T.
Structural analysis of cDNA of subunits of human mitochondrial fatty acid ß-oxidation trifunctional protein. Biochem Biophys Res Commun 1994; 199:818-825

Sander J, Sander S, Steuerwald U, Janzen N, Peter M, Wanders RJ, Marquardt I, Korenke GC, Das AM.
Neonatal screening for defects of the mitochondrial trifunctional protein. Mol Genet Metab 2005; 85:108-14

Schulze A., Lindner M., Kohlmüller D., Olgemüller K., Mayatepek E., Hoffmann G.
Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications. Pediatrics 2003; 111(6):1399-1406

Schymik I, Liebig M, Mueller M, Wendel U, Mayatepek E, Strauss AW, Wanders RJ, Spiekerkoetter U.
Pitfalls of neonatal screening for very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency using tandem mass spectrometry. J Pediart.2006;149(1):128-30.

Spiekerkoetter U, Sun B, Yue Z, Khuchua Z, Bennet MJ, Strauss AW.
Mitochondrial trifunctional protein (TFP) deficiency due to α- and ß-subunit mutations: one entity for two deseases? J Inherit Metab Dis 2002; 25(1):72

Spiekerkoetter U, Sun B, Khuchua Z, Bennet MJ, Strauss AW.
Molecular and phenotypic heterogeneity in mitochondrial trifunctional protein deficiency due to ß-subunit mutations. Hum Mutat 2003;21:598-607.

Spiekerkoetter U, Sun B, Zytkovicz T, Wanders R, Strauss AW, Wendel U.
MS/MS-based newborn and family screening detects asymptomatic patients with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. J Pediatr. 2003; 143 :335 –342

Spiekerkoetter U, Khuchua Z, Yue Z, Bennett MJ, Strauss AW.
General mitochondrial trifunctional protein (TFP) deficiency as a result of either α-or β-subunit mutations exhibits similar phenotypes because mutations in either subunit alter TFP complex expression and subunit turnover. Pediatr Res 2003; 55:190-196.

Spiekerkoeter U, Bennett MJ, Ben-Zeev B, Strauss AW, Tein I.
Peripheral neuropathy, episodic myoglobinuria and respiratory in deficiency of the mitochondrial trifunctional protein. Muscle Nerve 2004; 29: 66-72

Ushikubo S, Aoyama T, Kamijo T, Wanders RJ, Rinaldo P, Vockley J, Hashimoto T.
Molecular characterization of mitochondrial trifunctional protein deficiency: formation of the enzyme complex is important for stabilization of both α-and ß-subunits. Am J Hum Genet 1996; 58:979-988

Vreken P, van Lint AE, Bootsma AH, Overmars H, Wanders RJA, van Gennip AH.
Quantitative plasma acylcarnitin analysis using electrospray tandem mass spectrometry for the diagnosis of organic acidaemias and fatty acid oxidation defects. J Inherit Metab Dis 1999; 22:302-306.

Wanders RJ, Duran M, Ijlst L, de Jager JP, van Gennip AH, Jakobs C, Dorland L, van Sprang FJ.
Sudden infant death and long-chain-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. Lancet 1989; 52-53.

Wanders RJ, Poggi F, Bonnefort JP, Munnich A, Brivet M, Rabie D, Saudubray JM.
Human trifunctional protein deficiency: a new disorder of mitochondrial fatty acid ß-oxidation. Biochem Biophys Res Commun 1992; 188:1139-1145.

Wilcken B, Joy P, Black C, Rocca A, Haas M
Neuropsychologilical functioning in children with medium chain acyl coenzyme dehydrogenase deficiency (MCADD): The impact of early diagnosis and screening on Outcome. Child Neuropsychol. 2008; 1-13.

Yang BZ, Heng HH, Ding JH, Roe CR.
The genes for the α-and ß-subunits of the mitochondrial trifunctional protein are both located in the same region on human chromosome 2p23. Genomics 1996; 37:141-143.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Ute Spiekerkötter für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung, unermütliche Motivation und die wertvollen Anregungen bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. med Mayrteppek für sein Entgegenkommen in seiner Klinik experimentell arbeiten zu dürfen.

Weiterhin danke ich Martina Müller für ihre liebevolle Betreuung, geduldige Anleitung und stete Hilfestellung bei der praktischen Durchführung der Untersuchungen. Ihre Motivation und ihr Engagement waren mir eine große Hilfe. Danken möchte ich auch Frau Elke Diekmann für das gute Arbeitsklima.

Ein großer Dank gilt meiner Mitstreiterin Frau Dr. Ina Schymik, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nur halb soviel Spaß gemacht hätte.

Für die Zusammenarbeit möchte ich den Patienten und ihren Familien sowie den Kollegen, die uns Blutproben und klinische Informationen zugesendet haben danken.

Meinem Bruder Ansgar Sperk und Diana Giebel danke ich von Herzen für die tatkräftige Unterstützung, die zahlreichen Anregungen, kritische Durchsicht der Dissertation, Hilfestellung beim Formatieren und vor allem für Zeit und Geduld.

Vor allem danke ich meinen Eltern, Anni und Ferdinand Sperk, für ihre stete Hilfe und Unterstützung während meiner gesamten Ausbildungszeit. Nur durch sie konnte es gelingen meinen beruflichen Weg zu gehen. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Lebenslauf – Astrid Sperk

Persönliche Angaben

Geburtsdatum:	14.01.1978
Geburtsort:	Hilden
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Konfession:	römisch-katholisch

Ausbildung

Schule:

1984 - 1988	Grundschule Meigen, Solingen
1988 - 1997	Gymnasium August-Dicke-Schule, Solingen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Ausbildung:

1998 - 2000	zur Krankenschwester an der Krankenpflegeschule des Evangelischen Krankenhauses, Düsseldorf (EVK)

Hochschulstudium:

2000 - 2006	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (HHU)
Herbst 2002	Physikum
Herbst 2003	1. Staatsexamen
Herbst 2005	2. Staatsexamen
Herbst 2006	3. Staatsexamen

Praktisches Jahr:

2005 - 2006	Gynäkologie, Kliniken Düsseldorf Benrath Innere Medizin, Kliniken Düsseldorf Benrath Chirurgie, Sanitätsbetrieb Bozen/Italien

Berufliche Tätigkeit:

Seit Januar 2007	Assistenzärztin, Klinik für Innere Medizin, Kliniken Düsseldorf Benrath

Störungen des Mitochondrialen Trifunktionellen Proteins Genotyp-Phänotyp Analyse | Zusammenfassung

vorgelegt von Astrid Sperk

Die vorliegende Arbeit umfasst die molekulargenetische und klinische Charakterisierung von 16 Patienten mit klinischem und/oder biochemischem Hinweis auf eine Störung des MTP-Komplexes.

Die molekulare Charakterisierung ergab ausgesprochene molekulare Heterogenität. Von 16 Patienten trugen 5 nach molekulargenetischer Charakterisierung die Diagnose eines isolierten LCHAD-Mangels mit der homozygoten E474Q Mutation. Die übrigen Patienten wurden als α- bzw. ß-MTP-Mangel einklassifiziert.

Die Letalität lag in der Gesamtgruppe mit 8/16 (50%)Patienten sehr hoch. Hinsichtlich der Genotyp-Phänotyp-Klassifikation präsentierten sich sowohl Patienten mit einem LCHAD-Mangel als auch Patienten mit einem MTP-Mangel mit schweren oder milden Manifestationsformen. Beim LCHAD-Mangel kam es bei identischer homozygoter E474Q Mutation zu asymptomatischen, milden und auch letalen Verläufen. Auch Patienten, die im erweiterten Neugeborenenscreening identifiziert wurden zeigten ein heterogenes Outcome. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die klinische Verlaufsform des MTP- bzw. LCHAD-Mangels unabhängig von der Art und der Lokalisation der Mutation im Protein ist. Insgesamt ist es derzeitig nicht möglich, anhand der zugrunde liegenden Mutation das Risiko und die Präsentationsform einer symptomatischen Erkrankung abzuschätzen. Bemerkenswert ist allerdings, dass milde Verläufe nur dann vorliegen, wenn mindestens eine Mutation an Position 474 in der α-Untereinheit liegt. Bedeutsam ist auch die Beobachtung, dass letale Verläufe durch Einführung des erweiterten Neugeborenen-Screenings größtenteils verhindert werden können. Ein unverzichtbarer Aspekt der molekulargenetischen Untersuchung ist die Möglichkeit der Pränataldiagnostik bei weiterem Kinderwunsch der Eltern. Eine Pränataldiagnostik ist beim LCHAD/MTP-Mangel aufgrund der nicht sicher vorhersehbaren Symptome und der neurologischen Langzeitkomplikationen unbedingt anzuraten.

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