

**Der primäre Carnitin-Mangel im erweiterten
Neugeborenen-Screening**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Mandy Kliemann, geb. Horn
aus Frankfurt (Oder)**

Gießen, 2010

**Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des
Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Abteilung Kinderkardiologie
Leiter: Prof. Dr. D. Schranz**

in Kooperation mit dem Screening-Zentrum Hessen,

Hessisches Kindervorsorgezentrum

Leiter: Prof. Dr. E.W. Rauterberg

Gutachter: Prof. Dr. Kreuder

Gutachter: Prof. Dr. Geyer

Tag der Disputation: 18.06.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Defekte im Carnitin – Stoffwechsel.....	1
1.1.1	Einführung.....	1
1.1.2	Carnitin – Zyklus und Fettsäure – β – Oxidation.....	2
1.1.3	Primärer Carnitin – Mangel.....	4
1.1.4	Diagnostik.....	6
1.1.5	Therapie des Primären Carnitin – Mangels.....	7
1.2	Das OCTN2 – Protein und dessen Funktion.....	7
1.2.1	Mutationen im OCTN2 – Protein.....	8
1.3	Neugeborenen – Screening.....	8
1.3.1	Das erweiterte Neugeborenen – Screening.....	9
1.3.2	Carnitin – Mangel und erweitertes Neugeborenen – Screening....	13
1.4	Fragestellung.....	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Untersuchte Population.....	15
2.1.1	Neugeborenen – Screening.....	15
2.1.2	symptomatische Patienten mit OCTN2 – Defizienz.....	16
2.1.3	Mütter mit OCTN2 – Defizienz.....	16
2.2	Aufarbeitung der Trockenblutkarte.....	17
2.3	Tandem – Massenspektrometrie.....	17
2.4	Mutationsanalyse.....	18
2.4.1	Gewinnung genomischer DNA.....	18
2.4.2	Messung der DNA – Ausbeute.....	19
2.4.3	Die Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR).....	20
2.4.4	Praktische Durchführung der PCR.....	22
2.4.5	Reinigung des PCR Produktes.....	23
2.4.6	Sequenzierung.....	24
2.5	Berechnungen.....	26
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Ergebnisse der Tandem – Massenspektrometrie.....	27
3.1.1	Inzidenz der OCTN2 – Defizienz in Hessen.....	30

3.1.2	Qualitätskriterien.....	31
3.2	Ergebnisse der Mutationsanalyse.....	33
3.2.1	Exon-Amplifikation des <i>SLC22A5</i> (<i>OCTN2</i>) – Gens.....	33
3.2.2	Neugeborene mit <i>OCTN2</i> – Defizienz.....	36
3.2.3	Selektive Patienten mit <i>OCTN2</i> – Defizienz.....	38
3.2.4	Mütter mit <i>OCTN2</i> – Defizienz.....	40
4	Diskussion.....	43
4.1	Diskussion der Ergebnisse.....	43
4.1.1	Ergebnisse aus dem Neugeborenen – Screening.....	43
4.1.2	Ergebnisse aus der Mutationsanalyse.....	44
4.2	Limitationen.....	47
4.3	Schlussfolgerungen.....	48
5	Zusammenfassung.....	49
	Summary.....	50
6	Abkürzungsverzeichnis.....	51
7	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	53
8	Literaturverzeichnis.....	55
9	Anhang.....	61
	Erklärung zur Dissertation.....	67
	Danksagung.....	68
	Lebenslauf.....	69

1 Einleitung

1.1 Defekte im Carnitin-Stoffwechsel

1.1.1 Einführung

Carnitin (β -Hydroxy- γ -Trimethylammonium Butyrat) ist ein endogenes Amin, das als essentieller Cofaktor für die β -Oxidation beim transmembranären Transport langkettiger Fettsäuren durch die innere Mitochondrienmembran fungiert. Die Aufnahme von Carnitin aus dem Plasma in das Zytosol der Zelle ist an einen hoch-affinen, Natrium-abhängigen organischen Kation-Transporter (OCTN2) gebunden. [11]

Carnitin bindet intramitochondriale und zytosolische Acyl – Rückstände und hilft diese zu eliminieren. Dieser Mechanismus ist essentiell für die Bindung und Abgabe von abnormen organischen Säuren bei verschiedenen Organoazidämien und erklärt den daraus resultierenden sekundären Carnitinmangel. Die Carnitin – Konjugation erniedrigt die Zahl der an Coenzym A (CoA) gebundenen Acyl – Reste und erhöht das Verhältnis von freiem zu acyliertem CoA. [3] Eine weniger gut bekannte Funktion von Carnitin besteht, als Transportmolekül für Fettsäuren zwischen verschiedenen Organellen (Peroxisomen, Mitochondrien, Microsomen) zu fungieren. Die Konjugation von verschiedenen Acyl–Resten mit Carnitin ergibt unterschiedliche Acyl – Carnitine, die diagnostisch im Neugeborenen–Screening erfasst werden können. Das Muster dieser Acyl – Carnitine ist die Basis für das erweiterte Neugeborenen - Screening mit der Tandem – Massen – Spektrometrie (MS/MS) [19]

In der durchschnittlichen Ernährung Erwachsener wird der tägliche Carnitin Bedarf zu 75%, hauptsächlich über Fleisch und Milchprodukte, gedeckt. [4, 25, 35] Der Rest muss endogen aus Lysin und Methionin synthetisiert werden. [30] Dass strikte Vegetarier dennoch ihren Carnitinspiegel aufrecht erhalten

können, weist darauf hin, dass sie nicht nur Carnitin produzieren, sondern effizient über die renal-tubuläre Reabsorption aufsparen. [26]

1.1.2 Carnitin – Zyklus und Fettsäure – β – Oxidation

Carnitin ist verantwortlich für den Transport von langkettigen Fettsäuren (C16-20) aus dem Zytoplasma in die mitochondriale Matrix. [33]

Während Fastenperioden werden Fettsäuren als Substrat für die β – Oxidation in der Leber, dem Skelett – und Herzmuskel verwendet. Das Gehirn ist nicht in der Lage, direkt Fettsäuren zu oxidieren, aber oxidiert Ketonkörper, die als Produkte von Acyl – CoA und Acetocacyl – CoA aus der β – Oxidation hervorgehen. Bei Defekten in der Fettsäure-Oxidation können die aus dem Fettgewebe gelösten Fette nicht weiter verarbeitet werden und akkumulieren in der Leber, in Herz- und Skelettmuskel (Abb. 1).

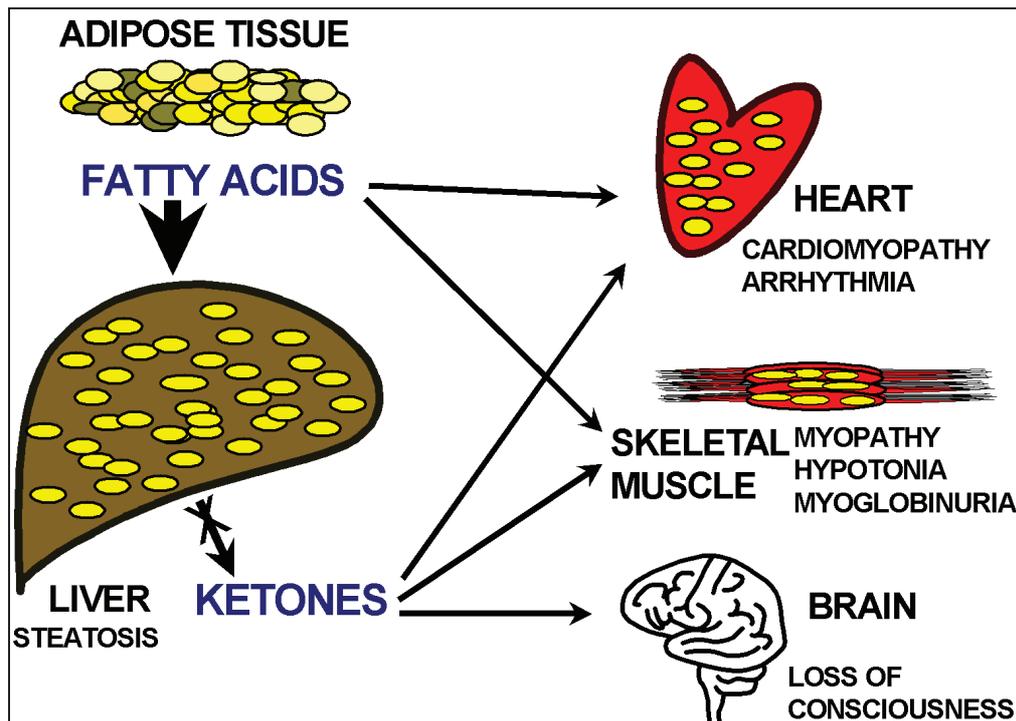


Abb. 1: Fettsäure-Oxidation während des Fastens [19]

Die Folge sind Steatosis und verminderte Bereitstellung von Ketonkörpern, die während Glukosemangel als alternative Energielieferanten für Herz-, Skelettmuskel und Gehirn fungieren. Zudem wird in der Leber durch Acetyl-

CoA die Pyruvat – Carboxylase aktiviert, die die Glukoneogenese begünstigt. [19]

Bei Defekten der Fettsäure-Oxidation kann Fett als Energielieferant nicht genutzt werden, Glukose wird vermehrt konsumiert, ohne dass die Regeneration via Glukoneogenese stattfinden kann. Die Folge sind Hypoglykämien, die in Ermangelung eines verwertbaren Energienachschubs zu einer Beeinträchtigung der Hirnfunktion und zu Bewusstlosigkeit führen.

Fett kann dann zum einen direkt im Herz – und Skelettmuskel akkumulieren und die Organ-/Gewebefunktion beeinträchtigen. Zum anderen können Fettsäuren und langkettige Acylcarnitine die elektrische Aktivität von Herzmuskelzellen verändern, was zu Arrhythmien führen kann.

Fettsäuren werden normalerweise aus dem Fettgewebsspeicher mobilisiert und sind im Blut hauptsächlich an Albumin gebunden. Nach ihrem Eintritt in die Zellen über spezifische Membran – Transporter, werden die Fettsäuren mit Hilfe der Acyl – CoA – Synthetase an Coenzym A konjugiert. Die Konjugation der Fettsäuren an Carnitin ist Voraussetzung zum Übertritt in das Mitochondrium. Carnitin reichert sich über einen hoch – affinen OCTN2 Carnitin Transporter in Herz- und Muskelzellen sowie in den Nierentubuluszellen an, während in den Hepatozyten in der Leber ein niedriger – affiner OCTN1 Transporter mit hoher Kapazität vorhanden ist. [30] Im Zellinneren geht Carnitin mit Hilfe der Carnitin – Palmitoyl – Transferase 1 (CPT 1), die an der Innenseite der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, eine Esterbindung mit langkettigen aktivierten Fettsäuren (Acyl – CoAs) ein. Diese Carnitinester (Acylcarnitine) können mit Hilfe der Carnitin – Acylcarnitin – Translokase (CACT) die innere Mitochondrienmembran überwinden, werden dort durch die Carnitin – Palmitoyl – Transferase 2 (CPT 2) wieder in Carnitin und Acyl – CoA – Thioester gespalten. Das frei werdende Carnitin kann erneut die Mitochondrienmembran passieren und gelangt so wieder in das Zytoplasma, während die Acyl – CoA – Thioester in die β – Oxidation eingeschleust werden (Abb. 2).

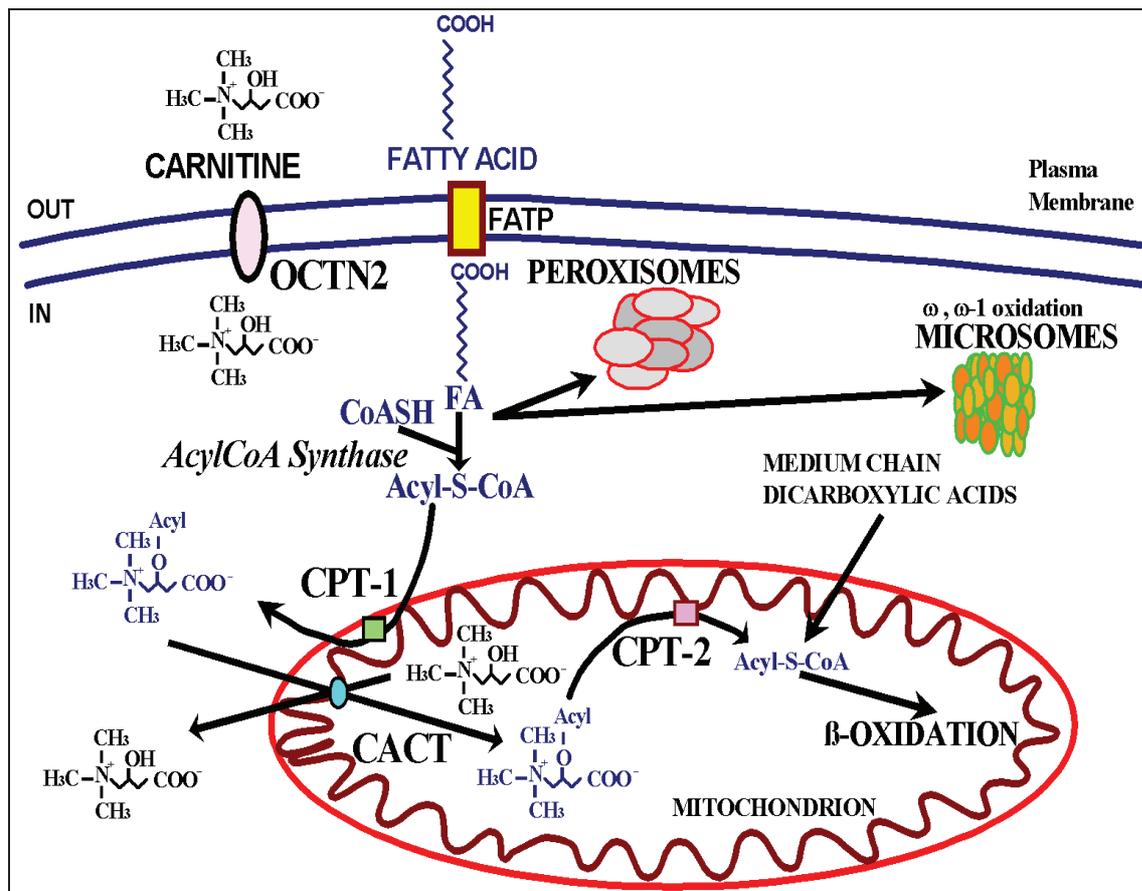


Abb. 2: Carnitin – Zyklus und Fettsäure – β – Oxidation [19]

1.1.3 Primärer Carnitin – Mangel

Der primäre Carnitin – Mangel (OMIM 212140) ist eine autosomal rezessive Erkrankung der Fettsäure Oxidation. Ursache ist eine Mutation im *SLC22A5*-Gen, das für den spezifischen Natrium- abhängigen Carnitin - Transporter OCTN2 kodiert.

Die Inzidenz wird in der japanischen und australischen Population mit 1:40 000 bzw. 1:37.000 – 1:100.000 angegeben. In Europa und den USA wurde sie bisher nicht definiert, aus Fallberichten wird aber eine ähnlich hohe Inzidenz angenommen. Ungefähr 0,5% der Bevölkerung überträgt ein defektes Allel des *SLC22A5*-Gens (Heterozygotenfrequenz 1:200) der Gene für die Erkrankung. [10, 42] Es handelt sich um die zweithäufigste Erkrankung der

Fettsäure-Oxidation nach dem Medium – Chain Acyl – CoA – Dehydrogenase – Defekt (MCAD – Mangel) [2]

Das Fehlen oder die Fehlfunktion des Carnitin – Transporters hat einen renalen Verlust an Carnitin zur Folge, der sich in stark erniedrigten niedrigen Serum-/ Plasma-Carnitinspiegeln (0-5 $\mu\text{mol/l}$, normal 25-50 $\mu\text{mol/l}$) und in einem erniedrigten intrazellulären Carnitin – Gehalt widerspiegelt. Patienten mit primärem Carnitin – Mangel verlieren 90-95% ihrer Carnitin – Reserven über den Urin (fraktionelle tubuläre Rückresorption < 10 %; normal > 90 %) , während ihre heterozygoten Eltern 2-3 mal mehr als normal über den Harn verlieren, was die mild erniedrigten Carnitin - Spiegel erklärt. [29]

Das klinische Bild beim primären Carnitin – Mangel ist bunt und kann sich durch hypoketotische Hypoglykämien, hepatische Enzephalopathie, Reye Syndrom, Hypotonie, Kardiomyopathie (CM) und plötzliche Todesfälle äußern. [38]

Betroffene Patienten fallen vorwiegend metabolisch oder kardial auf, wobei die metabolische Manifestation meist innerhalb der ersten zwei Lebensjahre auftritt. Typischerweise fallen diese Kinder mit Nahrungsverweigerung während einer Gastroenteritis oder einem Infekt der oberen Luftwege auf. In der Folge werden sie lethargisch und reagieren vermindert auf Ansprache. Zusätzlich besteht meist ebenfalls eine Hepatopathie. Laborchemisch fallen eine Hypoglykämie ohne oder mit nur geringer Konzentration von Ketonkörpern im Urin, eine milde Hyperammonämie sowie variabel erhöhten Leberwerten auf. Auch die Creatin Kinase (CK) kann mild erhöht sein. Kinder, die nicht sofort mit intravenöser Glukosezufuhr behandelt werden, fallen ins Koma und versterben.

Die Kardiomyopathie tritt meist erst bei älteren Patienten in Erscheinung und ist manchmal mit einer muskulären Hypotonie verbunden. Sie kann auch bei älteren Patienten mit einer primär metabolischen Manifestation gesehen werden, obwohl diese Patienten von der kardialen Seite zu diesem Zeitpunkt asymptomatisch sind. [19] Zudem werden in der Literatur Patienten

beschrieben, die ihr Leben lang asymptomatisch bleiben, obwohl andere mit nachweislich derselben homozygoten Mutation im *SLC22A5*-Gen in frühester Kindheit mit einem dem Reye – Syndrom ähnlichen Bild auffallen und erst über diesen „Indexpatienten“ die anderen Familienmitglieder diagnostiziert werden. [34] In anderen Familien, bei deren Mitgliedern identische Mutationen nachgewiesen wurden, sind beide Manifestationsformen (akute metabolische und [kardio]myopathische Manifestation) oder unterschiedliche Ausprägungen des Krankheitsbildes beschrieben. Das lässt vermuten, dass andere metabolisch-genetische Faktoren und exogene Faktoren, wie das Angebot von Carnitin in der Nahrung, Infektionen oder Fasten, das den Bedarf an Fettsäure-Oxidation steigert, einen großen Einfluss auf die Festlegung des Phänotyps haben. [39]

1.1.4 Diagnostik

Wegweisend ist der niedrige Serum Carnitin – Spiegel, wobei freies Carnitin und Acyl – Carnitin extrem erniedrigt sind (freies Carnitin < 5 µmol/l, normal 25-50 µmol/l; Summe freies Carnitin + Acylcarnitine > 15 µmol/l, normal > 35). Im Urin zeigen die organischen Säuren keine einheitliche Abnormalität, wenngleich über eine unspezifische Dicarboxyl – Azidurie berichtet wird. [29] Die Diagnose wird durch die verminderte Aufnahme von Carnitin in Haut - Fibroblasten des Patienten bestätigt, welche gewöhnlich unter 10% des Wertes der Kontrollgruppe liegt. Es besteht eine Korrelation zwischen der Rest – Carnitin – Transport – Aktivität und der Schwere der Mutation, nonsense Mutationen sind mit einer fast völlig fehlenden Carnitin – Transport – Aktivität verbunden. [19] Bei heterozygoten Patienten findet sich ein halb normaler Carnitin-Transport in ihren Fibroblasten; sie haben gegebenenfalls sogar einen grenzwertig niedrigen Serum Carnitin – Spiegel. [29]. Die fraktionelle tubuläre Rückresorption von freiem Carnitin ist massiv erniedrigt (< 10 %; normal > 90 %), während die Rückresorption von Acylcarnitinen nicht signifikant eingeschränkt ist.

Zu unterscheiden ist der primäre Carnitin – Mangel von anderen Erkrankungen, die mit einem niedrigen Serum Carnitin – Spiegel einhergehen, wie Organazidämien, Defekte in der Fettsäure – Oxidation, oder aber auch bei Patienten mit einem generalisierten Tubulusschaden (z.B. Lowe-Syndrom, nephropathische Zystinose), bei dem dann nicht nur Carnitin über die Niere verloren geht, sondern auch z.B. Bikarbonat, Phosphat und Aminosäuren.

1.1.5 Therapie des Primären Carnitin – Mangels

Eine kausale Therapie des primären Carnitin – Mangels ist heute noch nicht möglich, allerdings sprechen die Patienten gut auf eine Carnitin - Substitution von 100- 400 mg/kg KG/d an. Bei frühzeitigem Beginn können irreversible Organschädigungen verhindert werden. Die Dosis sollte durch regelmäßige Bestimmungen des Serum Carnitin – Spiegel individuell angepasst werden. [19, 31]

1.2 Das OCTN2 – Protein und dessen Funktion

Das *SLC22A-Gen*, das für das OCTN2-Protein kodiert, ist auf dem Chromosom 5q31 lokalisiert und besteht aus 10 Exons; das für OCTN2 spezifische DNA-Transkript umfasst 31 kb. Das OCTN2 Polypeptid besteht aus 557 Aminosäuren mit 12 mutmaßlichen transmembranären Domänen und zeigt eine große Homologie zu dem OCTN1 Transporter. [43] Der OCTN2 funktioniert sowohl als Natrium abhängiger Carnitin – Transporter als auch als Natrium unabhängiger Transporter für andere organische Kationen. [11] Diese Tatsache ist wichtig für das Verständnis des medikamentös oder toxisch induzierten sekundären Carnitin – Mangels. Es gibt eine große Anzahl verschiedener organischer Kationen und Zwitterionen, die stark mit dem OCTN2 Transporter um die intrazelluläre Aufnahme von Carnitin konkurrieren, wie die Ionenkanalblocker wie Verapamil und Chinidin oder Cephalosporine und das Alkaloid Emetin, oder nur leichte Inhibitoren des Carnitin - Transportes wie Valproinsäure. [28]

1.2.1 Mutationen im OCTN2 - Protein

Für den Carnitin – Transporter sind verschiedene Mutationen die zum Funktionsverlust und somit zum klinischen Erscheinungsbild des primären Carnitin - Mangels führen bekannt. Viele Studien beschreiben nonsense und missense Mutationen für den OCTN2 (Abb. 3). Beide führen zu einer völlig aufgehobenen Funktion des Proteins, Carnitin zu transportieren, oder sind mit einer Restaktivität des Carnitin – Transporters assoziiert. Allerdings besteht keine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp. [1, 7, 14, 29, 38, 39, 41]

Zudem ist der Transport anderer organischer Kationen von dem Funktionsverlust nicht betroffen ist. [11]

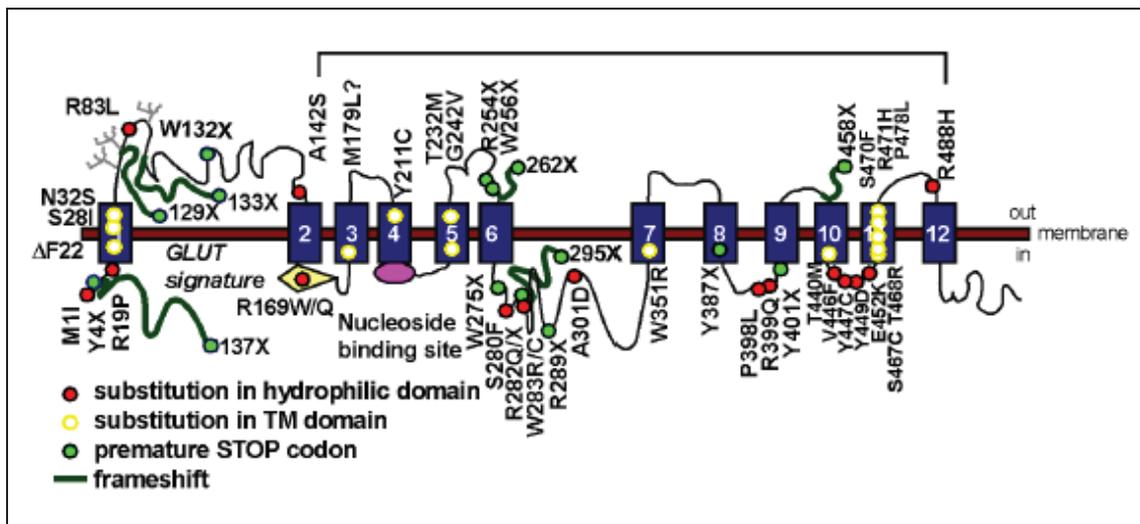


Abb. 3: Mutationen im OCTN2 – Protein beim primären Carnitin – Mangel [19]

1.3 Neugeborenen – Screening

Ziel eines Neugeborenen – Screenings ist es, behandelbare Stoffwechselerkrankungen mit ausreichender Inzidenz zu erkennen, bevor irreversible Schädigungen eingetreten sind. Sinnvoll ist ein Screening aller Neugeborenen dann, wenn die Erkrankung erkannt werden kann, bevor erste Symptome auftreten, die mit einer rechtzeitig eingeleiteten Therapie verhindert werden können. Gleichzeitig muss eine Beunruhigung der gesunden Bevölkerung durch falsch positive Ergebnisse vermieden werden, was eine hohe Sensitivität und Spezifität der verwendeten Methode

voraussetzt. Schließlich müssen auch finanzielle Überlegungen bezüglich der Probengewinnung, Analytik und Nachbetreuung betroffener Patienten in ein Screeningprogramm mit einfließen. [5]

Erste Massentests an Neugeborenen wurden in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts mit Testung auf die Phenylketonurie mit dem sogenannten Guthrie – Test (mikrobiologischer Hemmtest) durchgeführt. [9, 18] Der Guthrie – Test wurde in den folgenden Jahren um zahlreiche andere Stoffwechselerkrankungen (z.B. konnatale Hypothyreose, Adrenogenitales Syndrom, Galaktosämie, Ahornsirupkrankheit) erweitert. [13] Ein flächendeckendes Screening wurde Ende der 60er (1969 BRD, 1971 DDR) als staatlich finanziertes Vorsorgeprogramm eingeführt. Dafür wurden dieselben Filterpapierestkarten wie beim ursprünglichen Guthrie – Test benutzt.

1.3.1 Das erweiterte Neugeborenen – Screening

Anfang der 90er Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts wurde die Tandem - Massenspektrometrie (TMS) als Methode in das Neugeborenen - Screening eingeführt. Dadurch war es nicht nur möglich, den Screeningumfang unter anderem auf Defekte in der Fettsäureoxidation auszuweiten, sondern auch die Rate der falsch positiven Ergebnisse z. B. für die PKU deutlich zu senken. Diese Methode bietet die Möglichkeit, mehr als 30 Stoffwechselerkrankungen innerhalb kurzer Zeit aus einem Tropfen getrockneten Blutes zu detektieren. [5] Außerdem ist durch die hohe Sensitivität der Methode eine sichere Erkennung der Erkrankung unabhängig von der Proteinzufuhr möglich, was eine frühere Durchführung des Screenings (nach der 36. Lebensstunde) möglich und sinnvoll machte. Dadurch können besonders Neugeborene mit einer Ahornsiruperkrankung einer diätetischen Therapie vor einer metabolischen Entgleisung zugeführt werden. [27]

Die Verfügbarkeit der TMS und die daraus resultierende Zunahme an detektierbaren Krankheiten machte eine Neustrukturierung des Neugeborenen – Screenings in Deutschland nötig. In der 2005 herausgegebenen Richtlinie für das Neugeborenen - Screening in Deutschland sind die Ziele für das Neugeborenen - Screening erneut definiert und in der Tabelle 1 aufgeführt. In der Richtlinie wurden neben den 14 Zielkrankheiten (Tabelle 2) auch die Untersuchungsmethode (TMS) und unter anderem auch Untersuchungszeitpunkt, Information und Aufklärung, Probengewinnung und –versand, Befundrücklauf und Dokumentation festgelegt. Wichtig war auch, die Akzeptanz in der Bevölkerung wieder zu erhöhen, weswegen eine umfassende Information und Aufklärung über das Neugeborenen – Screening - Programm gestartet und eine schriftliche Einwilligung eines Elternteils obligat wurde. [8, 15, 16, 20, 27]

1	Verfügbarkeit für die gesamte Bevölkerung
2	flächendeckende und vollständige Erfassung
3	umfassende Aufklärung von Eltern und Öffentlichkeit
4	Vermeidung unnötiger Belastung von Familien gesunder Neugeborener
5	zeit- und fachgerechte Probengewinnung
6	sichere und vollständige Dokumentation
7	klare Verantwortlichkeiten.
8	richtlinienkonformer Screeningumfang und qualitätsgesicherte Laboranalytik.
9	raschen und vollständigen Befundrücklauf aller Resultate
10	Bildung regionaler Screeningzentren zur Sicherung des primären Screeningziels der frühen und sachgemäßen Intervention
11	niedriger Verwaltungsaufwand und möglichst geringe Kosten.

Tabelle 1: Ansprüche an ein Neugeborenen -Screening [8]

Einleitung

	Krankheiten	Kinderrichtlinie	Hessisches Programm
Konventionelle Testverfahren	Hypothyreose	x	X
	Adrenogenitales Syndrom (AGS)	x	X
	Biotinidase-Mangel	x	X
	Klassische Galaktosämie (Gal-Uridyltransferase Mangel)	x	X
Tandem-Massenspektrometrie	Aminoazidopathien:	PKU und HPA	PKU
		MSUD	MSUD
			HCY
			CIT
			ASA
			TYR I
	FettsäureOxidationsdefekte	MCAD	MCAD
		VLCAD	VLCAD
		LCHAD	LCHAD
			MAD
	Carnitinzyklus-Defekte	CPT I	CPT I
		CPT II	CPT II
		CACT	CACT
			CUD
	Organazidopathien	GA I	GA I
		IVA	IVA
			HMG
			MUT
			3 MCC
			CbIA, B
		PROP	
		BKT	

Tabelle 2: Zielkrankheiten des Neugeborenen – Screenings [8, 20]

In der Leitlinie sind nur 14 Zielkrankheiten festgelegt, da nur für diese eine ausreichende Methodensicherheit nachgewiesen ist, obwohl durch die TMS ohne höheren Kosten- oder Zeitaufwand eine Erweiterung leicht möglich wäre. [8, 20]

Wenn in einem der regionalen Screeningzentren weitere Erkrankungen detektiert werden, soll die Versorgung dieser Patienten gegenwärtig nur in wissenschaftlich begleiteten Programmen erfolgen, damit durch Informationen über die Diagnostik und Behandlung dieser Erkrankungen das Neugeborenen - Screening zum Nutzen der Bevölkerung weiterentwickelt werden kann.

Als Besonderheit in Deutschland ist das hessische Screeningprogramm zu nennen, das die Möglichkeit gibt, weitere Zielkrankheiten in das Screening aufzunehmen. Hierbei können die Eltern entscheiden, ob sie ein Screening nach der deutschen Kinderrichtlinie oder das erweiterte hessische Programm wünschen, bei der zusätzlich zu den in Tabelle 3 aufgelisteten Krankheiten noch auf Argininämie, Methionin-Adenosyl-Transferase-Mangel und Malonazidurie getestet wird. [20]

1.3.2 Carnitin – Mangel und erweitertes Neugeborenen – Screening

In den letzten Jahren sind Patienten mit primärem Carnitin – Mangel über das Neugeborenen – Screening aufgefallen. Dabei besteht die Auffälligkeit im Acyl – Carnitin – Profil darin, dass der freie Carnitin – Spiegel sowie das aller Acyl – Carnitin – Arten erniedrigt ist. Carnitin passiert die Plazenta, um dem Fetus zu dessen Wachstum zur Verfügung zu stehen. Nach der Geburt fällt der Serum Carnitin – Spiegel physiologischerweise ab. Allerdings kann der Carnitin – Spiegel, wenn das Screening sehr früh abgenommen wurde, auch falsch normal sein. Aus diesem Grunde empfehlen einige Autoren, das Screening erst nach der ersten Lebenswoche abzunehmen oder gegebenenfalls zu wiederholen. Zudem wurden einige Neugeborene identifiziert, die initial einen extrem niedrigen Carnitin – Spiegel aufwiesen, deren Carnitin-Spiegel aber auffallend rasch nach der Substitution von Carnitin anstieg. Diese Patienten

hatten keinen primären Carnitin – Mangel, sondern einen maternal erworbenen Carnitin-Mangel; die Mütter dieser Kinder waren asymptomatisch. Das bedeutet, dass ein niedriger Carnitin – Spiegel der Neugeborenen den primären Carnitin – Mangel der Mütter demaskieren kann. [19, 31]

1.4 Fragestellung

Die nachfolgenden Fragestellungen sollen in dieser Untersuchung bearbeitet werden

1. Inzidenz des im Neugeborenen – Screening detektierten Carnitin – Transporter – Defektes in Hessen
2. Qualitätskriterien (Sensitivität, Spezifität, positiver Vorhersagewert, Recallrate) des hessischen Neugeborenen - Screening auf OCTN2-Defizienz
3. vergleichende Mutationsanalyse bei Kindern mit OCTN2 – Defizienz, die im Neugeborenen - Screening aufgefallen sind, und Kindern, die aufgrund des primären Carnitin – Mangels klinisch symptomatisch geworden sind.
4. das Mutationsspektrum bei Müttern mit OCTN2-Defizienz, die im Rahmen des NG-Screenings ihrer Kinder detektiert wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchte Population

2.1.1 Neugeborenen – Screening

In die Studie aufgenommen wurden alle Neugeborenen in Hessen, die im Zeitraum vom 1.7.2005 bis zum 30.6.2009 am hessischen Neugeborenen – Screening in Erweiterung der Richtlinie der Interdisziplinären Screeningkommission der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin teilnahmen. Die Teilnahmequote betrug > 99,5 % aller in Hessen geborenen Neugeborenen im Zeitraum 1.7.2005 – 31.12.2006. Aufgrund der rechtlichen Verpflichtungen aller geburtshilflichen Einrichtungen und in der Geburtshilfe Tätigen in Hessen, das Neugeborenen – Screening am Screeningzentrum Hessen vornehmen zu lassen, lag die Teilnahmequote ab dem 1.1.2007 bei > 99,9 %. Den Neugeborenen wurde frühestens im Alter von 36 Stunden Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte entweder als Kapillarblutentnahme aus der Ferse, oder falls noch andere Blutentnahmen nötig waren, venös. Das entnommene Blut wurde auf Filterpapierkarten getropft.

Die Referenzwerte für freies Carnitin wurden mit der gleichen Methodik an einer Referenzpopulation von 20.000 reifen Neugeborenen im Zeitraum 1.1. – 1.7.2005 bestimmt.

Bei Unterschreiten eines Grenzwertes (cut-off) von - 3,0 SD (8,8 $\mu\text{mol/l}$; entspricht der 0,1%-Perzentile) für freies Carnitin wurde sofort eine Kontrollkarte angefordert und untersucht.

Bei Unterschreiten eines Grenzwertes von -3,5 SD (4,8 $\mu\text{mol/l}$; entspricht der 0,025 % - Perzentile) wurden die Kinder sofort kinderärztlich untersucht; nach Abnahme einer Kontrollkarte wurde sofort eine Carnitin-Supplementierung mit 100 mg/kg/Tag begonnen. Die obligate Konfirmationsdiagnostik umfasste die Bestimmung von freiem Carnitin und Acyl – Carnitin im Plasma mittels Radio –

Enzym – Assay (Routine-Diagnostik im Stoffwechsellabor am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin) und die Mutationsanalyse im *SLC22A5*-Gen und, wenn eine zeitgleiche Urinprobe verfügbar war, wurde im gleichen Labor auch die fraktionelle tubuläre Rückresorption von freiem Carnitin (FTR_{FC}) bestimmt.

2.1.2 symptomatische Patienten mit OCTN2-Defizienz

Hier wurde bei Patienten, die im Rahmen der Diagnostik bei v.a. dilatativer Kardiomyopathie untersucht wurden, als Ursache der Herzmuskelschwäche ein primärer Carnitin – Mangel diagnostiziert.

Auch hier umfasste die Diagnostik die Bestimmung von freiem Carnitin und Acyl – Carnitin im Plasma mittels Radio – Enzym – Assay (Routinediagnostik im Stoffwechsellabor am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin), eine Mutationsanalyse im *SLC22A5*-Gen und, wenn gleichzeitig eine Urinprobe verfügbar war, die Bestimmung der fraktionellen tubulären Rückresorption von freiem Carnitin (FTR_{FC}) im selben Labor. Die Patientenproben wurden uns freundlicher Weise auch von den Universitätskinderkliniken Wien und Freiburg zur Analyse überlassen.

2.1.3 Mütter mit OCTN2-Defizienz

Hier sind Neugeborene im NG – Screening mit erniedrigtem Carnitinspiegeln aufgefallen, bei denen in der weiteren Diagnostik eine heterozygote Mutation im *SLC22A5*-Gen diagnostiziert wurde. Bei den Familienmitgliedern wurde ebenfalls eine Bestimmung von freiem Carnitin und Acyl – Carnitin im Plasma mittels Radio – Enzym – Assay (Routinediagnostik im Stoffwechsellabor am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin), eine Mutationsanalyse im *SLC22A5*-Gen und, wenn gleichzeitig eine Urinprobe verfügbar war, eine Bestimmung der fraktionellen tubulären Rückresorption von freiem Carnitin (FTR_{FC}) im selben Labor. Diese Mütter waren alle asymptomatisch. Hier wurden uns Patientenproben aus dem Dr. von Haunerschen Kinderspital München,

den Universitätskinderkliniken Hamburg – Eppendorf und Erlangen, sowie von Dr. Heinrich Wiggermann, Facharzt für Kinderheilkunde in Schwerte zugesandt.

2.2 Aufarbeitung der Trockenblutkarte

Aus den Trockenblutkarten wurde zunächst ein 3,2mm großer Stanzling aus einem Trockenblutkreis herausgelöst und in eine Vertiefung einer MTPF – Platte gesetzt. Anschließend werden 150µl Interne – Standard – Arbeitslösung in jede Vertiefung mit Stanzling pipettiert und für 20 Minuten auf einem Schüttler bei 900rpm bei Raumtemperatur extrahiert und im Anschluss für 3 Minuten bei 1640 RFC zentrifugiert. Danach werden die Proben für 22 Minuten auf dem Wärmeblock getrocknet.

Der nächste Arbeitsschritt ist die Butylierung des Extraktes. Hierzu werden 60µl butanolische Salzsäure (BuO-Cl) hinzu pipettiert, für 2 Minuten auf dem Schüttler bei 900rpm vermischt und anschließend für 13-14 Minuten bei 65°C im Wärmeschrank inkubiert. Danach werden die Proben für 30 Minuten auf dem Wärmeblock eingedampft. Zuletzt werden die Proben für 5 Minuten abgekühlt und können dann direkt für die Tandem – Massenspektrometrie vorbereitet oder im Kühlschrank gelagert werden.

2.3 Tandem-Massenspektrometrie

Das Prinzip der klassischen Massenspektrometrie besteht darin, dass Teilchen in einem Hochfrequenzfeld gemäß ihrer Masse aufgetrennt werden können. Ein Problem dabei besteht aber darin, dass auch chemisch unterschiedliche Stoffe, die eine gleiche Massenzahl besitzen, simultan detektiert werden und ein gemeinsames Signal ergeben. Dieses Problem wurde mittels Hintereinanderschalten zweier Massenspektrometer (Tandem – Massenspektrometrie) gelöst. Hierbei werden im Vakuum Ionen in einem ersten Massenspektrometer in einem Hochfrequenzfeld massenabhängig in Schwingung versetzt. In Abhängigkeit von der angelegten Spannung können nur Ionen einer Masse das Feld passieren. Anschließend werden die vorselektierten Teilchen in einer Kollisionszelle mit einem inerten Gas, z.B.

Argon, in Verbindung gebracht, wo sie in spezifische Bruchstücke zerfallen. [27] Aminosäuren spalten dabei immer ein neutrales Teilchen bei 102 Dalton ab, während Acylcarnitine den Fettsäurerest und die quarternäre Ammoniumgruppe abgespalten und ein gemeinsames Fragment – Ion liefern, das mit der Masse 85 Dalton detektiert wird. [5, 27]

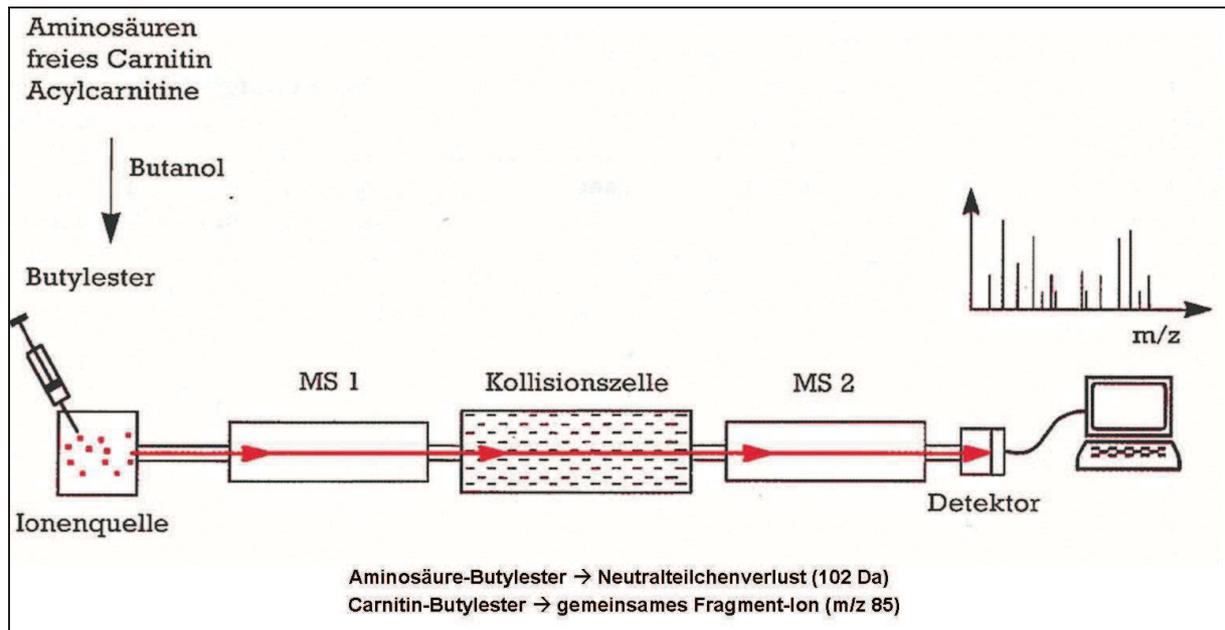


Abb4: schematische Darstellung der Funktionsweise der Tandem – Massenspektrometrie [27]

2.4 Mutationsanalyse

2.4.1 Gewinnung genomischer DNA

Zur Gewinnung der genomischen DNA verwendeten wir das *Qiamp DNA mini Kit*[®] und EDTA Blut. Der erste Schritt war der sogenannte Proteaseverdau, bei dem 200µl Patientenblut mit Proteinase K in ein 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend mit 200µl AL – Puffer versetzt (Lysepuffer) wurden. Diese Lösung wurde mit dem Tischrührer vermischt und dann für 10 Minuten bei 56°C inkubiert.

Anschließend wurde diese Lösung mit 200µl 100%igem Ethanol versetzt und erneut gemischt. Das gesamte Gemisch wurde nun in eine sterile 2ml Säule

pipettiert und 1 Minute bei 8 000rpm zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein offenes 1,5ml Gefäß gesetzt und 500µl AW 1 Puffer hinzu gegeben um das Ganze erneut für 1 Minute bei 8 000rpm zu zentrifugieren. Anschließend wurde die Säule in ein sauberes 1,5ml Gefäß gesetzt und mit dem 2. Waschpuffer, AW 2 Puffer, versetzt und für 3 Minuten bei 14 000rpm zentrifugiert. Die Säule wurde nun in ein steriles 1,5ml Eppendorfgefäß gesetzt mit 125µl Wasser versetzt und die Lösung für 5 Minuten bei Raumluft inkubiert. Anschließend erfolgte eine abschließende Zentrifugation bei 8 000rpm für 1 Minute. Danach konnte aus dem Eppendorfgefäß die DNA entnommen und die Konzentration spektralfotometrisch gemessen werden.

2.4.2 Messung der DNA – Ausbeute

Um für die Weiterverarbeitung der DNA eine einheitliche Konzentration zu haben wurde die Ausbeute an DNA spektralphotometrisch gemessen. Dazu wurde in einem Aliquot von 100µl, bestehend aus 5µl DNA – Lösung und 95µl Wasser, bei 260 nm die Menge an Nukleinsäuren gemessen. Die optische Dichte bei 280 nm entsprach der Menge an Proteinen, der Wert bei 320 nm diente als Hintergrundkorrektur. Das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Nach Anwendung folgender Formel erhielt man die Konzentration der DNA:

$$\text{DNA Konzentration (ng/}\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times 0,05^* \times 40$$

OD = optische Dichte bei 260 nm

* Verdünnungsfaktor

Unsere Ziel-Konzentration betrug 50ng/ μ l. Eine Verdünnung der z.T. höher konzentrierten DNA – Lösung erfolgte mit Tris – Puffer nach der Formel:

$$\left((\text{OD} \div 50) - 1 \right) \times V_{\text{DNA}} = V_{\text{Tris-Puffer}}$$

V = Volumen

Aufbewahrt wurden die DNA Proben bei einer Temperatur von 4° C.

2.4.3 Die Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung von definierten DNA –Sequenzen und wurde maßgeblich von Mullis und Faloona 1987 entwickelt. Es besteht aus drei Reaktionsschritten, die alle temperaturabhängig sind und zyklisch wiederholt werden. Katalysiert wird diese Reaktion von einer hitzestabilen DNA-Polymerase.

Der erste Schritt ist die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C. Danach erfolgt das Anlagern von Oligonucleotiden (Primer; forward und reverse) an die einzelsträngige DNA, das so genannte Annealing. Die Annealingtemperatur hängt von der Länge und dem Gehalt an Guanin/Cytosin der Primer ab und liegt meist zwischen 50 und 70°C. Es werden üblicherweise Primer mit einer Länge von 20-30 Nukleotiden verwendet. Nach der Anlagerung des Primers produziert die DNA-Polymerase einen neuen komplementären Strang zur ursprünglichen DNA – Matrize (Template). Dieser Schritt wird Elongation genannt. Nun kann die Reaktion von neuem beginnen. Die neu synthetisierten DNA – Stränge dienen nun ebenfalls als Template, so dass die Vervielfältigung zunächst exponentiell

stattfindet. Mit zunehmender Zykluszahl kommt es jedoch zu einem Wirkungsverlust der Polymerase, durch zunehmende Anhäufung des PCR – Produktes z. T. zu Rehybridisierungen und zum Zerfall der Nukleotide und somit kaum noch zur Vervielfältigung der Template – DNA, es wird eine Plateauphase erreicht. [23]

Zum Nachweis der Amplifikation verwendeten wir die Gelelektrophorese, mit der Nukleinsäuren, Proteine und andere geladene Teilchen aufgetrennt werden können. Da die DNA negativ geladen ist wandert diese in einem Spannungsfeld zum positiven Pol. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit von der Länge der Nukleinsäureketten, der Größe der Poren und von der angelegten Spannung abhängig, d. h. kleine Ketten wandern in der gleichen Zeiteinheit schneller, weswegen sich die längsten DNA – Fragmente im Teil nahe der negativen Elektrode des Gels befinden.

Die Gele stellten wir mit 1,5g Agarose mit 100ml TAE Puffer her. Die Geltaschen wurden jeweils mit Aliquots aus je 5µl PCR Produkt, 3µl BlueRun und 5µl Wasser beladen. Als Bandenmarker verwendeten wir DNA Molecular Weight Marker XIII; 50 base pair ladder der Firma Roche. Die Gele wurden nach dem Lauf in einem Ethidiumbromidwasserbad für 10 Minuten gefärbt. Aufgrund von Interaktionen lagert sich Ethidiumbromid zwischen benachbarte Purin- und Pyrimidinbasen an. Unter ultraviolettem Licht fluoresziert dieser Farbstoff blau – violett. Die Signalstärke ist proportional zur DNA – Menge. Die Ergebnisse wurden auf Fotopapier dokumentiert.

2.4.4 Praktische Durchführung der PCR

Für jedes Exon wurde zunächst ein PCR Mastermix in einem separaten Raum um Kontaminationen zu vermeiden angesetzt und auf die einzelnen Gefäße verteilt. Dieser bestand aus:

5,0 µl PCR-Puffer

- 4,0 µl dNTP`s (10 mM)
- 1,0 µl Primer-up (20 µM)
- 1,0 µl Primer-do (20 µM)
- 0,5 µl Taq-Gold (2,5 Units) (für Promotor 207, Exon 1
und 10 Hot Star Taq (5 Units)
- 1,0 µl DNA (50ng)
- 37,5 µl H₂O
- ad 50,0 µl

Die DNA wurde dann im Labor in die einzelnen Cups hinzugefügt.

Das Programm für die einzelnen PCRs unterscheidet sich nur in der Annealingtemperatur (T_a).

10 min.	94°C
30 sec.	94°C
60 sec.	T_a °C
<u>120 sec.</u>	<u>72°C + 3 sec./Cycl.</u>
10 min	72°C

35 Zyklen

Primer	Annealingtemperatur (T_a)
5'UTR-Fneu/5'UTR-Rneu	60°C
OC21F2neuA-F/OC21R1 (Ex1)	60°C
OC22F3/OC22R1 (Ex2)	57°C
OC234F2/OC23R3 (Ex3)	55°C
OC24F3neu/OC24R1 (Ex4)	60°C
OC25F3neu/OC25R1 (Ex5)	65°C
OC26F2/OC26R1 (Ex6)	55°C
OC27F3neu/OC27R1 (Ex7neu)	57°C
OC28F2/OC28R1 (Ex8)	55°C
OC29F1/OC28R2 (Ex9)	50°C
OC210F3/OC210R1 (Ex10)	52°C

Tabelle 3: Annealingtemperaturen der jeweiligen Primer. Im Anhang sind die Primer-Sequenzen tabellarisch aufgelistet.

2.4.5 Reinigung des PCR Produktes

Vor der Sequenzierung wurde das PCR – Produkt zunächst mit dem *QIAquick PCR Purification Kit*[®] der Firma QIAGEN von Primern, Nucleotiden, Polymerasen und Salzen gereinigt. Hierzu wurde das PCR Produkt mit dem 5fachen Volumen PB Puffer (Bindungspuffer) in ein 2ml Gefäß vermischt und anschließend in eine 2ml Säule pipettiert und bei 13000rpm für eine Minute zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen, die Säule wieder in das Gefäß gesetzt und über die Säule 740µl PE Puffer (Waschpuffer) gegeben. Dieses Gemisch wurde erneut bei 13000rpm für eine Minute zentrifugiert und das Zentrifugat wieder verworfen. Danach erfolgte eine weite Zentrifugation bei 13000rpm für eine Minute.

Nun wurde die Säule in ein 1,5ml Cup gesetzt und die DNA mit 50µl Wasser eluiert. Das Cup wurde ein letztes Mal bei 13000rpm für eine Minute zentrifugiert. Im Zentrifugat befand sich nun das gereinigte PCR Produkt. Die DNA –Konzentration wurde erneut spektralfotometrisch gemessen.

2.4.6 Sequenzierung

Im letzten Schritt der Mutationsanalyse wurde nun die Sequenz eines Genabschnittes kenntlich gemacht. Dazu wurde zunächst eine Art PCR jedoch nur mit einem Primer (lineare Amplifizierung) und unter Zugabe von fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotiden gestartet.

Dazu wurde eine PCR Mastermix für jeden Primer angesetzt, der sich wie folgt zusammensetzte:

4µl Big Dye Terminator - Premix v. 3.1
2,0µl Sequencing-buffer
1µl Primer (5 µM)
25ng Template (für OC24R1 50ng)
xµl Wasser ad 20µl Gesamtmenge

Das Programm der PCRs unterschied sich auch hier in den Annealingtemperaturen der Primer.

10 sec.	96°C
5 sec.	T _a °C
<u>4 min.</u>	<u>60°C</u>
unendl.	4°C
25 Zyklen	

Primer	T _a forward	T _a reverse
5'UTR-Fneu/5'UTR-Rneu	55°C	60°C
OC21F2neuA-F/OC21R1 (Ex1)	60°C	60°C
OC22F3/OC22R1 (Ex2)	55°C	50°C
OC234F2/OC23R3 (Ex3)	55°C	55°C
OC24F3neu/OC24R1 (Ex4)	50°C	58°C
OC25F3neu/OC25R1 (Ex5)	60°C	58°C
OC26F2/OC26R1 (Ex6)	55°C	55°C
OC27F3neu/OC27R1 (Ex7neu)	55°C	55°C
OC28F2/OC28R1 (Ex8)	50°C	50°C
OC29F1/OC28R2 (Ex9)	55°C	50°C
OC210F3/OC210R1 (Ex10)	50°C	50°C

Tabelle 4: Annealingtemperaturen der Primer bei der Sequenzierung

Im Anschluss daran wird, um die Nucleinsäuren aufzureinigen, eine Ethanolfällung durchgeführt. Dazu werden das Produkt aus der Sequenzierungs – PCR, 3M Natriumacetat und 100%iges Ethanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 14000rpm zentrifugiert. Danach wird der Ethanolüberstand abpipettiert. Auf das Pellet wird dann erneut mit 70%igem Ethanol pipettiert und bei 14000rpm für weitere 20 Minuten zentrifugiert und dann der Ethanolüberstand abpipettiert. Um kleinste Reste von Ethanol zu verdampfen, wurde danach das Pellet 8 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wird das Pellet in Formamid gelöst und wird dann im 16-Kapillar-Sequenzier (ABI 7700) analysiert.

Die nachgewiesenen Sequenzvariationen wurden, sofern nicht bereits beschrieben, mit den beiden computerbasierten Algorithmen Polyphen und SIFT hinsichtlich ihrer möglichen Pathogenität überprüft. Eine Mutation, die zu einer Verkürzung der Proteinsequenz führt (nonsense-Mutation, Verschiebung des Leserasters oder abnormales splicing), wurde als krankheitsauslösend

eingestuft. Die Mutationen wurden mit der Human Gene Mutation Database (vgl. Seite E 1638) und der Datenbank des ARUP Labors verglichen (http://www.aruplab.com/Research&Development/research_main.jsp) Die strukturellen und funktionellen Domänen des OCTN2-Proteins wurden anhand der Informationen der Universal Protein Resource (<http://www.uniprot.org>) eruiert.

2.5 Berechnungen

Die labortechnischen Qualitätskriterien des NG-Screenings wurden nach folgenden Formeln berechnet (vgl. Tabelle 7):

Sensitivität: $A / (A + C)$

Spezifität: $D / (B + D)$

positiv prädiktiver Wert (PPW): $A / (A + B)$

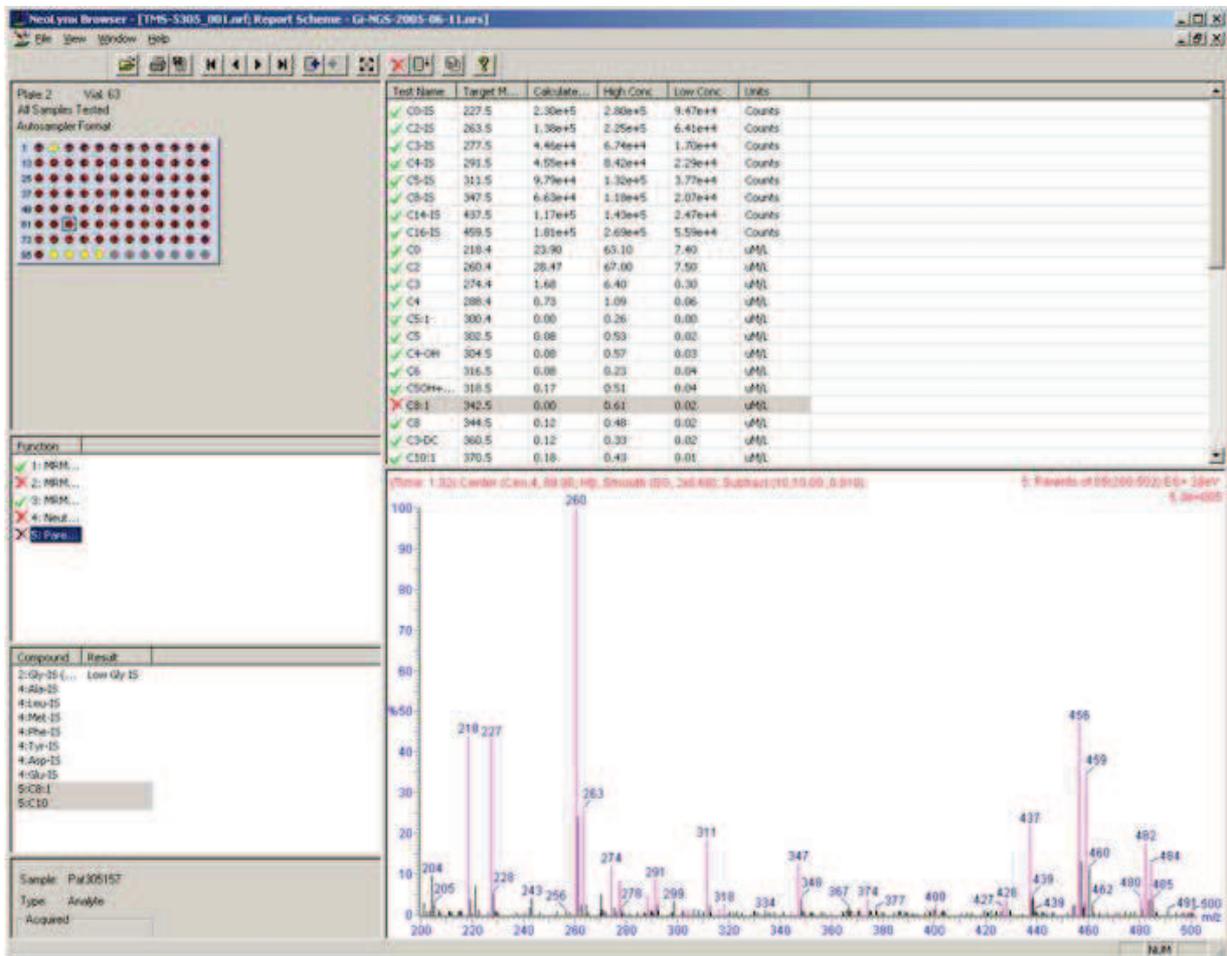
		„wahrer Wert“	
		Krank	Gesund
Testergebnis	Positiv	A	B
	Negativ	C	D

Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Tandem-Massenspektrometrie

Wie im vorigen Kapitel erläutert, spaltet die Massenspektrometrie die Inhaltsstoffe der Probe nach ihrer Masse auf. Von besonderem Interesse ist hier das freie Carnitin mit der m/z 218.

Nachfolgend zeigt die Abbildung ein Massenspektrogramm mit einer normalen Konzentration von freiem Carnitin im Blut.



Ergebnisse

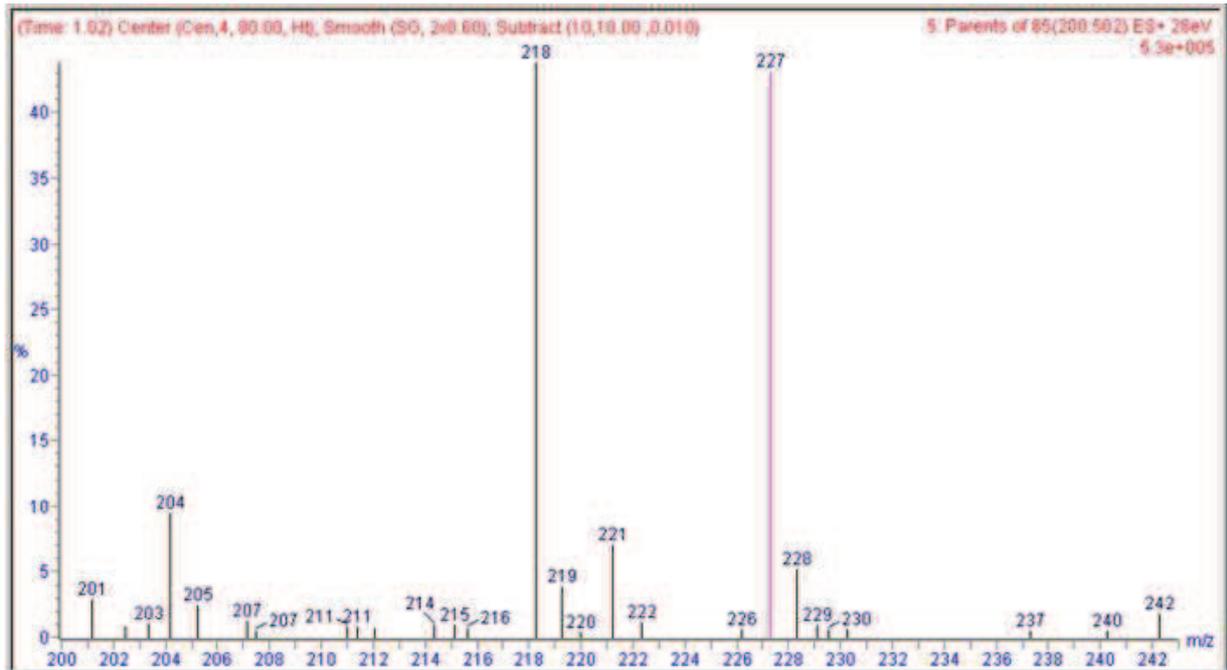
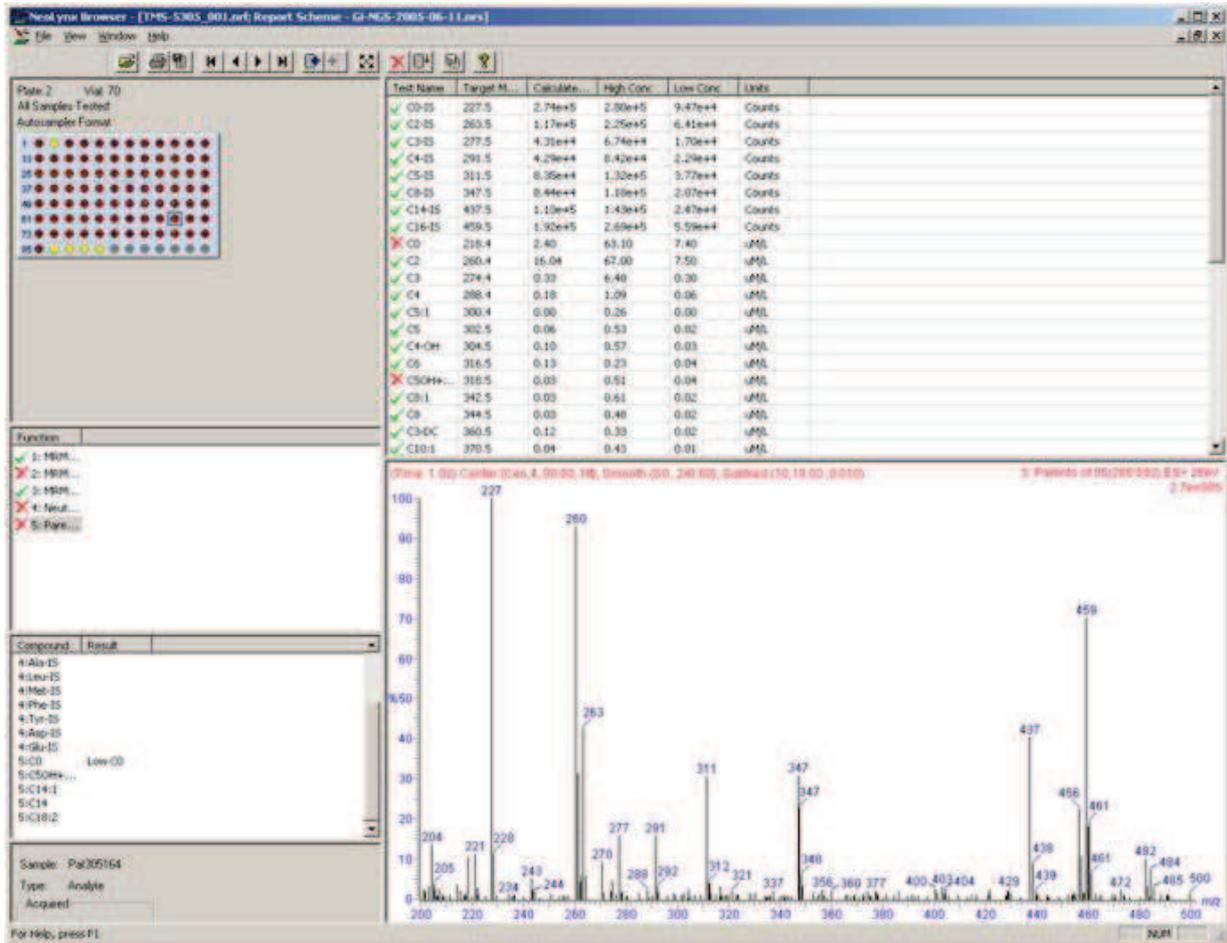


Abb. 5: Normales Massenspektrogramm. Freies Carnitin (C0) ist mit m/z von 218 in normaler Konzentration nachweisbar (23,0 $\mu\text{mol/l}$).

Ergebnisse

In der folgenden Abbildung zeigt sich ein Massenspektrogramm bei der die Konzentration von freiem Carnitin im Blut erniedrigt ist.



Ergebnisse

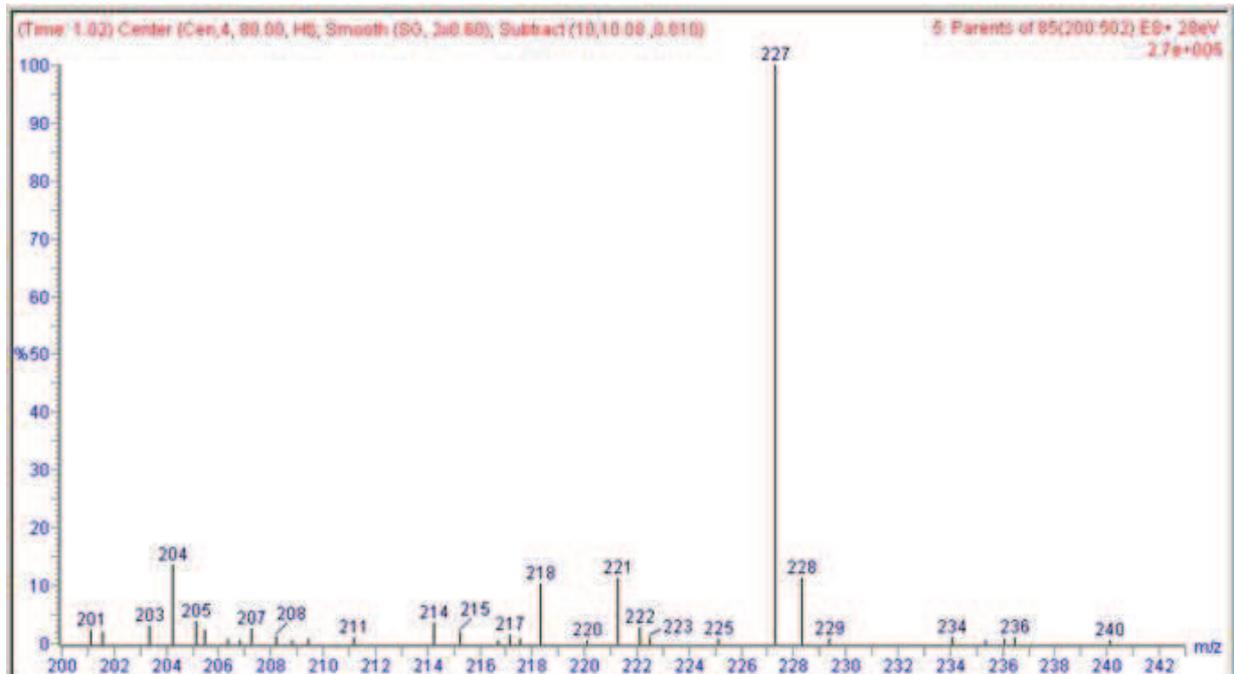


Abb. 6: Massenspektrogramm bei OCTN2-Defizienz: Freies Carnitin (C0) ist mit m/z von 218 in stark erniedrigter Konzentration nachweisbar (2,40 $\mu\text{mol/l}$).

3.1.1 Inzidenz der OCTN2 – Defizienz in Hessen

In dem Zeitraum der Untersuchung wurden in Hessen durch das Neugeborenen – Screening 3 an einer OCTN2-Defizienz Erkrankte auf 211.766 Neugeborene detektiert. Dies entspricht einer Inzidenz von 1:70.589.

Direkte Nachfrage in den entsprechenden Institutionen

(Stoffwechselambulanzen und kinderkardiologische Ambulanzen der Universitätskinderkliniken Frankfurt, Gießen und Marburg sowie der Kinderklinik Kassel) ergaben keine Hinweise auf weitere Kinder mit einer OCTN2-Defizienz, deren Trockenblutkarte im Zeitraum dieser Studie untersucht worden war.

Deshalb wird die Zahl der falsch-negativen Ergebnisse mit n=0 angesetzt.

Ergebnisse

Patient	1	2	3
SSW (Wo)	39	39	39
Alter (d)	2	2	2
Geschlecht (m/w)	m	w	w
C0(μmol/l) (cut off: 8,8μmol/l)	6,2	2,3	4,0
[C0+C2+C3+C16+C18+C18:1]	24,4	16,2	17,5
[C0+C2+C3+C16+C18+C18:1] / Citrullin* (cut off: 3)	2,9	1,46	1,96

Tabelle 5: Angaben zu den Kindern mit OCTN2-Defizienz, die im Neugeborenen – Screening detektiert wurden

3.1.2 Qualitätskriterien

Bei alleiniger Verwendung von freiem Carnitin (C0) als Ziel-Parameter wurden 233 Kontrollkarten nach dem Erst-Screening angefordert. Dies entsprach einer Recall-Rate von 0,11 %. Der positiv prädiktive Wert (PPW) betrug lediglich 1,2%.

		OCTN 2-Defizienz	
		Krank	Gesund
Testergebnis	Positiv (233)	A (3)	B (230)
	Negativ (211.533)	C (0)	D (211.533)

Die Recallraten und Qualitätsparameter in der untersuchten Population wurden nachträglich mit dem zusätzlich zu erfüllenden Grenzwert Verhältniswert $[C0+C2+C3+C16+C18+C18:1] / \text{Citrullin} < 3,0$ nachberechnet. Dieser zusätzliche Grenzwert wird vom TMS-Screening-Netzwerk „Regions for Genetics“ (<http://region4genetics.org/>) empfohlen, dem das Screeningzentrum Hessen seit 2008 angehört. Die Hinzunahme dieses Parameters verbessert die Aussagefähigkeit des Testverfahrens sehr deutlich.

Ergebnisse

Die Zahl der hypothetischen Kontrollkarten betrug 44 Karten. Insbesondere der positiv prädiktive Wert stieg deutlich an.

Grenzwert Parameter	Recall – Rate	Sensitivität (A/(A+C))	Spezifität D/(B+D)	PPW A/(A +B)
C0<-3,0 SD (P99,9)	0,11%	100%	99,88%	1,2%
C0<-3,0 SD (P99,9) und [C0+C2+C3+C16+C18:1]/Citrullin <3,0	0,02%	100%	99,98%	6,8%

Tabelle 6: Qualitätskriterien des hessischen Neugeborenen Screenings in Bezug auf den OCTN2-Mangel

1.1 3.2 Ergebnisse der Mutationsanalyse

3.2.1. Exon-Amplifikation des *SLC22A5 (OCTN2)* – Gens

Die Fotografie (Abb. 7) zeigt die exon-spezifischen PCR – Produkte nach Durchlaufen der Agarosegelelektrophorese sowie den DNA Längenstandard

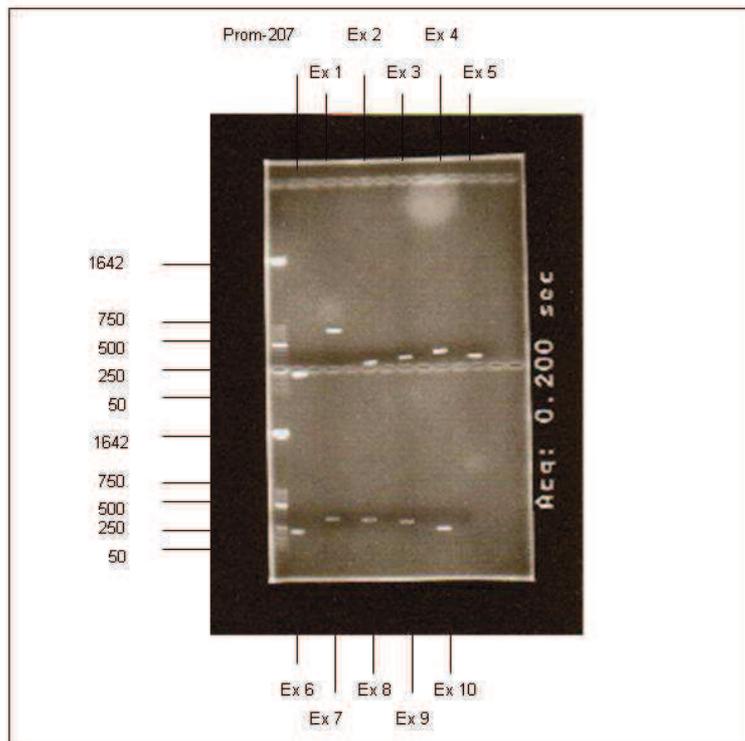
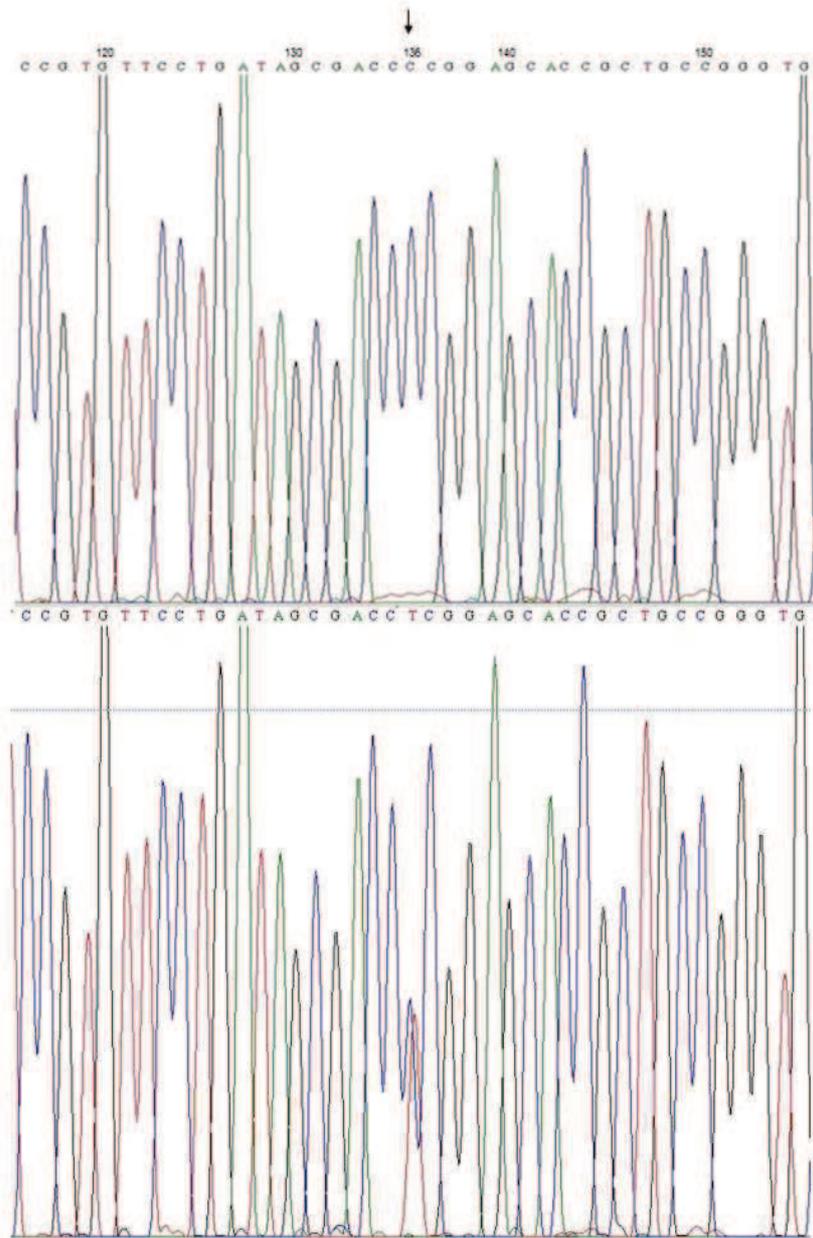


Abb. 7 Exon-spezifische PCR – Produkte mit dem DNA Längenstandard

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen beispielhaft Mutationen, die in unserem Patientenkollektiv durch die Sequenzierung diagnostiziert werden konnten. Dabei fand sich die Mutation p.P46S auf dem Exon 1 sowohl bei Neugeborenen, die im Neugeborenen – Screening detektiert wurden, als auch bei Müttern, die durch das Neugeborenen – Screening ihrer Kinder detektiert wurden.

Ergebnisse

Exon 1, Wildtyp



Exon 1, codon 46, c.136C>T (p.P46S)

Abb. 8: Wildtyp-Sequenz und heterozygote Mutation c.136C>T in Exon 1

Ergebnisse

Die Mutation p.R282X auf dem Exon 5 fand sich sowohl bei Neugeborenen, die im Neugeborenen – Screening detektiert wurden, als auch bei Patienten, die symptomatisch an einer OCTN2 – Defizienz erkrankten.

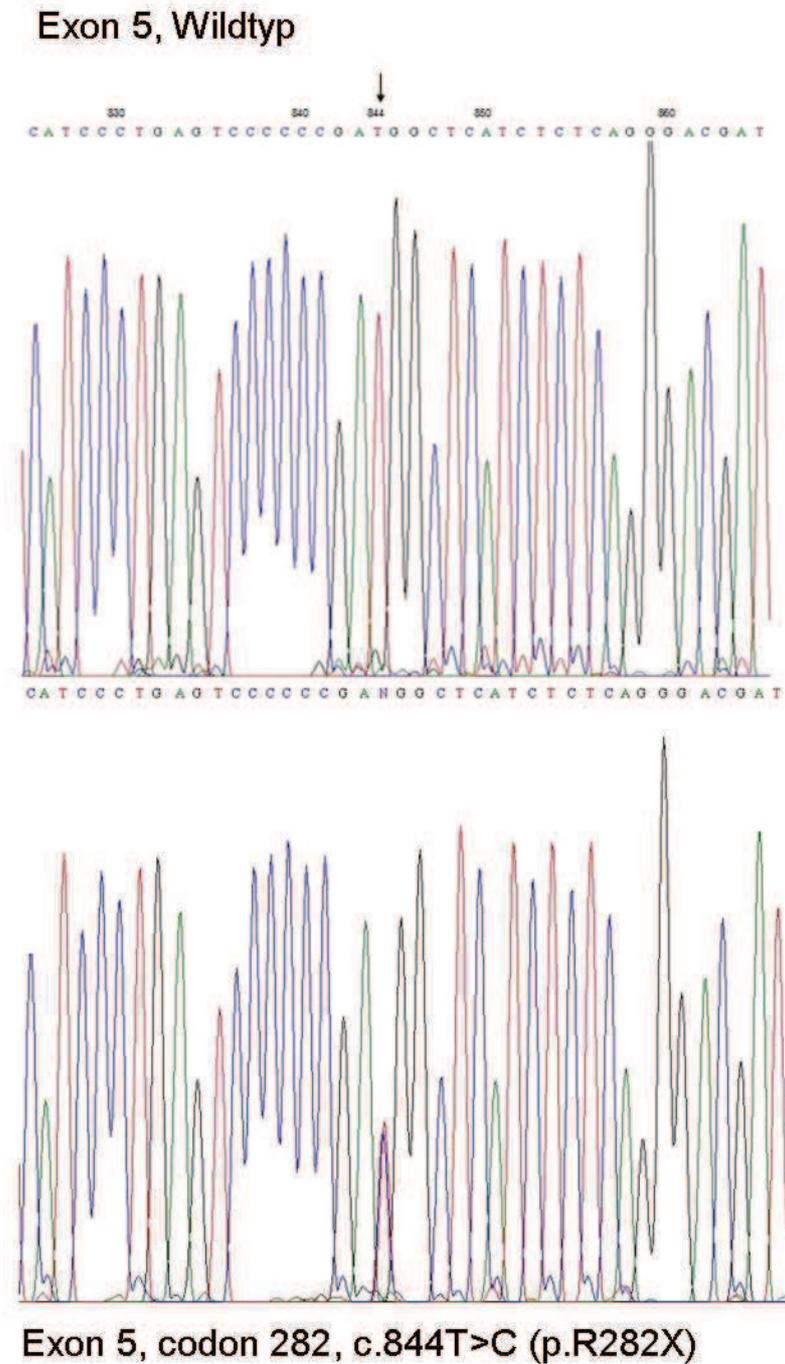


Abb. 9: Wildtyp-Sequenz und heterozygote Mutation c.844T>C in Exon 5

Ergebnisse

3.2.2 Neugeborene mit OCTN2-Defizienz

Die Tabelle 8 fasst die Ergebnisse der Mutationsanalyse des *SLC22A5*-Gens und der biochemischen Analytik bei Neugeborenen mit genetisch gesicherter OCTN2-Defizienz zusammen. Alle im Neugeborenen – Screening erkannten Patienten werden mit L-Carnitin behandelt (100 – 260 mg/kg/d) und zeigten bisher keine klinische Manifestation. Echokardiographische Verlaufsuntersuchungen zeigen keine Auffälligkeiten.

Die Normwerte für freies Carnitin, Gesamt Carnitin und die fraktionelle tubuläre Rückresorption von freiem Carnitin werden in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Alter	Freies Carnitin ($\mu\text{mol/l}$)	Gesamt Carnitin ($\mu\text{mol/l}$)	Fraktionelle Tubuläre Rückresorption (FTR_{FC}) (%)
1. Tag	$36,4 \pm 10,8$ (23,3 - 67,9)	$20,1 \pm 6,7$ (11,5 - 36,0)	> 75
2-7 Tage	$25,2 \pm 4,1$ (17,4 - 40,6)	$14,3 \pm 3,0$ (10,1 - 21,0)	> 75
8-28 Tage	$36,7 \pm 10,5$ (18,5 - 58,7)	$27,6 \pm 9,7$ (12,3 - 46,2)	> 75
29 Tage – 1 Jahr	$47,6 \pm 7,7$ (38,1 - 68,0)	$35,5 \pm 6,5$ (26,9 - 49,0)	> 85
1-6 Jahre	$54,4 \pm 9,9$ (36,6 - 83,6)	$41,7 \pm 7,9$ (24,3 - 62,5)	> 95
6 – 10 Jahre	$56,2 \pm 11,4$ (27,8 - 82,9)	$41,4 \pm 10,0$ (21,7 - 66,4)	> 95
10-17 Jahre	$53,4 \pm 9,5$ (33,7 - 77,0)	$39,4 \pm 8,7$ (21,6 - 64,5)	> 95
Erwachsene	$54,0 \pm 12,6$ (33,8 - 77,5)	$39,1 \pm 8,6$ (25,4 - 54,1)	> 95

Tabelle 7: Normwerte für freies Carnitin, Gesamt – Carnitin, FTR_{FC}

Ergebnisse

Patient	Zentrum	Codon	Codon (neue Nomenklatur) [6]	Exon	cDNA	Domäne	Referenz	Klinik	Plasma -FC (µmol/l)	Plasma -GC (µmol/l)	FTRFC (%)
1 E.A. 14.1.08	Frankfurt	Tyr84Cys (homozygot) Tyr449Asp (heterozygot)	p.Y84C p.Y449D	1 8	c.251 A>G c.1345 T>G		- Filippo 2004	nein	24,9* (unter Substitution)	52,8* (unter Substitution)	87,2*
2 J.R. 27.12.05	Giessen	Arg282Ier (homozygot)	p.R282X	5#	c.844 C>T	L6	Burwinkel 1999	nein	23,8 (unter Substitution)	39,1 (unter Substitution)	0
3 Y.H. 12.12.05	Giessen	Phe17Leu (homozygot)	p.F17L	1	c.51 C>G	N-terminus	Calderon et.al (unpublished)	nein	3,8	7,5	32,5
5 J.W. 16.2.99	München	Ile89Ister133 (homozygot)	p.I89fsX133	1#	c.254_264dup11		Lamhonwah 2002	nein	40,5 (unter Substitution)	64,3 (unter Substitution)	0
6 L.B. 19.01.03	Leipzig	Pro46Ser ΔArg289	p.P46S p.ΔR289	1 5	c.136 C>T c.865_867delCGA	L1	Schimmenti 2007§ -	nein	3*	4,6*	-

Tabelle 8: Neugeborene mit genetisch gesicherter OCTN2 – Defizienz

*auswärtiges Labor

beschrieben bei Müttern mit OCTN2 – Defizienz, die im Rahmen des Neugeborenen – Screenings detektiert wurde

3.2.3 *Selektive Patienten mit OCTN2-Defizienz*

Die nachfolgende Tabelle stellt die Ergebnisse der Mutationsanalyse des *SLC22A5*-Gens und der biochemischen Analytik bei Patienten mit genetisch gesicherter OCTN2-Defizienz dar.

Ergebnisse

Patient	Zentrum	Codon	Codon (neue Nomenklatur) [6]	Exon	cDNA	Domäne	Referenz	Klinik (Alter bei klinischer Manifestation)	Plasma-FC (µmol/l)	Plasma-GC (µmol/l)	FTR _{FC} (%)
7 R.P. 18.3.07	Wien	Arg282ter Arg282ter	p.R282X p.R282X	5#	c.844 C>T c.844delC	L6 L6	Burwinkel 1999	CM (2)	10	16,5	0
8 T.Sch. 27.8.84	Freiburg	Arg169Trp Tyr211Cys	p.R169W p.Y211C	3 3	c.506 C>T c.632 A>G	L2 TM3, L3 oder TM4	Burwinkel 1999 Vaz 1999	Nein, sudden death in Familie (25 aktuell)	-	-	-
9 S.G. 1.11.85	Giessen	Arg169Trp Arg282ter	p.R169W p.R282X	3 5#	c.506 C>T c.844 C>T	L2 L6	Burwinkel 1999 Burwinkel 1999	CM (2)	24,7 (unter Substitution)	37,1 (unter Substitution)	0
10 H.H. 20.5.00	Giessen	ΔPhe22 (homozygot)	p.ΔF22	1#	c.64_66delTT C		Lamhonwah 2002	CM (3)	11,5	17,3	0
11 S.B.; 15.8.98	Giessen	Glu452Lys (homozygot)	p.E452K	8	c.1354 G>A	L10	Wang 2000	CM (6)	Nicht messbar niedrig	Nicht messbar niedrig	

Tabelle 9: Patienten mit genetisch gesicherter OCTN2-Defizienz

beschrieben bei Müttern mit OCTN2 – Defizienz, die im Rahmen des Neugeborenen – Screenings detektiert wurden

3.2.4 Mütter mit OCTN2 – Defizienz

Die nachfolgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Mutationsanalyse des *SLC22A5*-Gens und der biochemischen Analytik bei Müttern mit genetisch gesicherter OCTN2 – Defizienz zusammen, die durch das Neugeborenen – Screening ihrer Kinder detektiert wurden.

Ergebnisse

Patient	Zentrum	Codon	Codon (neue Nomenklatur) [6]	Exon	cDNA	Domäne	Referenz	Klinik (Alter bei Diagnose)	Plasma-FC (µmol/l)	Plasma-GC (µmol/l)	FTR _{FC} (%)
1 A.R. 26.9.71	München	Pro46Ser Δ257_262	p.P46S p.Δ257_262	1 4	c.136 C>T c.769_786del18	L1 L5/TM6	Schimmenti 2007 -	Nein (36)	111 (unter Substitution)	203 (unter Substitution)	-
2 M.S. 9.3.71	München	Pro46Ser Gly511Val	p.P46S p.E511Q	1 9	c.136 C>T c.1531 G>C	L1	Schimmenti 2007 -	Nein (36)	3,4	4,1	82
3 G.Z. 27.3.70	München	Pro46Ser Gly511Val	p.P46S p.E511Q	1 9	c.136 C>T c.1531 G>C	L1	Schimmenti 2007 -	nein (37)	2,9	4,1	60
4 K.L. 20.11.72	München	Pro46Ser Δ257_262	p.P46S p.Δ257_262	1 4	c.136 C>T c.769_786del18	L1 L5/TM6	Schimmenti 2007 -	Nein (35)	-	-	-
5 C.Sch. 4.10.74	München	Gly33Val Pro46Ser	p.G33V p.P46S	1 1	c.98 G>T c.136 C>T	L1	- Schimmenti 2007	Nein (35)	5,8	6,25	87,8
7 S.B. 5.7.78	Hamburg	Trp351ter Gly484Val	p.W351X p.G484V	7 9	c.1053 G>A c.1451 G>T		- -	Nein (29)	12,6	15,4	96,4
8 A.W. 12.9.71	Hamburg	Pro46Ser Arg227His	p.P46S p.R227H	1 4	c.136 C>T c.680 G>A	L1 L4	Schimmenti 2007 -	Nein (36)	4,3	6,1	86
9 P.M. 30.5.83	Münster (Schwerte)	ΔPhe22	p. ΔF22	1#	c.64_66delITC		Lamhonwah 2002	Nein (21)	2	3,5	81
4 T.St. 23.6.88	Erlangen	ΔPhe22 Thr232Met	p. ΔF22 p.T232M	1# 4	c.64_66delITC c.695 C>T	L8	Calderon et.al (unpublished) - Lamhonwah 2002 Dobrowolski 2005	Nein (20)	2	3	53,2

Tabelle 10: Mütter mit genetisch gesicherter OCTN2-Defizienz

beschrieben bei Müttern mit OCTN2 – Defizienz, die im Rahmen des Neugeborenen – Screenings detektiert wurden

Ergebnisse

In der nachfolgenden Abbildung sind alle bisher bekannten Mutationen im OCTN2 Rezeptor graphisch dargestellt. Alle Mutationen, die im Rahmen dieser Arbeit neu gefunden wurden, sind rot in der Abbildung dargestellt.

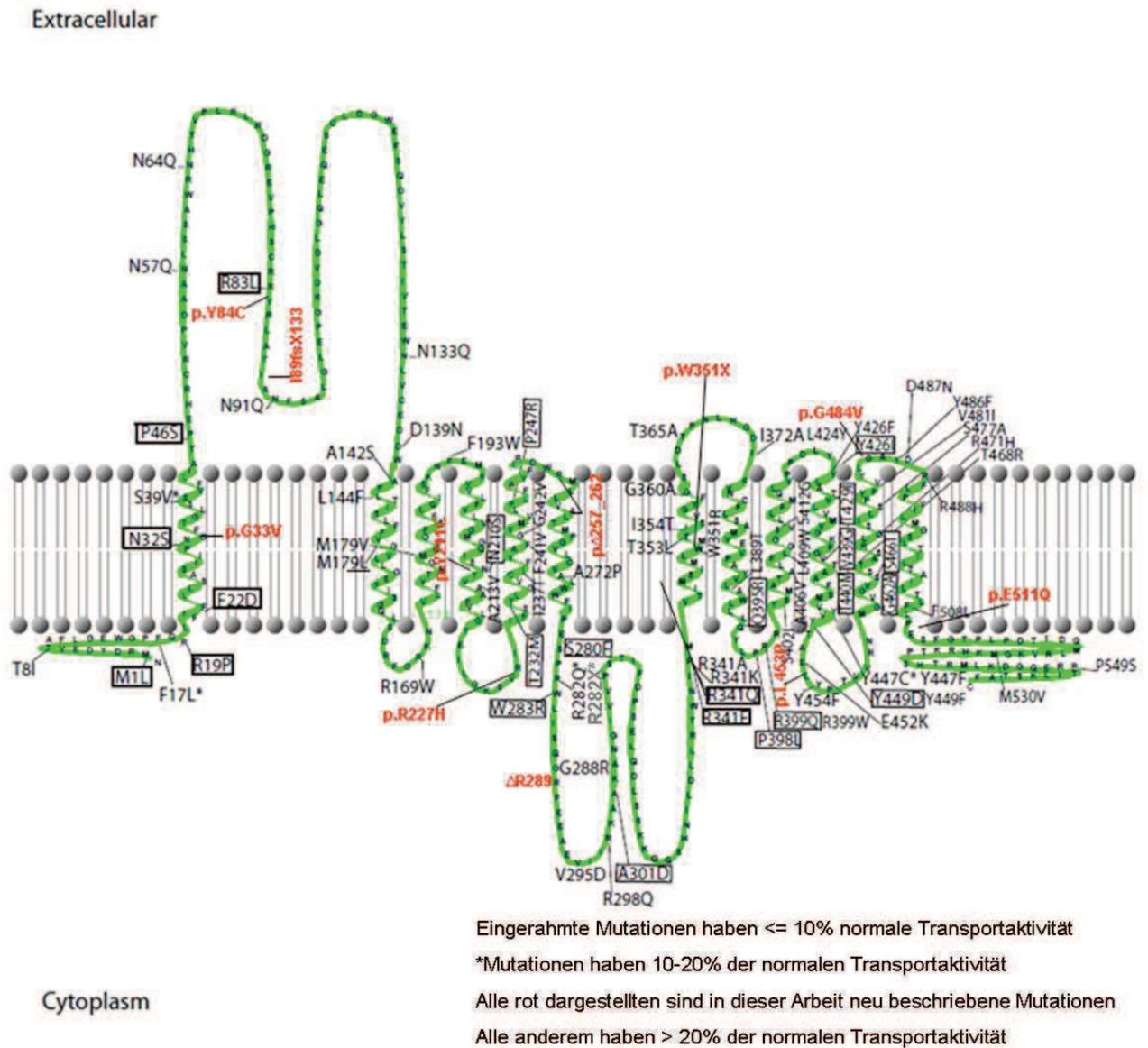


Abb. 10: Graphische Darstellung der transmembranären Domänen des OCTN2 Rezeptors und bisher gefundene Mutationen

Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

4.1.1 Ergebnisse aus dem Neugeborenen – Screening

Eine Zielstellung dieser Arbeit ist es, eine Inzidenz des Carnitin Transporter – Defektes für Hessen zu beschreiben. Von 211.766 Neugeborenen wurden 3 Neugeborene durch das Neugeborenen – Screening detektiert. Das entspricht einer Inzidenz von 1: 70.589. Unsere Ergebnisse decken sich damit in etwa mit der in der Literatur beschriebenen Inzidenz von 1:37.000-1:100.000 [10, 42]. Diese Häufigkeit entspricht dem Vorkommen anderer Stoffwechselerkrankungen, wie beispielsweise der klassischen Galaktosamie, die mit einer Inzidenz zwischen 1:30.000 bis 1:180.000 oder der Ahornsiruperkrankung, die mit 1:100.000 bis 1:200.000, beschrieben werden. [22, 32] Diese Erkrankungen sind bereits seit langem im Programm des Neugeborenen – Screenings enthalten und erfüllen mit ihrer Inzidenz das Kriterium der Interdisziplinären Screeningkommission der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, das ein ausreichend häufiges Auftreten der Erkrankung in der Bevölkerung fordert. Für den primären Carnitinmangel stimmt diese Aussage allerdings nur bedingt, da der Beobachtungszeitraum begrenzt ist und die Daten nicht ohne Weiteres auf die Gesamtpopulation übertragbar sind.

Die Arbeitsgruppe von Liebl et al. [15] reihte die OCTN2-Defizienz zu Erkrankungen ein, die nicht routinemäßig in das Neugeborenenenscreening integriert werden sollten, da es bei dieser Erkrankung eine mangelnde Sensitivität und Spezifität der Untersuchungsmethoden gäbe.[17] Durch die Hinzunahme des Verhältnisses $[C0+C2+C3+C16+C18+C18:1] / \text{Citrullin} < 3,0$ wurde die Aussagefähigkeit des Testverfahrens deutlich verbessert und somit eine unnötige Verunsicherung bei Eltern durch eine falsch positive Verdachtsdiagnose nahezu verhindert. Zudem werden die genannten Acylcarnitine und Citrullin in der Routineanwendung der Tandem –

Massenspektrometrie im Neugeborenen-Screening bestimmt, sodass keine Mehrkosten und auch kein zeitlicher Mehraufwand durch diese Erweiterung resultieren.

4.1.2 Ergebnisse aus der Mutationsanalyse

In dieser Arbeit fanden wir eine Reihe unterschiedlicher Mutationen, die zum großen Teil bereits in der Literatur beschrieben wurden (siehe Kapitel 3.2.1. und 3.2.2.)

In unserem Kollektiv fand sich eine Mutation, die sowohl bei klinisch unauffälligen, als auch an Kardiomyopathie erkrankten Patienten vorhanden (p.ΔF22) war. Es ist Spekulation, ob die zum Diagnosezeitpunkt unauffälligen Individuen ohne Therapie mittels Carnitin-Substitution ebenfalls eine Kardiomyopathie entwickelt hätten. Sicher ist jedoch, dass das Neugeborenen-Screening mit Einsatz der Tandem- Massenspektrometrie eine gute Methode ist, einen primären Carnitinmangel aufzudecken. Damit kann durch rechtzeitige Carnitin – Substitution und gegebenenfalls strikte Vermeidung von Fastenzeiten sowohl eine metabolische Manifestation als auch die Entwicklung einer Kardiomyopathie verhindert werden und somit eine potentiell tödliche Erkrankung therapiert werden.

Ähnliche Beobachtungen machten andere Arbeitsgruppen, die keinen stringenten Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp herstellen konnten. [2, 12, 34, 39] Somit müssen andere Faktoren wie beispielsweise Fasten oder eine carnitinarmer Ernährung (Vegetarier), Infektionen, Medikation mit Verapamil, Chinidin oder Antibiotika wie Pivampicillin eine Manifestation provozieren. [11, 12]

Bestandteil dieser Arbeit war die Mutationsanalyse von Müttern, deren Kinder im Neugeborenen-Screening mit erniedrigten Carnitinspiegeln auffielen. Bei diesen wurde erst im Anschluss an das Neugeborenen-Screening die Diagnose eines klassischen primären Carnitinmangels gestellt. Sie waren zum Diagnosezeitpunkt klinisch nicht oder nur äußerst gering beeinträchtigt. Aus Erfahrungen, die unterdessen im Krankheitsverlauf von Erkrankungen der

Fettsäure-Oxidation vorliegen, weiß man, dass diese bis dahin unauffälligen Erwachsenen lebenslang ein Risiko tragen, eine lebensbedrohliche Manifestation oder einen plötzlichen Tod zu erleiden. Deswegen ist eine Carnitinsubstitution dringend erforderlich. Aus diesem Grund sollten bei auffällig niedrigen Carnitinspiegeln bei Neugeborenen, nicht nur bei diesen die Diagnose überprüft werden, sondern auch bei deren Müttern. [31, 37]

Mit dem Wissen, dass die primäre OCTN2-Defizienz eine seltene autosomal rezessive Erkrankung ist und wir in der Studie über Mütter berichten, die nur über das Neugeborenen-Screening ihrer Kinder diagnostiziert wurden, sollte bei der Betreuung von Familien mit erkrankten Kindern auch bedacht werden, dass auch der Vater nicht nur Konduktor sein kann, sondern ebenfalls an einem klassischen primären Carnitinmangel erkrankt sein kann und ebenfalls einer Therapie bedarf. Ebenso sollten die Geschwister untersucht werden, insbesondere wenn diese älter sind und nicht mit dem erweiterten Neugeborenen-Screening untersucht wurden. [24, 34]

Interessant ist die Frage, ob es Mutationen im *SLC22A5* – Gen gibt, die regelhaft als krankheitsauslösend gelten. Mehrere Arbeitsgruppen haben durch Messungen der Restaktivitäten des Carnitin Transportes im OCTN2 Rezeptor in mit entsprechenden Mutationen veränderten CHO -Zellen (Chinese Hamster Ovary) gezeigt, dass es Mutationen im OCTN2 Rezeptor gibt, die den Carnitin Transport fast vollständig aufheben. Diese Mutationen liegen zumeist in den transmembranären Domänen, wie z.B. bei der nonsense Mutation des p. R282X. Hier kommt es zu einer Verkürzung des Transporters, die dazu führt, dass nicht 12, sondern nur 6 transmembranäre Domänen entstehen. Dies führt zu einem deutlich erniedrigten Carnitin Transport. [12, 41] Diese Mutation wurde bei vielen klinisch auffälligen Individuen mit primärem Carnitin – Mangel beschrieben. In unserem Kollektiv fanden wir die Mutation in homozygoter Form bei einem Neugeborenen ohne Klinik (unter Substitution seit den ersten Lebenswochen) und einem an einer Kardiomyopathie erkrankten 2-jährigen Mädchen, und in heterozygoter Form bei einem ebenfalls an einer Kardiomyopathie erkrankten Jungen. Dieser Junge ist compound heterozygot p.R282X/p.R169W, das heißt auf jedem Allel liegt eine

andere Mutation vor, die den Phänotyp beeinflusst. Auch die zweite missense Mutation (p.R169W) führt zu einem nahezu vollständigen Funktionsverlust des Carnitrintransporters. Allerdings fand sich diese Mutation in der Literatur sowohl bei Patienten mit einer metabolischen als auch bei einer kardialen Manifestation. In unserem Kollektiv fand sich diese Mutation nur bei Patienten mit einer Kardiomyopathie, was allerdings darin mitbegründet sein könnte, dass ein Schwerpunkt an unserer Klinik die Diagnostik und Therapie von Patienten mit einer Kardiomyopathie darstellt.

Weitere Mutationen in transmembranären Domänen in unserem Kollektiv sind p.ΔF22, p.G33V, p.Y211C, p.T232M p.Δ257-262 und p.W351X. Darunter fanden wir einige, die in der Literatur zuvor nicht beschrieben waren (p.W351X und p.G33V). Bei nicht allen diesen Mutationen ist bekannt, wie groß die Restfunktion des Carnitrintransporters ist. Vergleicht man jedoch die Mutationen mit direkt benachbarten Mutationen (ebenfalls in transmembranären Domänen), zeigt sich bei p.F22D, p.N32S, p.N210S eine deutliche Funktionseinschränkung. Die Annahme, dass dies bei den neu beschriebenen Mutationen ebenfalls so ist, liegt nahe, müsste aber mit weiteren Studien belegt werden.

Patient Nr. 2 ist ebenfalls compound heterozygot für p.R169W/p.Y211C, die beide ebenfalls mit einer reduzierten Carnitrintransportfunktion beschrieben sind. Dieser Patient ist bisher nicht an einer Kardiomyopathie erkrankt, jedoch gab es einen Todesfall mit Kardiomyopathie in der Familie, bei dem leider die Diagnostik bezüglich eines primären Carnitrinmangels nicht bekannt ist.

Auch in unserer Arbeit sind Mutationen in allen Exons gefunden worden, allerdings können auch wir die Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigen, dass die am häufigsten betroffene Region auf dem Exon 1 codiert wird. Das Exon 1 beinhaltet Informationen für das N-terminale Ende, die erste transmembranäre Domäne und den größten Teil der ersten extrazellulären Schleife (Abb. 4). In *in vitro* subzellulären Lokalisationsstudien von Mutationen fanden die Arbeitsgruppen Urban et al. [36] und Maekawa et.al. [21] heraus, dass diese Region des OCTN2 eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen

dem endoplasmatischen Retikulum und der Zellmembran spielt. Mutationen in diesem Bereich können zu bedeutsamen Veränderungen in der Proteinstruktur führen, die die Lokalisation des OCTN2 Rezeptors verändert. [14]

Wie die in anderen Arbeiten beschriebenen Mütter, die durch das auffällige Neugeborenencreening ihrer Kinder auffielen, ist auch in unserer Arbeit die Gruppe der Mütter mit OCTN2-Defizienz asymptomatisch. In unserem Kollektiv waren alle Mütter compound heterozygot. Eine Mutter hatte auf einem Allel 2 Mutationen und eine weitere wurde auf dem anderen Allel nachgewiesen. Überdurchschnittlich häufig fand sich die Mutation p.P46S. Diese Mutation fanden auch die Arbeitsgruppen von Schimmenti et al. [31] und Li et al. [14] bei asymptomatischen Müttern. In anderen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass gerade diese Mutation mit einer signifikanten Funktionseinschränkung des Rezeptors einhergeht. Lamhonwah et al. [12] konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass das Zusammentreffen von einer missense Mutation mit einer weiteren missense Mutation oder mit einer frameshift Mutation eine partielle Verbesserung des Carnitin – Transportes bewirken kann. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weswegen die Mütter in unserer Studie asymptomatisch sind. Zudem wird in vielen anderen Arbeiten immer wieder auf die Tatsache hingewiesen, dass keine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp besteht.

4.2 Limitationen

Die Nachbeobachtungszeit ist unter dem Gesichtspunkt falsch-negativer Screening – Ergebnisse möglicherweise noch zu kurz. In der Literatur finden sich Hinweise, dass eine genetisch und biochemisch gesicherte OCTN2-Defizienz erst im Alter > 5 Jahre symptomatisch werden. Deshalb kann die angenommene Anzahl von 0 falsch-negativen Ergebnissen nur als vorläufig eingestuft werden.

Die erhobenen Werte zur fraktionellen Rückresorption von FTR_{FC} erlauben keine verlässlichen Aussagen, wenn diese Untersuchung vor Etablierung einer ausreichenden Carnitin – Substitution durchgeführt wird. Bei sehr niedrigem

tubulärem Carnitin – Angebot bei ausgeprägter Carnitin – Depletion gewinnen unspezifische Transportprozesse eine relativ höhere Rolle und führen zu falsch – hohen FTR –Werten. Deshalb sollte diese Untersuchung nur unter adäquater Carnitin – Substitution durchgeführt werden. Zur biochemischen Charakterisierung ist die Messung der OCTN2-Aktivität in Fibroblasten vorzuziehen.

4.3 Schlussfolgerungen

Das Neugeborenen - Screening für den primären Carnitin – Mangel (OCTN2-Defizienz) ist bei Wahl entsprechender Parameter und cut-off-Werte möglich und sinnvoll.

Sowohl Kinder und als auch Mütter mit OCTN2-Defizienz werden detektiert und können behandelt werden, was schwerwiegende Organschädigungen verhindern kann.

Es finden sich partielle Überschneidungen in den Mutationen zwischen neu detektierten Müttern, Neugeborenen und symptomatischen Kindern.

Welche Faktoren im Einzelnen über einen symptomatischen oder asymptomatischen Verlauf entscheiden sind weiterhin unbekannt. Es bedarf weiterer Studien, um eine Risikoabschätzungen bezüglich der Schwere der Erkrankung treffen zu können.

5 Zusammenfassung

Der primäre Carnitinmangel (OMIM 212140) ist eine autosomal rezessive Erkrankung der Fettsäure – Oxidation und durch Mutationen im *SLC22A* – Gen, das für den spezifischen Carnitin – Transporter (OCTN2) kodiert, verursacht. Klinische Symptome sind hypoketotische Hypoglykämie, hepatische Encephalopathie, muskuläre Hypotonie, Kardiomyopathie und plötzliche Todesfälle.

Das erweiterte Neugeborenencreening mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie ermöglicht die simultane Detektion angeborener Erkrankungen im Stoffwechsel von Aminosäuren, organischen Säuren und Fettsäuren. In Ergänzung der Kinderrichtlinie gehört der primäre Carnitin – Mangel zu den Zielkrankheiten des Neugeborenen – Screenings in Hessen. Die Inzidenz in unserer Studie beträgt 1:70 589 und deckt sich mit der in der Literatur angegebenen Inzidenz für den primären Carnitin- Mangel. Es konnte gezeigt werden, dass durch Hinzunahme des Verhältniswertes $[C0+C2+C3+C16+C18+C18:1]/\text{Citruillin} < 3,0$ die Aussagefähigkeit des Testverfahrens deutlich erhöht werden konnte und eine hohe Recall – Rate gesenkt wurde. Deswegen ist die Tandem – Massenspektrometrie eine gute Methode Patienten mit primärem Carnitin – Mangel im Neugeborenen – Screening zu detektieren. Zudem kann über das Neugeborenen – Screening auch ein maternaler Carnitin – Mangel aufgedeckt werden.

Ein weiterer Punkt dieser Arbeit ist die Mutationsanalyse von Kindern und Müttern mit einer OCTN2-Defizienz, die über das Neugeborenen – Screening aufgefallen sind und Kindern, bei denen im Rahmen weiterer Diagnostik eine OCTN2-Defizienz auffiel. Wir fanden auch Mutationen, die bisher in der Literatur nicht beschrieben wurden. Es finden sich partielle Überschneidungen in den Mutationen zwischen neu detektierten Müttern, Neugeborenen und symptomatischen Kindern.

Summary

Systemic primary carnitine deficiency (OMIM 212140) is an inborn defect in the oxidation of fatty acids. It is caused by a mutation in the *SLC22A* – gene of the specific carnitine transporter (OCTN2). The inheritance is autosomal recessive. Clinical features are hypoketotic hypoglycemia, hepatic encephalopathy, skeletal muscle weakness, cardiomyopathy and cases of sudden death.

By expanded neonatal screening including tandem mass spectrometry inborn errors of amino acid, organic acid and fatty acid metabolism can be detected simultaneously. In addition to common German guideline of neonatal screening, systemic primary carnitine deficiency is a target of neonatal screening in Hesse.

In our study the incidence of the disease was 1:70 589 which is consistent with the reported incidence for primary carnitine deficiency in literature. We were able to demonstrate, that specificity and positive predictive value markedly improved by adding the ratio $[C0+C2+C3+C16+C18+C18:1]/\text{Citruillin} < 3,0$ as a disease marker, thus lowering the high number of recalls. So the neonatal screening by tandem mass spectrometry is able to reliably detect patients suffering from primary carnitine deficiency. Moreover, maternal carnitine deficiency is detected as well.

Another point of this study is the analysis of mutations of children and mothers with OCTN-2 deficiency detected in neonatal screening. We were able to detect mutations that have not been described before. We found an overlap in the mutations between newly detected mothers, affected newborns and symptomatic children.

6 Abkürzungsverzeichnis

AC	Acylcarnitin
ASA	Argininsukzinatlyasemangel
BKT	β -Ketothiolase-Mangel
BuO-Cl	butanolische Salzsäure
CACT	Carnitin-Acylcarnitin-Translocase
CblA	B Methylmalonazidurie
CIT	Zitrullinämie
CK	K(C)reatinkinase
CoA	Coenzym A
CUD	Karnitinaufnahmestörung
CPT I	Carnitin-Palmitoyl-Transferase I
CPT II	Carnitin-Palmitoyl-Transferase II
C0	freies Carnitin
C2	Acetylcarnitin
C3	Propionylcarnitin
C16	Palmitoylcarnitin
C18	Stearylarnitin
C18:1	Oleylcarnitin
GA I	Glutarazidurie I
HCY	Homozystinurie (aufgrund einer Cystathionin- β -Synthase-Störung)
HMG	3-Hydroxy-3-Methylglutarazidurie
HPA	Hyperphenylalaninämie
IVA	Isovalerianazidurie
LCHAD	Long-Chain-L-3-Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel
MCAD	Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel
MSUD	Ahornsirupkrankheit
MUT	Methylmalonazidurie (Mutasemangel)

Abkürzungsverzeichnis

MTPF	Multiscreen Filtrationsplatte
PKU	Phenylketonurie
PPW	positiv prädiktiver Wert
PROP	Propionazidurie
TFP	Mangel des trifunktionellen Proteins
TYR I	Tyrosinämie I
VLCAD	Very-long-Chain-Acyl-CoA- Dehydrogenase-Mangel
3 MCC	3-Methylcrotonyl-CoA-Karboxylase- Mangel

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Ansprüche an ein Neugeborenen -Screening [31]
- Tabelle 2: Zielkrankheiten des Neugeborenen – Screenings [31, 32]
- Tabelle 3: Annealingtemperaturen der jeweiligen Primer
- Tabelle 4: Annealingtemperaturen der Primer bei der Sequenzierung
- Tabelle 5: Angaben zu den Kindern mit OCTN2-Defizienz, die im Neugeborenen – Screening detektiert wurden
- Tabelle 6: Qualitätskriterien des hessischen Neugeborenen Screenings in Bezug auf den OCTN2-Mangel
- Tabelle 7: Normwerte für freies Carnitin, Gesamt – Carnitin, FTR_{FC}
- Tabelle 8: Neugeborene mit genetisch gesicherter OCTN2 – Defizienz
- Tabelle 9: Patienten mit genetisch gesicherter OCTN2-Defizienz
- Tabelle 10: Mütter mit genetisch gesicherter OCTN2-Defizienz

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Fettsäure – Oxidation während des Fastens [3].....	2
Abb. 2:	Carnitin – Zyklus und Fettsäure – β – Oxidation [3].....	4
Abb. 3:	Mutationen im OCTN2 – Protein beim primären Carnitinmangel [3].....	9
Abb. 4:	schematische Darstellung der Funktionsweise der Tandem – Massenspektrometrie [28].....	18
Abb. 5:	Normales Massenspektrogramm, freies Carnitin (C0) ist mit m/z von 218 in normaler Konzentration nachweisbar (23,0 $\mu\text{mol/l}$).....	27
Abb. 6:	Massenspektrogramm bei OCTN2-Defizienz: Freies Carnitin (C0) ist mit m/z von 218 in stark erniedrigter Konzentration nachweisbar (2,40 $\mu\text{mol/l}$).....	29
Abb. 7:	Exon-spezifische PCR – Produkte mit dem DNA Längenstandard.....	33
Abb. 8:	Wildtyp-Sequenz und heterozygote Mutation c.136C>T in Exon 1.....	34
Abb. 9:	Wildtyp-Sequenz und heterozygote Mutation c.844T>C in Exon 5.....	35
Abb. 10:	Graphische Darstellung der transmembranären Domänen des OCTN2 Rezeptors und bisher gefundene Mutationen.....	42

8 Literaturverzeichnis

1. **Amat di San Filippo, C. and N. Longo**, Tyrosine residues affecting sodium stimulation of carnitine transport in the OCTN2 carnitine/organic cation transporter. *J Biol Chem*, 2004. 279(8): p. 7247-7253.
2. **Amat di San Filippo, C.**, M. Pasquali, and N. Longo, Pharmacological rescue of carnitine transport in primary carnitine deficiency. *Hum Mutat*, 2006. 27(6): p. 513-523.
3. **Bieber, L.L.**, Carnitine. *Annu Rev Biochem*, 1988. 57: p. 261-283.
4. **Borum, P.R.**, Carnitine in neonatal nutrition. *J Child Neurol*, 1995. 10 Suppl 2: p. S25-31.
5. **Chace, D.H.**, T.A. Kalas, and E.W. Naylor, Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem*, 2003. 49(11): p. 1797-1817.
6. **den Dunnen, J.T. and S.E. Antonarakis**, Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet*, 2001. 109(1): p. 121-124.
7. **Dobrowolski, S.F.**, et al., Validation of dye-binding/high-resolution thermal denaturation for the identification of mutations in the SLC22A5 gene. *Hum Mutat*, 2005. 25(3): p. 306-313.
8. **Jugendmedizin**, I.S.d.D.G.f.K.u., Neue Screening-Richtlinien *Monatsschr Kinderheilkd*, 2002, 150(11):p. 1424-1440.
9. **Koch, J.H.**, Robert Guthrie The PKU Story: Crusade Against Mental Retardation. 1997: p. 31-43.

10. **Koizumi, A.**, et al., Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency. *Hum Mol Genet*, 1999. 8(12): p. 2247-2254.
11. **Lahjouji, K.**, G.A. Mitchell, and I.A. Qureshi, Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency. *Mol Genet Metab*, 2001. 73(4): p. 287-297.
12. **Lamhonwah, A.M.**, et al., Novel OCTN2 mutations: no genotype-phenotype correlations: early carnitine therapy prevents cardiomyopathy. *Am J Med Genet*, 2002. 111(3): p. 271-284.
13. **Levy, H.L.**, Newborn screening by tandem mass spectrometry: a new era. *Clin Chem*, 1998. 44(12): p. 2401-2402.
14. **Li, F.Y.**, et al., Molecular spectrum of SLC22A5 (OCTN2) gene mutations detected in 143 subjects evaluated for systemic carnitine deficiency. *Hum Mutat*, 2010. 31(8): p. E1632-1651.
15. **Liebl, B.**, et al., Expanded newborn screening in Bavaria: tracking to achieve requested repeat testing. *Prev Med*, 2002. 34(2): p. 132-137.
16. **Liebl, B.**, et al., Very high compliance in an expanded MS-MS-based newborn screening program despite written parental consent. *Prev Med*, 2002. 34(2): p. 127-131.
17. **Liebl, B.N.**, U.; von Kries, R.; Roscher, A., Abschlussbericht zum Modellprojekt zur Neuordnung des Neugeborenen-Screenings in Bayern. 2001: Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, p. 1-20

18. **Loeber, G.**, D. Webster, and A. Aznarez, Quality evaluation of newborn screening programs. *Acta Paediatr Suppl*, 1999. 88(432): p. 3-6.
19. **Longo, N.**, C. Amat di San Filippo, and M. Pasquali, Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2006. 142C(2): p. 77-85.
20. **Lukacs, Z.**, Neugeborenenenscreening in Deutschland, Österreich und der Schweiz. *Monatsschr Kinderheilkd*, 2009. 157 (12):p.1209-1214
21. **Maekawa, S.**, et al., OCTN2VT, a splice variant of OCTN2, does not transport carnitine because of the retention in the endoplasmic reticulum caused by insertion of 24 amino acids in the first extracellular loop of OCTN2. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1773(6): p. 1000-6.
22. **Mayatepek, E.**, Pädiatrie. Vol. 1. Auflage. 2007: Urban und Fischer. p.200, 208-216
23. **Müllhardt, C.**, Experimentator - Molekularbiologie/Genomics 2006(5. Auflage): Spektrum Akademischer Verlag. p. 84-119
24. **Ni-Chung Lee**, N.L.-S.T., Yin-Hsiu Chien, Chun-An Chen. Sho-Juan Lin, Pao-Chin Chiu, Ai-Chu Huang, Wuh-Liang Hwu, Diagnoses of newborns and mothers with carnitine uptake defects through newborn screening. *Mol Genet Metab*, 2009. 100(1): p. 46-50.
25. **Rebouche, C.J. and A.G. Engel**, Kinetic compartmental analysis of carnitine metabolism in the human carnitine deficiency syndromes. Evidence for alterations in tissue carnitine transport. *J Clin Invest*, 1984. 73(3): p. 857-867.

26. **Rebouche, C.J.**, Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1033: p. 30-41.
27. **Roscher, A.A.F.**, R. ;Liebl, B; Olgemöller, B. , Erweiterung des Neugeborenen Screenings durch Tandemmassenspektrometrie *Monatsschr Kinderheilkd*, 2001. 149(12):p 1297-1303
28. **Ohashi, R.**, et al., Na(+)-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. 291(2): p. 778-784.
29. **Scaglia, F.**, et al., Defective urinary carnitine transport in heterozygotes for primary carnitine deficiency. *Genet Med*, 1998. 1(1): p. 34-39.
30. **Scaglia, F.**, Y. Wang, and N. Longo, Functional characterization of the carnitine transporter defective in primary carnitine deficiency. *Arch Biochem Biophys*, 1999. 364(1): p. 99-10
31. **Schimmenti, L.A.**, et al., Expanded newborn screening identifies maternal primary carnitine deficiency. *Mol Genet Metab*, 2007. 90(4): p. 441-445.
32. **Schulte, F.J.;Spranger, J.**, L.S., *Pädiatrie*. 2003: Springer. p. 349-350, 269-372
33. **Scriver**, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th Ed ed. 2001. p. 2297-2326
34. **Spiekerkoetter, U.**, et al., Silent and symptomatic primary carnitine deficiency within the same family due to identical mutations in the organic

cation/carnitine transporter OCTN2. *J Inherit Metab Dis*, 2003. 26(6): p. 613-615.

35. **Stanley, C.A.**, Carnitine deficiency disorders in children. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1033: p. 42-51.

36. **Urban, T.J.**, et al., Functional genetic diversity in the high-affinity carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Mol Pharmacol*, 2006. 70(5): p. 1602 - 11.

37. **Vijay, S.**, et al., Carnitine transporter defect: diagnosis in asymptomatic adult women following analysis of acylcarnitines in their newborn infants. *J Inherit Metab Dis*, 2006. 29(5): p. 627-630.

38. **Wang, Y.**, et al., Phenotype and genotype variation in primary carnitine deficiency. *Genet Med*, 2001. 3(6): p. 387-392.

39. **Wang, Y.**, et al., Functional analysis of mutations in the OCTN2 transporter causing primary carnitine deficiency: lack of genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat*, 2000. 16(5): p. 401-407.

40. **Wang, Y.**, et al., A missense mutation in the OCTN2 gene associated with residual carnitine transport activity. *Hum Mutat*, 2000. 15(3): p. 238-245.

41. **Wang, Y.**, et al., Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(5): p. 2356-2360.

42. **Wilcken, B.**, et al., Carnitine transporter defect diagnosed by newborn screening with electrospray tandem mass spectrometry. *J Pediatr*, 2001. 138(4): p. 581-584.

43. **Wu, X.**, et al., cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 246(3): p. 589-595.

9 Anhang

9.1 Kommerziell erhältliche Geräte und Arbeitsmaterialien

ABIPrism® 3100 Genetic Analyzer Applied Biosystems, UK

ABIPrism® 7700 Sequence Detector Applied Biosystems, UK

DistriMan (Pipettierhilfe) Abimed, Langenfeld

Distri Tip Maxi (12,5 ml) Gilson, USA

Elektrophoresekammern Keutz, Reiskirchen

Elektrophoresekammern Keutz, Reiskirchen

Glasmaterialien
(Messbecher, Glasbecher) Schott, Mainz

Heizblock Techne, UK

Mikrowelle Severin, Sundern

HPLC-Pumpe 1525 Waters, USA

Kühlschrank Economic cooler Bosch

Kühlschrank
Profiline 7081555-00 Liebherr

Mikromass Quattro mikro API Waters, USA

Multiscreen Filtrationsplatte
Solvinert 96 well Millipore, Frankreich

Anhang

Nescofilm	Roth, Karlsruhe
PCR-Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400)	Perkin-Elmer, Überlingen
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Pipetten (verstellbar)	Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
PP-Mikrotiterplatte 96 well	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Schüttler Titramax	Heidolph, Schwabach
Schallschutzhaube Vakuumpumpe	Sonation GmbH, Biberach
Sofortbildkamera Polaroid MP-4	Polaroid, USA
Spannungsquelle	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Spektralphotometer	Pharmacia Biotech, USA
Stickstoff – Membran – Generator NGM – 11 – LC/MS	cmc Instruments, Eschborn
Tischrührer („Vortexer“)	Janke und Kunkel, Staufen
UV-Stratalinker	Stratagene, Kanada

Umluft Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Veriti® 96 well thermal cycler	Applied Biosystems, UK
Waage	Scaltec, Heiligenstedt
Wärmeblock L 30	Schrader, Ennigerloh
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen

9.2 Kommerziell erhältliche Chemikalien

Acetylchlorid	Merck, Darmstadt
Acetonitril (ACN) LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Agarose, universal	Peqlab, Erlangen
Ameisensäure p.A. 98-100%	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Butanol p.A.	Merck, Darmstadt
DNA-Längenmarker XIII	Roche, Mannheim
dNTPs	Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma, München
Eisessig	Riedel des Haen, Seelze

Anhang

Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Qbiogen, Frankreich
Formamid	Applied Biosystems, UK
Big Dye Terminator - Premix v. 3.1	Applied Biosystems, UK
Glycerin	Sigma, München
LiChrosolv-Wasser	Merck, Darmstadt
Milli-Q PF Plus Anlage	Millipore, Frankreich
Methanol p.A.	kein spezifischer Hersteller
Methanol LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
PCR-Puffer (10x)	Applied Biosystem, UK
QIAmp® DNA Mini Kit (250)	Qiagen, Düsseldorf
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Düsseldorf
Sequence Puffer (10x) mit EDTA	Applied Biosystems, UK
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma, München
Tris-Puffer	Roth, Karlsruhe

9.3 Oligonukleotide

Name	Sequenz	bp	Richtung
5'UTR-F-neu	TCAGGTGCACTCCCGGCCCG	20	Forward
5'UTR-R-neu	AGGCAAGCCAGGCAGCAG	18	Reverse
OC21F2neuA-F	CGCAACCTCCCTGGTCGT	19	Forward
OC21R1	AGCTCGGGTTCAAGGACCGC	20	Reverse
OC22F3	CCTGACTAAGTGAGTTCACA	20	Forward
OC22R1	TCAAGGGCCAGGCACACGCT	20	Reverse
C234F2	'TTCACACCCACTTACTGGATGGAT	24	Forward
OC23R3	GAAAGGTAGGTGATGGGATG	20	Reverse
OC24F3neu	AGCGCCATGAACTAGAGAGAGTTC	25	Forward
OC24R1	CTGCCCTCTAGTGAAGGCCA	20	Reverse
OC25F3neu	CAAGCTCTGGTCTGCAACCTTATTC	26	Forward
OC25R1	AGGGCTGGGTGCTGCTGCTC	20	Reverse
OC26F2	TCTGACCACCTCTTCTCCCATAC	24	Forward
OC26R1	TAAACAAGAGGCCCAATGGC	20	Reverse
OC27F3neu	TTGTACAGGTTGGGAAAGATG	21	Forward
OC27R1	ATTGAGACAGCCTGGTAGAC	20	Reverse
OC28F2	TATGTTTGTGTTGCTCTCAATAGC	24	Forward
OC28R1	CAGCTCACATTCAAGCCAGT	20	Reverse
OC29F1	ATAAAGGGGTAGATGAGAGA	20	Forward
OC28R2	TCTGTGAGAGGGAGTTGCGAGTA	24	Reverse
OC210F3	CTTGTTTGTGTTGGAGACTG	19	Forward
OC210R1	CTGCACAAGCTGGCCATTC	20	Reverse

9.4 Eigenhergestellte Lösungen

Blaumarker:

Bromphenolblau 62,5 mg

Glycerin 28,7 ml

SDS 250,0 mg

Na₂EDTA pH 8,0 (0,5 M) 5,0 ml

Destilliertes Wasser 16,3 ml

TAE- Puffer (50x), Ansatz für 1,0 Liter:

Tris- Puffer 242,0 g

Eisessig 78,0 ml

EDTA pH 8,0 (0,5 M) 100,0 ml

Interner Standard Stammlösung:

Für den Ansatz der IS-Stammlösung werden jeweils 2 Flaschen Carnitin- bzw. Aminosäure-Lyophilisat verwendet:

12ml MeOH (LiChrosolv) + 1 ml H₂O zusammengeben davon je 1ml zu jeder IS Carnitin-Lyophilisat-Flasche und zu jeder IS Aminosäure-Lyophilisat-Flasche geben. Gut mischen und quantitativ überführen

2x mit je 1ml MeOH/H₂O nachspülen

IS-Arbeitslösung:

300ul Stammlösung + 15 ml MeOH (LiChrosolv)

(Endverdünnung 1:300)

Ansatz BuO-CL:

90ml BuOH im Kühlschrank vorkühlen (mindestens 1h)

in Eis stellen und 10ml Acetylchlorid tropfenweise unter Schwenken zugeben.

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. J. Kreuder danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung und Unterstützung bei der Arbeit.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei den Kollegen aus dem Dr. von Haunerschen Kinderspital München, den Universitätskinderkliniken Hamburg – Eppendorf und Erlangen, sowie bei Dr. Heinrich Wiggermann, Facharzt für Kinderheilkunde in Schwerte, die uns Proben für die Mutationsanalyse gesandt haben, bedanken.

Kirstin Salser stand mir jederzeit freundlich und geduldig mit Rat in labortechnischen Angelegenheiten zur Seite. Dafür ein herzliches Dankeschön.

Ein großer Dank an Jan Enders, der nicht nur einmal die widerspenstige Formatierung zähmte.

Bei meiner Familie, insbesondere meinem Ehemann Guido Kliemann, und bei Allen die mich stets unterstützt und bei kleineren Rückschlägen wieder aufgebaut haben, und die immer an mich geglaubt haben, möchte ich mich von Herzen bedanken.

Jakob, Du hast mir auch ganz toll geholfen. Danke dafür.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**