

Aus dem Institut für Rechtsmedizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Mutationscreening im Gen für die Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase  
unter 405 am SIDS verstorbenen Säuglingen

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

|               |                 |
|---------------|-----------------|
| vorgelegt von | Janine Sorychta |
| aus           | Gardelegen      |
| Magdeburg     | 2010            |

# Dokumentationsblatt

## Bibliographische Beschreibung:

Sorychta, Janine:

Mutationscreening im Gen für die Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase unter 405 am SIDS verstorbenen Säuglingen.-2010.-93 Bl.: 12 Abb., 9 Tab., 1 Anl.

## Kurzreferat

Die autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselstörung MCADD kann in einem Enzymaktivitätsverlust verschiedenen Ausmaßes resultieren und bei kataboler Stoffwechsellage zu Hypoglykämien, Erbrechen, muskulärer Hypotonie und neurologischen Symptomen führen. Mit der Einführung der MCAD-Mangelerkrankung in das erweiterte Neugeborenen-Screening gelang eine Prävention vor schwerwiegenden Spätfolgen wie chronischen Anfallsleiden oder beispielsweise zerebraler Lähmung sowie der Vermeidung plötzlicher Todesfälle. Diesbezüglich wird in der Literatur ein Zusammenhang zwischen dem SIDS und der MCAD-Mangelerkrankung diskutiert. Ziele dieser Arbeit waren es, einen möglichen MCADD-SIDS-Zusammenhang zu eruieren sowie die Frequenz der Mutationen 157C>T, 244-245 Ins T und 799G>A in einem definierten SIDS-Obduktionsgut zu ermitteln. Zur Bewerkstelligung dieser Aufgabe dienten die PCR/Restriktionsmethode, die Polyacrylamidgelelektrophorese und die Silberfärbung. Die Restriktion der mutanten Allele erfolgte getrennt voneinander mit den Endonukleasen *BsrGI* für die Mutation 157C>T, *XcmI* für die Spaltung des an Position 244-245 Ins T mutierten Allels. *BgIII* spaltet das an Position 799G>A mutierte Allel. Unter dem vorhandenen SIDS-Obduktionsgut wurde keine der gesuchten Mutationen detektiert. Die Rolle der MCAD-Mangelerkrankung scheint eine untergeordnete Bedeutung in der SIDS-Ätiologie zu spielen.

## Schlüsselwörter:

MCAD-Mangel

SIDS (plötzlicher Säuglingstod)

PCR/ *BsrGI*/ *BgIII*/ *XcmI* Restriktionstest

157C>T/ 799G>A/ 244-245InsT Mutationsuntersuchung

# INHALTSVERZEICHNIS

|  |    |
|--|----|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS  | 5  |
| VORWORT  | 8  |
| 1. EINLEITUNG  | 9  |
| 1.1 Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel   | 9  |
| 1.2 ACADM-Gen, MCAD-Enzym und 985A>G Mutation  | 13 |
| 1.3 Fettstoffwechsel und die Rolle der Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenasen                    | 15 |
| 1.4 Fetale Fettsäureoxidationsstörungen und maternale Lebererkrankungen in der Schwangerschaft | 16 |
| 1.5 Sudden Infant Death Syndrome   | 17 |
| 1.5.1 Begriffserklärung  | 17 |
| 1.5.2 Risikofaktoren   | 19 |
| 1.5.2.1 Kindliche Risikofaktoren   | 19 |
| 1.5.2.2 Mütterliche und pränatale Risikofaktoren   | 22 |
| 1.5.3 Pathophysiologische Erklärungsmodelle zum SIDS   | 22 |
| 1.5.3.1 Long-QT-Syndrome und SIDS  | 23 |
| 1.5.3.2 Versagen von Arousalmechanismen und Schnappatmung                                      | 24 |
| 1.5.3.4 Metabolische Erkrankungen und SIDS   | 26 |
| 1.5.3.5 Infektionen und SIDS   | 27 |
| 1.5.4 Autopsie- und Leichenschaubefunde  | 27 |
| 1.6 Aufgabenstellung   | 29 |
| 1.7 Ethische Unbedenklichkeit der Untersuchung   | 30 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN   | 31 |
| 2.1 Material   | 31 |
| 2.1.1 Geräte für molekularbiologische und biochemische Arbeiten                                | 31 |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterialien für molekularbiologische und biochemische Arbeiten                 | 31 |
| 2.1.3 Chemikalien und Enzyme   | 31 |
| 2.1.4 Stamm- und Standardlösungen  | 32 |
| 2.1.5 Untersuchungsmaterialien   | 33 |
| 2.1.5.1 Leberbiopsien von 405 am plötzlichen Säuglingstod verstorbenen Säuglingen              | 33 |
| 2.1.5.2 Positivkontrollen für die Mutationen 157C>T, 244-245 Ins T und 799G>A                  | 33 |
| 2.2 Molekularbiologische Methoden  | 34 |
| 2.2.1 DNA-Amplifizierung durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)                            | 34 |
| 2.2.2 Primer, PCR-Produkte und artifizielle Restriktionsorte                                   | 35 |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen                                       | 38 |
| 2.2.4 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)  | 40 |
| 2.2.5 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen   | 41 |
| 2.2.6 Qualitätssicherung und Kontaminationsvermeidung                                      | 42 |
| 3. ERGEBNISSE  | 43 |
| 3.1 Screening auf die MCAD-Mutation 799G>A unter den SIDS-Opfern                           | 48 |
| 3.2 Screening auf die MCAD-Mutation 244-245 Ins T unter den SIDS-Opfern                    | 48 |
| 3.3 Screening auf die MCAD-Mutation 157C>T unter den SIDS-Opfern                           | 49 |
| 4. DISKUSSION  | 51 |
| 4.1 Screening auf MCADD, weitere mt-FAOD und Carnitinzyklusdefekte                         | 51 |
| 4.2 Unterschiedliche Untersuchungsmethoden für MCADD                                       | 53 |
| 4.2.1 Konventionelle biochemische Methoden   | 53 |
| 4.2.2 Genomische Diagnostik der MCADD  | 54 |
| 4.2.3 Screening auf bestimmte Mutationen im ACADM-Gen (Methodenbetrachtung)                | 55 |
| 4.3 Mutationen im ACADM-Gen und Genotypen-Phänotypen-Korrelationen                         | 56 |
| 4.4 Rolle der MCADD für den plötzlichen Säuglingstod                                       | 59 |
| 4.5 Weitere FAOD und Carnitinzyklusdefekte und ihre Rolle für den plötzlichen Säuglingstod | 61 |
| 4.5.1 Grundlagen der Fettsäureoxidation  | 61 |
| 4.5.2 Very-Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel (VLCADD)                               | 64 |
| 4.5.3 Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Mangel (LCHADD/mt-TFP-Defekt)             | 66 |
| 4.5.4 Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel (SCADD)                                    | 67 |
| 4.5.5 Carnitinzyklusdefekte  | 69 |
| 4.5.5.1 Carnitin-Palmitoyl-Transferase-I Mangel (CPT-I)                                    | 69 |
| 4.5.5.2 Carnitin-Palmitoyl-Transferase-II Mangel (CPT-II)                                  | 69 |
| 4.5.6 MAD-Mangel (Glutarazidurie Typ II)   | 71 |
| 4.5.7 Carnitintransporterdefekt  | 72 |
| 4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick  | 72 |
| ZUSAMMENFASSUNG  | 74 |
| LITERATURVERZEICHNIS   | 76 |
| DANKSAGUNG   | 89 |
| SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG  | 90 |
| BILDUNGSWEG  | 91 |
| Anhang   |    |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|         |  |
|---------|--|
| A       | Adenin   |
| ACADM   | Acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain                     |
| ACADVL  | Acyl-CoA dehydrogenase, very long chain                                |
| AFLP    | Acute fatty liver of pregnancy   |
| ALTE    | Apparent life-threatening event  |
| APS     | Ammoniumpersulfat  |
| BMBF    | Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie |
| bp      | Basenpaar(e)   |
| BSA     | Bovine serum albumin   |
| C       | Cytosin  |
| C0      | freies Carnitin  |
| C2      | Acetylcarnitin   |
| C3      | Propionylcarnitin  |
| C4      | Butyrylcarnitin  |
| C5      | (Iso)valerylcarnitin   |
| C5:1    | Tiglylcarnitin   |
| C6      | Hexanoylcarnitin   |
| C8      | Octanoylcarnitin   |
| C10     | Decanoylcarnitin   |
| C10:1   | Decenoylcarnitin   |
| C12     | Dodecanoylcarnitin   |
| C14     | Myristoylcarnitin  |
| C14:1   | Myristeylecarnitin   |
| C14:2   | Tetradecadienoylcarnitin   |
| C16     | Hexadecanoylcarnitin   |
| C16OH   | Hydroxypalmitoylcarnitin   |
| C18     | Stearoylcarnitin   |
| C18:1   | Octadecenoylcarnitin   |
| C18OH   | Hydroxystearoylcarnitin  |
| C18:1OH | Hydroxalocadecenoylcarnitin  |
| CACT    | Carnitin-Acylocarnitin-Translokase                                     |

|          |   |
|----------|---|
| CCHS     | Congenital central hypoventilation syndrome           |
| CoA      | Coenzym A   |
| CPT-I/II | Carnitin-Palmitoyl-Transferase-I/II                   |
| DNA      | Desoxyribonucleinacid                                 |
| dNTP     | Desoxyribonukleotidtriphosphat(e)                     |
| EDTA     | Ethylendiamintetraessigsäure                          |
| EMA      | Ethylmalonacid  |
| ETFP     | Elektronentransferflavoprotein                        |
| ETFP-DH  | Elektronentransferflavoprotein Dehydrogenase          |
| FAD      | Flavinadenindinucleotid, oxidierte Form               |
| FADH2    | Flavinadenindinucleotid, reduzierte Form              |
| FAO      | Fatty Acid Oxidation                                  |
| FAOD     | Fatty Acid Oxidation Disorder                         |
| FS       | Fettsäure   |
| G        | Guanin  |
| HELLP    | Hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets      |
| IUFT     | Intrauteriner Fruchttod                               |
| IUGR     | Intrauterine growth restriction                       |
| kb       | Kilobasen   |
| kD       | Kilodalton  |
| KG       | Körpergewicht   |
| LCEH     | Long-chain Enoyl-CoA Hydratase                        |
| LCHAD    | Long-chain-3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase            |
| LCHADD   | Long-chain-3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency |
| LCKAT    | Long-chain-3-Ketoacyl-CoA Thiolase                    |
| LQTS     | Long-QT-Syndrom                                       |
| M        | Molar   |
| Mb       | Megabasen   |
| MCAD     | Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase                   |
| MCADD    | Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency        |
| MS/MS    | Tandemmassenspektrometrie                             |
| NAD+     | Nikotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form          |
| OSAS     | Obstruktives Schlafapnoesyndrom                       |

|        |   |
|--------|---|
| PAGE   | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                   |
| PCR    | Polymerase Chain Reaction                         |
| PDA    | Piperazine Diacrylamide                           |
| PHOX2B | Paired-like homeobox 2b                           |
| SAS    | Schlafapnoesyndrom                                |
| SCAD   | Short-chain Acyl-CoA dehydrogenase                |
| SCADD  | Short-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency     |
| SCKAT  | Short-chain-3-Ketoacyl-CoA Thiolase               |
| SIDS   | Sudden infant death syndrome                      |
| SSW    | Schwangerschaftswoche                             |
| SUDI   | Sudden unexpected death in infancy                |
| T      | Thymin  |
| TBE    | Tris-Borsäure-EDTA                                |
| TEMED  | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin                       |
| TFP    | Trifunktionales Protein                           |
| Tm     | Melting temperature                               |
| Tris   | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                  |
| VLCAD  | Very-long-chain Acyl-CoA dehydrogenase            |
| VLCADD | Very-long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency |
| VNTR   | Variable tandem repeat region                     |

## VORWORT

Die in dieser Dissertationsschrift dargestellten Untersuchungen stehen in einem engen Kontext zur Promotionsarbeit von Yvonne Rosentreter. Gemeinsam wurde untersucht, ob in einem deutschlandweit gesammelten Obduktionsgut von 405 Opfern des Plötzlichen Kindstod-Syndroms (sudden infant death syndrome= SIDS) Individuen mit der Stoffwechselstörung Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defizienz (MCADD) zu finden sind. Bei meinen Untersuchungen konnte ich mich auf Ergebnisse der komplementären Arbeit von Frau Rosentreter stützen. Danach tragen in Deutschland fast alle MCADD-Patienten die Mutationen 985A>G, 157C>T, 799G>A, 244-245 insert T in homo- oder compound-heterozygoter Form. Deshalb war es ausreichend mithilfe von vier Screeningverfahren nach diesen Mutationen zu suchen und zu entscheiden, ob die MCAD-Defizienz in Deutschland einen nennenswerten Beitrag zum SIDS-Problem leistet. Das Screening auf die 985A>G Mutation wurde von Frau Rosentreter ausgeführt, meine Aufgabe war die Suche nach 157C>T, 799G>A und 244-245 insert T. Die DNA-Präparation aus Lebergewebe wurde zum größten Teil von Frau Rosentreter ausgeführt, so dass ich auf die bereits extrahierten DNA-Proben zurückgreifen konnte.

# 1. EINLEITUNG

Da sich die vorliegende Arbeit mit dem Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel und dem Plötzlichem Kindstod-Syndrom beschäftigt, soll hier zunächst in diese beiden Themengebiete eingeführt werden.

## 1.1 Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel

Der Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD)-Mangel ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselstörung [97]. Der erste Patient mit einer MCAD-Defizienz wurde 1976 von Gregersen et al. beschrieben [22]. Mutationen im ACADM-Gen können in einer herabgesetzten Enzymaktivität der Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase unterschiedlichen Ausmaßes resultieren und unter bestimmten Voraussetzungen zur klinischen Manifestation führen. Gewöhnlich kommt es erst bei kataboler Stoffwechsellage zu Symptomen, folglich nach oder während prolongierter Fastenperioden, nach febriler Erkrankung sowie nach gastrointestinalen Erkrankungen mit Emesis und Diarrhoe, wenn die beeinträchtigte  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren jenseits der mittleren Kettenlänge nicht in der Lage ist den gesteigerten Energiebedarf durch ausreichende Ketogenese zu decken [30, 51, 97]. Die  $\beta$ -Oxidation wird benötigt, wenn die Glykogenspeicher der Leber geleert sind. Dies trifft nach  $\geq 12$  h Fastendauer zu [11]. Da nicht auf Fettsäuren als Energiespender umgeschaltet werden kann, entwickelt sich rasch eine hypoketotische Hypoglykämie, das Leitsymptom aller  $\beta$ -Oxidationsdefekte [77, 98, 109]. Die akkumulierenden Fettsäuren mittlerer Kettenlänge (C6, C8, C10) werden an Carnitin gebunden und renal eliminiert. Daraus kann ein sekundärer Carnitinmangel resultieren [51]. Als Konsequenz des Substratmangels und der Anhäufung toxischer Metabolite können sich Symptome wie Erbrechen, muskuläre Hypotonie und neurologische Symptome wie Apathie, Bewusstlosigkeit und zerebrale Krampfanfälle entwickeln [23, 25, 51, 98, 103]. Des Weiteren wurden Todesfälle durch Arrhythmien im Zusammenhang mit MCAD-Mangel beschrieben. Die hohen Plasmakonzentrationen freier Fettsäuren sollen mit einer steigenden Inzidenz ventrikulärer Arrhythmien bei Patienten mit akuter myokardialer Ischämie assoziiert sein [25]. Kairamkonda et al. beschreiben Duodenalulcera in Zusammenhang mit MCADD [47]. Auch Püst et al. fanden bei einem Patienten mit Abbaufekt überlangkettiger Fettsäuren bei der Autopsie ein perforiertes Ulcus duodeni. Auslösend könnte ein durch schwere Hypoglykämien hervorgerufener

Hyperkortisolismus sein [77]. Hepatomegalie kann bei MCADD-Patienten ein markantes Merkmal sein, was zur Fehldiagnose eines Reye-Syndroms führen kann [76]. Hyperammonämie assoziiert mit hypoketotischer Hypoglykämie können zum Koma führen. Laktat ist bei MCAD-Mangel in akuter metabolischer Dekompensation die einzige zur Verfügung stehende Verbindung, die vom Gehirn als Energiequelle genutzt werden kann. Sie genügt jedoch nicht um die normalen Hirnfunktionen aufrecht zu erhalten. Ketogenese steigert physiologisch die Aufnahme neutraler Aminosäuren im Austausch gegen Glutamin. Beim MCAD-Mangel kann es durch Mangel an Ketonkörpern zu erhöhten Glutaminkonzentrationen im Gehirn kommen und auf diese Weise den toxischen Effekt der gleichzeitigen Hyperammonämie steigern [25]. Die meisten MCADD-Patienten erleiden ihre erste metabolische Krise in den ersten zwei Lebensjahren [2, 11, 22, 30].

Pollitt und Leonard fanden in einer prospektiven Studie ein mittleres Alter von 1,1 Jahren bei Auftreten der ersten Episode [76]. Derks et al. haben ein mittleres Alter bei Erstmanifestation von 17,7 Monaten beschrieben, aber auch Erstmanifestationen während der Neonatalperiode oder des Erwachsenenalters werden angegeben [22, 25]. Feillet et al. berichten von einem 33-jährigen Patienten mit Erstmanifestation klassischer Symptome eines MCAD-Mangels und nachgewiesener Homozygotie für die 985A>G Mutation [25]. Über Mortalitätsraten von 16-26 % bei akuter metabolischer Dekompensation vorab nicht diagnostizierter Patienten wird berichtet [2, 22, 97]. Versterben Kinder während solcher foudroyant verlaufenden, metabolischen Krisen und wird die ursächliche Erkrankung nicht erkannt, kann dies zur Fehldiagnose Sudden infant death syndrome (SIDS) führen. Einige Patienten können auch ihr Leben lang asymptomatisch bleiben [2]. Jedoch sind asymptomatische MCADD-Patienten nicht notwendigerweise normoglykämisch und es bleibt so die Gefahr einer hypoglykämischen Hirnschädigung bei Nichteinhaltung präventiver Maßnahmen [102]. Bei der Neigung zur Entwicklung klinischer Symptome gibt es große interindividuelle Unterschiede [23]. Verschiedene Genotypen könnten für die unterschiedliche klinische Ausprägung von Symptomen verantwortlich sein [2, 3]. Experimentelle Studien von Andresen et al. konnten zeigen, dass endogene Faktoren, wie die Zahl der verfügbaren Chaperone (Hitzeschockprotein 60) von Bedeutung für das Ausmaß der Enzymrestaktivität sind [2, 3]. Die Anfallshäufigkeit bei MCADD-Patienten nimmt mit zunehmendem Alter ab, da sich die Fastentoleranz mit zunehmender Körpermasse verbessert [23, 98]. Nur wenige Studien zu den Langzeitfolgen eines MCAD-Mangels sind bisher veröffentlicht. In einer prospektiven Studie von Pollitt und Leonard erlitten 6 von 36 überlebenden MCADD-

Patienten neurologische Schäden [76]. Grosse et al. schätzen, dass etwa 9 % der Überlebenden mit klinisch diagnostiziertem MCAD-Mangel geistig retardiert sind [30]. In einer retrospektiven Analyse zur klinischen Präsentation und Langzeitauswirkungen in den Niederlanden von Derks et al. berichten 35 % der Patienten über chronische Müdigkeit, 31 % über Muskelschmerzen und 39 % über eine reduzierte Belastbarkeit [22]. Die Ergebnisse der Langzeitfolgeevaluation von Iafolla und Kollegen fasst Tabelle 1 zusammen [97].

**Tabelle 1:** Häufigkeiten der Langzeitfolgen für MCADD-Patienten aus einer Studie von Iafolla et al. [97].

| Langzeitfolgen                   | % der MCADD-Patienten |
|----------------------------------|-----------------------|
| Entwicklungsverzögerung          | 16 %                  |
| Sprachverzögerung                | 22 %                  |
| Verhaltensstörungen              | 15 %                  |
| ≥ 1 der oben genannten Störungen | 32 %                  |
| Aufmerksamkeitsdefizit           | 12 %                  |
| proximale Muskelschwäche         | 16 %                  |
| chronisches Anfallsleiden        | 14 %                  |
| zerebrale Lähmung                | 9 %                   |
| Gedeihstörung                    | 10 %                  |
| Aphasie nach Erkrankung          | 5 %                   |

Die Bestimmung der spezifischen Acylcarnitinspiegel mit der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bietet einen sensitiven und spezifischen Test für das erweiterte Neugeborenen-Screening auf die MCADD-Erkrankung, insbesondere auch für die milde Ausprägung dieser Erkrankung [3, 25, 30, 90, 109]. Der Leitparameter beim MCAD-Mangel im MS/MS ist eine erhöhte Konzentration von Octanoylcarnitin (C8) [51, 59, 79, 90]. Patienten, bei denen die Mutation 985A>G in homozygotem Zustand vorliegt, haben häufig Octanoylcarnitinwerte > 10 µmol/l während der ersten 24-72 h des Lebens. Lehotay et al. konnten zeigen, dass Frühgeburtlichkeit und niedriges Geburtsgewicht ebenso mit ansteigenden C8-Werten verbunden sein können. Ihre Daten deuten auf ein umgekehrt-proportionales Verhältnis zwischen MCAD-Enzymrestaktivität und C8-Spiegeln im Blut hin [59]. Die Bestimmung des Acylcarnitinprofils (C6, C8, C10 und C10:1) und die Bildung der Quotienten C8/C12, C8/C10 und C8/2 kann die diagnostische Sicherheit weiter erhöhen [51, 59, 109]. Insbesondere ermöglicht die Bildung der Quotienten C8/C12 und C8/C2 die Unterscheidung

zwischen 985A>G heterozygoten Patienten und gesunden Neugeborenen [79]. Das hierfür benötigte Material wird von getrockneten Blutflecken gewonnen, die nach der 36. Lebensstunde im Rahmen des erweiterten Neugeborenen-Screenings auf Filterpapier getropft werden. An der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zählt MCADD seit 1999/2000 zu den im erweiterten Neugeborenen-Screening gesuchten Krankheiten. Die Octanoylcarnitinprofile fallen zwei- bis dreifach im Abstand zwischen dem 1.-2. und 6.-10. Lebenstag bei 985A>G homozygoten Patienten. Dies ist von Interesse für Nachuntersuchungen [79]. Die Acylcarnitinspiegel können durch sekundären Carnitinmangel supprimiert werden und falsch negativ ausfallen [30]. Deshalb werden weitere diagnostische Marker zur Diagnosesicherung herangezogen.

Zur Diagnosebestätigung können die organischen Säuren Adipin-, Suberin- und Sebacinsäure und die Glycinkonjugate Hexanoyl- und Suberylglycin im Urin mit der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GS/MS) bestimmt werden [11, 51, 109]. Die typischen Muster organischer Säuren im Urin persistieren länger als die Serumveränderungen nach metabolischer Entgleisung, sind jedoch nur für weniger als 24 h detektierbar [25]. So können Urinalysen normal ausfallen, wenn kein metabolischer Stress besteht [109]. Folglich ist die GS/MS mit Bestimmung der organischen Säuren keine geeignete Screening-Methode für Neugeborene [3]. Sie eignet sich jedoch gut zur Diagnosesicherung in der akuten metabolischen Krise [3, 29]. Hexanoylglycinspiegel im Urin sind des Weiteren kein MCADD-spezifischer Befund, sie werden auch bei multiplen Acyl-CoA Dehydrogenase Defekten beobachtet [95].

Ein schneller und spezifischer in vivo-Test ist der 3-Phenylpropionsäure (PPA)-Belastungstest (zum Beispiel 25 mg/ kg/ KG PPA-Gabe nach Rumsby et al. 1986). Die 3-Phenylpropionsäure ist eine nicht-toxische Substanz, die auch von der normalen Darmflora produziert wird und die die Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase zur Oxidation zu Hippursäure benötigt. Nach PPA-Belastung scheiden MCADD-Patienten große Mengen Phenylpropionylglycine mit dem Urin aus [109]. Auch in einer akuten metabolischen Krise wird dieser Metabolit an Glycin konjugiert, vermehrt im Urin ausgeschieden und kann als diagnostischer Parameter herangezogen werden. Unter antibiotischer Therapie kann Phenylpropionylglycin auch fehlen [11]. Auf der Basis einer Studie von Bennett et al. ist anzunehmen, dass PPA einen unzuverlässigen Marker in der frühen Kindheit darstellt, da unter 3-4 Monaten die PPA-produzierende Flora nicht ausreichend für aussagekräftige Messungen ist [8]. Rashed et al. schlagen die Untersuchung von Gallensekret zur Erstellung

eines postmortalen Acylcarnitinprofils zur Detektion metabolischer Störungen bei plötzlich und unerwartet verstorbenen Säuglingen und Kindern vor. Die beobachteten Acylcarnitinkonzentration waren im Gallensekret 10-14fach höher [78].

Romppanen et al. nutzten erfolgreich PCR und Oligonucleotide Ligation Assay zur Mutationsanalyse der häufigen 985A>G Mutation einer finnischen Population auf die MCAD-Mangelerkrankung [80].

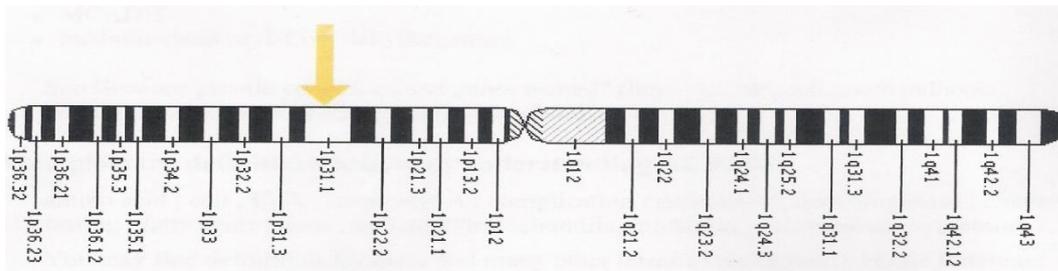
Allgemeine unspezifische laborchemische Veränderungen während der akuten Entgleisung können hypoketotische Hypoglykämie, Hyperammonämie, Transaminasenerhöhungen, Erhöhung der Kreatinkinase und metabolische Azidose beinhalten [25, 51].

Enzymaktivitätsmessungen an Fibroblastenkulturen ermöglichen Aussagen über die Enzymrestaktivität. Schlussendlich sichern molekulargenetische Untersuchungen den Genotyp des vorliegenden MCAD-Mangels.

Die Therapie des MCAD-Mangels liegt in der Vermeidung von Fastenperioden und einer fettarmen, kohlenhydratreichen Diät. Der Nutzen einer prophylaktischen Carnitinsupplementierung wird kontrovers diskutiert [23, 25, 98, 106]. Klinischen Studien zufolge empfehlen Derks et al. eine maximale Fastendauer zwischen dem sechsten Lebensmonat und dem ersten Lebensjahr von 8 h. Bis zum zweiten Lebensjahr sollte die Fastendauer 10 h nicht überschreiten und nach dem zweiten Lebensjahr nicht mehr als 12 h betragen [23]. Dies impliziert den Rat einer zusätzlichen Spätmahlzeit während der ersten zwei Lebensjahre [23, 51]. Während interkurrenter fieberhafter Infekte verkürzt sich die Fastendauer entsprechend [23]. Es wurde beobachtet, dass präpubertäre Jungen und Mädchen unter MCADD-Therapie zu Übergewicht neigen. Diskutiert wird, ob der MCAD-Mangel mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Insulinresistenz und eines Diabetes mellitus Typ II verbunden sein könnte [22]. Während einer akuten metabolischen Krise sowie prä- und intraoperativ bei Patienten mit vorbeschriebener Fastenintoleranz sollten 10%tige Glukoselösungen infundiert werden [51, 98]. Bei Mangel an freiem Carnitin wird empfohlen, dieses in Dosierungen von 20-50 mg/ kg KG zu substituieren [51].

## **1.2 ACADM-Gen, MCAD-Enzym und 985A>G Mutation**

Matsurbara et al. kartierten 1986 das ACADM-Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 an Position 31 (1p31) [112]. Die Abbildung 1 verdeutlicht dies anhand einer schematischen Darstellung des Chromosoms 1.

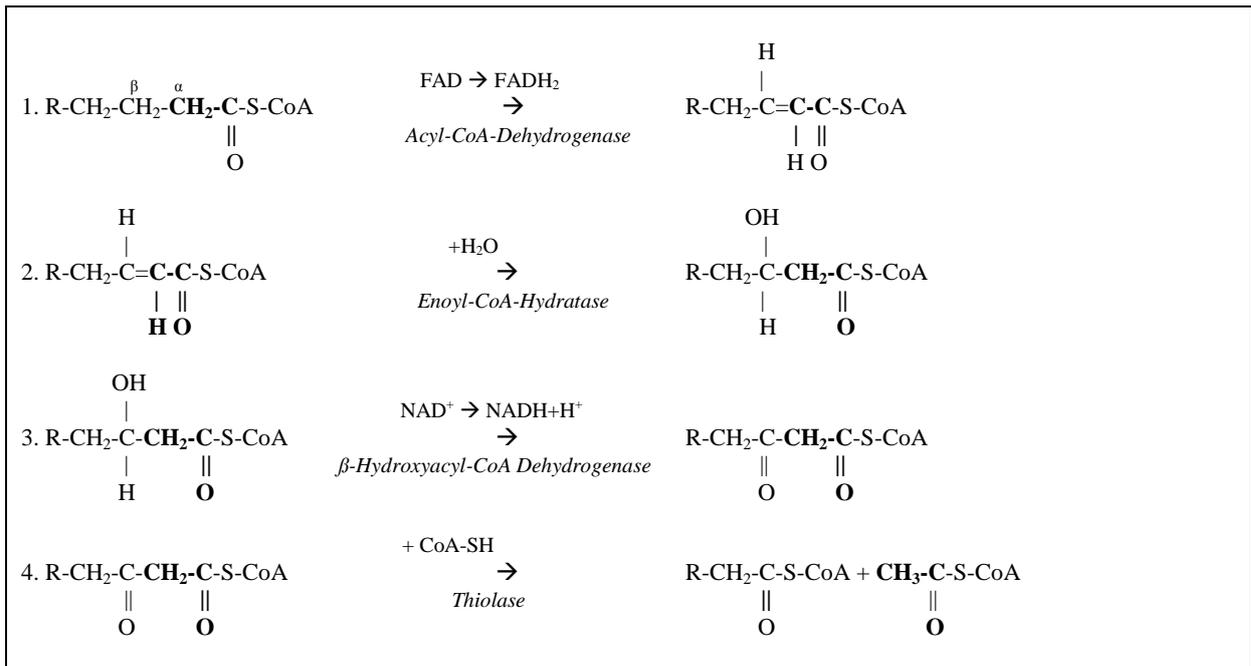


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Chromosoms 1. Der Pfeil markiert den Abschnitt des ACADM-Gens an Position 31 auf dem kurzen (p) Arm des Chromosoms 1 (1p31.1), der für das Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Enzym kodiert [111].

Das ACADM-Gen kodiert für das Enzym Acyl-Coenzym A Dehydrogenase für mittellangkettige Fettsäuren, welches die initiale Reaktion der  $\beta$ -Oxidation von C4-C10 unverzweigter Acyl-CoAs katalysiert [111, 112]. Das Gen umfasst die Basenpaare 75.962.869 bis 76.001.770 [111] und setzt sich aus 12 Exons, die durch 11 Introns unterbrochen werden, zusammen (Zhang et al. 1992) [112]. Kelly et al. bestimmten 1987 die Nukleotidsequenz der MCAD-mRNA, welche eine 1263 bp kodierende Region und einen 738 bp langen, 3'-nicht-translatierten Bereich umfasst [48]. Die Sequenz verschlüsselt ein Vorläuferprotein von 421 Aminosäuren [48]. Die ersten 25 Aminosäuren stellen die Signalsequenz dar, welche beim Import in die Mitochondrien abgespalten wird. Der zytoplasmatischen Translation folgt der Import des MCAD-Vorläuferproteins in die Mitochondrien. Dort wird die Faltung des MCAD-Monomers (42,5 kD) durch Chaperone unterstützt. Anschließend werden die Monomere zum homotetrameren MCAD-Enzym zusammengesetzt, mit je einem Molekül FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) pro Untereinheit [2]. Die dreidimensionale Struktur der MCAD ist in Abbildung 2 wiedergegeben. Mehr als 70 Mutationen konnten bereits im ACADM-Gen identifiziert werden. Die Tabelle 8 gibt einen Überblick über bisher detektierte Mutationen. Die Mehrzahl der bisher bekannten Mutationen sind sogenannte Missense-Mutationen, bei denen es zum Austausch einer Aminosäure kommt [30, 111]. Andresen et al. fanden in Expressionsexperimenten an *E.coli* bei Missense-Mutationen teilweise hohe Enzymrestaktivitäten, wohingegen Mutationen mit Einbau eines vorzeitigen Stopp-Codons keine Enzymrestaktivität hinterließen [2]. Die häufigste Mutation im ACADM-Gen ist eine Punktmutation an Position 985 im Exon 11, die zu einem Austausch der Base Adenin zu Guanin führt (985A>G). Im MCAD-Protein resultiert die 985A>G Mutation in einer Substitution von Glutamat durch Lysin an Position 329 des Vorläuferproteins (Lys329Glu) beziehungsweise an Position 304 des reifen Proteins (K304E) [30, 111, 112]. Diese Mutation wurde in 90 % der mutierten Allele des ACADM-Gens bei retrospektiv identifizierten Patienten gefunden. Etwa 80 % der Betroffenen sind homozygot für die 985A>G Mutation



übertragen. In der vierten und letzten Reaktion wird durch ein freies CoA das carboxyterminale C2-Fragment abgespalten. Es entsteht ein Molekül Acetyl-CoA sowie ein um zwei C-Atome verkürztes CoA-Thioester. Diese vier Schritte wiederholen sich so oft, bis die Fettsäure komplett abgebaut wurde. Das bei jedem Durchgang entstehende Acetyl-CoA-Molekül geht in den Zitratzyklus über und wird unter Energiegewinnung zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O vollständig abgebaut [58]. Abbildung 3 stellt den Ablauf zusammenfassend dar.



**Abbildung 3:** Überblick über die vier Schritte der β-Oxidation.

#### 1.4 Fetale Fettsäureoxidationsstörungen und maternale Lebererkrankungen in der Schwangerschaft

Die akute Schwangerschaftsfettleber (AFLP) und das HELLP (haemolysis, elevated liver enzymes, low platelets)-Syndrom sind seltene Erkrankungen des dritten Trimesters einer Schwangerschaft. Eine akute Schwangerschaftsfettleber kann sich in abdominellen Beschwerden mit Nausea und Vomitus äußern und rasch progredient zum Leberversagen mit Koagulopathie, Enzephalopathie und Tod führen. Das HELLP-Syndrom, eine Sonderform der Präeklampsie, geht mit einem ähnlichen klinischen Erscheinungsbild wie das Krankheitsbild der akuten Schwangerschaftsfettleber einher und äußert sich laborchemisch in einer Hämolyse, erhöhten Transaminasewerten und einer Thrombozytopenie.

Nelson et al. berichteten über eine Schwangere, welche in der Frühschwangerschaft an einer Hyperemesis gravidarum litt und bei der in der 28. SSW eine Präeklampsie mit einer

transienten ischämischen Attacke erschwerend hinzukamen. Bei fulminantem HELLP-Syndrom wurde die Patientin in der 32. SSW entbunden. Der Säugling verstarb im Alter von 17 Monaten an einem post mortem diagnostizierten MCAD-Mangel [68].

Auch Browning et al. bringen diese schwangerschaftsbedingten Erkrankungen mit Fettsäureoxidationsstörungen des Feten in Verbindung. Sie konnten retrospektiv zeigen, dass Mütter in 16 % der Fälle eine Lebererkrankung während der Schwangerschaft hatten, wenn der Fetus an einem Fettsäureoxidationsdefekt (FAOD) litt. 32 % der FAOD-Patienten dieser Studie litten an einem Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase (LCHAD)-Mangel und 68 % an einem Short-chain Acyl-CoA Dehydrogenase (SCAD) oder Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel [15]. Eine umfangreiche Studie von Tyni et al. zeigte, dass maternale Lebererkrankungen während der Schwangerschaft häufiger vorkommen, wenn der Fetus an einem LCHAD-Mangel leidet. Höhere Inzidenzen zeigten sich in ihrer Studie auch im Hinblick auf Frühgeburtlichkeit, Asphyxie, intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR) und intrauterinem Fruchttod (IUFT) [42]. Ibdah et al. fanden bei Müttern mit LCHADD-Feten in 79 % durch AFLP oder HELLP-Syndrom komplizierte Schwangerschaften. Erklärungsmöglichkeiten sehen sie in der reduzierten Kapazität zur Oxidation langkettiger Fettsäuren, bedingt durch eine obligate Heterozygotie der Mutter für den LCHAD-Mangel sowie den während der Schwangerschaft steigenden Plasma-Fettsäuren und akkumulierenden, möglicherweise lebertoxischen 3-Hydroxy-Fettsäuren bei isoliertem LCHAD-Defekt. Tierexperimente deuten auf eine signifikante Reduktion mitochondrialer Fettsäureoxidation Schwangerer hin [42].

## **1.5 Sudden Infant Death Syndrome**

### **1.5.1 Begriffserklärung**

Im Jahre 2004 war das Sudden Infant Death Syndrome (SIDS; ICD-10:R95) mit einer Inzidenz von 0,46/1000 Lebendgeburten immer noch die führende Todesursache des ersten Lebensjahres in Deutschland [92]. Der Begriff SIDS wurde erstmals im Jahre 1969 auf der zweiten Internationalen Konferenz für „Causes of Sudden Death in Infants“ als der plötzliche Tod eines jeden Säuglings und Kleinkindes, welcher aus der Exploration der Krankheitsgeschichte heraus unerwartet auftrat und bei dem sich auch nach gründlicher Obduktion keine adäquate Todesursache ergab, definiert [53]. Im Laufe der Jahre hat dieser

Begriff einige Überarbeitungen erfahren. In einer aktuellen Definition (2004) ist dann von SIDS die Rede, wenn der Tod eines Kindes unter einem Jahr ( $> 21$  Tage und  $< 9$  Monate Lebensalter) eintritt, sich die schwerwiegende Episode scheinbar während des Schlafes ereignet und auch nach sorgfältigen Untersuchungen, einschließlich einer vollständigen Autopsie, Rückblick auf die Todesumstände sowie der Anamnese unerklärt bleibt [41, 53, 54]. Unter den Gesichtspunkten Klinik, Todesumstände und Autopsiebefunde erfolgte die Subklassifizierung in vier Kategorien (Kategorie IA, IB, II und unklassifizierter plötzlicher Säuglingstod). Kategorie IA schließt alle Kindstodfälle ein, die der allgemeinen Definition entsprechen sowie den folgenden Anforderungen: Die Anamnese sowie der Schwangerschaftsverlauf sind unauffällig, Wachstum und Entwicklung waren normal, es liegen keine gleichartigen Todesfälle unter Geschwistern und nahen Verwandten und weiteren Kindern derselben Aufsichtsperson vor. Die Untersuchungen des Sterbeortes boten keine Erklärung für den Tod. Das Kind wurde in einer sicheren Schlafumgebung ohne Anhalt für einen unfallbedingten Tod aufgefunden. Die Autopsie ergab keine potentiell lebensbedrohlichen Befunde, maximal leichte inflammatorische Infiltrationen im respiratorischen System, intrathorakale petechiale Blutungen unterstützen den Verdacht, sind jedoch nicht obligatorisch. Es bestehen keine Anzeichen für ein Trauma, Missbrauch, Vernachlässigung oder unabsichtlicher Verletzungen. Die Obduktion erbrachte des Weiteren keine Hinweise auf einen wesentlichen Stresseffekt auf den Thymus. Toxikologie, Mikrobiologie, Radiologie, Glaskörperchemie und metabolisches Screening fielen negativ aus. Kategorie IB umfasst alle diejenigen Kindstodfälle, die den Anforderungen der allgemeinen Definition entsprechen und alle Kriterien der Kategorie IA erfüllen, ausgenommen nicht durchgeführter Untersuchungen am Sterbeort sowie  $\geq 1$  eine der folgenden nicht durchgeführten Untersuchungen: Toxikologie, Mikrobiologie, Radiologie, Glaskörperchemie oder metabolisches Screening. Kategorie II schließt alle Kindstodfälle ein, die den Kriterien der Kategorie I entsprechen, ausgenommen folgender: Alter außerhalb des definierten Altersbereiches, ähnliche Todesfälle unter Geschwistern, nahen Verwandten oder Kindern unter derselben Aufsichtsperson, ohne dass Indizien für einen Kindsmord oder einer genetischen Störung vorliegen. Neonatal oder perinatal bedingte Umstände (zum Beispiel solche aus Frühgeburtlichkeit resultierend), die sich zum Zeitpunkt des Todes bereits rückgebildet hatten. Mechanische Asphyxie oder Ersticken konnte durch Untersuchung der Todesumstände nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. In der Autopsie zeigten sich abnormales Wachstum und Entwicklung, die jedoch vermutlich nicht zum Tode beigetragen

haben sowie deutliche inflammatorische Veränderungen oder Abnormalitäten, die nicht zu einer ausreichenden Klärung der Todesursache führten. Als unklassifizierten plötzlichen Säuglingstod bezeichnet man jene Fälle, die sich nicht in Kategorie I oder II einordnen lassen, alternative natürliche oder unnatürliche Todesursachen jedoch fraglich erscheinen [28, 53].

Ein in diesem Zusammenhang häufig verwendeter Begriff ist ALTE (Apparent life-threatening event). Synonyma: anscheinend lebensbedrohliches Ereignis, near-miss SIDS, Attacks of Lifelessness, Infantile prolongierte Apnoe, Malaise. ALTE ist eine Situationsbeschreibung, die gekennzeichnet ist durch folgende Charakteristika: plötzliche Atemaussetzer (zentral oder seltener obstruktiv), akute Veränderung der Hautfarbe (Blässe oder Zyanose) und Muskeltonusveränderungen (Hyper- oder Hypotonie) [31, 41]. Scheinbar lebensbedrohliche Ereignisse treten ab der ersten Lebenswoche mit zunehmender Häufigkeit auf, um im ersten Lebensmonat ihren Höhepunkt zu erreichen. Damit liegt der Häufigkeitsgipfel der ALTE-Fälle mehrere Lebenswochen vor dem ersten Häufigkeitsgipfel der SIDS-Fälle [31]. In einigen Fällen gehen scheinbar lebensbedrohliche Ereignisse SIDS-Fällen voraus [41, 54, 55]. Zum Teil wird eine Risikoerhöhung auf das Drei- bis Fünffache angegeben [41].

## **1.5.2 Risikofaktoren**

### **1.5.2.1 Kindliche Risikofaktoren**

Als die wohl wichtigsten vermeidbaren kindlichen Risikofaktoren sind die Bauch- als auch die Seitenlage anerkannt [6, 41, 46, 105]. Das Risiko am plötzlichen Kindstod zu versterben, ist für Säuglinge, die in Bauchlage schlafen gelegt werden, etwa auf das Fünf- bis Zehnfache [46] beziehungsweise Drei- bis Neunfache [93] erhöht. Am gefährlichsten scheint die ungewohnte Bauchlage zu sein. Dies betrifft Kinder, die für gewöhnlich in Rückenlage schlafen gelegt werden, jedoch beim letzten Schlaf in Bauchlage schlafen gelegt wurden oder sich im Schlafe in die Bauchlage gedreht haben. Frühestens mit vier Monaten, spätestens aber mit acht Monaten können sich Säuglinge bei normaler Entwicklung spontan von der Rücken- in die Bauchlage drehen. Bei der Lagerung in Seitenlage scheinen Kinder noch etwa doppelt so häufig von SIDS betroffen zu sein [41, 46]. Die Bauchlage involviert ein weites Feld potentieller Probleme. Negative Auswirkungen der Bauchlage erklärt man sich durch eine Minderperfusion des Hirnstammes in Bauchlage bei gleichzeitiger Seitwärtsdrehung des

Kopfes [75], erschwerte Erweckbarkeit des Kindes in Bauchlage [46, 53], höheres Risiko für Magensäurereflux in Bauch- als in Rückenlage [41], Zwerchfellermüdung, CO<sub>2</sub>-Rückatmung, Reflexsenkung des Vasomotorentonus mit Tachykardie, obere Atemwegsobstruktionen als Ergebnis zu weichem Schlaflagers sowie Überwärmung [53]. Die Bauchschlafposition soll außerdem mit einer höheren Prävalenz von bakterieller Kolonisation des oberen Respirationstraktes assoziiert sein [99]. Mageninhaltaspiration scheint aber in Bauchlage nicht signifikant häufiger vorzukommen als in Rückenlage [6]. Darüber hinaus sei erwähnt, dass ein gesunder oder auch ein leicht kranker Säugling praktisch nie Erbrochenes aspiriert, da der Würgerreflex zu den sichersten Reflexmechanismen zählt. Eher ist dies ein agonales Phänomen oder durch Reanimationsversuche und Lageveränderungen nach dem Tode bedingt [6, 34]. Über mögliche Nebenwirkungen einer ausschließlichen Rückenlage ist bisher noch wenig bekannt. Diskutiert werden die Ausbildung flacher Hinterköpfe, das spätere Erlernen grobmotorischer Fähigkeiten sowie eine verringerte Schlafentiefe [46].

Einen weiteren kindlichen Risikofaktor stellt das Säuglingsalter dar. Den Häufigkeitsgipfel von SIDS findet man zwischen dem zweiten bis vierten Lebensmonat [6, 28, 36, 53, 54]. Die meisten SIDS-Fälle (ca. 90 % [28]) haben sich aber zumindest bis zum sechsten Lebensmonat ereignet [28, 41]. Dieser Häufigkeitsgipfel wird von verschiedenen Autoren mit dem Abfall passiv erworbener maternaler Antikörper und der noch insuffizienten Produktion eigener Antikörper in Zusammenhang gebracht [36]. Reifungsschübe des ZNS im Alter von 2-3, 5-7 und 9-10 Monaten scheinen zu einer funktionellen Instabilität bei der Steuerung von Atmung, Arousalmechanismen, Herz-Kreislauf- und Temperaturregulation zu führen [54].

Das männliche Geschlecht ist insgesamt häufiger betroffen (circa 60 % der SIDS-Fälle) [6, 28, 36]. Die Übersterblichkeit männlicher Säuglinge ist jedoch kein SIDS-spezifisches Phänomen [34]. 2/3 der SIDS-Fälle ereignen sich in der infektblastigen kalten Jahreszeit [6, 28, 34, 36]. Seit den "Back to Sleep" Kampagnen Anfang der 90er Jahre ist ein deutlicher Rückgang der SIDS-Inzidenz zu verzeichnen [56, 93]. Mit diesem Rückgang scheint auch die saisonale Häufung abgenommen zu haben [56]. Eine nächtliche Vorherrschaft dieses Ereignisses ist bekannt, so ereignen sich etwa 2/3 der Fälle zwischen 22:00 und 7:30 Uhr [10, 28] beziehungsweise zwischen 20:00 und 8:00 Uhr (~57,3 %) [34].

Steht für einen Säugling kein eigener Schlafplatz zur Verfügung, sondern wird dieser gemeinschaftlich genutzt, scheint dies mit einem erhöhten SIDS-Risiko assoziiert zu sein [41, 46, 93, 105]. Diskutiert wird jedoch, ob es sich hierbei um einen unabhängigen Risikofaktor handelt [72]. Es konnte gezeigt werden, dass die gemeinschaftliche Nutzung eines

Schlaflagers in Zusammenhang mit mütterlichem Nikotinabusus, Nutzung eines Sofas als Schlafplatz, kindlichem Alter < 11 Wochen und dem gleichzeitigen Gebrauch eines Schlafplatzes durch mehrere Kinder das SIDS-Risiko erhöhen [72].

Tabakrauchexposition führt zu einer Verdreifachung des Risikos für den plötzlichen Kindstod. Frühgeburtlichkeit ist mit einer erhöhten SIDS-Inzidenz auf bis zu 4-10/1000 Lebendgeburten verbunden [54]. Von Frühgeburtlichkeit spricht man bei einem Gestationsalter < 260 d, also < 37. vollendete Schwangerschaftswoche (SSW). Bei Säuglingen mit einem Geburtsgewicht von 1500-2499 g erhöht sich das SIDS-Risiko auf das Dreifache beziehungsweise bei einem Geburtsgewicht 1000-1499 g bis auf das Vierfache. Viele Studien haben ein umgekehrtes Verhältnis zwischen dem Risiko für SIDS und dem Geburtsgewicht beziehungsweise dem Gestationsalter ergeben [28, 41, 54]. Überwärmung durch hohe Raumtemperatur, erhöhte Körpertemperatur, exzessives Betten oder Bekleidung sind bei gleichzeitiger Bauchschlafelage mit einem sechs- bis zehnfach erhöhtem SIDS-Risiko verbunden [41, 105]. Diskutiert wird, ob der Verzicht auf einen Schnuller als unabhängiger Risikofaktor angesehen werden kann. Wenn für gewöhnlich ein Schnuller zum Schlafen verwendet wurde, nicht jedoch beim letzten Schlafenlegen, scheint sich die SIDS-Inzidenz zu erhöhen [26, 35, 41]. Franco et al. fanden eine niedrigere Arouschwelle unter Säuglingen, die häufig einen Schnuller gebrauchen. Diskutiert wird weiterhin, ob die Senkung der Arouschwelle durch das häufige Verlieren des Schnullers im Schlaf und den damit verbundenen Schlafunterbrechungen erklärt werden kann. Andere Autoren theoretisieren, dass Schnullergebrauch die Fähigkeit zur Mundatmung fördern kann, wenn nasale Atemwege verlegt sind [35]. Andererseits beobachtete man unter den Schnullernutzern einen geringen Anstieg von Otitis media, Infektionen des Respirations- und Gastrointestinaltraktes sowie Bissanomalien [35, 41]. Die Einführung des Schnullergebrauches sollte erst erfolgen, wenn sich das Stillen voll etabliert hat [35]. In einer Studie von Fleming et al. war der Gebrauch eines Schnullers mit einer niedrigeren Prävalenz des Stillens und kürzerer Stilldauer assoziiert [26]. Stillverzicht [41, 46, 92, 105], eine für SIDS positive Familienanamnese, ungünstige Schlafbedingungen wie die Verwendung von großen, weichen Kopfkissen, schweren Bettdecken, weichen Matratzen, Schafsfellen als Schlafunterlage, loses Bettzeug sowie Schlafen auf dem Sofa (zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko) sind andere wichtige Risikofaktoren des plötzlichen Säuglingstodes. Kombinationen von Risikofaktoren erhöhen das SIDS-Risiko weiter [41]. Immunisierung hingegen scheint kein Risikofaktor zu sein. In Fall-Kontroll-Studien waren weniger SIDS-Kinder geimpft als Kontrollkinder [36]. Unter den

immunisierten Kindern fand man keinen zeitlichen Zusammenhang zwischen der Impfstoffapplikation und dem Todeszeitpunkt [41]. Dennoch scheint es nicht unerwartet, wenn sich SIDS-Fälle in engem zeitlichen Zusammenhang mit einer Immunisierung ereignen, wenn die Impfstoffapplikation zu einem Häufigkeitsgipfel der SIDS-Inzidenz verabreicht wurde, was zu der fälschlichen Annahme geführt hat, dass eine Immunisierung einen SIDS-Fall verursachen würde [105].

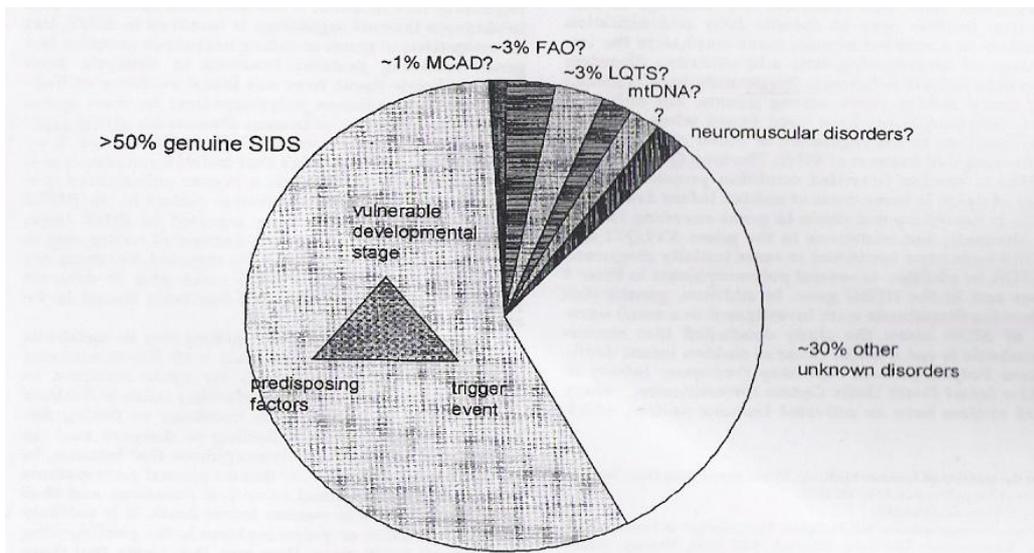
### **1.5.2.2 Mütterliche und pränatale Risikofaktoren**

Rauchen der Mutter während der Schwangerschaft stellt einen der wichtigsten beeinflussbaren pränatalen Risikofaktoren dar [6, 28, 46, 93, 105]. Rauchen während der Schwangerschaft erhöht die Inzidenz für den plötzlichen Säuglingstod, ab einer Menge von 10 Zigaretten pro Tag auf das Fünf- bis Zehnfache. Das Risiko ist umso höher, je ausgeprägter sich der Nikotinabusus in einer Plazentainsuffizienz und pränatalen Dystrophie des Feten ausgewirkt hat [28, 46]. Bei Säuglingen, deren Mütter während der Schwangerschaft geraucht haben und bei postnataler Nikotinexposition des Kindes zeigten sich in klinischen Studien eine Herabsetzung der Atmungsantwort auf Hypoxie [41, 105], ein gestörter Selbstwiederbelebungsmechanismus sowie eine Erhöhung der Arouschwelle [35, 41, 75]. Postnatale Tabakrauchexposition steigert die Anfälligkeit für virale und bakterielle Infektionen des Kindes [41]. Alkoholmissbrauch, insbesondere präkonzeptionell und im ersten Trimester sowie Drogenkonsum während der Schwangerschaft stellen pränatale Risikofaktoren dar, die mit einem erhöhten SIDS-Risiko in Verbindung gebracht werden konnten [41, 105]. Bei Kokainkonsum der Mutter während der Schwangerschaft konnte eine erhöhte Arouschwelle für den Säugling festgestellt werden [105]. Jungdliches Alter der Mutter zum Zeitpunkt der Schwangerschaft, rasch aufeinander folgende Schwangerschaften, unzureichende Schwangerschaftsvorsorge, niedriger sozioökonomischer Status, schlechte Schulbildung und alleinstehende Mütter sind schwer oder nicht beeinflussbare Risikofaktoren, die sich negativ auf die Entwicklung des Kindes auswirken können [9, 28, 41, 66, 93].

### **1.5.3 Pathophysiologische Erklärungsmodelle zum SIDS**

Die meisten Autoren sind zu der Auffassung gelangt, dass SIDS ein multifaktorielles Geschehen ist, bei dem Risikofaktoren auf ein vulnerables Kind treffen [6, 71].

Hierzu sei auf die Abbildung 4 verwiesen.



**Abbildung 4:** Mögliche SIDS-Ursachen aus Opdal et al. [71].

### 1.5.3.1 Long-QT-Syndrome und SIDS

Bereits 1976 brachten Schwartz et al. intrakardiale Erregungsüberleitungsstörungen mit dem plötzlichen Kindstod in Zusammenhang. 1998 wurde diese Hypothese durch eine Studiengruppe unter seiner Leitung unterstützt [75]. Es wird geschätzt, dass 5-10 % der SIDS-Fälle mit einem defekten kardialen Ionenkanal und daher mit einem ansteigenden Potential für letale Arrhythmien assoziiert sind. Das Long-QT-Syndrome (LQTS) beruht auf Natrium- und Kalium-Kanal-Polymorphismen [5, 41]. Arnestat et al. fanden unter 201 SIDS-Opfern 19 Fälle (9,5 %) mit genetischen Varianten in den Long-QT-Genen [5]. Das LQTS ist charakterisiert durch ein prolongiertes QT-Intervall, Torsade de pointes und Veränderungen der T-Welle im EKG. Anamnestisch können die Patienten über rezidivierende synkopale Anfälle und Fälle von plötzlichem Herztod in der Familie berichten. Man unterscheidet drei Typen des LQTS. Beim Jervell/Lange-Nielsen-Syndrom (Erstbeschreiber Jervell und Lange-Nielsen, 1957) liegen eine verlängerte QT-Zeit und Taubheit vom Schallempfindungstyp vor. Es wird autosomal-rezessiv vererbt. Das Romano-Ward-Syndrom ist die autosomal-dominant vererbte Form des LQTS. Für diese hereditäre Form wurden mittlerweile sieben Genloci identifiziert. Von einem sporadischen Long-QT-Syndrom spricht man bei unauffälliger Familienanamnese [65, 75, 82]. Des Weiteren existieren sekundäre Formen bei Elektrolytimbalanzen, peripartaler Asphyxie, Kardiomyopathien, koronarer Herzkrankheit,

nach akutem Myokardinfarkt, Erkrankungen des ZNS, bradykarden Herzrhythmusstörungen, medikamenteninduzierten Formen sowie passager bei Früh- und Neugeborenen [82]. Zur Therapie kommen als Mittel der Wahl  $\beta$ -Blocker zur Anwendung. Bei unzureichenden Therapieerfolgen stehen sympathische kardiale Denervierung sowie Schrittmacher- und Defibrillatorimplantationen zur Verfügung. Atem- und Herzfrequenzmonitoring sowie Elternschulung sind sinnvolle ergänzende Maßnahmen [65, 76, 82].

Milde respiratorische Infekte, wie sie oft bei Obduktionen von SIDS-Opfern gefunden werden, können zur Hypoxämie und über einen chemorezeptiven Reflex zur Sympathikusaktivitätssteigerung führen und letale Arrhythmien induzieren. Sympathikotonuserhöhungen kommen auch bei plötzlicher Lärmeinwirkung oder Bauchschlafage vor. Die Koexistenz dieser Faktoren zusammen mit einer genetischen Variante in LQT-Genen, die die Repolarisationsreserve reduzieren, kann das Risiko einer letalen Arrhythmie erhöhen. Andere arrhythmogene Störungen genetischen Ursprungs, die einen SIDS-Fall maskieren können, sind ebenfalls in Betracht zu ziehen. Darunter fallen das Brugada-Syndrom, das Short-QT-Syndrom und die katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie. Vor- und Nachteile eines flächendeckenden EKG-Screenings in der Neugeborenenperiode sind in Diskussion [5]. Fettsäureoxidationsstörungen und Defekte der mitochondrialen-oxidativen Phosphorylierung sollen für etwa 15 % der Kardiomyopathien bei Kindern verantwortlich sein [13].

### **1.5.3.2 Versagen von Arousalmechanismen und Schnappatmung**

Aufzeichnungen von Säuglingen, die unter Heimmonitoring verstarben, zeigten initial häufig eine hypoxiebedingte Bradykardie, oft gefolgt von Schnappatmung [6, 75].

Da Schnappatmung erst ab einem  $pO_2 < 10$  mmHg auftritt, muss geschlossen werden, dass die Säuglinge bei Einsetzen des Monitoralarms bereits ausgeprägt hypoxisch waren [75]. Unklar bleibt, warum die Schnappatmung bei diesen Kindern nicht wie gewöhnlich zur Selbstwiederbelebung führt und worin die Ursachen der ausgeprägten Hypoxie lagen. Für den gestörten Selbstwiederbelebungsmechanismus werden Störungen im Serotoninstoffwechsel und reifungsbedingte Schwäche der Stabilität der Schnappatmung angeführt [6, 41, 54, 71, 75]. Serotonin ist an der Regulation autonomer Funktionen einschließlich Atmung, kardiovaskulärer und zirkadianer Regulationen beteiligt [41, 71]. Zwei Studien untersuchten die VNTR in der Promotorregion des Serotonin-Transporter-Gens und fanden einen

Zusammenhang zwischen den L-Allelen des Serotonin-Transporter-Gens und SIDS. Solche Varianten sollen zu einer ansteigenden Expression des Serotonin-Transporters führen, dadurch die synaptischen Serotoninlevel senken und somit die Arousalreaktion beeinflussen [71]. Vor allem Kahn et al. konnten zeigen, dass Tabakrauchexposition, Bauchschlafage, Kopfbedeckungen, Atemwegsinfekte und erhöhte Zimmertemperatur zu einer Steigerung der Arouschwelle führen. Stillen und der Gebrauch eines Schnullers hingegen, sollen die Arouschwelle senken [75]. Aus Analysen der Auffindesituation ist bekannt, dass etwa 50 % der SIDS-Fälle in einer Lage gefunden wurden, bei der Mund und Nase bedeckt waren [34, 75]. In Studien konnte ein gehäuftes Vorkommen von obstruktiven Apnoen bei Kindern, die später am plötzlichen Säuglingstod verstarben, gezeigt werden [75]. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang weiter, ob ein obstruktives Schlafapnoesyndrom (OSAS) bei Säuglingen zur Unterbrechung wichtiger Entwicklungsprozesse führt. Die höchsten Inzidenzen für ein OSAS liegen jedoch im Alter zwischen zwei und sechs Jahren, ungleich derer von SIDS-Fällen, deren Häufigkeitsgipfel zwischen zwei bis vier Monate angegeben wird. Beide Geschlechter sind vom OSAS etwa gleich häufig betroffen. Die Hauptkomplikationen dieser Atemstörung im Schlaf sind eine Beeinträchtigung des Wachstums, kardiovaskuläre Probleme und Verhaltensauffälligkeiten [105]. Für die Hypothese eines OSAS als Trigger einer protrahierten Hypoxämie sprechen petechiale Blutungen an Thymus, Perikard und Pleura. Sie sind der einzig konstante Autopsiebefund unter SIDS-Fällen [34, 75]. Haidmayer, Einspieler und Löscher untersuchten in einer klinischen Studie an 853 gesunden reifgeborenen Säuglingen und einer Gruppe von 243 Säuglingen mit klinischen Symptomen eines Schlafapnoesyndroms (SAS) die Beziehung kardiorespiratorischer Kontrollmechanismen zum plötzlichen Säuglingstod. In der SAS-Gruppe fanden sie im Atemfrequenzmonitoring im Schlaf im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine generelle Hypoventilation mit daraus resultierender Hypoxämie. Ein Hypoxämie-Test mit 15%igen O<sub>2</sub> ergab in beiden Gruppen zunächst eine Steigerung der Ventilation mit nachfolgender Atemdepression. Diese Atemdepression fiel jedoch in der SAS-Gruppe deutlich stärker aus. Des Weiteren zeigten sich in der SAS-Gruppe Störungen der Regulation von Atmung, Saugen und Schlucken sowie eine reduzierte optimale Spontanmotorik. Hieraus schlussfolgerte man, dass verlängerte Apnoen, wie sie beim SAS auftreten, Trigger eines Circulus vitiosus darstellen könnten, wobei Apnoen > 15 s in einer Hypoxämie resultieren und eine nachfolgende Atemdepression bewirken [54]. Guntheroth und Spiers präsentierten Daten, die gegen pränatale Schädigungen als häufigen Risikofaktor

für SIDS sprechen. Kinder schwer anämischer Mütter weisen ein erhöhtes Risiko für Hypoxie und Hirnstammschäden auf. Deren höchste Mortalität war jedoch in der Neonatalperiode und nicht etwa im SIDS-spezifischen Alter zu finden [32].

### **1.5.3.3 CCHS und SIDS**

Das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom (CCHS) ist eine Störung der Atmungskontrolle mit diffuser autonomer Dysregulation, die erstmals 1970 beschrieben wurde. Das PHOX2B-Gen spielt eine Schlüsselrolle für das CCHS und ist auf Chromosom 4p21 lokalisiert. Es hat eine wichtige Funktion in der Entwicklung des autonomen Nervensystems. Rand et al. identifizierten einen häufigen Polymorphismus im Intron 2 des PHOX2B-Gens, welcher signifikant häufiger in der SIDS-Gruppe als in der Kontrollgruppe vorkam. Ein weiterer Polymorphismus im Exon 3 des PHOX2B-Gens trat ebenso signifikant häufiger unter SIDS-Fällen auf [101]. Hieraus könnte geschlossen werden, dass das CCHS von Bedeutung in der Pathogenese des SIDS ist. Meine Kollegin Diana Willms untersucht an der auch in dieser Arbeit verwendeten Stichprobe, ob dieser Zusammenhang nachweisbar ist.

### **1.5.3.4 Metabolische Erkrankungen und SIDS**

Metabolische Erkrankungen können sich in scheinbar lebensbedrohlichen Ereignissen erstmals klinisch äußern oder sogar in einem plötzlichen Tod enden. Sie können daher wichtige Differentialdiagnosen zum SIDS darstellen. In etwa 1-5 % der SIDS-Fälle wurden angeborene Stoffwechselstörungen gefunden [55]. In Betracht zu ziehen sind hier die Fettsäureoxidationsdefekte, Störungen der Glukoseoxidation oder Glukoneogenese und andere Stoffwechselstörungen wie der Biotinidase-Mangel, der Hyperinsulinismus, Thiaminstoffwechselstörungen, Hyperlipoproteinämie und Ornithintranskarbonylase-Mangel [6, 54, 55]. Im Gegensatz zum SIDS gehen dem akuten Ereignis bei metabolischen Erkrankungen meist mehrere Stunden bis Tage währende Symptome wie Erbrechen, Apathie, Trinkschwäche und spezielle Gerüche der Atemluft voraus. Das Alter bei Erstmanifestation metabolischer Erkrankungen liegt meist deutlich über dem Altersgipfel für SIDS [54]. Auf einige dieser Stoffwechselerkrankungen soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

### 1.5.3.5 Infektionen und SIDS

Die Rolle von Infektionen als Ursache oder triggernder Faktor bei der Pathogenese eines plötzlichen und unerwarteten Todesfalles im Kindesalter wird weiterhin kontrovers diskutiert. In einer retrospektiven Studie von Weber et al. im Zeitraum von 1996-2005 fand man bei 70 % der SUDI (sudden unexpected death in infancy)-Fälle bakterielle Mikroorganismen im Untersuchungsgut. Vorherrschend waren *Staph. aureus* und *E. coli* [99]. Das Konzept der Infektion als triggernder Faktor bei der Pathogenese von SIDS wird unterstützt durch eine Reihe von Beobachtungen, einschließlich der saisonalen Verteilung von SIDS mit Häufigkeitsgipfel in der kalten Jahreszeit, der hohen Inzidenz von Infekten des oberen Respirationstraktes als Begleitumstand und der höchsten SIDS-Inzidenz im Alter von zwei bis vier Monaten, zu einem Zeitpunkt mit Tiefstand der Immunglobulin-Level [6, 34, 36, 41, 55]. Die niedrigsten Immunglobulin-Konzentrationen finden sich zwischen der achten und zehnten Woche post partum. Heininger et al. schreiben *Bordatella pertussis* unter den Mikroorganismen bei der Pathogenese von SIDS eine bedeutende Rolle zu und untermauern ihre These mit epidemiologischen Beweisen. *Bordatella pertussis* kann zu apnoischen Hustenanfällen führen, die tödlich enden können [36].

Es sei erwähnt, dass die agonale Ausbreitung von Bakterien ein weiteres hypothetisches Konzept für das häufige Vorfinden von Mikroorganismen in postmortalen Untersuchungen darstellt [99].

### 1.5.4 Autopsie- und Leichenschaubefunde

Bisher konnten keine pathognomischen Autopsiebefunde für SIDS gesichert werden. Einige gehäuft auftretende Befunde postmortaler Untersuchungen sollen hier erwähnt werden.

In bis zu 95 % der SIDS-Fälle fanden sich petechiale Blutungen auf Thymus, Perikard und Pleura [34, 41, 53, 75]. In tierexperimentellen Studien zeigten sich solche Befunde nach höheren intrathorakalen Druckschwankungen mit protrahierter Hypoxämie [6]. Gehäuft fanden sich pulmonale Stauung, Lungenödem sowie ein akutes Emphysem des Lungengewebes [6, 34, 41]. Feuchte Haare, feuchte Bekleidung und Bettwäsche können Hinweise auf vorangegangene Hyperthermie aus einer internen oder externen Ursache geben [6]. Keine seltenen Beobachtungen sind Erbrochenes im Kinderbettchen oder noch im Pharynx, was, wie bereits erwähnt, auch auf ein postmortales Geschehen durch das

Erschlaffen der Magenmuskulatur zurückgeführt werden kann [6, 34]. Inflammatorische Veränderungen des oberen Respirationstraktes fanden sich gehäuft im histologischen Untersuchungsgut [34, 36, 99]. Howat et al. fanden unter 200 ungeklärten Kindstod-Fällen in 7 % (14/200) diffuse panlobuläre fettige Veränderungen der Leber. An fünf dieser auffälligen Lebern konnten Enzymaktivitätsmessungen folgen, zweimal ließ sich MCADD nachweisen. Ähnliche Beobachtungen machten Sinclair und Smith (1976), sie fanden bei 5 % ihrer SIDS-Fälle schwere fettige Veränderungen der Leber. Howat et al. schlussfolgern, dass in allen SIDS-Fällen histologische Untersuchungen der Leber erfolgen sollten und auffällige Veränderungen entsprechende Enzymanalysen implizieren sollten [39, 40].

### **1.5.5 Zusammenhang zwischen SIDS und aufgeklärten SUDI-Fällen**

Plötzliche unerwartete Todesfälle im Kindesalter (SUDI), die auch nach einer sorgfältigen Untersuchung, einschließlich der Durchführung einer kompletten Autopsie, mit Rückblick auf die Todesumstände und der Anamnese unerklärt bleiben, werden als SIDS bezeichnet.

Eine deutsche Studie zum plötzlichen Kindstod (GeSID) von 1998-2001 untersuchte an 455 plötzlichen Säuglingstodfällen die Unterschiede der Risikofaktoren zwischen SIDS und aufgeklärten SUDI-Fällen [92]. Sie fanden heraus, dass die Bauchlage, als einer der Hauptrisikofaktoren für SIDS, nicht mit einem ansteigenden Risiko für aufgeklärte SUDI-Fälle assoziiert war. Es zeigte sich außerdem, dass Stillverzicht in den ersten zwei Lebenswochen ein Risikofaktor für SIDS, nicht jedoch für aufgeklärte SUDI-Fälle war [92]. Bereits von 1993-1996 wurden diese Zusammenhänge von einer weiteren großen Studie, der "Confidential Enquiry into Stillbirth and Deaths in Infancy" (CESDI)-Studie, untersucht [56]. In dieser Studie zeigten sich vor allem Unterschiede in der Altersverteilung beider Gruppen. Der SIDS-spezifische Häufigkeitsgipfel zwischen dem zweiten bis vierten Lebensmonat fand sich nicht unter den aufgeklärten SUDI-Fällen. Hier wurde ein Häufigkeitsgipfel im ersten Lebensmonat beobachtet, ein zweiter nach dem sechsten Lebensmonat. Unter den aufgeklärten SUDI-Fällen wurden des Weiteren häufiger kongenitale Fehlbildungen gefunden und mehr Mütter von SIDS-Opfern waren in dieser Studie Raucherinnen. Insgesamt waren die Risikofaktoren für beide Gruppen jedoch auffallend ähnlich [56, 74].

## 1.6 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, zu eruieren, ob es einen möglichen Zusammenhang zwischen MCADD und SIDS gibt. Die Arbeitshypothese war, dass möglicherweise gelegentliche MCADD-bedingte Todesfälle als SIDS-Ereignisse eingestuft werden, weil die zutreffende Diagnose MCADD weder prä- noch postnatal gestellt worden war. Deshalb sollten Autopsieproben von verstorbenen Säuglingen, die in einer deutschlandweiten Studie als SIDS-Fälle eingeordnet worden waren, daraufhin durchsucht werden, ob mit genomischen Methoden in diesem Obduktionsgut in Einzelfällen nachträglich die Diagnose MCADD gestellt werden kann. Diese Aufgabe sollte durch ein Mutationsscreening erfüllt werden, in dem PCR-Produkte einzelner Exons mit Restriktionsenzymen gespalten werden. Die Tests wurden so konstruiert, dass das entsprechende Wildtyp-Allel nicht restringierbar war. Das Mutationsallel hingegen war mit dem jeweils geeigneten Restriktionsenzym spaltbar. Wie anfangs bereits erläutert wurde, sind für das MCAD-Gen mehr als 70 verschiedene Mutationen bekannt und es ist klar, dass es sogar weitere, bisher nicht beschriebene Mutationen gibt. Es ist verständlich, dass es weder durchführbar noch sinnvoll ist, mit der genannten Strategie nach all diesen Mutationen zu suchen. Um die oben aufgeworfene Frage zu beantworten, ist dies auch nicht notwendig, denn die meisten dieser Mutationen sind äußerst selten und die Suche nach diesen seltenen Mutationen würde keinen Beitrag zur Beantwortung dieser Fragestellung leisten. Sucht man aber nach häufigen MCADD-Mutationen, so kann man sicher sein, dass man damit fast alle MCADD-Fälle erkennt. Welche MCADD-Mutationen in unserer Population relativ häufig vorkommen, hat meine Kollegin Yvonne Rosentreter in ihrer Dissertation eruiert.

Mit Unterstützung von Frau Nennstiel Ratzel (Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit) wurde eine Mutationstypisierung bei 78 MCADD-Patienten aus unserer Region vorgenommen. Die Mutationen und ihre Häufigkeiten können wie folgt angegeben werden: 985A>G (83 %), 157C>T (3 %), 799G>A (3%), 244-245 insert T (3 %), diverse andere erkannte Mutationen (5 %) sowie diverse andere unerkannte Mutationen (3 %). Danach kann man errechnen, dass in dem Patientengut unserer Region etwa 99 % aller MCADD-Patienten die Mutationen 985A>G, 157C>T, 799G>A und 244-245 insert T in homozygoter oder compound-heterozygoter Form tragen. Somit war es berechtigt, die Suche nach Mutationen im ACADM-Gen auf diese vier Mutationen zu beschränken.

Es sollte also mit vier verschiedenen, aber im Wesen verwandten Screeningtests nach diesen vier Mutationen gesucht werden. Das Screening auf 985A>G war Gegenstand der Dissertation meiner Kollegin Yvonne Rosentreter [115]. Die Entwicklung von Tests auf 157C>T, 799G>A und 244-245 insert T und deren Anwendung an Proben von 405 SIDS-Opfern war Gegenstand dieser Arbeit.

### **1.7 Ethische Unbedenklichkeit der Untersuchung**

Die verwendeten Proben (Lebergewebe, getrocknete Blutflecken, bereits vorher extrahierte DNA) lagen in anonymisierter Form vor. Die Untersuchung zielte auf den Nachweis der MCAD-Mutationen 157C>T, 244-245 insert T sowie 799G>A. Darüber hinaus hatte sie keinen Bezug zu anderen Persönlichkeitsmerkmalen. Für diese Promotion liegt ein Unbedenklichkeitsvotum (Nr. 97/04) der zuständigen Ethikkommission vor. Diese ist im Anhang als Kopie beigefügt.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte für molekularbiologische und biochemische Arbeiten

| Geräte                         | Hersteller                  |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Laminarbox                     | kendro                      |
| Thermocycler T-Gradient        | Biometra                    |
| Thermocycler                   | Biozym                      |
| Elektrophoresekammer           | Pharmacia LKB-Multiphor II  |
| Spannungsgerät                 | Pharmacia LKB-ECPS 3000/150 |
| Minispin Zentrifuge            | Eppendorf                   |
| Pipetten 10, 100, 200, 1000 µl | Eppendorf/Biohit            |
| Magnetrührer                   | neoLab R3T                  |
| Wipptisch                      | unitwist RT                 |

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien für molekularbiologische und biochemische Arbeiten

| Verbrauchsmaterialien        | Hersteller |
|------------------------------|------------|
| Safe-Lock Tubes 0,5 + 2,0 ml | Eppendorf  |
| Pipettenspitzen: 0,5-10 µl   | Eppendorf  |
| 2-200 µl                     |            |
| 200-1000 µl                  |            |
| Samples Application Pieces   | Serva      |
| Gel-Fix-Folien               | Serva      |
| Spezialfilterpapierstreifen  | Whatman    |
| Nitril-Einmalhandschuhe      | Roth       |

#### 2.1.3 Chemikalien und Enzyme

| Chemikalien und Enzyme | Hersteller |
|------------------------|------------|
| Acrylamid              | Serva      |
| TRIS                   | Serva      |

|   |                      |
|---|----------------------|
| APS                                       | Serva                |
| PDA                                       | Bio-Rad Laboratories |
| TEMED                                     | Serva                |
| HNO <sub>3</sub> 2-3%ig                   | Merck                |
| AgNO <sub>3</sub>                         | Carl Roth GmbH       |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>           | Fluka                |
| Formaldehyd                               | Carl Roth GmbH       |
| CH <sub>3</sub> COOH                      | Carl Roth GmbH       |
| Glycerol 5%ig                             | Carl Roth GmbH       |
| NEBuffer 2                                | New England Biolabs  |
| BSA                                       | New England Biolabs  |
| <i>Bsr</i> GI, <i>Xcm</i> I, <i>Bg</i> II | New England Biolabs  |
| PCR-Restriktions-Puffer                   | Eurogentec           |
| dNTP                                      | Bioline              |
| MgCl <sub>2</sub>                         | Eurogentec           |
| Goldstar-Polymerase                       | Eurogentec           |
| PCR-Primer                                | Eurogentec           |

#### 2.1.4 Stamm- und Standardlösungen

|                     |  |
|---------------------|--|
| Acryl-PDA 14%ig:    | 6,85 g PDA<br>345 ml Acryl<br>634 ml Aqua bidest.  |
| Tris Puffer 120 mM: | 90,75 g Tris-Base<br>4,47 ml Ameisensäure<br>auf 1000 ml Aqua bidest. auffüllen  |
| TBE (pH 9,0)        | 54 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan<br>27,5 g Borsäure<br>20 ml 0,5 mol EDTA<br>Natronlauge bzw. Essigsäure (pH-Wert-Einstellung) |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| TBE-Pufferlösung mit Farbstoff: | 120 ml 5xTBE<br>180 ml Aqua bidest.<br>Bromphenolblau nach Augenmaß |
| APS 10%ig:                      | 5 g APS<br>50 ml Aqua bidest.                                       |
| HNO <sub>3</sub> 2%ig:          | 30 ml Salpetersäure (60%ig)<br>960 ml Aqua bidest.                  |
| CH <sub>3</sub> COOH 10%ig:     | 100 ml CH <sub>3</sub> COOH<br>900 ml Aqua bidest.                  |
| Glycerol 5%ig:                  | 50 ml Glycerol<br>1000 ml Aqua bidest.                              |

## 2.1.5 Untersuchungsmaterialien

### 2.1.5.1 Leberbiopsien von 405 am plötzlichen Säuglingstod verstorbenen Säuglingen

Die molekulargenetisch auf die Mutationen 157C>T, 244-245 insert T und 799G>A untersuchten Leberproben stammen von insgesamt 405 vermeintlich am plötzlichen Säuglingstod verstorbenen Patienten. Im Rahmen einer multizentrischen Studie zum Thema "Plötzlicher Säuglingstod" unter der Leitung der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster wurden Leberbiopsien zur weiteren Diagnoseforschung entnommen und im Rahmen dieser Promotionsarbeit auf die oben genannten Mutationen untersucht.

Die DNA-Extraktion erfolgte nach der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode und wurde mir von Yvonne Rosentreter zur Verfügung gestellt [115].

### 2.1.5.2 Positivkontrollen für die Mutationen 157C>T, 244-245 Ins T und 799G>A

Die verwendeten Positivkontrollen für die jeweiligen Mutationen stammen aus dem erweiterten Neugeborenen-Screening aus Niedersachsen und Sachsen-Anhalt.

Diese Neugeborenen waren mithilfe der MS/MS identifiziert worden. Die getrockneten Blutflecken jener 78 Patienten wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Yvonne Rosentreter auf die Hauptmutation 985A>G untersucht [115]. Die DNA von Kindern mit MCAD-Defekt, die die 985A>G Mutation in heterozygotem Zustand beziehungsweise gar nicht aufwiesen, wurde zur erweiterten Mutationsuntersuchung zum bayrischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit gesandt. Hier erfolgte die Sequenzierung des gesamten kodierenden Bereiches des MCAD-Gens. Dabei traten drei weitere Mutationen gehäuft auf. Dies waren mit einem Anteil von jeweils 3,2 % die Mutation G>A an Position 799 im Exon 9, die Mutation C>T an Position 157 im Exon 3 und die Insertion von Thymin an Position 244-245 im Exon 4. Diese auf Blutfleckkarten vorhandenen identifizierten Proben wurden als Positivkontrollen für die vorliegende Arbeit verwendet und mit jedem Restriktionsdurchgang mitgeführt.

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1 DNA-Amplifizierung durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Mit der PCR können DNA-Moleküle in einem zyklischen Verfahren millionenfach vermehrt werden. Üblicherweise werden ausgewählte DNA-Segmente in einem Verfahren mit 28 bis 35 Zyklen geschmolzen und anschließend mit Hilfe von Polymerasen verdoppelt. Die Auswahl der Segmente erfolgt mittels spezifischer Primer. Auf diese Weise erhält man von der gewünschten Zielsequenz so große Quantitäten, dass man diese einer Analyse zuführen kann [69]. Im vorliegenden Falle wurden Exonabschnitte amplifiziert, in denen die entsprechenden Mutationen gesucht werden sollten. Im günstigsten Falle bringt die Mutation direkt einen Restriktionsort hervor. Das ist aber nur im Ausnahmefall zutreffend.

Die Mutation 157C>T ist so geartet, dass sie keinen natürlichen Restriktionsort hervorbringt. Da bei der DNA-Amplifikation die Primer Bestandteile des Amplifikates werden, kann man mit der Mismatchprimertechnik mutationsspezifische artifizielle Restriktionsorte kreieren. Dabei bildet die Sequenz mit der Mismatchbase und der Mutation einen artifiziellen Restriktionsort. Wenn der Mismatch mindestens 3 Basen vom 3'-Ende des Primers entfernt ist, kommt es normalerweise nicht zu einer nennenswerten Retardierung der Amplifikation. Im Falle der Mutationen 157C>T im Exon 3, 799G>A im Exon 9 und 244-245 insert T im

Exon 4 entstehen durch die Mutationen keine Restriktionsorte. Hier wurde deshalb die Mismatchprimertechnik angewandt.

Für die Auffindung der Mutationen wurden DNA-Amplifikationen mit den hier aufgeführten Primern bewerkstelligt. Die Primernamen beziehen sich auf die Positionen der zu identifizierenden Mutationen in den entsprechenden Exons. Das Suffix „mm“ steht für Mismatch, weil der Primer eine oder zwei Mismatch-Base(n) enthält.

### 2.2.2 Primer, PCR-Produkte und artifizielle Restriktionsorte

#### Mutation 244-245 insert T im Exon 4

Primer MCAD244mmV 5' -GTCCCCCTAA<sup>CC</sup>AGAAGAGCCT-3' (mm=CC)

Primer MCAD244R 3' -AATGACTGAGTAGAGTTCCAC-5'

#### Amplifikat des Wildtype Allels: Länge = 137 bp

5'...GTCCCCCTAA<sup>CC</sup>AGAAGAGCCTgggaacttggtttaataacacacacattccagagaa  
ctgtggtaagctttctttatatttttaataactggaatgcatatgagtaagaaaaattGTGGA  
ACTCTACTCAGTCATT...3'

#### Amplifikat des mutanten Allels: Länge = 138 bp

5'...GTCCCCCTAA<sup>CC</sup>AGAAGAGCCT<sup>T</sup>gggaacttggtttaataacacacacattccagaga  
actgtggtaagctttctttatatttttaataactggaatgcatatgagtaagaaaaattGTGG  
AACTCTACTCAGTCATT...3'

Die Endonuklease *XcmI* schneidet die Sequenz: 5'...CCANNNNN' NNNNTGG...3'.

Demzufolge ist das mutante Allel-Produkt mit *XcmI* restringierbar und ergibt 120 bp + 18 bp.

**Abbildung 5:** Die Abbildung zeigt die Screeningstrategie der Mutation 244-245 insert T. Pathogene- und Mismatch-Mutationen sind rot gekennzeichnet. Die Primer wurden in Großbuchstaben hervorgehoben. Der Restriktionsort ist im mutanten Allel unterstrichen.

### Mutation 799G>A im Exon 9

Primer MCAD799V 5'-GAATTAAACATGGGCCAGCG-3'

Primer MCAD 799Rmm 3'-TTGCAACTTTGAAACCAGATC-5' (A=mm)

#### Amplifikat des Wildtype Allels: Länge = 112 bp

5'...GAATTAAACATGGGCCAGCGatggttcagatactagaggaattgtcttcgaagatgtgaa  
agtgcctaaagaaaatggttttaattggtgacgGATCTGGTTTCAAAGTTGCAA...3'

#### Amplifikat des mutanten Allels: Länge = 112 bp

5'...GAATTAAACATGGGCCAGCGatggttcagatactagaggaattgtcttcgaagatgtgaa  
agtgcctaaagaaaatggttttaattggtgacagATCTGGTTTCAAAGTTGCAA...3'

Die Endonuklease *Bgl*III schneidet die Sequenz: 5'...A'GATCT...3', demzufolge ist das mutante Allel-Produkt mit *Bgl*III restringierbar und ergibt 91 bp + 21 bp.

**Abbildung 6:** Die Abbildung zeigt die Screeningstrategie der Mutation 799G>A. Pathogene- und Mismatch-Mutationen sind rot gekennzeichnet. Die Primer wurden in Großbuchstaben hervorgehoben. Der Restriktionsort ist im mutanten Allel unterstrichen.

### Mutation 157C>T im Exon 3

Primer MCAD157V 5'-ACATACTGACTTCATAGGAC-3'

Primer MCAD157mmR 3'-ATTCCTCTCTGGCAAATGTAC-5' (G=mm)

#### Amplifikat des Wildtype Allels: Länge = 132 bp

5'...ACATACTGACTTCATAGGACatttttcttggttatccagttttaacttttctaaataat  
tttccttagagttcaccgaacagcagaaagaatttcaagctactgctcGTACATTGCCAG  
AGAGGAAATC...3'

#### Amplifikat des mutanten Allels: Länge = 132 bp

5'...ACATACTGACTTCATAGGACatttttcttggttatccagttttaacttttctaaataat  
tttccttagagttcaccgaacagcagaaagaatttcaagctactgcttGTACATTGCCAG  
AGAGGAAATC...3'

Die Endonuklease *Bsr*GI schneidet die Sequenz 5'...T'GTACA...3', demzufolge ist das mutante Allel-Produkt mit *Bsr*GI restringierbar und ergibt 109 bp + 23 bp.

**Abbildung 7:** Die Abbildung zeigt die Screeningstrategie der Mutation 157C>T. Pathogene- und Mismatch-Mutationen sind rot gekennzeichnet. Die Primer wurden in Großbuchstaben hervorgehoben. Der Restriktionsort ist im mutanten Allel unterstrichen.

Die Oligonukleotid-Primer wurden anhand der Sequenz des MCAD-Gens generiert. Diese war in der Datenbank <http://www.ensembl.org/> zugänglich. Mit der Synthese der Primer in der Qualität „Oligo-Gold“ wurde die Firma Eurogentec, Seraing, Belgien beauftragt.

Die PCR erfolgte in 25 µl Ansätzen bestehend aus:

- 2 µl DNA (circa 10-20 ng/µl)
- 2,5 µl Gold-Star-Polymerase-Puffer
- 2,5 µl dNTPs (4x25 mM)
- 2,5 µl Rückwärts-Primer (4 µM)
- 2,5 µl Vorwärts-Primer (4 µM)
- 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 11,5 µl dH<sub>2</sub>O
- 0,1 µl GoldStar-Polymerase (10 U/µl).

Alle Reagenzien wurden in der Laminarbox pipettiert und anschließend gut gemischt. Der fertige Ansatz wurde nach kurzem Zentrifugieren (30 s, circa 10000 rpm) unverzüglich in den Thermocycler überführt.

Für die Amplifikation wurde das Gerät wie folgt programmiert:

1. ramp-time (Anlaufzeit) – Vorheizen des Thermocyclers
2. Vor-Denaturierung: 94 °C für 2 min
3. Denaturierung: 94 °C für 45 s
4. Annealing: errechnete Temperatur<sup>1)</sup> für 30 s
5. Primerextension: 72 °C für 30 s
6. Wiederholung der Schritte 3-5 insgesamt 30 mal bzw. 35 mal (MCAD 799)
7. Abschlussexension: 72 °C für 2 min
8. ramp-time – Abkühlung des Gerätes auf 10 °C

<sup>1)</sup>Die Annealing-Temperaturen wurden nach folgender Formel für die Schmelztemperatur  $T_m$  berechnet:  
(Anzahl von Adenin + Thymin) x 2 °C + (Anzahl von Guanin + Cytosin) x 4 °C. Mismatch-Basen wurden nicht mitgezählt [69].

Für Oligonukleotidprimer > 20 nt wurde eine Temperatur 3-5 °C unter der errechneten  $T_m$  gewählt. So erhielt man für die drei Systeme optimale Schmelztemperaturen, die für MCAD 157 bei 51 °C, für MCAD 244 bei 56 °C und für MCAD 799 bei 54 °C lagen. Mit jedem PCR-Ansatz wurde eine Leerkontrolle mitgeführt, die alle Chemikalien für die enzymatische Amplifikation enthielt, um eine eventuelle Kontamination des Probenansatzes erkennbar zu machen.

### 2.2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Jede Restriktionsendonuklease erkennt eine spezifische DNA-Basensequenz. Diese Enzyme lassen sich nach ihren Eigenschaften in drei Typen unterscheiden. Solche vom Typ I schneiden die DNA an einer zufälligen Stelle, weit von der Erkennungssequenz entfernt. Endonukleasen vom Typ II schneiden den DNA-Strang innerhalb der spezifischen Sequenz, die vom Typ III schneiden ihn circa 20-25 bp von der Erkennungssequenz entfernt liegend. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme waren ausschließlich vom Typ II.

Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Unit (U) angegeben. Dabei entspricht 1 U der Menge an Enzym, die 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde schneidet.

Die PCR-Produkte der Systeme MCAD 244, MCAD 157 und MCAD 799 wurden separat voneinander mit den Enzymen *XcmI*, *BsrGI* und *BglII* verdaut.

Die Insertion von Thymin am Locus 244-245 kann durch Spaltung mit *XcmI* gefunden werden. Das Amplikon wird in 120 bp und 18 bp große Fragmente gespalten. Quelle dieses Restriktionsenzym ist ein *E. coli*-Stamm, der das nachgebildete *XcmI*-Gen von *Xanthomonas campestris* enthält. Für den 12 µl Restriktionsansatz galt folgendes Mischungsverhältnis:

- 5,8 µl dH<sub>2</sub>O
- 1,2 µl NEBuffer 2
- 0,5 µl BSA
- 0,5 µl *XcmI* (10 U/µl)
- 4 µl PCR-Produkt.

Die Mutation des Locus 157C>T kann durch Spaltung mit *Bsr*GI gefunden werden. Das 132 bp lange PCR-Produkt wird in 109 bp und 23 bp lange Fragmente aufgespalten. *Bsr*GI ist eine Restriktionsendonuklease des *Bacillus stearothermophilus* GR75. Der 10 µl Ansatz setzte sich zusammen aus:

- 5,2 µl dH<sub>2</sub>O
- 1 µl NEBuffer 2
- 0,5 µl BSA
- 0,3 µl *Bsr*GI (10 U/µl)
- 3 µl PCR-Produkt.

Für die Spaltung des 112 bp langen MCAD 799-Amplifikationsproduktes wurde das Restriktionsenzym *Bg*III angewandt. Die geschnittenen Spaltprodukte haben eine Länge von 91 bp + 21 bp. Quelle des Enzyms ist ein *E. coli* Stamm, der das geklonte *Bg*III-Gen von *Bacillus globigii* trägt. Der 10,2 µl Restriktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

- 6,0 µl H<sub>2</sub>O
- 1,0 µl NEBuffer 2
- 0,2 µl *Bg*III (10 U/µl)
- 3 µl PCR-Produkt.

NEBuffer 2 (Restriktionspuffer) ist nach Herstellerangaben ein Puffergemisch folgender Zusammensetzung: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM Dithiothreitol. NEBuffer 3 setzt sich zusammen aus: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM Dithiothreitol.

Beim Pipettieren des Mastermixes (Enzym-Puffergemisch) in der Laminarbox musste die angegebene Reihenfolge eingehalten werden, um die Reaktion nicht durch einen vorzeitigen Aktivitätsverlust des Enzyms einzuschränken.

Das PCR-Produkt wurde im Elektrophorese-Raum zugesetzt, anschließend zentrifugiert und sofort in den Thermocycler überführt und für 20 h über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auch hier wurde stets eine Leerkontrolle mitgeführt. Außerdem musste jedem Ansatz mindestens eine

Positivkontrolle, die die entsprechende Schnittstelle für das Restriktionsenzym enthielt, für die Auswertung beigefügt werden.

Für die Mutation 244 insert T handelte es sich um die mit MC 38 und MC 39 bezeichneten Proben, bei der Mutation 157C>T um die Probe MC 36 und für die Mutation G>A an Position 799 um MC 45, MC 34 und MC 10. Die DNA wurden von Blutproben aus der MCADD-Patientenpopulation der Magdeburger Universitätskinderklinik isoliert. Zur Analyse wurden die Fragmente in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildungen 5-7 zeigen die Screeningstrategien für die drei Mutationen auf.

#### **2.2.4 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

Die Überprüfung des Amplifikationserfolges beziehungsweise der Auftrennung der Spaltprodukte und damit des Nachweises der Mutation erfolgte mittels PAGE.

In der Elektrophorese wandert die negativ geladene DNA im elektrischen Feld zur Anode. Größere Moleküle wandern dabei langsamer als kleine im elektrischen Feld, was die Unterscheidung von gespaltenen, damit mutierten Proben zu ungespaltenen, nicht-mutierten Proben erst ermöglichte. Mit den PAA-Gelen können im Gegensatz zu den Agarose-Gelen sehr kleine Längendifferenzen dargestellt werden. Bei Fragmentlängen um 100 bp können in 9%igen PAA-Gelen Längenunterschiede bis zu 2 bp dargestellt werden. Für die Auswertung der hier untersuchten PCR-Produkte wurde ein 8%iges Gel, zur Auftrennung der Spaltprodukte ein 9%iges Gel verwendet [27].

Die Proben wurden in 5 µl-Portionen auf 6 mm x 2 mm Glasfleece-Rechtecke (Sample-Pieces) aufgetragen. Der Einlauf der Proben erfolgte bei 5 W, die Trennung bei 15 W (die Bromphenolblaubande musste die samples um mindestens 1 cm überschreiten). Die Spannung wurde auf 1000 V, die Stromstärke auf 40 mA begrenzt. Die Temperatur der Elektrophoresekammer wurde durch ein Umlaufthermostat auf 15 °C konstant gehalten.

Als Pufferbrücke zwischen Gel und Elektroden kam TBE 2 x (180 mM Tris-Borat, 4 mM EDTA, Bromphenolblau, (pH 9,0)) zum Einsatz. Bromphenolblau diente dabei der Markierung der Lauffront. Auskunft über die Zusammensetzung der Gele gibt die Tabelle 2.

**Tabelle 2:** Übersicht zur Gelzusammensetzung.

|                      | 8 %     | 9 %     |
|----------------------|---------|---------|
| Acryl-PDA (14%ig)    | 22,8 ml | 25,6 ml |
| Tris Puffer (120 mM) | 17,2 ml | 14,4 ml |
| APS (10%ig)          | 400 µl  | 400 µl  |
| TEMED                | 40 µl   | 40 µl   |

Die Reagenzien wurden mit dem Magnetrührer vermischt. Nach Zugabe von APS 10%ig und TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyldiamin) wurde der Polymerisationsvorgang eingeleitet, wobei TEMED Katalysator der Reaktion war. Die Mischung wurde auf eine horizontale, gut gereinigte Glasplatte gegossen und mit einer zweiten Platte, die die GelFix-Folie trug, abgedeckt. Die Folien hatten eine Abmessung von 265 mm x 193 mm. Die Grundplatte enthielt Spacer, welche die Dicke des Gels auf 0,6 mm festlegten.

### 2.2.5 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Um die DNA-Banden nach abgeschlossener Elektrophorese sichtbar zu machen, erfolgte anschließend die Färbung in Photoschalen mit Silbernitrat. Hierzu waren folgende Schritte notwendig:

1. Zunächst wurde das Gel in einer 2-3%igen Salpetersäure für etwa 3 min geschwenkt, bis der Bromphenolblaustreifen in gelb umschlug.
2. 2- 3maliges Spülen in Aqua bidest..
3. Färben durch 20minütiges Schwenken des Gels in einer Silbernitratlösung (0,2 g AgNO<sub>3</sub> auf 100 ml Aqua bidest.) auf einem Wipptisch.
4. Erneutes Waschen in Aqua bidest. (2-3 mal).
5. Entwickeln des Gels durch mehrfaches Inkubieren in einer Natriumcarbonat/Formaldehyd-Lösung (0,484 ml Formaldehyd und 26,68 g Natriumcarbonat auf 1 l Aqua bidest.), beobachten, um zu hohen Hintergrund zu vermeiden, Lösung bei Braunfärbung wechseln.
6. 2-3maliges Spülen in Aqua bidest..
7. Mit Hilfe einer 10%igen Essigsäure wurde der Anfärbungsprozeß durch 3minütiges Einwirken abgestoppt.
8. Waschen in Aqua bidest. für mindestens 2 min.

9. Imprägnierung des Gels in 5%igem Glycerol für etwa 15 min.
10. Nach dem Lufttrocknen über Nacht wurden die Gele zur Lagerung mit Kopierfolien versehen.

### **2.2.6 Qualitätssicherung und Kontaminationsvermeidung**

Bei der Herstellung von PCR- und Restriktionsprodukten wird mit Spurenlägern und sehr geringen Spurenengen gearbeitet. Damit Kontaminationen mit Fremd-DNA vermieden werden, müssen bestimmte Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden. Hierzu zählen die konsequente räumliche Trennung von Spurenaufbereitung und -amplifikation sowie die UV- Bestrahlung (254 nm) von Arbeitsflächen nach jedem Arbeitsgang für mindestens 20 min. UV-Licht führt zur Bildung von Pyrimidindimeren zwischen benachbarten Basen der DNA, sodass eventuelle DNA-Kontaminationen unschädlich gemacht werden. Einwegmaterialien wurden nach Gebrauch in speziell dafür vorgesehenen Abfallbehältern entsorgt. Spurenläger und PCR- beziehungsweise Restriktionsprodukte werden in getrennten Kühl- und Gefrierschränken aufbewahrt. Um Kontaminationen rechtzeitig erkennen zu können, wurde bei jeder PCR und Spaltung ein Leerwert mitgeführt, der alle Reagenzien, ausgenommen DNA beziehungsweise PCR-Produkt, enthielt. Die Qualitätssicherungsmaßnahmen des DNA-Laborbereiches im Institut für Rechtsmedizin der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg sind in einem Qualitätsmanagementbuch niedergeschrieben.

### 3. ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurden die Leberautopsieproben von 405 SIDS-Fällen aus der BMBF-Studie (Oktober 1998 bis April 2003) molekulargenetisch auf die Mutationen 799G>A, 244-245 insert T und 157C>T untersucht. Keine der genannten Mutationen konnte nachträglich unter den SIDS-Opfern detektiert werden. Zuvor wurden von Yvonne Rosentreter die gleichen Proben auf die Mutation 985A>G hin untersucht. Dabei wurde in einem Fall ein MCADD-Merkmalsträger gefunden. Es handelte sich dabei um das homozygote Auftreten der 985A>G Mutation. Basis der Untersuchungen waren die Ergebnisse der genomischen Analyse der MCADD-Patienten aus dem Neugeborenen-Screening, die mithilfe der MS/MS in Sachsen-Anhalt und Niedersachsen detektiert worden waren.

Seit 1999/2000 beinhaltet das erweiterte Neugeborenen-Screening an der Kinderklinik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg die MCAD-Mangelerkrankung. Im Juni 2004 erfolgte hier eine Aufarbeitung der Blutfleckkarten der im erweiterten Neugeborenen-Screening von Sachsen-Anhalt und Niedersachsen detektierten MCADD-Patienten. Unter Verwendung der MS/MS wurden hier erneut die Octanoylcarnitin-Werte und Octanoyl/Decanoyl-Quotienten bestimmt. Die Resultate listet die Tabelle 3 auf. Bei MCADD-Patienten, die vor der Einführung von MCADD ins Neugeborenen-Screening geboren wurden, erfolgte die Blutentnahme nicht innerhalb der ersten Lebensstage. Die optimale Entnahmezeit liegt zwischen 48-72 h post partum. Unbekannt ist, wie sich die Liegezeit der Blutfleckkarten auf die C8- und C8/C10-Werte auswirkt. Deshalb müssen diese Werte kritisch betrachtet werden und können nur richtungsweisend sein. Die Tabelle 3 zeigt die Mutationen sowie den biochemischen Phänotyp. Letzterer ist für die bearbeitete Fragestellung eigentlich nicht bedeutsam. Er wird jedoch mit aufgeführt, weil es möglicherweise für weitere Untersuchungen von Interesse sein könnte. Entscheidend ist hier die Darstellung der Mutationen, die bei der Sequenzierung der Proben von den 78 MCADD-Patienten aus Sachsen-Anhalt und Niedersachsen im erweiterten Neugeborenen-Screening mithilfe der MS/MS im Zeitraum von 1985-2003 detektiert wurden. Es wird hier angenommen, dass die Stichprobe weitgehend repräsentativ für die deutsche Population ist. Daraus ergab sich die Auswahl der Mutationen nach denen im SIDS-Obduktionsgut gesucht wurde. Dabei wurden die Mutationen 985A>G, 799G>A, 244-245 insert T und 157C>T als häufige beziehungsweise relativ häufige Mutationen erkannt. Neben der vorherrschenden 985A>G Mutation, die in circa 82,69 % der Allele nachgewiesen wurde, lag der Anteil der

folgenden drei oben genannten bei 3,2 %. Es wurden noch sechs weitere Mutationen unter den 78 Kindern mit MCAD-Mangel gefunden: 362C>T, 616C>T, 1178A>T, 1148C>G, 685T>G und 430-432 del AAG. Bei weiteren fünf sequenzierten Allelen konnten keine Mutationen nachgewiesen werden. Mögliche Ursache hierfür können Mutationen in der Promotorregion sein. Weiterhin können größere Deletionen, die ganze Exons umfassen, nicht mit den hier gewählten Techniken erkannt werden. Die Abbildung 8 stellt das Ensemble der aufgefundenen Mutationen graphisch dar.

**Tabelle 3:** Die Tabelle listet die im erweiterten Neugeborenen-Screening detektierten Kinder mit einem MCAD-Mangel aus Sachsen-Anhalt und Niedersachsen mit dazugehörigen Mutationen im ACADM-Gen, Octanoylcarnitin-Werten und Octanoyl-/Decanoyl-Quotienten auf. Die 985A>G Mutation wurde mittels NciI-Restriktionsuntersuchungen von Yvonne Rosentreter detektiert. Alle weiteren Mutationen wurden im Bayrischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit durch Sequenzierung des gesamten kodierenden Bereiches des ACADM-Gens ermittelt [115].

| MCADD-Fallnr. | 1. Allel         | 2. Allel         | C8-Profil | C8/C10 | Alter bei BE |
|---------------|------------------|------------------|-----------|--------|--------------|
| 1             | 985A>G           | 985A>G           | ++        | ++     | 4 d          |
| 2             | 985A>G           | 985A>G           | +         | ++     | 8 d          |
| 3             | 985A>G           | 985A>G           | ++        | ++     | 10 d         |
| 4             | 985A>G           | 985A>G           | +         | ++     | 1. Lj.       |
| 5             | n.n.             | n.n.             | ++        | ++     | 2 d          |
| 6             | 985A>G           | 985A>G           | +         | ++     | 4 d          |
| 7             | 985A>G           | 985A>G           | +         | ++     | 17 Lj.       |
| 8             | 985A>G           | 985A>G           | +         | +      | 4 d          |
| 9             | 985A>G           | 985A>G           | ++        | ++     | 4 d          |
| <b>10</b>     | <b>799G&gt;A</b> | <b>799G&gt;A</b> | +         | ++     | <b>4 d</b>   |
| 11            | 985A>G           | 616C>T           | +         | ++     | k.A.         |
| <b>12</b>     | <b>157C&gt;T</b> | <b>157C&gt;T</b> | -         | --     | <b>11 d</b>  |
| 13            | 985A>G           | 1178A>T          | -         | -      | 5 d          |
| 14            | 985A>G           | 985A>G           | +         | ++     | 5 d          |
| 15            | 985A>G           | 985A>G           | +         | ++     | 14 d         |
| 16            | 985A>G           | 985A>G           | ++        | ++     | 6 d          |

|           |                    |                    |    |    |               |
|-----------|--------------------|--------------------|----|----|---------------|
| 17        | 985A>G             | 985A>G             | +  | ++ | 3. Lj.        |
| 18        | 985A>G             | 985A>G             | -  | -  | 5 d           |
| 19        | 985A>G             | 985A>G             | ++ | ++ | 4 d           |
| 20        | 985A>G             | 985A>G             | +  | ++ | 5 d           |
| 21        | 985A>G             | 985A>G             | +  | ++ | 4 d           |
| 22        | 985A>G             | 985A>G             | +  | ++ | 7 d           |
| 23        | 985A>G             | 1148C>G            | ++ | ++ | 4 d           |
| 24        | 985A>G             | 985A>G             | +  | ++ | 5. Lj.        |
| 25        | 985A>G             | 985A>G             | +  | ++ | 5 d           |
| 26        | 985A>G             | 985A>G             | ++ | ++ | 5 d           |
| 27        | 985A>G             | 985A>G             | ++ | ++ | 5 d           |
| 28        | 985A>G             | 985A>G             | +  | ++ | 5 d           |
| 29        | 985A>G             | 985A>G             | ++ | ++ | k.A.          |
| 30        | 985A>G             | 985A>G             | +  | ++ | 18 d          |
| 31        | 985A>G             | 985A>G             | ++ | ++ | 10. Lm.       |
| 32        | 985A>G             | 985A>G             | +  | ++ | 9 d           |
| <b>33</b> | <b>244-245InsT</b> | <b>n.n.</b>        | +  | ++ | <b>5. Lj.</b> |
| <b>34</b> | <b>799G&gt;A</b>   | <b>799G&gt;A</b>   | +  | ++ | <b>4 d</b>    |
| 35        | 985A>G             | 985A>G             | +  | ++ | 4 d           |
| <b>36</b> | <b>157C&gt;T</b>   | <b>157C&gt;T</b>   | +  | ++ | <b>4 d</b>    |
| <b>37</b> | <b>244-245InsT</b> | <b>244-245InsT</b> | ++ | ++ | <b>5. Lj.</b> |
| <b>38</b> | <b>244-245InsT</b> | <b>244-245InsT</b> | +  | ++ | <b>9. Lj.</b> |
| 39        | 985A>G             | 985A>G             | +  | ++ | 2. Lj.        |
| 40        | 985A>G             | 985A>G             | ++ | ++ | 4 d           |
| 41        | 985A>G             | 985A>G             | ++ | ++ | 11. Lj.       |
| 42        | 985A>G             | 985A>G             | ++ | ++ | 3. Lj.        |

|           |                  |                  |    |    |            |
|-----------|------------------|------------------|----|----|------------|
| 43        | 985A>G           | 985A>G           | +  | ++ | 4 d        |
| <b>44</b> | <b>799G&gt;A</b> | <b>362C&gt;T</b> | +  | ++ | <b>5 d</b> |
| 45        | 985A>G           | 985A>G           | +  | ++ | 6 d        |
| 46        | 985A>G           | 985A>G           | ++ | ++ | 4 d        |
| 47        | 985A>G           | 985A>G           | +  | ++ | 4 d        |
| 48        | 985A>G           | 985A>G           | ++ | ++ | 3 d        |
| 49        | 985A>G           | 985A>G           | +  | ++ | 9 d        |
| 50        | 985A>G           | 985A>G           | ++ | ++ | 4 d        |
| <b>51</b> | <b>985A&gt;G</b> | <b>157C&gt;T</b> | +  | ++ | <b>9 d</b> |
| 52        | 985A>G           | 985A>G           | ++ | ++ | 8 d        |
| 53        | 985A>G           | 362C>T           | +  | +  | 9 d        |
| 54        | 985A>G           | 985A>G           | ++ | ++ | 3. Lm.     |
| 55        | 985A>G           | 985A>G           | ++ | ++ | 4. Lm.     |
| 56        | 985A>G           | 985A>G           | +  | ++ | 11. Lj.    |
| 57        | 985A>G           | 685T>G           | ++ | ++ | 7 d        |
| 58        | 985A>G           | 985A>G           | -  | -  | 8. Lj.     |
| 59        | 985A>G           | 985A>G           | ++ | ++ | 1 d        |
| 60        | 985A>G           | 985A>G           | ++ | ++ | 3 d        |
| 61        | 985A>G           | 985A>G           | +  | ++ | 10 d       |
| 62        | 985A>G           | 985A>G           | +  | ++ | 8 d        |
| 63        | 985A>G           | 985A>G           | +  | ++ | 2. Lj.     |
| 64        | 985A>G           | 985A>G           | ++ | ++ | k.A.       |
| 65        | 985A>G           | 985A>G           | ++ | ++ | 4 d        |
| 66        | 985A>G           | 430-432DelAAG    | +  | ++ | 12 Lj.     |
| 67        | 985A>G           | 985A>G           | +  | ++ | 4. Lj.     |
| 68        | 985A>G           | 985A>G           | +  | +  | 2. Lj.     |

|    |        |        |    |    |        |
|----|--------|--------|----|----|--------|
| 69 | 985A>G | 985A>G | +  | ++ | 4 d    |
| 70 | 985A>G | 985A>G | ++ | ++ | 14 d   |
| 71 | 985A>G | 985A>G | ++ | ++ | 6 d    |
| 72 | 985A>G | 985A>G | ++ | ++ | 3 d    |
| 73 | n.n.   | n.n.   | ++ | ++ | k.A.   |
| 74 | 985A>G | 985A>G | ++ | ++ | 1. Lm. |
| 75 | 985A>G | 985A>G | +  | ++ | 2. Lj. |
| 76 | 985A>G | 985A>G | +  | ++ | 7. Lm. |
| 77 | 985A>G | 985A>G | +  | +  | 7. Lm. |
| 78 | 985A>G | 985A>G | ++ | ++ | 3.Lj.  |

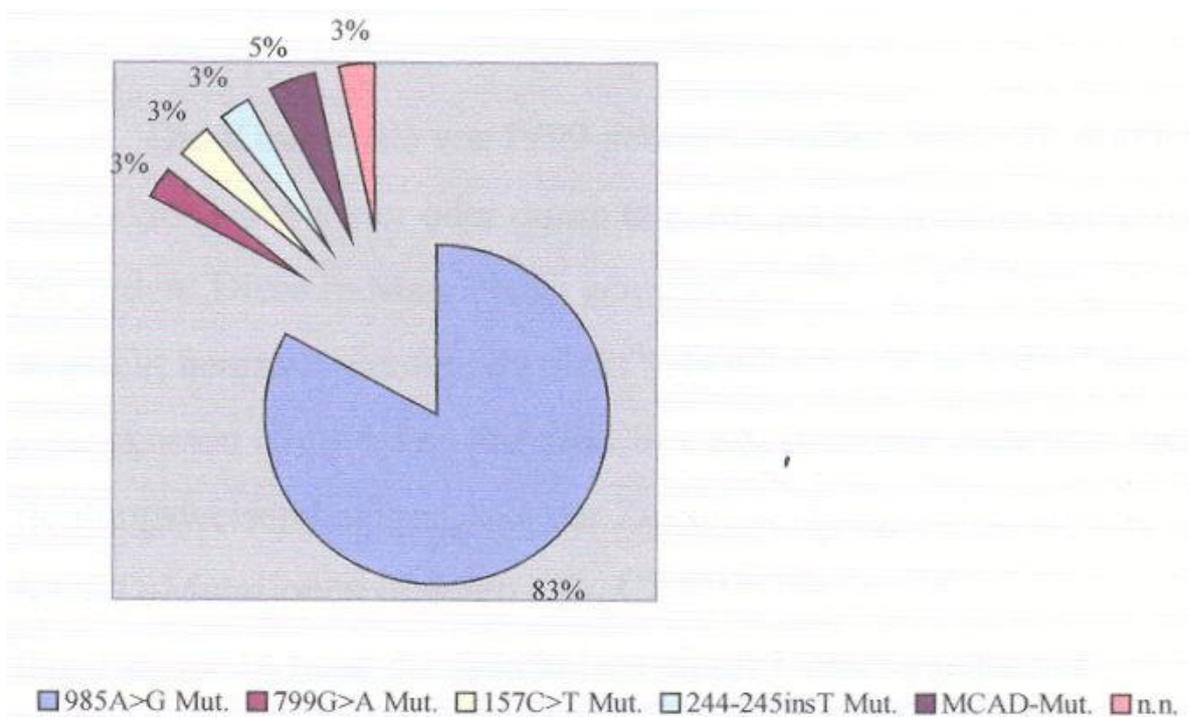
**C8:** - (< 0,45 µmol/l); + (mildes Profil: 0,45-2,00 µmol/l); ++ (schweres Profil: > 2,00 µmol/l)

**C8/C10:** - (< 2,00); + (mildes Profil: 2-4); ++ (schweres Profil ≥ 4)

**BE:** Blutentnahme

**k.A.:** keine Angaben

**n.n.:** nicht nachgewiesen



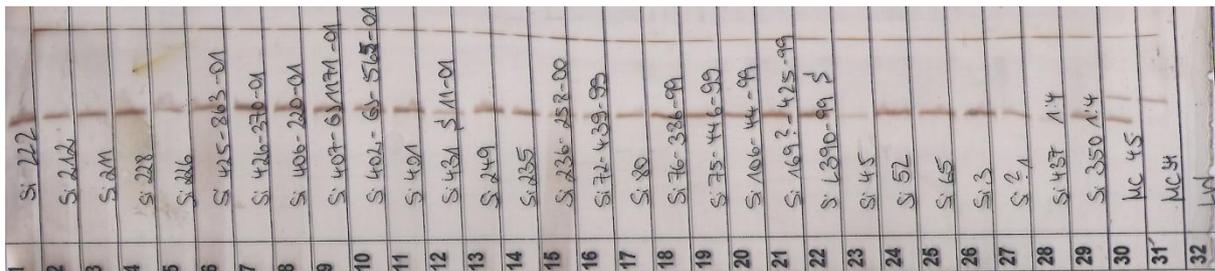
**Abbildung 8:** Darstellung der Mutationen in einer Stichprobe von 78 MCADD-Patienten aus Niedersachsen und Sachsen-Anhalt nach prozentualer Häufigkeit (n.n. = Mutationstyp wurde nicht erkannt).

### 3.1 Screening auf die MCAD-Mutation 799G>A unter den SIDS-Opfern

Die Abbildung 9 zeigt ein mit Silbernitrat gefärbtes PAA-Gel nach *Bgl*III-Restriktionsenzymverdau von Amplifikaten aus dem Exon 9 des ACADM-Gen. In den Positionen 30 und 31 befinden sich Positivkontrollen. Die Probe in Position 31 ist für die Mutation 799G>A homozygot und an Position 30 wurde eine heterozygote Probe aufgetragen. Diese Positivkontrollen stammen jeweils von den MCADD-Patienten. Wie die Tabelle 4 ausweist, wurde unter den SIDS-Opfern die genannte Mutation nicht gefunden.

**Tabelle 4:** Die Tabelle zeigt die beobachteten Häufigkeiten bei SIDS-Opfern für die Mutation 799G>A.

| Anzahl der untersuchten SIDS-Opfer | Anzahl der untersuchten SIDS-Opfer mit homozygotem Zustand der Mutation 799G>A | Anzahl der untersuchten SIDS-Opfer mit heterozygotem Zustand der Mutation 799G>A | Anzahl der untersuchten SIDS-Opfer ohne die Mutation 799G>A |
|------------------------------------|--|--|---|
| 405                                | 0  | 0  | 405   |



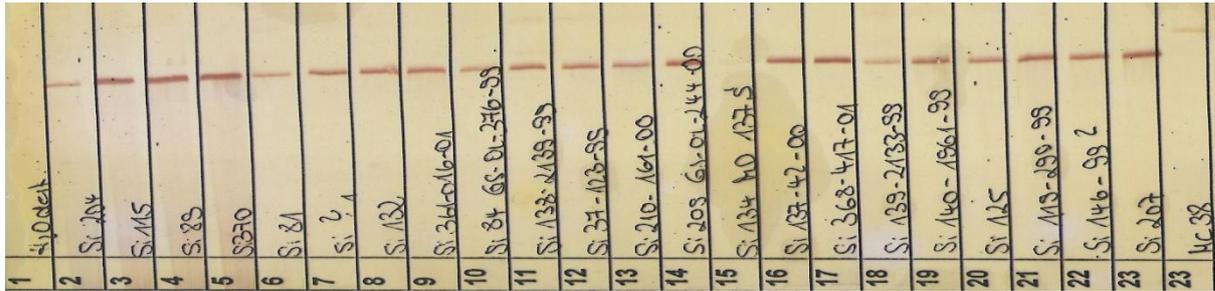
**Abbildung 9:** Silbernitrat gefärbtes PAA-Gel nach *Bgl*III-Restriktionsenzymverdau von Amplifikaten aus dem Exon 9 des ACADM-Gens.

### 3.2 Screening auf die MCAD-Mutation 244-245 Ins T unter den SIDS-Opfern

Die Abbildung 10 zeigt ein mit Silbernitrat gefärbtes PAA-Gel nach *Xcm*I-Restriktionsenzymverdau von Amplifikaten aus dem Exon 4 des ACADM-Gens. In der Position 24 zeigt sich die homozygote Positivkontrolle für die 244-245 Ins T Mutation. Auch diese Positivkontrollen stammen jeweils von den MCADD-Patienten. Wie die Tabelle 5 ausweist, wurde unter den SIDS-Opfern die genannte Mutation nicht gefunden.

**Tabelle 5:** Die Tabelle zeigt die beobachteten Häufigkeiten bei SIDS-Opfern für die Mutation 244-245 Ins T.

| Anzahl der untersuchten SIDS-Opfer | Anzahl der untersuchten SIDS-Opfer mit homozygotem Zustand der Mutation 244-245InsT | Anzahl der untersuchten SIDS-Opfer mit heterozygotem Zustand der Mutation 244-245InsT | Anzahl der untersuchten SIDS-Opfer ohne die Mutation 244-245InsT |
|------------------------------------|---|---|--|
| 405                                | 0   | 0   | 405  |



**Abbildung 10:** Mit Silbernitrat gefärbtes PAA-Gel nach *XcmI*-Restriktionsenzymverdau von Amplifikaten aus dem Exon 4 des ACADM-Gens.

### 3.3 Screening auf die MCAD-Mutation 157C>T unter den SIDS-Opfern

Die Abbildung 11 zeigt ein mit Silbernitrat gefärbtes PAA-Gel nach *BsrGI*-Restriktionsenzymverdau von Amplifikaten aus dem Exon 3 des ACADM-Gens. In der Position 26 zeigt sich die Positivkontrolle für die 157C>T Mutation. Diese Positivkontrolle stammt jeweils von den MCADD-Patienten. Wie die Tabelle 6 ausweist, wurde unter den SIDS-Opfern die genannte Mutation nicht gefunden.

**Tabelle 6:** Die Tabelle zeigt die beobachteten Häufigkeiten bei SIDS-Opfern für die Mutation 157C>T.

| Anzahl der untersuchten SIDS-Opfer | Anzahl der untersuchten SIDS-Opfer mit homozygotem Zustand der Mutation 157C>T | Anzahl der untersuchten SIDS-Opfer mit heterozygotem Zustand der Mutation 157C>T | Anzahl der untersuchten SIDS-Opfer ohne die Mutation 157C>T |
|------------------------------------|--|--|---|
| 405                                | 0  | 0  | 405   |



**Abbildung 11:** Mit Silbernitrat gefärbtes PAA-Gel nach *Bsr*GI-Restriktionsenzymverdau von Amplifikaten aus dem Exon 3 des ACADM-Gens.

Damit ist das zugängliche SIDS-Obduktionsgut für die in unserer Population vorkommenden häufigen MCADD-Mutationen durchsucht worden und es wurde nur in einem Falle ein Zusammenhang zwischen MCADD und SIDS gefunden. Ein homozygoten Auftreten einer selteneren Mutation oder Compoundheterozygotie unter Beteiligung zweier sehr seltener Mutationen ist so extrem unwahrscheinlich, dass daraus keine Verfälschung der Gesamtaussage dieser beiden Arbeiten resultieren kann.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Screening auf MCADD, weitere mt-FAOD und Carnitinzyklusdefekte

Die Schätzungen von Häufigkeiten für klinisch relevante angeborene Stoffwechselstörungen sind Grundvoraussetzungen für die Entscheidung über die Aufnahme einer Störung in das Neugeborenen-Screening [37]. Thomason et al. diskutierten 1998 den Nutzen der Aufnahme des MCAD-Defektes in das Neugeborenen-Screening [88]. Retrospektiv sind insbesondere die Fettsäureoxidationsdefekte ein gutes Beispiel für den Nutzen früher Aufdeckung dieser Stoffwechselstörungen. Vor Einführung des MCAD-Mangels in das erweiterte Neugeborenen-Screening lag die Mortalität dieser Stoffwechselstörung bei etwa 25 % und bei weiteren 30-40 % der MCADD-Patienten zeigten sich als Langzeitfolge Entwicklungsverzögerungen. MCADD-Patienten, die vor dem ersten Ausbruch von Symptomen diagnostiziert wurden und bei denen infolgedessen präventive Maßnahmen ergriffen werden konnten, hatten im Verlauf weniger Krankheitsausbrüche und eine geringere Mortalität mit signifikantem Kostenbenefit für das Gesundheitssystem [33, 83]. Schulze et al. fanden unter 250.000 mithilfe der MS/MS auf 23 verschiedene angeborene Stoffwechselstörungen getestete Neugeborene, 106 mit einem Defekt für Aminoazidopathien, FAOD und Organoazidämien. Dies ergab eine ganzheitliche Prävalenz für die genannten Störungen von 1:2400 (1:2900-1:2000), isoliert für die Fettsäureoxidationsstörungen lag die Prävalenz hier bei 1:10400 (1:17400-1:7400) [83]. In einer Studie von Klose et al. ergab sich eine MCADD-Inzidenz für Deutschland von 1:10600 auf der Basis von Schätzungen aus dem erweiterten Neugeborenen-Screening. Die MCADD-Inzidenz basierend auf Schätzungen symptomatischer Kinder mit MCADD betrug hingegen nur 1:42200 [50]. Für die MS/MS ergab sich bei den FAOD eine Spezifität von 99,9 % beziehungsweise 99,98 %, die Sensitivität lag bei 100 % [83, 89]. Schulze et al. schätzten die ganzheitliche Frequenz an Neugeborenen, die vom erweiterten Neugeborenen-Screening profitieren, auf 1:4100 ihrer Population [83]. Defekte der Fettsäureoxidation sind wichtige Ursachen des plötzlichen unerwarteten Todes im Kindesalter. Durch frühzeitige Diagnosestellung per MS/MS im erweiterten Neugeborenen-Stoffwechsel-Screening und die Möglichkeit zur Intervention bei bisher erst spät oder gar nicht diagnostizierten Stoffwechselerkrankungen zeichnet sich der hohe präventive Nutzen ab [81]. In einem bayrischen Modellprojekt von Januar 1999 bis Juli 2001 ergab sich eine Gesamtinzidenz für FAOD und Carnitinzyklusdefekte von 1:8500 [81].

Haas et al. errechneten Kosten von US \$ 1,29 pro Kind und Screening der kompletten Bandbreite an Stoffwechselstörungen unter Verwendung der MS/MS [33]. In ihrer Studie benötigten signifikant weniger positiv auf MCADD getestete Kinder eine stationäre Aufnahme (42 % versus 71 %) mit kürzeren Aufenthaltsdauern im Vergleich zur nicht untersuchten Gruppe. Weiterhin gab es einen signifikant niedrigeren Kostenaufwand in den Notaufnahmen für auf MCADD geprüfte Kinder. Jedoch zeigten die durchschnittlichen Kosten für stationäre Behandlungen, Notfallmaßnahmen und Ambulanzen pro Jahr keinen signifikanten Unterschied beider Gruppen. Nachteil ihrer Studie war die relativ kleine Beobachtungsanzahl und der kurze Beobachtungszeitraum von vier Jahren. Probleme der Langzeitauswirkungen für nicht untersuchte Kinder und dadurch hervorgerufene Kosten konnten nicht miterfasst werden [33]. Van der Hilst et al. zeigten, dass eine Testung auf den MCAD-Mangel mithilfe der MS/MS eine kosteneffektive Methode darstellt [89]. Insigna et al. konnten für den Bundesstaat Wisconsin zeigen, dass allein das Screening auf den MCAD-Defekt mit der MS/MS eine kosteneffektive diagnostische Methode ist und potentiell effektiv zur Reduzierung von Morbidität und Mortalität beitragen kann. Ihre errechnete Spezifität lag bei 99,9 %, die Sensitivität wurde geschätzt auf > 95 % [43]. Unter Verwendung der MS/MS kann also mit hoher Produktivität gleichzeitig nach mehreren Störungen gefahndet und die Kosteneffektivität so mit nur wenig zusätzlichem zeitlichen Aufwand gesteigert werden [37, 81, 89]. Ein Simulationsmodell von Venditti et al. deutet eine Reduktion von Mortalität und Morbidität durch ein Screening auf MCADD an und sagt voraus, dass bei einem Ziel von 70 Jahren die Kosten eines Screenings durch die Prävention von Folgeerkrankungen ausgeglichen sein würden [91].

Der SCAD-Mangel wurde bisher in Deutschland nicht in das erweiterte Neugeborenen-Screening eingeführt. Im Allgemeinen sollen Individuen mit einem SCAD-Defekt, die in anderen Ländern durch ein Screening detektiert wurden, normales Wachstum und Entwicklung zeigen im Gegensatz zu denen, die erst aufgrund klinischer Krankheitsbilder nachträglich ermittelt wurden [45].

Die Erkrankungen, die im erweiterten Neugeborenen-Screening in Deutschland erfasst werden, listet die Tabelle 7 auf.

**Tabelle 7:** Screening-Krankheiten nach Kinder-Richtlinien G-BA 2005 [100].

| <b>GRUPPE</b>                           | <b>KRANKHEIT</b>                              |
|---|---|
| <b>Endokrinopathien</b>                 | Hypothyreose,                                 |
|   | Adrenogenitales Syndrom                       |
| <b>Aminoazidopathien</b>                | Phenylketonurie und Phenylalaninämie,         |
|   | Ahornsirupkrankheit                           |
| <b>Organoazidopathien</b>               | Isovalerianazidämie                           |
|   | Glutarazidurie Typ I                          |
| <b>Fettsäureoxidationsstörungen und</b> | Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel    |
| <b>Carnitinzyklusdefekte</b>            | Very-long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel |
|   | Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel      |
|   | Carnitin-Palmitoyl-Transferase I Mangel       |
|   | Carnitin-Palmitoyl-Transferase II Mangel      |
|   | Carnitin-Acylcarnitin-Translokase Mangel      |
| <b>Andere</b>                           | Galaktosämie                                  |
|   | Biotinidasemangel                             |

## **4.2 Unterschiedliche Untersuchungsmethoden für MCADD**

### **4.2.1 Konventionelle biochemische Methoden**

Den Nachweis einer genetisch bedingten Stoffwechselstörung kann man prinzipiell auf verschiedene Weise führen. Die traditionelle Diagnostik beruht darauf, den Stoffwechseldefekt funktional nachzuweisen. Infolge des blockierten Abbauweges kommt es im Organismus zum Aufstau der Metaboliten und derer Sekundärprodukte, welche sich auch im Urin bestimmen lassen. Auf jenen Nachweis basieren die meisten Untersuchungsmethoden zur Früherkennung angeborener Stoffwechselerkrankungen, wie die Aminoazidopathien und auch die in dieser Arbeit analysierte Fettsäurestoffwechselstörung MCADD.

Eine weitere Strategie besteht darin, direkt die Aktivität der betroffenen Enzyme mithilfe biochemischer Methoden zu messen. Häufig werden die entsprechenden Enzyme jedoch organspezifisch exprimiert und ihre Defekte können demzufolge nur in den Zellen spezifischer Organe, wie zum Beispiel den Hepatozyten oder Fibroblasten, bestimmt werden. Für den MCAD-Defekt lassen sich folgende biochemische Methoden anwenden:

- Acylcarnitin-Profil im MS/MS-Screening
- GS/MS nach organischen Säuren im Urin
- 3-Phenylpropionsäure-Belastungstest
- enzymatische Untersuchungen anhand von Fibroblastenkulturen.

#### 4.2.2 Genomische Diagnostik der MCADD

Molekulare Methoden zielen darauf ab, für genetisch bedingte Erkrankungen direkt die Ursache, das heißt die Mutationen zu ermitteln. Das sicherste und umfassendste Vorgehen wäre es, für jeden Verdachtsfall alle 12 Exons und die Promotorregion des ACADM-Gens zu sequenzieren. Aber trotz Anwendung des Cycle-Sequencing für PCR-Produkte, was gegenüber früheren Verfahrensweisen eine bedeutende Vereinfachung darstellt, wäre eine solche Prozedur sehr aufwendig. Dennoch gibt es in der Phase der Erforschung der Erkrankung keine andere Möglichkeit. Erst wenn man die typischen und häufigsten Mutationen für eine Erkrankung kennt, kann man andere Strategien entwickeln. Man kann dann schnelle und einfache Screening-Verfahren etablieren, die diese dann bekannten Mutationen identifizieren. Nachteil solcher Verfahren ist, dass sie seltene oder bisher noch nicht aufgetretene Mutationen nicht berücksichtigen. Aber nur so ist man in der Lage, eine Population überhaupt zu erfassen und das Risiko, nennenswerte Erfassungsfehler zu begehen, ist relativ gering. Illustriert werden soll dies am Beispiel der zystischen Fibrose. Für die Erkrankung sind 1200 Mutationen bekannt, aber nur wenige sind so häufig, dass es sinnvoll ist, dafür ein Screening-Test zu entwickeln. Bekannt sind die Anwendung von Allelspezifischen Oligo-Dot-Blot, Microarrays, Oligo-ligation assays und die SNaPshot Technologie [113]. Zwei neue Cystic-Fibrosis Kits der Firma Luminex Molecular Diagnostics identifizieren 39 beziehungsweise 71 CF-Mutationen [114].

In unseren Arbeiten hatten Yvonne Rosentreter [115] und ich die Aufgabe, die Proben von 405 Kindern, die an SIDS verstorben waren, auf das Vorhandensein von MCADD-Mutationen zu überprüfen und zu erkunden, in welchem Umfang MCADD in unserer Population am Zustandekommen von SIDS beteiligt ist. Dabei konnten wir uns auf die Mutationen beschränken, die unter den MCADD-Patienten Deutschlands relativ häufig sind. Im Ergebnisteil sind alle bei uns gefundenen MCADD-Mutationen aufgeführt. Die Sequenzierung des gesamten codierenden Bereiches des ACADM-Gens wurde allerdings im

bayrischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Oberschleißheim) durchgeführt.

Die im Rahmen einer Promotionsarbeit über die Evaluation eines Nachsorgeprogrammes für Neugeborene mit einem MCAD-Mangel nach Einführung des erweiterten Neugeborenen-Screenings unter Verwendung der MS/MS (Eva Maria von Stein, Studienbeginn 2004) analysierten MCADD-Patienten wurden in den Jahren 1985 bis 2003 geboren und ab 1999 im erweiterten Stoffwechselscreening detektiert. Die DNA von Kindern mit MCAD-Mangel, die die A985G Mutation in heterozygotem Zustand beziehungsweise nicht aufwiesen, wurde zur erweiterten Mutationsuntersuchung zum bayrischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit zur Sequenzierung gesandt. Neben der Hauptmutation 985A>G, die in circa 82,69 % der Allele vorhanden war, traten die Mutationen 799G>A, 157C>T und 244-245 Ins T mit jeweils einem Anteil von 3,2 % gehäuft auf. Unter diesen Bedingungen war es möglich, für diese wenigen Mutationen eine einfache, wenn auch nicht sehr effektive Technik wie die Restriktionsmethode zu verwenden. Diese Technik ist zwar in der Ausführung relativ arbeitsaufwendig, sie kommt aber dafür ohne Entwicklungsarbeit aus. Die PCR, die durch Verwendung von Mismatch-Primern in der Kombination mit bestimmten Mutationen Restriktionsorte schafft, war zur Lösung der Aufgabe angemessen.

Die PCR/Restriktions-Methode ist eine etablierte Methode und wurde bereits zur Untersuchung verschiedener genetisch bedingter Erkrankungen angewandt. Ding et al. nutzten die PCR-Methode erfolgreich für Studien an Probanden mit MCAD-Mangel zur Klonierung von cDNA als vorbereitenden Schritt für die anschließende Restriktion mit *NcoI* zur Detektion der 985A>G Mutation [24].

#### **4.2.3 Screening auf bestimmte Mutationen im ACADM-Gen (Methodenbetrachtung)**

Die Suche nach Mutationen im MCAD-Gen anhand von DNA-Proben aus dem SIDS-Obduktionsgut erforderte die Etablierung von Screening-Methoden. Möglich war dies, da nur nach den häufigen Mutationen in unserer Population gesucht werden sollte und andere Mutationen wegen ihrer Seltenheit vernachlässigt werden konnten. Mutationen, die von Interesse waren, wurden durch die Sequenzierung der Proben von den 78 MCADD-Patienten aus Sachsen-Anhalt und Niedersachsen offenkundig. Nach der Art der zu suchenden Mutationen wurde die Screening-Strategie bestimmt. Die Mutationen 985A>G, 799G>A und 157C>T sind Punktmutationen mit Basensubstitutionen, die keine Längenveränderungen im

PCR-Amplifikat hervorrufen. Eine Längendifferenz zwischen Wildtyp-Allel und mutanten Allel von nur einem Basenpaar besteht bei der 244-245 T-Insertionsmutation. Alle Mutationen sind deshalb durch eine Kombination durch PCR und anschließender Längendarstellung durch Elektrophorese entweder gar nicht oder nur sehr unsicher darzustellen. Es wurde deshalb die Strategie der Restriktionsanalyse gewählt. In eher seltenen Glücksfällen kommt es vor, dass durch die Mutation ein Erkennungsort für ein bestimmtes Restriktionsenzym geschaffen wird. In anderen Fällen wird ein im Wildtyp-Allel bestehender Restriktionsort gelöscht. In beiden Fällen könnte man die Mutationssuche durch eine direkte Kombination von PCR, Restriktion und Elektrophorese bewerkstelligen. Im vorliegenden Fall schafft nur die Mutation 244-245-T Insertion einen natürlichen Restriktionsort.

Demzufolge könnte man das Amplifikat der Mutante mit dem Enzym *Bsa*II spalten, da es die Erkennungssequenz CCNNGG schneidet. Es wurde allerdings auf diese naheliegende Anwendung zugunsten des Einsatzes des Enzyms *Xcm*I verzichtet, weil dieses preiswerter zu beziehen war. Um die Mutation einer Restriktionserkennung mithilfe *Xcm*I zugänglich zu machen, musste die Mismatch-Primer-Technik angewandt werden. Das war auch für die Mutationen 985A>G, 799G>A und 157C>T notwendig, weil hier die Basensubstitutionen nicht zum Erscheinen natürlicher Restriktionsorte geführt hatten. Die Vorgehensweise wurde im Material- und Methodenteil beschrieben. Für die Erkennung der Mutationen hätte man sich auch einer Reihe anderer Methoden bedienen können. Naheliegend wäre es auch gewesen, die Aufgabe durch die Anwendung des SNaPshot® Multiplex Systems der Firma Applied Biosystems zu lösen [110]. Hiermit ließen sich alle Mutationen mit einem Arbeitsgang (PCR + Kapillarelektrophorese) detektieren. Allerdings wäre zur Etablierung des Systems ein höherer Arbeitsaufwand entstanden und die Kosten wären nicht wesentlich geringer ausgefallen. Zusätzlich war im Institut die Gerätekapazität der Kapillarelektrophorese begrenzt. Ein weiterer wesentlicher Gesichtspunkt zur Auswahl einer geeigneten Methode war arbeitsorganisatorischer Art. Die hier praktizierte Methode eignet sich für studentische Arbeiten, da sie sich in Intervallen verrichten ließ.

### **4.3 Mutationen im ACADM-Gen und Genotypen-Phänotypen-Korrelationen**

Mehr als 70 Mutationen wurden bereits im ACADM-Gen gefunden. Die Tabelle 8 listet die bekannten Mutationen auf. Die meisten dieser Mutationen sind Punktmutationen. Der häufigste Defekt im ACADM-Gen ist die A985G Punktmutation, welche zu einem Austausch

von Lysin nach Glutamat an Position 304 im reifen Protein führt (Lys304Glu oder K304E). Experimentelle Studien zeigten, dass die A985G Mutation mit den stärksten Veränderungen biochemischer Marker assoziiert war [95]. Diese Mutation und andere Aminosäuresubstitutionen im MCAD-Enzym verändern die Enzymstruktur und reduzieren oder heben die Enzymaktivität komplett auf [2, 49]. Die meisten Missense-Mutationen im ACADM-Gen resultieren jedoch in einer Enzymrestaktivität [2]. Betroffene mit einer A985G Mutation im homozygoten Zustand haben ein hohes Risiko für eine metabolische Dekompensation in der Kindheit, während bei Compound-Heterozygoten mildere Krankheitsverläufe aufgrund von Restaktivitäten des Enzyms beobachtet wurden [98]. Etwa 51-91 % der mutierten Allele sollen die A985G-Mutation tragen. Liebl et al. sowie Maier et al. fanden diese Punktmutation nur in 55-65 % der mutierten Allele. Es ergaben sich signifikante Unterschiede in den Häufigkeiten der A985G Mutation unter im erweiterten Neugeborenen-Stoffwechsel-Screening getesteten Neugeborenen verglichen mit klinisch retrospektiv ermittelten Fällen [95]. Dies reflektiert die Tatsache, dass im Neugeborenen-Screening circa 2-3mal mehr MCADD-Fälle detektiert werden als vor der Einführung dieses Stoffwechsedefektes in das erweiterte Neugeborenen-Screening [79, 95]. Es scheint jedoch keine eindeutigen Korrelationen zwischen Mutationstyp beziehungsweise Schwere der Mutation und klinischem Phänotyp zu geben [2, 95]. Lehotay et al. konnten zeigen, dass es jedoch vermutlich eine Beziehung zwischen dem Genotyp und biochemischen Phänotyp (dort C8-Level) gibt [59]. Erhöhte C8-Level fanden sich in dieser Studie jedoch auch bei Neugeborenen unter metabolischem Stress, zum Beispiel bei niedrigem Geburtsgewicht oder Frühgeburtlichkeit [59]. Zschocke et al. zeigten, dass die Ermittlung von Acylcarnitin-Quotienten (C8/C2, C8/C10, C8/C12) sich als eine sensitive Methode zur Differenzierung milder MCADD-Typen von klassischen MCADD-Typen und Kontrollen erweist [109]. Chace et al. unterstreichen die Rolle der Bildung von Quotienten zur Differenzierung metabolischer Erkrankungen untereinander sowie zur Minimierung der falsch-positiven Rate. Sie fanden postmortale C8-Konzentrationen dreifach über den Kontrollwerten [18]. Eine große Studie von Andresen et al. belegt die beachtliche Variationsbreite der Schwere verschiedener Mutationen und zeigt weiterhin, dass die Restaktivität vieler Missense-Mutationen durch endogene Faktoren, wie die Zahl der verfügbaren Chaperone und die Temperatur, moduliert werden könnte [2, 3, 95]. Andresen et al. fanden außerdem unter Patienten ohne Restaktivität der MCAD einige, die über Jahre ohne Krankheitszeichen blieben, wohingegen Compound-Heterozygote für die A985G Mutation und der milden C157T Mutation plötzlich und

unerwartet verstarben. Andresen et al. ermittelten weiterhin eine Trägerfrequenz von 1:500 für die T199C Mutation. Diese ist damit eine der drei häufigsten Mutationen von Enzymen der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation. Diese Frequenz ist vergleichbar mit der G1528C Mutation der Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (1:175–1:680) [2, 3]. Waddell et al. fanden die 199T>C Mutation bei 6 % der mutierten Allele im Neugeborenen-Screening. Funktionsteste dieser mutierten Proteinvariante zeigten, dass diese temperatursensitiv ist und möglicherweise bei fieberndem Patienten ihre Restaktivität verliert [95]. Es gibt Hinweise dafür, dass sich die Mutationsmuster der Acyl-CoA Dehydrogenasen untereinander ähneln. Häufig sind Proteinreste betroffen, welche nicht direkt die Enzymaktivität beeinträchtigen, jedoch wichtig für die Enzymbiogenese erscheinen [2]. Daten von Andresen et al. belegen weiterhin, dass G985 compound-heterozygote Patienten mit identischen Genotypen sehr unterschiedliche klinische Manifestationen bieten können. Erklärungen dafür sucht man in der unterschiedlichen Ausstattung zur Proteinfaltungsmaschinerie der Patienten untereinander, als auch in den überlappenden Enzymaktivitäten von Acyl-CoA Dehydrogenasen, den bereits erwähnten Umweltfaktoren und möglicherweise interindividuellen Unterschieden beim Abbau toxischer Metabolite, die bei einem  $\beta$ -Oxidationsdefekt akkumulieren können [2].

**Tabelle 8:** Mutationen im ACADM-Gen.

| Mutationen im ACADM-Gen | Quelle               | Mutationen im ACADM-Gen | Quelle       |
|-------------------------|----------------------|-------------------------|--------------|
| 504A>C                  | [79]                 | 742A>G                  | [79]         |
| 127G>A                  | [79, 95]             | 1067T>C                 | [79]         |
| 842G>C                  | [79]                 | 984A>G                  | [79]         |
| 698T>C                  | [79]                 | 155C>T                  | [79]         |
| 199T>C                  | [3, 30, 79, 95, 109] | 797A>G                  | [79]         |
| 583G>A                  | [2, 14]              | 387+1delG               | [79]         |
| 1012insTAGAATGAGTTAC    | [79, 95]             | 850-2A>G                | [79]         |
| 387delG                 | [79, 95]             | 203delA                 | [79]         |
| 311A>G                  | [79, 95]             | 1191delT                | [79]         |
| IVS 10-2A>C             | [79, 95]             | 1124T>C                 | [2, 79]      |
| 617G>A                  | [79, 95]             | 730T>C                  | [2, 79]      |
| IVS 6+7A>G              | [79, 95]             | 447G>A                  | [2, 79]      |
| 799G>A                  | [2, 79, 95, 109]     | del 1102-1105           | [79, 24]     |
| 253G>T                  | [79, 95]             | 577A>G                  | [2, 79]      |
| 250C>T                  | [79, 95]             | 734C>T                  | [3, 79, 109] |
| IVS 3+5G>T              | [79, 95]             | 85C>T                   | [22]         |
| 890A>G                  | [79, 95]             | 609A>C                  | [22]         |
| 694C>T                  | [79, 95]             | 789A>C                  | [22]         |
| 616C>T                  | [79, 95]             | 233T>C                  | [3, 22]      |

|                   |             |               |               |
|-------------------|-------------|---------------|---------------|
| IVS 10+4delAinsGC | [79, 95]    | 351A>C        | [3, 22]       |
| 245 insT          | [79]        | 395C>G        | [22]          |
| 608T>G            | [79]        | 1161A>G       | [4]           |
| 433A>T            | [79]        | 244insT       | [3]           |
| Y337S             | [79]        | 362C>T        | [3]           |
| 1001G>A           | [79]        | 343-348del    | [2, 3]        |
| 1237C>A           | [79]        | IVS5+1G>C     | [3]           |
| 817G>A            | [79]        | 489T>G        | [3]           |
| 157C>T            | [2, 22, 79] | IVS8+6G>T     | [3]           |
| 472T>C            | [79]        | 928G>T        | [3]           |
| 347G>T            | [2]         | 474T>G        | [2]           |
| 955-56del         | [2]         | 474delT       | [2]           |
| 977T>C            | [2]         | 1045C>T       | [2]           |
| 1008T>A           | [2]         | 1100-03del    | [2]           |
| 1055A>G           | [2]         | 1150G>T       | [2]           |
| 1189Ins           | [2]         | 985A>G        | [30, 95, 112] |
| 685T>G            | [115]       | 1148C>G       | [115]         |
| 1178A>T           | [115]       | 430-432delAAG | [115]         |

#### 4.4 Rolle der MCADD für den plötzlichen Säuglingstod

Augenmerk dieser Arbeit lag in der Interpretation der Rolle von MCADD für das Sudden Infant Death Syndrome. Dabei wurden 405 Leberbiopsieproben von SIDS-Fällen unter Verwendung molekulargenetischer Methoden auf MCADD untersucht. In der Arbeit von Yvonne Rosentreter fand sich ein für die A985G Mutation homozygoter Fall und weitere vier Fälle mit dem heterozygoten A985G Zustand. Die Proben der SIDS-Opfer mit der 985A>G Mutation in nur einem Allel wurden zur Sequenzierung des gesamten kodierenden Bereiches des ACADM-Gens zum Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Bayern gesandt. Es wurden keine weiteren krankheitsrelevanten Mutationen gefunden. Folglich konnte ein MCAD-Mangel für diese Fälle nicht bestätigt werden, jedoch auch nicht sicher ausgeschlossen werden, da die Methode große Deletionen sowie Mutationen außerhalb des kodierenden Bereiches nicht miterfasst. Die in dieser Arbeit gesuchten selteneren G799A, C157T und 244-245 Ins T Mutationen wurden in dem vorhandenen Patientengut nicht gefunden. Wir gehen davon aus, dass MCADD eine untergeordnete Rolle für das Sudden Infant Death Syndrome spielt.

Dieser Zusammenhang wurde bereits von anderen Studiengruppen geprüft. Vererbare metabolische Erkrankungen, die Auslöser akuter lebensbedrohlicher Ereignisse sein können, könnten auch Ursache von SIDS-Ereignissen sein [38]. Man nimmt an, dass 3-6 % der SIDS-

Fälle einer Fettsäureoxidationsstörung zuzuschreiben sind [18]. Diese Annahmen beruhen auf Daten, die vor der Einführung des erweiterten Neugeborenen-Screenings erhoben wurden.

Die Häufigkeit metabolischer Störungen, basierend auf dem Screening-Programm Neo Gen Screening (umfasst 1.000.000 Fälle), liegt bei 1:4500 [18].

Chace et al. fanden unter ihren > 7000 postmortal gesammelten Blutproben 66 bestätigte beziehungsweise hochwahrscheinliche (weil molekulare Untersuchungen oder Enzymaktivitätsmessungen nicht verfügbar waren) metabolische Störungen. Darunter fanden sich 23 MCADD-Fälle sowie weitere Fettsäureoxidationsstörungen, Carnitinzyklusdefekte und Organoazidopathien. Ihre Proben waren in über 50 % von Patienten mit ungeklärter Todesursache und hauptsächlich von Kindern unter einem Jahr [18]. Wilcox et al. untersuchten 247 plötzliche unerwartete Todesfälle von Kindern jünger als 12 Monate (SUDI) in einer Periode von fünf Jahren. Sie fanden 2 MCADD-Fälle und 1 VLCADD-Fall durch Acylcarnitinanalysen mithilfe der MS/MS. Das sind 1,2 % der SUDI-Fälle, bei denen ein Fettsäureoxidationsdefekt vorlag. Sie suggerieren, dass ein standardisiertes postmortales Screening auf Fettsäureoxidationsdefekte auch mit der universellen Einführung des erweiterten Neugeborenen-Screenings berechtigt bliebe, da ein Teil der Kinder bereits vor der Blutentnahme verstirbt [104]. Lundemose et al. untersuchten 120 SIDS-Fälle auf die G985A Mutation des MCAD-Mangels und fanden keine Überexpression, weder für Homozygotie noch für Heterozygotie dieser Mutation im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung. In einer weiteren Studie von Lundemose et al. wurden 79 unerwartete Todesfälle von Kindern unter vier Jahren auf Fettsäureoxidationsdefekte untersucht. Von diesen wurden 42 als klassische SIDS-Fälle definiert, unter 19 boderline-SIDS Fällen fanden sie eine nicht-definierte Fettsäureoxidationsstörung und von den verbleibenden 18 nicht-SIDS Fällen (Ausschluss aufgrund des Alters, autoptischen Befunden etc.) fand sich ein Patient mit multiplem Acyl-CoA Dehydrogenasen Defekt sowie ein weiterer mit einem MCAD-Mangel. Weiterhin wurden in der boderline-SIDS Gruppe zwei Träger einer G985A Mutation detektiert. Lundemose et al. schlussfolgern aus ihren Studien, dass es dennoch wichtig bleibt, vererbare Ursachen zu identifizieren, um weitere Familienmitglieder zu diagnostizieren, auch wenn der Anteil an Fettsäureoxidationsstörungen als Ursache für plötzliche Todesfälle im Kindesalter gering ist [61].

Bereits 1985 beschrieben Howat et al. den MCAD-Mangel als eine mögliche Ursache für das SIDS. Sie beobachteten unter 200 SIDS-Fällen 14 mit mikrovesikulären, panlobulären fettigen Veränderungen der Leber und konnten bei 5 aus diesen 14 Fällen weitere

histochemische Untersuchungen anschließen. Es zeigten sich hierunter 2 MCAD-Fälle [39]. Holton et al. prüften 95 plötzliche unerwartete Todesfälle im Kindesalter (mittleres Alter zum Todeszeitpunkt = 94 d) in einer Zweijahresperiode in dem definierten geographischen Gebiet von Avon und North Somerset auf vererbare metabolische Erkrankungen. Unter den 95 Todesfällen wurden 88 nach der Untersuchung als klassische SIDS-Fälle definiert. In Urin, Liquor und Glaskörperflüssigkeit konnten dort keine Abweichungen im Hinblick auf organische Säuremetabolite beobachtet werden. Die Fettsäureoxidation wurde in Hautfibroblasten-Untersuchungen an 70 SIDS-Fällen beurteilt, jedoch konnte kein MCAD-Mangel nachgewiesen werden. Holton et al. kommen zu dem Schluss, dass die Inzidenz von MCADD und anderen metabolischen Störungen unter SIDS-Fällen viel niedriger liegt, als zunächst angenommen [38].

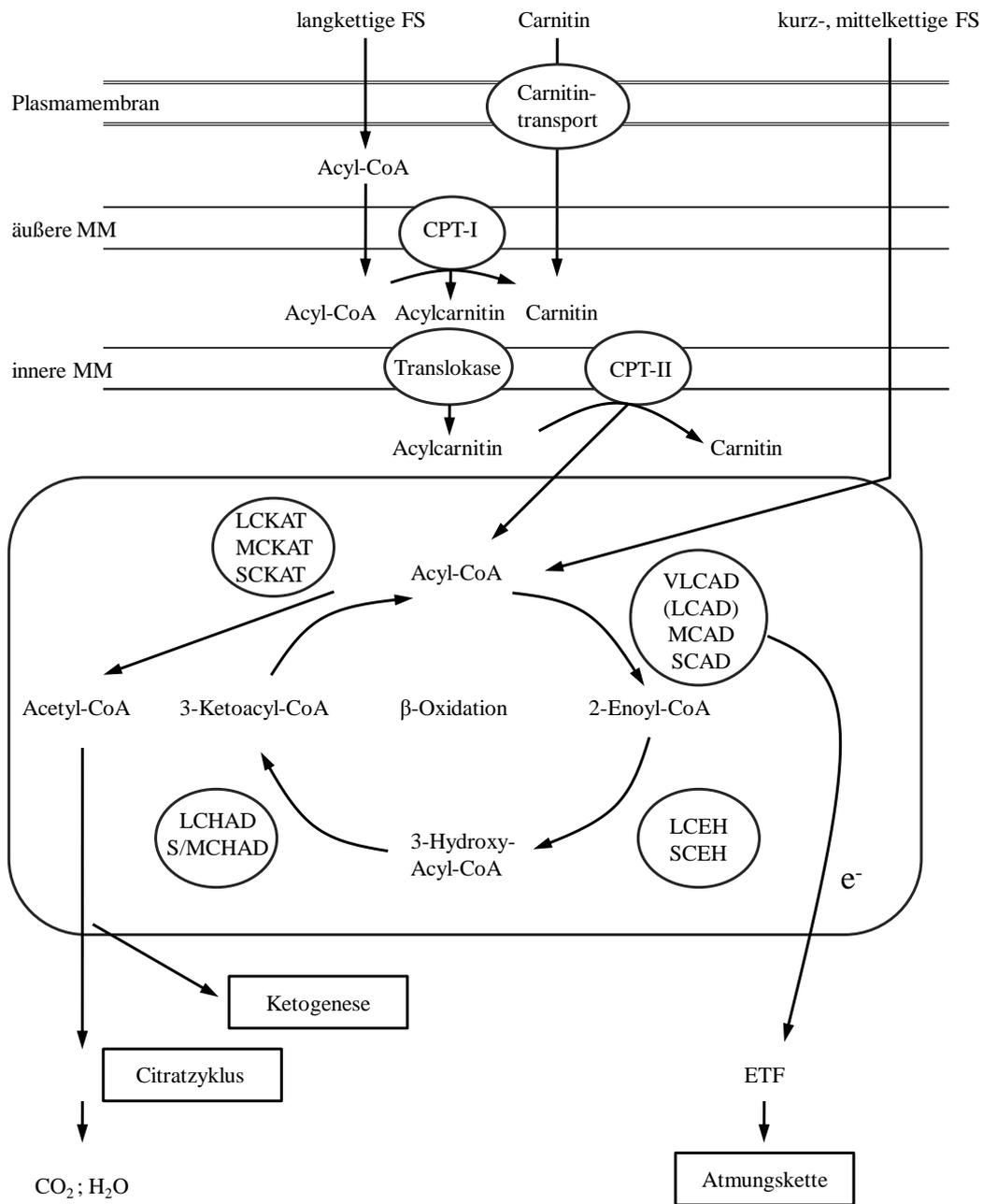
## **4.5 Weitere FAOD und Carnitinzyklusdefekte und ihre Rolle für den plötzlichen Säuglingstod**

### **4.5.1 Grundlagen der Fettsäureoxidation**

Neben der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation, die den Abbau von Fettsäuren mit 20 und weniger C-Atomen katalysiert, besteht die carnitinunabhängige  $\beta$ -Oxidation in den Peroxisomen sowie die  $\Omega$ -Oxidation in den Mikrosomen. Freie Fettsäuren aus dem Blut werden im Zytoplasma durch die Acyl-CoA-Synthetase aktiviert. Die Carnitinpalmitoyltransferase-I (CPT-I) in der äußeren Mitochondrienmembran verestert die aktivierte Fettsäure mit Carnitin. Dies stellt den limitierenden Schritt der  $\beta$ -Oxidation dar. Mit Hilfe der Carnitin-Acylcarnitrintranslokase (CACT) gelangt Acyl-Carnitin über die innere Mitochondrienmembran. Die Carnitinpalmitoyltransferase-II (CPT-II) hydrolysiert den Carnitinester zu Acyl-CoA. Für die CPT-I existieren gewebsspezifische Isoformen. Weder für die CPT-II noch für die CACT wurden bisher gewebsspezifische Expressionen beschrieben. Die Very-Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCADD) und das Trifunktionale Protein (TFP), ein Enzymkomplex aus Long-Chain 3-Hydroxy-Acyl-CoA Dehydrogenase (LCHAD), Long-Chain Enoyl-CoA Hydratase (LCEH) und Long-Chain 3-Ketoacyl-CoA Thiolase (LCKAT), liegen zusammen mit der CPT-II gebunden an der inneren Mitochondrienmembran vor. Die restlichen Enzyme der  $\beta$ -Oxidation befinden sich gelöst in der Mitochondrienmatrix. Der Abbau der Fettsäuren erfolgt in der  $\beta$ -Oxidationsspirale durch kettenlängenspezifische Enzyme. Endprodukt ist das

um zwei C-Atome verkürzte Acyl-CoA und ein Acetyl-CoA. Der bei der  $\beta$ -Oxidation entstehende Elektronenfluss wird über FADH<sub>2</sub> mit Hilfe des Elektronentransfer-Flavoprotein (ETFP) und der ETFP-Dehydrogenase (ETFP-DH) in die Atmungskette übertragen. Acetyl-CoA wird entweder im Zitratzyklus weiter abgebaut oder dient der Ketogenese.

Die meisten Enzyme der  $\beta$ -Oxidation werden an zytoplasmatischen Ribosomen als Vorläuferprotein synthetisiert und anschließend rezeptorvermittelt und energieabhängig in die Mitochondrien aufgenommen. Unter Abspaltung des Leitpeptids entsteht dort das reife Protein [19, 94]. Abbildung 12 zeigt schematisch den Fettsäurestoffwechsel.



**Abbildung 12:** Fettsäuretransport und  $\beta$ -Oxidation. Abbildung in Anlehnung an das Screening-Handbuch von Liebl et al. [60].

**Tabelle 9:** Mitochondriale  $\beta$ -Oxidationsdefekte und Jahr der Erstbeschreibung [64].

| <i>Jahr der Erstbeschreibung</i>       |                        |
|--|------------------------|
| <i>Transportproteine</i>               |                        |
| Fettsäuretransportprotein              | 1998 Odaib et al.      |
| Carnitin-Transporter                   | 1975 Karpati et al.    |
| Carnitin-Acylcarnitin-Translokase      | 1992 Stanley et al.    |
| <i>Enzyme der Mitochondrienmembran</i> |                        |
| CPT-I                                  | 1981 Bougneres et al.  |
| CPT-II                                 | 1973 Di Mauro et al.   |
| ETF/ETFDH                              | 1976 Przyrembel et al. |
| VLCAD                                  | 1993 Bertrand et al.   |
| LCHAD                                  | 1989 Wanders et al.    |
| LCKAT                                  | 1992 Hintz et al.      |
| <i>Enzyme der Mitochondrienmatrix</i>  |                        |
| MCAD                                   | 1976 Gregersen et al.  |
| SCHAD                                  | 1991 Tein et al.       |
| SCKAT                                  | 1997 Kamijo et al.     |
| SCAD                                   | 1987 Amendt et al.     |

#### 4.5.2 Very-Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel (VLCADD)

Die Acyl-CoA Dehydrogenase für überlangkettige Fettsäuren (C14-C22) ist mit der inneren Mitochondrienmembran verbunden. Es handelt sich dabei um ein Homodimer mit einer molekularen Masse von 70 kDA je Untereinheit. Das ACADVL-Gen ist auf Chromosom 17 p11.2 – p 11.13105 lokalisiert, 5.4 kb lang und beinhaltet 20 Exons [64]. Ein Mangel dieses Enzyms manifestiert sich in der Neonatal- und frühen Säuglingszeit und verursacht ein besonders schweres Energiedefizit [60, 77, 86, 100]. Das Enzym konnte 1992 von Izai et al. isoliert werden. 1993 wurde das Krankheitsbild von Bertrand et al. erstmals beschrieben [64, 77]. Die Prävalenz der Erkrankung beträgt 1:100.000 Neugeborene [100]. Leitparameter im Neugeborenen-Screening durch MS/MS sind Tetradecenoyl-Carnitin (C14:1) und Tetradecadienoyl-Carnitin (C14:2) [60]. Strauss et al. weisen darauf hin, dass auch dieser Defekt, wie schon für den MCAD-Mangel beschrieben, im Rahmen von katabolen Zuständen zum plötzlichen Kindstod führen kann. Sie beschrieben 1995 eine 105 bp Deletion des Exons

11 (bp 1078-1182) im ACADVL-Gen. Bei einem zweiten, für den VLCAD-Defekt compound-heterozygoten Patienten fanden Sie einen Basenaustausch an Position C1837T sowie auf einem zweiten Allel eine Deletion eines Guanin-Nukleotids an der Intron/Exon 6 Grenze [86]. Mathur et al. untersuchten 37 Patienten aufgrund von Symptomen und/oder biochemischen Markern, die auf einen VLCAD-Mangel hindeuteten. Sie fanden 21 verschiedene Mutationen, was die genetische Heterogenität des VLCAD-Defektes widerspiegelt [63]. Bis 1999 wurde noch mindestens weitere 11 Mutationen im ACADVL-Gen gefunden. Strauss et al. konnten mit den Ergebnissen ihrer Studien ebenso zeigen, welche zentrale Rolle die VLCAD für die myokardiale Energieversorgung darstellt. Sie konnten eine Verbindung zwischen hypertropher Kardiomyopathie und dem VLCAD-Defekt aufzeigen. Während des Fastens akkumulieren bei diesem Defekt überlangkettige, für Mitochondrien toxische Acylcarnitine, welche zu letalen Arrhythmien führen können [77, 86]. In einer Studie von Mathur et al. war die Kardiomyopathie die häufigste Manifestation unter VLCAD-defizienten Patienten. Sowohl dilatative als auch hypertrophe Kardiomyopathien wurden beobachtet, wobei sich erstere eher initial zeigte. Die Gesamtmortalität lag in ihrer Studie bei 44 %. Ihre Ergebnisse zeigen, dass für einige Fälle eines plötzlichen Kindstodes eine metabolische Störung ursächlich sein könnte [63]. Moczulski et al. beschreiben in einer Übersichtsarbeit zu den  $\beta$ -Oxidationsstörungen drei unterschiedliche Phänotypen. Zum einen eine schwere und frühe Form mit hypertropher Kardiomyopathie, Hepatomegalie und hoher Mortalität, zum anderen einen milderen Phänotyp, der hypoketotische Hypoglykämie und hepatische Symptome umfasst. Ferner die adulte Form, die sich vornehmlich mit myopathischen Beschwerden äußert [64]. Eindeutige Phänotypen-Genotypen-Korrelationen wurden bislang nicht aufgedeckt [64].

Die Abgrenzung zu anderen  $\beta$ -Oxidationsstörungen allein durch klinische Befunderhebung erscheint unmöglich. Die Unterscheidung zum MCAD-Defekt kann durch den Nachweis charakteristischer Glycinkonjugate im Urin sowie dem 3-Phenylpropionsäure-Test erfolgen. Die sichere Differenzierung zu allen anderen Fettsäureoxidationsdefekten ist jedoch nur durch enzymatische Untersuchungen an Fibroblastenkulturen und/oder molekulargenetische Untersuchungen möglich [77].

Im Gegensatz zum VLCAD-Defekt resultieren der MCAD- und LCHAD-Defekt aus einer häufigen Mutation, vermutlich abgeleitet aus einem Gründereffekt. Wie bereits erwähnt, umfasst die K304E Mutation im MCAD-Gen 80-90 % aller mutierten Allele beim MCAD-Defekt. Beim LCHAD-Mangel werden circa 60 % aller abnormen Allele durch die E474Q-

Mutation hervorgerufen. Die Aktivität der VLCAD überlappt mit der Aktivität der Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase. Die Existenz eines LCAD-Mangels ist aufgrund der experimentell niedrigen Aktivität dieses Enzyms in Fibroblasten und Kardiomyozyten und der untergeordneten Rolle in der Energieproduktion fraglich [64].

#### **4.5.3 Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Mangel (LCHADD/mt-TFP-Defekt)**

Die 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase langkettiger Fettsäuren katalysiert den dritten Schritt der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation langkettiger Fettsäuren. Dieses Enzym ist Teil des mitochondrialen trifunktionalen Proteins, zu welchem auch die Enoyl-CoA Hydratase langkettiger Fettsäuren und die Thiolase langkettiger Fettsäuren gehören [21, 64]. Die Gene des mt-TFP sind auf dem Chromosom 2p23 lokalisiert. Dieser Enzymkomplex besteht aus vier  $\alpha$ - und vier  $\beta$ -Untereinheiten. Die häufigste Störung im mt-TFP ist der isolierte LCHAD-Mangel [64]. Wanders et al. beschrieben 1990 diesen Defekt erstmalig. Auch der LCHAD-Mangel kann zu einer hypoketotischen Hypoglykämie, Kardiomyopathie und Skelettmuskelschwäche führen. Spätsymptome können Polyneuropathie und Retinopathia pigmentosa sein, Komplikationen, welche bisher bei keiner anderen mitochondrialen Fettsäureoxidationsstörung beobachtet wurden [21, 60]. Die Langzeitprognose hängt vor allem von der Vermeidung einer sich entwickelnden Kardiomyopathie ab [60]. Bei Müttern betroffener Feten wurden Schwangerschaftssteatosen und das HELLP-Syndrom beobachtet [15, 42, 60, 68, 100]. In der Studie von den Boer et al. wurden 15 % der Schwangerschaften durch ein HELLP-Syndrom und weitere 4 % durch eine akute Schwangerschaftsfettleber kompliziert [21]. Die Prävalenz der Erkrankung beträgt 1:200.000 Neugeborene [100]. Leitparameter im MS/MS-Screening sind langkettige hydroxylierte Acylcarnitine wie Hydroxy-Hexadecanoyl-Carnitin (C16-OH) und Hydroxy-Oleyl-Carnitin (C18:1-OH) [60, 100]. Eine retrospektive Studie von den Boer et al. an 50 LCHADD-Patienten erbrachte ein mittleres Alter bei klinischer Manifestation von 5,8 Monaten und eine Mortalität von 38 %. Die Mehrheit der LCHAD-defizienten Patienten trägt die Punktmutation 1528G>C auf mindestens einem Allel [21]. Ein Großteil der Patienten zeigte unspezifische chronische Probleme vor einer akuten hypoglykämischen Episode. Diese Beobachtung wurde bereits bei weiteren langkettigen Fettsäureoxidationsstörungen wie dem VLCAD-Defekt und dem CPT-II-Defekt gemacht [21].

Im Unterschied zum MCAD-Mangel liegen das Alter der Erstmanifestation bei LCHAD-Mangel deutlich niedriger und die ermittelte Mortalität wesentlich höher.

#### **4.5.4 Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel (SCADD)**

Die Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase katalysiert den ersten Schritt der  $\beta$ -Oxidation kurzkettiger Fettsäuren mit einer Spezifität für Kettenlängen von C4-C8. Maximalaktivitäten hat dieses Enzym bei der Kettenlänge C4. Wie bereits für den MCAD-Mangel beschrieben, führen auch bei diesem Defekt schwere inaktivierende Mutationen nicht zwangsläufig zu einer klinischen Manifestation. Die C319T Mutation resultiert *in vitro* in einem kompletten Aktivitätsverlust, homozygot Betroffene können neuromuskuläre Symptome zeigen oder aber asymptomatisch bleiben [96]. Die diagnostischen Methoden entsprechen denen des MCAD-Defektes. Plasma-Acylcarnitinspiegel können erhöhte Butyryl(C4)-Carnitin-Level zeigen. Im Urin findet sich ein Anstieg von Ethylmalonsäure (EMA). Bestätigt wird der Verdacht auf einen SCAD-Mangel durch Enzymaktivitätsmessungen vornehmlich im Muskelgewebe oder durch Gensequenzanalyse [67]. Akute Schwangerschaftsfettleber mit Präeklampsie und HELLP-Syndrom der Mütter betroffener Feten wurden beschrieben [12, 45]. In einer Studie von Waisbren et al. hatte die Hälfte der Mütter (7 von 14) mit SCAD-defizienten Kindern durch schwangerschaftsinduzierten Hypertonus (SIH), Präeklampsie und mildes HELLP-Syndrom komplizierte Schwangerschaften [96]. Das ACADS-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosom 12 lokalisiert, circa 13 kb lang und beinhaltet 10 Exons [45, 111]. Die Prävalenz der Erkrankung ist für Deutschland unbekannt [100]. Für die Niederlande wird eine Prävalenz von 1:50.000 angegeben [62]. Bisher wurde von 35 inaktivierenden Mutationen und zwei Genvarianten im ACADS-Gen berichtet. Die C511T Genvariante befindet sich auf Exon 5 und führt zu einer Substitution von Tryptophan für Arginin an Position 147 des reifen Proteins (R147W). Die G625A Variante im Exon 6 substituiert Serin an Position 185 für Glycin (G185S). Die meisten Individuen mit Genvarianten in homozygotem Zustand bleiben zeitlebens asymptomatisch. Es wird jedoch angenommen, dass Genvarianten in Zusammenhang mit einem oder mehreren Umweltfaktoren zu einer klinischen Manifestation der Erkrankung führen können. Das Vorhandensein von Genvarianten prädisponiert zu einem bestimmten biochemischen Phänotyp, nicht jedoch zu klinischen Symptomen [45, 62]. In den Untersuchungen von Waisbren et al. trugen alle bis auf einen der klinisch diagnostizierten SCADD-Fälle Genvarianten. Dagegen trugen im Screening detektierte Patienten fast

ausschließlich ACADS-Mutationen [96]. Studien von Gregersen et al. zeigen, dass die R147W-Variante die Proteinfaltung verändert und die G185S-Variante die thermische Stabilität des Enzyms beeinflusst. In den Untersuchungen von Nagan et al. fand sich in der US-Bevölkerung eine Allelfrequenz der G625A-Genvariante von 22 %, für die C511T-Variante betrug sie nur 3,1 %. Das homozygote Auftreten der 625G>A-Variante war dort mit erhöhten Butyryl-Carnitin-Konzentrationen verglichen mit den Wild-Typ-Probanden korreliert. Der obere Referenzwert für die C4-Konzentration im Plasma (1,0 µmol/l) wurde jedoch in ihrer Studie bei keinem der für die zwei Genvarianten homo- und compound-heterozygoten Neugeborenen erreicht [67]. Nahezu alle berichteten Mutationen im SCAD-Gen sind Punktmutationen und resultieren fast ausnahmslos in einer messbaren intramitochondrialen Proteinaggregation [12, 45]. Es wird vermutet, dass die Proteinaggregation eine Rolle in der Entwicklung von Symptomen beim SCADD spielt [45]. Hierfür spricht, dass insbesondere neurologische Symptome bei Manifestation der Erkrankung vorherrschen. Pedersen et al. fanden unter 114 Patienten mit SCADD in 69 % der Fälle eine Entwicklungsverzögerung [45]. Das Spektrum an Phänotypen umfasst weiterhin Gedeihstörungen, metabolische Azidose, Krampfanfälle, neuromuskuläre Symptome wie Myopathie und Hypotonie [12, 45, 62]. Der Krankheitsverlauf scheint durch dauerhafte therapeutische Maßnahmen nicht signifikant verändert zu sein. Im Allgemeinen sollen sich vorbestehende Symptome mit zunehmendem Alter bessern. Das Meiden von Fastenperioden scheint auch hier eine sinnvolle präventive Maßnahme zu sein [45]. Es gibt keine Beweise dafür, dass eine frühe Detektion von SCADD einen klinischen Nutzen erbringt. Eltern könnten bei positivem Screening-Ergebnis unnötigem Stress ausgesetzt sein. Es werden weitere Studien gebraucht, um über die Relevanz der Aufnahme von SCADD ins erweiterte Neugeborenen-Screening zu entscheiden [62]. In weiten Teilen der USA und Australiens ist diese Störung bereits ins Screening aufgenommen worden. Für den plötzlichen unerwarteten Tod im Säuglingsalter scheint der SCAD-Mangel aufgrund seines relativ milden Erscheinungsbildes eine eher akzidentielle Rolle zu spielen.

## **4.5.5 Carnitinzyklusdefekte**

### **4.5.5.1 Carnitin-Palmitoyl-Transferase-I Mangel (CPT-I)**

Es existieren drei gewebsspezifische Isoformen dieses Enzyms. Eine Leber-Isoform (L-CPT-I/ CPT-IA), eine Muskel-Isoform (M-CPT-I/ CPT-IB) und eine Isoform, die im Gehirn und Hoden gefunden wurde (B-CPT-I/ CPT-IC). Die L-CPT-Isoform wird in Leber, Nieren, Lymphozyten und Fibroblasten exprimiert. Die M-CPT-Isoform findet man hauptsächlich im Skelettmuskel [7, 64]. Das L-CPT-I Gen ist auf Chromosom 11q13.1-q13.5 lokalisiert [52, 64]. Der CPT-I-Mangel wurde erstmals 1981 beschrieben. Betroffene erleiden die erste metabolische Dekompensation meist zwischen den ersten Lebenstagen und dem 18. Lebensmonat [64] beziehungsweise zwischen dem 6. und 24. Lebensmonat [100] und können mit hypoketotischer Hypoglykämie, Hepatomegalie, Leberversagen, Krampfanfällen und Koma auffallen. Literaturangaben zum ersten Krankheitsausbruch variieren jedoch. Bis 2004 gab es nur etwa 30 veröffentlichte Fälle von CPT-I-Mangel, jedoch bereits etwa 25 identifizierte Mutationen [7, 52]. Bennett et al. bestätigten mit Ihrer Aufdeckung von fünf CPT-I-Mangel-Patienten mit vier neuen Mutationen die genetische Heterogenität des CPT-I-Mangels [7]. Im Gegensatz zu anderen FAO-Störungen sind bei dieser die Plasmacarnitinspiegel häufig erhöht [60, 64, 100]. Charakteristische Acylcarnitinprofile in der MS/MS wurden bisher nicht gefunden [52]. Enzymaktivitätsmessungen in Leukozyten oder Fibroblasten und Gensequenzierung dienen der Bestätigung [7, 52]. Korman et al. fanden unter drei Individuen mit CPT-I-Mangel erhöhte Dodecandisäure- und 3-Hydroxyglutarsäure-Werte und weisen damit auf mögliche zusätzliche diagnostische Marker hin [52]. 3-Hydroxyglutarsäureausscheidung findet man typischerweise bei Glutarazidurie Typ I. Die Prävalenz der Erkrankung liegt bei 1:500.000 Neugeborene [100]. Defekte der humanen CPTIB und -IC Isoform wurden bisher nicht beschrieben [52, 64].

### **4.5.5.2 Carnitin-Palmitoyl-Transferase-II Mangel (CPT-II)**

Erstbeschreiber des CPT-II-Mangels waren DiMauro und DiMauro (1973) [85]. Der CPT-II-Mangel ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Störung mit einer Prävalenz von 1:200.000 Neugeborene [100]. Das CPT-II-Gen liegt auf Chromosom 1p32 und beinhaltet 5 Exons [64, 84, 85]. Bisher wurde von mehr als 60 krankheitsverursachenden Mutationen im

CPT-II-Gen berichtet [44]. Es scheint Genotypen-Phänotypen-Korrelationen zu geben [64, 85]. Klinisch werden drei Phänotypen unterschieden: Erstens, die adulte Form mit Myopathien, welche durch episodisch auftretende Muskelschmerzen und -krämpfe sowie laborchemisch durch eine Erhöhung der Serumkreatinkinase und Myoglobinurie charakterisiert ist. Sie gilt als eher milde und ist die häufigste Form dieses Krankheitsbildes. Zweitens, die infantile Variante des CPT-II-Mangels, die sogenannte hepatokardiomuskuläre Erkrankung. Diese ist gekennzeichnet durch schwere Krankheitsausbrüche in der späten Kindheit mit hypoketotischer Hypoglykämie, Leberversagen, Kardiomyopathie und peripherer Myopathie. Drittens, die neonatale Form, die selten ist und entsprechend frühzeitig auftritt. Zusätzlich zu den Symptomen der infantilen Form können hier zahlreiche Dysmorphien hinzukommen [16, 44, 84, 85, 100]. Die häufige 338C>T Mutation ist meist mit der adulten Form assoziiert. Die Allelfrequenz für diese Mutation liegt bei etwa 60 % unter europäischen Patienten [44, 85]. Semba et al. berichten über ein verstorbenes Geschwisterpaar, von dem der Bruder am zweiten Lebenstag, die Schwester im Alter von einem Jahr verstarb. Retrospektiv wurde ein CPT-II-Mangel ermittelt [84.] Brucknerova et al. berichten von einem zwei Tage alten Neugeborenen mit rezidivierendem Erbrechen, Bradykardie und Asphyxie infolge von Arrhythmien, welches erfolgreich reanimiert werden konnte. Die Diagnose eines CPT-II-Mangels wurde mithilfe der MS/MS und mit Enzymaktivitätsmessungen in Leukozyten bestätigt [16].

Im Neugeborenen-Screening finden sich erhöhte langkettige Acylcarnitine (C16, C16:1, C18, C18:1, C18:2) und erniedrigtes freies Carnitin (C0) [60, 100]. Die MS/MS hat sich als schnelle, sensitive und spezifische Methode zur Detektierung eines CPT-II-Mangels erwiesen. Die Sensitivität für die adulte Form ist aufgrund der hohen Enzymrestaktivitäten ungewiss [85]. Pränatale Untersuchungen an DNA aus Chorionzottenbiopsien können in der 10. SSW vorgenommen werden. Messungen an kultivierten Amniozyten sind zwischen der 16. und 17. SSW möglich [16]. Der CPT-II-Mangel ist aufgrund des in manchen Fällen infausten Erscheinungsbildes als mögliche Ursache von plötzlichen unerwarteten Todesfällen im Kindesalter in Betracht zu ziehen.

#### **4.5.5.3 Carnitin-Acylcarnitin-Translokase Mangel (CACTD)**

Die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT) befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und ist essentiell für den Transport langkettiger Fettsäuren ins

Mitochondrieninnere, dem Ort der  $\beta$ -Oxidation. Ein CACT-Mangel führt zur Akkumulation kardiotoxischer langkettiger Acylcarnitine (C16, C18, C18:1, C18:2), wenn die Lipolyse aktiviert ist. Das Muster der Acylcarnitine unterscheidet sich nicht vom CPT-II-Mangel. Eine definitive Diagnose wird mithilfe von Enzymaktivitätsmessungen in Lymphozyten und Hautfibroblasten sowie Mutationsanalytik im CAC-Gen gestellt. Neugeborene mit CACT-Mangel fallen meist bereits in den ersten Lebenstagen mit metabolischer Dekompensation, kardiopulmonalem Versagen, Herzrhythmusstörungen und plötzlichen Todesfällen auf, wenn die orale Nahrungsaufnahme noch gering ist und die Glykogenreserven niedrig sind. Das CACT-Gen befindet sich auf Chromosom 3p21.31 und beinhaltet 9 Exons und 8 Introns [57, 60, 64, 70, 100]. Die Prävalenz des CACT-Defektes beträgt 1:500.000 Neugeborene [100]. Nuoffer et al. berichten über eine Familie mit acht Kindern von denen vier vermeintlich am SIDS verstorbenen waren. Beim achten Nachkommen wurde aufgrund der Familienanamnese eine  $\beta$ -Oxidationsstörung angenommen und positiv auf CACT-Mangel getestet. Dies zeigt einmal mehr die Bedeutung der Einführung dieser und anderer Carnitinzyklus- und  $\beta$ -Oxidationsdefekte ins erweiterte Neugeborenen-Screening.

#### **4.5.6 MAD-Mangel (Glutarazidurie Typ II)**

Das Elektronentransferflavoprotein und die ETFP-Dehydrogenase dienen der Elektronenübertragung vom in der Fettsäureoxidation entstehenden FADH<sub>2</sub> auf die Atmungskette. Defekte des ETFP und des ETFP-DH werden als multiple Acyl-CoA-Dehydrogenasen Defekte oder als Glutarazidurie Typ II bezeichnet. Betroffen sind neben den Dehydrogenasen der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren auch diverse Dehydrogenasen im Abbau von Aminosäuren und die Oxidation von Laktat. Die Prävalenz der Erkrankung liegt bei 1:200.000 Neugeborene [100]. Patienten mit einem multiplen Acyl-CoA-Dehydrogenasen Mangel werden in drei Gruppen unterteilt. Zum einen eine neonatale Form mit kongenitalen Anomalien, zum anderen eine neonatale Ausbruchform ohne kongenitale Anomalien und schließlich eine späte und mildere Form. Assoziierte kongenitale Missbildungen können hohe Stirn, Mittelgesichtshypoplasie, weite offene vordere Fontanelle, Bauchwanddefekte, abnorme Genitalien und Nierenzysten sein. Die meisten Patienten der ersten Gruppe versterben bereits in den ersten Lebenswochen. Patienten der zweiten Gruppe entwickeln typischerweise schwere Kardiomyopathien und versterben häufig in den ersten Lebenswochen. Der Verlauf der milden Form eines multiplen Acyl-CoA-Dehydrogenasen

Mangels ist sehr variabel und reicht von Episoden mit Erbrechen und Hypoglykämie, Hepatomegalie bis hin zu progressiven Lipideinlagerungen in die Muskulatur im Erwachsenenalter [1, 60, 87, 100].

#### **4.5.7 Carnitintransporterdefekt**

Carnitin ist eine quärtäre Ammoniumverbindung, die den Transport langkettiger Fettsäuren ins Mitochondrium unterstützt. Der primäre Carnitinmangel ist selten. Das initiale klinische Erscheinungsbild ist heterogen und reicht von Gedeihstörungen, Muskelschwäche, Hypoglykämie, dilatativer Kardiomyopathie mit Stauungsinsuffizienz, Koma bis zu plötzlichen unerwarteten Todesfällen in der Neonatalperiode. Ursächlich für den primären Carnitinmangel ist ein Membrantransporterdefekt von Carnitin, der zu einer Beeinträchtigung des Carnitintransports über Membranen ins Gewebe und zu einem Verlust von Carnitin in den Urin führt. Die frühzeitige Supplementierung von Carnitin soll Symptomen vorbeugen und zum Regress einer bereits eingetretenen Kardiomyopathie führen [73].

#### **4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Mit den Arbeiten von Yvonne Rosentreter und mir haben wir unter 405 SIDS-Fällen aus einer BMBF-Studie einen MCADD-Fall in Form einer homozygoten 985A>G Mutation entdeckt. Dabei handelt es sich um die häufigste MCADD-Mutation. Diese wurde durch die Screening-Methode (PCR/ *NocI*-Test) von Yvonne Rosentreter gefunden [115].

Das Screening nach den etwas selteneren Mutationen G799A, C157T und 244-245 Ins T, welches in dieser Arbeit beschrieben wurde, erbrachte keine weiteren Treffer. Es ist theoretisch möglich, dass sich unter den SIDS-Opfern weitere Fälle von MCADD befanden, denn wir konnten nur die Fälle erfassen, die durch häufige oder relativ häufige Mutationen verursacht werden. Weitere MCADD-Fälle unter diesen SIDS-Opfern könnte es aber nur geben, wenn ein homozygoter Status einer sehr seltenen Mutation oder ein Compound-Heterozygotenstatus von zwei sehr seltenen Mutationen vorläge. Dies ist jedoch so extrem unwahrscheinlich, dass man das Risiko vernachlässigen kann. Als Resultat ist zu konstatieren, dass MCADD prinzipiell einen Beitrag zum SIDS-Problem leisten kann, aber die Bedeutung nicht sehr hoch ist. Allerdings muss man einschränken, dass die Aussage nur für Populationen gilt, in denen kein erweitertes Neugeborenen-Stoffwechsel-Screening stattgefunden hat. Das

trifft für die Proben, die hier untersucht worden sind, zu. In neuerer Zeit kann man davon ausgehen, dass dieses Screening in Deutschland flächendeckend stattfindet und demzufolge keine unerkannten MCADD-Patienten vorkommen. Die in unseren beiden Arbeiten erprobten Techniken haben sich als handhabbar und sicher erwiesen. Sie sind aber schon aus theoretischer Sicht nicht geeignet, alle Fälle von MCADD zu erfassen, weil sie nur auf die häufigen Mutationen ausgerichtet sind. Dieser Nachteil ließe sich zwar durch die Einführung anderer genomischer Methoden, wie zum Beispiel der DNA-Chip-Technologie mildern, aber nicht völlig beseitigen. Deshalb ist für das Neugeborenen-Screening tatsächlich die Tandem-Massenspektrometrie, die nach Auswirkungen der Mutationen und nicht nach den Mutationen selbst sucht, die Methode der Wahl. Für unsere Aufgabe, nämlich der Klärung einer wissenschaftlichen Frage, war die Verwendung der kombinierten PCR/Restriktionstechnik angemessen und erfolgreich. Für die Praxis ergibt sich, dass bei der Obduktion und Nachuntersuchung von SIDS-Fällen der Frage nachgegangen werden sollte, ob das Kind ordnungsgemäß vom Neugeborenen-Stoffwechsel-Screening erfasst wurde und ob alle Befunde hinsichtlich MCADD und weiterer Stoffwechselstörungen unverdächtig waren. Diese Frage ist aufgrund der hohen Zahl von Kindern aus Familien mit Migrationshintergrund und bei wieder steigender Zahl von Hausgeburten relevant. Unter diesen Bedingungen ist es nicht notwendig, in den rechtsmedizinischen Instituten Methoden, wie sie hier angewandt worden sind, vorzuhalten.

## ZUSAMMENFASSUNG

Es wird angenommen, dass Organoazidämien und Fettsäureoxidationsdefekte die häufigsten lebensbedrohlichen angeborenen Stoffwechselstörungen sind. Ihre Häufigkeit, hohe Mortalität und Morbidität, verbunden mit der guten Behandelbarkeit machen sie zu guten Kandidaten für das erweiterte Neugeborenen-Screening [50]. Der Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel ist die häufigste Fettstoffwechselstörung. Gelangt ein nicht-diagnostizierter Patient in eine katabole Stoffwechsellage so kann sich dies in einer hypoketotischen Hypoglykämie, Hepatomegalie, Erbrechen und muskulären Hypotonie äußern. Über Apathie und Koma kann ein solches Ereignis bis hin zum Tode führen [17, 61, 97]. Es ist denkbar, dass ein durch MCADD verursachter Todesfall vor der Einführung des erweiterten Neugeborenen-Stoffwechsel-Screening ohne entsprechende Diagnostik als SIDS-Fall fehlgedeutet werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach einem möglichen MCADD-SIDS-Zusammenhang gesucht und weiterhin im Speziellen geprüft, welche Rolle die Mutationen 799G>A, 244-245 insert T und 157C>T in einer definierten SIDS-Gruppe spielen. Hierzu wurden Autopsieproben von verstorbenen Säuglingen, die in einer deutschlandweiten Studie als SIDS-Fälle eingeordnet worden waren, auf oben genannte Mutationen untersucht. Diese Aufgabe wurde durch ein Mutationsscreening erfüllt, in dem PCR-Produkte einzelner Exons mit Restriktionsenzymen gespalten wurden. Welche MCADD-Mutationen in unserer Population relativ häufig vorkommen, hat meine Kollegin Yvonne Rosentreter untersucht [115]. Mit Unterstützung von Frau Nennstiel Ratzel (Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit) wurde eine Mutationstypisierung bei 78 MCADD-Patienten aus unserer Region vorgenommen. Die Mutationen und ihre Häufigkeiten können wie folgt angegeben werden: 985A>G (82,69 %), 157C>T (3,2 %), 799G>A (3,2 %), 244-245 insert T (3,2 %), diverse andere erkannte Mutationen (5 %) sowie diverse andere unerkannte Mutationen (3 %). Danach kann man errechnen, dass in dem Patientengut unserer Region etwa 99 % aller MCADD-Patienten die Mutationen 985A>G, 157C>T, 799G>A und 244-245 insert T in homozygoter oder compound-heterozygoter Form tragen.

Das Screening auf 985A>G war Gegenstand der Dissertation meiner Kollegin Yvonne Rosentreter. Die Entwicklung von Tests auf 157C>T, 799G>A und 244-245 insert T und deren Anwendung an Proben von 405 SIDS-Opfern war Aufgabe dieser Arbeit.

Frau Rosentreter fand unter den 405 SIDS-Opfern einen für die Mutation 985A>G homozygoten Fall [115]. Bei der Suche nach den selteneren Mutationen 799G>A, 244-245 insert T und 157C>T in gleichem Obduktionsgut wurde ich nicht fündig.

Vor der Einführung der MCADD-Erkrankung ins erweiterte Neugeborenen-Screening lag der geschätzte Anteil dieser Stoffwechselstörung am Plötzlichen Kindstod Syndrom bei 3-6 % [18]. Seit 1999/2000 beinhaltet das erweiterte Neugeborenen-Screening der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg die MCAD-Mangel-Erkrankung. Zusammenfassend kann man festhalten, dass MCADD ein Beitrag zum SIDS-Problem leisten kann, die Bedeutung jedoch nicht sehr hoch ist. Die MS/MS ist für das MCADD-Screening mit seiner hohen Sensitivität, Spezifität sowie Kapazität sicherlich die Methode der Wahl [83, 89]. Die hier verwendete PCR/Restriktionstechnik war für unsere Fragestellung eine geeignete Methode, sie dient jedoch nicht dem Screening großer Populationen. Das post mortale metabolische Screening behält trotz der Einführung des erweiterten Stoffwechsel-Screenings einen wichtigen Stellenwert.

# LITERATURVERZEICHNIS

## Bücher und Zeitschriften

1. Abdenur, J.E., Chamoles, N.A., Schenone, A.B., Jorge, L., Guinle, A., Bernard, C., Levandovskiy, V., Fusta, M., Levorgna, S.: Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD): Use of acylcarnitines and fatty acids to monitor the response to dietary treatment. *Pediatr. Res.* 50. 61-66 (2001)
2. Andresen, B.S., Bross, P., Udvari, S., Kirk, J., Gray, G., Kmoch, S., Chamoles, N., Knudsen, I., Winter, V., Wilcken, B., Yokota, I., Hart, K., Packman, S., Harpey, J.P., Saudubray, J.M., Hale, D.E., Bolund, L., Kolvraa, S., Gregersen, N.: The molecular basis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in compound heterozygous patients: is there correlation between genotype and phenotype? *Mol. Hum. Genet.* 6/5. 695-707 (1997)
3. Andresen, B.S., Dobrowolski, S.F., O'Reilly, L., Muenzer, J., McCandless, S.E., Franzier, D.M., Udvari, S., Bross, P., Knudsen, I., Banas, R., Chace, D.H., Engel, P., Naylor, E.W., Gregersen, N.: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase mutations identified by MS/MS-based prospective screening of newborns differ from those observed in patients with clinical symptoms: Identification and characterization of a new, prevalent mutation that results in mild MCAD deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 68. 1408-1418 (2001)
4. Andresen, B.S., Kolvra, S., Bross, P., Bolund, L., Curtis, D., Eiberg, H., Zhang, Z., Kelly, D.P., Strauss, A.W., Gregersen, N.: A silent A to G mutation in exon 11 of the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene. *Hum. Mol. Genet.* 2/4. 488 (1993)
5. Arnestad, M., Crotti, L., Rognum, T.O., Insolia, R., Pedrazzini, M., Ferrandi, C., Vege, A., Wang, D.W., Rhodes, T.E., George, A.L., Schwartz, P.J.: Prevalence of Long-QT Syndrome Gene Variants in Sudden Infant Death Syndrome. *Circulation.* 115. 361-367 (2007)
6. Bajanowski, T., Poets, C.: Der plötzliche Säuglingstod. *Deutsches Ärzteblatt* Jg.101, Heft 47 (2004)
7. Bennett, M. J., Boriack, R. L., Narayan, S., Rutledge, S. L., Raff, M. L.: Novel mutations in CPT1A define molecular heterogeneity of hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 82. 59-63 (2004)

8. Bennett, M.J., Bhala, A., Poirier, S.F., Ragni, M.C., Willi, S.M., Hale, D.E.: When Do Gut Flora in the Newborn Produce 3-Phenylproprionic Acid? Implications for Early Diagnosis of Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Clin. Chem.* 38/2. 278-281 (1992)
9. Bergman, A.B.: Studying sudden infant death syndrome in a developing country. *J. Pediatr.* 82. 4-5 (2006)
10. Blair, P.S., Platt, M.W., Smith, I.J., Fleming, P.J., CESDI SUDI Research Group.: Sudden Infant Death Syndrome and the time of death: factors associated with night-time and day-time deaths. *Int. J. Epidemiol.* 35. 1563-1569 (2006)
11. Bodman, M., Smith, D., Nyhan, W.L., Naviaux, R.K.: Medium-Chain Acyl Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency/Occurrence in an Infant and His Father. *Arch. Neurol.* 58. 811-814 (2001)
12. Bok, L.A., Vreken, P., Wijburg, F.A., Wanders, R.J.A., Gregersen, N., Corydon, M.J., Waterham, H.R., Duran, M.: Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Studies in a Large Family Adding to the Complexity of the Disorder. *Pediatrics* 112. 1152-1155 (2003)
13. Bonnet, D., Martin, D., de Lonlay, P., Villain, E., Jouvret, P., Rabier, D., Brivet, M., Saudubray, J.-M.: Arrhythmias and Conduction Defects as Presenting Symptoms of Fatty Acid Oxidation Disorders in Children. *Circulation* 100. 2248-2253 (1999)
14. Brackett, J.C., Sims, H.F., Steiner, R.D., Nunge, M., Zimmermann, E.M., de Martinville, B., Rinaldo, P., Slauch, R., Strauss, A.W.: A Novel Mutation in Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Causes Sudden Neonatal Death. *J. Clin. Invest.* 94. 1477-1483 (1994)
15. Browning, M.F., Levy, H.L., Wilkins-Haug, L.E., Larson, C., Shih, V.E.: Fetal Fatty Acid Oxidation Defects and Maternal Liver Disease in Pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 107. 115-20 (2006)
16. Brucknervova, I., Bzduch, V., Behulova, D., Ferianec, V., Dubovicky, M., Ujhazy, E., Mach, M.: Reversible asphyxial status in a newborn due to neonatal form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 29(5). 627-630 (2008)
17. Carpenter, K., Wiley, V., Sim, K.G., Heath, D., Wilcken, B.: Evaluation of newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 275000 babies. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.* 8. F105-F109 (2001)

18. Chace, D.H., DiPerna, J.C., Mitchell, B.L., Sgroi, B., Hofman, L.F., Naylor, E.W.: Electrospray Tandem Mass Spectrometry for Analysis of Acylcarnitines in Dried Postmortem Blood Specimens Collected at Autopsy from Infants with Unexplained Cause of Death. *Clin. Chem.* 47/7. 1166-1182 (2001)
19. Coates, P.M., Tanaka, K.: Molecular basis of mitochondrial fatty acid oxidation defects. *J. Lipid Res.* 33. 1099-1110 (1992)
20. de Vries, H.G., Niezen-Koning, K., Kliphuis, J.W., Smit, G.P.A., Scheffer, H., ten Kate, L.P.: Prevalence of carriers of the most common medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency mutation (G985A) in the Netherlands. *Hum. Genet.* 98. 1-2 (1996)
21. den Boer, M.E.J., Wanders, R.J.A., Morris, A.A.M., Ijlst, L., Heymans, H.S.A., Wijburg, F.A.: Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Clinical Presentation and Follow-Up of 50 Patients. *Pediatrics* 109. 99-104 (2002)
22. Derks, T.G.J., Reijngoud, D.-J., Waterham, H.R., Gerver, W.J.-M., van der Berg, M.P., Sauer, P.J.J., Smit, G.P.A.: The natural history of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the Netherlands: clinical presentation and outcome. *J. Pediatr.* 148. 665-670 (2006)
23. Derks, T.G.J., van Spronsen, F.J., Rake, J.P., van der Hilst, C.S., Span, M.M., Smit, G.P.A.: Safe and unsafe duration of fasting for children with MCAD deficiency. *Eur. J. Pediatr.* (2006)
24. Ding, J.-H., Yang, B.-Z., Bao, Y., Roe, C.R., Chen, Y.-T.: Identification of a New Mutation in Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 50. 229-233 (1992)
25. Feillet, F., Steinmann, G., Vianey-Saban, C., de Chillou, C., Sadoul, N., Lefebvre, E., Vidailhet, M., Bollaert, P.E.: Adult presentation of MCAD deficiency revealed by coma and severe arrhythmias. *Intensive Care Med.* 1-7 (2003)
26. Fleming, P.J., Blair, P.S., Pollard, K., Platt, M.W., Leach, C., Smith, I., Berry, P.J., Golding, J. and CESDI SUDI Research Team.: Pacifier use and sudden infant death syndrome: results from the CESDI/SUDI case control study. *Arch. Dis. Child.* 81. 112-116 (1999)

27. Gassen, H. G., Schrimpf, G.: *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. MZB: 0308-371
28. Geib, L.T.C., Nunes, M.L.: The incidence of sudden death syndrome in a cohort of infants. *J. Pediatr. (Rio J).* 82(1). 21-6 (2006)
29. Gregersen, N., Winter, V., Lyonnet, S., Saudubray, J.-M., Wendel, U., Jensen, T.G., Andresen, B.S., Kolvraa, S., Lehnert, W., Bolund, L., Christensen, E., Bross, P.: Molecular genetic characterization and urinary excretion pattern of metabolites in two families with MCAD deficiency due to compound heterozygosity with a 13 base pair insertion in one allele. *J. Inher. Metab. Dis.* 17. 169-184 (1994)
30. Grosse, S.D., Khoury, M.J., Greene, C.L., Crider, K.S., Pollitt, R.J.: The epidemiology of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: An update. *Genet. Med.* 8(4). 205-212 (2006)
31. Grunske, A., Erler, T.: Scheinbar lebensbedrohliche Ereignisse im Säuglingsalter. ALTE: apparent life-threatening events. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 151. 520-526 (2003)
32. Guntheroth, W.G., Spiers, P.S.: The Triple Risk Hypotheses in Sudden Infant Death Syndrome. *Pediatrics* 110/5. 1-6 (2002)
33. Haas, M., Chaplin, M., Joy, P., Wiley, V., Black, C., Wilcken, B.: Healthcare Use and Costs of Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Australia: Screening Versus No Screening. *J. Pediatr.* 151. 121-6 (2007)
34. Hahn, J.: *Der plötzliche Kindstod/ Sudden infant death syndrom.* Shaker Verlag. MZB:0810-069
35. Hauck, F.R., Omojokun, O.O., Siadaty, M.S.: Do Pacifiers Reduce the Risk of Sudden Infant Death Syndrome? A Meta-analysis. *Pediatrics* 116. e716-e723 (2005)
36. Heininger, U., Kleemann, W.J., Cherry, J.D., SIDS Study Group.: A controlled Study of the Relationship Between Bordatella pertussis Infection and Sudden Unexpected Deaths Among German infants. *Pediatrics* 114/1. 9-15 (2004)
37. Hoffmann, G.F., von Kries, R., Klose, D., Lindner, M., Schulze, A., Muntau, A.C., Röschinger, W., Liebl, B., Mayatepek, E., Roscher, A.A.: Frequencies of inherited

- organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur. J. Pediatr.* 163. 76-80 (2004)
38. Holton, J.B., Allen, J.T., Green, C.A., Partington, S., Gilbert, R.E., Berry, P.J.: Inherited metabolic diseases in sudden infant death syndrome. *Arch. Dis. Child.* 66. 1315-1317 (1991)
  39. Howat, A.J., Bennett, M. J., Variend, S., Shaw, L., Engel, P.C.: Defects of metabolism of fatty acids in the sudden infant death syndrome. *Br. Med. J.* 290. 1771-1773 (1985)
  40. Howat, A.J., Bennett, M.J., Variend, S., Shaw, L.: Deficiency of medium-chain fatty acylcoenzyme A dehydrogenase presenting as the sudden infant death syndrom. *BMJ* 288. 976 (1984)
  41. Hunt, C.E., Hauck, F.R.: Sudden infant death syndrome. *CMAJ* 174(13). 1861-9 (2006)
  42. Ibdah, J.A., Yang, Z., Bennett, M.J.: Liver Disease in Pregnancy and Fetal Fatty Acid Oxidation Defects. *Mol. Genet. Metab.* 71. 182-189 (2000)
  43. Insinga, R.P., Laessig, R.H., Hoffmann, G.L. Newborn screening with tandem mass spectrometry: Examining its cost-effectiveness in the Wisconsin newborn screening panel. *J. Pediatr.* (2002)141:524-531
  44. Isackson, P. J., Bennett, M. J., Lichter-Konecki, U., Willis, M., Nyhan, W. L., Sutton, V. R., Tein, I., Vladutiu, G. D.: CPT2 gene mutations resulting in lethal neonatal or severe infantile carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 94. 422-427 (2008)
  45. Jethva, R., Bennett, M.J., Vockley, J.: Mini-Review: Short-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 95(4). 195-200 (2008)
  46. Jorch, G., Fischer, D., Beyer, U.: Prävention des plötzlichen Säuglingstodes. *Monatschr. Kinderheilkd.* 151. 514-519 (2003)
  47. Kairamkonda, V., Dalzell, M., Losty, P.D., Davidson, C.: Perforated duodenal ulcer disclosing medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Arch. Dis. Child.* 88. 88-89 (2003)

48. Kelly, D.P., Kim, J.-J., Billadello, J.J., Hainline, B.E., Chu, T.W., Strauss, A.W.: Nucleotide sequence of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase mRNA and its expression in enzyme-deficiency human tissue. *Biochem.* 84. 4068-4072 (1987)
  
49. Kelly, D.P., Whelan, A.J., Ogden, M.L., Alpers, R., Zhang, Z., Bellus, G., Gregersen, N., Dorland, L., Strauss, A.W.: Molecular characterization of inherited medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87. 9236-9240 (1990)
  
50. Klose, D.A., Kölker, S., Heinrich, B., Prietsch, V., Mayatepek, E., von Kries, R., Hoffmann, G.F.: Incidence and short-term outcome of children with symptomatic presentation of organic acid and fatty acid oxidation disorders in Germany. *Pediatrics* 110. 1204-1211 (2002)
  
51. Knerr, I., Nennstiel-Ratzel, U., Röschinger, W., Maier, E.M., Baumkötter, J., von Kries, R.: Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel: eine klinisch bedeutsame Stoffwechselstörung. *Deutsches Ärzteblatt* Jg.102, Heft 38 (2005)
  
52. Korman, S. H., Waterham, H. R., Gutman, A., Jakobs, C., Wanders, R. J. A.: Novel metabolic and molecular findings in hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 86. 337-343 (2005)
  
53. Krous, H.F., Beckwith, J.B., Byard, R.W., Rognum, T.O., Bajanowski, T., Corey, T., Cutz, E., Hanzlick, R., Keens, T.G., Mitchell, E.A.: Sudden Infant death Syndrome and Unclassified Sudden Infant Deaths: A Definitional and Diagnostic Approach. *Pediatrics* 114. 234-238 (2004)
  
54. Kruse, K., Oehmichen, M.: Plötzlicher Säuglingstod. Hansisches Verlagskontor Lübeck
  
55. Kurz, R., Kenner, T., Poets, C. (Hrsg.): Der plötzliche Säuglingstod. Ein Ratgeber für Ärzte und Betroffene. Springer-Verlag Wien New York (2000) ISBN: 3-211-83170-3
  
56. Leach, C.E.A., Blair, P.S., Fleming, P.J., Smith, I.J., Platt, M.W., Berry, P.J., Golding, J., CESDI SUDI Research Group.: Epidemiology of SIDS and Explained Sudden Infant Deaths. *Pediatrics* 104 No. 4. 1-10 (1999)
  
57. Lee, R.S.Y., Lam, C.W., Lai, C.K., Yuen, Y.P., Chan, K.Y., Shek, C.C., Chan, A.Y.W., Chow, C.B.: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency in three neonates presenting with rapid deterioration and cardiac arrest. *Hong Kong Med. J.* 13/1. 66-68 (2007)

58. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M.: Biochemie. 3. Auflage. pp. 645-671. Springer. USA 2001.
59. Lehotay, D.C., LePage, J., Thompson, J.R., Rockman-Greenberg, C.: Blood acylcarnitine levels in normal newborns and heterozygotes for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: A relationship between genotype and biochemical phenotype? *J. Inherit. Metab. Dis.* 27. 81-88 (2004)
60. Liebl, B., Muntau, A.C., Fingerhut, R., Knerr I., Röschinger, W., Nennstiel-Ratzel, U., Olgemöller, B., Roscher, A.A.: Screening-Handbuch. Fachschrift zum Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechselstörungen und Endokrinopathien. SPS Publications. 2. Auflage (2002)
61. Lundemose, J.B., Kolvraa, S., Gregersen, N., Christensen, E., Gregersen, M.: Fatty acid oxidation disorders as primary cause of sudden and unexpected death in infants and young children: an investigation performed on cultured fibroblasts from 79 children who died aged between 0-4 years. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 50. 212-217 (1997)
62. Maldegem, B.T., Duran, M., Wanders, R.J.A., Niezen-Koning, K.E., Hogeveen, M., Ijlst, L., Waterham, H.R., Wijburg, F.A.: Clinical, Biochemical, and Genetic Heterogeneity in Short-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. *JAMA* 296. 943-952 (2006)
63. Mathur, A., Sims, H.F., Gopalakrishnan, D., Gibson, B., Rinaldo, P., Vockley, J., Hug, G., Strauss, A.W.: Molecular Heterogeneity in Very-Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency Causing Pediatric Cardiomyopathy and Sudden Death. *Circulation* 99. 1337-1343 (1999)
64. Moczulski, D., Majak, I., Mamczur, D.: *Postepy Hig. Med. Dosw.* 63. 266-277 (2009)
65. Mondal, R.K., Karmakar, B., Chandra, P.K., Sarkar, U.N.: Jervell-Lange Nielsen Syndrome in a Family with the Long QT Syndrome (LQTS). *Indian J. Pediatr.* 73. 623-626 (2006)
66. Muntau, A.: *Intensivkurs Pädiatrie.* 3. Aufl. pp. 101-102. Urban & Fischer. Deutschland 2004.
67. Nagan, N., Kruckeberg, K. E., Tauscher, A. L., Snow Baily, K., Rinaldo, P., Matern, D.: The frequency of short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene variants in the US

- population and correlation with the C<sub>4</sub>-acylcarnitine concentration in newborn blood spots. *Mol. Genet. Metab.* 78. 239-246 (2003)
68. Nelson, J., Lewis, B., Walters, B.: The HELLP syndrome associated with fetal medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23. 518-519 (2000)
69. Newton, C.R., Graham, A.: PCR. Spektrum Akademischer Verlag . MZB:0308-196
70. Nuoffer, J.M., Lonlay, P.de, Costa, C., Roe, C.R., Chamoles, N., Brivet, M., Saudubray, J.M.: Familial neonatal SIDS revealing carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 159. 82-85 (2000)
71. Opdal, S.H., Rognum, T.O.: The Sudden Infant Death Syndrome Gene: Does it exist? *Pediatrics* 114. 506-512 (2004)
72. Ostfeld, B.M., Perl, H., Esposito, L., Hempstead, K., Hinnen, R., Sandler, A., Goldblatt Pearson, P., Hegyi, T.: Sleep Environment, Positional, Lifestyle, and Demographic Characteristics Associated With Bed Sharing in Sudden Infant Death Syndrome Cases: A Population-Based Study. *Pediatrics* 118, No.5. 2051-2059 (2006)
73. Piermont, M.E.M., Breningstall, G.N., Stanley, C.A., Singh, A.: Familial carnitine transporter defect: A treatable cause of cardiomyopathy in children. *Am. Heart J.* 139. 96-106 (2000)
74. Platt, M.W., Blair, P.S., Fleming, P.J., Smith, I.J., Cole, T.J., Leach, C.E.A., Berry, P.J., Golding, J. and the CESDI SUDI Research Group.: A clinical comparison of SIDS and explained sudden infant deaths: how healthy and how normal? *Arch. Dis. Child.* 82. 98-106 (2000)
75. Poets, C.F., Urschitz, M.S., von Bodman, A.: Pathophysiologische Erklärungsmodelle zum plötzlichen Säuglingstod. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 151. 504-509 (2003)
76. Pollitt, R.J., Leonard, J.V.: Prospective surveillance study of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the UK. *Arch. Dis. Child.* 79. 116-119 (1998)
77. Püst, B., Berger, A., Lehnert, W., Wanders, R.J.A., Gocht, A., Hennenberger, A.: Erstmanifestation eines Abbaufektes überlangkettiger Fettsäuren (VLCADD) mit letalem Ausgang. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 146. 484-486 (1998)

78. Rashed, M.S., Ozand, P.T., Bennett, M.J., Barnard, J.J., Govindaraju, D.R., Rinaldo, P.: Inborn Errors of Metabolism Diagnosed in Sudden Death Cases by Acylcarnitine Analysis of Postmortem Bile. *Clin. Chem.* 41/8. 1109-1114 (1995)
79. Rhead, W.J.: Newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: A global perspective. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29. 370-377 (2006)
80. Romppanen, E.-L., Mononen, T., Mononen, I.: Molecular diagnosis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency by oligonucleotid ligation assay. *Clin. Chem.* 44:1. 68-71 (1998)
81. Roscher, A.A., Fingerhut, R., Liebl, B., Olgemöller, B.: Erweiterung des Neugeborenen Screenings durch Tandemmassenspektrometrie. *Monatschr. Kinderheilkd.* 149. 1297-1303 (2001)
82. Schellscheidt, J., Franz, C., Löser, H., Jorch, G.: QT-Syndrom und plötzlicher Säuglingstod. *Monatschr. Kinderheilkd.* 146. 13-16 (1998)
83. Schulze, A., Lindner, M., Kohlmüller, D., Olgemöller, K., Mayatepek, E., Hoffmann, G.F.: Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications. *Pediatrics* 111. 1399-1406 (2003)
84. Semba, S., Yasujima, H., Takano, T., Yokozaki, H.: Autopsy case of the neonatal form of carnitine palmitoyltransferase-II deficiency triggered by a novel disease-causing mutation del1737C. *Pathol. Int.* 58. 436-441 (2008)
85. Sigauke, E., Rakheja, D., Kitson, K., Bennett, M.J.: Carnitine Palmitoyltransferase II Deficiency: A Clinical, Biochemical, and Molecular Review. *Lab. Invest.* 83. 1543-1554 (2003)
86. Strauss, A.W., Powell, C.K., Hale, D.E., Anderson, M.M., Ahuja, A., Brackett, J.C., Sims, H.F.: Molecular basis of human mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing cardiomyopathy and sudden death in childhood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92. 10496-10500 (1995)
87. Takken, T., Custers, J.W.H., Visser, G., Dorland, L., Helders, P.M.J., de Koning, T.J.: Prolonged exercise testing in two children with a mild Multiple Acyl-CoA-Dehydrogenase deficiency. *Nutr. Metab.* 2. 12 (2005)

88. Thomason, M.J., Lord, J., Bain, M.D., Chalmers, R.A., Littlejohns, P., Addison, G.M., Wilcox, A.H., Seymour, C.A.: A systematic review of evidence for the appropriateness of neonatal screening programmes for inborn errors of metabolism. *J. Public Health Med.* 20/3. 331-343 (1998)
89. Van der Hilst, C.S., Derk, T.G.J, Reijngoud, D.-J., Smit, G.P.A., TenVergert, E.M.: Cost-Effectiveness of Neonatal Screening for Medium Chain acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: The Homogeneous Population of the Netherlands. *J. Pediatr.* 151. 115-20 (2007)
90. Van Hove, J.L.K., Zhang, W., Kahler, S.G., Roe, C.R., Chen, Y.-T., Terada, N., Chace, D.H., Iafolla, A.K., Ding, J.-H., Millington, D.S.: Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency: Diagnosis by Acylcarnitine Analysis in Blood. *Am. J. Hum. Genet.* 52. 985-966 (1993)
91. Venditti, L.N., Venditti, C.P., Berry, G.T., Kaplan, P.B., Kaye, E.M., Glick, H., Stanley, C.A. Newborn screening by tandem mass spectrometry for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: A cost-effectiveness analysis. *Pediatrics* (2003); 112:1005-1015
92. Vennemann, M., Bajanowski, T., Butterfaß-Bahloul, T., Sauerland, C., Jorch, G., Brinkmann, B., Mitchell, E.A.: Do risk factors differ between explained sudden unexpected death in infancy and sudden infant death syndrome? *Arch. Dis. Child.* 92. 133-136 (2007)
93. Vennemann, M., Fischer, D., Findeisen, M.: Kindstodinzidenz im internationalen Vergleich. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 151. 510-513 (2003)
94. Vockley, J., Whiteman, D. A. H.: Defects of mitochondrial  $\beta$ -oxidation: a growing group of disorders. *Neuromuscul. Disord.* 235-246 (2002)
95. Waddell, L., Wiley, V., Carpenter, K., Bennetts, B., Angel, L., Andresen, B.S., Wilcken, B.: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: Genotype-biochemical phenotype correlations. *Mol. Genet. Metab.* 87. 32-39 (2006)
96. Waisbren, S. E., Levy, H. L., Noble, M., Matern, D., Gregersen, N., Pasley, K., Marsden, D.: Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency: An examination of the medical and neurodevelopmental characteristics of 14 cases identified through newborn screening or clinical symptoms. *Mol. Genet. Metab.* 95. 39-45 (2008)

97. Wang, S.S, Fernhoff, P.M., Hannon, W.H., Khoury, M.J.: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: Human genome epidemiology review. *Genet. Med.* 1(7). 332-339 (1999)
98. Wang, S.Y., Kannan, S., Shay, D., Segal, S., Datta, S., Tsen, L.: Anaesthetic Considerations for a Patient with Compound Heterozygous Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Anaesth. Analg.* 2002; 94:1595-7
99. Weber, M.A., Klein, N.J., Hartley, J.C., Lock, P.E., Malone, M., Sebire, N.J.: Infection and sudden unexpected death in infancy: a systematic retrospective case review. *Lancet* 371. 1848-53 (2008)
100. Wendel, U., Lindner, M., Bettendorf, M.: Neugeborenen-Screening in Deutschland. Positiver Screeningbefund – Was ist zu tun? Milupa/Schattauer (2009) ISBN 978-3-79452686-4
101. Weese-Mayer, D.E., Berry-Kravis, E.M., Ceccherini, I., Rand, C.M.: Congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) and sudden infant death syndrome (SIDS): Kindred disorders of automatic regulation. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 164. 38-48 (2008)
102. Wilcken, B., Carpenter, K.H., Hammond, J.: Neonatal symptoms in medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Arch. Dis. Child.* 69. 292-294 (1993)
103. Wilcken, B., Hammond, J., Silink, M.: Morbidity and mortality in medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Arch. Dis. Child.* 70. 410-412 (1994)
104. Wilcox, R.L., Nelson, C.C., Stenzel, P., Steiner, R.D.: Postmortem screening for fatty acid oxidation disorders by analysis of Guthrie cards with tandem mass spectrometry in sudden unexpected death in infancy. *J. Pediatr.* 141. 833-836 (2002)
105. Wildhaber, J.H., Moeller, A.: Sleep and respiration in children: time to wake up! *SWISS WKLY* 137. 689-694 (2007)
106. Wilson, C.J., Champion, M.P., Collins, J.E., Clayton, P.T., Leonard, J.V.: Outcome of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency after diagnosis. *Arch. Dis. Child.* 80. 459-462 (1999)

107. Yokota, I., Coates, P.M., Hale, D.E., Rinaldo, P., Tanaka, K.: Molecular survey of a prevalent mutation <sup>985</sup> A-to-G transition, and identification of five infrequent mutations in the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene in 55 patients with MCAD deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 49. 1280-1291 (1991)
108. Yokota, I., Indo, Y., Coates, P.M., Tanaka, K.: Molecular Basis of Medium Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. An A to G Transition at Position 985 That Causes a Lysine-304 to Glutamat Substitution in the Mature Protein is the Single Prevalent Mutation. *J. Clin. Invest.* 86. 1000-1003 (1990)
109. Zschocke, J., Schulze, A., Lindner, M., Fiesel, S., Olgemöller, K., Hoffmann, G.F., Penzien, J., Rüter, J.P.N., Wanders, R.J.A., Mayatepek, E.: Molecular and functional characterisation of mild MCAD deficiency. *Hum. Genet.* 108. 404-408 (2001)
110. Pati, N., Schowinsky, V., Kokanovic, O., Magnuson, V., Ghosh, S.: A comparison between SNaPshot, pyrosequencing, and biplex invader SNP genotyping methods: accuracy, cost, and throughput. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 60 (1). 1-12 (2004)

### **Internet**

111. Genetic Home Reference. ACADM. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=acadm>
112. OMIM: 607008 Acyl- CoA dehydrogenase, medium-chain, ACADM. [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez)
113. [www.sciencedirekt.com/science](http://www.sciencedirekt.com/science)
114. [www.luminexcorp.com/cf](http://www.luminexcorp.com/cf)

### **Dissertationen**

115. Rosentreter, Y.: Molekulare Untersuchungen zum Medium Chain Acyl CoA Dehydrogenase Mangel und seine Bedeutung als Risikofaktor für den plötzlichen Säuglingstod (SIDS). Magdeburg (2006)

## **Verzeichnung der wissenschaftlichen Veröffentlichungen**

Krause, D., Jachau, K., Mohnike, K., Nennstiel-Ratzel, U., Busch, U., Rosentreter, Y., Sorychta, J., Starke, I., Sander, J., Vennemann, M., Bajanowski, T., Szibor, R.: Mutation typing in patients with Medium Chain Acyl CoA dehydrogenase deficiency (MCADD) and PCR-based Mutation screening in SIDS victims. Elsevier (2005) / International Congress Series 1288. 682-684 (2006)

# DANKSAGUNG

*Mein Dank gilt all denjenigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!*

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Szibor für die Überlassung des Themas, die immer freundliche und geduldige Unterstützung während meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. med. Bajanowski danke ich für die Bereitstellung von Lebern der BMBF-Studie.

Ich danke Frau Dr. med. Nennstiel-Ratzel für die Sequenzierung von DNA-Proben.

Herrn Prof. Dr. med. Sander und Herrn Prof. Dr. med. Mohnike danke ich für die Bereitstellung der Proben von MCADD-Kindern aus Niedersachsen und Sachsen-Anhalt.

Frau Starke danke ich für die MS/MS-Untersuchungen der Blutflekkarten von 78 Kindern mit MCAD-Mangel aus Niedersachsen und Sachsen-Anhalt.

Besonderer Dank gilt auch Frau Ines Plate für Einarbeitung ins molekularbiologische Arbeiten sowie Frau Lachmann und Frau Muchow.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dieter Krause für die Durchführung dieser Arbeit an dem Institut für Rechtsmedizin der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg.

Meinen Eltern danke ich sehr für Ihre moralische Unterstützung und für seine entgegengebrachte Geduld danke ich meinem Freund Joachim.

*Vielen Dank!*

# SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Mutationscreening im Gen für die Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase unter 405 am SIDS verstorbenen Säuglingen

im Institut für Rechtsmedizin

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. habil. Szibor

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Braunschweig, den 6.12.2010

Unterschrift

# **BILDUNGSWEG**

## **Schulbildung**

1988-1993 Karl-Marx Grundschule Gardelegen

1993-2000 Geschwister Scholl Gymnasium Gardelegen

## **Hochschulstudium**

10/00-04/08 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

## ***Examina***

04/04 Ärztliche Vorprüfung („Physikum“): Note 2,6

04/08 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: Note 2,5

## ***Praktisches Jahr***

ab 02/07 Gynäkologie, St. Salvador Krankenhaus, Halberstadt

06/07 Chirurgie, Notfallzentren der Hirslanden-Kliniken, Salem-Spital, Bern

10/07 Innere Medizin, Johanniter Krankenhaus Stendal-Genthin

## **Facharztweiterbildung**

Seit 10/08 Facharztweiterbildung Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Städtischen Klinikum in Braunschweig

Unterschrift

