

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Großhadern, der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

Erstmalig charakterisierte Mutation im Glycerinkinase Gen eines männlichen Patienten mit
Hyperglycerinämie

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Thomas Wibmer

aus

Augsburg

2002

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. K. G. Parhofer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. A. Siess

Prof. Dr. U. Gresser

Prof. Dr. A. K. Walli

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. C. Otto

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2003

ERSTMALIG CHARAKTERISIERTE MUTATION IM GLYCERINKINASE GEN EINES MÄNNLICHEN PATIENTEN MIT HYPERGLYCERINÄMIE

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	2
1. EINFÜHRUNG	4
1.1. DER GLYCERINKINASE MANGEL	4
1.2. BISHER BEKANNTE MUTATIONEN.....	6
1.3. DIE ROLLE DER GLYCERINKINASE IM STOFFWECHSEL	7
1.4. DAS GLYCERINKINASE-GEN	9
1.5. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	14
2. PATIENTEN UND METHODEN	16
2.1. PATIENTEN	16
2.2. KLINISCHE BEFUNDE.....	16
2.3. DURCHGEFÜHRTE UNTERSUCHUNGEN	20
2.4. DNA-PREPARATION.....	21
2.5. PCR	22
2.6. MANUELLE SEQUENZIERUNG	27
3. ERGEBNISSE	32
3.1. SEQUENZIERUNG DER DNA DER TOCHTER	32
3.2. SEQUENZIERUNG DER DNA DER EHEFRAU	32
3.3. SEQUENZIERUNG DER DNA DES SOHNES DER TOCHTER.....	33
3.4. SEQUENZIERUNG DER DNA DES PATIENTEN.....	33
3.5. AKTIVITÄTSMESSUNG DER GLYCERINKINASE	33
3.6. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	34
3.7. DETAILS ZU ALLEN EXONS IM EINZELNEN	36
4. DISKUSSION	56
4.1. DIE NEU CHARAKTERISIERTE MUTATION G280A.....	56
4.2. AUSWIRKUNGEN DER MUTATIONEN AUF DIE SYMPTOMATIK	69
4.3. DIAGNOSTIK DES GLYCERINKINASEMANGELS.....	73
5. ZUSAMMENFASSUNG	76
6. LITERATURVERZEICHNIS	77
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	82
8. LEBENS LAUF	83
9. DANKSAGUNG	84

Abkürzungsverzeichnis

[α - ³⁵ S]dATP α S	Mit dem radioaktiven ³⁵ S Schwefelisotop markiertes dATP
ABCR	ATP-binding cassette transporter retina
ADP	Adenosindiphosphat
AHC	Congenital adrenal hypoplasia, angeborene Nebennierenhypoplasie
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATP7b	P-Typ-ATPase
B&W	binding and wash
CGD	Chronic Granulomatous diseases (septische Granulomatosen)
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
ddATP	Didesoxyadenosin-Triphosphat
ddCTP	Didesoxycytidin-Triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMD	Duchenne muscular dystrophy, Muskeldystrophie Duchenne
DNA	Desoxyribose nucleic acid
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G-3-P	Glycerin-3-Phosphat
GALC	Galaktozerebrosid-Betagalaktosidase
GK	Glycerinkinase
GKD	Glycerol kinase deficiency (engl. Glycerinkinasemangel)
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
GTPCH	GTP cyclohydrolase I
His	Histidin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Met	Methionin
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PGK	Phosphoglyceratkinase
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
PS-1	Presenilin-1
RP	retinitis pigmentosa
Ser	Serin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

1. Einführung

1.1. Der Glycerinkinase Mangel

Glycerinkinasemangel (engl. glycerol kinase deficiency, GKD) ist eine X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Dabei unterscheidet man mehrere Formen:

Die alte Einteilung (Ginns et al. 1984) erfolgt in

- Infantile Form (Kombinationen aus kongenitaler adrenaler Hypoplasie (AHC), Muskeldystrophie Duchenne (DMD), Glycerinkinasemangel)
- Juvenile Form (isolierter Glycerinkinasemangel)
- Adulte, benigne Form (isolierter Glycerinkinasemangel ohne Symptome)

während die gebräuchliche neue Einteilung (Balducci et al. 1995) unterscheidet zwischen:

- isolierte Form (isolierter Glycerinkinasemangel)
- komplexe Form (GKD, AHC, DMD)

Die alte Einteilung basierte auf der Beobachtung, daß Patienten mit komplexer GKD schwerwiegendere Symptome haben als Patienten mit isolierter Form und daher meist bereits im Kindesalter auffällig werden.

Die isolierte Form der GKD wird verursacht durch eine Deletion, Insertion oder Mutation im Gen der Glycerinkinase (Walker et al. 1996, Sjarif et al. 1998, Gaudet et al. 2000, Sargent et al. 2000, Zhang et al. 2000, Dipple et al. 2001). Dieses Enzym katalysiert normalerweise die Phosphorylierung freien Glycerins zu Glycerin-3-Phosphat, das weiter metabolisiert werden kann und auch bei der Lipidsynthese eine Rolle spielt. Die GK stellt somit ein Schlüsselenzym im Glycerinstoffwechsel dar (Gaudet et al. 2000).

Ein Aktivitätsverlust der Glycerinkinase führt zu einem erhöhten Glycerinspiegel im Blut (Hyperglycerinämie) sowie im Urin (Hyperglycerinurie).

Die klinischen Symptome sind sowohl bei Trägern verschiedener Mutation als auch bei Trägern derselben Mutation sehr variabel (Sargent 2000, Sjarif et al. 2000, Dipple et al 2001) und reichen von Symptombefreiheit über Erbrechen (Dipple et al. 2001), Hypoglykämien und Ketoazidose (Sjarif et al. 1998, Sargent et al. 2000, Dipple et al. 2001) bis zu geistiger und motorischer Retardierung (Walker et al. 1996, Sjarif et al. 1998, Dipple et al. 2001). Der Zusammenhang zwischen Symptomen und molekularer Grundlage ist dabei bis heute noch unklar (Dipple et al. 2001).

Die komplexe Form der GKD wird verursacht durch eine Deletion großer Bereiche des X-Chromosoms (XP21 contiguous gene deletion syndrome, Renier et al. 1983, Dunger et al. 1986, Schmickel 1986, Francke et al. 1987, Darras et Francke 1988, Davies et al. 1988, Matsumoto et al. 1988), was einen Verlust des Glycerinkinase Gens, verbunden mit teilweise oder völligem Verlust der Gene für Muskeldystrophie Duchenne (engl. Duchenne muscular dystrophy, DMD, Patil et al. 1985, Love et al. 1990) oder angeborene Nebennierenhypoplasie (engl. congenital adrenal hypoplasia, AHC, McCabe et al. 1977, 1983, Guggenheim et al. 1980, Bartley et al. 1982, Patil et al. 1985, Marlhens et al. 1987) zur Folge hat. Es sind auch Fälle bekannt, bei welchen alle drei Gene betroffen sind (Wieringa et al. 1985, Bartley et al. 1986, Saito et al. 1986).

Funktionsverluste der entsprechenden Gene erklären die ausgeprägten Symptome, darunter Dehydratation bei Salz-Verlust-Syndrom (Balducci et al. 1995, Peter et al. 1998), Schwäche (Ginns et al. 1984), Gedeihstörungen (Asghar et al. 1999), Gesichtsdysmorphien (Scheuerle et al. 1995) sowie geistige und motorische Retardierung (Bartley et al. 1982), die in einigen Fällen bereits bei Neugeborenen (Hammond et al. 1985) oder in den ersten Lebensmonaten (McCabe et al. 1977, Guggenheim et al. 1980, Borresen et al. 1987) zum Tod geführt haben.

Ist das AHC-Gen mitbetroffen, entwickeln die meisten Patienten bereits in den ersten Lebensmonaten Gedeihstörungen (Ginns et al. 1984), Salzverlustsyndrom (Balducci et al. 1995, Peter et al. 1998), hypoglykämische Krisen und Hyperpigmentation (Peter et al. 1998). Ein hypogonadotroper Hypogonadismus ist dabei eine häufige Begleiterscheinung (Goonewardna et al. 1987, Kaiserman et al. 1998).

Im Falle einer Beteiligung des DMD Gens sind die Patienten im Kleinkindesalter zunächst unauffällig und entwickeln ab dem lauffähigen Alter aufgrund der Funktionseinschränkung des Dystrophin Proteins eine zunehmende Schwächung der proximalen Skelettmuskulatur, was in der Regel im Alter von ca. 12 Jahren zur Gehunfähigkeit führt (Van Essen et al. 1997, Matsuo 1996). Die meisten dieser Patienten sterben im Alter zwischen 25-30 Jahren an Atem- oder Herzinsuffizienz. Klinisch kann diese Erkrankung von der Muskeldystrophie Duchenne nur dadurch unterschieden werden, daß die Symptome bei der GKD später einsetzen und schwächer ausgeprägt sind als bei Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne (Matsuo 1996).

1.2. Bisher bekannte Mutationen

Nach einer Übersicht von Sjarif et al. (2000) waren bis zum Jahr 2000 weltweit ca. 138 Fälle in 102 Familien mit GKD bekannt. Davon entfielen 38 Fälle in 24 Familien (davon 13 nicht-verwandte Familien) auf die isolierte Form und ca. 100 Fälle in 78 Familien auf die komplexe Form der GKD. Wohl ist die höhere Anzahl bekannter Fälle bei der komplexen Form nicht auf die höhere Häufigkeit sondern eher auf die größere Auffälligkeit der Patienten zurückzuführen.

Von den 100 bekannten Fällen mit komplexer GKD hatten 62 Patienten aus 53 Familien einen AHC-GKD-DMD Phänotyp, 24 Patienten aus 18 Familien einen AHC-GKD Phänotyp und 6 Patienten aus 2 Familien einen GKD-DMD Phänotyp. 8 Patienten aus 5 Familien hatten einen unklaren Phänotyp (Sjarif et al. 2000). 17 Patienten (AHC-GKD-DMD oder AHC-GKD

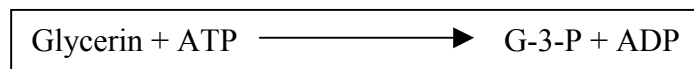
Phänotyp) verstarben bereits als Neugeborenes oder im frühen Kindesalter aufgrund nicht oder unzureichend behandelter Nebenniereninsuffizienz (Sjarif et al. 2000).

Die 38 bis zum Jahr 2000 bekannten Fälle isolierter GKD sind bis heute auf mindestens 46 angewachsen und traten in 20 nicht-verwandten Familien mit jeweils unterschiedlichen Mutationen auf. Darunter fanden sich bis heute 10 Missens-Mutationen, 2 Splice-Site Mutationen, 3 Nonsense Mutationen, eine Insertion und 2 kleine Deletionen.

1.3. Die Rolle der Glycerinkinase im Stoffwechsel

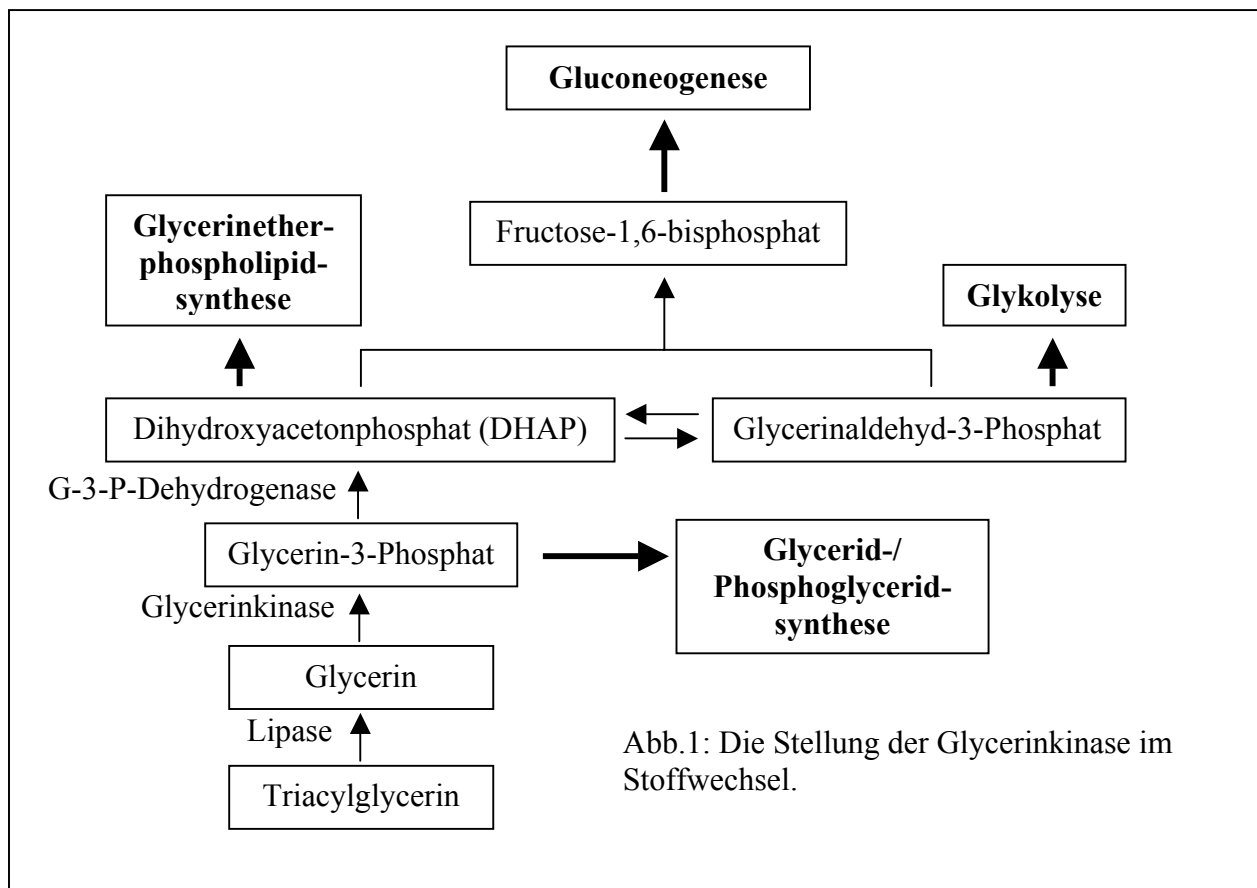
Die Glycerinkinase ist ein Enzym aus einer kleinen strukturverwandten Untergruppe der Kinasen, den sogenannten „Ambiquitous Enzymes“, die einerseits im Zytosol vorkommen und andererseits die Fähigkeit haben, reversibel an die äußere Mitochondrienmembran zu binden. Diese Bindung ist mit den spannungsabhängigen Anionenkanälen der Mitochondrienmembran assoziiert, was der Glycerinkinase direkten Zugriff auf ATP verschafft (Mahbubul Huq et al. 1997).

Glycerinkinase (ATP: Glycerin-3-Phosphotransferase, EC 2.7.1.30) katalysiert die Phosphorylierung von Glycerin und ATP in die Produkte Glycerin-3-Phosphat (G-3-P) und ADP.



Glycerin-3-Phosphat stellt ein Zwischenprodukt an der Schnittstelle zwischen Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel dar und spielt eine wichtige Rolle bei vielen Stoffwechselwegen wie z.B. Glycolyse, Gluconeogenese und Glycerolipidsynthese.

70-90% des entstehenden Glycerin-3-Phosphats werden durch die Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase zu Dihydroxyacetonphosphat dehydrogeniert, welches in die Gluconeogenese eingeht. Die restlichen 10-30% bilden Triglyceride, indem sie sich mit Acyl-CoA verbinden (Robergs und Griffin 1998).



Eine verminderte Verfügbarkeit von Glycerin-3-Phosphat könnte somit eine verminderte Gluconeogenese zur Folge haben.

Jedoch trägt Glycerin unter normaler Stoffwechsellage nur wenig zur gesamten Gluconeogenese der Leber bei. In langen Fastenperioden ist der Beitrag zur gesamten Gluconeogenese bei Erwachsenen aber immerhin ein Fünftel (Baba et al. 1995). Noch gibt es keine Erkenntnis über den Beitrag zur Gluconeogenese bei Kindern. Jedoch gibt es keine Hinweise, daß sich dieser von dem Erwachsener stark unterscheidet.

Einen weiteren Einfluß auf die Gluconeogenese stellt die durch den Defekt bedingte hohe Konzentration von Glycerin im Blut dar. In Vivo Versuche mit Ratten haben ergeben, daß Glycerin ein schwacher Inhibitor zweier Schlüsselenzyme der Gluconeogenese ist. Diese sind die Fructose-1,6-diphosphatase und Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (Wapnier und Stiel 1985). Glycerin könnte weiterhin die Glucose-Bildung aus Alanin verringern, eines der wichtigeren Gluconeogenese-Substrate (Jahoor et al. 1990).

Diese Einflußmöglichkeiten eines Glycerinkinase-Defekts könnten einige der Symptome der Patienten mit GKD erklären. So könnten sowohl hypoglykämische Krisen als auch Bewußtseinstäubung und Krampfanfälle auf eine unzureichende Gluconeogenese zurückzuführen sein. Auch Ketoazidosen könnten durch eine verringerte Gluconeogenese ausgelöst sein, jedoch sollte man auch eine mögliche Störung der Ketonkörperutilisation bedenken (Bonfont et al. 1990, Sjarif et al. 1998).

Im Tiermodell haben Mahbubul Huq et al. (1997) durch « targeted disruption » Glycerinkinase defiziente Mäuse erzeugt, von denen die männlichen bei Geburt noch unauffällig waren, jedoch in den folgenden Tagen Symptome wie Wachstumsverzögerung, gestörten Fettmetabolismus, Hyperglycerinämie, erhöhte freie Fettsäurekonzentrationen und eine autonome Glucocorticoid-Synthese zeigten. Während die männlichen Mäuse nach 3-4 Lebenstagen verstarben, waren heterozygote Weibchen gesund und biochemisch unauffällig.

1.4. Das Glycerinkinase-Gen

Das Glycerinkinase-Gen (Abb. 2) befindet sich im X-Chromosom an Position Xp21.3 und besteht aus 20 Exons (1-8, 9a, 9b, 10-19), welche in einem Bereich von ca. 50 KB liegen und durch Introns unterschiedlicher Länge getrennt sind (Guo et al. 1993, Walker et al. 1993, Sargent et al. 1994, Sjarif et al. 1998).

Abbildung 3 zeigt die DNA-Sequenz, deren 1659 bp für ein Protein mit 553 Aminosäuren kodieren.

Neben diesem funktionellen Gen existieren mindestens sechs Regionen im menschlichen Genom, die Sequenzen enthalten, die der Sequenz des Glycerinkinase-Gens an Position Xp 21.3 ähnlich sind (Sargent et al. 1994). Dabei handelt es sich um Pseudogene an Position 1q41 und Xq23, die exprimierten Gene an Position 4q13 und 4q32 und anonyme Sequenzen mit unbekanntem Status auf den Chromosomen 4 und Xq (Sjarif et al. 1998). Die Sequenzen an den Orten 1, 4 und Xq sind intronlos und sind auf Nukleotidebene zu jeweils 97%, 98% und 99,2% dem Glycerinkinase Gen an Position Xp 21.3 ähnlich (Sargent et al. 1994).

Anscheinend ist die Sequenz an Position Xp21.3 die einzige, die durch Introns unterbrochen wird (Sargent et al. 1994).

Wahrscheinlich codieren die Gene auf Chromosom 4 für ein aktives Enzym. Obwohl nur eine Ähnlichkeit von 98% besteht, sind alle Eigenschaften, die für eine katalytische Funktion bei Bakterien nötig sind, vorhanden (Sargent et al. 1994). Die Existenz separater, autosomaler, equivalenter Gene für Gene des X-Chromosoms ist bereits für andere Enzyme bekannt (PGK, E1alpha-Untereinheit des PDH Komplexes). Sie spielen wahrscheinlich im Hodengewebe eine Rolle, wo sie möglicherweise die Inaktivierung des X-Chromosoms vor der Meiose kompensieren (Sargent et al. 1994).

Chromosom

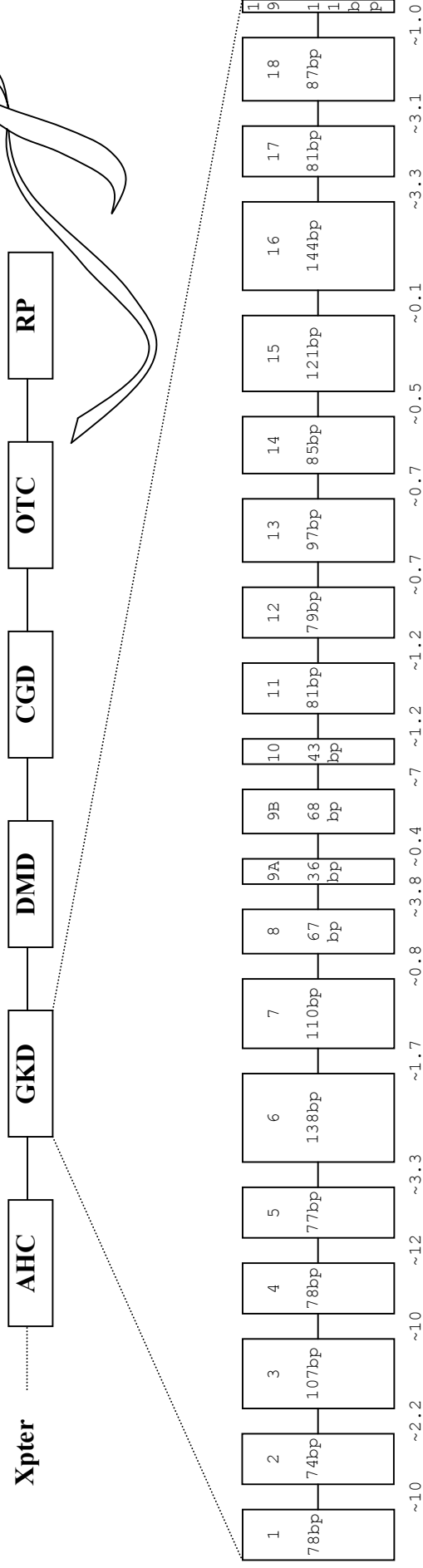
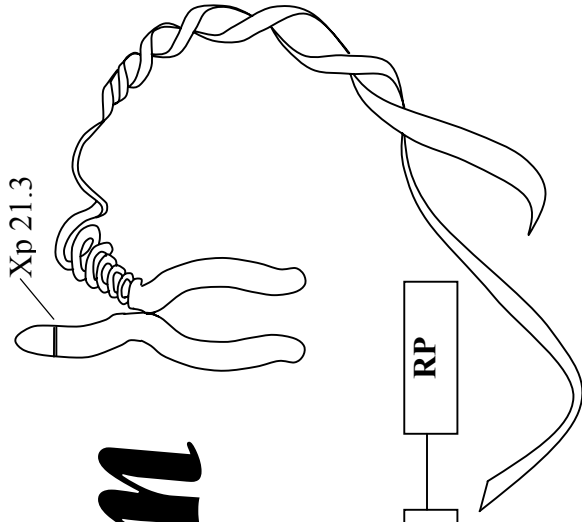


Abb. 2: Die Abbildung oben zeigt eine Schematische Darstellung des Bereichs um Xp21.3 mit dem Genort für den Glycerinkinase (GKD), in dem sich das Glycerinkinasegen befindet, umgeben von weiteren Genorten, insbesondere den beiden an der komplexen GKD beteiligten Orten für Angeborene Adrenale Hypoplasie (AHC) und Muskeldystrophie Duchenne (DMD).
 Im unteren Teil der Abbildung befindet sich eine Übersicht der 20 Exons der Glycerinkinase, versehen mit der Länge des Exons in Basenpaaren (Mitte) und Länge des jeweiligen Introns in Kilobasenpaaren (unten).

Abb. 3: DNA und Aminosäuresequenz der Glycerinkinase:

Exon1⇒
1 ATGGCAGCCTCAAAGAAGGCAGTTTTGGGGCCATTGGTGGGGCGGTGGACCAGGGCACC
M A A S K K A V L G P L V G A V D Q G T 20

Exon2⇒
61 AGTTCGACGCGCTTTTTGGTTTTCAATTCAAAAACAGCTGAACTACTTAGTCATCATCAA
S S T R F L V F N S K T A E L L S H H Q 40

Exon3⇒
121 GTAGAAATAAAACAAGAGTCCCAAGAGAAGGATGGGTGGAACAGGACCCTAAGGAAATT
V E I K Q E F P R E G W V E Q D P K E I 60

181 CTACATTCTGTCTATGAGTGTATAGAGAAAACATGTGAGAACTTGGACAGCTCAATATT
L H S V Y E C I E K T C E K L G Q L N I 80

Exon4⇒
241 GATATTTCCAACATAAAAGCTATTGGTGTGTCAGCAACCAGAGGGAAACCACTGTAGTCTGG
D I S N I K A I G V S N Q R E T T V V W 100

Exon5⇒
301 GACAAGATAACTGGAGAGCCTCTCTACAATGCTGTGGTGTGGCTTGATCTAAGAACCCAG
D K I T G E P L Y N A V V W L D L R T Q 120

Exon6⇒
361 TCTACCGTTGAGAGTCTTAGTAAAAGAATTCCAGGAAATAATAACTTTGTCAAGTCCAAG
S T V E S L S K R I P G N N N F V K S K 140

421 ACAGGCCTTCCACTTAGCACTTACTTCAGTGCAGTGAACTTCGTTGGCTCCTTGACAAT
T G L P L S T Y F S A V K L R W L L D N 160

481 GTGAGAAAAGTTCAAAGGCCGTTGAAGAAAAACGAGCTCTTTTTGGGACTATTGATTCA
V R K V Q K A V E E K R A L F G T I D S 180

Exon7⇒
541 TGGCTTATTTGGAGTTTGACAGGAGGAGTCAATGGAGGTGTCCACTGTACAGATGTAACA
W L I W S L T G G V N G G V H C T D V T 200

601 AATGCAAGTAGGACTATGCTTTTCAACATTCACTTTTGAATGGGATAAACAACCTCTGC
N A S R T M L F N I H S L E W D K Q L C 220

Exon8⇒
661 GAATTTTTTGGAAATCCAATGGAAATCTTCCAAATGTCCGGAGTTCTTCTGAGATCTAT
E F F G I P M E I L P N V R S S S E I Y 240

Exon9A⇒ Exon9B⇒
721 GGCCTAATGAAAGCTGGGGCCTTGAAGGTGTCCAATATCTGGGTGTTTAGGGGACCAG
G L M K A G A L E G V P I S G C L G D Q 260

Exon10⇒
781 TCTGCTGCATTGGTGGGACAAATGTGCTTCCAGATTGGACAAGCCAAAAATACGTATGGA
S A A L V G Q M C F Q I G Q A K N T Y G 280

Exon11⇒

841 ACAGGATGTTTCTTACTATGTAATACAGGCCATAAGTGTGTATTTTCTGATCATGGCCTT
T G C F L L C N T G H K C V F S D H G L 300

Exo

901 CTCACCACAGTGGCTTACAACTTGGCAGAGACAAACCAGTATATTATGCTTTTGGGAAGGT
L T T V A Y K L G R D K P V Y Y A L E G 320

n12⇒

961 TCTGTAGCTATAGCTGGTGTGTTATTTCGCTGGCTAAGAGACAATCTTGAATTATAAAG
S V A I A G A V I R W L R D N L G I I K 340

Exon13⇒

1021 ACCTCAGAAGAAATTGAAAACTTGCTAAAGAAGTAGGTA CTTCTTATGGCTGCTACTTC
T S E E I E K L A K E V G T S Y G C Y F 360

Exon14⇒

1081 GTCCAGCATTTCGGGGTTATATGCACCTTATTGGGAGCCCAGCGCAAGAGGGATAATC
V P A F S G L Y A P Y W E P S A R G I I 380

1141 TGTGGACTCACTCAGTTCACCAATAAATGCCATATTGCTTTTGCTGCATTAGAAGCTGTT
C G L T Q F T N K C H I A F A A L E A V 400

Exon15⇒

1201 TGTTTCCAACTCGAGAGATTTTGGATGCCATGAATCGAGACTGTGGAATTCCACTCAGT
C F Q T R E I L D A M N R D C G I P L S 420

1261 CATTTCAGGTAGATGGAGGAATGACCAGCAACAAAATTCTTATGCAGCTACAAGCAGAC
H L Q V D G G M T S N K I L M Q L Q A D 440

Exon16⇒

1321 ATTCTGTATATAACAGTAGTGAAGCCCTCAATGCCCGAAACCACTGCACTGGGTGCGGCT
I L Y I P V V K P S M P E T T A L G A A 460

1381 ATGGCGGCAGGGGCTGCAGAAGGAGTCGGCGTATGGAGTCTCGAACCCGAGGATTTGTCT
M A A G A A E G V G V W S L E P E D L S 480

Exon17⇒

1441 GCCGTCACGATGGAGCGGTTTGAACCTCAGATTAATGCGGAGGAAAGTGAAATTCGTTAT
A V T M E R F E P Q I N A E E S E I R Y 500

1501 TCTACATGGAAGAAAGCTGTGATGAAGTCAATGGGTTGGGTTACAACCTCAATCTCCAGAA
S T W K K A V M K S M G W V T T Q S P E 520

Exon18⇒

1561 AGTGGTGACCCTAGTATCTTCTGTAGTCTGCCCTTGGGCTTTTTTATAGTGAGTAGCATG
S G D P S I F C S L P L G F F I V S S M 540

Exon19⇒

1621 GTAATGTTAATCGGAGCAAGGTACATCTCAGGTATTCCA (TAA)
V M L I G A R Y I S G I P (Ter)

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Seit vielen Jahren fiel ein Patient durch stark erhöhte Serum-Triglyceride (Gesamttriglyceride 1980: 560 mg/dl, 1981: 398mg/dl, 1998: 552 mg/dl) auf. Diagnostiziert wurde eine schwere Hyperlipidämie.

Anfangs behandelte man den Patienten mit dem Lipidsenker Fenofibrat unter begleitender lipidsenkender Diät, später wurde ein Therapieversuch mit Atorvastatin 10mg/d unternommen. Die Triglyceridwerte besserten sich jedoch nicht: Obwohl der Patient stets berichtete, sich streng an die Diätvorschriften gehalten zu haben, erklärten die behandelnden Ärzte den ausbleibenden Therapieerfolg mit mangelnder Compliance des Patienten, wie ein Auszug aus einem Arztbrief zeigt: „Die erhöhten Serum-Triglyceride sind am ehesten auf die geringe Diätadhärenz des Pat. zurückzuführen, frühere Versuche mit einer medikamentösen Therapie, z.B. mit Fibraten zeigten keine wesentliche Beeinflussung, so daß wir eine strengere fettmodifizierte Diät empfehlen.“

Neben unzähligen erfolglosen Therapieversuchen über fast 20 Jahre fiel auf, daß sich das Serum des Patienten makroskopisch klar zeigte, obwohl bei Triglyceridwerten dieser Größenordnung eine Trübung zu erwarten gewesen wäre (siehe Abb. 4).

Es lag der Verdacht nahe, daß es sich um eine Pseudohypertriglyceridämie, vorgetäuscht durch einen erhöhten Serum-Glyceringehalt, handelte (Goussault et al. 1982). Tatsächlich lag der Glyceringehalt bei 10 mmol/l (Normwert: 0,06-0,18 mmol/l).

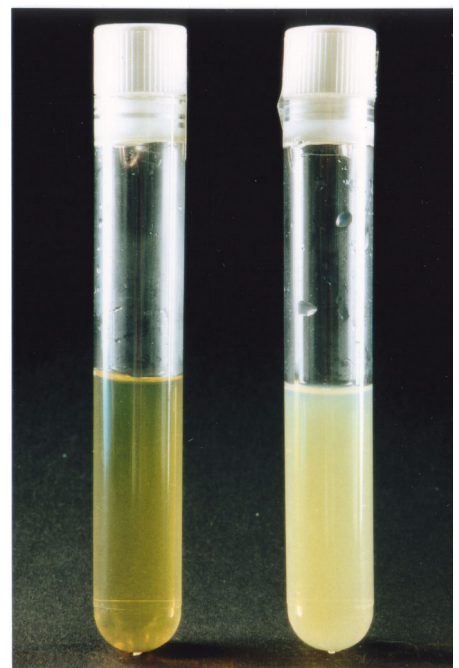


Abb.4: Links das klare Serum des Patienten, rechts das Serum eines Patienten mit ähnlich hohen (gemessenen) Serumtriglyceridwerten bei echter Hypertriglyceridämie.

Die falsch-hohen Triglyceridwerte ergaben sich, da bei der allgemein üblichen Triglyceridbestimmung zunächst die Triglyceride durch Enzyme in Fettsäuren und Glycerin gespalten werden und daraufhin das freigesetzte Glycerin bestimmt wird. Aus diesem Wert wird dann die Triglycerid-Konzentration berechnet.

Nach Ausschluß anderer Auslösefaktoren für diese Hyperglycerinämie kam man zu der Überzeugung, daß es sich um einen Fall von Glycerinkinase-mangel handeln mußte.

Ziel dieser Arbeit war, die molekulare Basis für den beim Patienten beobachteten Glycerinkinase-mangel zu beschreiben. Dies sollte am Restmaterial des Patienten, der bereits zu Beginn der Arbeit an den Folgen einer schweren generalisierten Arteriosklerose verstorben ist, sowie am Material seiner Nachkommen und Verwandten erfolgen.

Da als Grund für die Hyperglycerinämie am ehesten eine eingeschränkte Enzymfunktion durch Veränderung der Enzymstruktur in Frage kam, wurden Sequenzierungen des Glycerinkinase Gens durchgeführt, um dort nach einer Mutation zu suchen.

2. Patienten und Methoden

2.1. Patienten

Neben dem genannten Patienten mit Hyperglycerinämie wurden weitere Familienmitglieder (vergleiche Abbildung 5) in die Untersuchung miteinbezogen. Da nur wenig Probenmaterial in Form von tiefgefrorenem Blutplasma von dem zu Untersuchungsbeginn verstorbenen Patienten (I.1) existierte, wurde zunächst eine Probe seiner leiblichen Tochter (II.1) zur Mutationssuche benutzt. Diese mußte das Glycerinkinase-Gen des Vaters geerbt haben (X-Chromosom) und war phänotypisch symptomfrei.

Um Rückschlüsse auf die Vererbung der Mutation ziehen zu können, wurde auch Material von der Ehefrau (I.2) des Patienten sowie dem Sohn (III.1) der Tochter untersucht, die ebenfalls beide phänotypisch symptomfrei waren.

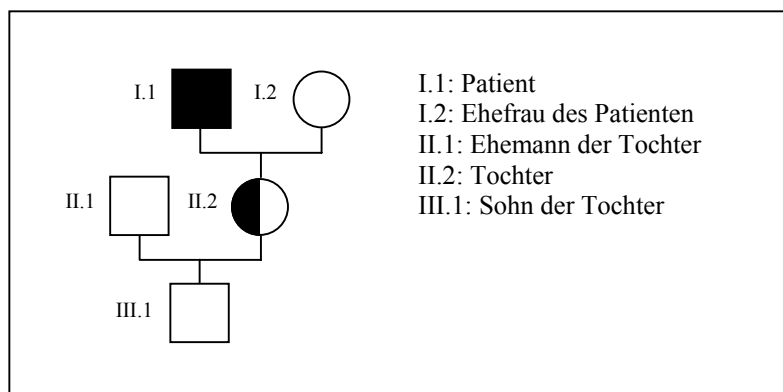


Abbildung 5: Schematischer Stammbaum der untersuchten Familie bezüglich des Merkmals Mutation 839G→C (schwarz). Mutationsträger sind I.1 (Patient) und II.2 (Tochter), die phänotypische Ausprägung (Hyperglycerinämie) besitzt lediglich I.1 (Patient).

2.2. Klinische Befunde

Von den vier untersuchten Familienmitgliedern (siehe Stammbaum Abb. 5) wurde nur bei dem Patienten (I.1) Glycerinkinasemangel diagnostiziert.

Der Patient (I.1) fiel bereits fast 20 Jahre zuvor aufgrund erhöhter Triglyceridwerte auf, in Wirklichkeit handelte es sich um eine Pseudohypertriglyceridämie, die durch eine

Hyperglycerinämie vorgetäuscht wurde (Goussault et al. 1982). Die Blutwerte präsentierten sich 1980 wie folgt:

Parameter	Einheit	Patient	Normbereich
Hämoglobin	g/dl	15,4	13,5-17
Leukozyten	T/ μ l	4,7	3,8-10,5
Thrombozyten	T/ μ l	228	140-345
Triglyceride	mg/dl	560	<200
Cholesterin	mg/dl	234	<200
HDL-Cholesterin	mg/dl	36	>35
LDL-Cholesterin	mg/dl	108	<160
VLDL-Triglyceride	mg/dl	260	
VLDL-Cholesterin	mg/dl	5	
VLDL-Triglyceride/ VLDL-Cholesterin		52	~5
Lipoprotein(a)	mg/dl	13	<30
AP	U/l	73	<175
γ -GT	U/l	35	<28
CK	U/l	22	<80
GPT	U/l	14	<23
Kreatinin	mg/dl	0,7	0,5-1,1
Kalium	mmol/l	3,9	3,5-5,0
Glucose, nüchtern	mg/dl	99	70-100
Glucose, postprandial	mg/dl	110	<160
Quick	%	85	70-100

Für einen Glycerinkinase-mangel sprachen bei dem Patienten: Pseudohypertriglyceridämie, klares Serum, keine Aufrahmung, im Verhältnis zu den VLDL-Triglyceriden zu niedriges VLDL-Cholesterin, Hyperglycerinämie und keine Verbesserung der Triglyceridwerte unter lipidsenkender Therapie, wie nachfolgende Tabelle zeigt:

	12.05.81	11.06.81 unter Fenofibrat	1998 Atorvastatin
Gesamtcholesterin	221 mg/dl	189 mg/dl	162 mg/dl
Gesamttriglyceride	398 mg/dl	397 mg/dl	552 mg/dl
HDL-Cholesterin	31 mg/dl	34 mg/dl	49 mg/dl
LDL-Cholesterin	173 mg/dl	128 mg/dl	108 mg/dl
VLDL-Cholesterin	12 mg/dl	12 mg/dl	5 mg/dl
VLDL-Triglyceride	224 mg/dl	227 mg/dl	260 mg/dl

Andere Auslösefaktoren einer Hyperglycerinämie konnten ausgeschlossen werden: orale Glycerineinnahme (anamnestisch ausgeschlossen), Diabetes mellitus (normale Blutglucosewerte), Hyperthyreose (normale Schilddrüsenwerte), Heparinapplikation (nicht erfolgt), Hepatopathie (normale Leberwerte), Hungerzustand (anamnestisch ausgeschlossen) und Kontamination der Blutprobe (erhöhte Werte über viele Jahre).

Damit war ein klassischer Glycerinkinase-mangel die wahrscheinlichste Ursache für die Hyperglycerinämie. Der hohe Serum-Glyceringehalt von 10 mmol/l (Normwert: 0,06-0,18 mmol/l) bestätigte diese Annahme.

Der Patient präsentierte folgende Begleitdiagnosen:

- Koronare Dreifäßerkrankung mit Vorderwandaneurysma
- Zustand nach anteroseptalem Myokardinfarkt 1980

- Zustand nach zwei Bypassoperationen in den Folgejahren des Herzinfarkts mit zweimonatiger Langzeitbeatmung 1980/1996
- Zustand nach transitorisch ischämischer Attacke 1990
- Zustand nach subtotaler Thyreoidektomie bei autonomen Adenom 1995
- Arterielle Hypertonie
- Hypercholesterinämie

Die schwere generalisierte Arteriosklerose ist wahrscheinlich auf die Risikofaktoren Nikotinabusus, arterielle Hypertonie und eine Hypercholesterinämie zurückzuführen.

Ehefrau (I.2) und Tochter (II.2) des Patienten waren beschwerde- und symptomfrei. Die Glycerinwerte lagen bei 0,8 mmol/l bei der Ehefrau und 0,13 mmol/l bei der Tochter.

Der Sohn (III.1) der Tochter zeigte eine sehr geringfügige Hypertriglyceridämie, wie die folgenden Werte zeigen:

Gesamtcholesterin	271 mg/dl
Gesamttriglyceride	209 mg/dl
HDL-Cholesterin	62 mg/dl
LDL-Cholesterin	176 mg/dl
VLDL-Cholesterin	53 mg/dl
VLDL-Triglyceride	203 mg/dl

Der Glycerinspiegel des Sohnes der Tochter lag mit 0,12 mmol/l im Normbereich.

2.3. Durchgeführte Untersuchungen

Im einzelnen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Patient (I.1): Automatische Sequenzierung der Exons 10 und 16.
- Ehefrau (I.2): Automatische Sequenzierung der Exons 3 und 10.
- Tochter (II.2): Manuelle Sequenzierung der Exons 3, 4, 5, 6, 13 und 16 sowie automatische Sequenzierung der Exons 3, 7, 9a, 9b, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18 und 19.
- Sohn der Tochter (III.1): Automatische Sequenzierung des Exons 10.

Es wurden zunächst 40 manuelle Sequenzierungen mit dem Material der Tochter des Patienten vorgenommen. Zuvor mußte - entsprechend der unten beschriebenen Methoden – die DNA aus dem Vollblut der Tochter isoliert und daraus jeweils das zu sequenzierende Exon mittels PCR amplifiziert werden. Das PCR Produkt wurde dann für die manuelle Sequenzierung im Kettenabbruchsverfahren verwendet.

Aus Zeit- und Kostengründen wurden die nachfolgenden Sequenzierungen nicht mehr manuell durchgeführt, sondern die PCR-Produkte zur automatischen Sequenzierung an Top-Lab, Martinsried, geschickt. Das Vorgehen zur Herstellung dieser PCR-Produkte aus dem Vollblut der jeweiligen Probanden entsprach dem zuvor genannten bei der manuellen Sequenzierung. Die PCR-Produkte wurden dann in unserem Labor wie unten beschrieben aufgereinigt (lediglich auf eine Denaturierung der DNA durch NaOH wurde verzichtet und statt dessen doppelsträngige DNA belassen) und zusammen mit dem entsprechenden Primerpaar eingeschickt.

Zuletzt wurde der schwierige Versuch unternommen, aus noch existierendem tiefgefrorenem Blutplasma des Patienten DNA zu gewinnen, um die bereits gewonnen Ergebnisse zu bestätigen.

Da nur wenig Material vorhanden war, mußte darauf verzichtet werden, die DNA-Konzentration des Materials durch z.B. Zentrifugation oder Filterung zu erhöhen.

Um das Material für die PCR vorzubereiten, wurde lediglich 10µl des Blutplasmas mit 10 µl Lösung B des Boehringer Mannheim Split Second™ DNA Preparation Kit für 5 Minuten bei 65° inkubiert. Die Probe wurde daraufhin direkt für die PCR benutzt.

Mehrwöchige Versuche mit Blutplasmaproben haben dabei gezeigt, daß andere mögliche Vorgehensweisen keinen Vorteil gegenüber dieser einfachen Vorbereitung hatten.

Das übrige Vorgehen entsprach dem, wie es zuvor für die automatische Sequenzierung beschrieben wurde.

2.4. DNA-Preparation

Die Blutproben wurden mit einem EDTA-Röhrchen abgenommen und gekühlt ins Labor transportiert. Dort wurde die DNA-Isolierung ausschließlich mit Reagenzien des patentierten Split-Second™ DNA-Preparation Kit von Boehringer Mannheim gemäß der mitgelieferten Anleitung wie folgt durchgeführt:

1. 1 ml Lösung A in ein autoklaviertes 1,5 ml Reaktionsgefäß geben.
2. 500 µl Vollblut hinzugeben und durch Kippen vermischen.
3. Das Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur für 10 Minuten auf einen Schüttler stellen oder alternativ 10 Minuten manuell periodisch kippen.
4. Das Reaktionsgefäß bei 2500 UpM (350 x g) für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugieren.
5. Mit einer autoklavierten Pipette vorsichtig den roten Überstand entfernen und verwerfen. Daraufhin wird am Boden des Gefäßes ein weißes Pellet sichtbar (siehe Abbildung 6).
6. 1 ml Lösung A hinzugeben und manuell schütteln, bis das Pellet resuspendiert ist.

7. Bei 2500 UpM (350 x g) für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugieren.
8. Mit einer autoklavierten Pipette erneut den Überstand vorsichtig entfernen, einschließlich des roten Rings um das weiße Pellet.
9. Das Pellet in 1 ml Lösung B durch leichtes Vortexen¹ resuspendieren.
10. Das Reaktionsgefäß für 5 Minuten bei 65°C in einem Wasserbad inkubieren.
11. Das Reaktionsgefäß für ca. 15 Sekunden vortexen.

Die Probe wurde daraufhin bei -85°C tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt direkt für die PCR benutzt.

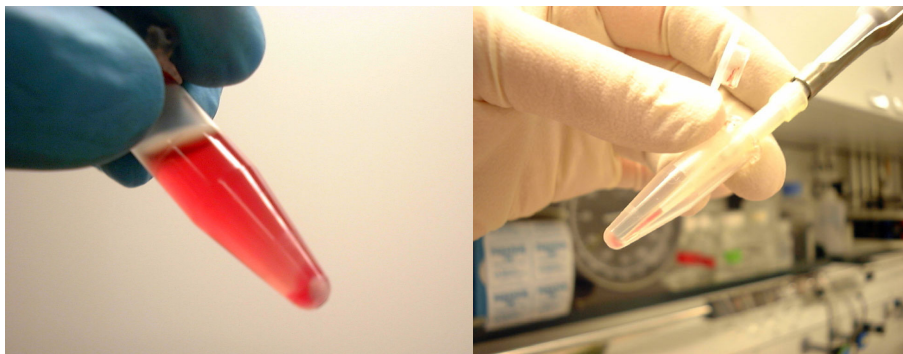


Abb.6: Links: Nach der Zentrifugation wird am Boden des Reaktionsgefäßes ein weißes Pellet sichtbar. Rechts: Der Überstand wird vorsichtig um das Pellet abpipettiert. Das Pellet verbleibt im Reaktionsgefäß.

2.5. PCR

Für jedes Exon wurde eine PCR mit dem entsprechenden Primerpaar (siehe Tabellen unten) durchgeführt. Die Primersequenzen wurden früheren Veröffentlichungen entnommen und bei ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, bestellt. Einer der beiden Primer – in der Regel der Forward-Primer - war jeweils 5'-biotinyliert, um eine Aufreinigung des Produktes mit Hilfe von Dynal Dynabeads (Streptavidin-Magnetpartikel) durchführen zu können.

¹ Unter „Vortexen“ wird das Durchmischen einer Probe in einem Reagenzglas durch gleichzeitiges Schütteln und Vibrieren auf einem entsprechenden Gerät verstanden.

Primer nach Sargent et al. (1994)

Exon	Forward Primer 5' nach 3'	Reverse Primer 5' nach 3'	T anneal (°C)	Produktgröße (bp), Erfolg
1		ACAGCCACCCCTCCGTCCCCCG		-
2	CATCCTTGATATCTGCCTGCATT	GGGCAAGTTGGGTGAGATGGACT	58	186, +
3	AGTTATATTTGTGTTGCTTTCTT	TTGAGAGAGTCTTATTATGTGGG	57	203, +
4	TGAGAGCTGTTTTCCCTGAAGTAGT	TTGCAATGTGAAGAAAGGCCCTA	57	204, +
5	TCCTTGATAGTGATTTACAGTAAGTTC	GGCCTCAATTATCCGGGAAAAAG	55	295, +
6	TTCTTTTGTGGTGGTTTTGTTTTA	TGCTAATTAATAAAGTCTGACCTGC	56	314, +
7	TGTGCTCTGCTGATTATGACCCT	TGCTCCACTGACATCTGAAAATA	58	284, +
8	ACAGTGTTAAATACCCAATCTTC	CCATTGTAAAAAGGACTGTAAAG	57	270, +
9	AGGCAAGTCTGTGATTCTAAAC			-
10				-
11	AGAACGCGGCTACAATTAATACA	GTCCTTCAACTCAATCAAATGCC	55	291, +
12	GTGTGCTGGAAAGCTCAC*	ATCACATTTGGGGCAAAGCATC	57	~400
13	TGTGTGATTTTTGTTTTGTTTTG	ATAAATCAAGATCCCCAAAAGC	61	177, +
14	TGATTATGTCCAATTTTCTCTTCC	ACTAAGTACAAGAAAACAGGCC		Zusammen
15		CCCAAAGAAGTATTATCCACAA	55	~600 bp, +
16	TCCCAGAGTAATGTTTCTTGT	CTCCCGTGCCTAAGTCGTTTTTC	57	291, +
17	AGCCCTACTGCAGTTAATGTG	TGTAACCCAACCCATTGACTTCA	55	184, inkomplett
18	TGGTTTGGTTTGCTTGACTGGAA	TCTGCTAAGTTATACACGAAAACATT	55	215, -
19	TCAGGTATTCATAAAACCTACC			-

Primer nach Zhang et al. (2000)

Exon	Forward Primer 5' nach 3'	Reverse Primer 5' nach 3'	T anneal (°C)	Produktgröße (bp)
1	CTCGGTCTCTGGACTCGTCA	TCAGCGCCTCTTCACATGTCA	62	217
2	CATCCTTGATATCTGCCTGCATT	GGGCAAGTTGGGTGAGATGGACT	62	186
3	TGGCTGCCATTAGTGGCCT	GAGAGTCTTATTATGTGGG	62	387
4	GCTGGAAGGAGTATGTAGAAATGAA	TTTTAATATGACCACATTTGCAATG	62	369
5	CCTTGATAGTGATTTACAGTAAGTTC	GCTTCTTTCTAGTGAAATCTGCAAAC	62	226
6	GAACTTCACAAGTGTTTTAG	GCTAGTAGAAACAATAGGCAAG	62	237
7	CCGTTCTTTTGCTTTATGTGC	GGTGCTCCACTGACATCTGA	62	305
8	CAGTGTTAAATACCCAATCT	TCCTTATTCAAAGCACCAAG	62	241
9A	GCTGCTATGTTAGTAGAGCC	GAGGCACACTGATGAACTAAG	62	183
9B	GCTGCTATGTTAGTAGAGCC	TCCTTATTCAAAGCACCAAG	62	201
10	TGCTTACTATTCAATCTCC	GAATTAAGAACACAMAAGCTG	62	384
11	CATTMCACTACTGAAATC	CAAATGCCAAGAAAGCAGAAC	62	256
12	GTGTGCTGGAAAGCTCAC	ATCACATTTGGGGCAAAGCATC	62	413
13	TGTGTGATTTTTGTTTTGTTTTG	ATCAAGATCCCCAGAAGCAC	62	156
14	CCTGGACATTTCTGTCTACC	CTGAATAAATCTCGGGTG	62	272
15	TCTGAGTGGAGGATTGCCAT	GTGGTTACATATGCCCAAAG	62	279
16	CTTTGGGCATATGTAACCAC	CCCTAAGGTGCTTTTTCACAG	62	247
17	GTTCAAGTATCATAAGTATGG	TCAGAATCTCTGGACATATG	62	291
18	TGGTTTGGTTTGCTTGACTGGAA	TTCCAGCTTCTTAGACACAG	62	248
19	GAAATCATATGGACTTTCTAGCC	GTCATGCAGCAAGTGGCTTA	62	253

Primer nach Gaudet et al. (2000), veröffentlicht auf der Lipimed Homepage: GK Projekt

Exon	Forward Primer 5' nach 3'	Reverse Primer 5' nach 3'	T anneal °C	Produktgröße (bp), Erfolg
1	TCTCTGGACTCGTCACCTG	ACAGCCACCCCCTCCGTC	61	>200
2	CATCCTTGATATCTGCCTGCATT	GGGCAAGTTGGGTGAGATGGACT	57	193
3	AGTTATATTTGTGTTGCTTTCTT	TTGAGAGAGTCTTATTATGTGGG	57	196
4	TGAGAGCTGTTTTCTGAAGTAGT	TTGCAATGTGAAGAAAGGCCCTA	57	200
5	TCCTTGATAGTGATTTCAAGTAACTC	GGCCTCAATTATCCGGGAAAAAG	57	298
6	TTCTTTTGTGGTGGTTTTGTTTTA	TGCTAATTAATAAAGTCTGACCTGC	57	315
7	TGTGCTCTGCTGATTATGACCCT	TGCTCCACTGACATCTGAAAATA	57	286
8	ACAGTGTTAAATACCCAATCTTC	CCATTGTAAAAAGGACTGTAAAG	57	271
9A	AGGCAAGTCTGTGATTCTAAAC	GAGACACTTGGGTGATGAAACT	57	>150
9B	TGGAGAAAATGCAAGGAAATA	CCTGGATGAACTTCAAAGC	57	295
10	TTCATTCTCCCTTCAACCAT	GTTCAAGCATTATTTAGATGAACTT	57	186
11	CATGTTATCTTTTCATTTTCCA	AGCTTTGAATGTTTGTGATATT	57	182
12	GTGTGCTGGAAAGCTCAC*	ATCACATTTGGGGCAAAGCATC	57	404
13	TGTGTGATTTTTGTTTTGTTTTG	ATAAATCAAGATCCCCAAAAGC	57	176
14	TGATTATGTCCAATTTTCTCTTCC	ACTAAGTACAAGAAAACAGGCC	57	245
15	TCAAAGAGGGCTTAGAAGACC	CCCAAAGAAGTAGTTATTCCACAA	57	339
16	TCCCAGAGTAATGTTTCTTGT	CTCCCGTGCACCTAAGTCGTTTTT	57	288
17	AGCCCTACTGCAGTTTAATGTG	TGTAACCCAAACCCATTGACTTCA	57	184
18	TGGTTTGGTTTGCTTGACTGGAA	TCTGCTAAGTTATACACGAAAACATT	57	202
19	ACTTCTAAAATGCATGTGGTCA	CACATCTTGGGAATCCATG	55	326

Die PCR wurde basierend auf der von Sargent et al. (1994) verwendeten Methode für alle Exons durchgeführt. Verwendet wurden Dynazym DNA Polymerase und 10xBuffer mit MgCl₂ von Biometra, Göttingen, dNTP-Mix von PeqLab, Erlangen, sowie die oben genannten Primer von ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt.

Die Reaktionsgefäße wurden wie folgt befüllt:

1. 10 µl 10xBuffer mit MgCl ₂
2. 2 µl 10mM dNTP-Mix
3. 10 µl 10 µM Forward Primer
4. 10 µl 10 µM Reverse Primer
5. 10 µl DNA-Template (=Patienten-DNA)
6. dH ₂ O entsprechend zugeben, um ein Gesamtvolumen von 100 µl zu erreichen

Die Reaktionsgefäße wurden in einen MWG Biotech AG Primus Thermal Cycler gegeben und die PCR mit folgendem Programm durchgeführt:

1. 94°C für 4 Minuten (Denaturierung der Matrizen DNA)
2. 0,5 µl 5U/µl Dynazym DNA Polymerase zugeben („Hotstart“)
3. 94°C für 1 Minute
4. T_{anneal} für 45 Sekunden (siehe Primer-Tabellen)
5. 72°C für 45 Sekunden
6. Schritt 3-5 30 mal wiederholen
7. 72°C für 10 Minuten

Das PCR Produkt wurde daraufhin mit Hilfe von DYNAL Dynabeads M-280 (Streptavidin-Magnetpartikel) basierend auf Methoden von Hultman et al. (1989, 1991) entsprechend der mitgelieferten Anleitung unter Verwendung von Reagenzien von Merck KGaA, Darmstadt, folgendermaßen aufgereinigt:

1. 100 µl Dynabeads-Lösung (5 µg/µl) zusammen mit 100 µl des PCR-Produktes in ein Reaktionsgefäß geben und unter gelegentlichem Schütteln für ca. 15 Minuten inkubieren lassen. Die biotinylierten Primer lagern sich nun an den Avidin-beschichteten Magnetpartikel an.
2. Reaktionsgefäß für 1-2 Minuten in den Magnetständer geben. Die Magnetpartikel wandern an den Gefäßrand und werden dort einschließlich der anhaftenden DNA-Stränge festgehalten.
3. Vorsichtig die Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß abpipettieren.
4. 1 ml 200mM NaOH-Lösung zugeben, um die DNA zu denaturieren und einzelsträngige DNA zu erhalten.

5. 2-3 mal mit 1 ml B&W Puffer (10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 2,0 M NaCl) spülen und anschließend in 100µl destilliertem Wasser resuspendieren.

Dieses Verfahren ermöglicht einen einfachen Pufferwechsel sowie eine einfache Trennung und Isolierung der DNA-Stränge und bietet somit optimale Bedingungen für eine Sequenzierung.

Eine Probe des aufgereinigten PCR-Produkts wurde nun in einer Ethidiumbromidgelelektrophorese, basierend auf Methoden von Rickwood et al., 1982, und Sambrook et al., 1989, analysiert, um sich von der Richtigkeit der Basenzahl (Produktlänge) zu überzeugen und um ggf. bei PCR-Produkten, die mehrere Banden enthielten, die richtige Bande anhand der Länge auszuwählen und auszuschneiden.

Die verwendeten Reagenzien stammten von Merck KgaA, Darmstadt.

Dazu wurden ca. 50ml Agarose 1% und 10µl Ethidiumbromid (Sicherheitshandschuhe!) in einen Gelträger entsprechender Größe gegossen und (mit einem Kamm zur Taschenbildung versehen) ca. 30 Minuten festwerden lassen.

10µl des PCR-Produkts wurden in einem Reaktionsgefäß mit 5 µl 10fach-Stop gemischt und

gevertext. Das Gemisch wurde dann in

eine Tasche des Ethidiumbromidgels

pipettiert. Der Gelträger wurde in eine

Gelkammer gelegt, vollständig mit

1xTAE-Pufferlösung (Tris-Acetat 40mM, EDTA 1mM, pH 8,3) bedeckt

und bei 100-150V und maximaler

Amperezahl ca. 35 min. laufen

gelassen.

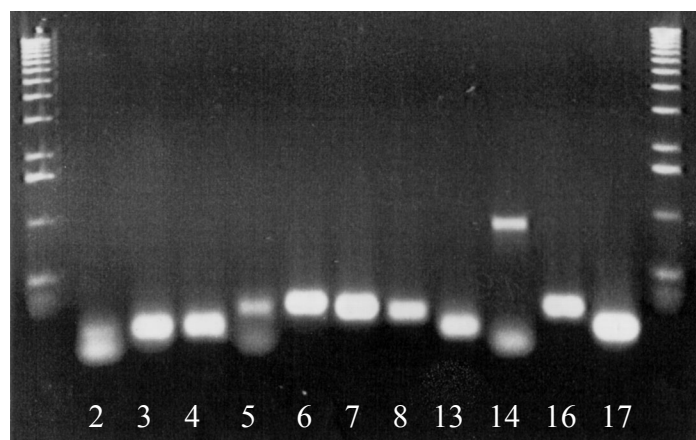


Abb. 7: Gelelektrophorese der PCR-Produkte Exon 2-8, 13, 14/15, 16 und 17 unter UV-Licht-Betrachtung.

Das Ergebnis wurde unter einer UV-Lampe betrachtet (Abb. 7). Im Falle mehrerer Banden wurde die Elektrophorese statt mit nur 10µl mit dem gesamten erzeugten PCR-Produkt wiederholt und daraufhin die entsprechende Bande unter UV-Licht-Betrachtung ausgeschnitten und die in diesem Gel-Stückchen befindlichen DNA-Stränge mittels einer Säule via Elektrophorese eluiert (Qiagen Qiaquick Gel Extraction Kit).

2.6. Manuelle Sequenzierung

Vor der eigentlichen Sequenzierung des aufgereinigten PCR-Produkts wurde, basierend auf Methoden von Rickwood et al., 1982, und Sambrook et al., 1989, ein Sequenzgel gegossen. Hierzu wurden Reagenzien von Merck KGaA, Darmstadt, sowie Acrylamid von Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg, verwendet.

Man geht folgendermaßen vor:

Es wird ein Gelsystem benötigt, bestehend aus zwei Glasplatten, zwei 0,4 mm Spacern (ca. 1cm breite Kunststoffstreifen) und Haifischzahnkämme.

Zunächst werden die Gelplatten wie folgt vorbereitet:

- Platten gründlich mit warmer Seifenlauge abwaschen. Dabei sämtliche Gelreste und Fettspuren entfernen. Dann mit destilliertem Wasser spülen, mit Ethanol abwaschen und abtrocknen.
- Eine der beiden Platten mit Silikon beschichten, damit man diese nach der Elektrophorese wieder leicht vom Gel abheben kann. Nach Möglichkeit immer die selbe Platte beschichten, da das Gel sonst bald an keiner der beiden Platten mehr haftet.
- Die Platten wie vom Hersteller beschrieben zusammensetzen. Hierzu werden die langen Spacer an die langen Seiten der Glasplatten gelegt und die Platten übereinander gelegt. Seiten und Boden werden nun mit einem ca. 4 cm breiten Klebeband dicht

abgeklebt. Man klemmt die Platten an den Kanten direkt über den Spacern mit Klammern fest.

Nun wird das Gel vorbereitet:

- Man pipettiert in einen konisch zulaufenden Kolben: 7,5 ml Acrylamid 6% Gellösung, 7,5 ml 10-fach TBE (108 g Tris-Base, 55 g Borsäure, 40 ml 500 mM EDTA pH 8,0 pro Liter) und 31,5 g Harnstoff und füllt mit destilliertem Wasser auf 75ml auf.
- Durch langsames Schütteln mischen
- Über Faltenfilter filtrieren und anschließend unter Vakuum 15 Minuten entgasen
- Vor dem Gießen 37,5 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und 375 µl 10 % Ammoniumpersulfat hinzugeben.

Die Gellösung wird vorsichtig zwischen die beiden Platten gegossen. Um zu verhindern, daß Blasen in das Gel gelangen muß unbedingt langsam gegossen werden und die Platten müssen in einem Winkel von 30° auf eine Kante gestellt werden. Gegen Ende werden die Platten waagrecht gestellt und randvoll gegossen.

Ein Haifischkamm wird nun mit der flachen Seite ca. 3 mm tief in das Gel gesteckt.

Das Gel ist frühestens nach einer halben Stunde fest, möglichst sollte es aber über Nacht vollkommen auspolymerisieren. Damit das Gel nicht austrocknet, deckt man das offene Ende mit feuchten Papiertüchern ab und umwickelt es mit Plastikfolie.

Nun wurde mit der eigentlichen Sequenzierungsreaktion im Kettenabbruchsverfahren basierend auf der Didesoxymethode von Sanger, 1977, begonnen. Hierzu wurden ein Boehringer Mannheim DNA Sequencing Kit, Reagenzien von Merck KgaA, Darmstadt, sowie als radioaktiver Marker [α -³⁵S]dATP α S von Promega, Mannheim, verwendet.

Zunächst erfolgt die **Anlagerungsreaktion (Annealing)**:

Man pipettiert in ein Reaktionsgefäß:

- 2 µl gereinigte einzelsträngige DNA-Probe, (ca. 1 µg DNA)
- 2 µl Primer (jeweils der nicht-biotinylierte, ca. 0,5-5 pmol)
- 2 µl 5-facher Anlagerungspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl)
- mit destilliertem Wasser auf 10 µl auffüllen

Der Becher wird kurz in 65-70°C heißes Wasserbad gestellt und dann bei Raumluft ca. 15-30 Minuten lang abgekühlt. Damit ist die Anlagerungsreaktion abgeschlossen.

Nun erfolgt die **Markierungsreaktion (Labeling)**, bei der die DNA-Stränge radioaktiv markiert werden:

Man legt ein Reaktionsgefäß auf Eis und pipettiert folgendes hinein:

- 10 µl Matrizen-DNA aus der Anlagerungsreaktion
- 2 µl dNTP-Ansatz (1,5 µM dCTP, 1,5 µM dGTP, 1,5 µM dTTP)
- 1 µl 100 mM DTT (Dithiothreitol)
- 0,1-0,5 µl [α -³⁵S]dATP α S (10-50 TBq mmol⁻¹, 370 MBq ml⁻¹)
- 2 µl DNA-Polymerase, 10-fach in eiskaltem Verdünnungspuffer verdünnt (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM DTT; 500 µg ml⁻¹ Rinderserumalbumin)

Bevor die DNA-Polymerase hinzugefügt wird, sollte alles für die Terminationsreaktion vorbereitet sein. Hierzu bereitet man eine Mikrotiterplatte vor: Man beschriftet vier Reihen mit jeweils „A“, „C“, „G“ und „T“ und stellt die Platte auf Eis. Dann pipettiert man 2,5 µl ddATP-Terminationsansatz (50 mM NaCl, je 80 µM von jedem dNTP, 8 µM ddATP) in die mit „A“ beschriftete Reihe, 2,5 µl ddCTP-Terminationsansatz (50 mM NaCl, je 80 µM von

jedem dNTP, 8 μ M ddCTP) in die mit „C“ beschriftete Reihe usw. und beläßt die Reaktion zunächst auf Eis.

Nun fügt man ins Reaktionsgefäß der Markierungsreaktion die DNA-Polymerase hinzu und nimmt das Gefäß vom Eis und läßt es 2-5 Minuten bei Raumluft inkubieren und beginnt direkt im Anschluß mit der **Terminationsreaktion (Termination)**:

Man erwärmt die Mikrotiterplatte der Terminationsreaktion 1 Minute auf 37-45°C.

Jetzt pipettiert man jeweils 3,5 μ l der Markierungsreaktion im 30 Sekunden Abstand in die mit „A“, „C“, „G“ und „T“ markierten Ansätze. Man mischt beim pipettieren ohne Blasen zu erzeugen und inkubiert 3-5 Minuten bei 37-45°C.

Nun gibt man ebenfalls im 30 Sekunden Abstand (bei selber Reihenfolge, um identische Inkubationszeiten zu erzielen) 4 μ l Stopplösung (95% Formamid, 20 μ M EDTA pH 8,0, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol FF) hinzu und lagert die Reaktionen vor Auftragen auf das Sequenzgel bei -20°C für maximal eine Woche.

Lauf des Sequenzgels:

- Man entfernt von der Gelplatte vorsichtig die Plastikfolie, die Papiertücher, die Klammern, den Haifischzahnkamm und das Klebeband. Dann montiert man die Gelplatten in der Elektrophoresekammer und füllt 1x TBE Laufpuffer (108 g Tris-Base, 55 g Borsäure, 40 ml 500 mM EDTA pH 8,0 pro 10 Liter) ein.
- Man läßt das Gel 10-15 Minuten laufen (2-3 kV, 55W)
- Die Sequenzierungsreaktionen werden 2-3 Minuten auf 80-90°C erhitzt und rasch auf Eis gestellt um eine Hybridisierung der denaturierten DNA zu verhindern
- Mit einer Spritze wird das Gel oben mit Laufpuffer ausgespült, um den Harnstoff zu

entfernen.

- Den Haifischzahnkamm wird nun mit den Zähnen nach unten auf das Gel aufgesetzt, so daß die Zähne nur leicht in das Gel eindringen.
- 0,5-1,0 µl der mit „A“, „C“, „G“ und „T“ beschrifteten Sequenzierungsreaktionen werden in jeweils eine Geltasche pipettiert. So schnell wie möglich auftragen, um die Diffusion gering zu halten!
- Man startet die Elektrophorese und stellt die Stromstärke so ein, daß das Gel eine Temperatur von ca. 40-50°C hat (ca. 55 Watt). Wenn der Bromphenolblau-Marker bis ans Ende des Gels gelaufen ist, stoppt man die Elektrophorese.

Belichtung auf Röntgenfilm:

- Man läßt das Gel auf Raumtemperatur abkühlen und legt es mit der silikonbeschichteten Platte nach oben. Mit einem Spatel trennt man die Platten vorsichtig und entfernt Spacer und Kämme.
- Man überträgt das Gel auf Filterpapier (z.B. Whatmann 3MM-Filterpapier), hüllt es in Plastikfolie ein und trocknet das Gel für mindestens 30 Minuten unter Vakuum bei 70-80°C bis es vollständig trocken ist.
- Die Plastikfolie wird entfernt und das Gel auf einen Röntgenfilm gelegt (Dunkelkammer!). Die Belichtung dauert ca. 24-48 Stunden (je nach Radioaktivität des Markers). Danach wird der Film entnommen und entwickelt.

3. Ergebnisse

3.1. Sequenzierung der DNA der Tochter

Jedes der 20 Exons des Glycerinkinase-Gens der Tochter wurde, sofern möglich, einschließlich seiner Intron-Exon Ränder sequenziert.

Bei den zunächst vorgenommenen 40 manuellen Sequenzierungen mit dem Material der Tochter fanden sich zwei Anomalien in Exon 3 und Exon 16, wovon sich die im Exon 3 als eine von Sargent et al. (2000) publizierte stille Mutation 165G→A identifizieren ließ. Dabei bewirkt die Änderung im Codon CAG (Glutamin) zu CAA (Glutamin) keine Änderung in der vorhergesagten Aminosäuresequenz. Die Veränderung im Exon 16 ließ sich bei automatischer Sequenzierung nicht bestätigen.

Bei den 28 automatisch durchgeführten Sequenzierungen zeigte sich beim Material der Tochter eine Veränderung im Exon 10, die als Mutation 839G→C (DNA-Sequenz) bzw. G280A (Aminosäure-Sequenz) bestätigt werden konnte. Die Folge der Mutation ist eine Änderung des Codons GGA (Glycin) zu GCA (Alanin). Im Intron zwischen Exon 10 und Exon 11 fand sich eine Mutation IVS10+79C→T. Diese Position konnte bei allen darauf folgenden Sequenzierungen nicht mehr erreicht werden; eine Bestätigung fehlt daher.

3.2. Sequenzierung der DNA der Ehefrau

Bei den 4 automatischen Sequenzierungen mit dem Material der Ehefrau des Patienten und zugleich leiblichen Mutter der gemeinsamen Tochter zeigte sich, daß die stille Mutation 165G→A im Exon 3 auch bei der Ehefrau vorhanden war und somit von ihr vererbt wurde. Die Mutation 839G→C im Exon 10 war bei der Ehefrau nicht zu finden, sie muß also vom Patienten selbst vererbt worden sein, sofern man eine Spontanmutation ausschließt.

3.3. Sequenzierung der DNA des Sohnes der Tochter

Um festzustellen, ob die Mutation von der Tochter an deren phänotypisch symptomfreien Sohn weitervererbt wurde, wurde auch mit dessen Material bei gleichem Vorgehen eine Sequenzierung des Exons 10 durchgeführt. Die Mutation 839G→C konnte dabei nicht gefunden werden, somit wurde die Mutation nicht weitervererbt.

3.4. Sequenzierung der DNA des Patienten

Bei dem schwierigen Versuch, mit noch existierendem tiefgefrorenem Blutplasma des Patienten eine DNA-Sequenzierung durchzuführen, gelang letztlich die Sequenzierung des entscheidenden Exons 10. Dabei fand sich wie zu erwarten die Mutation 839G→C im Exon 10.

3.5. Aktivitätsmessung der Glycerinkinase

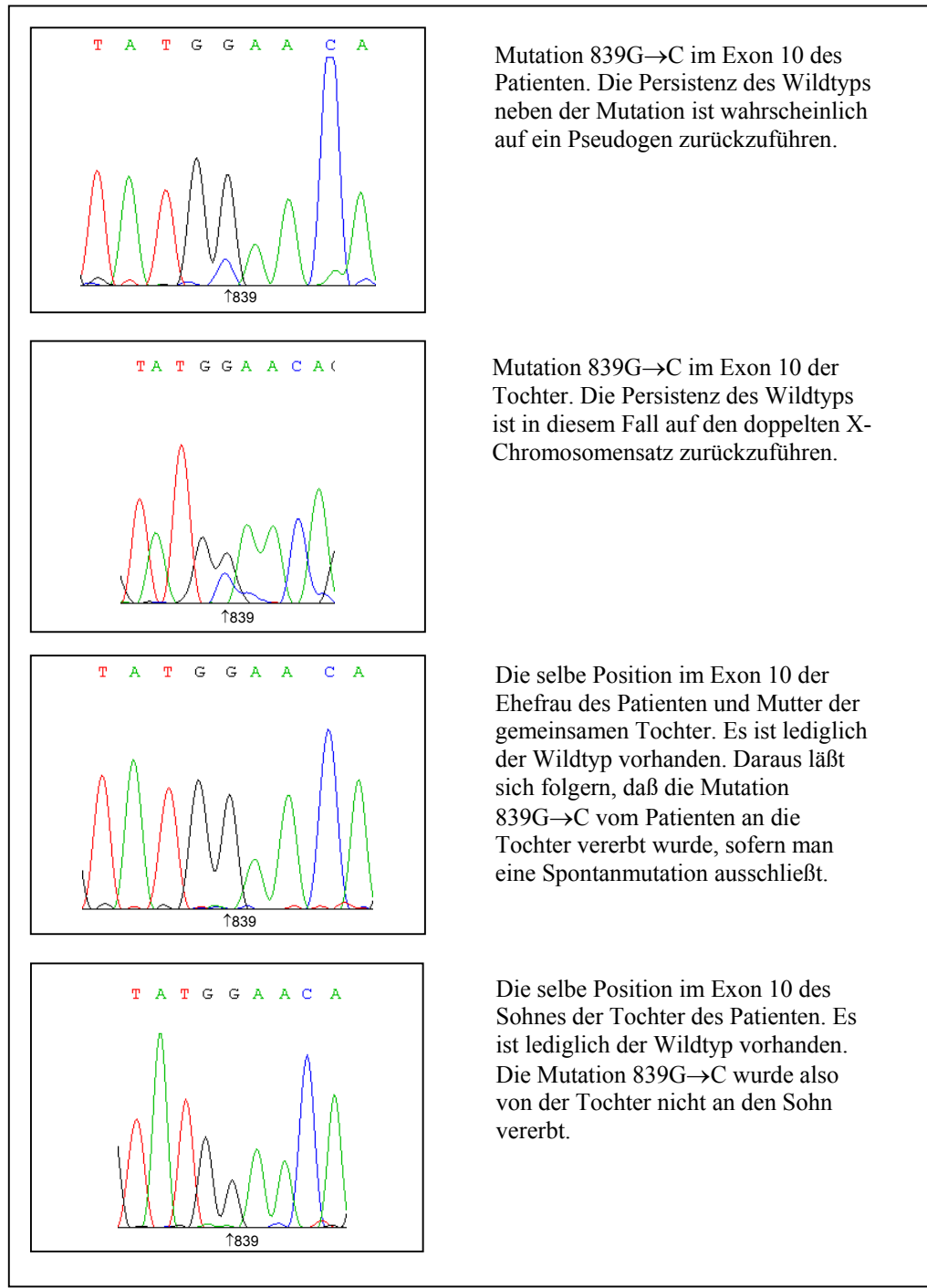
Auf eine Aktivitätsmessung der Glycerinkinase in Hautfibroblasten der jeweiligen Probanden mußte verzichtet werden, da hierzu eine Gewebentnahme notwendig gewesen wäre. Diese war den gesunden Probanden nicht zumutbar und beim betroffenen Patienten nicht mehr möglich, da er bereits verstorben war. Die aufwendige Methode der Aktivitätsmessung in Epstein-Barr-Virus transformierten lymphoblastoiden Zelllinien (Zhang et al. 2000) gilt als sehr problembehaftet und schien nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, daß die zufällige Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen bei heterozygoten Probanden die Aussagefähigkeit leukozytärer Zelllinien sehr einschränkt, nicht zum zusätzlichen Informationsgewinn geeignet.

3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Patient (I.1) und dessen Tochter (II.2) sind Träger der neu charakterisierten Mutation 839G→C (DNA-Sequenz) im Exon 10 des Glycerinkinase-Gens, welche den Aminosäureaustausch Gly280Ala bewirkt. Ehefrau (I.2) und Sohn (III.1) der Tochter sind Träger des Wildtyps (Siehe Abb. 8).

Ehefrau (I.2) und Tochter (II.2) des Patienten sind Träger der stillen Mutation 165G→A im Exon 3 des Glycerinkinase-Gens, welche keinen Aminosäureaustausch bewirkt.

Insgesamt konnten 79% der codierenden Basen sequenziert werden. Nicht vollständig sequenziert werden konnten Exons 1, 2, 8, 9A, 12 und 19 (siehe detaillierte Beschreibung unten). Eine weitere Mutation konnte somit nicht sicher ausgeschlossen werden. Auffällig ist, daß in diesen nicht oder nur schwer sequenzierbaren Exons bisher keine Mutationen bekannt sind. Somit ist denkbar, daß Untersuchungen in diesen Bereichen bisher scheiterten.



Mutation 839G→C im Exon 10 des Patienten. Die Persistenz des Wildtyps neben der Mutation ist wahrscheinlich auf ein Pseudogen zurückzuführen.

Mutation 839G→C im Exon 10 der Tochter. Die Persistenz des Wildtyps ist in diesem Fall auf den doppelten X-Chromosomensatz zurückzuführen.

Die selbe Position im Exon 10 der Ehefrau des Patienten und Mutter der gemeinsamen Tochter. Es ist lediglich der Wildtyp vorhanden. Daraus läßt sich folgern, daß die Mutation 839G→C vom Patienten an die Tochter vererbt wurde, sofern man eine Spontanmutation ausschließt.

Die selbe Position im Exon 10 des Sohnes der Tochter des Patienten. Es ist lediglich der Wildtyp vorhanden. Die Mutation 839G→C wurde also von der Tochter nicht an den Sohn vererbt.

Abb. 8: Vergleiche der DNA-Sequenzen von Patient (I.1), Tochter (II.2), Ehefrau (I.2) und Sohn (III.1) der Tochter (von oben nach unten) im Bereich der Mutation G280A (Aminosäuresequenz) bzw. 839G→C (DNA-Sequenz) zeigen, daß die Mutation vom Vater an die Tochter vererbt wurde.

3.7. Details zu allen Exons im einzelnen

Gestrichelt unterstrichene Sequenzen stellen Primerbindungsstellen dar, der erfolgreich sequenzierte Bereich ist durchgezogen unterstrichen.

Exon 1	
Position im Gen / Protein	1-78 / 1-26
Länge	78 bp
Basen sequenziert	0%
Forward-Primer	5' TCTCTGGACTCGTCACCTG
Reverse-Primer	5' ACAGCCACCCCCTCCGTC
T-Anneal	61°C
Amplicon-Länge	>200 bp
Bekannte Mutationen	-
Sequenzierte Probe	-
Ergebnis	Sequenzierung scheiterte aufgrund zu vieler multipler Banden des PCR-Produktes, was eine erfolgreiche Aufreinigung unmöglich machte.
Sequenz	Ggttcagcggacgcgcgcggcctcgg <u>tcctctggactcgtcacctgccccctcccctcccgcgcgcgtcaccaggaaccggccgcaatcgccggccgacctgaagctggtttc</u> ATGGCAGCCTCAAAGAAGGCAGTTTTGGGGCCATTGGTGGGGGCGGTGGACCAGGGCACCAGTTCGACGCGCTTTTTGgtgagcccggggtgacatgtgaagaggcgctgag

Exon 2	
--------	--

Position im Gen / Protein	79-152 / 27-51
Länge	73 bp
Basen sequenziert	0%
Forward-Primer	5' CATCCTTGATATCTGCCTGCATT
Reverse-Primer	5' GGGCAAGTTGGGTGAGATGGACT
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	193 bp
Bekannte Mutationen	-
Sequenzierte Probe	-
Ergebnis	Sequenzierung scheiterte aufgrund mangelnder Amplifikation der gesuchten Sequenz zu Gunsten einer anderen Bande bei der PCR.

Sequenz catccttgatatctgcctgcatttttacattaatattacaatatcttttcag
GTTTTCAATTCAAAAACAGCTGAACTACTTAGTCATCATCAAGTAGAAATAAA
ACAAGAGTTCCCAAGAGAAGGgtatgtttcctaatttaatatgtaaagacaca
ttatgtttgtttagtccatctcaccceaacttgccc

Exon 3

Position im Gen / Protein	153-259 / 52-87
Länge	108 bp
Basen sequenziert	100%
Forward-Primer	5' AGTTATATTTGTGTTGCTTTCTT
Reverse-Primer	5' TTGAGAGAGTCTTATTATGTGGG
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	196 bp

Bekannte Mutationen Stille Mutation 165G→A , IVS3+ 1GA

Sequenzierte Probe Tochter (manuell, automatisch), Ehefrau (automatisch)

Ergebnis Stille Mutation 165G→A gefunden bei Tochter und Ehefrau. Sequenz gut lesbar.

Sequenz agttatatttggttgctttcttcttacaaccaatgccttcttttggtcaagA
TGGGTGGAACAGGACCCTAAGGAAATTCACATTCTGTCTATGAGTGTATAGA
GAAAgACATGTGAGAACTTGGACAGCTCAATATTGATATTTCCAACATAAAA
Ggtattttagtagaatattttacccacataataagactctctcaa

↓ 165G→A

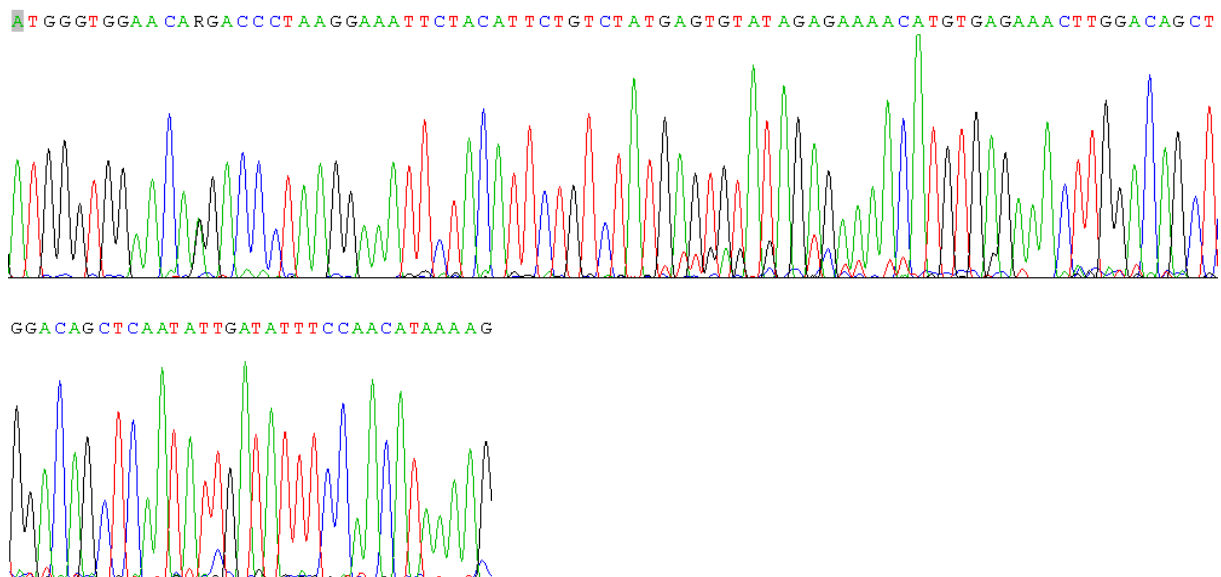


Abbildung 9: Sequenz des Exons 3 der Tochter.

Exon 4

Position im Gen / Protein	260-337 / 87-113
Länge	79 bp
Basen sequenziert	100%
Forward-Primer	5' TGAGAGCTGTTTTCTGAAGTAGT
Reverse-Primer	5' TTGCAATGTGAAGAAAGGCCCTA
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	200 bp

Bekannte Mutationen Alu ins IVS4

Sequenzierte Probe Tochter (manuell)

Ergebnis Sequenz gut lesbar, keine Anomalien.

Sequenz acaaatgtttcaagtatTTTTTtgatttgctatgtttagttgtgtctctagta
 agatgagagctgTTTTcctgaagtagtttccctacttgtaaTTTTtgacttc
 ctctgtttaactttctctttaaagCTATTGGTGTCAGCAACCAGAGGGAAAC
 CACTGTAGTCTGGGACAAGATAACTGGAGAGCCTCTCTACAATGCTGTGGgta
 agctgtcatgcatggatgtcaaatgtagggcctttcttcacattgcaaatgtg
 gtcatatataaaatatcttgctaaaaaagcatgcagtcg

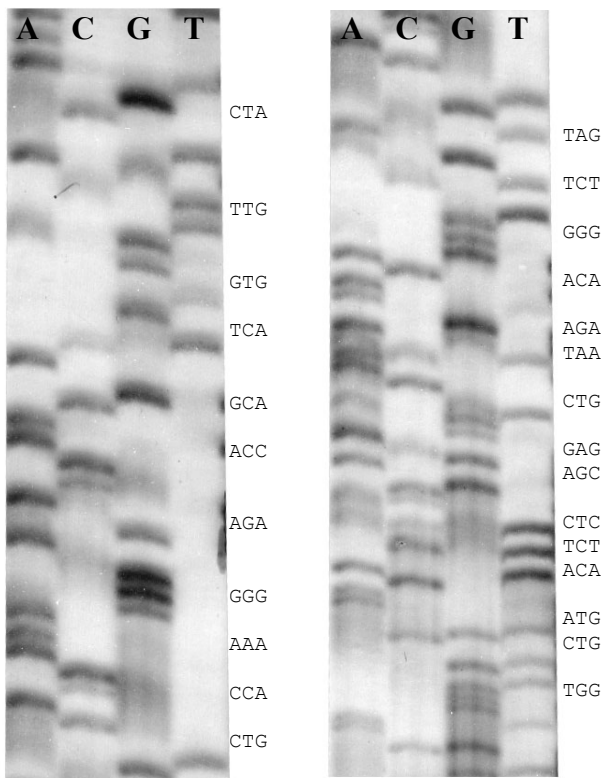


Abbildung 10: Sequenz des Exons 4 der Tochter.

Exon 5

Position im Gen / Protein	338-414 / 114-138
Länge	77 bp
Basen sequenziert	100%
Forward-Primer	5' TGAGAGCTGTTTTCTGAAGTAGT
Reverse-Primer	5' TTGCAATGTGAAGAAAGGCCCTA
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	296 bp

Bekannte Mutationen -

Sequenzierte Probe Tochter (manuell)

Ergebnis Sequenz gut lesbar, keine Anomalien.

Sequenz tccttgatagtgatttcagtaagttccttatttttttaaataagtttttc
atg
tatattattttatttttggtctatagTGTGGCTTGATCTAAGAACCCAGTCTAC
CGTTGAGAGTCTTAGTAAAAGAATTCAGGAAATAATAACTTTGTCAAG
gtaa
gaatttccttcagaagtatactataagaatgtttccttttttaaaaaagtttg
cagatttcactagaaagaagcatccttatggtacaatagttatttggatacaatt
tatagaatcctttttcccgataattgaggcc

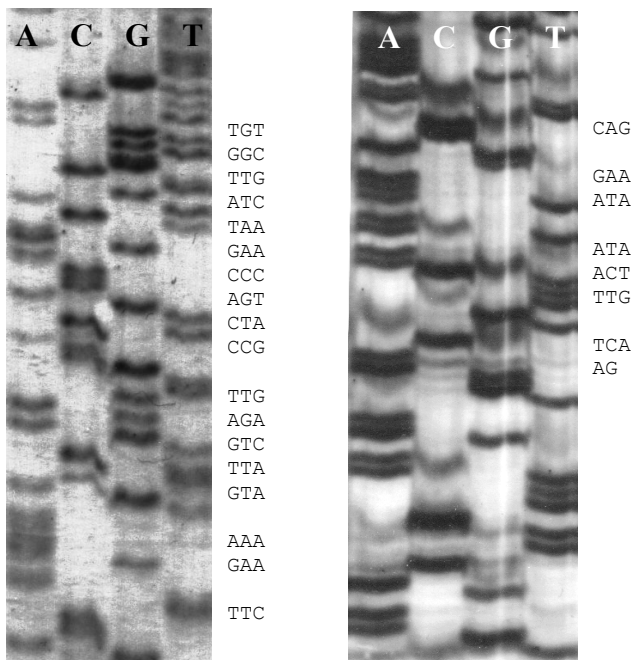


Abbildung 11: Sequenz des Exons 5 der Tochter.

Exon 6

Position im Gen / Protein 415-552 / 139-184
 Länge 138 bp
 Basen sequenziert 100%
 Forward-Primer 5' TTCTTTTGTGGTGGTTTTGTTTA
 Reverse-Primer 5' TGCTAATTAAAAGTCTGACCTGC
 T-Anneal 57°C
 Amplicon-Länge 314 bp

Bekannte Mutationen IVS6AS G-C

Sequenzierte Probe Tochter (manuell)

Ergebnis Sequenz gut lesbar, keine Anomalien.

Sequenz ttcttttggttggtggttttggttttaactgttacacttttcatttgctaact
gaacttcacaactgcttttagTCCAAGACAGGCCTTCCACTTAGCACTTACTT
CAGTGCAGTGAACTTCGTTGGCTCCTTGACAATGTGAGAAAAGTTCAAAAGG
CCGTTGAAGAAAACGAGCTCTTTTTGGGACTATTGATTCATGGCTTATTTGG
gtatggtttaaataataatggatataatggagaattttttcagaaattttttctag
actgccttgccattggttctactagcaggtcagactttttaattagca

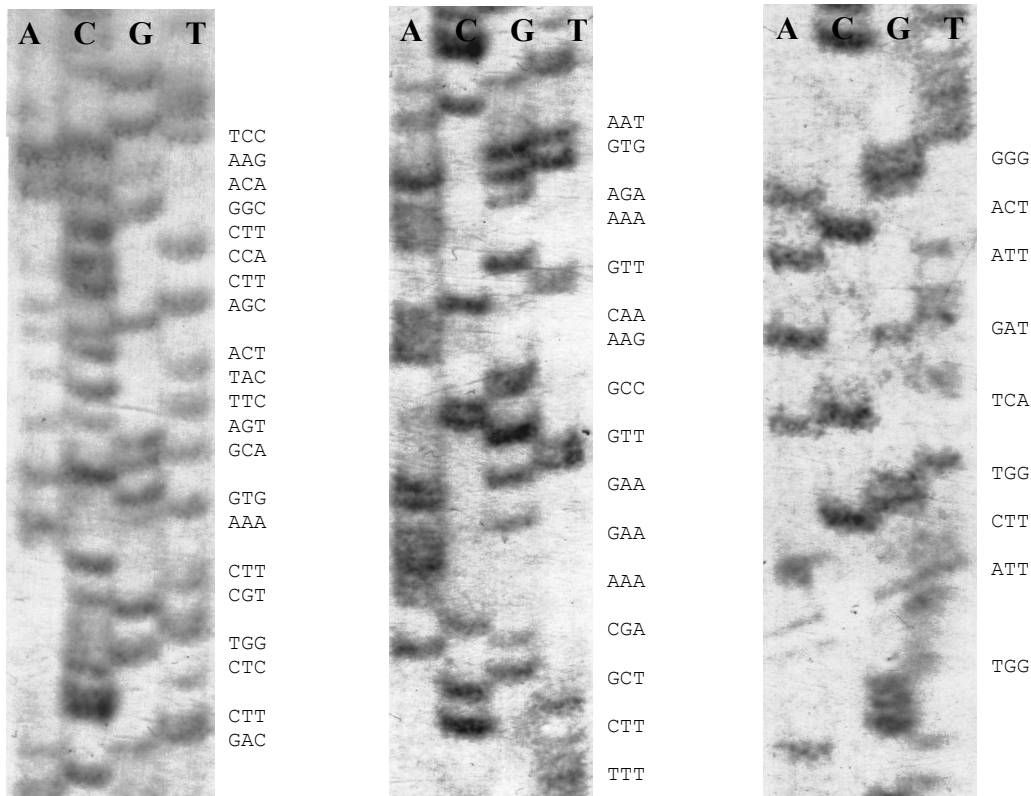


Abbildung 12:
Sequenz des Exons
6 der Tochter.

Exon 7

Position im Gen / Protein	553-662 / 185-221
Länge	110 bp
Basen sequenziert	100%
Forward-Primer	5' TGTGCTCTGCTGATTATGACCCT
Reverse-Primer	5' TGCTCCACTGACATCTGAAAATA
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	286 bp
Bekannte Mutationen	D198G
Sequenzierte Probe	Tochter (automatisch)
Ergebnis	Sequenz gut lesbar, keine Anomalien.

Sequenz tgtgctctgctgattatgacccttaacaatatgtaaattaaattgccataag
tacaaatttaacctgattttttactctgcctagAGTTTGACAGGAGGAGTCA
ATGGAGGTGTCCACTGTACAGATGTAACAAATGCAAGTAGGACTATGCTTTTC
AACATTCATTCTTTGGAATGGGATAAACAACTCTGCGAgtaagttctgtttg
ctctaaatatagttttcccaatacactacctattttataaccgaaatcttaata
ttttcagatgtcagtgaggca

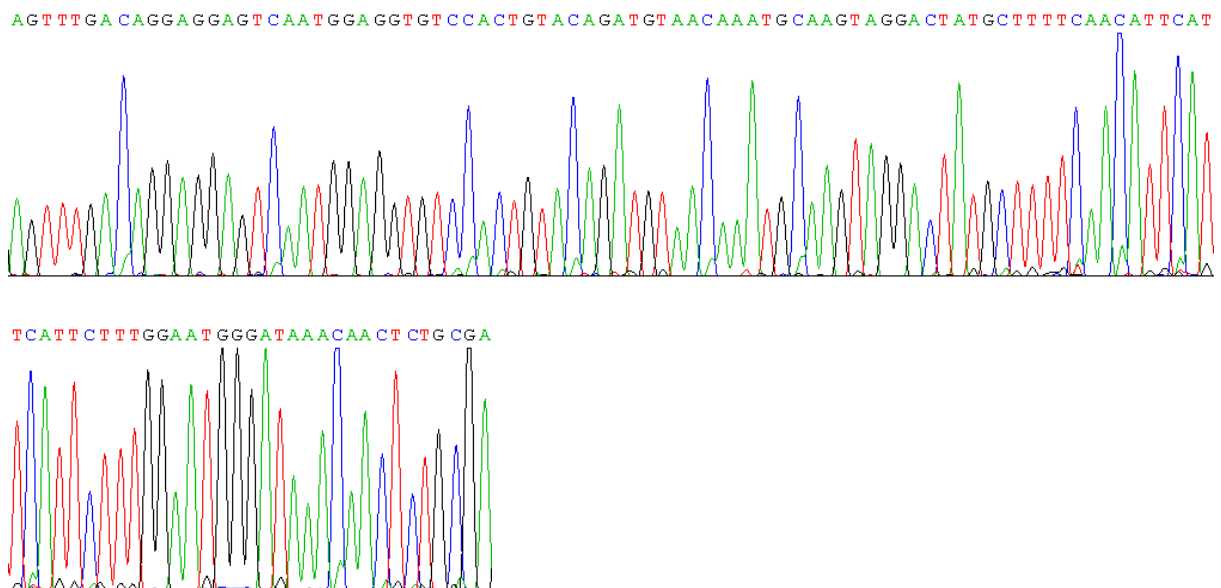


Abbildung 13: Sequenz des Exons 7 der Tochter.

Exon 8

Position im Gen / Protein	663-729 / 222-243
Länge	67 bp
Basen sequenziert	0%
Forward-Primer	5' ACAGTGTTAAATACCCAATCTTC
Reverse-Primer	5' CCATTGTAAAAAGGACTGTAAAG
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	271 bp
Bekannte Mutationen	-
Sequenzierte Probe	-
Ergebnis	PCR bisher gescheitert. Wahrscheinlich ist einer der Primer verunreinigt worden, denn die PCR funktionierte zuvor bei einem Testdurchlauf.
Sequenz	<u>acagtg</u> ttaaatacccaatcttcttggtttttcagATTTTTTGGAAATCCAATG GAAATTCTTCCAATGTCCGGAGTTCTTCTGAGATCTATGGCCTAATGgtaaa aaacaaacaaacaaacaaaaaacacacaaaaaaccaaaaaacaaacaaaaaa aacctaataattaagtttttttattacaaaacaagtttactattcataatt caaaagtcaactgtggttatgttttgtgacttaaaaactttacagtccttttta <u>caatgg</u>

Exon 9A

Position im Gen / Protein	730-765 / 244-255
Länge	36 bp
Basen sequenziert	0%
Forward-Primer	5' AGGCAAGTCTGTGATTCTAAAC
Reverse-Primer	5' GAGACACTTGGTGATGAAACT
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	>150 bp

Bekannte Mutationen	-
---------------------	---

Sequenzierte Probe	Tochter (automatisch)
--------------------	-----------------------

Ergebnis	Sequenz entspricht nicht der erwarteten.
----------	--

Sequenz	atattgtgatttttgttgctgccaatcttgaatgtatggtatctgtgagtatg tagtaggcaatt***gatcatatccttttaattatagAAAGCTGGGGCCTTG GAAGGTGTGCCAATATCTGGGgtaagtttcatcaccaagtgcttc
---------	--

Exon 9B

Position im Gen / Protein	766-833 / 256-276
Länge	68 bp
Basen sequenziert	100%
Forward-Primer	5' TGGAGAAAATGCAAGGAAATA
Reverse-Primer	5' CCTGGATGAACTTCAAAGC
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	295 bp

Bekannte Mutationen C256R, 20KB Del ab Exon 9

Sequenzierte Probe Tochter (automatisch)

Ergebnis Sequenz gut lesbar, keine Anomalien.

Sequenz tggagaaaatgcaaggaaatagacagttcattcctttgataaataaaaaatgaa
aaataaatcctatggctcttctaaaaagaaagttaatactattgtattagtca
gtgttctttattgtcatttatactttcagTGTTTAGGGGACCAGTCTGCTGCA
TTGGTGGGACAAATGTGCTTCCAGATTGGACAAGCCAAAAATACgtgagttta
agaacagacttaaaaaccaatgctgttttgttttttctacttggtgctttga
ataaggaaaagcttttgaagttcatccagg

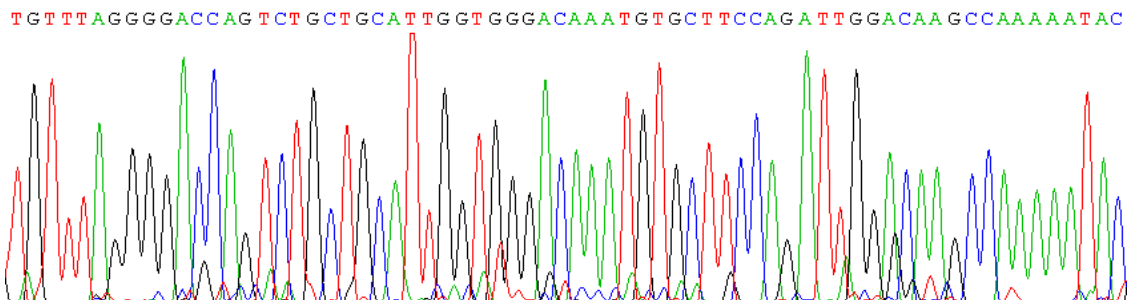


Abbildung 14: Sequenz des Exons 9B der Tochter.

Exon 10

Position im Gen / Protein	834-876 / 277-291
Länge	43 bp
Basen sequenziert	100%
Forward-Primer	5' TTCATTCTCCCTTCAACCAT
Reverse-Primer	5' GTTCAAGCATTATTTAGATGAACTT
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	186 bp
Bekannte Mutationen	T278M, N288D
Sequenzierte Probe	Patient (automatisch), Tochter (automatisch), Ehefrau (automatisch)
Ergebnis	Gefundene Mutationen: G280A / 839G→C (Patient, Tochter), IVS10+79C→T (Tochter). Sequenz gut lesbar.

Sequenz ttttgatcatttgtggtattaatgtttcattatTTTgctttcaataaaattgcttactattcattctcccttcaaccatagGTATGGAACAGGATGTTTCTTACTATGTAATACAGGCCATAAGgttggTTTTTTAAATTAATAAAATTGATTTAAAAc
taagttcatctaataatgcttgaac

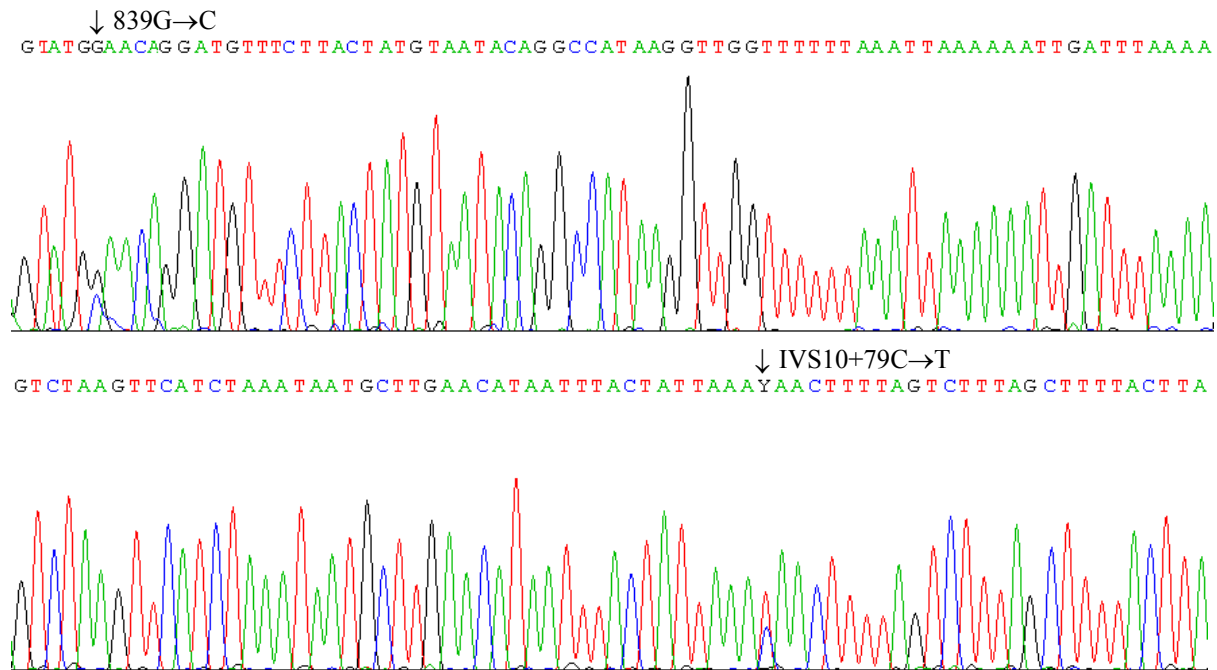


Abbildung 15: Sequenz des Exons 10 der Tochter.

Exon 11

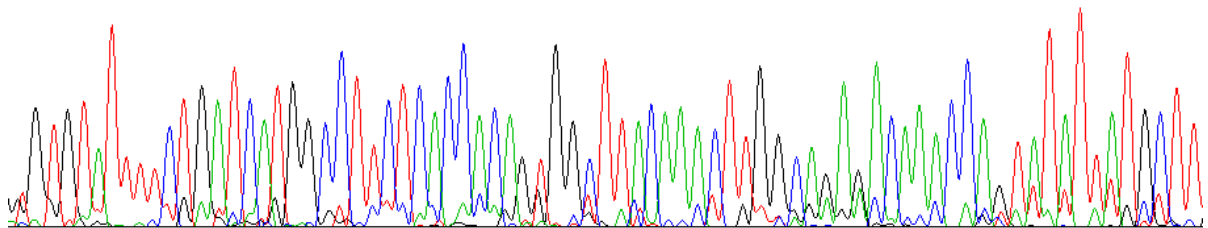
Position im Gen / Protein 877-957 / 277-319
 Länge 81 bp
 Basen sequenziert 100%
 Forward-Primer 5' CATGTTATCTTTTCATTTTCCA
 Reverse-Primer 5' AGCTTTGAATGTTTGTCATATT
 T-Anneal 57°C
 Amplicon-Länge 182 bp

Bekannte Mutationen A305V, R310X

Sequenzierte Probe Tochter (automatisch)
 Ergebnis Sequenz gut lesbar, keine Anomalien

Sequenz catgttatctttttcattttccactactgaaatctttttttttttctttcttaca
gTGTGTATTTTCTGATCATGGCCTTCTCACCACAGTGGCTTACAACTTGGCA
GAGACAAACCAGTATATTATGCTTTGGAAgtaagttctttttaatcaatatgg
ataatatgacaaacattcaagct

TG TG TATTTTCT GATCATGGCCTTCTCACCACAGTGGCTTACAAACTTGGCAGAGACAAACCAGTATATTATGCTT



T G G A A

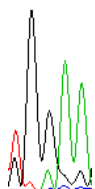


Abbildung 16: Sequenz des Exons 11 der Tochter.

Exon 12

Position im Gen / Protein	958-1036 / 320-346
Länge	79 bp
Basen sequenziert	14%
Forward-Primer	5' GTGTGCTGGAAAGCTCAC
Reverse-Primer	5' ATCACATTTGGGGCAAAGCATC
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	404 bp

Bekannte Mutationen -

Sequenzierte Probe Tochter (automatisch)

Ergebnis Mischsequenz, schlecht ablesbar, vorzeitiger Abbruch

Sequenz gtgtgctggaaagctcacttctattcctcatcccgttgaaaaacttttattag
tgacttagataaaaactatgtttgtattagaagacctagtttacatatttgctg
gagtctcaaaatggaaactgaattctgtccatctgattgtgtcatacacagaa
tatgctcaataaaaaccttggatagtgataaaaatatattctgtcatgaattcc
tttttttcttttagGGTTCTGTAGCTATAGCTGGTGCTGTTATTTCGCTGGCTAA
GAGACAATCTTGGAATTATAAAGACCTCAGAAGAAATTGgtgagtggttcta
acaaaagggttagaaaatctgaaaaatgacacatttcagtattttatctctgca
aagtaaatactgatgctttgccccaaatgtgat

G G T T C T G T A G C T A T A G C
G N G T T C T G T A G C T N N A G N

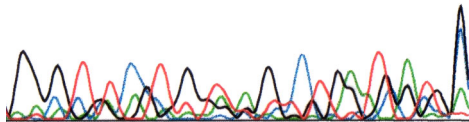


Abbildung 17: Teilsequenz des Exons 12 der Tochter.

Exon 13

Position im Gen / Protein	1037-1133 / 347-378
Länge	97 bp
Basen sequenziert	100%
Forward-Primer	5' TGTGTGATTTTTGTTTTGTTTTG
Reverse-Primer	5' ATAAATCAAGATCCCCAAAAGC
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	176 bp
Bekannte Mutationen	-
Sequenzierte Probe	Tochter (manuell)
Ergebnis	Sequenz in weiten Bereichen gut lesbar, keine Anomalien.

Sequenz tggtgatTTTTGTTTTGTTTTGTTTTaatgtagAAAACTTGCTAAAGAAG
TAGGTACTTCTTATGGCTGCTACTTCGTCCCAGCATTTCGGGGTTATATGCA
CCTTATTGGGAGCCCAGCGCAAGAGGgtaagtattgaaaatatggagtgcttt
tggggatcttgatttat

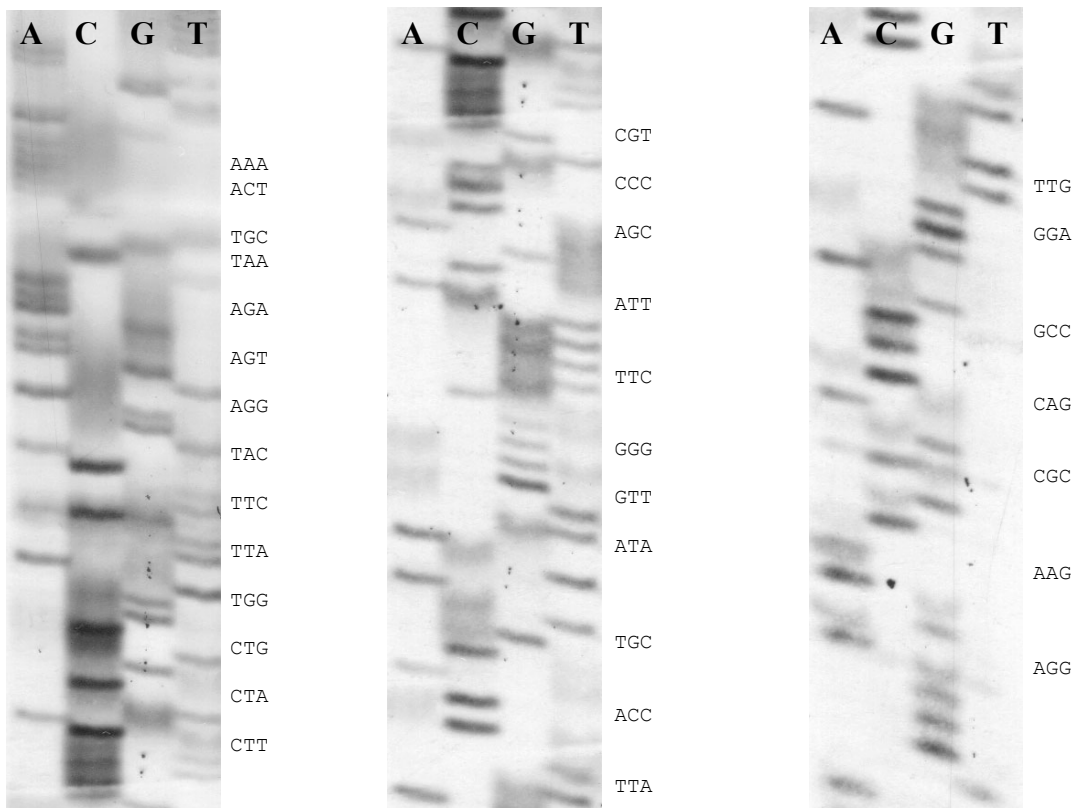


Abbildung 18: Sequenz des Exons 13 der Tochter.

Exon 14

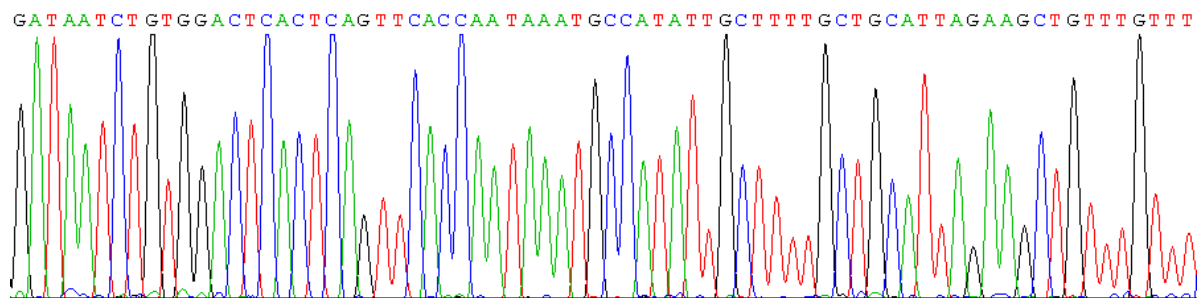
Position im Gen / Protein	1134-1218 / 379-406
Länge	85 bp
Basen sequenziert	100%
Forward-Primer	5' TGATTATGTCCAATTTTCTCTTCC
Reverse-Primer	5' ACTAAGTACAAGAAAACAGGCC
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	245 bp

Bekannte Mutationen Q403X, R405Q

Sequenzierte Probe Tochter (automatisch)

Ergebnis Sequenz gut lesbar, keine Anomalien.

Sequenz tgattatgtccaattttctcttcctggacatttctgtctaccaaattgacct
ttcatatttgagatatttcaaattgattggtttatatcattctaatctgaaa
atctttgtgcgtattttttagGATAATCTGTGGACTCACTCAGTTCACCAATAA
ATGCCATATTGCTTTTGCTGCATTAGAAGCTGTTTGTTTCCAAACTCGAGAGg
taacaaatatgggcctgttttcttgtacttagt



CCAAACTCGAGAG

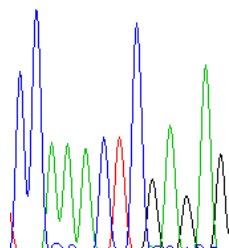


Abbildung 19: Sequenz des Exons 14 der Tochter.

Exon 15

Position im Gen / Protein	1219-1339 / 407-447
Länge	121 bp
Basen sequenziert	100%
Forward-Primer	5' TCAAAGAGGGCTTAGAAGACC
Reverse-Primer	5' CCCAAAGAAGCTAGTTATTCCACAA
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	339 bp

Bekannte Mutationen R413X, M428T, Q438R, D440V

Sequenzierte Probe Tochter (automatisch)

Ergebnis Sequenz gut lesbar, keine Anomalien.

Sequenz tcaaagagggccttagaagaccagaataagaagtctcaatttattccataggct
cttgggaagctcttgagagtttctgagtgaggattgccattttcagagatggt
actatgaaatagatttataacattaattgcactggtttatttaagATTTTGGG
TGCCATGAATCGAGACTGTGGAATTCCTCACTCAGTCATTTGCAGGTAGATGGAG
GAATGACCAGCAACAAAATTCTTATGCAGCTACAAGCAGACATTCTGTATATA
CCAGTAGgtttagtaagtcttcattcc*ttaaactcccagagtaatgtttcttg
tggaataactagttccttggg

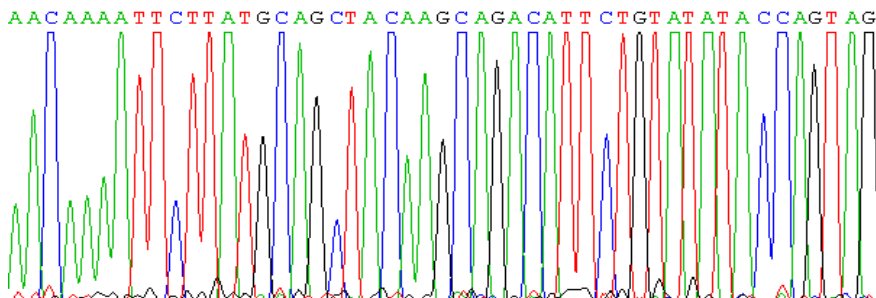
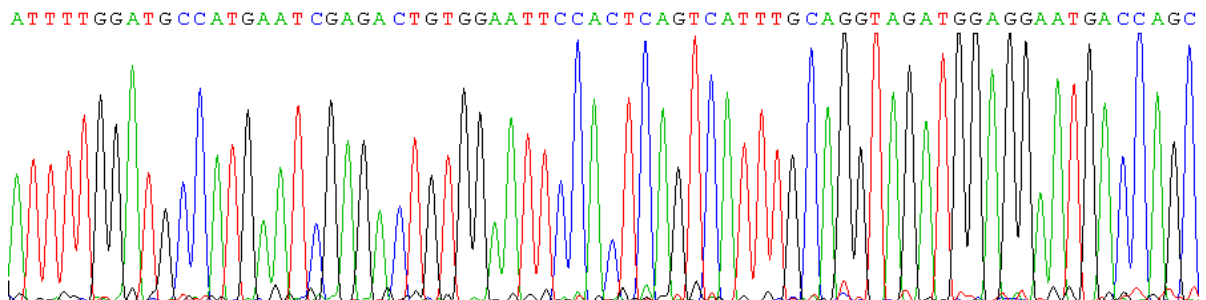


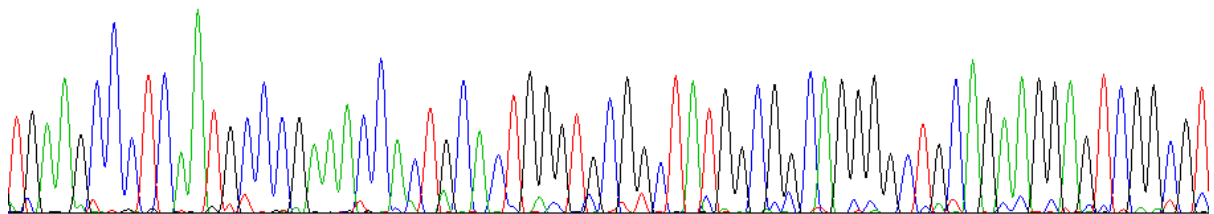
Abbildung 20: Sequenz des Exons 15 der Tochter.

Exon 16

Position im Gen / Protein	1340-1483 / 448-495
Länge	144 bp
Basen sequenziert	100%
Forward-Primer	5' TCCCAGAGTAATGTTTCTTGT
Reverse-Primer	5' CTCCCGTGCACTAAGTCGTTTTTC
T-Anneal	57°C
Amplicon-Länge	288 bp
Bekannte Mutationen	-
Sequenzierte Probe	Patient (automatisch), Tochter (automatisch), Tochter (manuell)
Ergebnis	Sequenz gut lesbar, keine Anomalien.

Sequenz Tcccagagtaatgtttcttgtggaataactagttccttgggcatatgtaacca
caaagatattgatggaactctctctcctcagTGAAGCCCTCAATGCCCGAAAC
CACTGCACTGGGTGCGGCTATGGCGGCAGGGGCTGCAGAAGGAGTCGGCGTAT
GGAGTCTCGAACCCGAGGATTTGTCTGCCGTCACGATGGAGCGGTTTGAACCT
CAGATTAATGCGGAGGgtacatttaaagaatgaaatgttcagtgatatactgt
gaaaacgacttagtgacgggag

TGAAGCCCTCAAATGCCCGAAACCACTGCACTGGGTGCGGCTATGGCGGCAGGGGCTGCAGAAGGAGTCGGCGT



ATGGAGTCTCGAACCCGAGGATTTGTCTGCCGTCACGATGGAGCGGTTTGAACCTCAGATTAATGCGGAGG

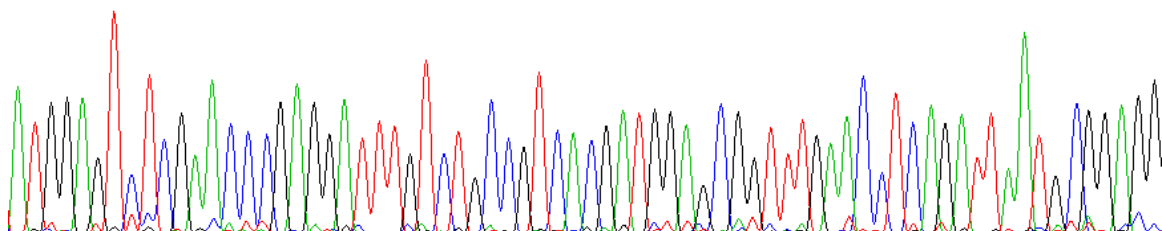


Abbildung 21: Sequenz des Exons 16 der Tochter.

Exon 17

Position im Gen / Protein 1484-1564 / 496-522
 Länge 81 bp
 Basen sequenziert 100%
 Forward-Primer 5' AGCCCTACTGCAGTTTAATGTG
 Reverse-Primer 5' TCAACCTGATAATTTACATTTTGTG
 T-Anneal 57°C
 Amplicon-Länge 385 bp

Bekannte Mutationen W503R, Ex17Del

Sequenzierte Probe Tochter (automatisch)
 Ergebnis Sequenz gut lesbar, keine Anomalien

Sequenz Agccctactgcagtttaatggtggaataatttgtcaagaatggtgagtgatca
taagtatggtactaagaacatctcagcaaactacctttcgttatggtttttt
ctaccttctaattctagAAAGTGAAATTCGTTATTCTACATGGAAGAAAGCTG
TGATGAAGTCAATGGGTTGGGTTACAACCTCAATCTCCAGAAAGTGgtaaaaat
gtttttgtttattattgtcacattttcttagtatattaaatagttatttaagt
atctaggcatttacacatagccaggctgctctgaagaaaagcattatcatatg
tccagagattctgacattttgaaaacactttaagttctaaacacaaaatgta
aattatcaggttgt

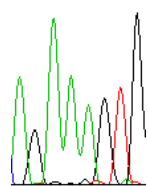
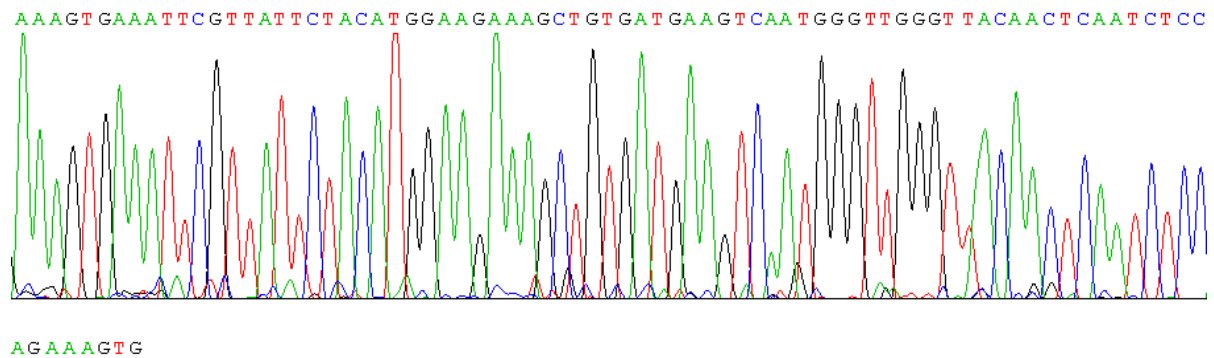


Abbildung 22: Sequenz des Exons 17 der Tochter.

Exon 18

Position im Gen / Protein 1565-1651 / 523-551
 Länge 87 bp
 Basen sequenziert 100%
 Forward-Primer 5' TGGTTTGGTTTGCTTGACTGGAA
 Reverse-Primer 5' TCTGCTAAGTTATACACGAAAACATT
 T-Anneal 57°C
 Amplicon-Länge 202 bp

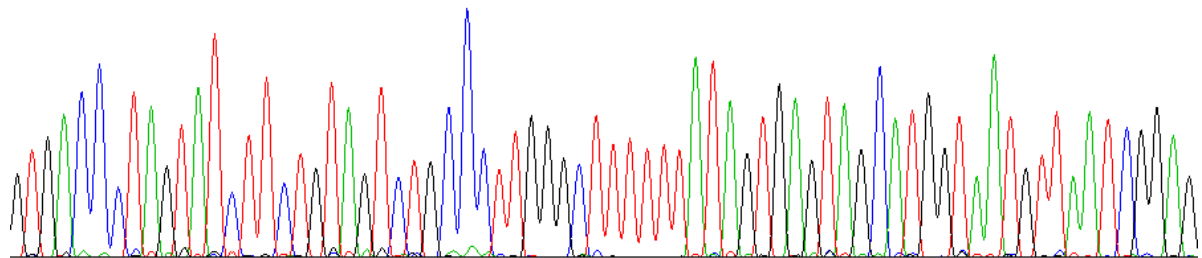
Bekannte Mutationen -

Sequenzierte Probe Tochter (automatisch)

Ergebnis Sequenz gut lesbar, keine Anomalien.

Sequenz TggtttggtttgcttgactggaatctcttctgcttggatgaccacagGTGACC
 CTAGTATCTTCTGTAGTCTGCCCTTGGGCTTTTTTATAGTGAGTAGCATGGTA
 ATGTTAATCGGAGCAAGGTACATCTCAGgtagttactctttaattagacaa
 ctctattagttagctttaatgttttcgtgtataacttagcagaaattttccag
 tgtttttcattcttctctgtgtctaggaagctggaaaatcaattaaaggtctaa
 ttagttagaccaattaatctttgggggcagttagaagtaagaactgtgactct
 gcttaccctttttaaatTTTTAATGTGATGACTTCTTTAAGAGGGACTACATT
 ctgctgtcagctgcagcaataagcaaaagtgaaaataactaatatTTAAATGAC
 aggactttcagactgactgctgaaagttaaagtatacttttgacattaattaa
 att

GTGACCCTAGTATCTTCTGTAGTCTGCCCTTGGGCTTTTTTATAGTGAGTAGCATGGTAATGTTAATCGGAG



G CAAGGTACATCTCAG

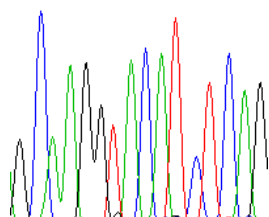


Abbildung 23: Sequenz des Exons 18 der Tochter.

Exon 19

Position im Gen / Protein	1652-1659/ 552-554
Länge	8 bp
Basen sequenziert	100%
Forward-Primer	5' ACTTCTAAAATGCATGTGGTCA
Reverse-Primer	5' CACATCTTGGGAATCCATG
T-Anneal	55°C
Amplicon-Länge	326 bp
Bekannte Mutationen	-
Sequenzierte Probe	Tochter (automatisch)
Ergebnis	Exonbereich konnte nach mehrmaligem Sequenzieren nicht erreicht werden.
Sequenz	<pre> tttttcttaaaattactggcttaaattggaaatgatgcttcttattctgtatgt tcccatgaaagtgaaacttaaaaaaaaaaattcatgattagggtttcatgaaa ggccttgtttctatgaaaattgagacagggttgcattctctctaagctaaaagat gggctatgtgtctagagtccttagacttctaaaatgcatgtgggtcactatatgt aggttatctcttcggtgacatacactgcaatttgagagggctggaaattgttt gccttggtaaacgattagcaacagtggcaatatttgtaattttggaattggc cctgtttggtgcattttaattgtgaggcatgatttagaaatcataatggacttt ctagcttaataaatgattgaatcatctgcattgctttaaactcctgaattgtat gcatgtattattgacataatggtttttgttccccatttcagGTATTCCATAA aacctaccaactcatggattcccaagatgtgagctttttacataatgaaagaa cccagcaattctgtctcttaatgcaatgacactattcatagactttgatttta tttataagccacttgctgcatgaccctccaagtagacctgtggcttaaaataa agaaaatgcagcaaaaagaatgctatagaaatatttggtggtttttttttttt ttaaacatccacagtttaagggtgggcccagctacctttggggctgaccccctcc attgccataacatcctgctccattccctctaagatgtaggaagaattcggatc cttaccattggaatcttccatcgaacataactcaaacacttttggaccaggatt tgagtctctgcatgacataacttgattaaaagggtattactaacctgtttaa aatcagcagctctttgcttttaagagacaccctaaaagtcttcttttctacat agttgaagacagcaacatcttactgaatggttgaatagaaaccttactaaa ttattaaaatagacatttagtggtctcacagcttggatatttttctgaaaagt tatttgccaaaactgaaatccttcagatggtttccatgggtcccactaattata atgactttctgtctgggtcttataggaaaagatactttctttttcttccatc tttcctttttatatttttactttgtatgtataacatacatgcctatatatatt tatacactgagggagcccatttataaataaagagcacattatattcagaaggt tctaacaggg </pre>

4. Diskussion

4.1. Die neu charakterisierte Mutation G280A

Durch DNA-Sequenzierung des Glycerinkinase-Gens des Patienten mit Glycerinkinasmangel konnten wir die bisher noch nicht beschriebene Mutation G280A im Exon 10 des Glycerinkinase-Gens identifizieren. Nun wird versucht, auf molekularer Ebene zu klären, welche Auswirkungen dieser Mutation zu erwarten sind.

Kommt es zu einem Austausch einer Aminosäure in einem Protein, wie in diesem Fall der Glycerinkinase, kann dies vielfältige Auswirkungen haben. Denkbar sind z.B.:

- Veränderungen in der Sekundärstruktur (z.B. Abbruch einer α -Helix)
- Veränderungen in der Tertiärstruktur (z.B. Verlagerung einer Domäne)
- Verlust oder Beeinträchtigung einer Bindungsstelle (z.B. ATP-Bindungsstelle)
- Beeinträchtigung der Konformationsänderung allosterischer Enzyme

Durch die beschriebenen Veränderungen kann es dann zu Funktionsverlust, einer Einschränkung oder auch zur Verstärkung der Funktion kommen.

Auffallend ist, daß es Bereiche im GK-Gen gibt, an denen sich bisher gefundene Mutationen zu häufen scheinen. Dies läßt vermuten, daß es sich hierbei um Bereiche handelt, in denen der Austausch einer Aminosäure zu funktionsbeeinträchtigenden Konsequenzen wie den oben genannten führt, was zur Folge hat, daß der Mutationsträger durch die phänotypische Ausprägung (Hyperglycerinämie) auffällig wird.

Es ist anzunehmen, daß bestimmte Mutationen zu einer stärkeren Aktivitätseinschränkung führen als andere. Da jedoch keine ausreichenden Daten vorliegen, kann eine direkte

Beziehung zwischen Mutationsposition und Grad der Einschränkung der Enzymaktivität noch nicht hergestellt werden.

Das Alignment (engl.: Aufstellung, Ausrichtung; Abb. 25) zeigt die Lokalisation bisher bekannter Missens-Mutationen mit abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener prokaryoter und eukaryoter Organismen.

In der Evolution erhaltenegebliebene (konservierte) Aminosäuren lassen vermuten, daß sie eine wichtigere Rolle für die Funktion des Gens darstellen, als solche, die starke Variabilität zeigen.

Dabei betreffen die Missens-Mutationen D198G, T278M, N288D, Q438R, D440V und W503R Aminosäuren, die sowohl bei den Eukaryonten als auch bei den Prokaryonten identisch sind.

Die Aminosäuren an den Positionen der Missens-Mutationen C256R, R405Q und M428T sind nur bei den Eukaryonten identisch.

Die von uns gefundene Mutation G280A befindet sich an einer Stelle, die sowohl bei den Eukaryonten als auch bei den Prokaryonten identisch ist. Somit kann man eine besondere Wichtigkeit dieser hochkonservierten Aminosäure für die Funktion des Enzyms vermuten.

Die Mutation bewirkt einen Austausch der polaren Aminosäure Glycin gegen das unpolare hydrophobe Alanin. Dies kann ggf. zu einer Strukturveränderung im Enzym führen, denn im Gegensatz zur Aminosäure Glycin, die als α -Helix-destabilisierend gilt, fördert Alanin die Bildung einer α -Helix. Eine solche Strukturveränderung kann vielfältige Auswirkungen auf die Funktion des Enzyms haben, wie z.B. Störung der Substratbindung oder der katalytischen Reaktion. Da die Glycerinkinase zu den allosterischen Enzymen gehört, ist auch denkbar, daß durch eine Strukturveränderung der Konformationsübergang negativ beeinflusst wird, was eine Affinitätsminderung für die Liganden zur Folge haben könnte. Da sich beide

Aminosäuren jedoch nur durch die zusätzliche CH_3 -Gruppe des Alanins unterscheiden, und ein solcher Austausch aufgrund dieses geringen Unterschiedes als „konservativer Austausch mit minimalen Auswirkungen auf die Proteinstruktur“ (Majewski et al. 2003) bzw. „akzeptierter Polymorphismus“ gelten könnte, lässt sich dadurch der Funktionsverlust der Glycerinkinase nur unbefriedigend erklären. Daher stellt sich die Frage, ob diese Aminosäure für die Funktion des Enzyms eine spezielle Rolle spielt.

Um festzustellen, in welcher Beziehung die Mutation zu den Interaktionsbereichen der Glycerinkinase steht, kann man zu diesem Zweck die E. Coli Glycerinkinase betrachten. Diese ist im Gegensatz zur humanen GK bereits röntgenkristallographisch untersucht, und die dreidimensionale Struktur (Abbildung 24) und Ligandenbindungsstellen sind weitgehend bekannt. Ihre Aminosäuresequenz ist mit der der humanen GK zu 50% identisch und zu 65% ähnlich (Guo et al. 1993, Walker et al 1993).

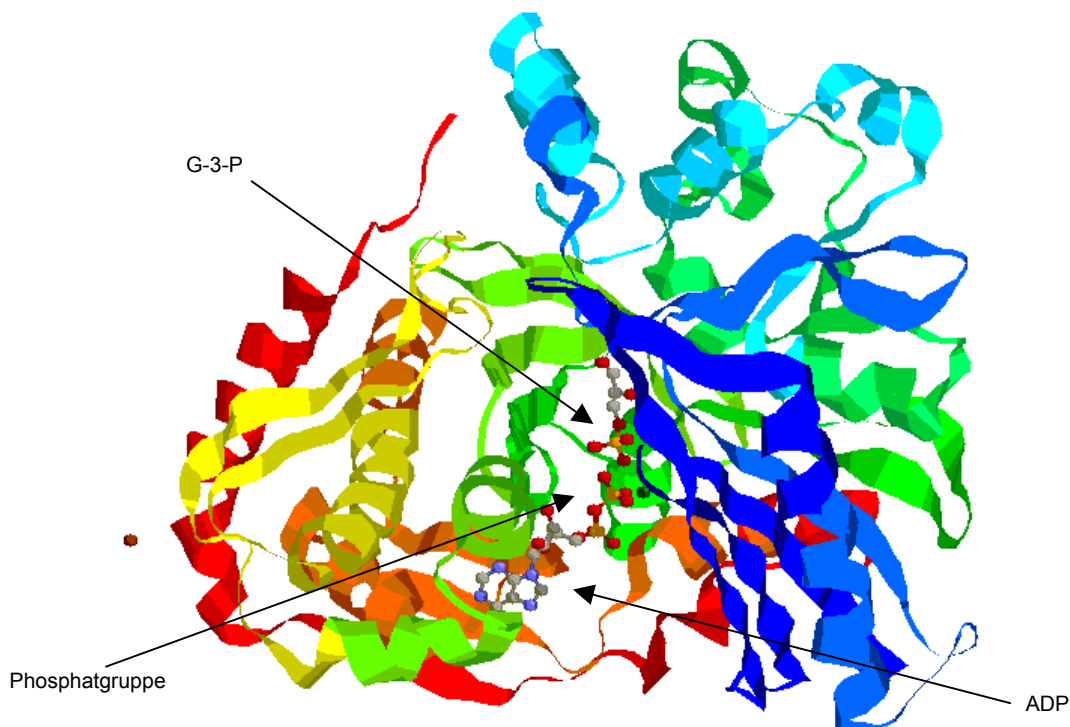


Abbildung 24: E. coli Glycerinkinase mit gebundenem ADP und Glycerin-3-Phosphat (G-3-P) im Reaktionszentrum. Zwischen diesen beiden Liganden katalysiert das Enzym den Austausch einer Phosphatgruppe (hier bereits an Glycerin gebunden).

In Alignment Abbildung 25 erkennt man, daß sich in Umgebung der Mutation G280A die Aminosäuresequenzen der E. coli GK und der humanen GK über 10 Aminosäuren gleichen. Die Position 280 entspricht dabei der Position 266 in der Aminosäuresequenz der E. coli GK. Aus Tabellen 1 und 2 und Abbildung 26a wird ersichtlich, daß es sich bei diesem Glycin um eine ATP-Bindungsstelle in Form einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Sauerstoffatom des Glycins und einem Sauerstoffatom des ATP handelt (Datenbank des Weizmann-Instituts).

Abbildung 27 stellt schematisch die ATP-Bindung am Enzym dar. Diese Bindung wird hauptsächlich durch fünf Aminosäuregruppen ausgeübt (Abb. 26b), die im Alignment (Abb. 25) durch schraffierte Bereiche gekennzeichnet sind.


Aufgrund der Ähnlichkeit des gesamten Bindungsbereichs (es sind auch die umgebenden Aminosäuren Tyr265 und Thr267 an der Bindung beteiligt) mit dem entsprechenden Bereich der humanen GK, kann man davon ausgehen, daß auch das humane Glycin 280 an der ATP Bindung beteiligt ist.

Ein Austausch des Glycins durch Alanin bewirkt eine Einführung einer CH₃-Gruppe im Bindungsbereich. Dies könnte mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Destabilisierung der ATP-Bindung führen, und damit die Phosphorylierungsreaktion beeinträchtigen.

Betrachtet man Abb.26c, fällt zudem die enge topographische Beziehung des Glycins 266 zum Substrat Glycerin auf. Aus Tabellen 3 und 4 ist ersichtlich, daß bereits die ersten beiden Nachbaraminosäuren Threonin 267 und Glycin 268 an der Glycerinbindung beteiligt sind.

Auch dies läßt vermuten, daß eine zusätzliche Einführung einer CH₃-Gruppe an Position 266 zu einer Störung der katalytischen Reaktion führt.

Abb. 25: Alignment (engl.: Aufstellung, Ausrichtung) verschiedener GK-Sequenzen ausgewählter Organismen. Grau hinterlegt und mit Pfeil gekennzeichnet sind bisher bekannte Missense und Nonsense Mutationen der humanen GK bei Patienten mit Hyperglycerinämie. Die schraffierten Gebiete markieren Aminosäuregruppen, die bei E. Coli an der ATP-Bindung beteiligt sind. Eine Erklärung der Abkürzungen befindet sich am Ende des Alignments.

	1	15	16	30	31	45	46	60	61		76	90		
1	Q63060GLPK_RAT	---	---	---	---	---	---	MAAAKAVL	GPLVGAVDQGTSTR	FLVFN	SKTAE	LLSHH	39	
2	Q64516GLPK_MOUSE	---	---	---	---	---	---	MAAAKAVL	GPLVGAVDQGTSTR	FLVFN	SKTAE	LLSHH	39	
3	P32189GLPK_HUMAN	---	---	---	---	---	---	MAAAKAVL	GPLVGAVDQGTSTR	FLVFN	SKTAE	LLSHH	39	
4	P08859GLPK_ECOLI	---	---	---	---	---	---	---	KKYIIVALDQGTSTR	A-VVMD	HANI	ISVS	31	
5	P44400GLPK_HAEIN	---	---	---	---	---	---	---	KKYIIVALDQGTSTR	AVLLDH	NANV	VEIA	31	
6	Q51390GLPK_PSEAE	---	---	---	---	---	---	---	KKYVVALDQGTSTR	AVFDR	DANV	VVQA	34	
7	O34153GLPK_ENTCA	---	---	---	---	---	---	---	KNYVVAIDQGTSTR	AIIFDR	NGK	IGSS	31	
8	O34154GLPK_ENTFA	---	---	---	---	---	---	---	EKYIIVALDQGTSTR	AIIFDR	KNK	IGSSA	32	
9	P18157GLPK_BACSU	---	---	---	---	---	---	---	ETYIILSDQGTSTR	AILFN	KEG	KIVHSA	30	
10	P95907GLPK_SULSO	---	---	---	---	---	---	---	GGFIIAIDEGTSTR	AIIYN	QDLE	VLGIG	31	
11	P47284GLPK_MYCGE	---	---	---	---	---	---	---	KKQYIIVALDEGTSSC	RSIVF	DHNLN	QIAIA	33	
12	P75064GLPK_MYCPN	---	---	---	---	---	---	---	KQOYIIVALDEGTSSC	RTIVF	DKD	LNQV	IAIA	33
13	P74260GLPK_SYNY3	---	---	---	---	---	---	---	HNQYVMAIDLGTGTGN	RAILF	DEYEG	NIVGQA	32	
14	P32190GLPK_YEAST	ASIDVGTSSRCILF	NRWGQVSKHQIEYS	TSASKGIGVSGLR	PSTAPARETPNAGDI	---	---	---	KTSGKPIFSAEGYAI	QETKFL	KIEE	LDDLDF	139	
15	O29395_A.Fulg	---	---	---	---	---	---	---	---	MIGVI	DA	GTTTTI	KLAVYDEDKLVAIKK	27

	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180										
1	Q63060GLPK_RAT	QVEIKQEFPPREGWVE	QDPKEILQSVYECIE	KTCEKLGQL	---	---	---	NIDISNIKAI	GVSN	QRETT	VVW	DKLTGEP	LYN-AVVWLDLRTQS	121								
2	Q64516GLPK_MOUSE	QVEIKQEFPPREGWVE	QDPKEILQSVYECIE	KTCEKLGQL	---	---	---	NIDISNIKAI	GVSN	QRETT	VVW	DKLTGEP	LYN-AVVWLDLRTQS	121								
3	P32189GLPK_HUMAN	QVEIKQEFPPREGWVE	QDPKEILHLSVYECIE	KTCEKLGQL	---	---	---	NIDISNIKAI	GVSN	QRETT	VVW	DKLTGEP	LYN-AVVWLDLRTQS	121								
4	P08859GLPK_ECOLI	QREFEQIYPPKPGWVE	HDPMEI	IWATSSTLV	EVLAKA	---	---	---	---	DISSD	QIAAIGITN	QRETTIVMEKETGPK	IYN-AIVWQCRRTAE	110								
5	P44400GLPK_HAEIN	QREFEQIYPPKPGWVE	HNPMEI	IWATSSTLN	EVVAKA	---	---	---	---	---	---	QRETTIVMEKSTGTP	VYN-AIVWQCRRTAD	110								
6	Q51390GLPK_PSEAE	QREFAQFYPPQAGWVE	HDPMEI	WATSSTLV	EALAQ	---	---	---	---	---	---	QRETTIVVMDRHSGRP	IHN-AIVWQCRSAA	114								
7	O34153GLPK_ENTCA	QKEFFQYFPKSGWVE	HNANEI	WNSVQSVIA	GAFIES	---	---	---	---	---	---	QRETTIVVWDKTTGQP	IAN-AIVWQSRQSSP	110								
8	O34154GLPK_ENTFA	QKEFTQYFPNAGWVE	HNANEI	WNSVQSVIA	GSLIES	---	---	---	---	---	---	QRETTIVVWDKATGLP	IYN-AIVWQSRQTPP	111								
9	P18157GLPK_BACSU	QKEFTQYFPHPGWVE	HNANEI	WNSVQSVIA	SVISES	---	---	---	---	---	---	QRETTIVVWDKDTGSP	VYN-AIVWQSRQTS	109								
10	P95907GLPK_SULSO	QYDFPQHYPSPGYVE	HNPDEI	WNAQMLAIK	EAMKKA	---	---	---	---	---	---	QRETTILWD	DAISGPK IYN-AIVWQDRRTSN	110								
11	P47284GLPK_MYCGE	QNEFN	TFPNSPGWVE	QDPLEI	WSAQLATM	Q	SAK	KA	---	---	---	QRETTIVLW	NKENG	GLP VYN-AIVWQDRTAA	112							
12	P75064GLPK_MYCPN	QNEFN	QFFPKSGWVE	QDPLEI	WSVQLATM	Q	SAK	KA	---	---	---	QRETTIVLW	NKENG	GLP VYN-AIVWQDRTAS	112							
13	P74260GLPK_SYNY3	YKELTQ	FYPKAGWVE	HDALEI	WRD	TKVTM	Q	EVVQKT	---	---	---	QRETTCLL	WDK	TTGQP LHP-AIVWQDRFAH	111							
14	P32190GLPK_YEAST	HNEPTL	KFFPKPGWVE	CHPQK	LLVNVVQCLA	SLLS	LT	IN	SERVA	NGL	PPYKVICM	GIAN	MRETTIL	MSRR	TGPK IVNXYGI	VW	ND	TRTIK	229			
15	O29395_A.Fulg	EPVVK	-HNP	KPGWVE	IDAED	LARKCVS	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	VFN-	AL	GW	DM	FRANA	100

181 195 196 210 211 225 226 240 241 255 256 270
1 Q63060GLPK_RAT TVEKLSKRI-P--GN NNFVKSKTGLPLS-T YFSAVKLRWLLDNVK KVQEA-----VEENRALF GTIDSWLIWLSLTGGI 190
2 Q64516GLPK_MOUSE TVENLSKRI-P--GN NNFVKSKTGLPLS-T YFSAVKLRWLLDNVK KVQEA-----VEENRALF GTIDSWLIWLSLTGGI 190
3 P32189GLPK_HUMAN TVESLSKRI-P--GN NNFVKSKTGLPLS-T YFSAVKLRWLLDNVR KVQKA-----VEEKRALF GTIDSWLIWLSLTGGV 190
4 P08859GLPK_ECOLI ICEHLKRDG-----L EDYIIRNSNTGLVID-P YFSGTVKVKWILDHVE GSRER-----ARRGELLF GTVDTWLIWKMKTQG-- 176
5 P44400GLPK_HAEIN ITDKLKADG-----H EYIIRNTTGLVVD-P YFSGTVKVKWILDNE GAREK-----AERGELLF GTVDTWLVVWKLTFQG-- 176
6 Q51390GLPK_PSEAE ICAQLKRDG-----L EDYIRETTGLVTD-P YFSGTVKVKWILDNE GAREK-----AERGELLF GTIDTWLVVWKLTFEG-- 180
7 O34153GLPK_ENTCA IADQLKVDG-----H TEMIHEKTGLVID-A YFSATKVRWLLDNIE GAQEK-----ADNGELLF GTIDTWLVVWKLTFD-- 176
8 O34154GLPK_ENTFA IADQLKEDG-----Y SEMIHEKTGLIID-A YFSATKVRWLLDNVE GAQEK-----ADNGELLF GTIDTWLVVWKLTFG-- 176
9 P18157GLPK_BACSU ICEELREKG-----Y NDKFKREKTGLIID-P YFSGTVKVKWILDNE GAREK-----AERGELLF GTIDTWLVVWKMMSG-- 175
10 P95907GLPK_SULSO ITDWLKEN-----Y FGMIKDKTGLIPD-P YFSGSKIKWILDNLP NVRSK-----AEKGEIKF GTIDTWLVVWKLTFG-- 175
11 P47284GLPK_MYCGE LCQKFNEDK-L---I QTKVKQKTGLPIN-P YFSATKIAWILKNVP LAKKL-----MEQKLLF GTIDSWLIWKLTFNG-- 179
12 P75064GLPK_MYCPN LCDKLNQDT-K---I KEFVKKHTGLPIN-P YFSATKIAWILENVP LAQKM-----LKEDKLLA GTIDTWLIWKLTFGG-- 179
13 P74260GLPK_SYNY3 FCGELTAAG-----Y VDEIYERTGLVLD-A YFSGTVKVKWILDNVE QSKS-----VDPANLLA GTIDSWALWNLTFGG-- 176
14 P32190GLPK_YEAST IVRDKWQNTSV--DR QLQLRQKTGLPLLST YFSCSKLRWFLDNEP LCTKA-----YEENDLMF GTVDTWLIYQLTFKQ-- 299
15 O29395_A.Fulg LAEMNRDSTIRMAR TAGMIARGVVKLLLPT LKNRRRVKWLITLSR LSIRPNHTSVKLCWM LRELGEKKEKYDLKA GTVDSWLVYRLTFG-- 188

271 285 286 300 301 315 316 330 331 345 346 360
1 Q63060GLPK_RAT NGGVHCTDVTNASRT MLFNIHSLEWDKELC EFFGIPM--EILPNV RSSSEIYGLMKAGAL EG-----VPISGGLGDQ 260
2 Q64516GLPK_MOUSE HGGVHCTDVTNASRT MLFNIHSLEWDKELC EFFGIPM--EILPNV RSSSEIYGLMKAGAL EG-----VPISGGLGDQ 260
3 P32189GLPK_HUMAN NGGVHCTDVTNASRT MLFNIHSLEWDKQLC EFFGIPM--EILPNV RSSSEIYGLMKAGAL EG-----VPISGGLGDQ 260
4 P08859GLPK_ECOLI --RVHVTDYTNASRT MLFNIHTLDWDDKML EVLDIPR--EMLPEV RRSSEYVGTNIGGK GG--T-----RIPISGAGDQ 246
5 P44400GLPK_HAEIN --RVHVTDYTNASRT MLFNIHTKQWDDKML EILNIPR--SMLPEV RNSSEIYGTNIGGK GG--V-----RIPVAGAGDQ 246
6 Q51390GLPK_PSEAE --KVHVTDYTNASRT MLFNIHSRDWDARML EVLDIPR--SMLPEV RNSSEYVGNARIGGV GG--G-----ELPIAGAGDQ 250
7 O34153GLPK_ENTCA --QVHVTDYSNASRT MLYNIHKLEWDQEIL DLLNIPS--SMLPEV KSNSEVYGHTRSYPH YG--S-----EVPVAGAGDQ 246
8 O34154GLPK_ENTFA --DTHVTDYSNASRT MLFNIHDLKWDQDQLL DLLNIPR--VMLPKV VSNSEVYGLTKNYHF YG--S-----EVPVAGAGDQ 246
9 P18157GLPK_BACSU --KAHVTDYSNASRT LMFNIYDLKWDQDQLL DILGVPK--SMLPEV KPSSHVVAETVDYHF FG--K-----NIPVAGAGDQ 245
10 P95907GLPK_SULSO --KIHVTDYSNASRT MLFNINKLEWDREIL ELLKIPE--SILPEV RPSDDIYGYTEVLG--S-----SIPISGAGDQ 242
11 P47284GLPK_MYCGE --KMHTVDVSNASRT LLDIVKMEWSKEIC DLFEVVP--SILPKV LSSNAYFGDIETNHW SSSNAKG-----IVPIRVLGDQ 253
12 P75064GLPK_MYCPN --KMHTVDVSNASRT LLDFTITMTWSQELG DIFKVPV--SILPKV MPNSAHFGDIVPSSHV STSATG-----MVPVIRGAGDQ 253
13 P74260GLPK_SYNY3 --KVHRTDHSNASRT MVLNLDLSLIWDEKLL DLFTIPA--QIMPEV QPSLSYFGVTDPEIL G-----V-----EIPITAFGDQ 245
14 P32190GLPK_YEAST --KAFVSDVTNASRT GFMNLSLTKIWDNELL EFWGIDKNLIHMPEI VSSSQYVGFDFGIPDW IMEKLHDSPKVTILRD LVKRNLPVQGLGDQ 387
15 O29395_A.Fulg ---EHLTVDYSSNAAT GLDYSYLRWSEPIIL KIVGADE--EMLPKT LESDRIFGEYRNVV-
↑

D198G
C256R

361 375 376 390 391 405 406 420 421 435 450
1 Q63060GLPK_RAT SAALVGQMCFDGQA KNTYGTGCFLLCNTG HKCVFSEHGLLTTVA YKLGK----- DKPVYVALEGSVAIA GAVIRWLRDNLGLIK 340
2 Q64516GLPK_MOUSE SAALVGQMCFDGQA KNTYGTGCFLLCNTG HKCVFSEHGLLTTVA YKLGK----- DKPVYVALEGSVAIA GAVIRWLRDNLGLIK 340
3 P32189GLPK_HUMAN SAALVGQMCFIQGA KNTYGTGCFLLCNTG HKCVFSDHGLTTVA YKLGK----- DKPVYVALEGSVAIA GAVIRWLRDNLGLIK 340
4 P08859GLPK_ECOLI QAALFGQLCVKEGMA KNTYGTGCFMLMNTG EKAVKSENGLLTTIA CGP----- TGEVNVYALEGAVFMA GASIQWMLRDEMMLIN 324
5 P44400GLPK_HAEIN QAALYGHLCVHAGQA KNTYGTGCFMLLHTG NKAITSKNGLTTIA CNA----- KGEPEYALEGSVFIA GASIQWMLRDELKIVH 324
6 Q51130GLPK_PSEAE QAALFGQMCVEFGQA KNTYGTGCFLLMHTG DKAVKSTHGLTTIA CGP----- RGEVGYALEGAVFNG GSTVQWMLRDELKVIN 328
7 O34154GLPK_ENTCA QAALFGQMAFEKGM I KNTYGTGAFIVMNTG EEPQLSDNDLLTTIG YGI----- NGKVYVALEGSIFVA GSAIQWMLRDLGLRMIE 324
8 O34154GLPK_ENTFA QAALFGQMAFEKGM I KNTYGTGGSFIVMNTG EEPQLSKNLLTTIG YGI----- NGKVYVALEGSIFVA GSAIQWMLRDLGLKMLQ 323
9 P18157GLPK_BACSU QAALFGQACFEFEGM I KNTYGTGCFMLMNTG EKAIKSEHGLLTTIA WGI----- DGKVNVALEGSIFVA GSAIQWMLRDLGLRMFQ 324
10 P95907GLPK_SULSO QAALFGQVAYDMGEV KSTYGTGCFILMNTG SNPIFSENLLTTIAM GLE----- SKRVTYVALEGSIFIT GAAVQWFRDGLRAID 320
11 P47284GLPK_MYCGE QAALFGQLCTEPEGM I KNTYGTGCFVLMNTG DKPTLSKHLLTTIVA WQLE----- NHPPVYVALEGSVFVA GAAIKWLRDALKIY 331
12 P75064GLPK_MYCPN QAALFGQLCVERPAM I KNTYGTGCFMLMNTG NELKYSQHLLTTIVA WQLE----- NQKPVYVALEGSVFVA GAALKWLRDLSLKVMY 331
13 P74260GLPK_SYNY3 QAALYAHGCDRPLGL KCTYGTGAFLVANTG QTVTRSQRLLSTVA WTQTNRDK----- SLTRDYALEGSMFVA GSCVQWMLRDKLGLIE 328
14 P32190GLPK_YEAST SASMVGQLAYKPGAA KCTYGTGCFLLYNTG TKKLIHQHGALTTIA FWFPHLQEXGGQKPE LSKPHFALEGSVAIA GAVVQWMLRDNLRLLID 477
15 O29395_A.Fulg SASLYALGCWEEGDI KATNGTGTGFVDLNVG EEPQASPGGLLPLIA WKLKS----- --EMRYMMEGMLFYS GSAVEKLEIGIYDD 328

T278M G280A N288D A305V R310X

465 466 480 481 495 496 510 511 525 526 540
1 Q63060GLPK_RAT SSEEIEKLAKEVG-T SYGCFVVPAFSALYA PYWEPARGIICGLT QFTNKCHIAFAALEA VCFQTRREILDAMNRD CG----- 416
2 Q64516GLPK_MOUSE SSEEIEKLAKEVG-T SYGCFVVPAFSGLYA PYWEPARGIICGLT QFTNKCHIAFAALEA VCFQTRREILDAMNRD CG----- 416
3 P32189GLPK_HUMAN TSEEIEKLAKEVG-T SYGCFVVPAFSGLYA PYWEPARGIICGLT QFTNKCHIAFAALEA VCFQTRREILDAMNRD CG----- 416
4 P08859GLPK_ECOLI DAYDSEYFATKVQ-N TNGVYVVPFAFTGLGA PYWDPYARGAIFGLT RGVNANHIIIRATLES IAYQTRDVLAMQAD SG----- 400
5 P44400GLPK_HAEIN DSFDSEYFAQKVT-D SNGVYVVPFAFTGLGA PYWDPYARGAIFGLS RGNRNHIVRATLES IAYQTRDVLAMQSD SG----- 400
6 Q511390GLPK_PSEAE DSFDSEYFATKVK-D SNGVYLVPAFTGLGA PYWDPYARGAVFGLT RGVKADHLIRATLES IAYQTRDVLAMQRD AG----- 404
7 O34153GLPK_ENTCA TSPQSEELAAKAK-G DNEVYVVPFAFTGLG HNEVYVVPFAFTGLG PYWDSQARGAVFGLT RGTTKEDFVRATLQA VAYQSKDVIDTMKID SG----- 400
8 O34154GLPK_ENTFA TAAESEAVAKAST-G HNEVYVVPFAFTGLG HNEVYVVPFAFTGLG PYWDSQARGAVFGLT RGTTRDFVKATLQA VAYQVRDIIIDTMKED TG----- 400
9 P18157GLPK_BACSU DSSLSESYAEKVD-S TDGVYVVPFAFVGLGT PYWDSVVRGVSFGLT RGTTKEHFIRATLES IAYQTRDVLAMQAD SN----- 399
10 P95907GLPK_SULSO ASDDIEPLAASVP-D TGGVYVVPFAFVGLGA PYWDPYARGAIFGLT RGTTKAHIRATLES IAYQNRDVIEMKE SG----- 396
11 P47284GLPK_MYCGE SEKESDFYAEELAKEN EQNLVFPVPAFVGLGA PYWDSASARGIILGIE ASITKREHIVKASLES IAFQANDLLNAMASD LG----- 408
12 P75064GLPK_MYCPN SAAESDFYAKLAQKE EQEVVFPVPAFTGLGA PYWDSASARGAIFGLT ANTKREHLVKATLES IAFQANDLLKAMASD LN----- 408
13 P74260GLPK_SYNY3 SAAASELARSVD-S NGGVYVFPALSGLGA PHWDMNACGAFIOLG AGVTKAHLVRSVLEA IAFQAREVVEAINQD SP----- 404
14 P32190GLPK_YEAST KSEDEVGPIASTV-P D SGGVYVVPAFVGLGA PYWDPDARATIMGMS QFTTASHIARAASVEG VCFQARAILKAMS SD AFGEGSKDRDFLEEI 566
15 O29395_A.Fulg VSKTSEMAFRSKN-- DD-MLLIPSFTGLAT PHYVSV-P-GLLYGIS NAMTREDIVKALLES IAFRIAEIIVEIMRKE FP----- 401

Q403X R405Q R413X

1	Q63060GLPK_RAT	541	555	555	570	571	585	586	600	601	615	616	630
2	Q64516GLPK_MOUSE		---	IPLSHLQV	DGGMTSNKILMQLQA	DILY	--	IPVVKPSMP	ETTALGAAMAAGAAE	GVGVMS	---	---	LEP 476
3	P32189GLPK_HUMAN		---	IPLSHLQV	DGGMTSNKILMQLQA	DILY	--	IPVVKPSMP	ETTALGAAMAAGAAE	GVGVMS	---	---	LEP 476
4	P08859GLPK_ECOLI		---	IRLHALRV	DGGAVANNFLMQLQA	DILG	--	TRVERPEVR	EVTALGAAYLAGLAV	GFWQNL	---	---	DEL 460
5	P44400GLPK_HAEIN		---	ERLQYLRV	DGGATNNFLMQLQA	DILD	--	VNVERPVVK	EVTALGAAYLAGLAT	GFWKDL	---	---	DEL 460
6	Q511390GLPK_PSEAE		---	ERLRALRV	DGGAVANNFLMQLQA	DILG	--	TRVERPVMR	ETTALGAAYLAGLAC	GFWSSL	---	---	DEL 464
7	O34154GLPK_ENTCA		---	IDIPLLKV	DGGAANDLLMQLQA	DILD	--	IDVQRAANL	ETTALGAAYLAGLAV	GFWKDL	---	---	DEL 460
8	O34154GLPK_ENTFA		---	IDIPVLKV	DGGAANDLLMQLQA	DILN	--	TAVQRAANL	ETTALGAAYLAGLAV	GFWKDL	---	---	EEL 460
9	P18157GLPK_BACSU		---	ISLKTLRV	DGGAANNFLMQLQA	DLN	--	VPVERPEIN	ETTALGAAYLAGLAV	GFWKDR	---	---	SEI 459
10	P95907GLPK_SULSO		---	TKINILKV	DGGAKDNLMLMQLQA	DILG	--	IRVVRPKVM	ETASMGVAMLGLAI	NYWNSL	---	---	NEL 456
11	P47284GLPK_MYCPN		---	YKITSIKA	DGGIVKSNYLMQLQA	DIAD	--	IRVVISPKNK	ETTAVGVCFLAGLAV	GFWKDI	---	---	HQL 468
12	P75064GLPK_MYCPN		---	SSIKKIKV	DGGACNSNYLMQLQA	DIAN	--	LEVIIPKNV	ETTTTMGAFFLAGLAV	NYWKDT	---	---	KQL 468
13	P74260GLPK_SYNY3		---	APIQQLKV	DGGACNNDFLMQLQA	DVLG	--	IPVERPAVL	DATAQGAFFGAGLKI	GWN	---	---	458
14	P32190GLPK_YEAST		---	SDVTYEKSPLSVLAV	DGGMSRSNEVMQLQA	DILG	PCVKVRRSPTA	ECTALGAAIANMAF	KDVNERPLWKDLHDV	KKWVFYNGMEKNEQI	---	---	656
15	O29395_A.Fulg		---	YETDRIRC	DGEMSSNDFFLQRIA	DVTG	--	LKVERGAVL	SGTSFGAHLVAGRAL	GRWK	---	---	456

M428T Q438R D440V

1	Q63060GLPK_RAT	631	645	646	660	661	675	676	690
2	Q64516GLPK_MOUSE		EDLSAVTMERFEPQI	NAEESIYSTWKKA	VMKSI	GWVTTQSPES	GIP	---	524
3	P32189GLPK_HUMAN		EDLSAVTMERFEPQI	NAEESIYSTWKKA	VMKSI	GWVTTQSPES	GIP	---	524
4	P08859GLPK_ECOLI		QEKAVIERE-FRPGI	ETTERNRYAGWKKA	VKRAM	WEHDE	---	---	501
5	P44400GLPK_HAEIN		RDKARVERT-FSPDS	DNEKRERRYKGMKKA	VKRSLE	WAKEDEE	---	---	502
6	Q511390GLPK_PSEAE		KSKAVIERV-FEPEC	DEPRREKLYAGWKKA	VERTRG	WDDGEL	---	---	505
7	O34153GLPK_ENTCA		KSMEEGQM-FTPEM	PAEERDNLIEGKQA	VAATQ	TFKFKAKKEG	E	---	505
8	O34154GLPK_ENTFA		KAFOEEGQQ-FEPIM	AEEREEDLYEGWQA	VAATQ	QFKRKNK	---	---	501
9	P18157GLPK_BACSU		ANQWNLDKR-FEPEL	EEEKRNELYKGMKKA	VKAAMA	FK	---	---	496
10	P95907GLPK_SULSO		KQKWTVDKE-FIPSI	NKEERERRYNAMKEA	VKRSLE	GWEKSLGSK	---	---	499
11	P47284GLPK_MYCPN		EKLTTLDKK-FKSTM	DPNIRKTKINSWKKA	VERALK	WKEID	---	---	508
12	P75064GLPK_MYCPN		EKLGTIAKQ-FKSQM	NQTVREKSKRWNEA	VKRTL	KWASLD	---	---	508
13	P74260GLPK_SYNY3		---QLQIRF-FRTRFH	HGTISLICLQFLPMR	IQEGV	SVDQ	---	---	493
14	P32190GLPK_YEAST		SPEAHPNLKIFRSES	DDAERRKHWKYWEVA	VERSKG	LKDIEGEH	EQVLEN	FQ	709
15	O29395_A.Fulg		KDFCMPFDKVFEPSP	DLSEKYRRWKRLLEI	SKLKV	---	---	---	492

Abkürzungen:
 ECOLI: E.coli,
 HAEIN: Haemophilus influenzae
 PSEAE: Pseudomonas aeruginosa
 ENTCA: Enterococcus casseliflavus
 ENTFA: Enterococcus faecalis
 BACSU: Bacillus subtilis
 SULSO: Sulfolobus solfataricus
 MYCGE: Mycoplasma genitalium
 MYCPN: Mycoplasma pneumoniae
 SYNY3: Synecocystis PCC 6803
 YEAST: Saccharomyces cerevisiae
 A.Fulg: Archaeoglobus fulgidus

W503R

Somit läßt sich die Möglichkeit einer Funktionsbeeinträchtigung der Glycerinkinase trotz des potentiell als „akzeptierter Polymorphismus“ geltenden Austausches von Glycin durch Alanin durch die besondere Beziehung des Glycins zum Reaktionszentrum erklären.

Auch bei anderen Krankheitsbildern wurden schon Glycin→Alanin Mutationen berichtet, so z.B.

- Phenylketonurie: Mutation Gly83Ala im GTPCH Gen, einem Enzym, das die Synthese von 7,8-Dihydroneopterin Triphosphat aus GTP katalysiert. (BioMDB Database)
- STGD (Stargadt disease), eine juvenile Macula Degeneration. Mutation Gly863Ala / 2588G→C im ATP-bindenden Transporter Gen (ABCR). (Shroyer et al. 2001)
- Morbus Wilson: Gly626Ala im ATP7B Gen (GeneDis Database)
- Morbus Krabbe (Globoid Zell Dystrophie): Gly178Ala im GALC Gen (GeneDis Database)
- Morbus Alzheimer: Mutation Gly384Ala im PS-1 Gen (Lévesque et al.), Gly692Ala im APP Gen (Hendriks et al. 1992)

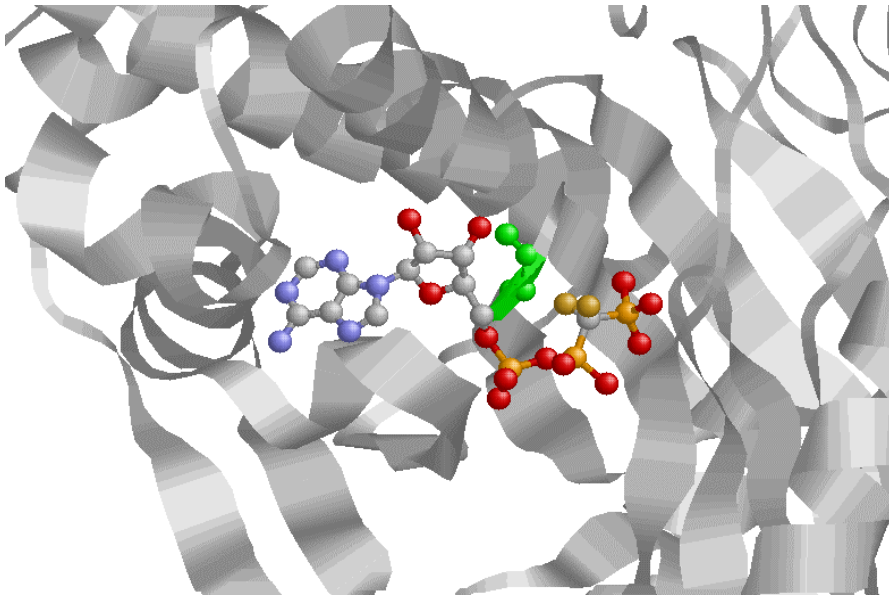


Abb. 26a: ATP-Bindungsstelle der E. coli Glycerinkinase bei gebundenem ATF, einem ATP-Analogen. Glycin 266, das dem Glycin 280 der humanen GK entspricht, ist grün hervorgehoben.

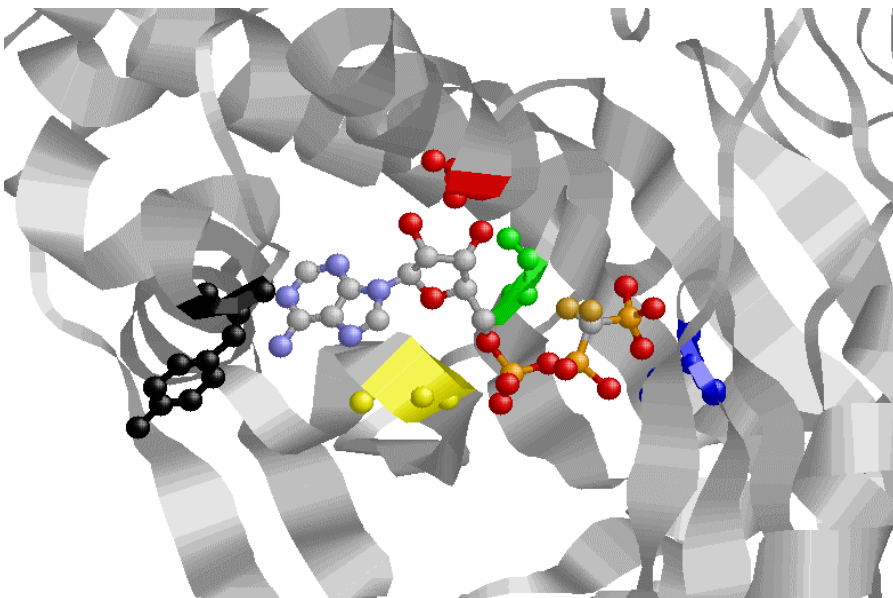


Abb. 26b: Entspricht der vorhergehenden Abbildung, zusätzlich sind jeweils eine Aminosäure der fünf hauptsächlich an der ATP-Bindung beteiligten Aminosäuregruppen hervorgehoben (vergleiche Abbildung 27).

Blau: Gruppe 1, Serin 15
 Grün: Gruppe 2, Glycin 266
 Rot: Gruppe 3, Glycin 310
 Schwarz: Gruppe 4, Tyrosin 327
 Gelb: Gruppe 5, Glycin 411

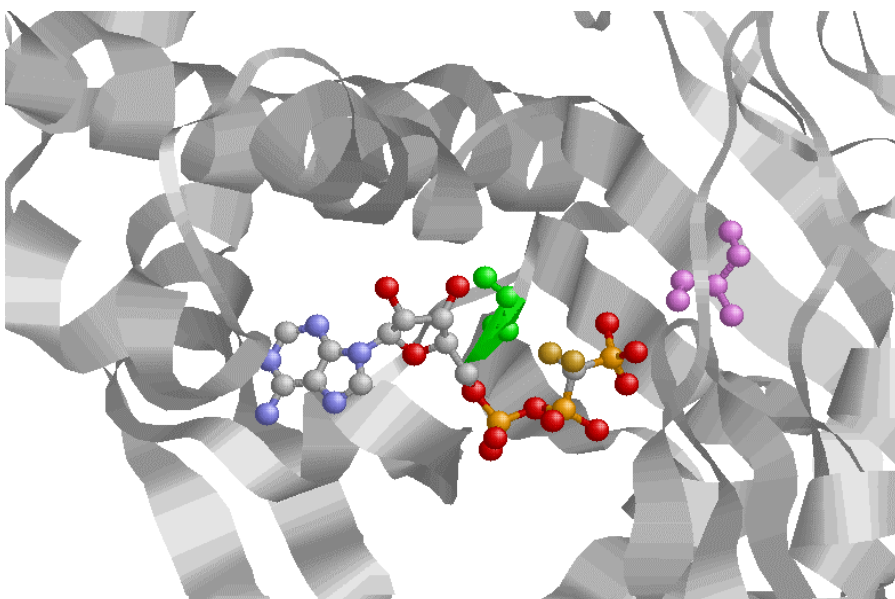


Abb. 26c: Entspricht ebenfalls Abbildung 8, zusätzlich ist das Substrat Glycerin violett hervorgehoben, um die nahe topographische Beziehung zum grün gekennzeichneten Glycin 266 darzustellen.

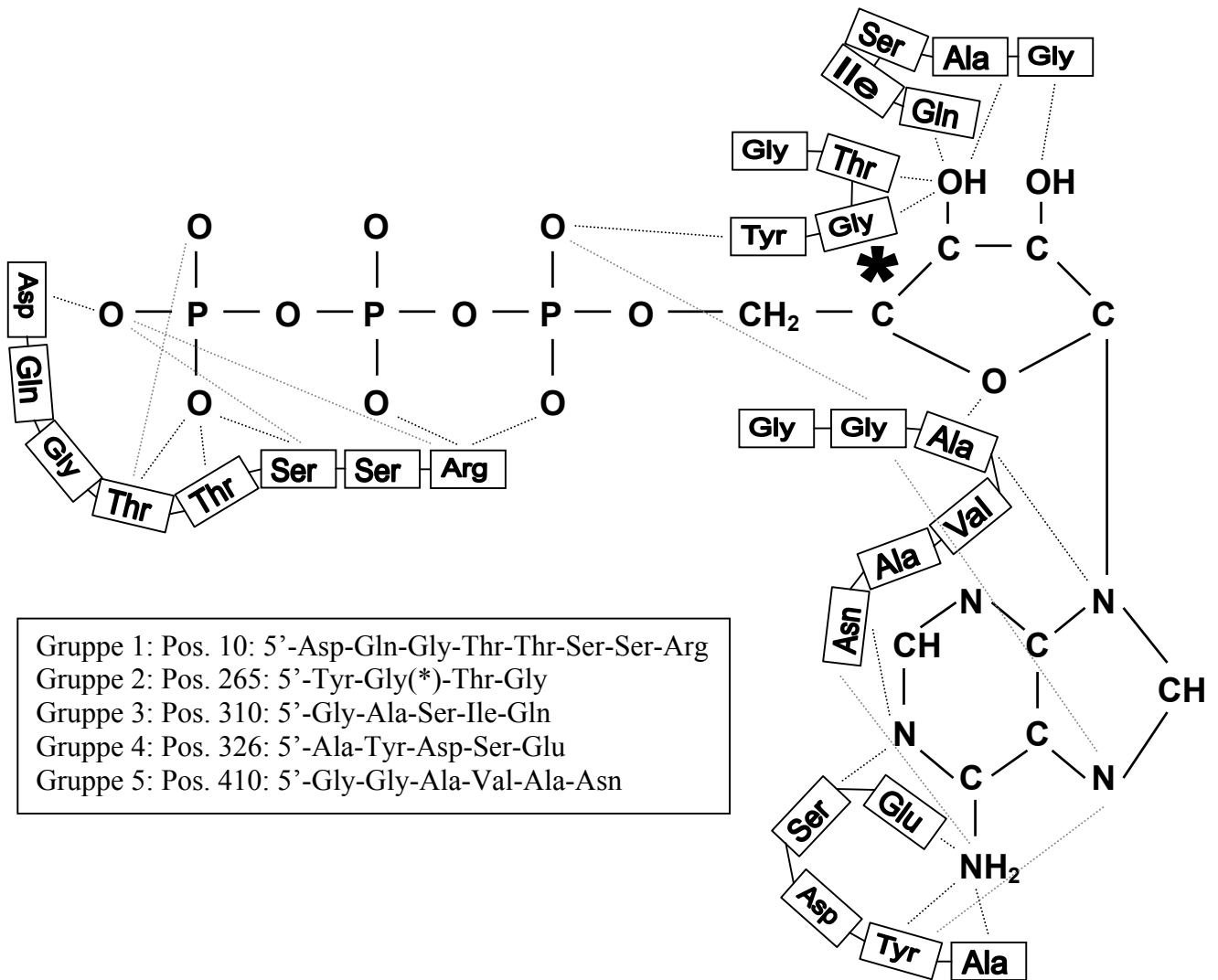


Abb. 27 zeigt eine schematische Darstellung der fünf hauptsächlich an der ATP-Bindung beteiligten Gruppen bei gebundenem ATP. Die gestrichelten Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Enzym und ATP dar. Die Position der Mutation G280A, die bei E. Coli Glycin 266 entspricht, ist durch ein (*) gekennzeichnet. Vergleiche Abbildung 9.

Residue	Dist	Surf	HB	Arom	Phob	DC
13Y	THR*	4.0	10.3	-	-	-
82Y	GLN*	4.7	0.4	-	-	-
83Y	ARG*	2.6	42.9	+	-	-
84Y	GLU*	2.4	26.0	+	-	-
103Y	TRP*	3.3	41.3	-	-	-
135Y	TYR*	2.4	23.8	+	-	-
245Y	ASP*	2.4	48.2	+	-	-
246Y	GLN*	3.7	4.9	+	-	-
267Y	THR*	6.0	0.4	-	-	-
268Y	GLY	5.6	0.8	+	-	-
270Y	PHE*	3.4	31.2	-	-	-
601Y	ATF	4.7	7.7	+	-	-

Tabelle 1: Aminosäuren der E. coli GK, die mit dem Substrat Glycerin in Kontakt treten.

Dist=kürzester Abstand in Å
 Surf=Kontaktfläche in Å²
 HB=hydrogen bond
 Arom=aromatic-aromatic
 Phob=hydrophobic-hydrophobic
 DC=hydrophobic-hydrophilic

Ligand atom			Protein atom				Dist	Surf
N	Name	Class	Residue	Name	Class			
2	O1	I	GLU 84Y	OE1	II	2.4	22.9	
2	O1	I	TYR 135Y	OH	I	2.4	17.3	
2	O1	I	ARG 83Y	NH2	III	2.6	6.1	
4	O2	I	ASP 245Y	OD1	II	2.4	18.9	
4	O2	I	ARG 83Y	N	III	2.6	20.6	
4	O2	I	ARG 83Y	NE	III	2.8	5.2	
6	O3	I	ASP 245Y	OD2	II	2.8	15.2	
6	O3	I	GLN 246Y	NE2	III	3.7	2.1	
6	O3	I	GLN 246Y	OE1	II	4.1	1.9	
6	O3	I	ATF 601Y	O2G	I	4.7	2.9	
6	O3	I	GLY 268Y	N	III	5.6	0.2	

Tabelle 2: Vermutete Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäuren der E. coli GK und dem Substrat Glycerin.

N=Atom-Nummer im PDB-File
 Dist=kürzester Abstand in Å
 Surf=Kontaktfläche in Å²
 Class I=hydrophilic
 Class II=acceptor
 Class III=donor

Residue	Dist	Surf	HB	Arom	Phob	DC
10Y	ASP*	4.8	4.2	+	-	-
12Y	GLY*	3.1	15.1	-	-	-
13Y	THR*	2.4	39.2	+	-	-
14Y	THR*	2.6	50.0	+	-	+
15Y	SER*	3.5	10.7	+	-	-
17Y	ARG*	4.9	17.0	+	-	+
245Y	ASP*	4.4	5.7	+	-	-
264Y	THR*	6.0	1.2	-	-	+
265Y	TYR	3.6	1.0	+	-	-
266Y	GLY*	3.5	34.6	+	-	-
267Y	THR*	2.7	41.9	+	-	-
268Y	GLY	4.9	0.2	-	-	-
310Y	GLY*	2.8	48.5	+	-	-
311Y	ALA	3.5	0.7	+	-	-
313Y	ILE*	3.8	20.2	-	-	+
314Y	GLN*	3.2	28.0	+	-	+
317Y	ARG*	5.9	0.2	-	-	-
326Y	ALA*	3.7	36.3	+	-	+
327Y	TYR*	3.7	33.7	+	-	-
329Y	SER*	3.6	14.0	+	-	-
330Y	GLU*	4.8	1.8	+	-	-
381Y	LEU*	4.5	5.6	-	-	+
410Y	GLY*	4.2	2.8	-	-	-
411Y	GLY*	3.2	47.7	+	-	-
412Y	ALA*	3.5	37.3	+	-	+
414Y	ALA*	4.7	8.5	-	-	+
415Y	ASN*	3.1	42.5	+	-	+
418Y	LEU*	5.3	1.1	-	-	-
600Y	GOL	4.7	6.3	+	-	-
602Y	MG	2.5	31.3	-	-	-

Tabelle 3: Aminosäuren der E. coli GK, die mit dem Liganden ATF (ein ATP-Analogen) in Kontakt treten.

Dist=kürzester Abstand in Å
 Surf=Kontaktfläche in Å²
 HB=hydrogen bond
 Arom=aromatic-aromatic
 Phob=hydrophobic-hydrophobic
 DC=hydrophobic-hydrophilic

Ligand atom			Protein atom				Dist	Surf
N	Name	Class	Residue	Name	Class			
2	O1G	I	THR 14Y	N	III	2.6	33.6	
2	O1G	I	THR 14Y	OG1	I	2.6	8.7	
2	O1G	I	THR 13Y	N	III	3.2	0.5	
2	O1G	I	SER 15Y	N	III	3.5	1.0	
2	O1G	I	SER 15Y	OG	I	4.2	0.2	
3	O2G	I	THR 13Y	N	III	2.4	31.0	
3	O2G	I	THR 13Y	OG1	I	3.1	7.4	
3	O2G	I	ASP 245Y	OD2	II	4.4	5.7	
3	O2G	I	GOL 600Y	O3	I	4.7	0.3	
4	O3G	I	SER 15Y	OG	I	4.1	9.0	
4	O3G	I	SER 15Y	O	II	4.3	0.5	
4	O3G	I	ASP 10Y	OD2	II	5.1	0.9	
4	O3G	I	ASP 10Y	OD1	II	5.2	0.2	
4	O3G	I	ARG 17Y	NE	III	5.5	1.7	
7	O2B	I	ASP 10Y	OD2	II	4.8	2.4	
7	O2B	I	ARG 17Y	NE	III	4.9	6.2	
7	O2B	I	ARG 17Y	NH2	III	5.4	1.0	
12	O1A	I	GLY 411Y	N	III	4.1	4.3	
12	O1A	I	ARG 17Y	NE	III	5.5	2.9	
12	O1A	I	ARG 17Y	NH2	III	5.6	0.2	
13	O2A	I	GLY 411Y	N	III	3.2	17.5	
13	O2A	I	TYR 265Y	O	II	3.6	0.9	
18	O4*	II	ALA 412Y	N	III	3.5	10.7	
20	O3*	I	GLN 314Y	NE2	III	3.2	7.1	
20	O3*	I	ALA 311Y	N	III	3.5	0.7	
20	O3*	I	GLY 266Y	O	II	3.8	3.6	
20	O3*	I	THR 267Y	N	III	4.0	0.2	
22	O2*	I	GLY 310Y	O	II	3.3	13.7	
24	N9	I	ALA 412Y	N	III	3.8	0.4	
26	N7	I	GLY 411Y	O	II	4.0	4.8	
26	N7	I	TYR 327Y	N	III	4.7	1.6	
29	N6	I	ALA 326Y	O	II	4.0	0.2	
29	N6	I	TYR 327Y	O	II	4.0	4.4	
29	N6	I	ASN 415Y	OD1	II	4.1	4.2	
29	N6	I	ASN 415Y	N	III	4.5	4.4	
29	N6	I	GLU 330Y	OE1	II	4.8	1.8	
30	N1	I	ASN 415Y	OD1	II	3.1	14.8	
30	N1	I	SER 329Y	OG	I	3.6	4.4	

Tabelle 4: Vermutete Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäuren der E. coli GK, und dem Liganden ATF (ein ATP-Analogon).

N=Atom-Nummer im PDB-File
Dist=kürzester Abstand in Å
Surf=Kontaktfläche in Å²
Class I=hydrophilic
Class II=acceptor
Class III=donor

Tabelle 1 – 4: Ligand-Protein Contacts (LPC) wurden mit der LPC software (Sobolev et al.) abgeleitet und sind den Datenbeständen des Weizmann-Instituts entnommen.

4.2. Auswirkungen der Mutationen auf die Symptomatik

Wie zuvor beschrieben läßt die gefundene Mutation G280A eine Einschränkung der Funktion des Glycerinkinase-Enzyms und somit einen Glycerinkinase-Mangel erwarten.

Damit stellt sich die Frage, zu welchen Symptomen diese Mutation bei dem Patienten führen könnte.

Um eine Übersicht über die Symptomatik der bisher publizierten Mutationen bei Patienten mit Glycerinkinase-Mangel zu erhalten, wurden folgende Tabellen erstellt:

Missens-Mutationen:

Bezeichnung/ Position/Autor	Patient	Symptome	Glycerin (Plasma/Urin) <0,2mM/<0,2mM	GK Aktivität	Sonstiges
D198G, 593A→G (Dipple et al. 2001)	Männlicher Japaner	Glycerinurie am 5. Lebensstag, körperliche Entwicklungsretardierung, Fieberkrämpfe im Alter von 14 Monaten		5,55% in Lymphozyten	Keine metabolischen Entgleisungen
C256R, 766T→C (Sargent et al. 2000)	Männlicher Patient	Hypoglykämisches Koma nach 17 stündiger Nahrungskarenz im Alter von 2 Jahren	4,6 mM (Plasma)	12% in Fibroblasten	-
T278M, 833C→T (Romero et al. 1997)	-	DMD	-	-	Komplexe DMD-GKD mit zusätzlicher T278M Mutation
N288D, 862A→G (Gaudet et al. 2000, Dippel et al. 2001)	18 Männer und 14 Frauen aus fünf Familien französisch-kanadischer Herkunft	Symptomfrei	Männer: 3,99 mM/- Frauen: 0,54 mM/- Jeweils Mittelwerte mit einer SA von 0,71 bzw. 0,14	-	Erhöhter durchschnittlicher Body Mass Index und Körperfettgehalt im Vergleich zur Kontrollgruppe
A305V, 914C→T (Dipple et al. 2001)	Männlich, 51 Jahre alt	Asymptomatisch	6,2mM (Serum)	5,81%	Adipositas, leichte Hypertonie, Proteinurie
R405Q, 1214G→A (Dipple et al 2001)	Männlicher Patient	Krämpfe am 2. Lebensstag, mit 3 ½ Jahren Krämpfe bei Hypoglykämie und Erbrechen, leichte Entwicklungsverzögerung	-	11,6%	IQ im Alter von 6 Jahren: 84
M428T, 1283T→C (Dipple et al. 2001)	Männlicher Patient	Asymptomatisch	3,47 mM (Serum)	12,7%	Asphyxie und leichte Subarachnoidalblutung während Geburt
Q438R, 1313A→G (Dipple et al 2001)	34 Jähriger männlicher Patient	Asymptomatisch	erhöht/erhöht	5,83%	Leicht übergewichtig, leichte Hypertonie
D440V, GAC to GTC (Walker et al. 1996)	13 Jähriger jugoslawischer Herkunft	Auffällig im Alter von 7 wegen geistiger Retardierung (IQ 70)	8,6 mM/93,6 mM	10% in Fibroblasten	Keine Familienanamnese geistiger Retardierung
W503R, 1615T→C (Sjarif et al. 1998)	I.1: 1 ½ Jähriger indonesischer Herkunft	Krampfanfälle im Alter von 10 Monaten, verzögerte psychomotorische Entwicklung	3,6 mM/66 mM	-	-
	I.2: 3 ½ jähriger Halbbruder von Patient I.1	Normale Entwicklung, keine hypoglykämischen Episoden	5,4 mM/41 mM	-	-
	I.3: 8 jähriger Halbbruder von Patient I.1	Normale Entwicklung, keine hypoglykämischen Episoden	5,1 mM/24 mM	-	-

Deletionen:

Bezeichnung/ Position/Autor	Patient	Symptome	Glycerin (Plasma/Urin) <0,2mM/<0,2mM	GK Aktivität	Sonstiges
20KBDel (Sjarif et al. 1998): Deletion downstream von Exon 9 bis mindestens zum 3' Ende	Holländische Familie mit 4 männlichen Betroffenen. Patient I.1: 12 Jähriger	Metabolische Azidose in der ersten Lebenswoche. Unterdurchschnittliches Geburtsgewicht. Mehrere Episoden mit Lethargie, Fieber, Erbrechen. Strabismus und rechtsinguinale Hernie	5,2 mM/ 48 mM	-	-
	Patient I.2: 8 Jähriger	Einmalige hypoglykämische Episode (Glucose 0,8 mmol/l) bei Geburt, geringes Geburtsgewicht, Gesichtsdysmorphien (eckiges Gesicht, leichte Ohrdysmorphie), hypoplastischer rechter Daumen und Kryptorchidismus bei normalem, männlichem Karyotyp.	6,4 mM/ 38 mM	-	-
	Patient I.3: 1 ½ Jähriger	Normales Geburtsgewicht, keine hypoglykämischen Episoden, keine geistigen und körperlichen Entwicklungsstörungen	4,8 mM/ 60 mM	-	-
	Patient I.4: 62 jähriger mütterlicher Großvater	keine Symptome	5,5 mM/ 32 mM.	-	-
Ex17Del (Walker et al. 1996) Deletion des gesamten Exon 17	Patient I.1: 7 Jahre, Schwedische Abstammung	Auffällig im Alter von 2 Jahren, retardiertes Wachstum und retardierte psychomotorische Entwicklung, therapierefraktäre Hypophosphatämie mit häufigen Knochenbrüchen und frühem Zahnverlust	4,5 mM/ 283 mM	4% in Fibroblasten	-
	Patient I.2: 3 jähriger Bruder von Patient I.1	Symptomfrei	7,9 mM/ 84 mM	4% in Fibroblasten	-

Splice Site Mutationen :

Bezeichnung/ Position/Autor	Patient	Symptome	Glycerin (Plasma/Urin) <0,2mM/<0,2mM	GK Aktivität	Sonstiges
IVS3+ 1G A (Dipple et al 2001)	-	-	-	-	-
IVS6AS G-C (Walker et al. 1996) G-to-C Transversion in letzten Nucleotid des Intron 6	61 jähriger Patient belgischen Ursprungs	Beschwerdefrei, auffällig geworden durch therapierefraktäre Pseudohypertriglyceridämie, unbemerkte chronische Pankreatitis	8,19 mM/ 210 mM	0% in Leukozyten	Mutation führt zu einem Frame Shift und frühzeitigem Stop Codon in Nucleotid 607

Nonsense-Mutationen:

Bezeichnung/ Position/Autor	Patient	Symptome	Glycerin (Plasma/Urin) <0,2mM/<0,2mM	GK Aktivität	Sonstiges
R310X, 1042A→T (Sargent et al. 2000)	-	Episoden hypoglykämischen Komata nach Nahrungskarenz und Krankheit	-	-	-
Q403X, 1321C→T (Sargent et al. 2000)	Zweieiige Zwillinge	Krampfanfälle bei einem der Zwillinge, der andere asymptomatisch	-	-	-
R413X (Sjarif et al. 1998), 1351C→T	8 jähriger Holländer	Ketoazidose und Erbrechen im Alter von 3 Jahren (pH 7,23), leichtes Psychomotorisches Defizit und Aufmerksamkeitschwäche. Normales Wachstum	1,3 mM/ 47 mM	-	-

Insertionen:

Bezeichnung/ Position/Autor	Patient	Symptome	Glycerin (Plasma/Urin) <0,2mM/<0,2mM	GK Aktivität	Sonstiges
Alu ins IVS4 (Zhang et al. 2000), AluY Insertion in Intron 4	36 jähriger Afro-Amerikaner	hämodialysepflichtig	210 mM/ -	32% mit radiochemischer Methode nach Guggenheim et al., 1980	chronischer Alkoholiker, Hep. B pos., Cholesterin 107 mg/dl, LDL 332 mg/dl

Wie schon in der Einleitung erwähnt, werden vor allem Symptomfreiheit und Symptome wie Erbrechen, Hypoglykämien und Ketoazidose sowie geistige und motorische Retardierung beschrieben. Der mögliche Zusammenhang dieser Symptome mit einer auf den Glycerinkinase-mangel zurückzuführenden mangelnden Gluconeogenese wurde bereits im Abschnitt „Die Rolle der Glycerinkinase im Stoffwechsel“ erklärt.

Vergleicht man die Symptomausprägung bei Mutationsträgern mit ähnlich eingeschränkter Enzymaktivität, stellt man fest, daß sich diese in der Mehrzahl der Fälle stark unterscheiden. So kann man weder die Art der Symptome noch die Schwere der Symptomausprägung bei einer bestimmten Mutation vorhersagen (Sargent et al. 2000, Dipple et al. 2001).

Genauere Betrachtungen lassen eher daran zweifeln, daß Symptome und Symptomausprägung in der Regel in unmittelbarem Zusammenhang mit der Mutation stehen, bedenkt man die

ohnehin starke Variabilität der Symptomausprägung selbst bei Trägern derselben Mutation und die dazu vergleichsweise geringen Unterschiede gemittelter Symptomausprägungen zwischen Familien mit unterschiedlichen Mutationen.

Vermutlich bestimmen weit komplexere Faktoren den Phänotyp des Mutationsträgers, als nur die Funktionseinschränkung der Glycerinkinase. So könnten z.B. Polymorphismen anderer Gene, die unabhängig von der Glycerinkinase vererbt wurden, eine wichtige Rolle spielen (Dipple et al. 2001).

Der in dieser Arbeit untersuchte Patient mit Hyperglycerinämie hat keine der bisher mit Glycerinkinase-mangel in Verbindung gebrachten Symptome. Da seine oben genannten Begleiterkrankungen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf den Glycerinkinase-mangel zurückzuführen sind, kann dieser als asymptomatisch eingestuft werden.

4.3. Diagnostik des Glycerinkinase-mangels

Der Glycerinkinase-mangel ist eine selten diagnostizierte Erkrankung und seine Symptome werden wahrscheinlich oft missgedeutet, wie auch die lange Krankengeschichte des in dieser Arbeit untersuchten Patienten zeigt.

Daher wird hier der Versuch unternommen, ausgehend von bisher berichteten Fällen und Symptomen sowie basierend auf Ideen, die bei der Diagnostik des beschriebenen Patienten angewendet wurden, Anhaltspunkte für ein Vorliegen eines Glycerinkinase-mangels zusammenzustellen, um zukünftige Untersuchungen zu erleichtern.

Bei der komplexen Form werden wohl meist zuerst die Begleiterkrankungen Muskeldystrophie Duchenne oder angeborene Nebennierenhypoplasie diagnostiziert, die Symptome des Glycerinkinase-mangels treten wie auch bei der isolierten Form meist erst bei langer Nahrungskarenz in den Vordergrund.

Vor allem folgende Symptome sollten an einen Glycerinkinase-mangel denken lassen:

- Pseudohypertriglyceridämie:

Im Gegensatz zur echten Hypertriglyceridämie fällt dabei folgendes auf:

- Klares Serum, keine Aufrahmung
 - Normale Lipidelektrophorese
 - Im Verhältnis zu den VLDL-Triglyceriden zu niedriges VLDL-Cholesterin
 - Hyperglycerinämie
 - Glycerinurie
 - Keine Verbesserung der Triglyceridwerte unter lipidsenkender Therapie
- Übelkeit und Erbrechen unbekannter Genese
 - Ketoacidose unbekannter Genese
 - Entwicklungsstörungen
 - Schwankende Bewußtseinstörungen
 - Krampfanfälle

Von diagnostischer Relevanz ist dabei auch die Tatsache, daß die Symptomatik vor allem durch Nahrungskarenz, Überanstrengung und Krankheit ausgelöst oder verstärkt werden kann.

Bei Messung einer erhöhten Glycerinkonzentration im Serum gilt es, andere Auslösefaktoren auszuschließen. Darunter fallen:

- orale Glycerineinnahme
- Diabetes mellitus
- Hyperthyreose
- Heparinapplikation
- Hepatopathie

- Hungerzustand
- Kontamination der Blutprobe durch Hautpflegemittel, Detergenzien o.ä.

Bisher existieren erst wenige Berichte über Glycerinkinase-Mangel-Patienten, und so lässt sich nicht sicher sagen, ob jedes der o.g. Symptome wirklich durch den Glycerinkinase-Mangel ausgelöst wird. Beweise für den Zusammenhang zwischen der möglicherweise durch Glycerinkinase-Mangel eingeschränkten Gluconeogenese sowie der möglicherweise durch Hyperglycerinämie eingeschränkten Gluconeogenese aus anderen Substraten und der Symptomatik stehen ebenso noch aus.

5. Zusammenfassung

Glycerinkinase-Mangel ist eine selten diagnostizierte Erkrankung, die als komplexe Form zusammen mit angeborener Nebennierenhypoplasie oder Muskeldystrophie Duchenne oder als isolierte Form symptomatisch oder asymptomatisch auftreten kann.

In dieser Arbeit wird über einen erwachsenen, männlichen Patienten mit isoliertem, asymptomatischem Glycerinkinase-Mangel berichtet, der durch eine therapierefraktäre Pseudohypertriglyceridämie bei Hyperglycerinämie auffällig wurde.

Durch DNA-Sequenzierung wurde als mögliche Ursache eine erstmalig charakterisierte Missensmutation 280Gly→Ala im Xp21.3 Glycerinkinase-Gen gefunden. Dabei konnten 79% der codierenden Basen sequenziert werden.

Durch einen Vergleich mit E. Coli Glycerinkinase konnte gezeigt werden, daß die gefundene Mutation eine hochkonservierte Aminosäure im Bereich einer ATP-Bindungsstelle im Reaktionszentrum betrifft und mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ligand und Enzym destabilisiert. Somit kann der gefundene Polymorphismus als wahrscheinliche Ursache der Hyperglycerinämie angesehen werden.

Erstmals konnte somit der Zusammenhang zwischen einer Funktionseinschränkung und einer strukturellen Veränderung der humanen Glycerinkinase beschrieben werden.

6. Literaturverzeichnis

- Asghar, M.; Nevin, N. C.; Beattie, E. D.; McManus, D.; Roberts, G. M. A.; Phillips, J. A. : Contiguous gene deletion syndrome involving glycerol kinase and Duchenne muscular dystrophy loci. *J. Inherit. Metab. Dis.* 22: 933-935, 1999.
- Baba, H.; Zhang, X.J.; Wolfe, R.R. : Glycerol gluconeogenesis in fasting humans. *Nutrition* 11: 148-153, 1995.
- Balducci, R.; Municchi, G.; Toscano, V.; Mangiantini, A.; Sabatini, R.; Caiola, S.; Tedeschi, B.; Orlandi, L.; Boscherini, B. : Complex glycerol kinase deficiency: an unusual cause of salt-wasting in males. *Clin. Endocr.* 42: 437-439, 1995.
- Bartley, J. A.; Miller, D. K.; Hayford, J. T.; McCabe, E. R. B. : Concordance of X-linked glycerol kinase deficiency with X-linked congenital adrenal hypoplasia. *Lancet II*: 733-736, 1982.
- Bartley, J. A.; Patil, S.; Davenport, S.; Goldstein, D.; Pickens, J. : Duchenne muscular dystrophy, glycerol kinase deficiency, and adrenal insufficiency associated with Xp21 interstitial deletion. *J. Pediatr.* 108: 189-192, 1986.
- Bonnefont, J.P.; Specola, N.B.; Vassault, A.; et al : The fasting test in pediatrics: application to the diagnosis of pathological hypo- and hyperketotic states. *Eur J Pediatr* 150: 80-85, 1990.
- Borresen, A.-L.; Hellerud, C.; Moller, P.; Sovik, O.; Berg, K. : Prenatal diagnosis of glycerol-kinase deficiency associated with a DNA deletion on the short arm of the X chromosome. *Clin. Genet.* 32: 254-259, 1987.
- Darras, B. T.; Francke, U. : Myopathy in complex glycerol kinase deficiency patients is due to 3-prime deletions of the dystrophin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 43: 126-130, 1988.
- Davies, K. E.; Patterson, M. N.; Kenwrick, S. J.; Bell, M. V.; Sloan, H. R.; Westman, J. A.; Elsas, L. J., II; Mahan, J. : Fine mapping of glycerol kinase deficiency and congenital adrenal hypoplasia within Xp21 on the short arm of the human X chromosome. *Am. J. Med. Genet.* 29: 557-564, 1988.
- Dipple, K. M.; Zhang, Y.-H.; Huang, B.-L.; McCabe, L. L.; Dallongeville, J.; Inokuchi, T.; Kimura, M.; Marx, H. J.; Roederer, G. O.; Shih, V.; Yamaguchi, S.; Yoshida, I.; McCabe, E. R. B. : Glycerol kinase deficiency: evidence for complexity in a single gene disorder. *Hum. Genet.* 109: 55-62, 2001.
- Dunger, D. B.; Davies, K. E.; Pembrey, M.; Lake, B.; Pearson, P.; Williams, D.; Whitfield, A.; Dillon, M. J. D. : Deletion on the X chromosome detected by direct DNA analysis in one of two unrelated boys with glycerol kinase deficiency, adrenal hypoplasia, and Duchenne muscular dystrophy. *Lancet I*: 585-587, 1986.
- Francke, U.; Harper, J. F.; Darras, B. T.; Cowan, J. M.; McCabe, E. R. B.; Kohlschutter, A.; Seltzer, W. K.; Saito, F.; Goto, J.; Harpey, J.-P.; Wise, J. E. : Congenital adrenal hypoplasia, myopathy, and glycerol kinase deficiency: molecular genetic evidence for deletions. *Am. J. Hum. Genet.* 40: 212-227, 1987.

Gaudet, D.; Arsenault, S.; Perusse, L.; Vohl, M.-C.; St.-Pierre, J.; Bergeron, J.; Despres, J.-P.; Dewar, K.; Daly, M. J.; Hudson, T.; Rioux, J. D. : Glycerol as a correlate of impaired glucose tolerance: dissection of a complex system by use of a simple genetic trait. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1558-1568, 2000.

Ginns, E. I.; Barranger, J. A.; McClean, S. W.; Sliva, C.; Young, R.; Schaefer, I.; Goodman, S. I.; McCabe, E. R. B. : A juvenile form of glycerol kinase deficiency with episodic vomiting, acidemia, and stupor. *J. Pediatr.* 104: 736-739, 1984.

Goonewardena, P.; Dahl, N.; Ritzen, M.; Johnsen, E.; Pettersson, U. : Deletion in Xp associated with glycerol kinase deficiency, adrenal aplasia and hypogonadotropic hypogonadism. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 46: 621 only, 1987.

Goussault, Y.; Turpin, E.; Neel, D.; Dreux, C.; Chanu, B. ; Bakir, R. ; Rouffy, J. : « Pseudohypertriglyceridemia » caused by hyperglycerolemia due to congenital enzyme deficiency. *Clin. Chim. Acta* 123: 269-274, 1982.

Guggenheim, M. A.; McCabe, E. R. B.; Roig, M.; Goodman, S. I.; Lum, G. M.; Bullen, W. W.; Ringel, S. P. : Glycerol kinase deficiency with neuromuscular, skeletal, and adrenal abnormalities. *Ann. Neurol.* 7: 441-449, 1980.

Guo, W.; Worley, K.; Adams, V.; Mason, J.; Sylvester-Jackson, D.; Zhang, Y.-H.; Towbin, J. A.; Fogt, D. D.; Madu, S.; Wheeler, D. A.; McCabe, E. R. B. : Genomic scanning for expressed sequences in Xp21 identifies the glycerol kinase gene. *Nature Genet.* 4: 367-371, 1993.

Hammond, J.; Howard, N. J.; Brookwell, R.; Purvis-Smith, S.; Wilcken, B.; Hoogenraad, N. : Proposed assignment of loci for X-linked adrenal hypoplasia and glycerol kinase genes. (Letter) *Lancet* I: 54 only, 1985.

Hendriks, L.; van Duijn, C.M.; Cras, P.; Cruts, M.; van Hul, W.; van Harskamp, F.; Warren, A.; McInnis, M.G.; Antonarakis, S.E.; Martin, J.J.; Hofman, A.; van Broeckhoven, C. : Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β -amyloid precursor proteingene. *Nature Genet* 1: 218-221, 1992.

Hultman, T.; Berg, S.; Moks, T.; Uhlen, M. : Direct Solid Phase Sequencing of in vitro Amplified Plasmid DNA. *BioTechniques* 10: 84-93, 1991.

Hultman, T.; Stahl, S.; Hornes, E.; Uhlen, M.: Direct Solid Phase Sequencing of Genomic and Plasmid DNA using Magnetic Beads as Solid Support. *Nucleic Acids Res* 17: 4937-4946, 1989.

Jahoor, F.; Peters, E.J.; Wolfe, R.R. : The relationship between gluconeogenic substrate supply and glucose production in humans. *Am J Physiol* 258: E288-96, 1990.

Kaiserman, K.B.; Nakamoto, J.M.; Geffnerr M.E.; McCabe, E.R.B.: Minipuberty of infancy and adolescent pubertal function in adrenal hypoplasia congenita. *J. Pediatr.* 133: 300-302, 1998.

Lévesque, G.; St George-Hyslop, P. : The Presenilins and Alzheimer Disease. *McGill Journal of Medicine*:142-148, 1997.

Love, D. R.; Bloomfield, J. F.; Kenwrick, S. J.; Yates, J. R. W.; Davies, K. E. : Physical mapping distal to the DMD locus. *Genomics* 8: 106-112, 1990.

Mahbubul Huq, A. H. M.; Lovell, R. S.; Sampson, M. J.; Decker, W. K.; Dinulos, M. B.; Disteche, C. M.; Craigen, W. J. : Isolation, mapping, and functional expression of the mouse X chromosome glycerol kinase gene. *Genomics* 36: 530-534, 1996.

Mahbubul Huq, A. H. M.; Lovell, R. S.; Ou, C.-N.; Beaudet, A. L.; Craigen, W. J. : X-linked glycerol kinase deficiency in the mouse leads to growth retardation, altered fat metabolism, autonomous glucocorticoid secretion and neonatal death. *Hum. Molec. Genet.* 6: 1803-1809, 1997.

Majewski, J.; Ott, J.: Amino acid substitutions in the human genome: evolutionary implications of single nucleotide polymorphisms. *Gene* 305(2): 167-173, 2003.

Marlhens, F.; Chelly, J.; Kaplan, J. C.; Lefrancois, D.; Harpey, J. P.; Dutrillaux, B. : Familial deletion of Xp21.2 with glycerol kinase deficiency and congenital adrenal hypoplasia. *Hum. Genet.* 77: 379-383, 1987.

Matsuo, M. : Duchenne/Becker muscular Dystrophy: from molekular diagnosis to gene therapy. *Brain Dev* 18: 167-172, 1996.

Matsumoto, T.; Kondoh, T.; Yoshimoto, M.; Fujieda, K.; Matsuura, N.; Matsuda, I.; Miike, T.; Yano, K.; Okuno, A.; Aoki, Y.; Murano, I.; Toyota, S.; Ohnishi, S.; Niikawa, N. : Complex glycerol kinase deficiency: molecular-genetic, cytogenetic, and clinical studies of five Japanese patients. *Am. J. Med. Genet.* 31: 603-616, 1988.

McCabe, E. R. B.; Fennessey, P. V.; Guggenheim, M. A.; Miles, B. S.; Bullen, W. W.; Sceats, D. J.; Goodman, S. I. : Human glycerol kinase deficiency with hyperglycerolemia and glyceroluria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78: 1327-1333, 1977.

McCabe, E. R. B. : Human glycerol kinase deficiency: an inborn error of compartment metabolism. *Biochem. Med.* 30: 215-230, 1983.

Patil, S. R.; Bartley, J. A.; Murray, J. C.; Ionasescu, V. V.; Pearson, P. L. : X-linked glycerol kinase, adrenal hypoplasia and myopathy maps at Xp21. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 40: 720-721, 1985.

Peter, M.; Vieman, M.; Partsch, J.C.; Sippel, W.G.: Congenital adrenal hypoplasia: clinical spectrum experience with hormonal diagnosis, and report on new point mutations of the DAX-1 gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 2666-2674, 1998.

Renier, W. O.; Nabben, F. A. E.; Hustinx, T. W. J.; Veerkamp, J. H.; Otten, B. J.; ter Laak, H. J.; ter Haar, B. G. A.; Gabreels, F. J. M. : Congenital adrenal hypoplasia, progressive muscular dystrophy and severe mental retardation, in association with glycerol kinase deficiency, in male sibs. *Clin. Genet.* 24: 449-457, 1983.

- Rickwood, D.; Hames, B.D. (eds.) : Gel Electrophoresis of Nucleic Acids - A Practical Approach. IRL Press Washington DC, 1982.
- Robergs, R.A.; Griffin, S.E. : Glycerol. Biochemistry, pharmacokinetics and clinical and practical applications. Sports Med 26: 145-167, 1998.
- Romero, N-B.; Recan, D.; Rigal, O.; Leturcq, F.; Llense, S.; Barbot, J.C.; Deburgrave, N.; Cheval, M-A-; Deniau, F.; Kaplan, J.C. : A point mutation in the glycerol kinase gene associated with a deletion in the dystrophin gene in a familial X-linked muscular dystrophy: non-contiguous gene syndrome involving Becker muscular dystrophy and glycerol kinase loci. Neuromuscul Disord. Dez;7(8): 499-504, 1997.
- Saito, F.; Goto, J.; Kakinuma, H.; Nakamura, F.; Murayama, S.; Nakano, I.; Tonomura, A. : Inherited Xp21 deletion in a boy with complex glycerol kinase deficiency syndrome. (Letter) Clin. Genet. 29: 92-93, 1986.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. : Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York, 2000.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977.
- Sargent, C. A.; Young, C.; Marsh, S.; Ferguson-Smith, M. A.; Affara, N. A. : The glycerol kinase gene family: structure of the Xp gene, and related intronless retroposons. Hum. Molec. Genet. 3: 1317-1324, 1994.
- Sargent, C. A.; Kidd, A.; Moore, S.; Dean, J.; Besley, G. T. N.; Affara, N. A. : Five cases of isolated glycerol kinase deficiency, including two families: failure to find genotype:phenotype correlation. J. Med. Genet. 37: 434-441, 2000.
- Scheuerle, A.; Greenberg, F.; McCabe, E.R.: Dymorphic features in patients with complex glycerol kinase deficiency. J. Pediatr. 126: 764-7, 1995.
- Schmickel, R. D. : Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes. J. Pediatr. 109: 231-241, 1986.
- Sjarif, D. R.; Ploos van Amstel, J. K.; Duran, M.; Beemer, F. A.; Poll-The, B. T. : Isolated and contiguous glycerol kinase gene disorders: a review. J. Inherit. Metab. Dis. 23: 529-547, 2000.
- Sjarif, D. R.; Sinke, R. J.; Duran, M.; Beemer, F. A.; Kleijer, W. J.; Ploos van Amstel, J. K.; Poll-The, B. T. : Clinical heterogeneity and novel mutations in the glycerol kinase gene in three families with isolated glycerol kinase deficiency. J. Med. Genet. 35: 650-656, 1998.
- Shroyer, N.F.; Lewis, R.A.; Yatsenko, A.N.; Lupski, J.R. : Null missense ABCR (ABCA4) mutations in a family with stargardt disease and retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci : 42(12):2757-61, 2001.
- Sobolev, V.; Sorokine, A.; Prilusky, J.; Abola, E.E.; Edelman, M.: Automated analysis of interatomic contacts in proteins. Bioinformatics 15: 327-332, 1999.

Van Essen, A.J.; Kneppers, A.L.J.; Van der Hout, A.J., et al. : The clinical and molecular genetic approach to Duchenne and Becker muscular dystrophy: an updated protocol. *J. Med. Genet.* 24: 805-812, 1997.

Walker, A. P.; Muscatelli, F.; Monaco, A. P. : Isolation of the human Xp21 glycerol kinase gene by positional cloning. *Hum. Molec. Genet.* 2: 107-114, 1993.

Walker, A. P.; Muscatelli, F.; Stafford, A. N.; Chelly, J.; Dahl, N.; Blomquist, H. K.; Delanghe, J.; Willems, P. J.; Steinmann, B.; Monaco, A. P. : Mutations and phenotype in isolated glycerol kinase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 1205-1211, 1996.

Wapnir, R.A.; Stiel, L. : Regulation of gluconeogenesis by glycerol and its phosphorylated derivatives. *Biochem Med* 33:141-148, 1985.

Wieringa, B.; Hustinx, T.; Scheres, J.; Hofker, M.; Schepens, J.; Ropers, H. H.; ter Haar, B. : Glycerol kinase deficiency syndrome explained as X-chromosomal deletion. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 40: 777 only, 1985.

Wieringa, B.; Hustinx, T.; Scheres, J.; Renier, W.; ter Haar, B. : Complex glycerol kinase deficiency syndrome explained as X-chromosomal deletion. (Letter) *Clin. Genet.* 27: 522-523, 1985.

Zhang, Y.-H.; Dipple, K. M.; Vilain, E.; Huang, B.-L.; Finlayson, G.; Therrell, B. L.; Worley, K.; Deininger, P.; McCabe, E. R. B. : AluY insertion (IVS4-52ins316alu) in the glycerol kinase gene from an individual with benign glycerol kinase deficiency. *Hum. Mutat.* 15: 316-323, 2000.

Elektronische Datenbanken:

BioMDB Database : <http://www.bh4.org/>

GeneDis Homepage : <http://life2.tau.ac.il/GeneDis/>

Lipimed Homepage : GK Projekt: <http://www.lipimed.com/gk/>

Weizmann-Institut : <http://bioinfo.weizmann.ac.il>

Whitehead Institute / MIT Center for Genome Research, GK Projekt :
<http://www.genome.wi.mit.edu/humgen/projects/gk.html>

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung

- 1 Die Stellung der Glycerinkinase im Stoffwechsel: erstellt von T. Wibmer
- 2 Xp21.3 mit dem Genort für den Glycerinkinasemangel: erstellt von T. Wibmer
- 3 Sequenz des Glycerinkinase-Gens: erstellt von T. Wibmer
- 4 Serum des Patienten mit Glycerinkinasemangel: Zur Verfügung gestellt von der Medizinischen Klinik II, Großhadern, der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 5 Stammbaum: erstellt von T. Wibmer
- 6 DNA-Preparation: erstellt von T. Wibmer
- 7 Gelelektrophorese: erstellt von T. Wibmer
- 8 Vergleich der Position 839 bei allen untersuchten Familienangehörigen: erstellt von T. Wibmer basierend auf den elektronisch übermittelten Ergebnissen der automatischen DNA-Sequenzierung
- 9 Exon 3 der Tochter: erstellt von T. Wibmer basierend auf den elektronisch übermittelten Ergebnissen der automatischen DNA-Sequenzierung
- 10 Exon 4 der Tochter: erstellt von T. Wibmer basierend auf den bei der manuellen Sequenzierung belichteten Röntgenfilmen
- 11 Exon 5 der Tochter: wie Abbildung 10
- 12 Exon 6 der Tochter: wie Abbildung 10
- 13 Exon 7 der Tochter: wie Abbildung 9
- 14 Exon 9b der Tochter: wie Abbildung 9
- 15 Exon 10 der Tochter: wie Abbildung 9
- 16 Exon 11 der Tochter: wie Abbildung 9
- 17 Exon 12 der Tochter: erstellt basierend auf einem Ausdruck der Ergebnisse der automatischen DNA-Sequenzierung
- 18 Exon 13 der Tochter: wie Abbildung 10
- 19 Exon 14 der Tochter: wie Abbildung 9
- 20 Exon 15 der Tochter: wie Abbildung 9
- 21 Exon 16 der Tochter: wie Abbildung 9
- 22 Exon 17 der Tochter: wie Abbildung 9
- 23 Exon 18 der Tochter: wie Abbildung 9
- 24 3D-Ansicht der E.Coli Glycerinkinase: erstellt von T. Wibmer mit dem Computerprogramm RasMol Version 2.6 von R. Sayle, 1995.
- 25 Alignment: erstellt von T. Wibmer mit Hilfe des EMBL-Online-„Comparative Sequence Analysis“-Programms <http://coot.embl-heidelberg.de/Alignment/>
- 26a-c Wie Abbildung 24
- 27 Schematische Darstellung der ATP-Bindungsstelle: erstellt von T. Wibmer

8. Lebenslauf

Name: Wibmer
Vorname: Thomas

Adresse: Hornungstraße 24 1/2
86161 Augsburg

Telefon: 0821 556407 oder 0173 59 66 303
E-Mail: Thomas.Wibmer@gmx.de

Geburtsdatum: 13. November 1974
Geburtsort: Augsburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schule: 1981 - 1985 Grundschule
1985 - 1994 Humanistisches Gymnasium b. St. Stephan, Augsburg

Zivildienst: 1994 - 1995 Pflegedienst im Kreiskrankenhaus Friedberg

Universität: 1995 - 1996 Elektrotechnik an der TU München
1996 - 2002 Medizin an der LMU München
(1999 1. Staatsexamen, 2001 2. Staatsexamen,
2002 3. Staatsexamen), Abschluß April 2002

Praktika: 1995, 1996 Mechanisches und elektronisches Grundpraktikum bei
Siemens Augsburg (8 Wochen)
1998 - 2001 Famulatur in Innere Medizin, Pädiatrie, Radiologie,
Gynäkologie (4 Monate)
2001 - 2002 Praktika in Chirurgie, Innere Medizin und Gynäkologie
im Rahmen des Praktischen Jahres (je 4 Monate)

Ausland: 2000 Famulatur Victoria Hospital, Seychellen (5 Wochen)
2001 Kardiologie, University of Birmingham, England (2
Monate)

9. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Otto für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und den großen Freiraum bei dessen Bearbeitung. Kurz vor Fertigstellung der experimentellen Arbeit kam er bei einem tragischen Bergunfall ums Leben. Ich werde mit dieser Dissertation das Gedenken an Herrn Prof. Dr. Joachim Otto in Ehren halten.

Herrn PD Dr. K.G. Parhofer, der sich für die Nachfolge zur Verfügung gestellt hat und mir damit die Fertigstellung dieser Dissertation ermöglichte, danke ich insbesondere.

Herrn Dr. Carsten Otto danke ich für die Betreuung der Dissertation und die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Er hat es mir auch ermöglicht, nach dem Tode seines Vaters die Arbeit unverzüglich fortsetzen zu können.

Frau Ilona Dietze, die mich bei den Arbeiten im Labor unterstützt hat, danke ich für ihr unermüdliches Mitwirken. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit unter ungleich schwierigeren Bedingungen durchgeführt worden.

Den Mitarbeitern des Adolf-Butenandt-Instituts bin ich für die Bereitstellung der Reagenzien und Geräte, die ich für die DNA-Sequenzierung benötigte, dankbar.

Vielen Dank den Mitarbeitern der Medizinischen Klinik II, Großhadern, die mir Patientendaten und Untersuchungsmaterial zur Verfügung gestellt haben.

Für die zuverlässige Durchführung der oft schwierigen automatischen Sequenzierungen danke ich der Firma TopLab, Martinsried.

Besonderer Dank gilt den Familienangehörigen des verstorbenen Patienten, ohne deren bereitwilliges Entgegenkommen diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.