

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im

**Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

Vorstand: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**GSD Typ II und Typ IV: Biochemische und molekulargenetische
Analyse bei Patienten mit Mangel an saurer α -Glukosidase bzw. mit
Branchingenzymmangel**

Dissertation

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

vorgelegt von

Hyun Kyung Lee

aus

Seoul

2005

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Y. S. Shin
Mitberichterstatter: Prof. Dr. T. Igo - Kemenes
Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2005

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Y. S. Shin für die Überlassung dieser Arbeit, für die hilfreiche Unterstützung und hervorragende Betreuung sowie für die zahlreichen anregungsvollen Diskussionen.

Herrn Dr. med. Podskarbi danke ich herzlich für die gute und hilfreiche Zusammenarbeit.

Herrn Franz Jansen und Herrn Jan Tausendfreund möchte ich für die gute Beratung, Hilfsbereitschaft und für die hervorragende technische Unterstützung danken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Geschichte der Glykogen-Speicherkrankheit Typ II und Typ IV.....	1
1.2 Physiologie und Biochemie des Glykogenstoffwechsels.....	2
1.2.1 Enzyme des Glykogenabbaus: Saure α -Glukosidase.....	2
1.2.2 Enzyme des Glykogenaufbaus: Das Branchingenzym.....	4
1.3 Klinik und genetische Aufklärung.....	6
1.3.1 Glykogen-Speicherkrankheit Typ II.....	6
1.3.2 Glykogen-Speicherkrankheit Typ IV.....	7
1.4 Molekulargenetische Aufklärung.....	8
1.4.1 Molekulargenetische Aufklärung der sauren α -Glukosidase.....	8
1.4.2 Molekulargenetische Aufklärung des Glykogen-Branchingenzym.....	12
1.5 Diagnose und Therapie.....	14
1.5.1 Diagnostik und Therapie bei GSD Typ II.....	14
1.5.2 Diagnostik und Therapie bei GSD Typ IV.....	16
1.6 Differentialdiagnose.....	17
1.6.1 Differentialdiagnose bei GSD Typ II.....	17
1.6.2 Differentialdiagnose bei GSD Typ IV.....	18
2. Ziel der Arbeit	18
3. Patienten	19
3.1 GSD Typ II.....	19
3.1.1 Patientin 1.....	19
3.1.2 Patientin 2.....	19
3.1.3 Patientin 3.....	20
3.2 GSD Typ IV.....	20
3.2.1 Patient 4.....	20

4.	Material.....	21
4.1	Angewendete Chemikalien, Geräte und Enzyme für Zellpräparation.....	21
4.1.1	Verwendete Chemikalien und Enzyme.....	21
4.1.2	Verwendete Geräte.....	21
5.	Methoden.....	23
5.1	Vorbereitung der Leukozyten und Fibroblasten.....	23
5.1.1	Leukozytenpräparation.....	23
5.1.2	Kultivierung der Fibroblasten.....	23
5.1.3	Fibroblastensplit.....	24
5.1.4	Fibroblastenaufarbeitung zum Test der Enzymaktivität.....	25
5.1.5	Myoblasten- und Hepatozytenaufarbeitung zum Test der Enzymaktivität	25
5.1.6	Chorionzottenaufarbeitung zum Test der Enzymaktivität.....	25
5.2	Proteinbestimmung.....	26
5.2.1	Methode.....	26
5.3	Bestimmung der Aktivität der sauren α -Glukosidase.....	27
5.4	Bestimmung der Branchingenzymaktivität aus Leukozyten, Fibroblasten, Myozyten und Hepatozyten.....	28
5.4.1	Methode.....	28
5.4.2	Phosphatmessung.....	29
5.5	DNA-Präparation.....	29
5.5.1	Untersuchungsmaterial.....	29
5.5.2	Isolierung von genomischer DNA.....	31
5.5.3	Primer für PCR aus DNA.....	33
5.6	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
5.6.1	Prinzip der Polymerase.....	35
5.6.2	Amplifikation.....	36
5.6.3	Amplifikation und Qualitätskontrolle der PCR bei GSD Typ IV.....	37
5.7	Gelelektrophorese.....	37
5.7.1	Definition der Gelelektrophorese.....	37
5.7.2	Prinzip der Agarose Gelelektrophorese.....	37

5.7.3	Herstellung der Agarosegele.....	38
5.7.4	Elektrophorese bei Nukleinsäure.....	38
6.	Ergebnisse.....	39
6.1	GSD Typ II: Aktivität der sauren α -Glukosidase (GAA).....	39
6.1.1	Normale Enzymaktivität der sauren α -Glukosidase.....	39
6.1.2	Pathologische Werte der Patienten mit GSD Typ II.....	40
6.1.3	Genanalyse der sauren α -Glukosidase bei den Patienten mit GSD Typ II	41
6.2	Kinetik des Branchingenzym (GSD Typ IV).....	42
6.2.1	Proteinabhängigkeit der Branchingenzymaktivität.....	42
6.2.2	Inkubationszeitabhängigkeit der Branchingenzymaktivität.....	42
6.2.3	Affinität zu dem Substrat Glukose-1-Phosphat.....	42
6.3	Aktivität des Branchingenzym.....	47
6.3.1	Normwerte der Branchingenzymaktivität.....	47
6.3.2	Pathologische Werte der Branchingenzymaktivität einer Patientenfamilie	47
6.3.3	Genanalyse des Branchingenzym des Patienten und seiner Familie.....	48
7.	Diskussion.....	49
7.1	GSD Typ II: Aktivität der sauren α -Glukosidase und Mutationen des GAA-Gens.....	49
7.2	GSD Typ IV: Branchingenzymaktivität und Mutationen des Branchingen- zyms	51
8.	Zusammenfassung.....	54
	Referenzen.....	57

1. Einleitung

In unserem Körper spielt die Glukose eine wichtige Rolle für die Ernährung. Glykogen wird in den Zellen gespeichert und steht ihnen als Energie für verschiedene Prozesse zur Verfügung. Eine Störung der Glukosespeicherung führt daher zu einem gestörten Energiehaushalt und zu verschiedenen Krankheitsbildern. Die Glykogen-Speicherkrankheit ist eine Glykogenstoffwechselerkrankung, die sich sowohl als Glykogenabbaustörung (Pompe Krankheit, GSD Typ II) als auch als Glykogenaufbaustörung (Andersensche Krankheit, Amylopektinosis, GSD Typ IV) zeigt. In dieser Arbeit wird die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp bei der Pompe und Andersenschen Krankheit untersucht.

1.1 Geschichte der Glykogen-Speicherkrankheit Typ II und Typ IV

Die klinische Erstbeschreibung einer Glykogen-Speicherkrankheit (syn. Glykogenose) stammt aus dem Jahre 1928 (1). Der Erkrankung eines siebenjährigen Jungen mit vergrößerter Leber und kleinen Genitalien lag ein Defizit des „debranching enzyme“ zugrunde (Glykogenose Typ III) (2).

Die Glykogenose Typ I (Glukose-6-Phosphatase-Defizit) wurde 1929 von Edgar von Gierke, einem deutschen Pathologen, beschrieben. Ein siebenjähriger Patient mit dieser Krankheit zeigte einen aufgedunsenen Leib, der auf einer massiven Vergrößerung der Leber beruhte. Zwischen den Nahrungsaufnahmen trat eine schwere Hypoglykämie auf. Außerdem stieg der Blutzuckerspiegel nach Verabreichung von Adrenalin oder Glukagon nicht an (3).

Die Glykogenose Typ II (GSD Typ II) wurde 1932 erstmalig von J. C. Pompe, einem niederländischen Pathologen, beschrieben. Er berichtete über ein sieben Monate altes Mädchen, bei der eine abnormale Glykogenakkumulation in jedem Gewebe beobachtet wurde. Sie verstarb an fortgeschrittener idiopatischer, hypotropischer Kardiomyopathie. 1963 schlug de Duve als Erster als Erklärung eine lysosomale Speicherkrankheit vor (4).

Die Glykogen-Speicherkrankheit Typ IV ist eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit des Glykogenstoffwechsels, hervorgerufen durch Mangel am Glykogen-Bran-

chingenzym in jedem Gewebe (5, 6). Der enzymatische Defekt der GSD Typ IV (Branchingenzym; Amylo-1,4-1,6 Transglykosidase) wurde 1956 durch Andersen aufgeklärt (7). Er beschreibt einen Patienten, der eine progressive Hepatosplenomegalie zeigte und histologisch abnormale Polysaccharide in der Leber aufwies (klassische Glykogenose Typ IV, Morbus Andersen) (5, 8, 9, 10). Die abnormalen Glykogene haben mehr α -1,4 Glukoseeinheiten und längere Außenketten als normales Glykogen (11). Wegen der abnormalen Glykogenstruktur vermutete man daher einen Mangel am Branchingenzym, welcher von Brown 1966 nachgewiesen worden ist (12).

1.2 Physiologie und Biochemie des Glykogenstoffwechsels

Glykogen ist eine leicht mobilisierbare Speicherform der Glukose. Es ist ein sehr großes, verzweigtes Polymer aus Glukoseeinheiten, die größtenteils über α -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Die Verzweigungen (α -1,6-glykosidische Bindung) treten etwa einmal in zehn Einheiten auf.

Glykogen finden wir in Form von Granula mit einem Durchmesser von 10 bis 40 nm in der Leber sowie im Skelettmuskel. Die Glykogenkonzentration ist in der Leber höher als in der Muskulatur, aber in der Skelettmuskulatur wird aufgrund ihrer größeren Masse insgesamt mehr Glykogen gespeichert.

1.2.1 Enzyme des Glykogenabbaus: Saure α -Glukosidase

Der Glykogenabbau dient ebenso wie die Glukoneogenese der Gewährleistung einer konstanten Blutglukosekonzentration, welche besonders für die Funktion des ZNS und der Muskeltätigkeit von Bedeutung ist. Glykogen wird gänzlich in der Leber abgebaut, da Glukose-6-Phosphatase, ein Hydrolyseenzym, meistens in der Leber, wenig in den Nieren und im Darmgewebe vorkommt. Phosphorylierte Glukose kann im Gegensatz zu freier Glukose kaum aus den Zellen diffundieren.

Am Abbau des Glykogens sind drei Enzyme beteiligt. Phosphorylase spaltet phosphorytisch Glukosereste von den nicht reduzierenden Enden ab. Dabei entsteht neben dem verkürzten Glykogen Glukose-1-Phosphat, das durch die Phosphoglukomutase-Reaktion in Glukose-6-Phosphat isomerisiert wird. Die glykosidische Bin-

dungsstelle zwischen dem C1 einer endständigen Einheit und dem C4 der vorhergehenden Einheit wird durch Orthophosphat gespalten, wobei Glukose-1-Phosphat entsteht, das reversibel in Glukose-6-Phosphat überführt werden kann. Die Phosphorylase stoppt die Spaltung von α -1,4-Bindungen, sobald sie einen endständigen Glukoserest erreicht, der vier Einheiten von einer Verzweigung entfernt liegt. Im nächsten Stadium wird eine Transferase, α -(1 \rightarrow 4)-Transglykosylase (α -1,4-Glukosidase, lysosomal) erforderlich, da eine Transferase einen Block von drei Glukoseeinheiten von einem äußeren Zweig auf einen anderen überträgt. Amylo-(1 \rightarrow 6)-Glukosidase (debranching enzyme) spaltet hydrolytisch die verbleibenden α (1 \rightarrow 6)-gebundenen Glukosemoleküle ab.

1.2.1.1 Struktur der sauren α -Glukosidase

J. A. Lodge et al. löste die Struktur der sauren α -Glukosidase aus *Thermotoga maritima* (Escheria Coli) (77) sauren α -Glukosidase-Protein bildet einen Komplex mit NAD^+ und Maltose, da das Enzym NAD^+ und Mn^{2+} braucht, um eine starke Reduktionskondition der Aktivität zu erreichen. Die NAD^+ verbindet sich mit der Rossmann-Faltung NAD^+ -Bindungsseite. Nicotinamid liegt in der Nähe von Maltose. Die aktive Seite von Cys-174 und die Umgebung des Histidin spielt eine große Rolle für die Hydrolyse-Reaktion (78). Abb. 1 zeigt die 3D-Struktur der sauren α -Glukosidase nach Lodge.

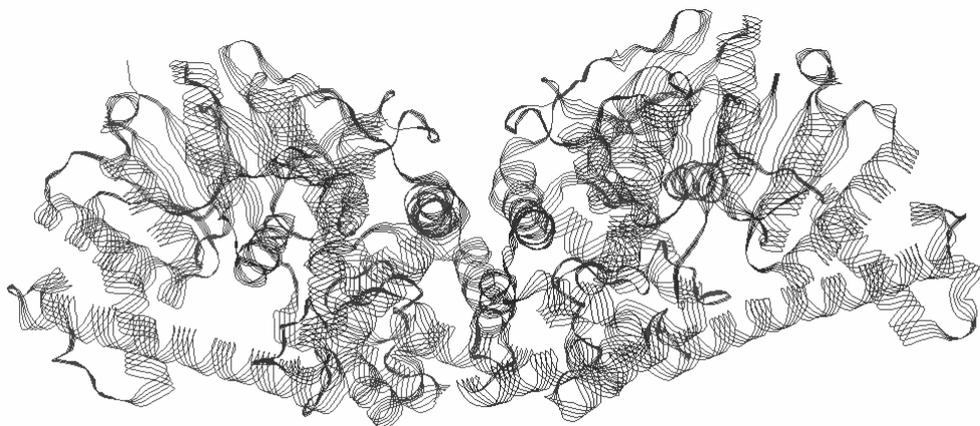


Abb. 1: Struktur der GAA nach Lodge et al. (77)

1.2.2 Enzyme des Glykogenaufbaus: Das Branchingenzym

Die Glukose für den Aufbau des Glykogens wird dem Blut entnommen und in der Leber durch die Hexo- und Glukokinase zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Dieses muß zunächst in Glukose-1-Phosphat isomerisiert werden, denn das ist die Voraussetzung für die Aktivierung der Glukose mit Uridintriphosphatase (UTP). Die Isomerisierung wird durch die Phosphoglukomutase katalysiert, während die Koppelung des gebildeten Glukose-1-Phosphats an UTP durch die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase katalysiert wird. Die Glykogen-Synthetase katalysiert die Übertragung der Glukose aus UDP-Glukose nur auf die C4-Hydroxylgruppe einer endständigen Einheit im wachsenden Glykogenmolekül. Zur Bildung der α -1,6 Bindungen, die Glykogen zu einem verzweigten Polymer machen, ist ein weiteres Enzym erforderlich. Die Verzweigung ist sehr wichtig, da sie die Löslichkeit des Glykogens erhöht und durch sehr viele nicht reduzierende Enden die Angriffspunkte der Glykogenphosphorylase und der Glykogensynthetase darstellen. Damit erhöht die Verzweigung die Geschwindigkeit von Glykogensynthetase und -abbau. Ein Verzweigungsenzym (Branchingenzym) wandelt einige der α -1,4- in α -1,6-Bindungen um. Das Glykogen-Branchingenzym (α -1,4- und 1,6-Glykosyltransferase, kurz GBE) katalysiert den letzten Schritt der Glykogensynthese durch Verbindung von kurzen Glukoseketten (etwa sechs bis sieben Glukose-Einheiten) zum α -1,6 glykosidisch-nichtreduzierenden Ende. Diese sieben Glukoseeinheiten stammen von einer Kette mit mindestens elf Einheiten und werden auf eine mehr im Innern der Kette liegende Stelle transferiert. Das Verzweigungsenzym, das diese Reaktion katalysiert, arbeitet sehr spezifisch. Der neue Verzweigungspunkt muß mindestens vier Einheiten von einem bereits bestehenden entfernt sein. Die neu verbundene, kurze Verzweigung wird durch Glykogensynthetase weiter verlängert (12, 13). Deshalb führt ein Mangel am Glykogen-Branchingenzym zur Akkumulation abnormalem Glykogens mit Amylopektin-ähnlicher Struktur (14, 15). Dieses abnormale Glykogen ist bekannt als Polyglukosan und akkumuliert in der Leber, im Herzen und im neuromuskularem System. Die Verbindung zur α -1,6 Glukose im Glykogen ist für die Zelle sehr wichtig, da dadurch die Löslichkeit zunimmt, der osmotische Druck sinkt und mehr Glukose durch Glykogenphosphorylase mobilisiert werden kann (16). Die klinische Manifestation der GSD Typ IV entsteht durch die Akkumulation von Polyglukosan in verschiedenen Gewe-

ben. Durch die Unlöslichkeit nimmt der osmotische Druck in der Zelle zu, was zur Schwellung und zum Tod führt. Außerdem verursacht diese Unlöslichkeit eine fremde Reaktion in der Leber und führt zu Leberfehlern (17).

1.2.2.1 Struktur des Glykogen-Branchingenzym

Abad et al. veröffentlichte die Struktur des Branchingenzym von *Escherichia Coli* (79). Das Enzym besteht aus drei Major-Domänen, der NH₂-terminalen, sieben Faltblatt-Sandwich-Domäne, der COOH-terminalen Domäne und der zentral liegenden α/β -Barrieredomäne, die das aktive Zentrum des Enzyms enthält. Die Zentraldomänen aller anderen Amylasegruppen sind ähnlich (79). Abb. 2 zeigt die Struktur des Branchingenzym.

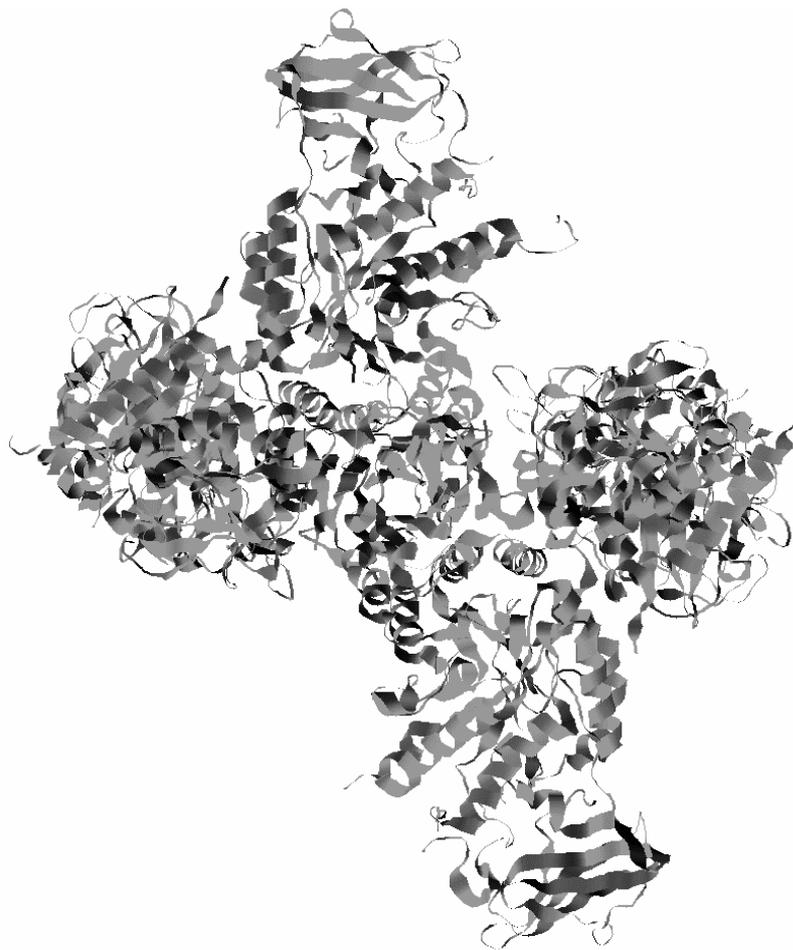


Abb. 2: Ansicht der dreidimensionalen Struktur des Branchingenzym nach Abad et al. (79)

1.3 Klinik und genetische Aufklärung

1.3.1 Glykogen-Speicherkrankheit Typ II

Die Glykogen-Speicherkrankheit Typ II ist eine autosomal rezessive Krankheit des Glykogenstoffwechsels, hervorgerufen durch Mangel am lysosomalen Enzym saurer α -Glukosidase in jedem Gewebe (18). Sie ist eine seltene Stoffwechselerkrankung mit einer wahrscheinlichen Häufigkeit von ca. 1:100.000 (westliche Länder). Jedoch ist die autosomal-rezessive Glykogenose die häufigste Glykogenose (15% aller Glykogenosen). Die infantile Form tritt häufiger in Afrika, dem südlichen China und Taiwan auf (19), während die Spätmanifestation bei adulter Form in den Niederlanden häufiger beobachtbar ist (20).

Die **infantile Form** (GSD Typ II) tritt nur bei Säuglingen auf; charakteristisch für diese Erscheinungsform ist eine schwere Hypotonie, progressive Muskelschwäche, massive Kardiomegalie (Kürzung des PR-Intervalls und des großen QRS-Komplex) mit variabler Hepatomegalie (deutliche Anstieg des Plasma CK) und Macroglossia. Die **klassische infantile GSD Typ II** mit Kardiomegalie ist besonders fatal durch eine im ersten Lebensjahr auftretende Herzinsuffizienz (18).

Die Symptome der **non-klassischen GSD Typ II** als Subklassifikation der infantilen Form (untypische infantile Form oder muskulare Variante) sind leichte Herz-Beteiligung (hypertrophische Kardiomyopathie) ohne Einfluß der linken Herz-Auswurfleistung und der linken Herzkontraktion und eine längere Lebenserwartung gegenüber der klassischen GSD Typ II (länger als 12 Monate). Später sterben die Patienten durch pulmonale Infektionen mit sekundären Ventilationsstörungen. Die Enzymaktivität erniedrigt sich meistens (22).

Juvenile oder intermediate Formen (Glykogen-Speicherkrankheit Typ II oder Saure-Maltase Mangel) assoziieren mit reduzierender Restenzymaktivität (die residuale GAA-Aktivität in Fibroblasten zeigt etwa 10% der normalen Werte). Die juvenile Form beginnt in der ersten Lebensdekade und zeichnet sich durch eine verlangsamte motorische Entwicklung und eine überwiegend proximale und respiratorische Muskelschwäche aus. Glykogen wird in den Skelettmuskeln akkumuliert, begleitet von milder Hepatomegalie und Herz-Beteiligung oder ohne Hepatomegalie und Herz-Beteiligung.

Adulte Formen äußern sich ähnlich wie juvenile Formen und beginnen im Alter von 20-60 Jahren. Die residuale Glukosidaseaktivität ist im Vergleich zu juvenilen Formen höher (40% der normalen Werte), die progressive Myopathie verläuft ohne Herz-Beteiligung und langsamer als bei juvenilen Formen (18). Die adulte Form manifestiert sich in Symptomen einer respiratorischen Insuffizienz und einer progredienten, symmetrischen und muskulären Schwäche der Gliedergürtelmuskulatur. Später gehen die Patienten durch respiratorische Insuffizienz in ein fatales Stadium über (18). Die Unterschiede zwischen juvenilen und adulten Formen sind nicht genau definierbar (23). Die Muskelschwäche in den unteren distalen Extremitäten mit Zwerchfellbeteiligung verläuft sehr langsam progressiv. Anderen Berichten zufolge zeigt sich bei Patienten beider Formen Muskelschwäche mehr im proximalen als distalen Bereich (23). Man vermutet, dass phänotypische Variationen von GSD Typ II (juvenile und adulte Formen) durch unterschiedliche residuale Glukosidaseaktivität entstehen. Vermutlich wird dies durch den hohen Grad der genetischen Heterogenität verursacht (23). Zusätzlich zeigen 30% der Patienten mit Spätmanifestation einer GSD Typ II ein obstruktives Schlafapnoesyndrom (24).

1.3.2 Glykogen-Speicherkrankheit Typ IV

Polyglukosan-Körper entstehen durch Imbalanz zwischen zwei wichtigen Enzymen bei der Glykogensynthese, der Glykogensynthetase und dem Glykogen-Branchingenzym (25). Deshalb verursacht ein Mangel am Glykogen-Branchingenzym (GBE) eine Akkumulation des abnormalen Glykogens mit Amylopektin-ähnlicher Struktur (14, 15). Diese abnormalen Glykogene sind bekannt als Polyglukosan und akkumulieren in allen Geweben, einschließlich des Myokards (7, 26, 27, 28, 29, 30). GSD Typ IV ist eine sehr seltene Krankheit und wird etwa auf eine Inzidenz 1: 200.000 pro Geburt geschätzt (31). Hinsichtlich der Organmanifestation und des klinischen Verlaufs zeigen Patienten mit GSD Typ IV differenzierte Krankheitsbilder (27, 32). Eine typische Mutation des Glykogen-Branchingenzyms verursacht eine rapide progressive Leberzirrhose bei Kindheit (5, 33) als **klassische, allgemeine Form**. Als Symptom ist eine progressive Leberzirrhose bekannt, die typisch in den ersten 18 Monaten mit Hepatosplenomegalie und Leberfehlern auftritt. Danach folgt als Komplikation portale Hypertonie, Azites und ösophageale Varikosis. Die Kinder sterben

meistens im Alter um 5 Jahre, selten überleben die Kinder bei Leberdysfunktion ohne progressive Leberkrankheit (35, 36, 37, 38).

Die **milde, non-progressive, hepatische Form** ist als variante Form beschrieben. Einige Kinder zeigen bei letzterer Form eine deutliche Kardiomyopathie.

Die **neuromuskuläre Form** (neuromuskuläre neonatale Form) zeigt eine schwere Hypotonie in der neonatalen Periode, multisystemische Krankheit mit Myopathie, Neuropathie und unterschiedliche schwere Leberschädigung. Die Kinder sterben in der neonatalen Periode (29). Die **spätere neuromuskuläre Form** in der Jugend zeigt sich mit Myopathie und Kardiopathie (27, 28, 41).

Anders als die Muskelform kann auch eine **spätmanifestierende, neurodegenerative Krankheit** (adult polyglucosan body disease, APBD) auftreten (33). Bei dieser Krankheit beobachtet man bei Erwachsenen eine diffuse zentrale und periphere Nervendysfunktion begleitend mit Akkumulation des Polyglukosan im Nervensystem (42, 43).

Über eine andere **isolierte Muskelform bei Spätmanifestation** wurde berichtet, dass die Branchingenzymaktivität nur im Muskel erniedrigt ist und in anderen Geweben, z. B. in Leukozyten, Fibroblasten und Hepatozyten unauffällig erscheint. Bei juveniler Form zeigt sich, dass die Branchingenzymaktivität nicht nur im Muskel sondern auch in Leukozyten erniedrigt ist (112, 115).

1.4. Molekulargenetische Aufklärung

1.4.1 Molekulargenetische Aufklärung der sauren α -Glukosidase

Bis jetzt sind über 203 Mutationen der GAA identifiziert und im Pompe-Zentrum im Erasmus Universität Medical Center in Rotterdam kategorisiert. Die bei infantiler Form auftretenden Mutationen (p.Cys103Gly, p.Gly219Arg, p.Gly293Arg, p.His308Pro, p.Leu312Arg, p. Leu355Pro, p.Cys374Arg, p. Leu405Pro, p. Gly478Arg, p.Met519Thr, p.Leu552Pro, p.Glu579Lys, p. Gly607Asp, und p.Ala880Asp) führen mit einer Wahrscheinlichkeit von 98% oder höher zu einer Reduktion der α -Glukosidaseaktivität (21).

Hermans et al. berichtet, dass die einzelne Mutation (nur mit p.Trp481Arg oder p.Tyr575Ser) als juvenile Form zum vollständigem Verlust der GAA-Aktivität führt (21). Aber bei der Mutation p.Trp481Arg, p.Tyr575Ser bei Heterozygotie mit einer

weiteren, zweiten Mutation, wird die Restenzymaktivität erhalten. Die Mutation (p.Pro285Arg, p.Try455Phe, p.Pro545Leu, und p.Gly549Arg) führte zum partiellen Verlust der GAA-Aktivität. Die Patienten mit dieser Mutation korrelierten zwischen ihrem Genotyp und der Restenzymaktivität und präsentierten sich mit juveniler Form (21). Hermans et al. stellte zwei Patienten mit Mutation (c.525del mit c.546 G>A und c.1827del mit c.-45T>G) als adulte Form vor. Die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp wurde nicht aufgeklärt (21).

GSD Typ II ist eine autosomal rezessive Krankheit. Beide Eltern der kranken Kinder sind Träger der Mutantgene. Siblings haben eine 25%ige Chance, diese Krankheit zu erhalten und eine 50%ige Chance, wenn beide Eltern Träger des Gens sind. Der verantwortliche Gencode der sauren α -Glukosidase liegt im menschlichen Chromosom 17q25.2-q25.3 und enthält 20 Exons. Das erste Exon ist nicht kodiert (22, 80). GAA cDNA enthält eine 2856 bp kodierende Sequenz. Sie verbindet sich mit der nichtübersetzten 5' Region der 218 bp und nicht übersetzten 3' Region der 555 bp. Sie kodieren ein Polypeptid, das aus 952 Aminosäuren besteht und eine molekulare Masse von 105 kDa besitzt (81, 82). Der Enzym-Precursor wird mit einem Asparat-Rest glykolysiert und einem Mannoserest phosphoryliert, um Lysosome und proteolytische Prozesse zu aktivieren (83, 84). Die Major-Formen werden durch SDS-Elektrophorese, einem Precursor 110 kDa und zwei Matur-Formen 76 – 70 kDa, dargestellt. Die katalysierende Seite wurde identifiziert (85).

Neue Studien zeigen, dass IVS1 (13T→G) als juvenile Form die am häufigsten auftretende Mutation in Kaukasien ist (86, 87). Eine Asp645Glu-Mutation wird meistens in infantiler Form in Taiwan und China beobachtet (88, 89, 90, 91).

C.1585TC>GT(Ser529Val), c.2015G>A(Arg672Gln) als juvenile Form und c.1798C>T(Arg600Cys) in unterschiedlichen Formen tritt häufig in Japan auf (92). Arg854stop common nonsense Mutation tritt bei Afrikanern oder bei Amerikanern afrikanischen Ursprunges als infantile Form auf (93).

Die Allele, die Deletion eines Basenpaars in Position 525 (525delT), 510C>T(A170A), c.925G>A(Gly309Arg) und die Deletion des Exons 18 (Exon 18 del), tritt in Deutschland häufiger auf als in anderen Ländern. Homozygot für 525delT oder Exon 18 del und Compound heterozygot für diese Allele ist die infantile Form (86, 87, 94, 95, 96, 97, 98). Der Genotyp korrespondiert nicht immer mit dem Phänotyp, da die unterschiedliche Modifizierung der Gene eine Rolle spielt (46, 99, 100, 101, 102).

Vier Patienten aus Holland und ein Patient aus Südafrika mit der Mutation c.1634C>T(Pro545Leu) wurden durch Hermans et al. vorgestellt. Eine doppelte Insertion c.2741insC2743insG konnte bei drei türkischen Familien bestätigt werden (95, 103).

In der folgenden Tabelle 1 ist die Gensequenz der GAA aufgelistet:

1	cagttgggaa	agctgaggtt	gtcgccgggg	ccgcggtgg	aggtcgggga	tgaggcagca
61	ggtaggacag	tgacctcggg	gacgcgaagg	accocggcca	cctctaggtt	ctcctcgtcc
121	gcccgttgtt	cagcgaggga	ggctctgggc	ctgccgcagc	tgacgggaa	actgaggcac
181	ggagcgggccc	tgtaggagct	gtccaggcca	tctccaacca	tgggagtgag	gcaccgccc
241	tgctcccacc	ggctcctggc	cgtctgcgcc	ctcgtgtcct	tggcaaccgc	tgcactcctg
301	gggcacatcc	tactccatga	tttctgctg	gttcccgcag	agctgagtgg	ctcctcccca
361	gtcctggagg	agactcacc	agctcaccag	cagggagcca	gcagaccagg	gccccgggat
421	gcccaggcac	accctggccc	tcccagagca	gtgcccacac	agtgcgacgt	ccccccaac
481	agccgcttcg	attgcgccc	tgacaaggcc	atcaccacag	aacagtgcga	ggcccgcggc
541	tgctgctaca	tccctgcaaa	gcagggctg	cagggagccc	agatggggca	gcccctgggc
601	ttcttcccac	ccagctacc	cagctacaag	ctggagaacc	tgagctcctc	tgaaatgggc
661	tacacggcca	ccctgaccgc	taccacccc	accttcttc	ccaaggacat	cctgaccctg
721	cggctggacg	tgatgatgga	gactgagaac	cgcctccact	tcacgatcaa	agatccagct
781	aacaggcgct	acgaggtgcc	cttgagagacc	ccgcgtgtcc	acagccgggc	accgtcccca
841	ctctacagcg	tggagtctc	cgaggagccc	tccgggtga	tcgtgcaccg	gcagctggac
901	ggccgctgc	ttgtaaacac	gacggtggcg	cccctgtct	ttgcggacca	gttctctcag
961	ctgtccacct	cgctgcctc	gcagtataac	acaggcctcg	ccgagcacct	cagtcccctg
1021	atgctcagca	ccagctggac	caggatcacc	ctgtggaacc	gggaccttgc	gcccacgccc
1081	ggtgcgaacc	tctacgggtc	tcacccttcc	tacctggcgc	tggaggacgg	cgggtcggca
1141	cacgggtgt	tcctgctaaa	cagcaatgcc	atggatgtgg	tcctgcagcc	gagcctgcc
1201	cttagctgga	ggtcgacagg	tgggatcctg	gatgtctaca	tcttctctgg	cccagagccc
1261	aagacgctgg	tgcagcagta	cctggacgtt	gtgggatacc	cgttcatgcc	gccatactgg
1321	ggcctgggct	tcacactgtg	ccgctggggc	tactcctcca	ccgctatcac	ccgccaggtg
1381	gtggagaaca	tgaccagggc	ccacttcccc	ctggacgtcc	aatggaacga	cctggactac
1441	atggactccc	ggagggactt	cacgttcaac	aaggatggct	tccgggactt	cccggccatg
1501	gtgcaggagc	tgcaccaggg	cggccggcgc	tacatgatga	tcgtggatcc	tgccatcagc
1561	agctcggggc	ctgcccgggag	ctacaggccc	tacgacgagg	gtctgcggag	gggggttttc
1621	atcaccacag	agaccggcca	gcccgtgatt	gggaaggtat	ggcccgggtc	gacctcttc
1681	cccgacttca	ccaaccccac	agccctggcc	tgggtgggag	acatgggtggc	tgagtccat
1741	gaccaggtgc	ccttcgacgg	catgtggatt	gacatgaacg	agccttccaa	cttcatcaga
1801	ggctctgagg	acggctgcc	caacaatgag	ctggagaacc	caccctacgt	gcctggggtg
1861	ggtgggggga	ccctcaaggc	ggccaccatc	tgtgcctcca	gccaccagtt	tctctccaca
1921	cactacaacc	tgcacaacct	ctacggcctg	accgaagcca	tcgcctccca	cagggcgctg
1981	gtgaaggctc	gggggacacg	cccatttgtg	atctcccgtc	cgacctttgc	tggccacggc
2041	cgatacggcg	gccactggac	gggggacgtg	tggagctcct	gggagcagct	cgcctctcc
2101	gtgccagaaa	tccctgcagtt	taacctgctg	ggggtgcctc	tggtcggggc	cgactctgc
2161	ggcttctctg	gcaacacctc	agaggagctg	tgtgtgcgct	ggaccacagct	gggggacctc
2221	tacccttca	tgcggaacca	caacagcctg	ctcagtctgc	cccaggagcc	gtacagcttc
2281	agcgagccgg	cccagcaggc	catgaggaag	gccctcacc	tgcgctacgc	actcctcccc
2341	cacctctaca	cactgttcca	ccaggcccac	gtcgcggggg	agaccgtggc	ccggcccctc
2401	ttcctggagt	tcccgaagga	ctctagcacc	tggactgtgg	accaccagct	cctgtggggg
2461	gagccctgc	tcatacccc	agtgctccag	gcccgggaagg	ccgaagtgc	tggctacttc
2521	cccttgggca	catggtacga	cctgcagacg	gtgccaatag	aggcccttgg	cagcctccca
2581	ccccacctg	cagctccccg	tgagccagcc	atccacagcg	aggggcagtg	ggtgacgctg
2641	ccggccccc	tggacaccat	caacgtccac	ctccgggctg	ggtacatcat	ccccctgcag
2701	ggcctgggccc	tcacaaccac	agagtcccgc	cagcagccca	tggccctggc	tgtggcctg
2761	accaagggtg	gagaggcccg	aggggagctg	ttctgggacg	atggagagag	cctggaagtg
2821	ctggagcgag	gggcccacac	acaggtcatc	ttcctggcca	ggaataaacac	gatcgtgaat
2881	gagctgggtac	gtgtgaccag	tgagggagct	ggcctgcagc	tgagaaggt	gactgtcctg
2941	ggcgtggcca	cgggccccc	gcaggtcctc	tccaacggtg	tcctgtctc	caacttcacc
3001	tacagccccg	acaccaaggt	cctggacatc	tgtgtctcgc	tgttgatggg	agagcagttt
3061	ctcgtcagct	ggtgttagcc	gggcgagtg	tgttagtctc	tccagagggg	ggctggtcc
3121	ccagggaaagc	agagcctgtg	tgcgggcagc	agctgtgtgc	gggctggggg	ggtgcatgtg
3181	tcacctggag	ctgggcaacta	accattccaa	gcccgcgcat	cgcttgtttc	cacctcctgg
3241	cggggggctc	tggccccaa	cgtgtctagg	agagctttct	ccctagatcg	cactgtgggc
3301	ggggcctgg	agggctgctc	tgtgttaata	agattgtaag	gtttgcctc	ctcacctgtt
3361	gcccggcatgc	gggtagtatt	agccaccccc	ctccatctgt	tcccagcacc	ggagaagggg
3421	gtgctcaggt	ggaggtgtgg	ggtatgcacc	tgagctcctg	cttcgcgctc	gctgctctgc
3481	cccaacgcga	ccgcttcccg	gctgcccaga	gggctggatg	cctgcccgtc	cccagcgaag
3541	cctgggaact	caggaaaatt	cacaggactt	gggagattct	aatcttaag	tgcaattatt

Tab. 1: Gensequenz der GAA nach Hoefsloot et al. (113)

1.4.2 Molekulargenetische Aufklärung des Glykogen-Branchingenzym

Als Ursache der klassischen, allgemeinen Form ist eine Dreipunktmutation beim GBE-Gen bekannt: R515C, F257L und R524X. Diese Mutation verursacht eine Inaktivität des GBE (34).

Als Ursache der milden, nonprogressiven, hepatischen Form ist eine Mutation bei zwei Allele, L224P und Y329S bestätigt und heterozygot für Mutation R524Q dargestellt. Bei L224P zeigt sich ein kompletter Ausfall der GBE-Aktivität und bei Y329S etwa 50% der GBE-Aktivität (39, 40).

Als Ursachen der neonatalen, neuromuskularen Form sind Deletion der 210 bp vom Nukleotid 873 bis 1082 der GBE-cDNA erkannt, d. h. der Verlust von 70 Aminosäuren, was dem Verlust eines vollständigen Exons entspricht, das durch eine 3' Akzeptor Punktmutation (ag bis aa) im Enzym bei neonataler Periode vorhanden ist. Diese Deletion löscht die GBE-Aktivität vollständig (34).

Die zwei Mutationen der spätmanifestierenden, neurodegenerativen Krankheit im GBE-Gen bei APBD sind R515H in Nukleotid 1634 und R524G in Nukleotid 1661, Y329S. Dies hat eine erniedrigte Branchingenzymaktivität zur Folge (40, 44, 112).

Die cDNA des humanen Glykogen-Branchingenzym wurde mittels Hefe kloniert, um die molekulare Basis der Glykogen-Speicherkrankheit Typ IV und um die Spezifität des Gewebes zu verstehen. In Tabelle 2 ist die vollständige Sequenz des Human GBE Gens aufgeführt. Die Sequenz beginnt mit dem BgIII-Anfang und endet mit dem EcoRI-Terminus. Die DNA-Sequenz der gesamten pVT602 cDNA wurde bestimmt. Die Sequenz bildet eine Kette von 702 Aminosäuren. Diese cDNA, die 90 Basen 5' nicht übersetzte Region bis zum ersten Methionin-Codon enthält, beginnt mit ATG (80). Die kodierten Gene des Branchingenzym werden sofort als diagnostisches Instrument angewendet und sind in der Zukunft als somatische Gentherapie vorstellbar (104).

Das Human GBE Gen ist in Chromosom 3p14 lokalisiert und besteht aus 16 Exons, die eine Länge von etwa 118kb chromosomaler DNA haben. Die cDNA hat etwa 3kb Länge und kodiert 702 Aminosäuren (14).

-90 GATCTGAATTCGGTCCCAGCTAGAGCTCCAGCGCCCGCTCAGGCCCACTCGACCCTCTCGGGCTCGGCTACTT

-15 GGACTGCGGCGGAATATGGCGGCTCCGATGACTCCCGCGGCTCGGCCGAGGACTACGAGGCGGCGCTCAATGCC
MetAlaAlaProMetThrProAlaAlaArgProGluAspTyrGluAlaAlaLeuAsnAla

-90 GCCCTGGCTGACGTGCCGAACCTGGCCAGACTCCTGGAGATCGACCCGTACTTGAAGCCCTACGCCGTGGACTTC
AlaLeuAlaAspValProGluLeuAlaArgLeuLeuGluIleAspProTyrLeuLysProTyrAlaValAspPhe

165 CAGCGCAGGTATAAGCAGTTTAGCCAAATTTGAAGAACATTGGAGAAAATGAAGGTGGTATTGATAAGTTTTCC
GlnArgArgTyrLysGlnPheSerGlnIleLeuLysAsnIleGlyGluAsnGluGlyGlyIleAspLysPheSer

240 AGAGGCTATGAATCATTTGGCGTCCACAGATGTGCTGATGGTGGTTTATACTCAAAGAATGGGCCCGGAGCA
ArgGlyTyrGluSerPheGlyValHisArgCysAlaAspGlyGlyLeuTyrSerLysGluTrpAlaProGlyAla

315 GAAGGAGTTTTCTTACTGGAGATTTTAAATGGTTGGAATCCAT TTCGTACCCATACAAAAACTGGATTATGGA
GluGlyValPheLeuThrGlyAspPheAsnGlyTrpAsnProPheSerTyrProTyrLysLysLeuAspTyrGly

390 AAATGGGAGCTGTATATCCCACAAAGCAGAATAAATCTGTACTCGTGCCTCATGGATCCAAATTAAGGTAGTT
LysTrpGluLeuTyrIleProProLysGlnAsnLysSerValLeuValProHisGlySerLysLeuLysValVal

465 ATTACTAGTAAAAGCGGAGAGATCTGTATCGTATTTACCGTGGCAAAGTATGTGGTTCGTGAAGGTGATAAT
IleThrSerLysSerGlyGluIleLeuTyrArgIleSerProTrpAlaLysTyrValValArgGluGlyAspAsn

540 GTGAATTATGATTGGATACACTGGGATCCAGAACACTCATATGAGTTTAAGCATTCCAGACCAAAGAAGCCACGG
ValAsnTyrAspTrpIleHisTrpAspProGluHisSerTyrGluPheLysHisSerArgProLysLysProArg

615 AGTCTAAGAATTTATGAATCTCATGTGGGAATTTCTTCCCATGAAGGAAAAGTAGCTTCTTATAAACATTTTACA
SerLeuArgIleTyrGluSerHisValGlyIleSerSerHisGluGlyLysValAlaSerTyrLysHisPheThr

690 TGCAATGTACTACCAAGAATCAAAGGCCTTGGATACAACCTGCATTAGTTGATGGCAATCATGGAGCATGCTTAC
CysAsnValLeuProArgIleLysGlyLeuGlyTyrAsnCysIleGlnLeuMetAlaIleMetGluHisAlaTyr

765 TATGCCAGCTTTGGTTACCAAAATCAAGCTTCTTTGAGCTTCCAGCCGTTATGGAACACCTGAAGAGCTACAA
TyrAlaSerPheGlyTyrGlnIleThrSerPhePheAlaAlaSerSerArgTyrGlyThrProGluGluLeuGln

840 GAACTGGTAGACACAGCTCATTCCATGGGTATCATAGTCTCTTAGATGTGGTACACAGCCATGCTTCAAAAAAT
GluLeuValAspThrAlaHisSerMetGlyIleIleValLeuLeuAspValValHisSerHisAlaSerLysAsn

915 TCAGCAGATGGATTGAATATGTTTGTATGGGACAGATTCCTGTTATTTTCATTCTGGACCTAGAGGGACTCATGAT
SerAlaAspGlyLeuAsnMetPheAspGlyThrAspSerCysTyrPheHisSerGlyProArgGlyThrHisAsp

990 CTTTGGGATAGCAGATTGTTTGCCTACTCCAGCTGGGAAGTTTAAAGATTCTTCTGTCAAACATAAGATGGTGG
LeuTrpAspSerArgLeuPheAlaTyrSerSerTrpGluValLeuArgPheLeuLeuSerAsnIleArgTrpTrp

1065 TTGAAGAATATCGCTTTGATGGATTTGTTTTGATGGTGTACGTCATGCTTTATCATCACCATGGAGTGGGT
LeuGluGluTyrArgPheAspGlyPheArgPheAspGlyValThrSerMetLeuTyrHisHisHisGlyValGly

1140 CAAGGTTTCTCAGGTGATTACAGTGAATATTTCCGACTACAAGTAGATGAAGATGCCTTGACTTACCTCATGTTG
GlnGlyPheSerGlyAspTyrSerGluTyrPheGlyLeuGlnValAspGluAspAlaLeuThrTyrLeuMetLeu

1215 GCAAATCATTGGTTCACACGCTGTGTCCCGATTCTATAACAATAGCTGAGGATGTATCAGGAATGCCAGCTCTG
AlaAsnHisLeuValHisThrLeuCysProAspSerIleThrIleAlaGluAspValSerGlyMetProAlaLeu

1290 TGCTCTCAAATTTCCAGGGAGGGGGTGGTTTTGACTATCGACTAGCCATGGCAATTCAGATAAGTGGATTACG
CysSerProIleSerGlnGlyGlyGlyGlyPheAspTyrArgLeuAlaMetAlaIleProAspLysTrpIleGln

1365 CTACTTAAAGAGTTTAAAGATGAAGACTGGAACATGGGCGATATAGTATACACGCTCACAACAGGCGCTACCTT
LeuLeuLysGluPheLysAspGluAspTrpAsnMetGlyAspIleValTyrThrLeuThrAsnArgArgTyrLeu

1440 GAAAAGTGCATTGCTTATGCAGAGACCATGATCAGGCATTGGTTGGGGATAAGTGCCTGGCATTGTTGGTTGATG
GluLysCysIleAlaTyrAlaGluSerHisAspClnAlaLeuValGlyAspLysSerLeuAlaPheTrpLeuMet

1515 GATGCCGAAATGTATACAAACATGAGTGTCTGACTCCTTTTACTCCAGTTATTGATCGTGAATACAGCTTCAT
AspAlaGluIleMetTyrThrAsnMetSerValLeuThrProPheThrProValIleAspArgGlyIleGlnLeuHis

1590 AAAATGATTCGACTCATTACGCATGGGCTTGGTGGAGAAGGCTATCTCAATTTTCATGGGTAATGAATTTGGCAT

LysMetIleArgLeuIleThrHisGlyLeuGlyGlyGluGlyTyrLeuAsnPheMetGlyAsnGluPheGlyHis

1665 CCTGAATGGTTAGACTTCCCAAGAAAAGGAAATAATGAGAGTTACCATTATGCCAGGCGGCAGTTTCATTTAACT
ProGluTrpLeuAspPheProArgLysGlyAsnAsnGluSerTyrHisTyrAlaArgArgGlnPheHisLeuThr

1740 GACGACGACCTTCD TCGCTACAAGTTCCTAAATAATTTTGACAGGGATATGAATAGATTGGAAGAAAGATATGGT
AspAspAspLeuLeuArgTyrLysPheLeuAsnAsnPheAspArgAspMetAsnArgLeuGluGluArgTyrclly

1815 TGGCTTGACGCTCCACAGGCCTACGTGAGTGAAAAACATGAAGGCAATAAGATCATGCTTTTGAAGAGCAGGT
TrpLeuAlaAlaProGlnAlaTyrValSerGluLysHisGluGlyAsnLysIleIleAlaPheGluArgAlaGly

1890 CTTCTTTTCATTTTCACTTCCATCCAAGCAAGAGCTACACTGACTACCGAGTTGGAACAGCATTGCCAGGGAAA
LeuLeuPheIlePheAsnPheHisProSerLysSerTyrThrAspTyrArgValGlyTyrAlaLeuProGlyLys

1965 TTCAAAATTGTGCTAGATTTCAGATGCAGCGGAATATGGAGGGCATCAGAGACTGGACCACAGCACTGACTTTTTT
PheLysIleValLeuAspSerAspAlaAlaGluTyrGlyGlyHisGInArgLeuAspHisSerThrAspPhePhe

2040 CTGAGGCTTTTGAACATAATGGGCGTCCCTATTCTCTTTTGGTGTACATTCCAAGCAGAGTGGCCCTCATCCTT
SerGluAlaPheGluHisAsnGlyArgProTyrSerLeuLeuValTyrIleProSerArgValAlaLeuIleLeu

2115 CAGAATGTGGATCTGCCGAATTGAAGAGGCCTGATTTTCAGCTCCACCAGATGCAGATTTGTGTTTTGTTTTCTTG
GlnAsnValAspLeuProAsn***

2190 TTATCACTGTACACAGCTTATAACATGTATGCTTTTCAGAATACAGTTGTCTAGCCAAGCCATCAAGTGTCTGA

2265 AATTCAATATTGGTTTATGCAAATACAGCAAACCTTTTATTTAAGTAGATAGGAGAATATGTTTAAATATTAGGA

2340 ATCCTAGACCATATTTTCAAGTCATCTTAGCAGCTAGGATTCTCAAATGGAAGTGTATATATAATATGTTAAAA

2415 ACATTTTGCTTTCTGGCTAATTATTTGATCCTTTTAAATCCAAATTTGAATCATTGTGCATGTATGATTATTTT

2490 TGTAAATGTACACAGTATTTAAGATGGATATTTGGTGGCTCTATTTGTTCTGATATCTTTTGGTCTAAATTATG

2565 AGGTACCAAGATTGTTTCTTTGTTTCTTTTTTCAAATTTGTGTTTAGAAATACTGTAATAAATATGCAGTAGTGA

2640 TATAAAGAATTATATCCAAGTAATATAAAAAGCCATTACGTATGAACTCATCCGTGTCTCATTGTTGTTTTATT

2715 TTGTGATCTCTGTCCACTAAGTATCTTGTAAATGCCAGTATCTCAGTCTTTCTGAAGCCCTGAAATGGTAATT

2790 GTAGCATTTCAGAAAATGTCTTTTCATTTCATCAATCAATAAAAAGCTTTTGT

2865 CCGTCGACAAAGCGGCCGCAAACCGAATTC

Tab. 2: DNA-Sequenz der cDNA Einsatz in pVT602

1.5. Diagnose und Therapie

1.5.1 Diagnostik und Therapie bei GSD Typ II

Eine exakte Diagnose erfordert eine Messung der Saure-Maltase-Aktivität (GAA-Aktivität, Enzymanalyse) in Lymphozyten, kultivierten Fibroblasten, Leukozyten, Myozyten, Hepatozyten, Amniozyten oder Chorionzotten. Die Messungen der GAA-Aktivität von Leukozyten sind nicht genauer, da neutrale Maltase im Blut vorhanden ist. Bei Säuglingen ist die Enzymaktivität erschwert zu messen, da Granulozyten (Leukozyten mit Zytoplasmakörper) ein Nieren-Isomer mit saurer Maltase enthalten, welches bei saurem pH aktiv ist. In Zukunft könnte die totale Konzentration des GAA-

Proteins einfach durch Nachweis im Urin, im Plasma oder im Blutspot bestimmt werden (46, 47, 48, 49). Zusätzlich werden Serum-CK, -GOT und -GPT untersucht, welche besonders bei der juvenilen Form angestiegen sind (50). Als bildgebende Untersuchungsmethoden werden die Echokardiographie, die den Grad der Kardiobeteiligung bestätigt und die Angiographie, die durch die Glykogenakkumulation verursachte Aneurysmen in den intrakraniellen Blutgefäßen entdeckt, eingesetzt. Zusätzlich wird die Elektromyographie angewendet.

Neurographisch zeigen sich bei der Glykogenose keine Auffälligkeiten und myographisch findet sich regelmäßig pathologische Spontanaktivität in Form von positiven, scharfen Wellen, Fibrillationen und, bei bis zu 30% der Patienten, myotone Entladungen (19, 51, 52, 53). Die histologischen Untersuchungen waren uneinheitlich. Die histologischen Befunde waren häufig positive PAS, saure Phosphatase und vakuolare Myopathie (114).

Genanalyse durch PCR und Sequenzierung als wichtige Diagnose wird häufig angewendet, um die Basis von der genetischen, biochemischen und klinischen Heterogenität zu verstehen und um in Zukunft geeignete Therapiemaßnahmen finden zu können. Prenatale Genanalyse und Enzymanalyse werden bei Chorionzotten sowie bei Amniozyten angewendet, um eine frühe Erkennung der Krankheit zu ermöglichen und die Basis der spezifischen Mutation zu verstehen.

Eine effektive Therapie ist bis heute nicht gefunden, eine symptomatische Therapie wird bei juveniler und adulter Form angewendet. Über Knochenmarktransplantationen wurde bisher erfolglos berichtet, da das Enzym nicht in die Muskelzellen eindringen konnte (51).

Eine direkte Gentherapie durch Stammzellen könnte in der Theorie eventuell möglich sein (54). Als Enzymsubstitutionstherapie wurde saure α -Glukosidase aus Fungus *Aspergillus niger* drei Kindern mit infantiler Form administriert. Die Therapie verlief erfolglos.

Enzym-Replacement-Therapie (ERT), die direkt intravenöse Infusion der „recombinant human GAA“ und die Enzym-Enhancement-Therapie (EET), die die übriggebliebene Funktion des mutierten Branchingenzym ansteigen läßt, ist in Zukunft vorstellbar (51). Nach dieser Therapie zeigten 15 Kinder mit klassischer, infantiler Form (hypertropische Kardiomegalie, schwerer GAA-Mangel) eine abnehmende Kardio-

megalie, Funktionszunahme der Kardial- und Skelettmuskeln und eine verlängerte Lebenserwartung (55, 56, 57). Durch mehrere Berichte wurde bestätigt, dass die Patienten mit früherer infantiler Form durch ERT therapiert werden können, jedoch erhöht sich meistens nur die Lebenserwartung.

Die nächste geplante, neue Studie über die intravenöse Therapie der „recombinant human acid alpha-Glukosidase (rhGAA)“ aus transgener Kaninchenmilch ist 2004 in den USA und Europa gestartet.

Die Patienten mit adulter Form werden durch psychologische Beratung, Physiotherapie und hohe Protein-Diät (Leucin- und L-Alanin-Substitution bei Spätmanifestation der GSD Typ II) unterstützt, was bei einem Teil der Patienten zu einer verbesserten Muskelfunktion führt (58, 59, 60).

1.5.2 Diagnostik und Therapie bei GSD Typ IV

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wird positive PAS (Periodic Acid Schiff-positiv) und Diastase-resistente Inklusion, d. h. Amylopektin-ähnlichem Material (Polyglukosan Körper) in den betroffenen Organen als erster wichtiger Hinweis beobachtet (28, 61, 62). Der zweite wichtige Schritt der Diagnose ist der Nachweis der Enzymaktivität in der Leber, im Muskel (kultivierte Myokardiozyten), in der Haut (kultivierte Fibroblasten) und in Leukozyten (9). Prenatale Diagnostik ist möglich durch Messung der Enzymaktivität in kultivierten Amniozyten oder Chorionzotten. Es konnte beobachtet werden, dass Neugeborene Hypotonie aufweisen und während der Schwangerschaft Komplikationen, wie Hydratation, Polyhydramnion und Minderung der fetalen Bewegung häufig in Erscheinung treten (63).

Bisher ist eine Erklärung der GSD Typ IV auf molekularer Ebene nicht gefunden und die unterschiedlichen Symptome nicht erklärbar. Alle Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der GBE-Aktivität sind indirekt, deshalb passt die bisherige Methode nicht für eine quantitative Analyse der GBE-Restaktivität, um verschiedene Formen dieser Krankheit zu differenzieren (31, 38, 64).

Als moderne diagnostische Methode wird bei der Mutation Genanalyse durch PCR und Sequenzierung angewendet. In Zukunft müssen molekulargenetische Untersuchungen den genetischen Zusammenhang des Branchingenzym genauer aufdecken, um den pathogenetischen differentiellen Zusammenhang mit der APBD (A-

dulte Polyglukosan Body Disease) und den Varianten der GSD Typ IV aufzuklären. Möglicherweise ergeben sich hieraus gentherapeutische Ansätze (65).

Die Behandlung der APBD und der GSD Typ IV ist bislang rein symptomatisch. Ursächliche Therapiemöglichkeiten stehen derzeit nicht zur Verfügung. Bisherige Therapieversuche mit langfristigen Steroid- oder Glukagon-Gaben, Substitutionsversuche mit α -1,4- und α -1,6-Glukosidasen, sowie Diätprogramme mit eiweißreicher und kohlenhydratarmer Kost waren bei der GSD Typ IV erfolglos. Eine Lebertransplantation wurde bislang nur bei wenigen Patienten bei fortgeschrittener Lebererkrankung mit unterschiedlichen Therapieerfolgen durchgeführt (65). Bisher wurde lediglich über eine HTX (Orthotopen Herztransplantation) bei einem Patienten mit GSD Typ IV berichtet, wobei der Patient aufgrund einer septischen Komplikation verstarb (26). Patienten mit anderen Formen der Glykogenose wurden bei kardialer Manifestation bereits erfolgreich transplantiert (66).

1.6. Differentialdiagnose

1.6.1 Differentialdiagnose bei GSD Typ II

Viele Krankheiten haben ähnliche klinische Erscheinungsformen wie die bei infantilen Formen der GSD Typ II:

Zytochrom-c-Oxidase-Mangel-Syndrom, Debrancher-Enzymmangel, Sekundär-Carnitin-Mangel-Syndrom, tödlich verlaufende kindliche Herzskelett-Myopathie und Noonan-Syndrom. Adulter und auch juveniler GAA-Mangel kann auf Grund der proximalen Muskelschwäche mit verschiedenen anderen Erkrankungen verwechselt werden, wie z. B. Polymyositis, Schulter-Becken-Gürtel-Dystrophie bei Erwachsenen, Curschmann-Steinert sowie Motoneuronenerkrankungen, z. B. amyotrophe Laterosklerose (ALS) und Anorexia nervosa.

Differentialdiagnostisch kommen muskulare lysosomale Glykogenose in Betracht, an die insbesondere bei jüngeren Patienten mit normaler GAA-Aktivität gedacht werden muß. Der Morbus Danon wird durch einen X-chromosomal vererbten, primären Mangel an lysosomalassoziertem Membranprotein-2 hervorgerufen und ist klinisch neben einer proximalen Myopathie durch Kardiomyopathie und mentale Retardierung gekennzeichnet (67, 68, 69).

Die X-chromosomal vererbte Myopathie mit exzessiven autophagischen Vakuolen ist eine weitere muskulare, lysosomale Glykogenose, die sich klinisch durch eine im Jugendalter beginnende, langsam progrediente, proximale Muskelschwäche ohne systemische Beteiligung auszeichnet (70, 71, 72).

1.6.2 Differentialdiagnose bei GSD Typ IV

Die wichtigste Diagnose der GSD Typ IV ist ein positives PAS und eine Diastase-resistente Globulie im Gewebe. Als differentielle Diagnose wird GSD Typ II, infantile Form, gezählt (73). Die GSD Typ II zeigt in der infantilen Form eine starke Kardiomegalie und bei Muskelbiopsie massive Akkumulation des normalen Glykogens ohne Polyglukosan. Schwere infantile Hypotonia gehören zur fatalen, infantilen Variation der GSD Typ V (myophosphorylase deficiency) (74, 75) und der GSD Typ VII (PFK deficiency) (76). Bei dieser Krankheit tritt vizzerale Beteiligung nicht in Erscheinung. Ferner ist in der Glykogenakkumulation im Muskel kein Polyglukosan nachweisbar.

Die Lafora-Krankheit zeigt ein ähnliches Bild bei Leberbiopsie wie GSD Typ IV (Polyglukosan Körper) (62). Trotz Ähnlichkeiten mit GSD Typ IV kann man die Lafora Krankheit durch Färbung, sowie durch das charakteristische klinische Trias, i.e. Epilepsie, Myoklonie und Demenz, unterscheiden.

2. Ziel der Arbeit

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit ist es zunächst, durch Messung der Enzymaktivität von saurer α -Glukosidase (für GSD Typ II) und der des Branchingenzym (für GSD Typ IV) in Leukozyten einen Screening-Test durchzuführen.

Ziel der Arbeit ist es, mittels Messung der Enzymaktivitäten eine frühzeitige Erkennung der Krankheit zu ermöglichen und dadurch den Patienten rechtzeitig einer Therapie zuzuführen. Da eine Erklärung der Erkrankung auf molekularer Ebene und die Differenzierung der Krankheit mit einer Enzymanalyse bisher noch nicht möglich sind, wird daher in dieser Arbeit auch die Genanalyse als diagnostische Methode angewendet. Durch diese Studie soll eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp aufgeklärt und die genetische Kontrolle des Enzyms genauer verstanden werden.

3. Patienten

3.1 GSD Typ II

3.1.1 Patientin 1

Die 15-jährige Patientin stammt aus Usbekistan und lebt seit 1989 in Deutschland. Sie hat drei Brüder, die gesund sind. Zwei Kinder der Mutter sind kurz nach Geburt, bedingt durch den mütterlichen Diabetes mellitus, an Makrosomie verstorben. Die Mutter berichtet, dass sie in der Schulzeit an gelegentlich auftretenden kleinen Fieberschüben litt, die im Verlauf des achten bis neunten Lebensjahres sistieren. Die Patientin machte von Beginn an einen schwächeren Eindruck als ihre Schwestern. Zusätzlich verlief die motorische Entwicklung der Patientin sehr langsam. Sie zeigt eine deutliche Myopathie mit Reduktion der groben Kraft auf Kraft Grad IV in allen Extremitäten. Die Muskeleigenreflexe sind nicht auslösbar. An beiden Füßen, rechts mehr als links, liegt eine Spitzfußkontraktur und eine massive Seitenhypertrophie vor. Die Patientin kann schwer Treppensteigen und schwer bergauf gehen. Die histologischen Befunde zeigen eine ausgeprägte vakuolare Myopathie mit PAS-positiven Materialien und keine mesenchymale entzündliche Zeichnung. GSD Typ II in adulter Form wurde festgestellt.

3.1.2 Patientin 2

Bei der neun Jahre alten deutschen Patientin wird juvenile GSD Typ II festgestellt. Im Alter von einem Jahr litt sie unter Fieberschüben. Aufgrund eines Zufallsbefundes mit CK-Erhöhung wurde eine Muskelbiopsie veranlaßt. Die motorische Entwicklung wurde zeitgerecht durchlaufen. Nach längeren Gehstrecken tritt heute eine deutliche Ermüdung auf. Zusätzlich klagt die Patientin über Nachtschweiß und morgendliche Kopfschmerzen. Körperliche und Blutgas-Untersuchung, Lungenfunktion, Atemmuskelfunktion und Polysomnographie sind unauffällig. Ein deutlicher Anstieg von GOT, GPT und CK deutet auf eine Möglichkeit der Leberbeteiligung hin. Bei ihrer älteren Schwester wurde auch die GSD Typ II durch Muskelbiopsie, die vakuolare schöllige fortgeschrittene Myopathie, mit positiver Kaminfärbung nach Best nachgewiesen. Eine GOT-, GPT- und CK-Erhöhung wurde bestätigt.

3.1.3 Patientin 3

Bei der 16-jährigen deutschen Patientin wurde erstmal im Alter von sieben Jahren eine juvenile GSD Typ II bei auffälliger CK-Erhöpfung festgestellt. Die motorische Entwicklung verlief bis zum heutigen Alter zeitgerecht. Die Patientin kann nicht mehr als etwa 2 km Gehstrecke laufen; beim Treppensteigen benötigt sie Unterstützung. Bisher sind eine Pneumonie, residivierende Infekte, Kopfschmerzen, Schnarchen und Atempausen nicht aufgetreten. Nach schwerer Belastung bekam sie eine Dyspnoe. Die körperliche Untersuchung war unauffällig. Die Untersuchung der Lungenfunktion zeigte eine leichte restriktive Ventilationsstörung und eine Andeutung einer Zwerchfellschwäche. Die Atemmuskelfunktion zeigte einen leicht erhöhten Atemantrieb, leicht erhöhte Atemmuskelbeanspruchung im Liegen und leicht erniedrigte maximale Inspirationsdrücke. Vereinzelt Hypopnoe mit diskreter Entsättigung wurden im Schlaf durch Polysomnographie beobachtet.

3.2 GSD Typ IV

3.2.1 Patient 4

Ein 5-jähriger Patient aus Polen leidet unter Hepatosplenomegalie mit erhöhten Leberwerten ohne weitere Symptome. Bis heute ist eine Restenzymaktivität beobachtbar. Sein Bruder, sein Vater und seine Mutter sind autosomal-rezessiv heterozygot ohne Symptome.

4. Material

4.1 Angewendete Chemikalien, Geräte und Enzyme für Zellenpräparation

4.1.1 Verwendete Chemikalien und Enzyme

Dextran

0,9% NaCl

Heparin

Desinfektionsmittel

Kulturmedium (besteht aus Antibiotikum, Mykotikum, Kälberserum und Glutamin)

Phosphatpuffer

Trypsin

5,5 g CuSO_4 / 100 ml

1,35 g Seignettensalz (NaK-Tartat) / 100 ml

2%iges Na_2CO_3 in n/10 NaOH

150 μl Bisulfit-Borat-Lösung

25 μl Molybdat-Lösung

25 μl Reduktionslösung

500 μl Sulfit-Carbonat-Lösung

Ein Teil 360 mM Glukose-1-Phosphat bei pH 6,5

Ein Teil 4,5 mM Adenosinmonophosphat (AMP)

Ein Teil Phosphorylase a.(aktiv) 18 U/ml

10 μM MUF (4-Methylumbelliferon) Standardlösung

4 μM MUF α -D-Glukoside bei pH 4,0 und pH 6,5

Carbonatpuffer (1M Na_2CO_3 , 1M NaHCO_3) bei pH 10,7

4.1.2 Verwendete Geräte

Zentrifuge (Mikro Rapid K)

Hettich

Eppendorfreaktionsgefäße

Sarstedt

Vortex Mixer

IKA Jaunke & Kunkel

Kühlschrank +4 °C

Gefrierfach -20 °C

Photometer Ultraspect 3100 peo.

LKB Bromma

Präzisionsküvetten	Hellma
Heizplatte	IKAMAG RCT
Eppendorfpipetten	Sarstedt
Rührspatel	Sarstedt
Rührgeräte IKAMAG RCT und RET	Jauke & Kunkel
Sonifiziergeräte (Sonifier B-10)	Branson Sonic
Spektrorfluorophotometer (RF-5001PC)	Shimadzu Co.
Feinwaage (BA110S)	Sartorius
Inkubatoren 37 °C und 95 °C	Liebisch
Brutkästen	Costr
Uniflow UV 1200 Überdruckarbeitsplatz	
Falcon-Zellschaber	
Falcon-Gewebekulturflaschen	Becton
Zentrifugengefäße	
Mikroskop	
Glaselektrode	
PHM 82 Standard pH-Meter	

5. Methoden

5.1 Vorbereitung der Leukozyten und Fibroblasten

5.1.1 Leukozytenpräparation

Für die Leukozytengewinnung wird Leukolösung benötigt:

- 5 g Dextran,
- 78 ml 0,9%ige NaCl-Lösung,
- 1,3 ml Heparin und 20,7 ml Aqua bidest.

Bei der Präparation wird folgendermaßen vorgegangen:

5 ml Vollblut wird mit 1 ml Leukolösung (Verhältnis 5:1) in einem Reagenzglas vermischt und eine Stunde bei Zimmertemperatur zur Sedimentation abgestellt. Der Überstand wird möglichst ohne Erythrozyten abpipettiert, danach etwa 2 Minuten bei 5500 U/min. zentrifugiert und verworfen. Das Zentrifugat wird mit 0,15 ml eisgekühltem Aqua bidest. 15 Sekunden vermischt, um Erythrozyten zu lysieren. Danach erfolgt eine sofortige Zugabe von 0,9%iger NaCl-Lösung.

Nach dem Zentrifugieren erhält man die Leukozyten als Sediment (Pellet). Der Überstand wird abpipettiert. Die Probe kann bei Bedarf eingefroren werden. Für die Proteinbestimmung und Enzymaktivitätsmessung kann sowohl eingefrorene, wie frisch abzentrifugierte Probe verwendet werden.

Ist die Probe eingefroren, wird sie zunächst kurz aufgetaucht und mit eiskaltem Wasser versetzt, um eine Verdünnung von etwa 0,5 mg/ml Konzentration zu erreichen. Dann wird sie zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand für die Messung verwendet.

5.1.2 Kultivierung der Fibroblasten

Die Kultivierung der Fibroblasten erfolgt aus Reinheitsgründen unter einem Dunstabzug; es wird unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Zunächst wird das Kulturmedium zu 500 ml, 50 ml Kälberserum, vorbereitet. Dazu gibt man als nächstes Glutamin, 5,5 ml Antibiotikum und Mykotikum im Verhältnis 1:100 zum Kulturmedium zu. Kleine Hautstücke werden präpariert, zugeschnitten und dann vorsichtig in ein neues, steriles Kulturgefäß pipettiert. Die Kulturgefäße sind generell so aufgebaut, dass CO₂

durch Gefäßfilter frei ein- und ausströmen kann. Dann wird das vorbereitete Kulturmedium, etwa 5 bis 10 ml, vorsichtig in das Gefäß einpipettiert. Anschließend wird das Kulturgefäß ein bis zwei Wochen bei 37 °C im Kulturschrank inkubiert.

5.1.3 Fibroblastensplit

Mit dem Mikroskop kontrolliert man während der Inkubationszeit, ob die Fibroblasten am Flaschenboden gut gewachsen sind. Wenn die Fibroblasten dicht sind, werden sie gesplittet. Der Fibroblastensplit sollte immer unter einer Dunstabzugshaube durchgeführt werden, um in möglichst steriler Umgebungsluft zu arbeiten. Dadurch wird eine bakterielle Kontamination geringgehalten. Das Medium des inkubierten Kulturgefäßes wird abpipettiert und verworfen. Danach erfolgt eine sofortige Zugabe von 2,5 ml Phosphatpuffer bei kleinen und 5 ml Phosphatpuffer bei größeren Flaschen. Nach kurzem Durchspülen wird der Phosphatpuffer wieder abpipettiert und anschließend Trypsin in die Kulturgefäße einpipettiert.

Die so präparierte Kulturflasche mit Trypsinlösung wird im Kulturschrank bei 37 °C etwa 4 Minuten inkubiert. Danach werden 2,5 ml bis 5 ml, je nach Größe des Kulturgefäßes, neues Medium in die Kulturgefäße zugegeben, um das Ablösen der Fibroblasten vom Kulturflaschenboden, welches durch die Zugaben vom neuen Medium hervorgerufen wird, zu stoppen. Das Kulturgefäß wird vorsichtig leicht geschwenkt. Dabei wird darauf geachtet, dass das Medium immer mit dem Boden der Gefäße Kontakt behält. Nun erfolgt eine erneute Abpipettierung der abgelösten Fibroblasten, die dann in ein Zentrifugegefäß einpipettiert werden. Die Lösung wird dann bei 5000 U/min. 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen, das am Boden befindliche Pellet wird als Ausgangsmaterial für den Fibroblastensplit verwendet.

Zwei neue Kulturgefäße werden mit neuem Kulturmedium vorbereitet, 4 ml für das kleinere Gefäß, 9 ml für das größere Gefäß. Nun wird vom Ausgangsmaterial des Fibroblastensplits 2 ml Kulturmedium in das Zentrifugegefäß zugegeben und mehrfach zur Mischung ein- und auspipettiert. Die neuen Kulturgefäße werden mit der so vermischten Lösung mit jeweils 1 ml beimpft. Die Kulturgefäße werden dann mit leicht geöffnetem Deckel in den Kulturschrank zum CO₂-Austausch eingestellt; nach

ca. 30 Minuten wird der Deckel fest verschlossen. Spezielle Filter werden hierbei nicht verwendet.

5.1.4 Fibroblastenaufarbeitung zum Test der Enzymaktivität

Das Medium aus einem Kulturgefäß wird abpipettiert. Das Kulturgefäß wird dreimal mit 3 ml NaCl-Lösung (0,9%) durchgespült und aus dem Gefäß abgegossen. Danach werden 5 ml 0,9%ige NaCl-Lösung zugegeben. Dann werden die Fibroblasten vorsichtig mit einem gereinigten Gummischaber vom Gefäßboden abgekratzt. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt, bis sich die gesamten Fibroblasten vom Gefäßboden gelöst haben. Nun wird diese Lösung in ein Zentrifugengefäß gegeben und bei 2500 U/min. 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wird die überständige NaCl-Lösung abgenommen. Das Pellet wird nun mit 1,5 ml NaCl resuspendiert und durch Rotation gemischt. Anschließend wird es bei 5500 U/min. fünf Minuten zentrifugiert. Das NaCl wird abpipettiert, das Pellet im Gefrierfach bei -20°C gelagert, um entweder DNA zu extrahieren oder die Enzymaktivität und die Proteinkonzentration zu bestimmen.

5.1.5 Myoblasten- und Hepatozytenaufarbeitung zum Test der Enzymaktivität

Bei -20°C gefrorene oder frische Myozyten und Hepatozyten werden zunächst in kleine Stücke geschnitten. Die Stücke werden in die Eppendorfgefäße vorsichtig schnell eingeschoben. Kaltes Wasser wird abhängig von der Größe der Stücke zugegeben, um eine optimale Konzentration zu erreichen. Die Probe wird mit einem Sonifikationsgerät sonifiziert und danach mit 5000 U/ min. 2 Min. zentrifugiert. Der Überstand der Probe wird abpipettiert, um die Enzymaktivität zu messen.

5.1.6 Chorionzottenaufarbeitung zum Test der Enzymaktivität

Meistens werden Chorionzotten im Kulturmedium transportiert. Die Chorionzotten im Kulturmedium werden zur Züchtung von Chorionzotten im Brutschrank einige Wochen gelagert. Das Kulturgefäß wird dreimal mit 3 ml NaCl-Lösung (0,9%) durchgespült und abgegossen. Danach wird eine 5 ml 0,9%ige NaCl-Lösung zugegeben. Vollständig dicht gewachsene Chorionzotten werden nun vorsichtig mit einem Gum-

mischaber vom Gefäßboden abgekratzt. Die Chorionzotten werden dann mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung bei 5000 U/min. 2 Min. lang zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und Pellet wird entweder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank gelagert oder nach Zugabe von destilliertem Wasser genutzt, um die Enzymaktivität zu messen.

5.2 Proteinbestimmung

5.2.1 Methode

Zur Proteinbestimmung werden folgende Lösungen verwendet:

Lösung L₁ : 5,5 g CuSO₄ / 100 ml

Lösung L₂: 1,35 g Seignettensalz (NaK-Tartat) / 100 ml

Lösung L₃: 2% Na₂CO₃ in n/10 NaOH

Aus den Lösungen wird das Reaktionsgemisch R mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

$$R = 10\ \mu\text{l}\ L_1 + 100\ \mu\text{l}\ L_2 + 5\ \text{ml}\ L_3$$

Die Erstellung der Eichgeraden erfolgt durch den Proteinstandard von Rinderserumalbuminlösung mit sechs verschiedenen Konzentrationen (0,00 mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,10 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml). Alle Messungen werden an Duplikaten bzw. Triplikaten durchgeführt. Dabei werden die Proben so verdünnt, dass die Probenkonzentration im Bereich von 0,1 – 0,3 mg/ml liegt.

20 μl verdünnte Probe wird zuerst mit 250 μl Reaktionsgemisch R versetzt. Nach 10minütiger Inkubationszeit im Dunkeln bei Raumtemperatur fügt man 25 μl Folin-Ciocalteus-Phenollösung zu, die im Verhältnis 1:1, verdünnt mit 2% Na₂CO₃, hergestellt wurde. Zur Inkubation des Ansatzes wird die Lösung bei Raumtemperatur im Dunkeln 30 Minuten abgestellt. Die Absorption wird mit dem Photometer bei 734 nm gemessen und mit der Absorption des Proteinstandards verrechnet. Die Proteinkonzentration der Proben wird nun an der Eichgeraden ermittelt.

5.3 Bestimmung der Aktivität der sauren α -Glukosidase

Die Enzymaktivität wird durch Anwendung des Substrats, Methylumbelliferyl- α -Glukosid (MUG) und durch die Bestimmung der Fluoreszenz des Produktes Methylumbelliferon (MUF) analysiert.

Die Proteinkonzentration im Gewebe-Homogenat beträgt 0,1 - 0,2 mg/ml bei Leukozyten und 0,05 mg/ml Fibroblasten, 0,03 - 0,05 mg/ml bei Hepatozyten und 0,15 - 0,2 mg/ml bei Myozyten. Die Standardlösungen sind Wasser und 10 μ mol/ml (Methylumbelliferon) MUF. Alle Messungen werden an Duplikaten bzw. Triplikaten durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wird wie folgt hergestellt:

- 7,5 mM MUF- α -Glukosid (Substrat) in
- 7/8 von 0,2 NAC-Puffer (Natriumacetat) bei pH 4,0 und pH 6,5
- 1/8 von Ethylenglycolmonomethyläther

Die Enzymreaktion wird mit 30 μ l Probe und 60 μ l des oben genannten Reaktionsgemisches gestartet. Nach der Inkubation bei 37 °C, 60 min. ist die Reaktion durch 500 μ l NaCO₃-Puffer, pH 10,7 gestoppt. Die Enzymaktivität wird durch die Messung der produzierten Fluoreszenz des Produktes (MUF) anhand der folgenden Formel in nmol Substratumsatz /min/mg Protein bei pH 4,0 und pH 6,5 errechnet:

$$\text{GAA-Aktivität (nmol/min/mg)} = \frac{\text{MUF-Konzentration der Probe (nmol/ml)}}{60 \text{ min.} \times \text{Proteinkonzentration der Probe (mg/ml)}}$$

wobei die MUF-Konzentration wie folgt ermittelt wird:

$$\text{MUF-Konzentration der Probe (nmol/ml)} = \frac{(\text{gemessene Fluoreszenz der Probe} - \text{Nullstandard-Fluoreszenz}) \times 10}{\text{Standardfluoreszenz (von 10 nmol/ml)} - \text{Nullstandard-Fluoreszenz (von 0 nmol/ml)}}$$

Zur Klassifizierung der klinischen Formen wird der Quotient der GAA-Aktivität bei pH 6,5 und pH 4,0 definiert:

$$\text{Quotient} := \frac{\text{Aktivität des GAA bei pH 6,5}}{\text{Aktivität des GAA bei pH 4,0}}$$

(Normbereich des Quotienten: 1,0 - 3,5; bei Patienten mit infantiler Form > 12,0, bei juveniler Form > 6,0 und bei adulter Form > 4,0)

5.4 Bestimmung der Branchingenzymaktivität aus Leukozyten, Fibroblasten, Myozyten und Hepatozyten

5.4.1 Methode

Die Enzymaktivität wird durch die Anwendung des Substrats Glukose-1-Phosphat (G-1-P) und durch die Bestimmung der Phosphatkonzentration (Produkt) analysiert. Die Glukose des Substrats G-1-P wird durch die Enzymreaktion in das Glykogen inkorporiert und spaltet das Phosphat.

Die Probenextrakte der Leukozyten, Fibroblasten und Myozyten aus Herzmuskelzellen werden durch Sonifizierung und Zentrifugation vorbereitet.

Die Proben sind mit Wasser verdünnt, so dass die Proteinkonzentration im Gewebe-Homogenat 0,5 - 0,7 mg/ml bei Leukozyten und Fibroblasten, 0,3 mg/ml bei Hepatozyten und 0,4 mg/ml bei Myozyten beträgt. Alle Analysen werden durch eine Duplikate-, bzw. Triplikate-Bestimmung durchgeführt. Die Leerwertproben werden durch Hitze (95 °C) für 2 Minuten vorbereitet. Durch Zugabe des 40µl Reaktionsgemisches zu 20µl Probe wird die Reaktion gestartet. Das Reaktionsgemisch wird wie folgt hergestellt:

- 1 Teil 360 mM Glukose-1-Phosphat bei pH 6,5
- 1 Teil 4,5 mM Adenosinmonophosphat (AMP)
- 1 Teil Phosphorylase a.(aktiv) 18 U/ml

Nach 20 Minuten bei 37 °C Inkubation wurde die Enzymreaktion durch Hitze (2 Minuten, 95 °C) gestoppt.

5.4.2 Phosphatmessung

Als Phosphat-Standard wurden die folgenden Konzentrationen verwendet:

0,0 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1,6 mg/ml, 3,2 mg/ml und 6,4 mg/ml.

Je 20 µl Überstände der Probe bzw. 20 µl Phosphat-Standard werden mit folgenden Reaktionslösungen in dieser Reihenfolge vermischt:

Lösung L₁: 150 µl Bisulfit-Borat-Lösung

Lösung L₂: 25 µl Molybdat-Lösung

Lösung L₃: 25 µl Reduktionslösung

Lösung L₄: 500 µl Sulfit-Carbonat-Lösung

Nach der Mischung wird die Phosphat-Konzentration spektrophotmetrisch gemessen. Die Enzymaktivität wird anhand der folgenden Formel in µmol Substratumsatz /min/mg Protein errechnet:

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{(\text{Pi Konz. der Probe } (\mu\text{mol/ml}) - \text{Pi Konz. des Leerwertes } (\mu\text{mol/ml})) \times 3}{\text{Inkubationszeit (20 Min.)} \times \text{Proteinkonzentration (mg/ml)}}$$

mit Pi Konz. = Phosphat-Konzentration.

5.5 DNA-Präparation

5.5.1 Untersuchungsmaterial

5.5.1.1 Verwendete Chemikalien und Enzyme für DNA-Isolierung und Präparation

Proteinase K – Lösung

100 mg Proteinase K

3 ml 5 mM NaCl-Lösung

5 ml 1 M Tris-HCl-Lösung pH 7,5

2 ml 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0 und ad 100 ml H₂O

Lyse-Puffer

155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃

0,2 ml 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0

ad 1000 ml H₂O

pH 7,4 mit Hilfe von Salzsäure und Natronlauge einstellen

TE-Puffer

10 ml 10 mM Tris-HCL-Lösung pH 8,0

2 ml 1 mM EDTA-Lösung pH 8,0 und ad 1000 ml H₂O

AL1 und AL2 Puffer

AL1 : AL2 = 4:1

AW Puffer

84 ml AW-Puffer und 196 ml Ethanol

Ethanol 100 %

SDS 20% (Sodium docedyl sulfat)

DNA QI Aamp

Tri-Cl

Boricasid

QIAamp Blood Kit

QIAamp Spin Columns

2 ml Collection Tubes

Agarose

Tritriplex III

20% Ficoll

NH₄-Persulfat

Acrylamid/ Bisacrylamid 29:1

Ethiumbromid

Ethanol

dNTPs

PCR Molecular Weight Markers VIII,V

5.5.1.2 Verwendete Geräte für DNA-Isolierung und Präparation

Zentrifuge (Mikro Rapid K)

Eppendorf-Reaktionsgefäße

Eppendorf-Rotationsmischer Nr. 3300

Kühlschrank +4 °C und Gefrierfach -20 °C

Photometer Ultraspect

Plus 4054

Präzisionsküvetten

Heizblock

Eppendorf-Pipetten

Rührspatel

PCR-Processor

Eppendorf Zentrifuge 5415 C

Elektrophoresis Power Supply 400 V

Power PAC 300 Specifications

DNA-SUB TM Elektrophoresis Zelle

Gelkammer

Protean II xi Vertical Elektrophoresis Zelle

5.5.2 Isolierung von genomischer DNA

Alle Präparationsschritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontamination zu vermeiden.

DNA wird aus 0,25 - 0,5 ml frischem Vollblut oder bei +4 °C gekühltem EDTA-Blut gewonnen. Zuerst wird das bei +4 °C gekühlte Blut in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und für 3 Minuten mit 1200 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1 ml Lysepuffer mittels Rührspatel und Rotationsmischer resuspendiert. Das Gemisch sollte für 3-5 Minuten bei Raumtemperatur in Ruhe stehen und noch mal für 3 Minuten mit 1200 U/min. zentrifugiert werden. Der Überstand wird wieder verworfen und der Vorgang 3 - 4 mal wiederholt. Das Pellet wird dann mit 300 µl Proteinkinase-K-Puffer und 16 µl SDS 20% (Natriumdodecylsulfat) gemischt, um das Protein zu denaturieren und zu zerlegen.

Das Gemisch wird für 2-3 Stunden bei 55 °C inkubiert, während der Inkubation mit 90 µl NaCl versetzt und etwa 10 Sekunden im Rotationsmischer gemischt. Danach wird es zentrifugiert und 500 µl des Überstandes mit 100 µl Ethanol 100% versetzt, um DNA zu denaturieren. Die flockig sichtbare DNA wird mit Hilfe einer Eppendorf-Pipettenspitze aus der Lösung gezogen und in der Eppendorf-Zentrifuge mit 1400 U/min. für 15 Minuten zentrifugiert. Die DNA bleibt nach Zentrifugation als Pellet am Boden der Tubes haften.

Zur Isolierung von genomischer DNA aus frischem Vollblut werden 200 µl frisches Vollblut mit 200 µl Puffer AL und Proteinase K versetzt und etwa 15 Sekunden gut durchgemischt. Als nächstes wird die Lösung für 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. So werden die Zellen lysiert. Ethanol 96%-100% wird in dem Gemisch versetzt und gevortext. Das Gemisch wird in die Säulen einpipettiert und bei 8000 U/min. für 1 Minute zentrifugiert. So wird die DNA in die Säulenmembran absorbiert und gereinigt. Die Säulen werden in Reaktionsgefäße eingeführt und mit 500 µl AW-Puffer versetzt. Danach werden sie bei 8000 U/min. für 1 Minute zentrifugiert. Dies wird wiederholt und danach bei 12000 U/min. für 10 Sekunden zentrifugiert. Jetzt wird die Säule herausgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße eingeführt. 200 µl Tri-Cl, das auf 70 °C vorgewärmt worden ist, wird in Eppendorf-Reaktionsgefäße einpipettiert und bei 8000 U/min. für 1 Minute zentrifugiert. Durch diesen Vorgang wird DNA in der Säulenmembran in die Lösung gebracht. Die RNA-Konzentration, der Reinheitsgrad der Lösung und die Konzentrationsbestimmung der DNA in der Lösung werden mit Photometer durch die Absorptionsbestimmung des UV-Lichtes gemessen. Die Absorption bei 260 nm von 1,0 entspricht 50 µg DNA. Der Bereich bei der Wellenlänge von 260 nm entspricht der Absorption der aromatischen Anteile der Nukleotide.

5.5.3 Primer für PCR aus DNA

Für GSD Typ II (Tab. 2) und Typ IV (Tab. 3) werden die folgende Primer eingesetzt:

Exon oder Intron	Sens	Antisens
Intron 1	5'TCCCTGCTGTAGCCC GCTTT3'	5'ACCCCAAGCTTG TGAGGTGC3'
Exon 2	5'CGCGTTGATGTCTC AGAGCTGC3'	5'ACCCACCCCTTG TGAGGTGC3'
Exon 3	5'TGTCCTTGGCGTGC GGTTGTTCC3'	5'GGTCGCCCTCCC CATCATGCTG3'
Exon 4	5'GGTGCTCTCTGGGT GCTCTCAGG3'	5'CATGCGGACCTC CAGTCTCCAGG3'
Exon 5	5'GGTGCTCTCTGGGT GCTCTCAGG3'	5'CATGCGGACCTC CAGTCTCCAGG3'
Exon 6	5'CGCCTGTGATTGGC CCATCTGTGG3'	5'CAGGCCAACGCC GACTTCATGAG3'
Exon 7	5'TTGTGGGTAGGGCC TGCTCCCTG3'	5'CCACACAGGCAC GAGGATGACGC3'
Exon 8	5'TTGTGGGTAGGGCC TGCTCCCTG3'	5'CCACACAGGCAC GAGGATGACGC3'
Exon 9	5'ACTGTCTCAGTTTTC CCGTGT3'	5'AAATCCCACGGT CTTCTTGAGG3'
Exon 10	5'CTCAGTGGGGTCTC CATGCAG3'	5'GTGCTAAGTCTC CCAGGCCAGA3'
Exon 11	5'CTCAGTGGGGTCTC CATGCAG3'	5'GTGCTAAGTCTC CCAGGCCAGA3'
Exon 12	5'AGGGAGGGCACCTT GGAGCCTG3'	5'GCAGAGGCCCCA ACCTTGTAGG3'
Exon 13	5'TGCCCTGCTGGTGA CAGGGTTCC3'	5'CCGGCAAGCCTC CCATAGAGGCC3'
Exon 14	5'ACTTGGCCTGAGCT GGCTCTGC3'	5'TTCCCAGGGGAG AGTCTTGGGT3'
Exon 15	5'TGAGAAGTGCAGCT CTCCCG3'	5'GACAGGGCTGCC TGGGAGTTACG3'
Exon 16	5'ATTCAGCCTCTTCCT GTGCCTCC3'	5'TTTCCGCCACCT GGTCACCAAC3'

Tab. 2: Primer für GSD Typ II

Exon oder Intron	Sens	Antisens
Intron 5	5'GTGAATTTTGGT TGGGGTAT3'	5'ACAAAACAAGGT AAAATCCC3'
Exon 1	5'CTTCCGTCCCG GCTATAAAG3'	5'GCAAGACCGCT GATTAGAAC3'
Exon 2	5'CAGTAGCTTTTC TAGAAGAC3'	5'CCTTGTTATTTTC TAGTACATG3'
Exon 3	5'TTAGTCCTATCA TGCTGTTG3'	5'CATGCATCAGTT GTACATTC3'
Exon 4	5'GTATTATCAGAG TTCTGGATG3'	5'GACAGACTATGA TACTCATAAC3'
Exon 5	5'CCACTAGCAGG ACCATAAG3'	5'TCTATGCTATCA CTATTACAG3'
Exon 6	5'ATACAGCTCTAA GAGACTATC3'	5'G TTCAGCTTCTA TTAACTCTG3'
Exon 7	5'AGTACTGCGATG GTGAAAC3'	5'TAATGTTAAACA GCAACAATAG3'
Exon 8	5'GAACATTATGAT TCTTGAGATAG3'	5'AGACACCAGTAA TGGCTATTG3'
Exon 9	5'TAAGTCAGTATA TTTGCTGATG3'	5'TGACAACATGAG ATTGATTAATC3'
Exon 10	5'ATTTATTGACCT GGGCTTTAC3'	5'TAAAGTAAGCAA CACAGTATTC3'
Exon 11	5'TAATGCATAACT TCAGATTGTG3'	5'CATACACACATT ATAGTAACTAC3'
Exon 12	5'TATTGTAAATCA CAACTACTTAG3'	5'GCAATTTACACG ACAGTATATG3'
Exon 13	5'TCTAGTAAATGA TAGCCTAAAC3'	5'AGATTTAAATTG GTTGCCATTC3'
Exon 14	5'GTA CT TGTAGCA GCATCTAG3'	5'GTTTCTGTCATC AAGAGCAAC3'
Exon 15	5'CTCAGCACGTAT TTTACAATG3'	5'ATGTTGCTTATT TGAAGAGTTG3'
Exon 16	5'TGTGAAATTGAG CCTTCTAAG3'	5'AAACAAAACACA AATCTGCATC3'

Tab. 3: Primer für GSD Typ IV

5.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) wurde 1985 von K. Mullis und Saiki zum ersten Mal beschrieben (111). Die Vermehrung von DNA setzt voraus, dass man die zu amplifizierende DNA in ausreichenden Mengen besitzt. Zuweilen ist dies ein Ausgangsproblem bei der Rekombination und Klonierung von

DNA-Fragmenten. So wird diese Technik zur Vervielfältigung von DNA in Vitro durch PCR angewendet, um größere Mengen DNA zu erhalten. Damit ist es möglich, kleinste Mengen nicht nachweisbarer DNA sichtbar zu machen.

Das prinzipielle Vorgehen besteht darin, dass man die Nukleinsäuren, die eine zu amplifizierende Sequenz enthalten, mit einem Überschuß von zwei chemisch synthetisierten Oligonucleotiden reagieren läßt. Diese stammen aus den Randbereichen der zu amplifizierende Sequenz und sind strangspezifisch, d. h. sie sind komplementär zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge.

Für die PCR benötigt man:

- eine Einzelstrang DNA-Matraxe (stammt aus Denaturierung eines Doppelstranges)
- Primer (Oligonukleotidsequenzen komplementär zu den 5`-und 3`- Enden einer bestimmten Nukleotidsequenz (diese werden in speziellen Labors synthetisiert)
- Deoxynukleotide Triphosphat (dNTPs)
- ein DNA-Polymerase Enzym. Die Enzyme stammen aus dem thermophilen Bakterium, *Thermus aquaticus* und besitzen ein Temperaturoptimum von über 70 °C, d. h. sind bis zu 95 °C stabil. Im gleichen Reaktionsansatz können die aufzupolymerisierenden DNA-Einzelstränge daher durch Hitze-Denaturierung erzeugt werden, ohne dass das Enzym zerstört wird und nach jedem Reaktionsschritt erneut zugegeben werden muß. Hierdurch wird es möglich, vom PCR-Primer frankierte DNA-Fragmente mit einer Länge von mehreren kb zu amplifizieren.

5.6.1 Prinzip der Polymerase

Durch Erhitzen des Reaktionsgemisches bei 94 °C wird die Doppelstrang-DNA denaturiert. Die zweifachen Wasserstoffbrückenbindungen werden zwischen den Basen Adenin und Thymin getrennt und die dreifachen zwischen Guanin und Cytosin. Nach von 2 bis 3 Minuten werden die Bindungen vollständig getrennt. Die Oligonukleotidprimer lagern sich an die komplementären Sequenzen durch Hybridisierung, d. h. Annelierung der Primer. Die Zahl der Zyklen sollte nicht größer als 40 sein, da es mit zunehmender Zahl der Zyklen die Häufigkeit der unerwünschten, unspezifi-

schen Amplifikationen steigt. Die Auswahl der Annealing-Temperatur ist der entscheidende Schritt für die Optimierung der PCR-Ausbeute. Die Temperatur liegt zwischen 45 °C -72 °C. Die Reinheit des Produktes hängt von der Temperatur ab. Durch DNA-Polymerase werden die gewünschten Fragmente synthetisiert. Extension des Primers bei 72 °C wird als letzter Schritt durchgeführt. Bei Wiederholung der Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Anhybridisierung der Primer und Extension kommt es nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdoppelung der DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven, etwa 10^6 - 10^7 fachen Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierter DNA-Sequenz. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches (2%igem Agarogel, 1 Std. bei 100 V) sind die amplifizierten DNA-Fragmente als Banden vor dem Hintergrund der nicht amplifizierten DNA-Bereiche durch Ethidiumbromid-Färbung zu erkennen.

5.6.2 Amplifikation

Für das Reaktionsgemisch (Master-Mix) mischt man zuerst 10 µl 10 x PCR-Puffer mit dNTPs, 0,18 µl Primer 3`-5`, 0,18 µl Primer 5`-3, 56 µl autoklaviertes und destilliertes H₂O und 0,21 µl Taq DNA-Polymerase in Reaktionsgefäße. Dazu wird 3,5 µl DNA-Lösung (0,5 µg/µl DNA) und 66,5 µl Master Mix in jedes Reaktionsgefäß einpipettiert. Danach werden die Reaktionsmittel gemischt und zentrifugiert. Das Reaktionsgemisch wird in den bei 95 °C, 10 min. vorgeheizten PCR-Prozessor eingesetzt. Als Temperaturprogramm für die Amplifikation werden die folgenden Werte verwendet:

- 3 Minuten bei 94 °C (Denaturierung; 61 °C für Exon 12, 60 °C für Exon 2 u. Exon 14)
- 0,5 Minuten bei 94 °C (Denaturierung)
- 1,5 Minuten bei 61 °C (Annelierung)
- 0,5 Minuten bei 72 °C (Annelierung)
- 3,0 Minuten bei 72 °C (Extension)

5.6.3 Amplifikation und Qualitätskontrolle der PCR bei GSD Typ IV

Für das Durchlaufen aller Phasen aller PCR-Reaktion werden insgesamt 50 µl Volumen benötigt, die aus 2U der Taq Polymerase (Quiagen), 200 pmol für jede dNTP und 15 pmol für jedes Primer besteht.

Das Reaktionsgemisch wird zur Annelierung für 35 Zyklen bei 60 °C und 61 °C angewendet. Die richtige Größe der Banden nach Gelelektrophorese sind entscheidend, da die Banden mit dem DNA-Mass-Standard (SM0403; MBI Fermentas) verglichen werden können. RNA ohne Reverse-Transkriptase wird als negative Kontrolle inkubiert, um genomische Kontamination zu prüfen. Primer, die für die Amplifikation angewendet werden, sind identisch zu β-Aktin. Deshalb wird das cDNA-Reaktionsprodukt mit Intron-Spanning Primer aus Aktin als Kontrolle für den RNA-Gehalt und die genomische DNA-Konzentration verwendet.

Der Primer für β-Aktin lautet:

β-Aktin sens 5`-TCACCCACACTGTGCCATCTACCA-3`, und β-Aktin antisens 5`-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3`.

5.7 Gelelektrophorese

5.7.1 Definition der Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist ein biochemisches Verfahren, bei dem die Wanderung von elektrisch geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt wird. Diese Methode wird z. B. für die Identifikation der amplifizierten PCR-Produktion und zur Trennung verschiedener Nukleonsäuren und Proteine angewendet.

5.7.2 Prinzip der Agarose Gelelektrophorese

Der aus der PCR gewonnenen DNA werden 10 µl entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und anschließend mit 1/5 bis 1/3 des Auftrags-Volumens mit Auftragspuffer versetzt. Gleichzeitig werden 2 µl Größenmarker mit der entsprechenden Menge Auftragspuffer vorbereitet. Die restliche DNA kann bei -20 °C gelagert werden. Als Laufpuffer wird TEA-Puffer, versetzt mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid, verwendet, der die Trageschale während der Elektrophorese bedecken sollte. Die vor-

bereiteten Proben werden in eine kleine Geltasche (slot) von wenigen Milli-metern Durchmesser einpipettiert. Bei einer Spannung von 100 V läuft die Elektro-phorese solange, bis die erforderliche Strecke vom Farbstoffmarker zurückgelegt worden ist. Dies dauert etwa 30 Minuten. Die aufgetrennten Moleküle erscheinen nach E-lektrophorese als Banden. Das Wanderungsverhalten von Makromolekülen hängt maßgeblich von der Stärke des angelegten elektrischen Feldes, der Nettola-dung, der Form und Größe der Makromoleküle, der Ionenstärke, der Porengröße so-wie der Temperatur der verwendeten Innenmatrix ab. Das Ohmsche Gesetz findet bei der Elektrophorese Anwendung, da bei der Elektrophorese meist einer der elek-trischen Parameter konstant gehalten wird.

5.7.3 Herstellung der Agarosegele

Agarose wird mit TEA Puffer unter ständigem Rühren aufgekocht. Nach Abkühlung der Lösung auf etwa 60 °C wird sie mit 5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Lösung ver-setzt und dann möglichst blasenfrei in die horizontale Gelkammer gegossen, wo die Agarose erstarrt. Die Gelschablonen und die Endstücke können erst nach Erstarren des Gels entfernt werden. In Folie eingewickelt, können die Gele bis zu 2 Tage bei 4 °C gelagert werden.

5.7.4. Elektrophorese bei Nukleinsäure

Nukleinsäuren sind aufgrund des Zucker-Phosphat-Rückgrats bei allen pH-Werten negativ geladen. Sie wandern daher bei der Elektrophorese zur Anode, je langsamer um so größer sie sind. Die genaue Lage wird durch Faktoren wie Gelkonzentration, Elektrophoresezeit, Molmasse der DNA und Ausmaß des Supercoiling beeinflusst.

6. Ergebnisse

6.1 GSD Typ II: Aktivität der sauren α -Glukosidase (GAA)

6.1.1 Normale Enzymaktivität der sauren α -Glukosidase

In Tab. 4 sind die Mittelwerte und der Normbereich der GAA-Aktivität in unterschiedlichen Geweben zusammengestellt. Die Quotienten der GAA-Aktivität bei pH 6,5 zu pH 4,0 in Leukozyten sind in Tab. 5 aufgelistet. Die GAA-Aktivität ist in unterschiedlichen Geweben verschieden, da unterschiedliche Isoenzyme von GAA in den verschiedenen Geweben vorhanden sind. Obwohl die in Tab. 4 aufgelistete GAA-Aktivität (Mittelwert) bei pH 4,0 in Leukozyten etwas höher liegt im Vergleich zur Aktivität im Skelettmuskel und in Fibroblasten, zeigt eine genaue Betrachtung, dass die wahre GAA-Aktivität in Leukozyten niedriger liegt, da die GAA-Aktivität in Leukozyten bei neutralem pH die Messung der GAA-Aktivität bei pH 4,0 beeinflusst.

Gewebe	Mittelwert \pm Standardabweichung (bei pH 4,0)	GAA-Aktivität Normbereich [nmol/min/mg Protein]
Leukozyten	0,61 \pm 0,23 (n=50)	0,5 – 1,5
Skelettmuskel	0,45 \pm 0,15 (n=20)	0,3 – 1,0
Fibroblasten	0,52 \pm 0,20 (n=10)	0,4 – 3,0
Chorionzotten	4,15 \pm 1,14 (n=7)	3,0 – 30

Tab. 4: Enzymaktivität in Leukozyten, Muskel, Fibroblasten und Chorionzotten

Klassifikation	Quotient GAA-Aktivität (Leukozyten)*
gesunde Probanden	1,0 - 3,5
infantile Form	> 12,0
juvenile Form	> 6,0
adulte Form	> 4,0

Tab. 5: Normbereich des Quotienten der GAA-Aktivität abhängig von der Klassifikation der Krankheit (in Leukozyten)

*Quotient = Aktivität der GAA bei pH 6,5 / Aktivität der GAA bei pH 4,0

6.1.2 Pathologische Werte der Patienten mit GSD Typ II

Die prozentuale Enzymaktivität der GAA in Fibroblasten liegt bei der infantilen Form (bis 12 Monate) unter 1%, bei spätinfantiler/juveniler Form bei 1%-10% und bei der adulten Form bei 2% - 40% (105). In der Regel hat der Patient mit infantiler Form eine nicht nachweisbare Enzymaktivität im Muskel und sehr niedrige Enzymaktivität in den Fibroblasten. Im Gegensatz dazu zeigen die meisten Patienten mit adulter Form eine deutliche Restenzymaktivität der GAA im Muskel und in Fibroblasten. Obwohl es einen Zusammenhang zwischen der Restenzymaktivität und dem klinischen Phänotyp bei juveniler und adulter Form gibt, wurde bisher keine eindeutige Korrelation zwischen dem klinischen Schweregrad und der Restenzymaktivität nachgewiesen. Die klinische Form kann mit der gemessenen GAA-Aktivität in Leukozyten allein nur bei pH 4,0 nicht einfach differenziert werden, da die Aktivität des neutralen Enzyms bei diesem pH gehemmt wird. Daher haben wir die Quotienten der GAA-Aktivität aus pH 6,5 und pH 4,0 berechnet und konnten mit diesen relativen Werten unterschiedliche klinische Formen klassifizieren (Tab. 5 und Tab. 6).

In Tab. 6 ist die gemessene prozentuale GAA-Enzymaktivität in Leukozyten bei den untersuchten Patienten mit GSD II mit der Zuordnung der klinischen Klassifikation zusammengestellt. Bei Patientin 1 mit adulter Form betrug die Restenzymaktivität ca. 80% und bei Patientin 2 und 3 mit juveniler Form ergab sich ca. 30% als Restenzymaktivität.

Patient	GAA-Enzymaktivität in Leukozyten [% der Normaktivität]	Quotient der Enzymaktivität in Leukozyten [GAA-Aktivität bei pH 6,5 / GAA-Aktivität bei pH 4,0]	klinische Klassifikation
Patientin 1	80%	4,7	adulte Form
Patientin 2	30%	7,8	juvenile Form
Patientin 3	30%	8,0	juvenile Form

Tab. 6 : Relative Enzymaktivität (% der normalen Aktivität) in den Leukozyten der GSD Typ II-Patienten 1 bis 3.

6.1.3 Genanalyse der sauren α -Glukosidase bei den Patienten mit GSD Typ II

In Tab. 7 sind die Nukleotidänderungen, Aminosäureänderungen, Lokalisationen und Translationen der GAA-cDNA für die Patientin 1 bis 3 aufgeführt. Bei Patientin 1 ist in Position 1703 CTC anstelle CAC im Exon 12 kodiert, was einen Austausch von Leucin anstelle von Histidin in Position 568 verursacht. Bei der zweiten Mutation wird TGG anstelle CGG in Position 2014 im Exon 14 gefunden, wodurch anstelle des Arginins ein Tryptophan in Position 672 synthetisiert wird. Die klinischen Symptome der Patientin 1 sind mit denen einer adulten Form der GSD II vereinbar (Tab. 6 und Tab. 7). Die Patientinnen 2 und 3 haben eine Änderung im Intron 1, wo G anstelle T in Position 13 vorhanden ist. Der Austausch der G- anstelle der T-Base bei Position 13 des Intron 1 resultiert in eine alternative Splicing-Transkription mit Deletion des Exon 2, wo das Startkodon lokalisiert ist. So entsteht Asparagin in Position 170. Eine weitere Mutation liegt in Position 510 vor, wo GAT anstelle von GAC in Exon 2 vorkommt. Die Patientinnen 2 und 3 sind Geschwister und zeigen die klinischen Symptome, die mit einer juvenilen Form der GSD Typ II vergleichbar sind.

Patient	Geburtsdatum	Mutation I	Mutation II	Form	Translation der GAA cDNA
Patientin 1	20.09.1982	<u>*c.1703A>T</u> <u>(H568L)</u> <u>Exon12</u>	c.2014C>T (R672W) Exon14	adult	Position 1703 C**AC(His, 568) Position 2014 **CGG(Arg, 672)
Patientin 2	06.08.1995	c.-32-13T>G (IVS1-13T>G) Intron1	c.510C>T (A170A) Exon2	juvenil	Position 510 GA**C(Asp,170)
Patientin 3	23.01.1988	c.-32-13T>G (IVS1-13T>G), Intron1	c.510C>T (A170A) Exon2	juvenil	Position 510 GA**C(Asp,170)

* bislang nicht beschriebene Mutation

** geänderte Sequenz

Tab. 7: Überblick der GAA-Mutationen der untersuchten Patienten mit GSD Typ II. In Spalte Mutation I und Spalte II sind die Nukleotid- und Aminosäureänderungen, sowie die Lokalisationen dargestellt.

6.2 Kinetik des Branchingenzyms (GSD Typ IV)

6.2.1 Proteinabhängigkeit der Branchingenzymaktivität

Wie in den Abbildungen 1a und 1b ersichtlich, zeigt die Enzymreaktion in Leukozyten eine linear steigende Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bis 0,4 mg/ml (Abb. 1a) sowie bis 0,6 mg/ml (Abb. 1b). Ein optimaler Bereich zur Enzymaktivitätsmessung in Leukozyten wurde bei einer Proteinkonzentration von 0,2 - 0,4 mg/ml gewählt. Die Enzymreaktionen in Fibroblasten zeigen ebenfalls eine linear ansteigende Abhängigkeit, die im Bereich zwischen 0,05 mg/ml und 0,4 mg/ml (s. Abb. 2a) sowie zwischen 0,1 mg/ml und 0,5 mg/ml (s. Abb. 2b) liegt. Der optimale Bereich zur Enzymaktivitätsmessung in Fibroblasten ist bei 0,2 – 0,3 mg/ml gewählt worden. Die Abb. 3 zeigt das Ergebnis in kultivierten Chorionzotten. Der Verlauf zeigt eine lineare Abhängigkeit von der Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml bis 1,5 mg/ml. Als optimalen Bereich zur Bestimmung der Enzymaktivität in kultivierten Chorionzotten haben wir die Proteinkonzentration 0,2 – 0,3 mg/ml gewählt.

6.2.2 Inkubationszeitabhängigkeit der Branchingenzymaktivität

Die Inkubationszeitabhängigkeit der Enzymaktivität in Leukozyten wurde in Abb. 4 dargestellt. Es konnte eine linear ansteigende Enzymaktivität im Zeitraum bis 120 Minuten beobachtet werden. Als optimale Inkubationszeit bei der Routine-Messung für die Branchingenzymaktivität in Leukozyten wurde 20 Minuten gewählt.

6.2.3 Affinität zu dem Substrat Glukose-1-Phosphat

Zur Messung der Substratabhängigkeit in Leukozyten und Fibroblasten wurden verschiedene Substratkonzentrationen von Glukose-1-Phosphat verwendet. Die K_m -Werte wurden anhand des Diagramms nach Lineweaver und Burk in den Abbildungen 5 und 6 gezeigt. Die K_m -Werte liegen in Leukozyten bei ca. 50 mM und in Fibroblasten bei ca. 19 mM.

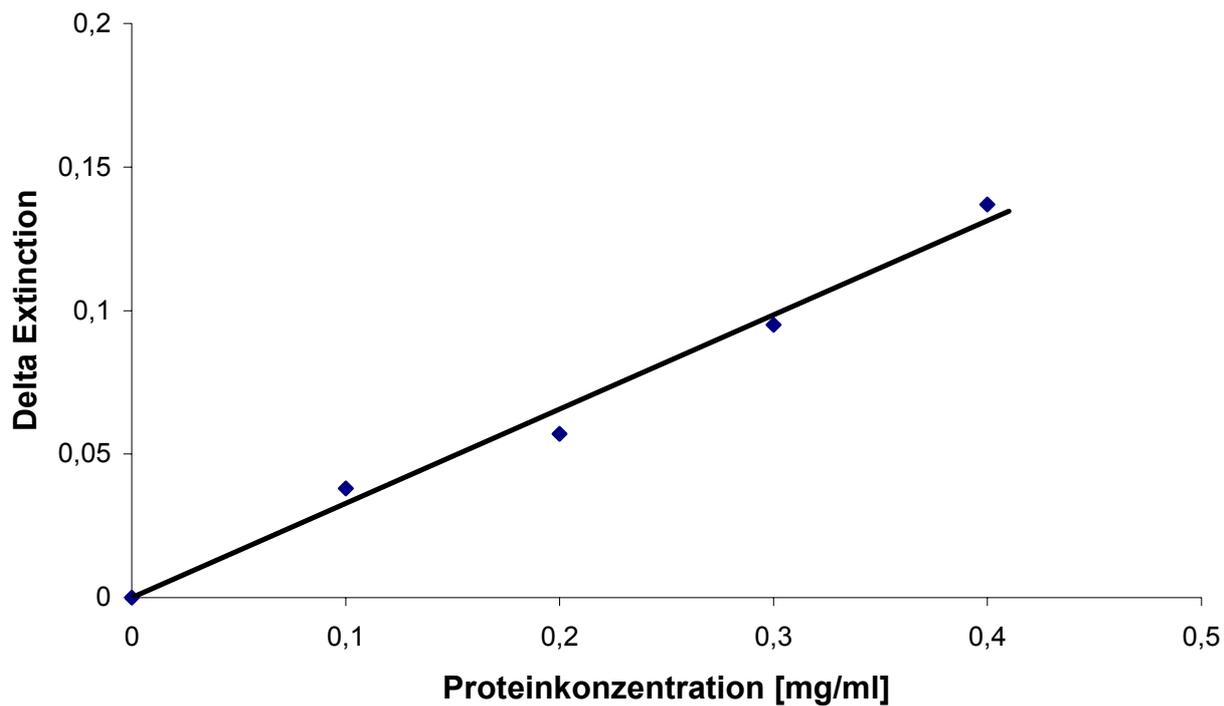


Abb. 1a: Proteinabhängigkeit des Branchingenzyms in Leukozyten I

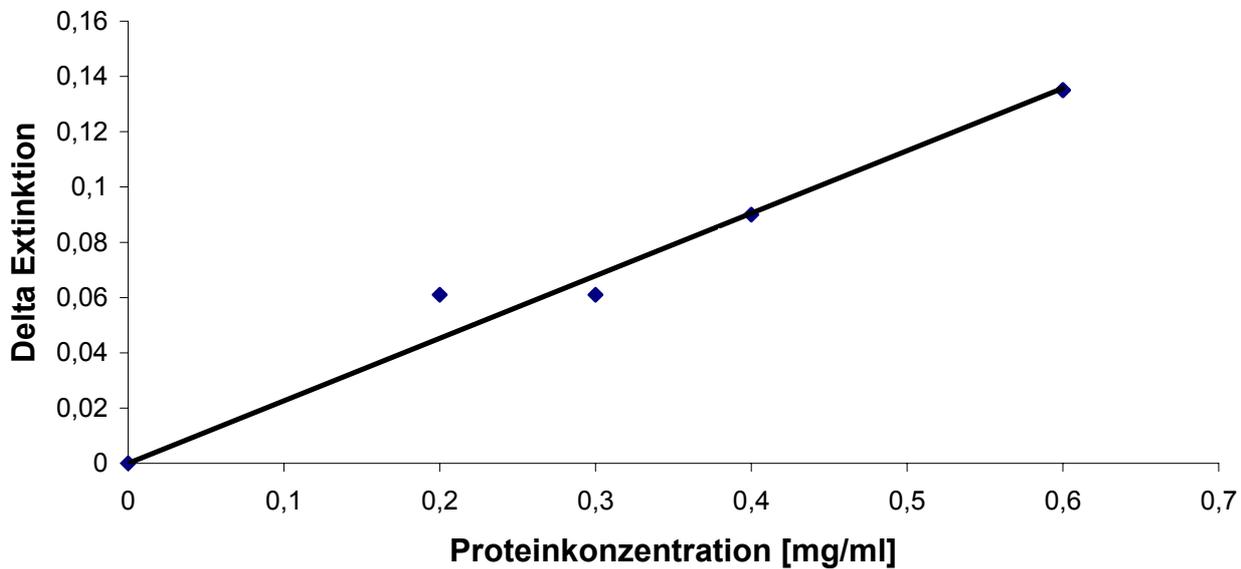


Abb. 1b: Proteinabhängigkeit des Branchingenzyms in Leukozyten II

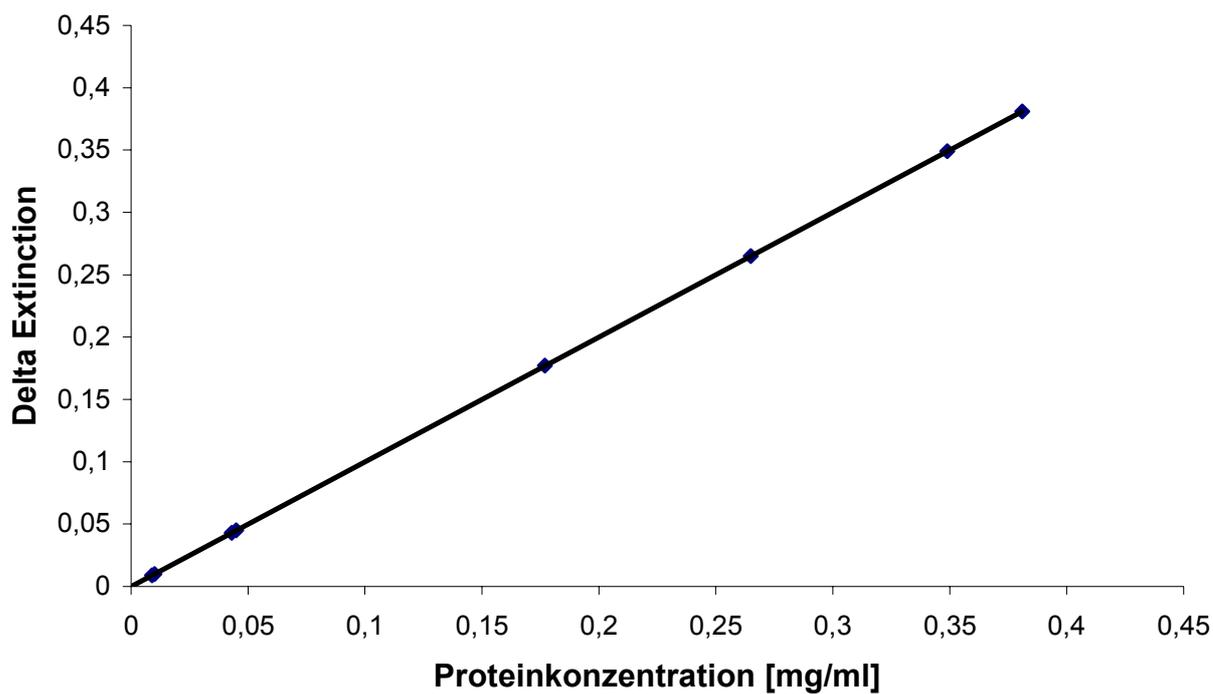


Abb. 2a: Proteinabhängigkeit des Branchingenzym in Fibroblasten I

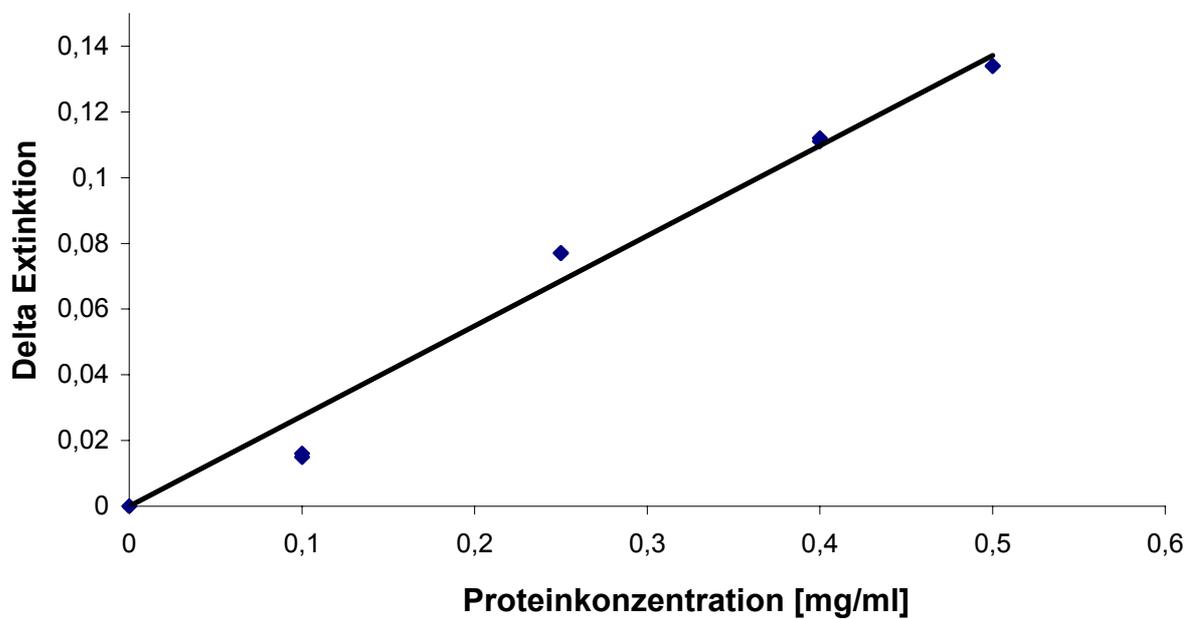


Abb. 2b: Proteinabhängigkeit des Branchingenzym in Fibroblasten II

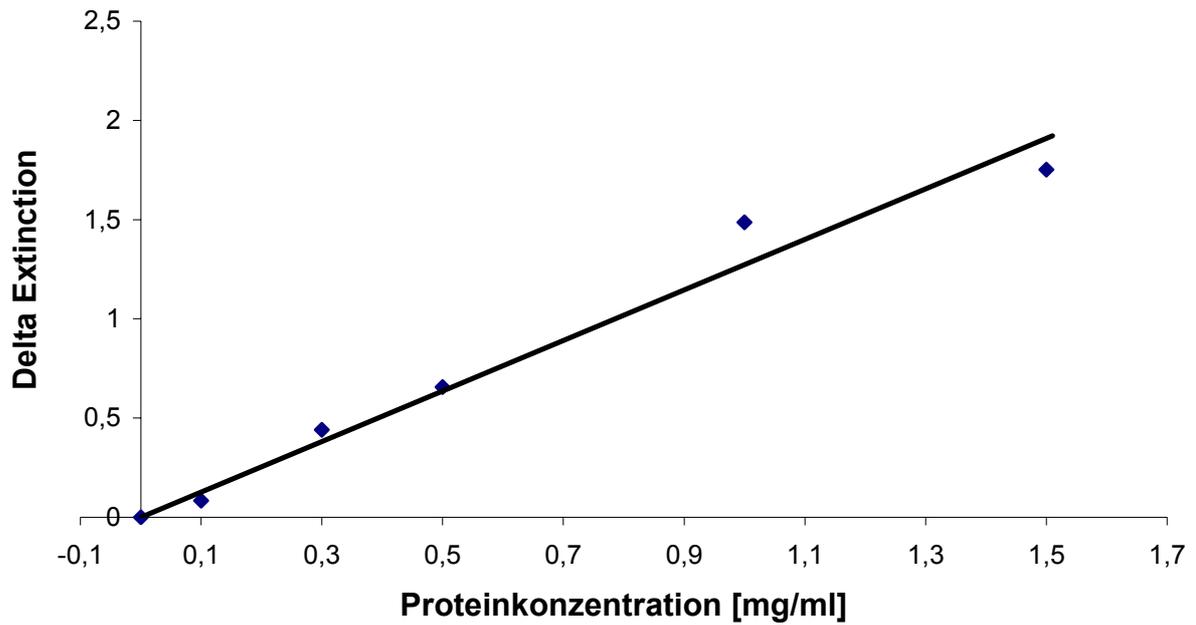


Abb. 3: Proteinabhängigkeit des Branchingenzyms in Chorionzotten

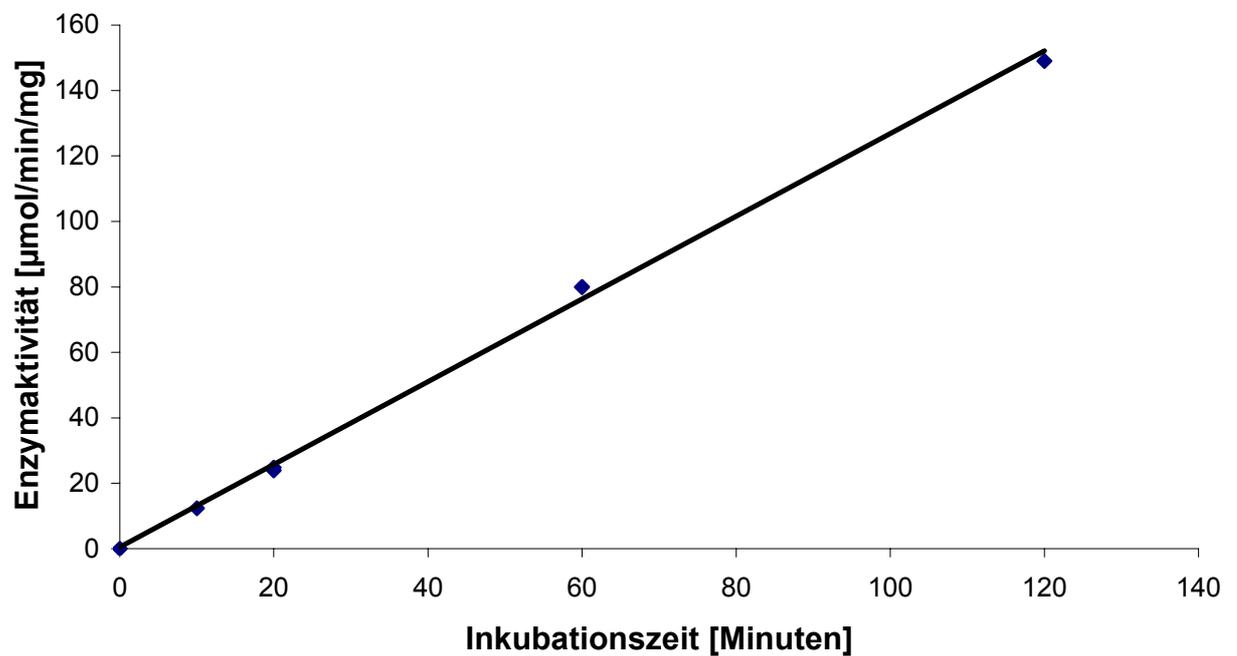


Abb. 4: Inkubationszeitabhängigkeit der Branchingenzymaktivität in Leukozyten

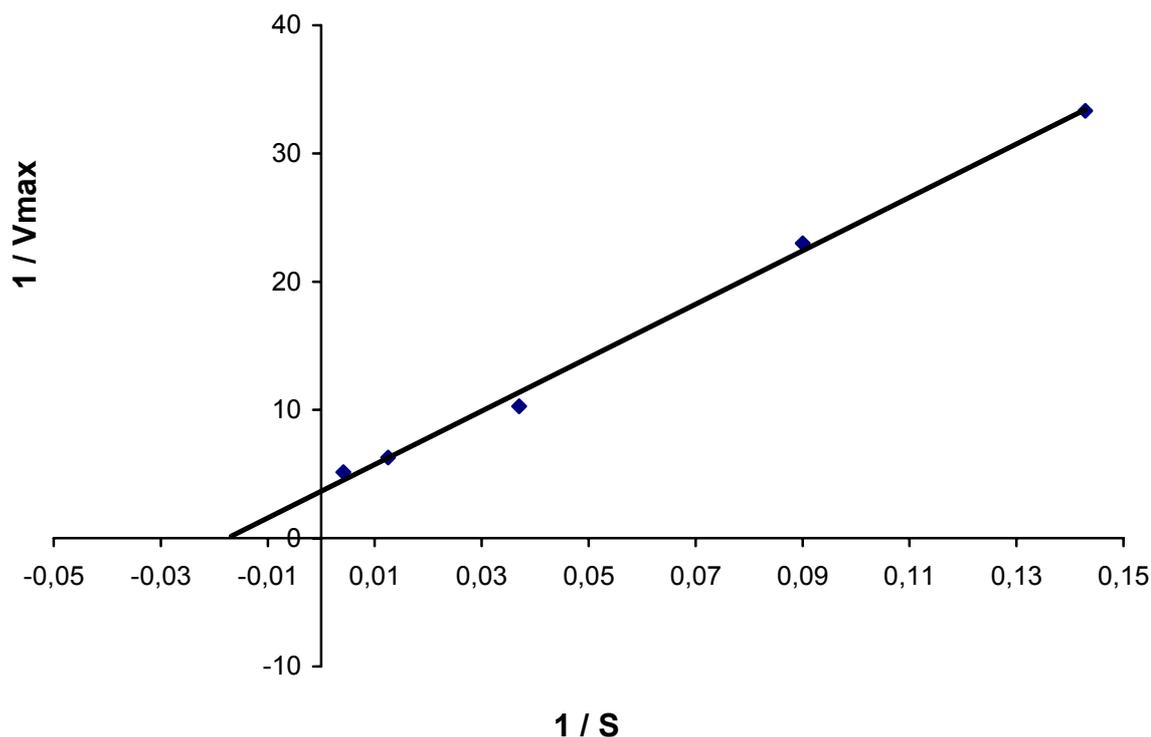


Abb. 5: Substratabhängigkeit bei Leukozyten. S entspricht dem Substrat Glukose-1-Phosphat in mmol, V der Reaktionsgeschwindigkeit in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

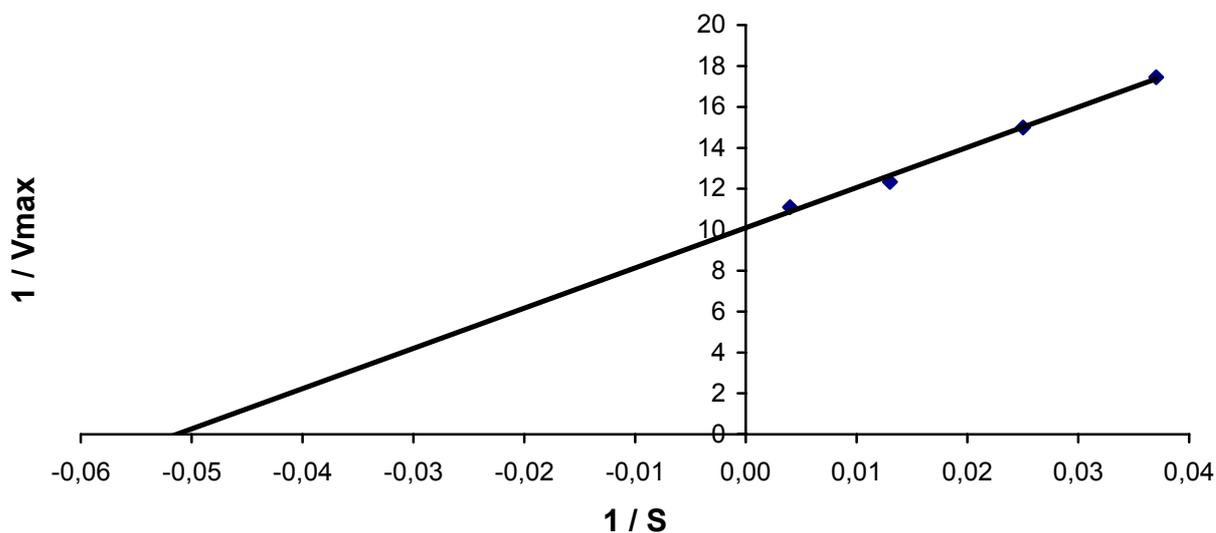


Abb. 6: Substratabhängigkeit bei Fibroblasten. S entspricht dem Substrat Glukose-1-Phosphat in mmol, V die Reaktionsgeschwindigkeit in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

6.3 Aktivität des Branchingenzym

6.3.1 Normwerte der Branchingenzymaktivität

In Tab. 8 sind die gemessenen Branchingenzymaktivitäten, die Mittelwerte sowie die Standardabweichung und die Normbereiche für unterschiedliches Kontrollgewebe dargestellt. Die Branchingenzymaktivität liegt in Leukozyten etwas niedriger als in anderem Gewebe und als in nativen Chorionzotten.

Gewebe	Mittelwert ± Standardabweichung	Normbereich [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$]
Leukozyten n=57	0,35 ± 0,17	0,1 – 0,5
Skelettmuskel n=20	0,42 ± 0,41	0,2 – 1,0
Leber n=9	0,93 ± 0,79	0,3 – 1,5
Chorionzotten n=5	0,45 ± 0,22	0,5 – 5,0
Fibroblasten n=7	0,39 ± 0,29	0,2 – 0,7

Tab. 8: Branchingenzymaktivität in verschiedenen Geweben

n = Anzahl der gemessenen Proben bei Gesunden

6.3.2 Pathologische Werte der Branchingenzymaktivität einer Patientenfamilie

Die Branchingenzymaktivität der polnischen Familie in Leukozyten wurde in Tab. 9 zusammengestellt. Die Enzymaktivität in Leukozyten des Patienten war mit einer Restenzymaktivität von 0,02 U (U= $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein) deutlich vermindert. Die Enzymaktivität beim Bruder und beim Vater betrug 0,09 U, was an der Grenze des Normbereiches liegt. Die Enzymaktivität der Mutter liegt mit 0,11 U im niedrigen Normbereich.

Patient	Enzymaktivität in Leukozyten [$\mu\text{mol} / \text{min/mg Protein}$]	klinische Klassifikation
Patient	0,02	Milde non progressive Leberform
Bruder	0,09	asymptomatisch
Vater	0,09	asymptomatisch
Mutter	0,11	asymptomatisch

Tab. 9: Branchingenzymaktivität in Leukozyten der untersuchten Patientenfamilie

6.3.3 Genanalyse des Branchingenzym des Patienten und seiner Familie

Tab. 10 zeigt die bei der Patientenfamilie auftretenden Mutationen sowie deren klinische Form und der Lokalisation im Nukleotid, in der Polypeptidkette sowie in der cDNA. Der Patient 4 zeigt eine Compound-Heterozygotie für die Mutationen H528R und IVS5+2t>c. Die Mutation für H528R besteht aus c1611C>G, was in Position 1611 eine Änderung des Codons nach **GAT** anstelle **CAT** bewirkt. Die Mutation H528R weist auf einen Austausch der Aminosäure Arginin anstelle von Histidin in Position 528 hin. Diese Mutation ist beim Vater und dem Bruder gefunden worden. Die Mutation IVS5+2t>c, die bei seiner Mutter identifiziert wurde, ändert in Intron 5 das Codon T zu C.

Über die neue Mutation H528R des Patienten 4 ist noch nicht berichtet worden.

Patient	Mutation I	Mutation II	klinische Form	Translation der Branchingenzym cDNA
Patient 4	*H528R (c1611C>G, Exon 14)	IVS5+2t>c (Intron5)	milde non progressive Leberform	Position 1611 **CAT(His,528)
Bruder	H528R	-	asymptomatisch	
Vater	H528R	-	asymptomatisch	
Mutter	IVS5+2t>c	-	asymptomatisch	

* bislang nicht beschriebene Mutation

** geänderte Sequenz

Tab. 10: Mutationen, klinische Form und Translation der Branchingenzym-cDNA des Patienten 4 und seiner Familie

7. Diskussion

7.1 GSD Typ II: Aktivität der sauren α -Glukosidase und Mutationen des GAA-Gens

Die normale, saure α -Glukosidase-Aktivität liegt in Leukozyten etwas höher als in Fibroblasten und als in nativen Chorionzotten. Bei Leukozyten wird durch Hemmung des neutralen Enzyms im Bereich um pH 4,0 eine genaue Messung der sauren α -Glukosidase-Aktivität verhindert (116, 117). Deshalb liegt die α -Glukosidase-Aktivität in Leukozyten höher als in anderen Geweben, aber die Werte der wahren GAA-Aktivität bei pH 4,0 liegen niedriger als die tatsächlich gemessenen Werte. Bei Säuglingen ist die Enzymaktivität erschwert zu messen, da zusätzlich Granulozyten (Leukozyten mit Zytoplasmakörper) das Nieren-Isomer saure Maltase enthalten, welches auch bei saurem pH aktiv ist. (46, 47, 48, 49). Wir haben früher Antikörper gegen saure α -Glukosidase für die exakte Bestimmung verwendet (116, 117), welches eine sehr arbeitsintensive und aufwendige Methode war. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine neue, einfachere Methode für die Bestimmung der α -Glukosidase-Aktivität bei pH 4,0 und pH 6,5 angewendet (Tab. 5 und 6).

Mit dem definierten Quotienten der sauren α -Glukosidase-Aktivität (Quotient: α -Glukosidase-Aktivität bei pH 6,5 / α -Glukosidase-Aktivität bei pH 4,0) lassen sich verschiedene klinische Formen relativ gut klassifizieren. Der Normbereich des Quotienten in Leukozyten liegt bei Gesunden im Bereich 1,0 - 3,5, während er im Muskel oder Fibroblasten niedriger als 1,0 liegt. Bei Patienten mit infantiler Form liegt der Quotient in Leukozyten über 12,0, bei juveniler Form über 6,0 und bei adulter Form über 4,0. In dieser Studie wurden Leukozyten als das diagnostischen Mittel ausgewählt, da Leukozyten aus peripheralem Blut einfach gewonnen und ohne Kultivierung schnell gemessen werden können. Im Gegensatz zur sauren α -Glukosidase-Aktivität in Leukozyten zeigt die saure α -Glukosidase-Aktivität in Fibroblasten und in Myozyten keine Hemmung durch neutrales Enzym im Bereich um pH 4,0, was eine klare Unterscheidung der klinischen Formen durch die Restenzymaktivität der sauren α -Glukosidase (GAA) ermöglicht. Daher sind in der Literatur überwiegend Berichte über die prozentuale Restenzymaktivität der sauren α -Glukose-Aktivität in Fibroblasten zu finden. Die prozentuale Restenzymaktivität bei den Patienten in Fibroblasten liegt generell unter 1% des Normbereiches bei der infantilen Form (bis 12

Monate), bei 1%-10% bei spätinfantiler / juveniler Form und bei 2% - 40% bei der adulten Form (107).

Die Patientin 1 zeigte eine fast normale saure α -Glukosidase-Aktivität in Leukozyten (ca. 80% der Normaktivität). Im Gegensatz dazu lag der Quotient der Enzymaktivität in Leukozyten eindeutig höher als der Normbereich (Tab. 6). Hier zeigt sich vorteilhaft die Methode der Quotientenbildung, da hierdurch deutliche Unterschiede der GAA-Aktivität betrachtet werden können. Bei der Patientin 1 haben wir eine Compound-Heterozygotie für c1703A>T(H568L) und c2014C>T (R672W) gefunden. Die erste Mutation verursacht einen Aminosäureaustausch in Position 568, Leucin anstelle Histidin, über die in der Literatur bisher noch nicht berichtet worden ist. Bei der zweiten Mutation handelt es sich um eine Änderung Arginin durch Tryptophan in Position 672. Diese zweite Mutation konnte bereits früher von Huie et al. bei anderen Patienten identifiziert werden (110). Huie et al. hat eine vergleichbare Heterozygotie mit c2014C>T(R672W)/ Δ nt766-785/+insC beschrieben und eine Restenzymaktivität im Muskel gemessen (110). Unsere Patientin 1 leidet nur unter Muskelschwäche, aber der Patient von Huie et al. verstarb durch respiratorische Insuffizienz. Der Vergleich zeigt, dass sich durch die unterschiedlich ausgeprägte Mutation (Δ nt766-785/+insC anstelle von c1703A>T(H568L) ein anderer klinischer Verlauf ergibt.

Die Restenzymaktivität in Leukozyten bei Patientin 2 und 3 liegt bei 30% der Normaktivität und somit höher als die Restenzymaktivität in Fibroblasten bei den Patienten, über die Kroos et. al berichtet hat (102). Die Restenzymaktivität beim Patienten der Mutation IVS1-13t>g / Δ T525 von Kroos et al. in Fibroblasten liegt bei etwa 12% der Normaktivität und beim Patienten der Mutation Δ T525/ Δ T525 liegt diese nahe Null (102). Es zeigt sich eine eindeutige höhere Restenzymaktivität, wenn die zweite Mutation anstelle von c.510 C>T zu der Mutation Δ T525 kodiert wird. Bei Untersuchungen anderer Autoren zur Mutation IVS1-13t>g / Δ T525 der juvenilen Form liegt die Restenzymaktivität in Fibroblasten im Bereich zwischen 1%-10% (107). Die Mutation IVS1-13t>g, die bei Patientin 2 und 3 gefunden wurde, wurde 1995 durch Huie et al. (87) und Kroos et al. (102) bereits beschrieben. Der Austausch der G- anstelle der T-Base bei Position 13 des Intron 1 resultiert in eine alternative Splicing-Transkription mit Deletion des Exon 2, wo das Startkodon lokalisiert ist (87,103). Diese

Mutation zeigt sich als juvenile bzw. adulte-Onset der GSD Typ II sehr häufig. Besonders häufig tritt diese Mutation bei adulten bzw. juvenilen Patienten bei weißen kaukasischen Populationen auf (86, 87). Deshalb wird vermutet, dass diese Mutation eine Uralt-Mutation ist. Als Beispiel berichtet Kroos et al. (102) über eine Familie aus Kaukasien, in der sechs Generationen mit GSD Typ II untersucht wurden. Die meisten Neugeborenen dieser Familien starben sofort nach der Geburt. Der Großvater wurde mit Compound-Heterozygotie IVS1-13t>g / Δ T525 identifiziert und hat diese Merkmale bis in die dritte Generation homozygot Δ T525/ Δ T525 weitergegeben (102). Bei Patientin 2 und 3 liegt eine missense-Mutation c.510 C>T in einem anderen Allel vor, bei der Cytosin durch Thymin im Exon 2 ausgetauscht ist. Die Mutation c.510 C>T tritt sehr häufig in Deutschland auf (nach Information aus der Gendatenbank). Bei den Patientinnen 2 und 3, zwei deutschen Geschwistern, wurde besonders die Schädigung der Skelettmuskulatur und der Leber, sowie bei Patientin 3 des Zwerchfells beobachtet. Bisher wurde eine andere Compound-Heterozygotie für IVS1-13t>g/ Δ exon18 (108, 109) als adulte Form bestätigt.

7.2 GSD Typ IV: Branchingenzymaktivität und Mutationen des Branchingenzymgens

Wir haben eine zweistufige Bestimmungsmethode für die genaue Messung der Branchingenzymaktivität mit Anwendung der Phosphorylase-a sowie der Glykogensynthese entwickelt (9). Durch diese Methode konnten wir die Restenzymaktivität des Branchingenzym in Leukozyten mit großer Sicherheit bestimmen (Tab. 8). Die relativ hohen Km-Werte für Glukose-1-Phosphat könnten sich durch die Anwendung der exogenen Phosphorylase-a ergeben, da das Substrat Glukose-1-Phosphat zweimal an der Enzymreaktion beteiligt ist (Abb. 5 und 6). Die normale Branchingenzymaktivität ist etwas unterschiedlich in verschiedenen Geweben (Tab. 8). In Leukozyten, Hepatozyten, Fibroblasten, Myozyten und Chorionzotten wurde eine signifikant erniedrigte Branchingenzymaktivität bei der neonatalen und infantilen Leberform, sowie bei der Kardialform der GSD IV gemessen (34).

So konnte zum Beispiel bei der infantilen Leberform eine Branchingenzymaktivität weder in Hepatozyten noch in Leukozyten nachgewiesen werden (34, 45), während bei der milden, non-progressiven, hepatischen Form entweder eine Inaktivität des

Branchingenzym oder lediglich 50% der Branchingenzymaktivität in der Leber festgestellt werden konnte (39, 40). Bei der neonatalen, neuromuskularen Form wurde keine Aktivität des Branchingenzym im Muskel (34, 45) gemessen; bei APBD lag die Restenzymaktivität in Leukozyten und in peripheren Nerven bei 10%-20% (40, 44, 45, 112). Bei der isolierten, spätmanifestierenden Muskelform ist die Branchingenzymaktivität nur im Muskel erniedrigt, während bei der isolierten, juvenilen Muskelform eine Erniedrigung im Muskel und in Leukozyten auftritt. In anderen Geweben, z. B. in Fibroblasten oder Hepatozyten, liegt die Enzymaktivität im Normbereich (112). Unser Patient 4 zeigt eine Hepatosplenomegalie und 0,02 U Restenzymaktivität des Branchingenzym in Leukozyten, was mit einer milden, non-progressiven Leberform vereinbar ist.

Bisherige Studien zeigen acht Mutationen in den Branchingenzymgenen (L224P, Y329S, F257L, R515C, R524X, R515H, R524Q und 210-bp Deletion) (34, 44). Der klassischen, allgemeinen Form (Leberform) liegt eine Dreipunktmutation (R515C, F257L, R524X) zugrunde, die wahrscheinlich eine Inaktivität des Branchingenzym (0% in der Leber) verursacht (34). Bei der milden non-progressiven hepatischen Form mit einer Punktmutation in Position L224P und Y329S, die in zwei unterschiedlichen Allelen entdeckt wurde, zeigt sich bei L224P ein kompletter Ausfall der Branchingenzymaktivität in der Leber und bei Y329S nur etwa 50% der Branchingenzymaktivität in der Leber (39, 40). Als Ursache der neonatalen, neuromuskularen Form ist die Deletion der 210 bp vom Nukleotid 873 bis 1082 in der Branchingenzym-cDNA bekannt, d. h. der Verlust von 70 Aminosäuren. Diese Deletion löscht die Branchingenzymaktivität im Muskel vollständig aus (34). Die Patienten mit adulter Polyglukosankörper-Krankheit (APBD) zeigten eine Restenzymaktivität von ca. 10% in Leukozyten und peripheren Nerven (40, 44, 112).

Über die zwei Mutationen im Branchingenzymgen bei spätmanifestierender neurodegenerativer Form (APBD, adulte Polyglukosankörper-Krankheit) R515H und R524Q ist berichtet worden (40, 44, 112). Erstmals identifizierten Ziemssen et al. Mutationen, nämlich R515H und R524Q, bei non-Ashkenazi (112). Die Patienten von Ziemssen et al. mit adulter Polyglukosankörper-Krankheit (APBD) leiden unter Gangstörung, Urin-Inkontinenz und Taubheit und zeigen einen Mangel der Branchingenzymaktivität in Leukozyten (20% der Normaktivität) (40).

Bei unserem Patienten 4 wurden zwei Mutationen H528R- und IVS 5+2t>c gefunden. Seine Mutter ist heterozygot für die Mutation IVS 5+2t>c, sein Vater und Bruder sind

heterozygot für die Mutation H528R identifiziert. Die Mutation H528R verursacht höchstwahrscheinlich eine geringe oder fehlende Branchingenzymaktivität. Die Patienten mit R515C- und R524X-Mutationen litten an einer progressiven Leberzirrhose mit Leberversagen (34). Bao et al. identifiziert eine Intron-Mutation, IVS 6-1g>a, was bei der Transkription einen Übersprung des Exon 7 (210bp Deletion) in den Nukleotide von 873 bis 1082 des GBE verursacht. Diese Deletion löscht die Branchingenzymaktivität völlig (34). Die neue Mutation, IVS 5+2t>c, unterscheidet sich von der Intronmutation von Bao et al. (34) und beeinflusst höchstwahrscheinlich die Restenzymaktivität des Branchingenzym, was mit dem milden Verlauf der klinischen Symptome des Patienten 4 vereinbar ist. Diese Intron-Mutation ist höchstwahrscheinlich verantwortlich für die Restenzymaktivität in Leukozyten bei dem Patienten 4 und bei der Mutter (Tab. 9).

Die klinische Beteiligung und Manifestation bei GSD Typ IV präsentiert sich sehr unterschiedlich. Man vermutet, dass unterschiedliche Isoformen des Branchingenzym, die durch ein Gen kodiert werden, in verschiedenen Geweben spezifisch gebildet werden. Die differentielle Sensitivität der mutanten Enzyme ändert sich durch die Protease, durch posttranslationaler Modifikation in differenten Zelltypen und durch genetische oder extrinsische Faktoren. Sie trägt höchstwahrscheinlich zur Heterogenität der GSD Typ IV bei (40).

8. Zusammenfassung

Glykogen ist eine leicht mobilisierbare Speicherform der Glukose in Leber und Skelettmuskel. Die lysosomale saure α -Glukosidase nimmt am Glykogenabbau teil.

Die Glykogen-Speicherkrankheit Typ II, die durch Mangel von saurer α -Glukosidase verursacht wird, ist eine autosomal rezessive Krankheit und klassifiziert sich in die infantile Form, die non-klassische GSD Typ II (als Subklassifikation der infantilen Form), die juvenile und in die adulte Form. Das Gen für die saure α -Glukosidase ist im menschlichen Chromosom bei 17q25.2-q25.3 lokalisiert und enthält 20 Exons. Sie kodieren ein Protein mit 952 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 105 kDa. Das Branchingenzym katalysiert die Verzweigung der Glykogenkette in der α -1,6-Position. Dadurch nimmt die Löslichkeit des Glykogens zu, der osmotische Druck sinkt. Damit erhöht die Verzweigung die Geschwindigkeit von Glykogensynthese und -abbau. Die Glykogen-Speicherkrankheit Typ IV, die durch einem Mangel an Branchingenzym verursacht wird, ist ebenso eine autosomal rezessive Krankheit und kann in fünf Formen klassifiziert werden, nämlich in die klassische Form, die milde non-progressive hepatische Form, die neuromuskuläre Form, die spätmanifestierende neurodegenerative Form (APBD) und in die isolierte Muskelform, die als adulte und juvenile Form erscheint. Das Gen für das Branchingenzym liegt im menschlichen Chromosom an Stelle 3p14 und besteht aus 16 Exons. Sie kodieren für ein Protein mit 702 Aminosäuren und eine Länge von etwa 118 kb chromosomaler DNA.

In dieser Arbeit haben wir vor allem die Messung der Enzymaktivität der GAA und des Branchingenzym in Leukozyten präsentiert, da für eine schnelle und einfache Bestimmung der Enzymaktivität Leukozyten besonders gut geeignet sind. Als weitere diagnostische Methode wurde die Genanalyse mittels DNA aus Vollblut, durch PCR und Gelelektrophorese durchgeführt.

Insgesamt werden 4 Patienten, 3 Patientinnen mit GSD Typ II und ein Patient mit GSD Typ IV, vorgestellt: Patientin 1 aus Usbekistan, Patientin 2 und Patientin 3 aus Deutschland und Patient 4 mit seiner Familie aus Polen.

Die 15-jährige Patientin 1 zeigte eine langsame motorische Entwicklung und eine deutliche Myopathie in allen Extremitäten. Die histologischen Befunde zeigten eine

ausgeprägte vakuolare Myopathie mit PAS-positiven Materialien. Die saure α -Glukosidaseaktivität in Leukozyten lag fast im Normbereich (ca. 80%), aber der Quotient der Enzymaktivität in Leukozyten betrug 4,7, was eindeutig höher liegt als der Normbereich. Die molekulargenetische Studie zeigte eine bislang nicht beschriebene Mutation in Position 1703 in einem Allel. Dort wurde CTC anstelle CAC in Exon 12 kodiert, wodurch ein Austausch von Histidin durch Leucin in Position 568 resultiert. Als zweite Mutation ist im Exon 14 in Position 2014 TGG anstelle CGG kodiert, was anstelle des Arginins Tryptophan in Position 672 (R672W) erzeugt. Diese Patientin zeigte die typischen Symptome der adulten Form der Pompe-Krankheit.

Die 9-jährige Patientin 2 zeigte GOT, GPT und eine CK-Erhöhung im Lebensalter von einem Jahr. Sie klagt über eine Ermüdung beim Gehen nach langen Strecken, morgendlichen Kopfschmerzen und Nachtschweiß.

Bei der 16-jährigen Patientin 3, Schwester von Patientin 2, wurde erstmals im Alter von sieben Jahren eine juvenile GSD Typ II festgestellt. Bestätigt wurde diese durch eine Muskelbiopsie, bei der vakuolare, schöllige, fortgeschrittene Myopathie nachgewiesen werden konnte. Die Patientin 3 zeigt Muskelschwäche beim Laufen langer Strecken, sowie beim Treppensteigen. Zusätzlich leidet sie unter Belastungsdyspnoe und Schlafapnoe. Die Restenzymaktivität lag bei den beiden Patientinnen 2 und 3 in Leukozyten bei 30% der Normaktivität und die Quotienten der GAA-Aktivität betragen 7,8 und 8,0. Genetisch liegt bei Patientin 2 und Patientin 3 eine Änderung im Intron 1 vor, wo G anstelle T in Position 13 vorhanden ist. Diese Intron-Mutation resultiert in eine alternative Splicing-Transkription mit Deletion des Exon 2 und führt wahrscheinlich zur juvenilen Form der GSD Typ II. Eine weitere Mutation liegt in Position 510 vor, wo GAT anstelle von GAC in Exon 2 vorkommt.

Die Kombination dieser beiden Mutationen ist noch nicht beschrieben worden, aber sie zeigen, dass die Kombination dieser beiden Mutationen klinisch mit der juvenilen Form vereinbar ist.

Der 5-jährige, an GSD Typ IV leidende Patient aus Polen zeigte eine Hepatosplenomegalie ohne eine weitere Symptomatik und eine geringere Restenzymaktivität des Branchingenzym in Leukozyten (0,02 U). Die Enzymaktivität bei seinem Bruder und Vater lag etwas unter dem Normbereich und bei seiner Mutter im niedrigen Normbereich. Mittels der durchgeführten Genanalyse konnte eine Heterozygotie für die ge-

samte Familie bestätigt werden. Sowohl der Vater als auch der Bruder sind heterozygot für die erste Mutation mit H528R. Eine zweite Mutation im Intron (IVS5+2t>c) wurde bei der Mutter identifiziert. Die Mutation der H528R führt zu einem Austausch der Aminosäure Arginin in Position 528 anstelle von Histidin. Die neue Mutation IVS5+2t>c im Intron 5 resultiert vermutlich in einer reduzierten Restenzymaktivität des Branchingenzym, besonders in der Leber und Milz, was eine Hepatosplenomegalie zur Folge hat. Beim Patienten konnte durch Anamnese, Genanalyse und Enzymanalyse die milde non-progressive hepatische Form festgestellt werden.

In dieser Arbeit wurden zunächst einfache und sichere Methoden für die Bestimmung der Aktivität der sauren α -Glukosidase und der des Branchingenzym in Leukozyten angewendet. Weiterhin wurde die molekulargenetische Analyse der entsprechenden Gene durchgeführt. Damit konnten wir für mehrere Patienten mit Glykogenose mittels ca. 2-3 ml EDTA Blut eine sichere Diagnose stellen. Diese Verfahren sind hilfreich beim Verständnis und der Korrelation der klinischen und genetischen Heterogenität dieser Erkrankung. Falls in Zukunft eine Therapie zur Verfügung steht, ermöglicht sie durch eine rasche Diagnostik den frühzeitigen Beginn.

Referenzen

1. Creveld van S.: Over een bijzondere stoonis in de koolhydraatstofwisseling in den kinderleeftijd. *Nederl Maandschr Geneesk* 8 : 349-359, 1928.
2. Fernades J.: The history of the glycogen storage disease. *Eur J Pediatr* 154 : 423-424, 1995.
3. von Gierke E.: Hepato-nephrome-galia glykogenica. *Ziegler`s Beiträge pathol. Anat. u. allgem. Pathol.* 82: 497-513, 1929.
4. de Duve C., Pressman B., Gianetto R., Wattiaux R. and Appelmans F.: Tissue fractionation studies: intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver. *Biochem J.* 60: 604, 1955.
5. Andersen D. H.: Familial cirrhosis of the liver with storage of abnormal glycogen. *Lab Invest* 5: 11-20, 1956.
6. Chen Y.-T.: The metabolic and molecular bases of inherited disease. In: C.R.Sriver C. R., Beaudet A., Sly W. S., Valle D., Childs B., Kinzler K. W. and Vogelstein B., Editors, McGraw-Hill, New York, 8th ed.: 1521-1553, 2001.
7. Nase S., Kunze K. P., Schröder S. M., Shin Y. S., Hanrath P. : A new variant of type IV glycogenosis with primary cardiac manifestation and complete branching enzyme deficiency. In vivo detection by heart muscle biopsy. *Eur. Heart J.* 16 : 1698-1704, 1995.
8. van Noort G., Straks W., van Diggelen O. P., Hennekam R. C.: A congenital variant of glycogenosis type IV. *Pediatr. Pathol.* 13 : 685-698, 1993.
9. Shin Y. S. : Diagnosis of glycogen storage disease. *J. Inher. Metab. Dis.* 13 : 419-434, 1990.
10. Shin Y. S., Steiüber H., Klemm P., Endres W., Schwab O., Wolff G. : Branching enzyme in erythrocytes. Detection of type IV glycogenosis homozygotes and heterozygotes. *J. Inher. Metab. Dis.* 11 suppl2 : 252-254, 1988.
11. Illingworth B., Cori G. T.: Structure of glycogens and amylopektins, III. Normal and abnormal human glycogen. *J. Biol. chem.* 199 : 653, 1952.
12. Brown B. I., Brown D. H.: Lack of an α 1-4 glycan: α 1-4 glycan 6-glycosyl transferase in a case of type IV glycogenosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56 : 725 - 729, 1966.
13. Roach P. J., Glycogen and its metabolism. *Curr. Mol. med.* 2 : 101-120, 2002.

-
14. Thon V. J., Khalil M. and Cannon F. C.: Isolation of human glycogen branching enzyme c DNAs by screening complementation in yeast. *J. Biol. Chem.* 268 : 7509-7513, 1993.
 15. Servidei S. and Dimauro S.: Disorders of glycogen metabolism of muscle. *Neurol. Clin.* 7 : 159-178, 1989.
 16. Geddes, R.: In the polysaccharides (Aspinall, G. O. ed.). Academic Press. New York, Vol.3 : 283-336, 1985.
 17. Howell, R. R. Continuing lessons from glycogen storage diseases (Editorial) *N. Engl. J. Med.* 324 : 55-56, 1991.
 18. Hirschhorn R., Scriver C. R., Beaudet A. C., Sly W. S., Valle D. eds. The metabolic and molecular bases of inherited diseases. McGraw-Hill New York 7th ed. : 2443-2464, 1995.
 19. Hirschhorn R. and Reuser A. J.: Glycogen storage disease type II: acid alpha-glucosidase (acid maltase) deficiency. In: Scriver A. L., Beaudet W. S., Sly et al.: The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw Hill, New York : 3389-3420, 2001.
 20. Ausems M. G., Verbiest M. P., Hermans M. A., Kroos F. A., Beemer J. H., Wokke et al.: Frequency of glycogen storage disease type II in the Netherlands: implications for diagnosis and genetic counselling. *Eur. J. Hum. Genet.* 7 : 713-716, 1999.
 21. Hermans M. M. P., Leenen D. V. et al.: Twenty-Two Novel Mutations in the Lysosomal α -Glucosidase Gene (GAA) Underscore the Genotype-Phenotype Correlation in Glycogen Storage Disease Type II. *Human Mutation* 23 : 47-56, 2004.
 22. Slonim A. E., Bulone L., Ritz S., Goldberg T., Chen A., Martiniuk F.: Identification of two subtypes of infantile acid maltase deficiency. *J. Pediatr.* 137 : 283-285, 2000.
 23. Laforet P., Nicolino M., Eymard B., Puech J. P., Caillaud C., Poenaru L., Fardeau M.: Juvenile and adult-Onset acid maltase deficiency in France, *Neurology*, 55 : 1122-1128, 2000.
 24. Fischer D. S., Paus S., Schröder S.: Spätmanifestation einer Glykogenose Typ II. *Nervenarzt* 74 : 896-899, 2003.
 25. Raben N., Danon M., Lu N. et al.: Surprises of genetic engineering: a possible model of polyglucosan body disease. *Neurology* 56 : 1739 –1745, 2001.
 26. De la Blanchardiere A. , Vayssier C., Duboc D., Jacquemin I. E, Eymard B., Fardeau M., Maire I., Dreyfus G., Guierin F.: Severe cardiomyopathy revealing amylopectino-

-
- sis. Two cases in adolescents from same family. *Press. med.* 23 : 1124 – 1127, 1994.
27. Reusche E., Aksu F., Goebel H. H., Shin Y. S., Yokota T., Reichmann H.: A mild juvenile variant of type IV glycogenosis. *Brain Dev* 14 : 36-43, 1992.
 28. Schröder J. M., May R., Shin Y. S., Sigmund M., Nase-Huppmeier S.: Juvenile hereditary polyglucosan body disease with complete branching enzyme deficiency (type IV glycogenosis). *Acta Neuropathol.* 85 : 419 – 430, 1993.
 29. Tang T. T., Segura A. D., Chen Y. T., Ricci L. M., Splaingard M. L., Lubinsky M. S.: Neonatal hypotonia and cardiomyopathy secondary to type IV glycogenosis, *Acta Neuropathol.* 87 : 531 – 536, 1994.
 30. Uro-Coste E., Lelong-Tissier M.C., Marie I., Ceuterick C., Chausseray F., Delisle M. B.: Glycogenose type IV variante congenitale. A propos d'une observation anatomoclinique. *Ann. Pathol.* 16 : 449 – 452, 1996.
 31. Tang T. T., Segura, A. D., Chen Y.-T. et al.: Neonatal hypotonia and cardiomyopathy secondary to type IV glycogenosis. *Acta Neuropathol.* 87 : 531 – 536, 1994.
 32. Herrick M. K., Twiss J. L., Vladutiu G. D., Glasscock G. F., Horoupian D. S. : Concomitant branching enzyme and phosphorylase deficiencies. An unusual glycogenosis with extensive neuronal polyglucosan storage. *J. Neuropathol.* 53 : 239-246, 1994.
 33. Moses S. W. and Parvari R.: The variable presentations of glycogen storage disease type IV: a review of clinical, enzymatic and molecular studies. *Curr. mol. Med.* 2 : 177- 188, 2002.
 34. Bao Y., Kishnani P., Wu J.- Y. und Chen Y.-T.: Hepatic and Neuromuscular Forms of Glycogen Storage Disease Type IV caused by Mutation in the same Glycogen-branching Enzyme Gene. *J. Clin. Invest.* Vol. 97 : 941 – 948, 1996.
 35. Guerra, A. S., van Diggelen O. P., Carneiro F., Tsou R. M., Simoes S. and Santos N. T.: A juvenile variant of glycogenosis IV (Andersen disease). *Eur. J. Pediatr.* 145: 179 – 181, 1986.
 36. Greene, H. L., Brown B. I., McClenahan D. T., Agostini R. M. and Taylor S. R.: A new variant of type IV glycogenosis: deficiency of branching enzyme activity without apparent progressive liver disease. *Hepatology* 8: 302 – 306, 1989.
 37. Brown, B. I. and Brown D. H.: Branching enzyme activity of cultured amniocytes and chorionic villi: prenatal testing for type IV glycogen storage disease. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 378-381, 1989.

-
38. McConkie-Rosell, A. C., Wilson D. A., Piccoli J., Boyle, T., DeClue P., Kishnani, J.-J., Shen, A., Boney B., Brown and Chen Y.-T: Clinical and laboratory findings in four patients with a nonprogressive hepatic form of type IV glycogen storage disease. *J. Inherited Metab. Dis.*, In press., 1996.
 39. Bruno C., DiRocco M., Doria Lamba L., Bado M., Marino C., Tsujino S., Shanske S., Stella G., Minetti C., Van Diggelen O. P., DiMauro S.: A novel missens mutation in the glycogen branching enzyme gene in a child with myopathy and hepatopathy. *Neuromusc. Disord.*, Vol. 9 : 403 – 407, 2000.
 40. von Ziemssen F., Sindern E., Schröder J. M., Shin Y. S., Zange J., Kilimann M. W., Malin J. P., Vorgerd M.: Novel missense mutations in the glycogenbranching enzyme gene in adult polyglucosan body disease. *Ann. Neuro.* 47 : 536 – 540, 2000.
 41. Servidei, S., Riepe R. E., Lanston C., Tani I., Bricker J. T., CrispLindgren N., Travers H., Armstrong D. and DiMauro S.: Severe cardiopathy in branching enzyme deficiency. *J. Pediatr.* 111 : 51 – 56, 1987.
 42. Lossos, A., V., Barash D., Soffer Z., Argov M., Gomori Z., BenNariah O., Abramsky O. and Steiner I.: Hereditary branching enzyme dysfunction in adult polyglucosan body disease: A possible metabolic cause in two patients. *Ann. Neurol.* 30 : 655 – 662, 1991.
 43. Bruno, C., Servidei S., Shanske S., Karpati G., Carpenter S., McKee S. D., Barohn R. J., Hirano M., Rifai Z. and DiMauro S.: Glycogen branching enzyme deficiency in adult polyglucosan body disease. *Ann. neurol.* 33 : 88 – 93, 1993.
 44. Lossos A., Meiner Z., Barasch V. et al.: Adult polyglucosan body disease caused by the Tyr329Ser mutation in the glycogen branching enzyme gene in Ashkenazi Jews. *Ann. Neurol.* 44 : 867 – 872, 1998.
 45. Sindern E., Patzold T., Vorgerd M., Shin Y. S., Podskarbi T., Schröder J. M., Malin J. P.: Adulte Polyglucosankörperkrankheit. *Nervenarzt* 70 : 745 – 749, 1999.
 46. Lam C. W., Yuen Y. P., Chan K. Y., Tong S. F., Lai C. K., Chow T. C. et al.: Juvenile-onset glycogen storage disease type II with novel mutation in acid alpha-glucosidase gene. *Neurology* 60 : 715 – 717, 2003.
 47. Rozaklis T., Ramsay S. L., Whitfield P. D., Ranieri E., Hopwood J. J. and Meikle P. J.: Determination of oligosaccharides in pompe disease by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 48 : 131 – 139, 2002.

-
48. An Y., Yong S. P., Hillman S. L., Van Hove J. L., Chen Y. T. and D. S. Millington: Liquid chromatographic assay for a glucose tetrasaccharide, a putative biomarker for the diagnosis of Pompe disease. *Anal. biochem.* 287 : 136 –143, 2000.
 49. Umapathysivam K., Hopwood J.J. and Meikle P.J.: Determination of acid alpha-glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for pompe disease. *Clin. Chem.*: 1378-1383, 2001.
 50. Ausems M. G., Lochman P., van Diggelen O. P., Ploos H. K., van Amstel, Reuser A. J and. Wokke J. H.: A diagnostic protocol for adult-onset glycogen storage disease type II. *Neurology* 52 : 851 – 853, 1999.
 51. Engel A. G., Gomez M. R., Seybold M. E., Lambert E. H.: Acid maltase deficiency: comparison of infantile, childhood, and adult types. *Neurology* 20 : 382, 1970.
 52. Engel A. G., Gomez M. R., Seybold M. E. and Lambert E. H.: The spectrum and diagnosis of acid maltase deficiency. *Neurology* 23 : 95 – 106, 1973.
 53. Lenard H., Schaub J., Keutel: J. Electromyography in type II glycogenosis. *Neuropediatrics* 5 : 410. 1974.
 54. Chen Y.T. and Amalfitano A.: Towards a molecular therapy for glycogen storage disease type II (Pompe disease). *Mol. Med. Today* 6 : 245 – 251, 2000.
 55. Van den Hout M., Reuser A. J., de Klerk J. B., Arts W. F., Smeitink J. A. and Van der Ploeg A. T.: Enzyme therapy for Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk. *J. Inherit. Metab. Dis.* 24 : 266 – 274, 2001.
 56. Amalfitano A., Bengur A. R., Morse, R. P. Majure J. M., Case L. E., Veerling D. L. et al.: Recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: results of a phase I/II clinical trial. *Genet. Med.* 3 : 132-138, 2001.
 57. Kishnani P., Voit T., Nicolino M., Tsai C.- H., Herman G., Waterson J. et al.: Enzyme replacement therapy with recombinant human acid alpha glucosidase (rhGAA) in infantile Pompe disease (IPD): results from a phase 2 study. *Pediatr. Res.* 53 259, 2003.
 58. Bodamer O. A., Leonard J. V., Halliday D.: Dietary treatment in late-onset acid maltase deficiency, *Eur. J. Pediatr.* 156 : 39 – 42, 1997.
 59. Slonim A. E., Coleman R. A., McElligot M. A., Najjar J., Hirschhorn K., Labadie G. U. et al.: Improvement of muscle function in acid maltase deficiency by high-protein therapy. *Neurology* 33 : 34 – 38, 1983.

-
60. Bodamer O. A., Haas D., Hermans M. M., Reuser A. J. and Hoffmann G. F.: L-alanine supplementation in late infantile glycogen storage disease type II. *Pediatr. Neurol.* 27 : 145 – 146, 2002.
 61. Cafferty M. S., Lovelace R. E., Hays A. P., Servidai S., Di Mauro S., Rowland L. P. Polyglucosan body disease. *Muscle Nerve* 14 : 102 – 107, 1991.
 62. Robitaille Y., Carpenter S., Karpati G. et al.: A distinct form of adult polyglucosan body disease with massive involvement of central and peripheral neuronal processes and astrocytes: a report of four cases and a review of the occurrence of polyglucosan bodies in other conditions such as Lafora's disease and normal aging. *Brain* 103 : 315 – 336, 1980.
 63. Stacey K. H., Tay, H., Akman O., Wendy K. et al.: Fatal infantile neuromuscular presentation of glycogen storage disease type IV. *Neurol Dis.* 14,4 : 253-260, 2004.
 64. Brown, D. H. and Brown B. I.: Studies of the residual glycogen branching enzyme cDNAs by screening complementation in yeast. *J. Biol. Chem.* 268 : 7509 – 7513, 1983.
 65. Selby R., Starzl T. E., Yunis E., Brown B. I., Kendall R. S., Tzakis A.: Liver transplantation for type IV glycogen storage disease. *N. Engl. J. Med.* 324 : 39 – 42, 1991.
 66. Dworzak F., Casazza F., Mora M., Maria M., Gronda E., Baroldi G., Rimoldi M., Morani L., Cornelio F.: Lysosomal glycogen storage with normal acid maltase: a familial study with successful heart transplant. *Neuromuscul. Disord.* 4 : 243 –247, 1994.
 67. Danon M. J., Oh S. J., DiMauro S., Manaligod J. R., Eastwood A., Naidu S., Schliselfeld L. H.: Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology* 31 : 51 – 57, 1981.
 68. Nishino I., Fu J., Tanji K., Yamada T. et al.: Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 406 : 906-910, 2000.
 69. Sugie K., Yamamoto A., Murayama K. et al. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 58 : 1773 – 1778, 2002.
 70. Chabrol B., Figarella-Branger D., Coquet M. et al.: X-linked myopathy with excessive autophagy: a clinicopathological study of five new families. *Neuromuscul. Disord.* 11 : 376 – 388, 2001.
 71. Kalimo H., Savontaus M. L., Lang H. et al. X-linked myopathy with excessive autophagy: a new hereditary muscle disease. *Ann. Neurol.* 23 : 258 – 265, 1988.

-
72. Yamamoto A., Morisawa Y., Verloes A., Murakami N., Hirano M., Nonaka I., Nishino I.: Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease. *Neurology* 57 : 903 – 905, 2001.
 73. Wolfe H. J. and Cohen R. B.: Nonglycogen polysaccharide storage in glycogenosis type II (Pompe's disease). *Arch. Pathol.* 86 : 579 – 584, 1968.
 74. DiMauro S. and Hartlage P. L.: Fatal infantile form of muscle phosphorylase deficiency. *Neurology* 28 : 1124 – 1129, 1978.
 75. Milstein J. M., Herron T. M. and Haas J. E.: Fatal infantile muscle phosphorylase deficiency. *J. Child. Neurol.* 4 : 186 – 188, 1989.
 76. Agamanolis D. P., Askari A. D., DiMauro S. et al.: Muscle phosphofructokinase deficiency: two cases with unusual polysaccharide accumulation and immunologically active enzyme protein. *Muscle Nerve* 3 : 456 – 467, 1980.
 77. Lodge J. A., Maier T., Liebl W., Hoffman V. and Sträter N.: Crystal Structure of *Thermotoga maritima* α -Glucosidase AglA Defines a New Clan of NAD⁺-dependent Glycosidase. *J. Biol. Chem.* Vol. 278 : 19151 – 19158, 2003.
 78. Reuser A. J., Koster J. F., Hoogeveen A., Galjaard H.: Biochemical, immunological and cell genetic studies in glycogenosis type II. *Am. J. Hum. Genet.* 30 : 132 – 143, 1978.
 79. Abad M. C., Binderup K., Rios-Steiner J., Arni R. K., Preis J., Geiger J. H.: The X-ray Crystallographic Structure of *Escherichia coli* Branching Enzyme. *J. Biol. Chem.* 277 : 42164, 2002.
 80. Kozak, M.: An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids res.* 15 : 8125 – 8148, 1987.
 81. Kuo W.-L., Hirschhorn R., Huie M. L. and Hirschhorn K.: Localisation and ordering of acid alpha-glucosidase (GAA) and thymidine kinase (TK1) by fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.* 97 : 404 – 406, 1966.
 82. Matiniuk F., Mehler M., Tzall S., Meredith G. and Hirschhorn R.: Sequence of the cDNA and 5'-flanking region for human acid α -glucosidase, detection of an intron in the 5' untranslated leader sequence, definition of 18-nt polymorphisms, and differences with previous cDNA and amino acid sequences. *DNA Cell. Biol.* 9 : 85 – 94, 1990.
 83. Matiniuk F., Bodkin M., Tzall S. and Hirschhorn R.: Isolation and partial characterisation of the structural gene for human acid alpha glucosidase. *DNA Cell. Biol.* 104 : 283 – 292, 1991.

-
84. Wisselaar H. A., Kroos M. A., Hermans M. M., van Beeumen J. and Reuser A. J.: Structural and functional change of lysosomal acid alpha-glucosidase during intracellular transport and maturation. *J. Biol. Chem.* 268 : 2223 – 2231, 1993.
 85. Hermans M. M., Wisselaar H. A., Kroos M. A., Oostra B. A. and Reuser A. J.: Human lysosomal alpha-glucosidase: functional characterisation of the glycosylation sites. *Biochem. J.* 289 : 681 – 686, 1993.
 86. Kroos M. A., Van der Kraan M., Van Diggelen O. P., Kleijer W. J., Reuser A. J., Van den Boogaard M. J., Ausems M. G., Ploos van Amstel H. K., Poenaru L., Nicolino N., Wevers R.: Glycogen storage disease type II: Frequency of three common mutant alleles and their associated clinical phenotypes studied in 121 patients. *J. Med. Genet.* 32 : 836 – 837, 1995.
 87. Huie M. L., Chen A. S., Tsujino S., DiMauro S., Engel A. G. et al.: Aberrant splicing in adult onset glycogen storage disease type II (GSD II): molecular identification of an IVS(-13T→G) mutation in a majority of patients and a novel IVS10(+1GT→CT) mutation. *Hum. Mol. Genet.* 3 : 2231 – 2236, 1994.
 88. Shieh J. J. and Lin C. Y.: Frequent mutation in Chinese patients with infantile type of GSD II in Taiwan: evidence for a founder effect. *Hum. Mutat.* 11 : 306 - 312, 1998.
 89. Ko T. M., Hwu W. L. et al.: Molecular genetic study of pompe disease in Chinese patients in Taiwan. *Hum. Mutat.* 13 : 380-384, 1999.
 90. Shieh J. J., Lin C. Y.: Frequent mutation in Chinese patients with infantile type of GSD II in Taiwan: evidence for a founder effect. *Hum. Mut.* 11 : 306 – 312, 1998.
 91. Shieh J. J., Wang L. Y., Lin C. Y.: Point mutation in Pompe disease in Chinese. *J. Inherit. Metab. Dis.* 17: 145 – 148, 1994.
 92. Tsujino S., Huie M. et al.: Frequent mutation in Japanese patients with acid maltase deficiency. *Neuromuscul. Disord.* 10 : 599 – 603, 2000.
 93. Becker J. A., Vlach J., Raben N., Nagaraju K., Adams E. M., Hermans M. M. et al.: The African origin of the common mutation in African American patients with glycogen storage disease type II. *Am. J. Hum. Genet.* 62 : 991 – 994, 1998.
 94. Boerkoel C. F., Raben N., Martiniuk F., Miller F., Plotz P. Identification of a deletion common to adult and infantile acid α -glucosidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 51 (suppl): A 347, 1992.
 95. Hermans M. M. P., De Graaff E. et al.: The effect of a single base pair deletion (Δ T525) and a C1634T missense mutation (pro545leu) on the expression of lysosomal

-
- alpha-glucosidase in patients with glycogen storage disease type II. *Human. Mol. Genet.* 3 : 2213 – 2218, 1994.
96. Kroos M. A., van Leenen D., Verbiest J., Reuser A. J., Hermans M. M. P.: Glycogen storage disease type II : identification of a dinucleotide deletion and a common missense mutation in the lysosomal alpha–glucosidase gene. *Clin. Genet.* 53 : 379 –382, 1998.
97. Hirschhorn R., Huie M. L.: Frequency of mutations for glycogen storage disease type II in different populations : the delta 525T and deltaexon 18 mutations are not generally „ common “ in white populations [letter; comment]. *J. Med. Genet.* 36 : 85-86, 1999.
98. Van der Kraan M., Kroos M. A. et. al.: Deletion of exon 18 is a frequent mutation in glycogen storage disease type II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203 : 1535 – 1541, 1994.
99. Busch H. F., Koster J. F. and van Weerden T. W.: Infantile and adult-onset acid maltase deficiency occurring in the same family. *Neurology* 29 : 415 – 416, 1979.
100. Loonen M. C., Busch H. F., Koster J. F., Martin J. J., Niermeijer M. F., Schram A. W. et al.: A family with different clinical forms of acid maltase deficiency (glycogenosis type II): biochemical and genetic studies. *Neurology* 31 : 1209 –1216, 1981.
101. Hoefsloot L. H., van der Ploeg A. T., Kroos M. A., Hoogeveen-Westerveld M., Oostra B. A. and Reuser A. J.: Adult and infantile glycogenosis type II in one family explained by allelic diversity. *Am. J. Hum. Genet.* 46 : 45 – 52, 1990.
102. Kroos M. A., Van der Kraan M., Van Diggelen O. P., Kleijer W. J. and Reuser A. J.: Two extremes of the clinical spectrum of glycogen storage disease type II in one family: a matter of genotype. *Hum. Mutat.* 9 : 17 – 22, 1996.
103. Hermans M. M. P., Kroos M. A., Smeitink J. A. M. et al.: Glycogen storage disease type II; genetic and biochemical analysis of novel mutations in infantile patients from turkish ancestry. *Hum. Mutat.* 11 : 209 – 215, 1998.
104. Thon V. J., Khalil M. and Cannon J. F.: Isolation of Human Glycogen Branching Enzyme cDNAs by Screening Complementation in Yeast, *J. of Bio. Chem.* Vol. 268 : 509 – 7513, 1993.
105. Taniguchi N., Kato E. et.al.: Alpha-glucosidase activity in human leucocytes: choice of lymphocytes for the diagnosis of Pompe`s disease and the carrier state. *Clin. Chim. Acta* 16 : 89 (2) : 293-299, 1978.

-
106. Ding E., Hu H., Hodges B. L., Migone F. et.al: Efficiency of gene therapy for a prototypical lysosomal storage disease (GSD-II) is critically dependent on vector dose, transgene promoter, and the tissues targeted for vector transduction. *Mol. Ther.* 5 : 436 – 446, 2002.
 107. Kishnani P. S., Howell R. R.: Pompe disease in infants and children. *The J. of Ped.* Vol. 144 : 35 – 43, 2004.
 108. Boerkoel C. F. , Haas D., Hermans M., Reuser A, Hoffman G,; L-alanine supplementation in late infantile glycogen storage disease type II, *Pediatr. Neurol.* 27 : 145, 2002.
 109. Wokke J. H., Ausems M. G., van den Boogaard M. J. et al.: Genotype-phenotype correlation in adult-onset acid maltase deficiency. *Ann. Neurol.* 38 : 450 – 454,1995.
 110. Huie M. L., Tsujino S., Sklower Brooks S., Engel A., et al: Glycogen storage disease type II: Identification of four novel missense mutation (D645N, G648S, R672W, R672Q) and two insertions/deletions in the acid α -glucosidase locus of patients of differing phenotype. *Biochem. and biop. res. comun.* 244 : 921 – 927, 1998.
 111. Rolfs A., Schuller I., Finckh U., Weber-Rolfs I.: PCR Clinical Diagnostics and Research. *Springer Laboratory* 7 : 88 - 102, 1992.
 112. Sindern E., Ziemssen F., Ziemssen T., Podskarbi T., Shin Y et.al: Adult polyglucosan body disease, A postmortem correlation study. *Neurology*, 61: 263 - 265, 2003.
 113. Hoefsloot L. H., Hoogeveen-Westerveld M., Kroos M. A., van Beeumen J., Reuser A. J. and Oostra B. A. Primary structure and processing of lysosomal alpha-glucosidase; homology with the intestinal sucrase-isomaltase complex. *EMBO J.* 7 (6): 1697 – 1704, 1988.
 114. www.morbus-pompe.de
 115. Shin Y.S., Imgrund M., Podskarbi T., Goebel H., Muss W: Myopathien bei Glukogenosen. In: *Molekulare Grundlage hereditärer Myopathien*. Verlag W. Zuckschwerdt: 28 - 36, 1995.
 116. Grubisic A, Shin Y. S., Meyer W, Endres W, Becker U, Wischerrath H: First trimester diagnosis of Pompe`s disease (Glycogenosis type II) with normal outcome: assay of acid α -glucosidase in chorionic villous biopsy using antibodies. *Clin.genet.*, 30, 298, 1986.
 117. Shin Y. S., Endres W., Unterreitheimer J., Rieth M., Schaub J.: Diagnosis of Pompe`s disease using leukocyte preparation. *Kinetic and immulogial studies of 1,4*

α -glucosidase in human fetal and adult tissues and cultured cells. Clin. Chim. Acta 148, 9, 1985.

LEBENS LAUF

Name: Hyun Kyung Lee
Geburtsdatum: 16. Juli 1962
Geburtsort: Seoul / Südkorea
Familienstand: verheiratet
Nationalität: südkoreanisch

Schul Ausbildung

06/1969 – 07/1974 Grundschule
08/1974 – 07/1977 Mittelschule
08/1977 – 07/1981 Gymnasium

Studium

10/1981 – 02/1985 Studium „Nursing“, Samyuk Universität, Seoul
Abschluß: Bachelor of Science
10/1991 – 09/1998 Studium der Humanmedizin, Freie Universität Berlin
10/1998 – 02/2000 Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität
München
12/1999 Ärztliche Prüfung

Berufliche Tätigkeit

04/1985 – 08/1989 Korea Universitätshospital, Seoul
Leitende Krankenschwester der Abteilung für Innere Medizin
11/2001– 04/2003 Gemeinschaftspraxis für Pneumologie, Innere Medizin und All-
ergologie
Priv. Doz. Dr. med. Brückner, Dr. habil Dr. med. Kemmerich
09/2003 – 02/2004 Waldhausklinik Deuringen

München, 29. Januar 2005