

**Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Universität München**

Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt

**Neugeborenen-Screening bezüglich des
Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangels:
Genetische Charakterisierung von biochemisch grenzwertig auffälligen Proben und
Validierung der Auswertungskriterien**

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

vorgelegt von

Julia Pongratz

aus

Göttingen

Jahr

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. W. Röschinger

Mitberichterstatter: PD Dr. T. M. Strom
PD Dr. A. Peters

Betreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. E. Maier

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2007

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung 6
1.1	Die Medium-Chain Acyl-Coenzym A Dehydrogenase Defizienz (MCADD) 6
1.1.1	Allgemeine Einführung 6
1.1.2	Biochemische Grundlagen 6
1.1.3	Klinische Symptomatik 9
1.1.4	Biochemische Diagnostik 10
1.1.5	Genetik 11
1.1.6	Therapie 12
1.2	Neugeborenen-Screening 12
1.2.1	Neugeborenen-Screening in Bayern 13
1.2.2	Ungeklärte Fragen im Neugeborenen-Screening 14
1.2.2.1	Klinisch asymptomatische und biochemisch milde MCADD-Varianten 14
1.2.2.2	Falsch Negative und Falsch Positive Proben im MCADD-Screening 15
1.3	Zielsetzung der vorliegenden retrospektiven Studie 15
2	Material 17
2.1	Studienkonzeption und Auswahl der Proben 17
2.1.1	MCADD-Patienten 18
2.1.2	Studiengruppe 19
2.1.3	Gematchte Kontrollgruppe 20
2.1.4	Falsch Positive Proben im Neugeborenen-Screening für MCADD 21
2.1.5	Nachsequenzierte Proben 21
2.1.6	Heterozygote Eltern und Geschwister von MCADD-Patienten 21
2.2	Daten des Neugeborenen-Screenings in Bayern: Ermittelte MCADD-Prävalenz und Allelfrequenz der Mutationen 985A→G und 199T→C 21
3	Methoden 23
3.1	Acylcarnitinmessung im Blut mittels ESI-Tandemmassenspektrometrie 23
3.2	Identifikation der <i>ACADM</i> -Mutationen 985A→G und 199T→C 24
3.2.1	DNA-Präparation aus getrockneten Blutstropfen 24

3.2.1.1	Reinigung und Proteinabtrennung	25
3.2.1.2	DNA-Extraktion	25
3.2.1.3	Photometrische Messung der DNA-Konzentration	25
3.2.2	PCR	25
3.2.2.1	PCR für Exon 3 (199T→C)	26
3.2.2.2	PCR für Exon 11 (985A→G)	27
3.2.3	Restriktionsverdau	28
3.2.3.1	Verdau des amplifizierten Exon 3	29
3.2.3.2	Verdau des amplifizierten Exon 11	29
3.2.4	Gelelektrophorese und Visualisierung	29
3.2.5	Validierung der Methodik	30
3.3	Identifikation von <i>ACADM</i> -Mutationen in allen kodierenden Exons durch Sequenzierung des <i>MCADD</i> -Gens	31
3.4	Datenverarbeitende Methoden	32
3.4.1	Berechnung der erwarteten Heterozygotenhäufigkeit und der Konfidenzintervalle	32
3.4.1.1	Heterozygotenhäufigkeit 985A→G	32
3.4.1.2	Heterozygotenhäufigkeit 199T→C	32
3.4.1.3	Berechnung der 95 % Konfidenzintervalle für die erhobenen Häufigkeiten	33
3.4.2	Deskriptive Statistik und Signifikanzberechnung	33
3.4.3	Receiver operated characteristics (ROC), Box- und Scatterplots	33
3.4.4	Vier-Felder-Tafel zur Berechnung der technischen Performance des Neugeborenen-Screenings	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Allelfrequenzen der Mutationen 199T→C und 985A→G	35
4.1.1	Allelfrequenzen in der Studien- und Kontrollgruppe	35
4.1.2	Abhängigkeit der Allelfrequenzen in der Studiengruppe von der Höhe der Octanoylcarnitin-Konzentration	36
4.1.3	Allelfrequenzen in der Gruppe der Falsch Positiven Proben	38
4.2	Unterscheidung einzelner <i>ACADM</i> -Genotypen anhand von Acylcarnitin-Mustern	38
4.2.1	Normalwerte der Acylcarnitine	38
4.2.2	Acylcarnitin-Konzentrationen der einzelnen <i>ACADM</i> -Genotypen	40

4.2.3	Unterscheidung von 985A→G homozygoten, 985A→G / 199T→C compound heterozygoten MCADD-Patienten (Gruppen 1a und 1b) und Carriern mit erhöhten Acylcarnitin-Konzentrationen im Erstscreening (Gruppe 2)	45
4.2.3.1	Receiver operated characteristics (ROC) und mögliche cut-off-Werte	
4.2.3.2	Scatterplot und Falsch Negative Proben	47
4.2.4	Unterscheidung von Carriern und Noncarriern für 985A→G oder 199T→C mit unauffälligen Acylcarnitin-Konzentrationen im Neugeborenen-Screening (Gruppe 3)	51
4.3	Altersabhängigkeit der Acylcarnitin-Konzentrationen	52
4.3.1	Altersabhängigkeit der Acylcarnitin-Konzentrationen bei MCADD-Patienten mit unterschiedlichen Genotypen	52
4.3.2	Vergleich der Acylcarnitin-Werte heterozygoter Erwachsener, Kinder und Säuglinge	54
4.4	Retrospektiv bestimmte technische Performance des Neugeborenen-Screenings für MCADD in Bayern	54
5	Diskussion	57
5.1	Möglichkeiten einer wissenschaftlichen Bewertung des Neugeborenen-Screenings	57
5.2	Erhöhte Carrierfrequenz bei Individuen mit grenzwertig auffälligem biochemischen Phänotyp („Borderline-MCADD“)	58
5.3	Analyse der Acylcarnitinmuster zur Definition von möglichen Trennkriterien	60
5.4	Identifikation von Falsch Negativen Individuen im MCADD-Screening	61
5.5	Konsequenzen für das Neugeborenen-Screening	62
6	Zusammenfassung	65
7	Literaturverzeichnis	68
8	Abkürzungsverzeichnis	73
9	Danksagung	75
10	Lebenslauf	76

1 Einleitung

1.1 Die Medium-Chain Acyl-Coenzym A Dehydrogenase Defizienz (MCADD)

1.1.1 Allgemeine Einführung

Der Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel (MCADD; MIM 201450) ist eine autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselstörung des mitochondrialen Fettsäureabbaus von Fettsäuren mittlerer Kettenlänge. Er wurde erstmals 1982 bei einem 3-jährigen Patienten beschrieben mit Erkrankungs-Episoden, die mit Lethargie und Bewusstlosigkeit einhergingen und einem Reye Syndrom ähnelten (Kolvraa, Gregersen et al. 1982).

Die Inzidenz des MCADD liegt in den mitteleuropäischen Ländern zwischen 1 / 8.456 und 1 / 15.001 (Andresen, Dobrowolski et al. 2001; Maier, Liebl et al. 2005), womit er zu den häufigsten angeborenen Stoffwechselerkrankungen zählt. Die Inzidenz der Phenylketonurie liegt zum Vergleich etwa bei 1 / 10.000, die der Galaktosämie zwischen 1 / 59.000 und 1 / 80.000 und die des Biotinidase-Mangels zwischen 1 / 80.000 und 1 / 100.000 (Mathias and Bickel 1986; Kwon and Farrell 2000; Liebl 2001; Schulze, Mayatepek et al. 2002; Hoffmann, von Kries et al. 2004).

1.1.2 Biochemische Grundlagen

Der mitochondriale Fettsäureabbau geht zyklisch in vier sequenziellen Reaktionen vonstatten. Die Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, MCAD (EC 1.3.99.3), ist eine von mehreren analogen Acyl-CoA-Dehydrogenasen, die den jeweils initialen Schritt im Zyklus der β -Oxidation ausführen (siehe Abbildung 1).

Das tetramere, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-abhängige Enzym katalysiert die Dehydrogenierung von Acyl-CoA-Estern mit sechs bis zwölf Kohlenstoffatomen, wobei bei der Substratspezifität Überlappungen mit anderen Acyl-CoA Dehydrogenasen, der Short-Chain und (Very) Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, SCAD und (V)LCAD, bestehen. Die größte Affinität zeigt die MCAD zu Octanoyl-CoA (Kolvraa, Gregersen et al. 1982).

Neben diesem Schritt sind weitere Enzyme in der Verwertung von Fettsäuren involviert, bei denen ebenso Defekte bekannt sind (z.B. Defekte der Carnitin-Palmitoyltransferasen CPT I und II oder der Defekt der Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase, LCHAD). Der MCADD stellt die bei weitem häufigste Störung dar (Gregersen, Andresen et al. 2001).

Ein Defekt in der β -Oxidation führt in katabolen Stoffwechselsituationen wie längerem Fasten u.a. durch fehlende Ketonkörperbildung und indirekte Störung der Glukose-Bereitstellung zu schweren Ausfallerscheinungen in Gehirn, Leber und Muskeln. Hierbei ähneln sich die Symptome bei den unterschiedlichen Enzymdefekten der Fettsäureverwertung (Gregersen, Andresen et al. 2001).

Die beim MCADD anfallenden C6-C10 Fettsäuren werden teilweise durch die anderen Dehydrogenasen abgebaut. Bei hohem Anfall werden sie teilweise im endoplasmatischen Retikulum durch die Cytochrom P450 vermittelte ω - und (ω -1)-Oxidation zu Dicarbonsäuren abgebaut. Es kommt intramitochondrial zu einer Anhäufung von Intermediärprodukten, die an Carnitin gekoppelt vermehrt ausgeschieden werden. Des weiteren entsteht ein relativer Mangel an freiem Coenzym A, wodurch verschiedene mitochondriale Enzymsysteme gehemmt werden, was u.a. zu einer Drosselung der Gluconeogenese führt.

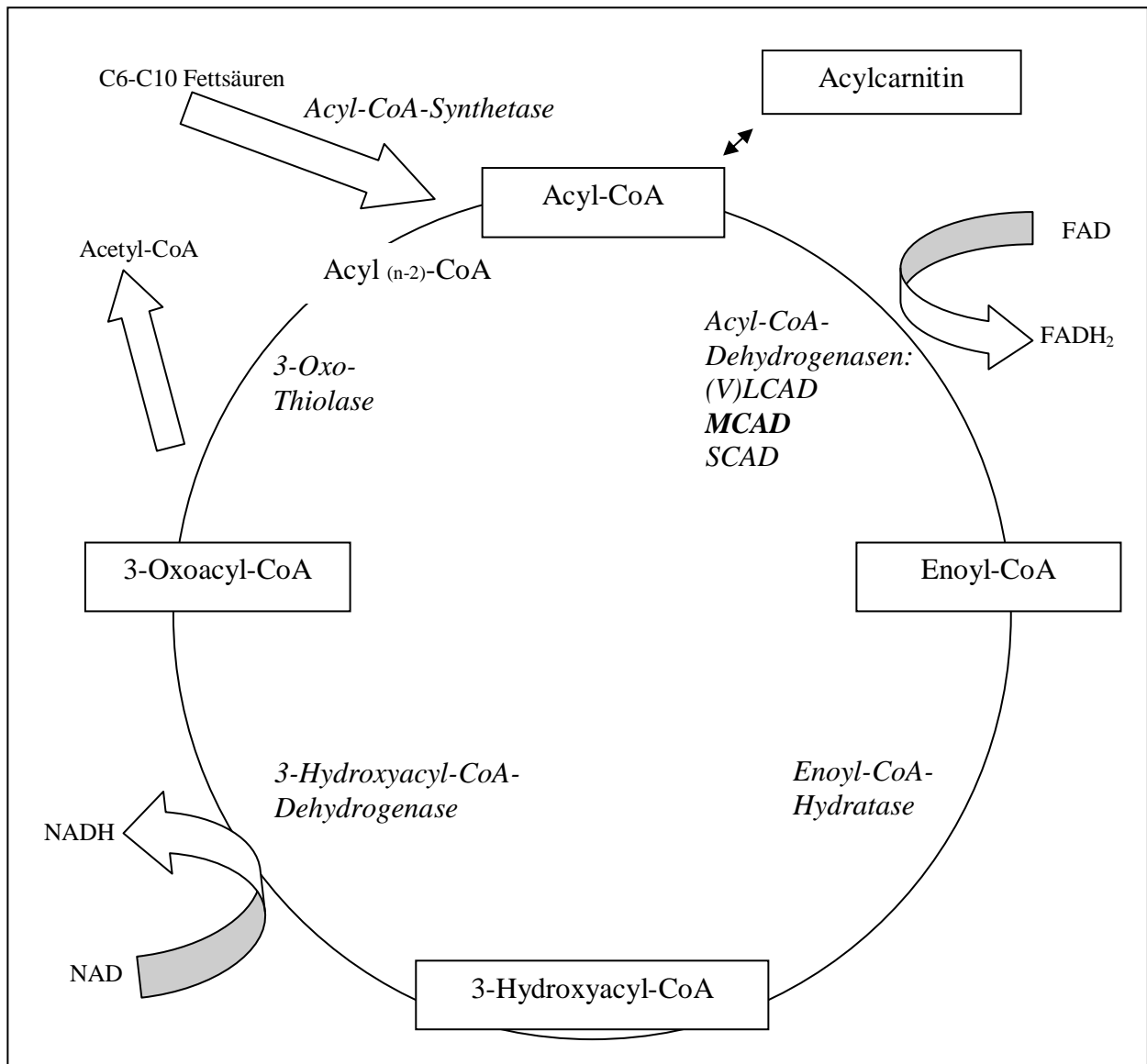


Abbildung 1. Schematischer Aufbau der β -Oxidation von Fettsäuren

Da Fettsäuren chemisch relativ inert sind, werden sie unter Verbrauch von ATP durch die Acyl-CoA-Synthetase in reaktionsfreudigere Thioester mit Coenzym A überführt. Acyl-CoA steht im Gleichgewicht mit dem Carnitinester, der als Transportform durch die Mitochondrienmembran diffundieren kann.

In der ersten von vier sequenziellen Reaktionen, durch die die Kette in C2-Bruchstücke zerlegt wird, wird Acyl-CoA durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase, für C6-C10-Fettsäuren die MCAD, mit dem Reaktionspartner FAD dehydriert; danach lagert die Enoyl-CoA-Hydratase am C3-Atom Wasser an. Die entstehende Hydroxygruppe wird durch die 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase mit NAD zur Oxogruppe dehydriert. Schließlich spaltet die 3-Oxo-Thiolase ohne Energieverlust Acetyl-CoA ab (Karlson 1988).

Abkürzungen: CoA (Coenzym A), FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) und FADH₂ (Flavin-Adenin-Dinukleotid, wasserstoffbeladen), NAD (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) und NADH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, wasserstoffbeladen), (V)LCAD, MCAD, SCAD (Very Long-, Long-, Medium- und Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase) (Karlson 1988). Enzyme sind *kursiv* geschrieben.

1.1.3 Klinische Symptomatik

Die Ausprägung des Phänotyps beim MCADD reicht von völliger Symptombfreiheit bis hin zum plötzlichen Tod (Van Hove, Zhang et al. 1993; Gregersen, Winter et al. 1994; Iafolla, Thompson et al. 1994; Wilcken, Hammond et al. 1994).

Die Patienten präsentieren sich mit episodischen, katabolen Krisen, die durch einen erhöhten Bedarf an Fettsäuren als primäre metabolische Energiequelle charakterisiert sind. Die Krisen werden in der Regel durch banale Infekte und längere Fastenperioden hervorgerufen (Iafolla, Thompson et al. 1994; Shetty, Craver et al. 1999).

Die Erstmanifestation liegt meist in den ersten zwei Lebensjahren, kann jedoch auch im Erwachsenenalter auftreten (Marsden, Sege-Petersen et al. 1992; Touma and Charpentier 1992; Iafolla, Thompson et al. 1994; Wilcken, Hammond et al. 1994; Ruitenbeek, Poels et al. 1995; Boles 1996; Raymond, Bale et al. 1999; Gregersen, Andresen et al. 2001; Feillet, Steinmann et al. 2003).

Die laborchemischen Veränderungen und klinischen Symptome sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1. Laborchemische Veränderungen des MCADD in der katabolen Krise

	Prozentanteil der Patienten
Erhöhung der LDH	100
Fehlende Ketonurie bei Hypoglycämie	97
Erhöhung der Leberenzyme	96
Erhöhung der Harnsäure	88
Hypoglycämie	88
Hyperammonämie	54

Tabelle 2. Klinische Symptome bei Erstmanifestation

	Prozentanteil der Patienten
Bewußtseinsstörungen	90
Vorausgehender Infekt	74
Erbrechen	64
Hepatomegalie	47
Krampfanfälle	39

Quelle: (Touma and Charpentier 1992; Iafolla, Thompson et al. 1994)

Die Letalität bei der Erstmanifestation des undiagnostizierten MCADD liegt zwischen 16 und 25 % (Touma and Charpentier 1992; Iafolla, Thompson et al. 1994; Wilcken, Hammond et al. 1994; Wilson, Champion et al. 1999). Dabei wird die Todesursache oft als Reye Syndrom oder plötzlicher Kindstod fehlgedeutet. In der Obduktion finden sich eine Verfettung von Leber, Herz und Nieren sowie ein Hirnödem (Iafolla, Thompson et al. 1994). 30 – 40 % der überlebenden Patienten tragen dauerhafte neurologische Schäden davon (Iafolla, Thompson et al. 1994; Wilcken, Hammond et al. 1994).

Mittels molekulargenetischer Analyse wurden Individuen mit MCADD charakterisiert, die klinisch keine Symptome zeigten (Gregersen, Winter et al. 1994; Wilcken, Hammond et al. 1994; Korman, Gutman et al. 2004). Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise „milde“ Mutationen existieren und/oder die Gen-Umwelt-Interaktion eine wichtige Rolle bezüglich Penetranz und klinischer Expression spielt.

1.1.4 Biochemische Diagnostik

Der MCADD kann in der metabolischen Krise klinisch vermutet und laborchemisch verifiziert werden.

Die Acylcarnitine im Vollblut bzw. Plasma, deren Bestimmung die sensitivste Methode zur Diagnose eines MCADD ist, zeigen eine Erhöhung von C6-C10-Spezies mit dem führenden Metabolit C8 (Octanoylcarnitin). Bei Carnitindepletion und bei Kindern, die älter als 10 Tage sind, kann die Erhöhung weniger ausgeprägt sein (Clayton, Doig et al. 1998; Carpenter, Wiley et al. 2001). Bei den organischen Säuren im Urin finden sich während einer katabolen Krise in der Regel keine Ketonkörper, jedoch eine Erhöhung von C6- bis C10-kettigen Glyzin-Konjugaten und Dicarboxylsäuren (Catzefflis, Bachmann et al. 1990; Touma and Charpentier 1992).

Da ein Hungerversuch zur Diagnosestellung mit erheblichen Risiken behaftet ist, gilt er heute als obsolet. In unklaren Fällen kann der orale Phenylpropionsäure-Belastungstest eingesetzt werden. Er basiert auf der Tatsache, dass der Gesunde die „Phenyl-markierte“ Fettsäure zu Benzoat abbaut und nach Verknüpfung mit Glyzin als Hippursäure eliminiert. Der beim MCADD nicht mögliche Abbau findet im Nachweis von 3-Phenylpropionylglyzin seinen Niederschlag (Touma and Charpentier 1992). Ein positives Testergebnis kann einen MCADD bestätigen, ein negatives ihn allerdings nicht sicher ausschließen (Zschocke, Schulze et al. 2001).

In Leukozyten oder Fibroblastenkulturen lässt sich die Enzymaktivität der MCAD bestimmen, die bei Patienten unter 20 % liegt (Zschocke, Schulze et al. 2001).

Der Acylcarnitinstatus im Vollblut eignet sich hervorragend für eine Neugeborenen-Screening-Untersuchung, die für MCADD eine hohe Spezifität aufweist (Chace, Hillman et al. 1997). Auch post mortem ist eine Diagnosestellung möglich (Rinaldo, Yoon et al. 1999; Chace, Kalas et al. 2003).

Zur Konfirmation eines MCADD ist eine genetische Analyse durch Sequenzierung des *ACADM*-Genes sinnvoll. Diese lässt sich auch pränatal (Rinaldo, Studinski et al. 2001) und post mortem (Bennett, Rinaldo et al. 1991; Rinaldo, Yoon et al. 1999) durchführen.

1.1.5 Genetik

Als autosomal rezessive Krankheit tritt der MCADD gehäuft bei Kindern konsanguiner Eltern auf. Häufig wird in der Familiengeschichte über verstorbene Geschwisterkinder berichtet (Catzeflis, Bachmann et al. 1990; Korman, Gutman et al. 2004), da für Geschwister ein Risiko von 25 % besteht, ebenfalls an MCADD zu leiden.

Dem MCADD zugrunde liegt in 63 - 80 % der Fälle (s.u.) eine homozygote Punktmutation im *ACADM*-Gen auf Chromosom 1 (1p13). Die Veränderung von Adenin zu Guanin im Exon 11 an Position 985 führt zu dem Aminosäureaustausch Lysin zu Glutamat. Diese Hauptmutation 985A→G findet sich vor allem in der nordeuropäischen Bevölkerung und deren Nachkommen in den USA, was - neben den Analyseergebnissen von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen - auf einen starken Gründereffekt hindeutet. So liegt die Homozygotenfrequenz in Nordeuropa bei 1 / 20.000 - 40.000, in Italien dagegen bei lediglich 1 / 444.000 (Gregersen, Winter et al. 1993).

Das *ACADM*-Gen besitzt 12 Exons. In Exon 3 liegt ein weitere häufige Mutation, 199T→C, die einen Austausch von Tyrosin zu Histidin bewirkt (Andresen, Dobrowolski et al. 2001). Die Restaktivität des Enzyms weist bei dieser Mutation höhere Werte auf als bei Vorliegen der Hauptmutation (Zschocke, Schulze et al. 2001). Außerdem wurde diese Mutation bisher nur bei Kindern im Neugeborenen-Screening (NGS) und nicht bei klinisch diagnostizierten Patienten identifiziert.

Dies führte zu einer Einteilung des MCADD in eine „klassische“ (985A→G homozygot) und eine „milde“ Form (199T→C / 985A→G), wobei jedoch nach derzeitigem Wissensstand keine sicheren Aussagen bezüglich des klinischen Langzeitverlaufs möglich sind. Bisher wurden über 40 unterschiedliche Mutationen beschrieben (Andresen, Jensen et al. 1994;

Brackett, Sims et al. 1994; Albers, Levy et al. 2001; Andresen, Dobrowolski et al. 2001; Bozkurt, Ozturk et al. 2001; Gregersen, Andresen et al. 2001; Korman, Gutman et al. 2004; Maier, Liebl et al. 2005) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=ACADM>, 24.05.06).

1.1.6 Therapie

Obwohl es bisher an klinischen Studien, die ein optimales Therapieregime für Patienten mit β -Oxidationsstörungen aufzeigen, mangelt (Solis and Singh 2002), ist allgemein akzeptiert, dass allein durch die Vermeidung von katabolen Krisen ein sehr günstiger klinischer Verlauf erzielt werden kann. Dazu gehören eine regelmäßige Nahrungsaufnahme mit maximalen Pausen von 8 bis 12 h und eine hohe Kohlenhydratzufuhr, ggf. als intravenöse Glucosegabe, während kataboler Episoden, wie im Falle von verlängerten Fastenperioden, fieberhaften Infekten oder gastrointestinalen Störungen mit Durchfall und Erbrechen (Wilson, Champion et al. 1999). Die Carnitinsubstitution wird kontrovers diskutiert. Bei sekundärem Carnitinmangel erscheint eine Gabe in niedriger Dosierung sinnvoll. Symptomatische Stoffwechselkrisen werden mit sofortiger Glucoseinfusion behandelt (z.B. Empfehlungen Roe auf www.fodsupport.org, 07.08.2005, (Knerr 2005)).

Da sich nach Diagnosestellung durch diese einfache Therapie die Letalität erheblich absenken läßt (Iafolla, Thompson et al. 1994; Wilcken, Hammond et al. 1994; Wilson, Champion et al. 1999; Nennstiel-Ratzel, Arenz et al. 2005), wurde schon früh vorgeschlagen, die Erkrankung in erweiterte Neugeborenen-Screening-Programme aufzunehmen (Chace, Hillman et al. 1997; Wilson, Champion et al. 1999).

1.2 Neugeborenen-Screening

Nicht alle Krankheiten eignen sich für ein NGS. Grundbedingung für ein effektives Screening ist u.a. die Möglichkeit, die Krankheit mit hinreichender Sicherheit zu erkennen und die Diagnose sichern sowie die Patienten einer wirksamen Therapie zuführen zu können. Gleichzeitig muss die vorwiegend gesunde Bevölkerung möglichst wenig irritiert werden. So ist die Zahl Falsch Positiver Proben gering zu halten. Erkrankungen mit ungenügenden Kenntnissen bezüglich Therapie und Prognose sollten nur im Rahmen von gezielten Studien in Programme aufgenommen werden. Schließlich muss die Analytik und die sich anschließende Betreuung betroffener Individuen mit vertretbarem finanziellen Aufwand erfolgen können.

Das NGS erstreckte sich daher in vielen westlichen Ländern über Jahrzehnte in der Regel auf wenige Krankheiten (z.B. Phenylketonurie, Galaktosämie, Hypothyreose).

Die Einführung der Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) in den neunziger Jahren zur quantitativen Bestimmung von Metaboliten-Profilen (Acylcarnitine und Aminosäuren) aus getrockneten Blutstropfen eröffnete die Möglichkeit zu einer Erweiterung des Screeningumfangs, unter anderem auf Defekte der Fettsäureoxidation (Chace, Hillman et al. 1997; Clayton, Doig et al. 1998; Liebl 2001; Roscher, Fingerhut et al. 2001; Chace, Kalas et al. 2003; Roschinger, Olgemoller et al. 2003; Maier, Liebl et al. 2005). So können in einem Arbeitsgang mehr als 20 angeborene Stoffwechselerkrankungen mit einer kumulativen Inzidenz von 1 / 2.700 bis 1 / 6.396 detektiert werden (Roschinger, Olgemoller et al. 2003; Wilcken, Wiley et al. 2003).

Der MCADD eignet sich aufgrund der (1) einfachen Therapie, der (2) möglichen schwerwiegenden Folgen bei fehlender oder verzögerter Diagnosestellung, der (3) einfachen und sicheren Erkennbarkeit mittels Acylcarnitinmessung und der (4) hohen Prävalenz in Nordeuropa besonders gut zur Frühuntersuchung (Iafolla, Thompson et al. 1994; Chace, Hillman et al. 1997).

1.2.1 Neugeborenen-Screening in Bayern

1999 wurde in Bayern ein erweitertes Neugeborenen-Screening eingeführt. In München und Erlangen wurden klinische Zentren zur weiterführenden Diagnostik und Nachbetreuung von Neugeborenen eingerichtet. Ein weiteres Ziel war es, die auf unter 80 % gesunkenen Teilnahmeraten wieder zu heben und so eine möglichst vollständige Erfassung aller Neugeborenen zu erreichen. Dazu wird die Anzahl der gescreenten Kinder mit der Anzahl der gemeldeten Geburten abgeglichen und fehlenden Befunden nachgegangen („demographisches Tracking“). Durch dieses Vorgehen wurde in den Jahren 1999 und 2000 eine Teilnahmerate von über 98 % aller Neugeborenen in Bayern erreicht (Liebl, Nennstiel-Ratzel et al. 2002). Teilnahmevoraussetzung ist eine schriftliche Einwilligung eines Elternteiles (Liebl, Fingerhut et al. 2000; Liebl, Nennstiel-Ratzel et al. 2002).

Bei kontrollbedürftigen Befunden wird eine weitere Testkarte für ein Zweitscreening angefordert. Bei Bestätigung des Krankheitsverdachtes werden die Eltern an eines der Stoffwechselzentren verwiesen (Liebl 2001).

1.2.2 Ungeklärte Fragen im Neugeborenen-Screening

1.2.2.1 Klinisch asymptotische und biochemisch milde MCADD-Varianten

Mit der Erweiterung des NGS ergeben sich neue Fragestellungen, die nicht nur den MCADD betreffen. So zeigte die hochsensitive MS/MS-Technologie, dass die Heterogenität von monogenetischen Erkrankungen wie die Citrullinämie, der VLCADD, die Isovalerialacidämie oder der 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase-Mangel in der Bevölkerung breiter ist als bisher angenommen (Haberle, Pauli et al. 2003; Spiekerkoetter, Sun et al. 2003; Ensenaer, Vockley et al. 2004; Stadler, Polanetz et al. 2006). So werden auch Neugeborene mit milden oder möglicherweise asymptotischen klinischen Phänotypen biochemisch erfasst, wobei nicht auszuschließen ist, hierdurch gesunde Individuen zu stigmatisieren.

Die *ACADM*-Genotypen der prospektiv durch das MS/MS-basierte NGS entdeckten Individuen differieren von denen der Patienten, die klinisch diagnostiziert wurden (Ziadeh, Hoffman et al. 1995; Andresen, Dobrowolski et al. 2001; Maier, Liebl et al. 2005). Während 80 % der Patienten, die durch klinische Symptome auffielen, homozygot für die Hauptmutation 985A→G sind und bei weiteren 18 % diese Mutation auf einem Allel gefunden wird (Yokota, Coates et al. 1991), ist die Prävalenz dieser Mutation bei Kindern, die im NGS detektiert werden, geringer. Hier zeigen nur 63 % bzw. 47 % eine Homozygotie für 985A→G (Andresen, Dobrowolski et al. 2001; Maier, Liebl et al. 2005). Der homozygote Genotyp mit 985A→G könnte somit eine höhere Anfälligkeit für eine metabolische Dekompensation aufweisen und somit als Hochrisiko-Genotyp angesehen werden (Zlotogora 2003).

Die aus NGS-Daten ermittelte Prävalenz des MCADD ist deutlich höher, als auf dem Boden der Homozygotenfrequenz für 985A→G zu erwarten war (Andresen, Dobrowolski et al. 2001; Maier, Liebl et al. 2005). Dafür fanden sich im NGS bis dahin unbekannte Allelvarianten, u.a. die häufige Mutation 199T→C. Da compound heterozygote Individuen mit dem Genotyp 199T→C / 985A→G einen milderen biochemischen Phänotyp aufweisen (Maier, Liebl et al. 2005), sind im Acylcarnitinprofil Überlappungen mit dem von einfach heterozygoten, gesunden Neugeborenen zu erwarten, die ebenfalls mild pathologische Muster zeigen können (Lehotay, LePage et al. 2004). Nach dem derzeitigen Wissensstand ist nicht vorhersehbar, welche Genotypen bzw. biochemischen Phänotypen innerhalb der sich im NGS abbildenden Heterogenität klinisch auffällig werden bzw. asymptotisch bleiben.

1.2.2.2 Falsch Negative und Falsch Positive Proben im MCADD-Screening

Ebenso unklar ist die Zahl der Individuen mit unterschiedlichen *ACADM*-Genotypen, welche durch die im NGS verwendeten diagnostischen Richtlinien nicht erkannt werden. Da manche von diesen Individuen vermutlich niemals Symptome entwickeln, ist die Rate der Falsch Negativen im NGS nahezu unmöglich durch Beobachtungsstudien zu bestimmen (Dezateux 2003). Da bisher Daten fehlen, die die Sensitivität des MCADD-Screenings validieren, muss mit der Einführung der MS/MS-Technik nach Methoden gesucht werden, die Informationen zu Detektionsraten und diagnostischer Sensitivität liefern, ohne auf retrospektiv diagnostizierte Patienten mit potenziell ungünstigem klinischen Verlauf angewiesen zu sein. Ebenso fehlt bisher eine detaillierte genetische Charakterisierung von Neugeborenen, die (1) grenzwertig auffällige Acylcarnitine zeigten oder die (2) im Erstscreening mit MCADD-typischen Acylcarnitinen auffielen, welche sich im Kontrollscreening jedoch normalisierten. In diesen Gruppen können sich sowohl Falsch Positive (und somit gesunde Individuen) finden als auch MCADD-Carrier (und somit ebenso gesunde Individuen) oder betroffene MCADD-Patienten mit mildem biochemischen Phänotyp.

1.3 Zielsetzungen der vorliegenden retrospektiven Studie

Um sich diesen ungeklärten Fragen (1.2.2) im Neugeborenen-Screening (NGS) zu nähern, wurden in der vorliegenden Arbeit vorrangig Individuen aus dem bayerischen NGS untersucht, deren biochemischer Phänotyp grenzwertig pathologisch war, aber die Kriterien für einen kontrollbedürftigen MCADD-Verdacht nicht erfüllte.

Ziel der Studie war es, die Qualität des NGS zu verbessern. Dies sollte durch eine Optimierung der Auswertungskriterien erfolgen, die eine höhere Trennschärfe bei grenzwertig auffälligen Screeningbefunden erlauben. MCADD-Patienten sollen also sicher diagnostiziert und zugleich Gesunde und insbesondere gesunde Anlageträger nicht als Falsch Positiv erkannt und deren Familien beunruhigt werden.

Grundlage der Arbeit bildeten 470.247 Kinder, die in den Jahren 1999 – 2002 in Bayern gescreent worden waren. 139 Neugeborene hatten kontrollbedürftig hohe Acylcarnitinwerte gezeigt: Bei 58 bestätigte sich der Verdacht auf MCADD, während die übrigen 81 als Falsch Positiv einzustufen waren. Bei 938 Kindern fanden sich MCADD-ähnliche Acylcarnitinmuster („Borderline-MCADD“). 333 von diesen Proben sowie 69 der 81 Falsch Positiven Proben sollten anonymisiert retrospektiv genetisch charakterisiert werden mittels

einer Untersuchung auf die beiden häufigsten Mutationen, 199T→C und 985A→G. Diese Varianten stellen 71 % der mutierten Allele dar (Maier, Liebl et al. 2005). Als Kontrollen dienten 333 Proben mit normalen Acylcarnitinwerten, die bezüglich Geburtsgewicht und Alter bei Probeabnahme gematcht worden waren.

Die erhobenen Analysenergebnisse sollten die Grundlage bilden, eine Korrelation zwischen identifizierten Mutationen (Genotyp) und der jeweiligen Höhe gemessener Acylcarnitin-Konzentrationen (biochemischer Phänotyp) herzustellen. Insbesondere der Nachweis erhöhter Carrier-Frequenzen im Borderline-MCADD-Kollektiv würde eine postulierte Genotyp-Phänotyp-Korrelation nachdrücklich unterstützen. Ergänzend sollte eine Altersabhängigkeit der Acylcarnitin-Konzentrationen bei gesunden Individuen und MCADD-Patienten mit unterschiedlichen Genotypen beschrieben und heterozygote Erwachsene, Kinder und Säuglinge verglichen werden, um mögliche diagnostische Fehlerquellen zu minimieren.

Schließlich sollten mithilfe der erhobenen Daten die bisherigen Screeningkriterien neu bewertet werden mit einer präzisen Definition von Grenzwerten sowie der Anzahl und Kombination biochemischer Marker. Die Anwendung der Auswertungskriterien, die die höchste Trennschärfe erlauben, sollte dazu führen, einzelne Proben als potenziell Falsch Negativ zu detektieren. So ließe sich durch Sequenzierung des kompletten *ACADM*-Gens dieser einzelnen Individuen die schwierig zu bestimmende Rate der Falsch Negativen Proben abschätzen.

2 Material

2.1 Studienkonzeption und Auswahl der Proben

Es wurde retrospektiv der Genotyp von Proben mit milden, MCADD-ähnlichen Acylcarnitinmustern aus dem NGS bestimmt. Hierbei wurde die Untersuchung auf die zwei häufigsten Mutationen, 985A→G und 199T→C, beschränkt, die 71% der veränderten Allele darstellen. Zur Verfügung standen über 400.000 anonymisierte Filterpapierkärtchen mit getrockneten Blutstropfen aus dem NGS aus den Jahren 1999-2002. Die Probenentnahme erfolgte im Median 67 h postnatal, die Lagerung bis zur Probenaufbereitung und PCR unterschritt 3 Jahre.

In Abbildung 2 sind die einzelnen analysierten Untergruppen dargestellt, die im folgenden detailliert beschrieben werden.

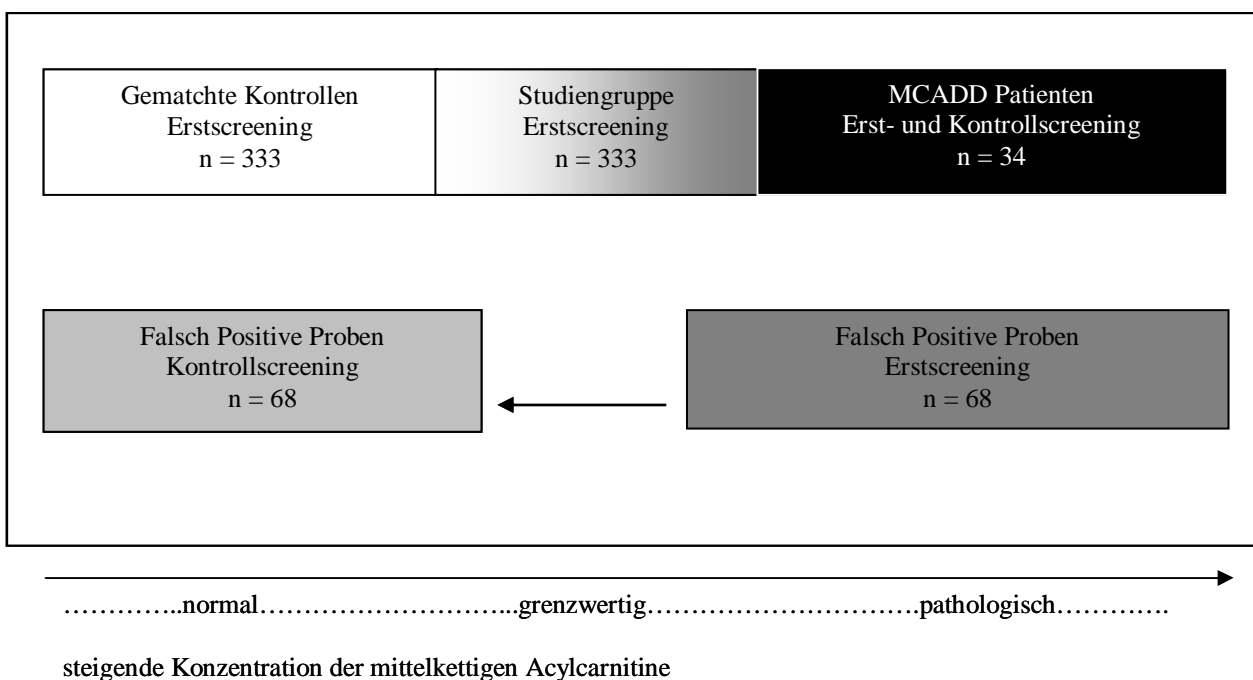


Abbildung 2: Studienaufbau

Darstellung der untersuchten Subgruppen in Bezug auf die Höhe der gemessenen Konzentrationen der mittelkettigen Acylcarnitine: Gematchte Kontrollen (n = 333) und Studiengruppe (n = 333) basieren auf der Erstscreening-Untersuchung; MCADD-Patienten, nur Genotyp 985A→G / 985A→G und 985A→G / 199T→C (n = 34) und Falsch Positive Proben (n = 68) basieren auf der Erstscreening- und der confirmatorischen Kontrollscreening-Untersuchung.

2.1.1 MCADD-Patienten

Unter den Bedingungen einer prospektiven Beobachtungsstudie wurden im Zeitraum Januar 1999 bis Dezember 2002 470.247 Kinder in Bayern gescreent. Die Ergebnisse des Erstscreenings wurden mit einem multiparametrischen Bewertungssystem interpretiert, das einen primären (C8-Konzentration) mit sekundären Markern (C6, C10, C10:1 und Ratios C8 / C6, C8 / C10, C8 / C12) kombiniert.

Als kontrollbedürftig galten für einen MCADD-Verdacht folgende Kriterien:

Eine Erhöhung der Konzentration von C8, sowie eine Erhöhung von mindestens drei der weiteren Parameter C6, C10, C10:1, C8 / C6, C8 / C10, C8 / C12 (genaue Beschreibung in (Maier, Liebl et al. 2005)).

Die Grenzen der einzelnen Marker werden durch Analyse der Acylcarnitine einer Referenzpopulation von über 10.000 Neugeborenen entsprechend dem Mittelwert + 4 Standardabweichungen in regelmäßigen Abständen festgelegt. Für wissenschaftliche Zwecke wurden die 99.5 Perzentilen aus den Gesamtdaten des NGS berechnet, die in etwa diesen Grenzen entsprechen.

Im Rahmen des Erstscreenings bestand bei 139 Neugeborenen ein MCADD-Verdacht, der sich in der Kontrolluntersuchung bei 58 Neugeborenen bestätigte. Bei 57 Patienten konnte die Verdachtsdiagnose durch Nachweis einer Mutation auf beiden Allelen mittels Sequenzierung des *ACADM*-Genes konfirmiert werden. In einem Fall fand sich nur eine Mutation in heterozygotem Zustand, wobei der Patient den biochemischen Phänotyp eines MCADD aufwies. Dies ergab einen positiv prädiktiven Wert der Erstuntersuchung von 42 %.

Von den 58 im NGS entdeckten Kindern verstarben zwei: Eines wies eine Koinzidenz mit einem adrenogenitalen Syndrom mit Salzverlust auf und verstarb während einer Salzverlust- oder metabolischen Krise. Das andere verstarb während einer leichten Gastroenteritis. Bis 2005 war lediglich eine weitere ernsthafte Stoffwechselkrise bei einem Patienten aufgetreten (Nennstiel-Ratzel, Arenz et al. 2005).

Die Tabelle 3 zeigt die Anzahl aller durch das NGS in den Jahren 1999 bis einschließlich 2002 diagnostizierten MCADD-Patienten in Bayern.

Tabelle 3. MCADD-Patienten des Neugeborenen-Screenings in Bayern 1999-2002

	Anzahl
gescreente Kinder, gesamt	470.247
MCADD Patienten, gesamt	58
MCADD, Genotyp 985A→G / 985A→G	24
MCADD, Genotyp 985A→G / 199T→C	7
MCADD, Genotyp 985A→G / a.M.	13
MCADD, Genotyp 199T→C / a.M.	3
MCADD, Genotyp a.M. / a.M.	10
MCADD, Genotyp 985A→G / nicht nachweisbar	1

a.M.: andere identifizierte Mutationen, nicht 985A→G oder 199T→C

60 % der Allele von MCADD-Patienten wiesen die Mutation 985A→G auf, 9 % 199T→C. Durch die Suche nach lediglich diesen beiden Mutationen lassen sich 53 % der Patienten genetisch confirmieren.

45 Patienten waren kaukasischer Abstammung, wovon nur einer keine der beiden Mutationen aufwies. 80 % der Allele dieser Patienten zeigten eine der Mutationen 985A→G oder 199T→C. Eine genauere Analyse der Herkunft der 10 Patienten mit anderen Mutationen auf beiden Allelen, vor allem 742A→G und 799G→A, zeigte, dass sie größtenteils türkischer Abstammung waren (siehe auch (Maier, Liebl et al. 2005)).

Nur die Daten mittels Sequenzierung genetisch confirmierter MCADD-Patienten wurden zur Berechnung der Heterozygotenhäufigkeiten und zum Vergleich von Acylcarnitinstufen herangezogen. Für die Analyse der korrespondierenden Acylcarnitinprofile der genotypisierten Individuen wurden lediglich Werte der Genotypen 985A→G / 985A→G und 985A→G / 199T→C (n = 31) verwendet, zusätzlich Daten von 3 nicht aus Bayern stammenden Neugeborenen mit Genotyp 985A→G / 199T→C (n gesamt = 34).

2.1.2 Studiengruppe

Es handelte sich bei den Proben der Studiengruppe um Kärtchen von Neugeborenen, die im Rahmen des NGS erhöhte Acylcarnitinwerte zeigten. C6, C8, C10 und C10:1 lagen gleichzeitig auf oder über der jeweils retrospektiv bestimmten 95. Perzentile einer

Neugeborenenpopulation des Jahres 1999 ($n = 136.700$). Bekannte MCADD-Patienten waren ausgeschlossen. Die absoluten Werte der 95. Perzentile waren für C6 $0,61 \mu\text{mol/l}$, für C8 $0,23 \mu\text{mol/l}$, für C10 $0,12 \mu\text{mol/l}$ und für C10:1 $0,13 \mu\text{mol/l}$.

Da die Screening-Richtlinien eine Anonymisierung und Vernichtung der Kärtchen nach einem bestimmten Zeitraum erfordern, wurden aus 938 Fällen der Jahre 1999 bis 2002, die den Kriterien der Studiengruppe entsprachen, 376 vorhandene Kärtchen ausgewählt. Davon waren 43 Fälle aufgrund der Unmöglichkeit, DNA zu extrahieren oder einen passenden Matching-Partner zu finden, nicht verwertbar. So konnten schließlich 333 Kärtchen zur Analyse herangezogen werden.

2.1.3 Gematchte Kontrollgruppe

Für die Kontrollgruppe wurden Filterpapierkärtchen aus dem Jahr 2002 verwendet. Die Proben der Kontrollgruppe umfasste nur Neugeborene, deren Acylcarnitinwerte nicht den Kriterien der Testgruppe entsprachen und die nicht als MCADD-Patienten bekannt waren.

Als Matching-Kriterium wurde zum einen das Geburtsgewicht gewählt, da Frühgeborene erhöhte Acylcarnitine aufweisen können, zum anderen das Alter bei Probenentnahme, da sich Acylcarnitinmuster nach der Geburt über die Zeit verändern (Meyburg, Schulze et al. 2001; Pourfarzam, Morris et al. 2001; Lehotay, LePage et al. 2004). Das Geschlecht als Kriterium wurde ausgeschlossen, da der MCADD bei beiden Geschlechtern gleich häufig auftritt und sich die Acylcarnitinmuster nicht signifikant unterscheiden (Pollitt and Leonard 1998). Tabelle 4 zeigt Mittelwerte, Standardabweichungen und die maximalen Werte der Differenz als Maß für die Qualität des Matching.

Tabelle 4. Qualitätskriterien des Matching der Kontrollgruppe

	Gewichtsdifferenz	Differenz des Alters bei Probenentnahme
Mittelwert \pm Standardabweichung	$2,7 \text{ g} \pm 49,4 \text{ g}$	$0,3 \text{ h} \pm 1,8 \text{ h}$

Bei 10 Kindern lag die Differenz des Alters bei Probenentnahme aufgrund sehr später Abnahmezeitpunkte über 12 h (Maximum 33 h), bei 6 Kindern die Gewichtsdifferenz aufgrund sehr hoher oder niedriger Geburtsgewichte und damit verbundener Unmöglichkeit, einen genau passenden Matchingpartner zu finden über 300 g (Maximum 410 g).

2.1.4 Falsch Positive Proben im Neugeborenen-Screening für MCADD

Als Falsch Positive MCADD-Proben wurden diejenigen Fälle angesehen, die im Erstscreening des NGS MCADD-Kriterien erfüllten (siehe Einleitung), im Zweitscreening jedoch normale Werte zeigten. Zur Analyse des Genotyps an Position 199 und 985 wurden anonymisiert Erst- oder Zweitscreeningkarten verwendet.

Von 81 Falsch Positiven Proben von 1999 bis 2002 konnte von 68 DNA gewonnen und untersucht werden.

2.1.5 Nachsequenzierte Proben

Aufgrund der Zwischenergebnisse der Studie (siehe Kap. Ergebnisse, ALT3.2.3.2ALT) wurden bei 9 Proben alle MCAD kodierenden Exons nachsequenziert. Die Kriterien hierfür waren Zugehörigkeit zur Testgruppe und / oder zur Gruppe der Falsch Positiven Proben und im Erstscreening sowohl ein C8-Wert von über 1,4 $\mu\text{mol/l}$ als auch eine C8 / C12-Ratio von über 7.

2.1.6 Heterozygote Eltern und Geschwister von MCADD-Patienten

Im Rahmen der halbjährlichen Kontrolluntersuchungen bei MCADD-Patienten konnte von 25 heterozygoten Eltern und 7 heterozygoten Geschwistern mit deren Einverständnis Blut zur Messung der Acylcarnitine und zur Genotypisierung erhalten werden.

2.2 Daten des Neugeborenen-Screenings in Bayern: Ermittelte MCADD-Prävalenz und Allelfrequenzen der Mutationen 985A→G und 199T→C

Die MCADD-Häufigkeit in Bayern (alle Genotypen) beläuft sich auf 1 / 8.108 mit einem 95 % - Konfidenzintervall von 1 / 6.277 – 1 / 10.684.

Tabelle 5 zeigt die aus den Daten des Neugeborenen-Screenings berechneten Häufigkeiten für MCADD-Genotypen mit den Mutationen 985A→G und / oder 199T→C.

Tabelle 5. Frequenz der MCADD-Genotypen im NGS Bayern

MCADD Genotyp	Frequenz	Konfidenzintervall
985A→G / 985A→G	1 / 19.594	1 / 13.169 – 1 / 30.582
985A→G / 199T→C	1 / 67.178	1 / 32.604 – 1 / 167.068
985A→G / wt	1 / 70 *	1 / 57 – 1 / 87
199T→C / wt	1 / 480 *	1 / 233 – 1 / 1.193

* nach Hardy-Weinberg-Gesetz berechnete Häufigkeit
wt: Wildtyp

Berechnet man mit diesen Daten die erwartete Anzahl Heterozygoter, ergibt sich für eine Gesamtzahl gescreenter Kinder von 470.247 in den Jahren 1999 bis 2002 für die Mutation 985A→G eine Anzahl von 6.718, für 199T→C von 980.

Den im NGS beobachteten und errechneten Heterozygotenhäufigkeiten (Tabelle 5) wurden in Tabelle 6 die in der Literatur beschriebenen Frequenzen zum Vergleich gegenübergestellt.

Tabelle 6. Heterozygotenfrequenzen der Mutationen 985A→G und 199T→C in der Literatur

Heterozygotenfrequenz	untersuchte Region	Literaturstelle
985A→G		
1 / 84	USA (Pennsylvania, Ohio, New Jersey, Illinois, Florida, North Carolina)	(Andresen, Dobrowolski et al. 2001)
1 / 52	Großbritannien (West Midlands)	(Seddon, Green et al. 1995)
1 / 83	Großbritannien (Trent)	
1 / 70	Deutschland (Bayern)	(Maier, Liebl et al. 2005)
1 / 68	Kanada, Nova Scotia	(Ung 1992; Blois, Riddell et al. 2005)
1 / 120	Neuengland (Massachusetts, Maine, New Hampshire, Vermont, Rhode Island)	(Zytkovicz, Fitzgerald et al. 2001)
199T→C		
1 / 500	USA (Pennsylvania, Ohio, New Jersey, Illinois, Florida, North Carolina)	(Andresen, Dobrowolski et al. 2001)
1 / 627	Deutschland (Bayern)	(Maier, Liebl et al. 2005)

3 Methoden

3.1 Acylcarnitinmessung im Blut mittels ESI-Tandemmassenspektrometrie

Die Messung der Acylcarnitine im Rahmen der Screeninguntersuchung wurde aus getrockneten Blutstropfen auf Filterpapierkarten (Abbildung 3) von dem Labor Becker und Olgemöller, München, auf Triple Quadropole Massenspektrometern durchgeführt (API 365, API 3000, PE-SCIEX, Toronto, Kanada).

<p>Möglichst alle Kreise vollständig mit Blut füllen. Filterpapier nicht anfassen! Blutproben gut lufttrocknen lassen.</p>	Kostenträger <input type="checkbox"/> Selbstzahler <input type="checkbox"/> Krankenkasse Name <input type="checkbox"/> Einsender	Kassennummer	<p>0103</p>	LABOR Becker, Olgemöller & Kollegen
	Neugeborenes Nachname Vorname	Mutter Nachname Vorname		
	Geburtsdatum	Geburtszeit Uhr	Adresse	
	Probenentnahmedatum	Probenentnahmezeit Uhr	PLZ, Ort	
	Probenahme erfolgte innerhalb der ersten 36 Stunden nach der Geburt; ein Zweitscreening wurde veranlasst: <input type="checkbox"/> ja		Telefonnummer der Mutter mit Vorwahl	
	Geburtsgewicht bzw. Gewicht bei Kontrolle g	Geschlecht <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> W	Mehrling <input type="checkbox"/> ja	Besonderes (z. B. positive Familienanamnese, Nummer der Erstscreeningkarte etc.):
Nationalität (Angabe freiwillig) <input type="checkbox"/> D oder	Datenübermittlung an ÖGD abgelehnt: <input type="checkbox"/>			BY83016 - 103

<p>Absender (wenn kein Barcode vorhanden):</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p style="text-align: center;">LABOR</p> <p style="text-align: center;">Neugeborenen-Screening Becker, Olgemöller & Kollegen Fachärzte für Laboratoriumsmedizin Ottobrunner Str. 6 · Postfach 800 749 81607 München</p> <p style="text-align: right; font-size: small;"> DGK P-0027-98-00 </p> </div> <p style="margin-top: 10px;">Neugeborenen-Screening LABOR Telefon 089/544 654-0 Service-Telefon des ÖGD 089/315 60 204</p>	<p>Leitfaden zur Blutentnahme (Kapillar- oder Venenblut, kein EDTA-Blut!):</p> <ul style="list-style-type: none"> Zur Durchblutungssteigerung Fuß evtl. 5 min. in ein feuchtes 40 - 42°C warmes Tuch einwickeln. Fersenhaut desinfizieren, sorgfältig trocknen. Ferse zwischen Daumen und Zeigefinger fixieren, Mittel-, Ring- und Kleinfinger über den Fußrücken legen. Einstich am inneren oder äußeren Fersenrand, Einstichtiefe 2,4 mm (bei Frühgeborenen 1,9 mm) nicht überschreiten (Sicherheitslanzetten, Verletzungsgefahr des Fersenbeinknochens). Ersten Blutstropfen abwischen, danach die Kreise auf dem Filterpapier (nur!) von einer Seite her vollständig durchtränken, so daß sie auch auf der Rückseite vollständig ausgefüllt sind. Blutstropfen 2 - 4 Stunden bei Raumtemperatur eintrocknen lassen. Am gleichen Tag abschieken. Karten nicht über mehrere Tage sammeln! Diese Probenkarte ist Eigentum des Labors. 	
--	--	--

Abbildung 3. Vorder- und Rückseite der Probenkärtchen des Neugeborenen-Screenings Die Kreise auf dem Streifen Filterpapier am Rand sollten ganz mit Blut durchtränkt sein, das bei Raumtemperatur getrocknet wird. Aus den getrockneten Blutstropfen werden die Proben ausgestant.

Bei der Massenspektrometrie werden geladene Teilchen, die zuerst in einem Vakuum durch ein elektrisches Feld beschleunigt werden, in einem Magnetfeld verschieden stark abgelenkt. Die Ablenkung ist proportional zum Verhältnis Masse/Ladung (m/z) (Fingerhut, Roschinger et al. 2001; Roscher, Fingerhut et al. 2001).

Freies Carnitin, Acylcarnitine und Aminosäuren können im gleichen Arbeitsgang aus der Filterpapierkarte extrahiert und gemessen werden.

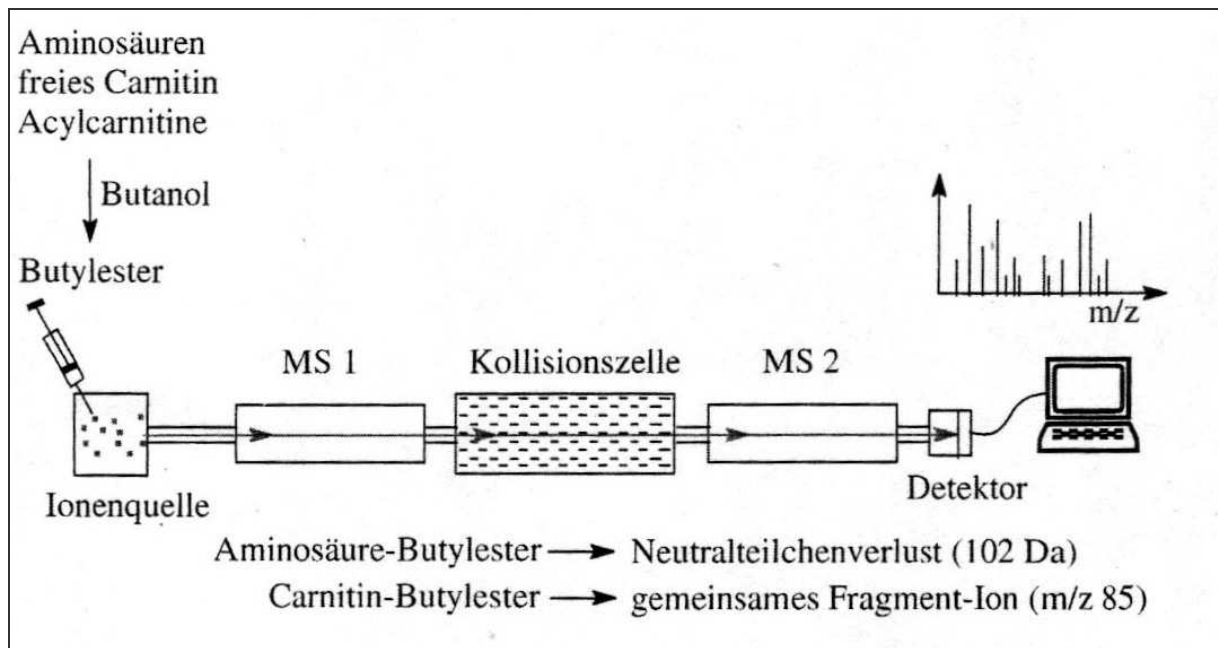


Abbildung 4. Prinzip der Tandemmassenspektrometrie {Roscher, 2001 #69}

Die zu analysierenden Moleküle (Aminosäuren, Acylcarnitine) werden als Butylester gelöst eingespritzt, in der Ionenquelle ionisiert und im Massenspektrometer 1 (MS 1) selektiert, um dann in der Kollisionszelle fragmentiert zu werden. Im Massenspektrometer 2 (MS 2) werden lediglich vorab definierte Fragmente analysiert und mithilfe des angeschlossenen Detektors quantifiziert.

3.2 Identifikation der *ACADM*-Mutationen 985A→G und 199T→C

3.2.1 DNA-Präparation aus getrockneten Blutstropfen

Der allgemeine Arbeitsgang der DNA-Präparation umfaßt die Reinigung und Proteinabtrennung des Materials durch NaCl / Na-EDTA-Lösung, den Zellaufschluss durch NaOH-Base und die anschließende Neutralisierung durch Trisma-Base.

3.2.1.1 Reinigung und Proteinabtrennung

Nach Zugabe von 1 ml 10 mM NaCl / 10 mM EDTA-Lösung (NaCl; EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III): Carl Roth GmbH+Co., 76185 Karlsruhe, Deutschland) zu jeweils 3 mit Blut durchtränkten ausgestanzten Spots von einem Durchmesser von 2 mm wurden die Proben 20 min bei 23 - 30 °C auf einem Schüttler (Eppendorf Thermomixer comfort: 22339 Hamburg, Deutschland, www.eppendorf.com) bei 800 rpm gewaschen. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde der Waschvorgang wiederholt.

Zur Entfernung von Flüssigkeitsresten und Hämoglobinpigmenten wurden die Proben 1 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417C) und der Überstand abpipettiert.

3.2.1.2 DNA-Extraktion

Zu den gewaschenen Spots wurde 150 µl 50 mM NaOH-Lösung (Riedel-de-Haen, RdH Laborchemikalien GmbH+Co., 30926 Seelze, Deutschland) gegeben, hierauf die Proben bei 99 °C 10 min lang im Schüttler bei 650 rpm gekocht. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 30 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5) (Trisma-Base: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim, Deutschland; Salzsäure: Riedel-de-Haen) neutralisiert und mit 20 µl sterilem Wasser (Ampuwa®) auf ein Endvolumen von 200 µl gebracht. Die Lagerung der präparierten DNA erfolgte bei 4 °C.

3.2.1.3 Photometrische Messung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration war eine Verdünnung von 1 : 6 bis 1 : 10 nötig (10 µl DNA-Lösung und 50 µl, bzw. 90 µl steriles Wasser). Am UV-Spectrophotometer (Ultrospec 3000, Harvard Apparatus GmbH, 79232 March-Hugstetten, Deutschland, www.harvardapparatus.com) wurde die Extinktion, die der optischen Dichte (OD) entspricht, bei 260 nm bestimmt. Die DNA-Konzentration lag zwischen 90 und 110 ng/µl.

3.2.2 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient zur Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte. Sie kann mit Hilfe spezifischer Primer und einer Polymerase in wenigen Stunden durchgeführt werden.

Für die Vervielfältigung genomischer DNA wurde ein optimiertes kommerziell angebotenes Hot Start PCR-Kit verwendet, das bereits Nukleotide, Puffer mit $MgCl_2$, Tris-Cl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$ und die Taq-Polymerase enthält. Für Exon 3 und 11 des *ACADM*-Gens wurde jeweils eine PCR angesetzt. Die Reaktionen wurden primär nach Angaben des Herstellers des HotStarTaq-MasterMix Kit angesetzt (QIAGEN, 40724 Hilden, Deutschland, www.qiagen.com; im Kit enthalten: steriles Wasser; Master Mix mit HotStarTaq DNA Polymerase, PCR-Puffer mit 3 mM $MgCl_2$, Tris-Cl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, je 400 μM dATP, dTTP, dGTP, dCTP).

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration von $MgCl_2$ (Roche, 4070 Basel, Schweiz, www.roche.com) und DNA wurden Verdünnungsreihen durchgeführt (Abbildung 5).

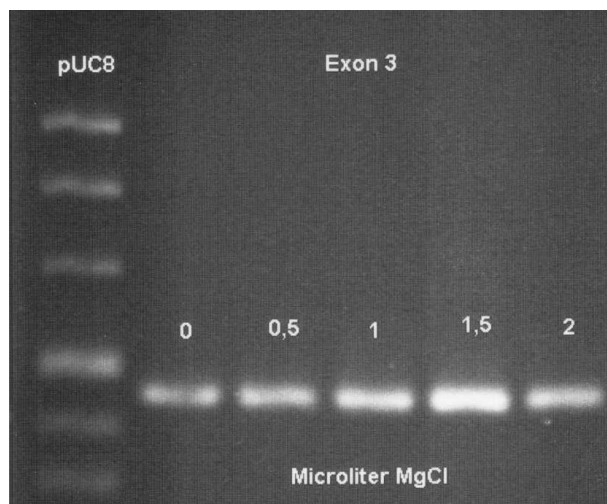


Abbildung 5. Optimierung der Magnesiumchlorid-Konzentration im Probenansatz der PCR des Exon 3. Bei einer Verdünnungsreihe mit verschiedenen Konzentrationen von $MgCl_2$ ist zu sehen, dass bei Zugabe von 1,5 μl 25 mM $MgCl_2$ (37,5 pmol) die DNA optimal amplifiziert wird.

3.2.2.1 PCR für Exon 3 (199T→C)

Zur Amplifizierung von Exon 3, das die mögliche Mutation 199T→C enthält, wurden als Primer Oligonukleotide verwendet, die in den flankierenden Introns binden. Der Sense Primer („3F“) weist die Sequenz 5'-GTCTGAGTTTCTGATAATCAAGG-3', der Antisense Primer („4R“) die Sequenz 5'-CTTACTCATATGCATTCCAG-3' auf (Primer „3F“: Länge 23 bp, MWG Biotech, 85560 Ebersberg, Deutschland, www.mwg-biotech.com; entwickelt von: Dr. N. Krone, Dr. von Haunersches Kinderspital; Primer „4R“: Länge 20 bp, MWG Biotech; entwickelt von: LGL, Dr. U. Busch, C. Holzapfel, I. Schneider). Das entstehende Fragment hat vor Verdau eine Länge von 447 Basenpaaren.

In einem Ansatz für ein Endvolumen von 24 µl fanden sich:

1 µl	10 pmol	10 µM-Lösung	Primer
2 µl	ca. 180 ng		DNA
1,5 µl	37,5 pmol	25 mM-Lösung	MgCl ₂
7 µl			steriles Wasser
12,5 µl			HotStarKit

Für das Programm des Thermocyclers (Primus 96plus, MWG Biotech, 85560 Ebersberg, Deutschland, www.mwg-biotech.com) wurden zunächst die Empfehlungen des Herstellers des Hot Start PCR-Kits verwendet. Dann wurden die Zeiten für Denaturierung, Anlagerung und Synthese soweit wie möglich minimiert.

Das Programm für den PCR-Cycler wies folgende Merkmale auf:

15 min 95 °C initiale Aktivierung der Hot Start Polymerase (vorgegeben durch den Hersteller)

35 Zyklen zu je:

15 sec 94 °C Hitzedenaturierung

30 sec 50 °C Anlagerung

30 sec 72 °C Amplifikation

5 min 72 °C finale Polymerisation (vorgegeben durch den Hersteller)

3.2.2.2 PCR für Exon 11 (985A→G)

Für die Detektion der Mutation 985A→G ist es erforderlich, durch eine PCR-basierte Mutagenese eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym einzufügen. Im Sense Primer („11F mut“) 5'-ATATCATTTATGCTGGCTGAAATGGCCATG-3' wurde an der Stelle 981 die Base A durch C ausgetauscht. Durch diesen Austausch entsteht bei Vorliegen einer Punktmutation A→G an der Position 985 eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Nco I*.

Der Antisense Primer bindet im angrenzenden Intron und hat die Sequenz 5'-GGCTCACAGCCATATATGACAG-3' (Primer „11F mut“: Länge 30 bp, Fa. metabion, 82152 Martinsried, Deutschland; Beschreibung: {Yokota, 1990 #56}. Primer „11 R“: Länge 22 bp, MWG Biotech; entwickelt von: Dr. N. Krone). Das entstehende PCR-Fragment ist vor Verdau 371 Basenpaare lang.

Der PCR-Ansatz für ein Endvolumen von 24 µl wurde gemäß den Herstellerangaben des Hot Start PCR-Kits entwickelt:

1 µl	10 pmol	10 µM-Lösung	Primer
2 µl	ca. 90 ng		DNA
8,5 µl			steriles Wasser
12,5 µl			HotStarKit

Bei der Etablierung des Cyclor-Programms zeigte sich, dass 40 Zyklen erforderlich waren, um ein verwendbares PCR-Produkt zu erhalten.

Die Zeiten waren wie folgt:

15 min 95 °C initiale Aktivierung der Hot Start Polymerase (vorgegeben durch den Hersteller)

40 Zyklen zu je:

15 sec 94 °C Hitzedenaturierung

15 sec 55 °C Anlagerung

15 sec 72 °C Amplifikation

5 min 72 °C finale Polymerisation (vorgegeben durch den Hersteller)

3.2.3 Restriktionsverdau

Bakterielle Restriktions-Endonukleasen erkennen eine meist palindromische Nukleotidsequenz der DNA und spalten die DNA innerhalb dieser.

Alle Ansätze wurden bei 37 °C im Brutraum über Nacht (ca. 15 h) inkubiert.

3.2.3.1 Verdau des amplifizierten Exon 3

Die Mutation 199T→C bildet mit den angrenzenden Nukleotiden eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *NlaIII* (Restriktionsnuklease aus *Neisseria lactamica*, Schnittstelle CATG!, 10 000 U/ml, New England Biolabs; 65926 Frankfurt a.M., Deutschland, www.neb.com). Nach Verdau bilden sich bei Vorliegen der Mutation zwei Fragmente mit den Längen von 207 und 240 Basenpaaren.

Ansatz gemäß den angegebenen Bedingungen des Enzymherstellers:

16,8	μl	PCR-Produkt
2	μl	Reaktionspuffer NEB 4 (NEB 4, 10 x Konzentrat; enthält 5 mM Kaliumazetat, 2 mM Tris-Azetat, 1 mM Magnesiumazetat, 0,1 mM Dithiothreitol, pH 7,9 bei 25 °C, New England Biolabs)
0,2	μl	BSA (0,2 μg; 100 x Konzentrat, 10 mg/ml, New England Biolabs)
1	μl	<i>NlaIII</i> (10 U)

3.2.3.2 Verdau des amplifizierten Exon 11

Durch Einfügen einer Mutation mittels des einen PCR-Primers entsteht mit dem Basenaustausch 985A→G eine Schnittstelle für *NcoI* (Restriktionsnuklease aus *Nocardia corallina*, Schnittstelle C!CATGG, 10 000 U/ml, New England Biolabs). Bei Vorhandensein der Mutation weisen die geschnittenen zwei Fragmente eine Länge von 26 und 345 Basenpaaren auf.

Verdau-Ansatz nach Herstellerangaben:

17	μl	PCR-Produkt
2	μl	Reaktionspuffer NEB 4 (New England Biolabs)
1	μl	<i>NcoI</i> (10 U)

3.2.4 Gelelektrophorese und Visualisierung

Zur Auftrennung und Größenbestimmung der generierten DNA-Fragmente wurde das Produkt des Restriktionsverdau mit Elektrophoreseauftragspuffer (1 mg/ml Bromphenolblau, 0,5 Glycerin, 0,5 Aqua dest) versetzt und auf 2 % Agarosegel aufgetragen (1,2 g Agarose,

peqGOLD Universal Agarose, peQLab Biotechnologie, 91052 Erlangen, Deutschland, www.peqlab.de; auf 60 ml TBE-Puffer, bestehend aus 89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA). Als Größenmarker wurde pUC Mix Marker 8 (0,5 mg DNA/ml, Fermentas GmbH, 68789 St. Leon-Rot, Deutschland, www.fermentas.com; enthält 17 verschieden lange DNA-Fragmente mit Längen von 19 bis 1116 Basenpaaren) verwendet. Anschließend erfolgte die Elektrophorese bei 100 Volt, 90 Minuten für Exon 11 und 50 Minuten für Exon 3 (BIORAD PowerPac 300 mit BIORAD Sub-Cell GT, Wide Mini-Sub-Cell GT, 80939 München, Deutschland, www.bio-rad.com). In der Folge wurde das Gel nach 30 bis 60 min Färbung in einem Ethidiumbromid-Bad unter UV-Licht betrachtet und photographiert (Abbildung 6).

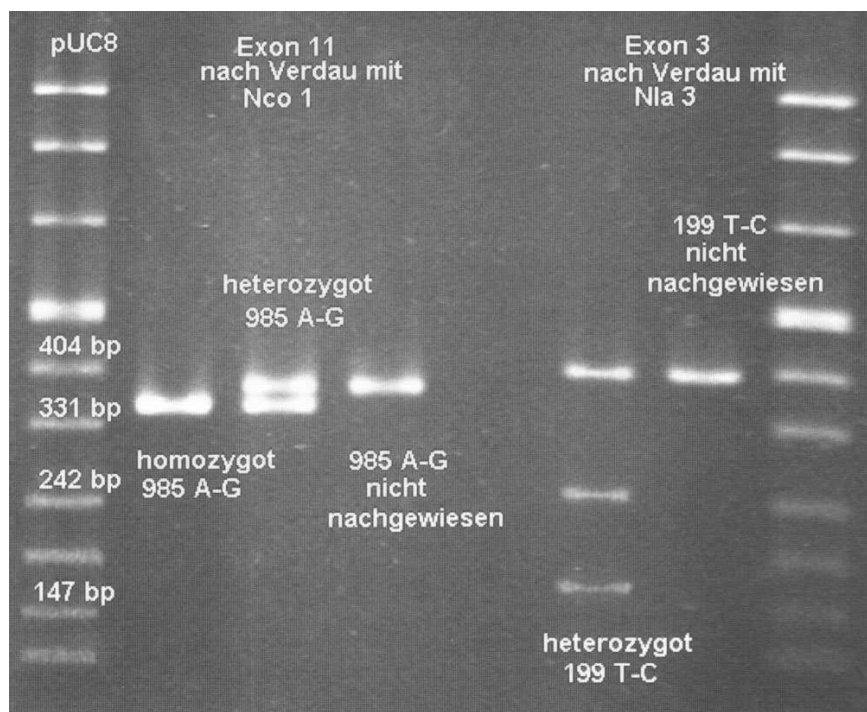


Abbildung 6. PCR Produkte (Exon 3 und Exon 11) nach Restriktionsverdau

3.2.5 Validierung der Methodik

Zur Kontrolle der gesamten Methodik wurde sowohl bereits isolierte und sequenzierte DNA von MCADD-Patienten des Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit verwendet, als auch DNA aus Filterpapierkärtchen von MCADD-Patienten mit bekannten Mutationen.

3.3 Identifikation von *ACADM*-Mutationen in allen kodierenden Exons durch Sequenzierung des *MCADD*-Gens

Für die Sequenzierung wurde eine Cycle-Sequencing-Reaktion durchgeführt. Dabei dienen PCR-Produkte als Matrize. Die farbstoffmarkierten Sequenzierprimer werden an das ihnen komplementäre Stück am 5'-Ende der Kette angelagert. Die im verwendeten Basenreagenz enthaltenen Didesoxyribonukleotide werden nach dem Zufallsprinzip in das entstehende Produkt miteingebaut und führen so zu einem Kettenabbruch an statistisch allen Positionen im Produkt (Kettenabbruchmethode nach (Sanger 1992)). Es entstehen hierdurch unterschiedlich lange Fragmente. Die Auswertung erfolgt über eine hochauflösende Gelelektrophorese.

Die im Gerät enthaltene Software ermöglichte es, die Sequenz jeder einzelnen Probe prozessiert und in farbmarkierten Kurven angezeigt auszuwerten.

Die verwendeten Primer waren so gewählt, dass durch Bindung im Intron die kompletten Exons, Exon-Intron-Übergänge und schmale Exon-flankierende Stücke der Introns amplifiziert wurden. Für die PCR wurde das HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) verwendet. Bei der Amplifikation von Exon 1, 3, 8 und 12 war ein Zusatz von $MgCl_2$ notwendig.

Nach Aufreinigung mittels dem QIAGEN Purification Kit (Qiagen) wurden die PCR-Produkte mittels bidirektionaler direkter Cycle-Sequenzierung mit einem BigDye Terminator Sequencing Kit (BigDye Terminator Sequencing Standard, Applied Biosystems, 64331 Weiterstadt, Deutschland) und dem ABI 310 Kapillar-DNA-Sequenzer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) analysiert. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer waren dieselben wie die der PCR. Die PCR-Cycling-Bedingungen und Primer-Sequenzen sind in (Maier, Liebl et al. 2005) beschrieben. Die Sequenzierung wurde vom Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit durchgeführt.

3.4 Datenverarbeitende Methoden

3.4.1 Berechnung der erwarteten Heterozygotenhäufigkeit und der Konfidenzintervalle

3.4.1.1 Heterozygotenhäufigkeit 985A→G

Basierend auf der Rate der im NGS entdeckten 985A→G homozygoten Individuen wurde gemäß des Hardy-Weinberg-Gesetzes die erwartete Rate der Heterozygoten wie folgt berechnet.

Unter der Annahme, dass p die Allelfrequenz des gesunden, q die des erkrankten Genes bedeutet, ergibt sich die Genotyphäufigkeit durch die Formel:

$$p^2 + 2pq + q^2 = (p+q)^2 = 1$$

p^2 ist die Rate der Homozygoten für das gesunde Gen (wt / wt an Position 985)

q^2 ist die Rate der Homozygoten für das erkrankte Gen (Homozygote 985A→G)

Die Häufigkeit der Heterozygoten ist hier $2pq$.

Da das Ereignis q^2 sehr selten ist, läßt sich p gleich 1 setzen und somit ist $2pq$ gleich $2q$.

Homozygotenhäufigkeit	$1 / q$
Genhäufigkeit = Allelfrequenz	$1 / \sqrt{q}$
Heterozygotie	$2 / \sqrt{q}$

3.4.1.2 Heterozygotenhäufigkeit 199T→C

Aus der berechneten Allelfrequenz für 985A→G läßt sich mit Kenntnis der Rate der compound heterozygoten 199T→C / 985A→G Individuen unter der Annahme von Panmixie sowie vollständiger Erfassung aller compound heterozygoten MCADD-Patienten, die erwartete Allelfrequenz für 199T→C bestimmen.

Ansatz der Berechnung: $2pq = t / N$

t / N	Rate der Compound Heterozygoten	p	Allelfrequenz von 985A→G
t	Anzahl aller Compound Heterozygoten	q	Allelfrequenz von 199T→C
N	Anzahl gescreenter Neugeborener	$2q$	Heterozygotenhäufigkeit für 199T→C / wt

3.4.1.3 Berechnung der 95 % Konfidenzintervalle für die erhobenen Häufigkeiten

Da bei einer Ereignisanzahl von unter 100 die Normalverteilung nicht mehr angewandt werden kann, wurde zur Berechnung der 95 % Konfidenzintervalle die nicht symmetrische Poisson-Verteilung herangezogen. Hierzu wurden die berechneten Häufigkeiten je nach Zahl der Ereignisse mit einem Faktor multipliziert, der Standardtabellen für die Poisson-Verteilung entnommen werden kann.

Zur Bestimmung der Konfidenzintervalle der Heterozygotenhäufigkeiten wurden die oberen und unteren Grenzwerte des 95 % Konfidenzintervalls der Homozygotenrate in die unter 3.4.1.1 und 3.4.1.2 angegebenen Formeln jeweils eingesetzt.

3.4.2 Deskriptive Statistik und Signifikanzberechnung

Die deskriptive Statistik (Mittelwerte, Standardabweichungen, Median, Modalwerte und Perzentilen) wurde in dem Datenverarbeitungsprogramm SPSS berechnet. Zur Auffindung von signifikanten Unterschieden zwischen der beobachteten und erwarteten Heterozygotenhäufigkeit wurde der Chi-Quadratstest angewandt, zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen den Mittelwerten der einzelnen Genotyp-Gruppen der Mann-Whitney U-Test, da keine Normalverteilung vorlag.

3.4.3 Receiver operated characteristics (ROC), Box- und Scatterplots

Zur Bestimmung der Parameter, die die einzelnen Genotyp-Gruppen im NGS am besten biochemisch unterscheiden, wurden in SPSS receiver operated characteristics (ROC)-Kurven erstellt. ROC-Kurven sind ein visueller Index für die Genauigkeit, mit der zwei Gruppen durch einen Parameter unterschieden werden können. Je größer die dazugehörige „Fläche unter der Kurve“ (Area under the curve, AUC), desto besser eignet sich der Parameter zur Unterscheidung. Aus der ROC läßt sich für jeden möglichen Wert eines Parameters die dazugehörige Sensitivität und die Rate der Falsch Positiven (1-Spezifität) ablesen.

Alle Box- und Scatterplots wurden in SPSS erstellt.

3.4.4 Vier-Felder-Tafel zur Berechnung der technischen Performance des Neugeborenen-Screenings

Mit Vier-Felder-Tafeln lassen sich die Sensitivität, Spezifität, der positiv prädiktive Wert, der negativ prädiktive Wert und weitere Merkmale für die Qualität einer diagnostischen Methode bestimmen.

4 Ergebnisse

4.1 Allelfrequenzen der Mutationen 199T→C und 985A→G

4.1.1 Allelfrequenzen in der Studien- und Kontrollgruppe

Die Anzahl identifizierter Individuen in der Studien- und Kontrollgruppe mit heterozygoten Genotypen für 985A→G und 199T→C wurde mit der aus den Daten des NGS berechneten Anzahl verglichen (Tabelle 7).

Die Heterozygotenhäufigkeiten der Mutation 985A→G in der Studiengruppe und der Kontrollgruppe unterschieden sich signifikant. In beiden Gruppen wurde je ein für 199T→C heterozygotes Individuum gefunden. Homozygote für eine der beiden Mutationen oder compound heterozygote Patienten für 985A→G / 199T→C wurden weder in der Studien- noch in der Kontrollgruppe entdeckt.

Tabelle 7. Genotypen und Heterozygotenhäufigkeiten in Studien- und Kontrollgruppe

Carrier	985A→G	199T→C	Noncarrier für 985A→G 199T→C	gesamt
Studiengruppe				
erwartete Anzahl *	4,76	0,69		
beobachtete Anzahl	77	1	255	333
Kontrollgruppe				
erwartete Anzahl *	4,76	0,69		
beobachtete Anzahl	8	1	324	333

Carrier	Beobachtete Frequenz		Statistische Analyse	
	Studiengruppe	Kontrollgruppe	χ^2 -Wert	p-Wert
985A→G	1/4,3 (1/3,6 – 1/5,4)	1/42 (1/25 – 1/132)	610,511	< 0,001
199T→C	1/333 (1/60 – 1/13.162)	1/333 (1/60 – 1/13.162)	0,000	0,999

* erwartete Anzahl, berechnet aus den Daten des NGS 1999 bis 2002

95% Konfidenzintervalle in Klammern

4.1.2. Abhängigkeit der Allelfrequenzen in der Studiengruppe von der Höhe der Octanoylcarnitin-Konzentration

Zur weiteren Charakterisierung der identifizierten Carrier wurden drei Gruppen mit unterschiedlichen Octanoylcarnitinkonzentrationen gebildet (Gruppe A, B und C) und mit der Kontrollgruppe verglichen.

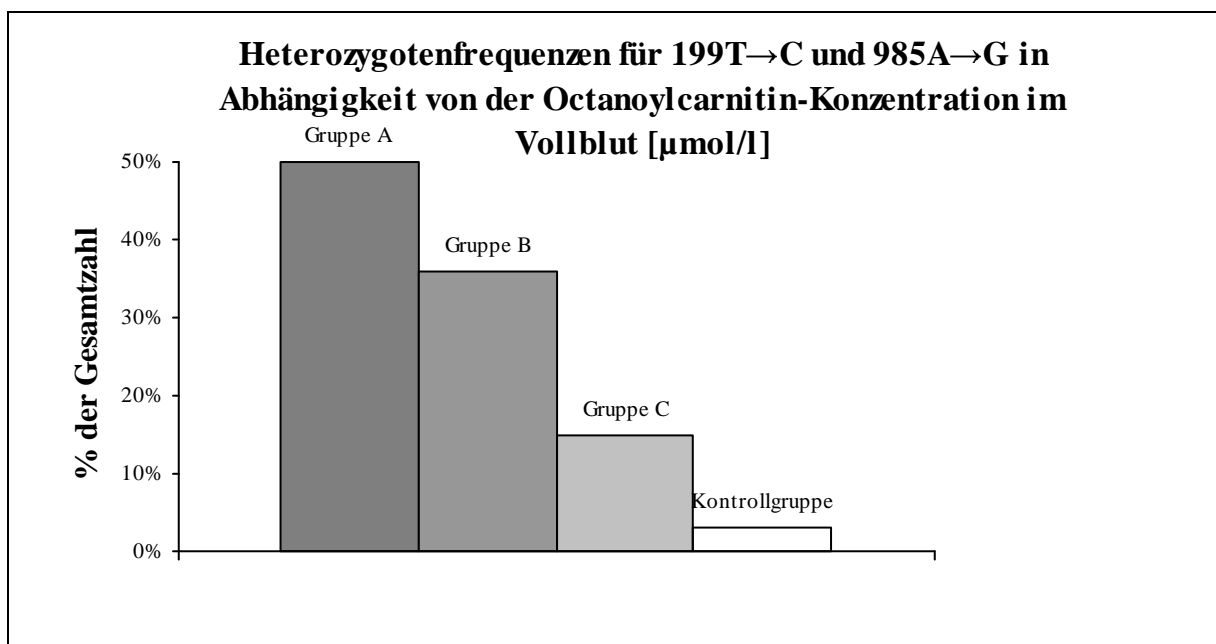
Es zeigte sich, dass mit steigenden C8-Werten im NGS die Rate der Carrier anstieg. Aus Tabelle 8 ist ersichtlich, dass die Hälfte der Individuen mit C8-Werten über 1 $\mu\text{mol/l}$ eine Heterozygotie für die Mutation 985A→G oder 199T→C aufweist. Die Rate der Noncarrier sinkt entsprechend mit zunehmenden C8-Werten.

Tabelle 8. Heterozygotenfrequenzen der Studiengruppe für die Mutationen 985A→G und 199T→C in Abhängigkeit von der Höhe des Octanoylcarnitin-Wertes aus getrockneten Blutstropfen des NGS

Die Studiengruppe wurde anhand von C8-Konzentrationen gestaffelt. Prozentwerte beziehen sich auf die Fallzahl der korrespondierenden Gruppe. Die Balken der Abbildung zeigen die prozentualen Werte der Carrierfrequenz in den einzelnen Gruppen A-C.

C8 ist in $\mu\text{mol/l}$ angegeben.

	Studiengruppe				Kontrollgruppe
	Gruppe A C8 \geq 1,0	Gruppe B 1,0 > C8 > 0,5	Gruppe C 0,5 \geq C8 \geq 0,23	gesamt	
Anzahl Carrier für 985A→G oder 199T→C	11 (50 %)	36 (36 %)	31 (15 %)	78 (23 %)	9 (2,7 %)
Anzahl Noncarrier für 985A→G oder 199T→C	11 (50 %)	64 (64 %)	180 (85 %)	255 (77 %)	324 (97,3 %)
Anzahl gesamt	22	100	211	333	333



4.1.3 Allelfrequenzen in der Gruppe der Falsch Positiven Proben

Zur Evaluation des NGS wurden ebenso alle verfügbaren Kärtchen von als Falsch Positiv klassifizierten Proben auf die beiden Mutationen 985A→G und 199T→C untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9. Heterozygotenfrequenz in der Gruppe der Falsch Positiven Proben

Carrier für	985A→G	199T→C	Noncarrier	gesamt
erwartete Anzahl *	0,97	0,14	nicht bestimmbar	
beobachtete Anzahl	30	3	35	68
beobachtete Häufigkeit	1 / 2,3 (1 / 1,6 – 1 / 3,4)	1 / 23 (1 / 7,8 – 1 / 110)	1 / 1,9	

* erwartete Anzahl, berechnet aus den Daten des NGS 1999 bis 2002

95% Konfidenzintervalle in Klammern

Für beide Mutationen zusammengenommen ergibt sich eine Heterozygotenhäufigkeit unter den Falsch Positiven MCADD-Fällen von 1 / 2,1. Die Carrierfrequenz für beide Mutationen war im Chi Quadrat-Test signifikant unterschiedlich zu der errechneten erwarteten Frequenz (Signifikanzniveau: < 0,001).

Der positiv prädiktive Wert von 49 % drückt die Wahrscheinlichkeit für einen Falsch Positiv klassifizierten Fall aus, heterozygot für eine der beiden untersuchten Mutationen zu sein.

4.2 Unterscheidung einzelner ACADM-Genotypen anhand von Acylcarnitin-Mustern

4.2.1 Normalwerte der Acylcarnitine

Um die Grenzwerte der Acylcarnitine für die Testpopulation festlegen zu können, wurden die Screening-Acylcarnitinwerte von 136.700 Neugeborenen retrospektiv analysiert und die Mittelwerte, Standardabweichungen und Perzentilen berechnet. Hierbei wurden MCADD-Patienten ausgeschlossen. Tabelle 10 zeigt die deskriptive Statistik einschließlich der 95. und der 99,5. Perzentile.

Tabelle 10. Mittelwerte, Standardabweichungen, 95. und 99,5. Perzentilen einer Neugeborenenpopulation ohne MCADD-Patienten (n = 136.700) für alle im NGS gemessenen Parameter; Acylcarnitine in $\mu\text{mol/l}$.

Werte, die als Einschlusskriterien für die Studiengruppe dienen, sind grau unterlegt (95. Perzentile C6, C8, C10 und C10:1).

	C0	C2	C3	C4	C5	C6	C8	C10	C12	C14
Mittelwert	30,01	7,31	2,66	,49	,13	,33	,12	,06	,18	,21
Standardabweichung	11,88	3,13	1,31	,27	,14	,65	,09	,05	,15	,10
95. Perzentile	51,16	12,51	5,00	,94	,27	,61	,23	,12	,40	,37
99,5. Perzentile	75,55	18,95	7,99	1,65	,48	1,10	,39	,21	,87	,55

	C16	C18	C5:1	C10:1	C14:1	C16:1	C18:1	C10:2	C14:2	C18:2	C5-OH
Mittelwert	4,80	1,0	,04	,07	,11	,20	1,06	,04	,04	,15	,15
Standardabweichung	1,85	,35	,05	,06	,08	,10	,35	,04	,07	,10	,10
95. Perzentile	8,10	1,63	,08	,13	,23	,35	1,68	,08	,10	,31	,27
99,5. Perzentile	11,05	2,21	,17	,21	,41	,49	2,26	,16	,19	,55	,46

	C14-OH	C16-OH	C16:1-OH	C18:1-OH	C4dc	C5dc	C6dc	C12dc	C8 / C6	C8 / C10	C8 / C12
Mittelwert	,02	,02	,04	,02	,15	,04	,04	,10	,47	2,69	,89
Standardabweichung	,05	,02	,04	,01	,07	,03	,03	,06	,37	2,44	,76
95. Perzentile	,05	,05	,08	,04	,26	,08	,09	,21	1,00	6,33	1,91
99,5. Perzentile	,10	,08	,14	,06	,38	,12	,15	,32	2,37	15,01	3,80

4.2.2 Acylcarnitin-Konzentrationen der einzelnen ACADM-Genotypen

Zur Analyse der Acylcarnitinprofile wurden 4 Gruppen gemäß des Genotyps und Acylcarnitinmusters gebildet. Die genaue Einteilung ist aus Tabelle 11 ersichtlich.

Tabelle 11. Gruppeneinteilung nach Genotypen und Acylcarnitin-Werten

Gruppe	Genotyp		Anzahl
1a	985A→G / 985A→G	MCADD-Patienten	24
1b	985A→G / 199T→C	MCADD-Patienten	10
2	Carrier für 985A→G oder 199 T→C	erhöhte Acylcarnitinwerte (Studiengruppen-Kriterien)	78
3	Kontrollgruppe: Carrier (n = 9) und Noncarrier (n = 324)	normale Acylcarnitinwerte	333

Die Tabellen 12a und 12b bilden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Acylcarnitine der einzelnen Gruppen ab.

Da die Frage nach einer Unterscheidung einzelner Genotypen aufgrund der Screeningwerte von Interesse ist, wurde für die Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypgruppen die Signifikanz im Mann-Whitney U-Test bestimmt. Hierbei wurde auf folgende Unterschiede fokussiert: Unterschiede zwischen den beiden MCADD-Genotypen (Gruppe 1a und 1b), zwischen den compound heterozygoten MCADD-Fällen und den Heterozygoten mit erhöhten Acylcarnitinen (Gruppe 1b und 2) und zwischen den Carriern und Noncarriern für 985A→G oder 199T→C mit normalem Acylcarnitinprofil (innerhalb Gruppe 3).

Bezüglich der Parameter für das MCADD-Screening differierten Gruppe 1a und 1b, die beiden untersuchten Gruppen von MCADD-Patienten unterschiedlichen Genotyps, signifikant in den Markern C6, C8, C10:1, C8 / C6, C8 / C10 und C8 / C12. MCADD-Patienten milderer biochemischer Phänotyps, Gruppe 1b, wurden von Gruppe 2, den Carriern mit erhöhten Acylcarnitinen im NGS, durch C6, C8, C10:1, C8 / C10 und C8 / C12 signifikant unterschieden und hoch signifikant von der Kontrollgruppe (Gruppe 3) in allen für MCADD indikativen Metaboliten und Ratios.

Innerhalb der Kontrollgruppe war zwar ein Trend zu höheren metabolischen Markern bei Carriern für 985A→G oder 199T→C (Gruppe 3a) im Gegensatz zu Noncarriern sichtbar, jedoch nicht statistisch signifikant. In kurz- und langkettigen Acylcarnitinen unterschieden sich die untersuchten Gruppen nicht.

Tabelle 12a. Acylcarnitinkonzentrationen und MCADD-Ratios der einzelnen *ACADM*-Genotypgruppen

Gruppe	n	Genotyp	C6	C8	C10	C10:1	C8 / C6	C8 / C10	C8 / C12
1a	24	985A→G / 985A→G	2,41 ± 1,85 ¹	11,59 ± 5,71 ¹	0,77 ± 0,46	0,98 ± 0,46 ¹	5,66 ± 2,17 ¹	18,56 ± 11,98 ¹	70,11 ± 31,38 ¹
1b	10	985A→G / 199T→C	1,02 ± 0,50 ²	2,68 ± 1,05 ²	0,90 ± 0,37	0,63 ± 0,33 ²	0,29 ± 0,12	3,56 ± 2,08 ²	17,07 ± 6,25 ²
2	78	Carrier für 985A→G oder 199T→C	0,75 ± 0,24	0,66 ± 0,37	0,67 ± 0,40	0,29 ± 0,12	0,92 ± 0,45	1,12 ± 0,56	2,47 ± 1,65
3	333	Kontrollen: Carrier und Noncarrier	0,09 ± 0,05	0,08 ± 0,04	0,09 ± 0,05	0,18 ± 0,09	1,08 ± 0,70	1,08 ± 0,73	0,80 ± 0,70

Gruppe	C0	C2	C3	C4	C5	C12	C14	C16	C18	C5:1
1a	27,16 ± 11,23	12,48 ± 4,67	2,61 ± 0,94	0,46 ± 0,17	0,18 ± 0,09	0,18 ± 0,09	0,21 ± 0,11	3,88 ± 1,30	1,16 ± 0,51	0,03 ± 0,01
1b	23,48 ± 7,31	15,48 ± 6,09	3,74 ± 2,26	0,46 ± 0,19	0,20 ± 0,12	0,17 ± 0,06	0,28 ± 0,15	4,56 ± 1,66	1,10 ± 0,69	0,03 ± 0,02
2	24,29 ± 12,65	18,85 ± 8,84	3,67 ± 1,49	0,77 ± 0,52	0,26 ± 0,14	0,31 ± 0,15	0,31 ± 0,10	5,38 ± 1,90	1,14 ± 0,43	0,07 ± 0,06
3	26,53 ± 10,56	15,37 ± 7,16	2,92 ± 1,46	0,41 ± 0,32	0,22 ± 0,14	0,14 ± 0,27	0,21 ± 0,14	4,36 ± 1,56	1,08 ± 0,43	0,03 ± 0,02

Gruppe	C14:1	C16:1	C18:1	C10:2	C14:2	C18:2	C4dc	C5dc	C6dc	C12dc
1a	0,10 ± 0,05	0,14 ± 0,06	0,84 ± 0,37	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,03	0,11 ± 0,07	0,13 ± 0,05	0,09 ± 0,06	0,07 ± 0,03 ¹	0,05 ± 0,04
1b	0,13 ± 0,07	0,18 ± 0,08	0,86 ± 0,53	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,04	0,13 ± 0,09	0,17 ± 0,07	0,09 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,02
2	0,19 ± 0,09	0,24 ± 0,0	0,89 ± 0,28	0,04 ± 0,04	0,06 ± 0,05	0,15 ± 0,11	0,21 ± 0,08	0,09 ± 0,04	0,06 ± 0,04	0,05 ± 0,05
3	0,10 ± 0,06	0,16 ± 0,07	0,67 ± 0,24	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,02	0,10 ± 0,08	0,11 ± 0,05	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,08	0,02 ± 0,01

Gruppe	C5-OH	C14-OH	C16-OH	C16:1-OH	C18:1-OH
1a	0,16 ± 0,08	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,01 ± 0,01
1b	0,14 ± 0,05	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,01
2	0,25 ± 0,18	0,03 ± 0,04	0,04 ± 0,05	0,05 ± 0,05	0,03 ± 0,06
3	0,14 ± 0,06	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,01 ± 0,01

Acylcarnitinkonzentrationen in µmol/l (Mittelwert ± Standardabweichung)

1: MCADD Patienten; 2: Carrier mit erhöhtem Acylcarnitinprofil (Studiengruppenkriterien); 3: im NGS unauffällige Kontrollen

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Mann-Whitney U-Test: zwischen Gruppe 1a und 1b (¹) und Gruppe 1b und 2 (²)

Tabelle 12b. Acylcarnitinkonzentrationen der einzelnen *ACADM*-Genotypgruppen: Ratios und abgeleitete Parameter

Acylcarnitinkonzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung).

1: MCADD Patienten; 2: Carrier mit erhöhtem Acylcarnitinprofil (Studiengruppenkriterien); 3: im NGS unauffällige Kontrollen

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Mann-Whitney U-Test: zwischen Gruppe 1a und 1b (¹) und Gruppe 1b und 2 (²)

	n	Genotyp	C6 / C10	C6 / C12	C8 / C10:1	C4 / C8	C8 / C18:1	C10 / C10:1
1a	24	985A→G / 985A→G	4,06 \pm 3,82 ¹	13,41 \pm 8,99 ¹	13,49 \pm 8,74 ¹	0,06 \pm 0,05 ¹	16,25 \pm 13,53 ¹	0,87 \pm 0,68 ¹
1b	10	985A→G / 199T→C	1,44 \pm 1,14	6,28 \pm 2,12 ²	5,48 \pm 4,03 ²	0,18 \pm 0,08 ²	4,79 \pm 5,03 ²	1,88 \pm 1,63 ²
2	78	Carrier für 985A→G oder 199T→C	1,58 \pm 1,18	3,16 \pm 2,60	2,43 \pm 1,20	1,48 \pm 1,16	0,83 \pm 0,58	2,37 \pm 1,11
3	333	Kontrollen: Carrier und Noncarrier	1,17 \pm 0,75	0,86 \pm 0,83	0,55 \pm 0,44	6,58 \pm 6,84	0,13 \pm 0,08	0,62 \pm 0,51

	C6+C8+C10	C8+C10+C12	(C8+C10+C12) / (C3+C4+C5)	(C6+C8+C10) / (C16+C18)
1a	13,61 \pm 6,87 ¹	11,67 \pm 5,86 ¹	3,71 \pm 1,95 ¹	2,82 \pm 1,50 ¹
1b	4,60 \pm 1,70 ²	3,74 \pm 1,31 ²	1,03 \pm 0,57 ²	0,95 \pm 0,60 ²
2	2,09 \pm 0,78	1,64 \pm 0,80	0,40 \pm 0,25	0,36 \pm 0,17
3	0,26 \pm 0,11	0,31 \pm 0,30	0,10 \pm 0,10	0,05 \pm 0,02

Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Acylcarnitine berechnet, jedoch zeigten lediglich die für MCADD indikativen Parameter Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Zur optischen Darstellung dieser Unterschiede wurden für einige Metabolite oder abgeleitete Parameter Boxplots erstellt.

In der Abbildung 7 sind zum Vergleich Boxplots von C8 und C8 / C12 als MCADD-Parameter und zum Vergleich C16:1-OH der einzelnen *ACADM*-Genotypen dargestellt. Die (985A→G / 199T→C) compound heterozygoten Kinder (Gruppe 1b) zeigen in den MCADD-Parametern niedrigere Werte als die homozygoten Individuen für 985A→G (Gruppe 1a), jedoch sind die Werte im Vergleich zur Norm (Gruppe 3) und zu den Carriern für 985A→G oder 199T→C (Gruppe 2) deutlich erhöht.

Aus dem dritten Boxplot (C16:1-OH) wird ersichtlich, dass sich die Unterschiede zwischen den einzelnen *ACADM*-Genotypen auf die mittelkettigen Acylcarnitine beschränken.

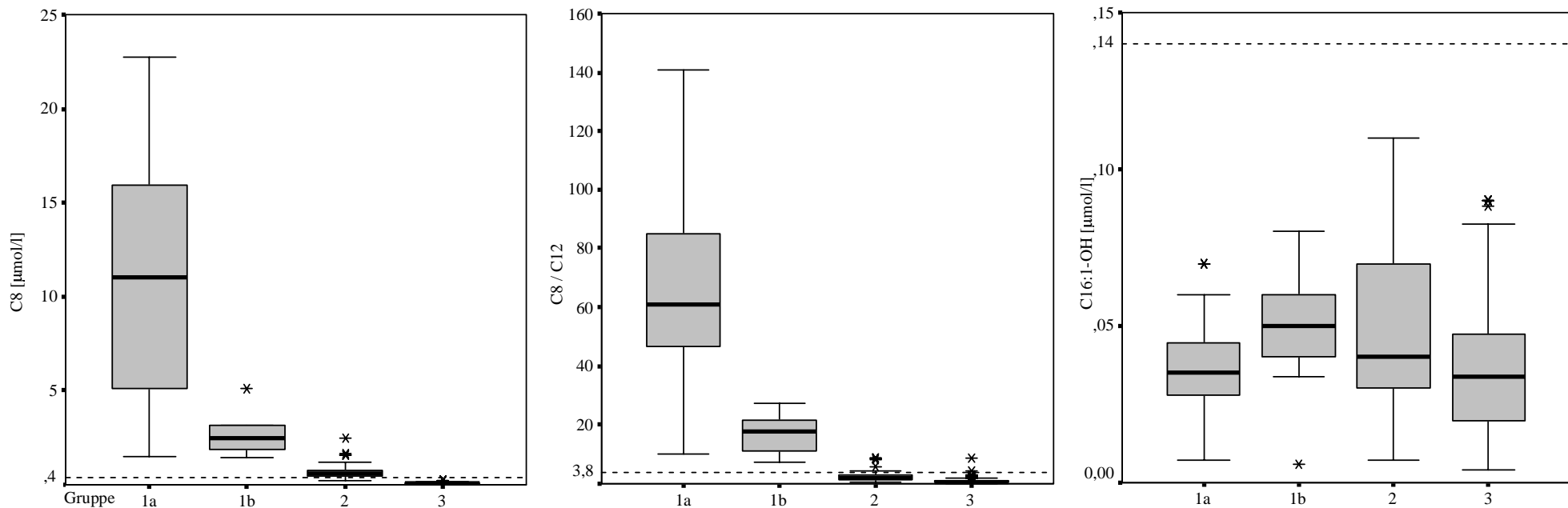


Abbildung 7. Boxplots von NGS-Werten der einzelnen Genotyp-Gruppen: C8 und C8 / C12 als MCADD-Parameter und C16:1-OH zum Vergleich. Gestrichelte Linien zeigen die 99,5. Perzentile, die den cut-off zur Kontrolluntersuchung im NGS darstellt. Zwei Neugeborene zeigten extreme Werte für C16:1-OH (0,35 μmol/l und 0,26 μmol/l, nicht abgebildet).

Gruppen (siehe auch Tabelle 12): 1a MCADD-Patienten (985A→G / 985A→G), n=24

1b MCADD-Patienten (985A→G / 199T→C), n=10

2 Carrier für 985A→G oder 199T→C mit erhöhten Acylcarnitinmustern im NGS, n=78

3 Carrier (n=9) und Noncarrier (n=324) für 985A→G oder 199T→C mit unauffälligen Acylcarnitinmustern im NGS, n=333

4.2.3 Unterscheidung von 985A→G homozygoten, 985A→G / 199T→C compound heterozygoten MCADD-Patienten (Gruppen 1a und 1b) und Carriern mit erhöhten Acylcarnitin-Konzentrationen im Erstscreening (Gruppe 2)

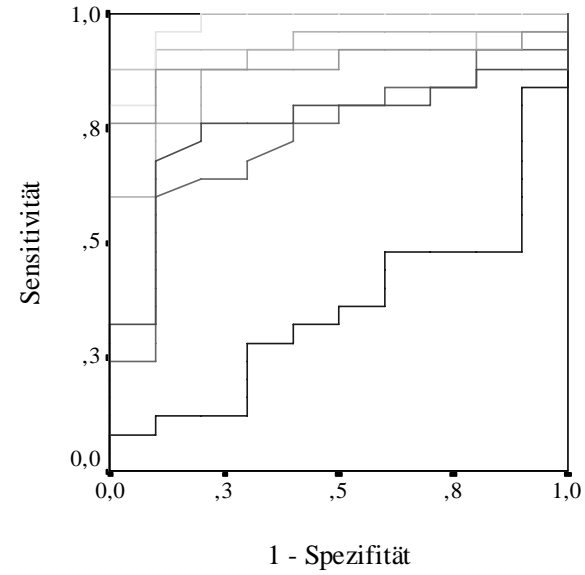
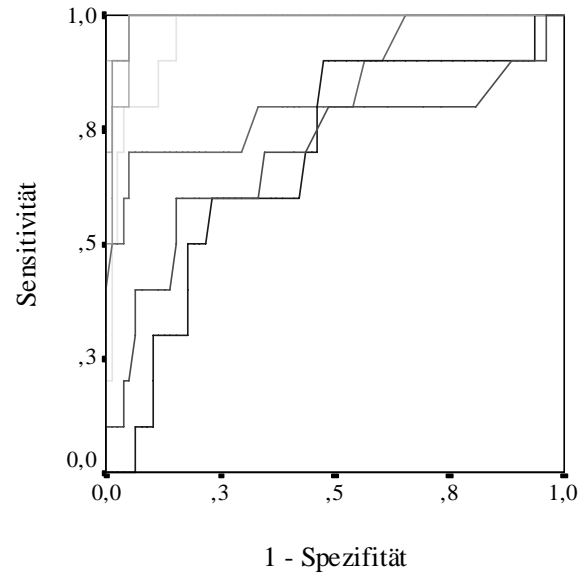
4.2.3.1 Receiver operated characteristics (ROC) und mögliche cut-off-Werte

Zur Identifizierung derjenigen Metabolite und Metabolit-Quotienten, die die beiden MCADD-Genotypgruppen am besten unterscheiden, wurden ROC Kurven errechnet. In Abbildung 8a sind diese Parameter gelistet mit der jeweils dazugehörigen Fläche unter der Kurve („Area under the ROC curve“, AUC). Hieraus lassen sich die am besten unterscheidenden Parameter für 985A→G homozygote und 985A→G / 199T→C compound heterozygote MCADD-Patienten, nämlich die Ratios **C8 / C10** und **C8 / C12** bestimmen.

Wenn auch die Unterscheidung dieser zwei Gruppen kein Ziel des Neugeborenen-Screenings ist, wären mögliche Grenzwerte hierfür einerseits 5 für C8 / C10 und 27 für C8 / C12 mit einer jeweiligen Sensitivität von 96 % und 88 %.

Für ein effektives Screening ist eine vollständige Erfassung aller MCADD Fälle bei einer möglichst geringen Rate an Falsch Positiven Fällen (kein MCADD) erforderlich, um eine Beunruhigung von Familien und unnötige Kosten zu vermeiden. Daher wurden zur Identifikation der Screeningparameter im NGS, die die Gruppe der MCADD-Fälle mit milden Acylcarnitinerhöhungen (Genotyp 985A→G / 199T→C, Gruppe 1b) von den gesunden Carriern mit Acylcarnitinerhöhungen (Gruppe 2) am sichersten unterscheiden, ebenfalls ROC Kurven erstellt. Wie aus Abbildung 8b ersichtlich, sind **C8** und die Ratio **C8 / C12** für diesen Zweck am besten geeignet.

Um retrospektiv Grenzen festlegen zu können, mittels derer MCADD-Patienten mit mildem Acylcarnitinprofil (Gruppe 1b) von heterozygoten Individuen mit erhöhten Acylcarnitinen (Gruppe 2 und Falsch Positive Proben des NGS) unterschieden werden können, wurden die Falsch Positiven Proben des NGS miteinbezogen und die Grenzen für **C8 bei 1,4 µmol/l** und für die **Ratio C8 / C12 bei 7** festgelegt. Hierdurch erreichte man eine Sensitivität von 100 % zur Erfassung der MCADD-Patienten.



metabolischer Parameter	AUC-Wert
C6	0,754
C8	0,892
C10	0,365
C10:1	0,728
C8/C6	0,892
C8/C10	0,976
C8/C12	0,924

metabolischer Parameter	AUC-Wert
C6	0,693
C8	0,990
C10	0,685
C10:1	0,841
C8 / C6	0,988
C8 / C10	0,960
C8 / C12	0,995

Abbildung 8a. ROC-Kurven und AUC-Werte für mögliche diskriminierende Parameter zwischen Gruppe 1a (MCADD; 985A→G / 985A→G) und Gruppe 1b (MCADD; 985A→G / 199T→C)

Abbildung 8b. ROC-Kurven und AUC-Werte für mögliche diskriminierende Parameter zwischen Gruppe 1b (MCADD; 985A→G / 199T→C) und 2 (Carrier für 985A→G oder 199T→C, erhöhte Acylcarnitine im NGS)

4.2.3.2 Scatterplot und Falsch Negative Proben

Für alle untersuchten Individuen (MCADD-Patienten, Kinder der Studien- und Kontrollgruppe, Gruppe der Falsch Positiven), wurden Scatterplots der am besten trennenden Parameter C8 und C8 / C12 erstellt.

Abbildung 9a zeigt den Scatterplot mit Vergrößerung für MCADD-Patienten (Gruppe 1a und 1b) und im NGS biochemisch auffällige Carrier (Gruppe 2 und heterozygote Falsch Positive Proben). Alle Carrier ließen sich mit hoher Trennschärfe abgrenzen mit Ausnahme von vier Individuen (Abb. 9a, Fälle 1-4). Zwei davon stammten aus der Studiengruppe, zwei aus der Gruppe der Falsch Positiven. In allen vier Fällen wurde eine Sequenzierung der gesamten kodierenden Region des *ACADM*-Genes durchgeführt, um potentielle weitere Mutationen außer 199T→C oder 985A→G zu identifizieren.

Durch Nachweis drei neuer Missense-Mutationen konnten die Individuen 2-4 (Abb. 9a) als compound heterozygot für MCADD eingeordnet werden. Im verbleibenden, für 199T→C heterozygoten, Fall (Nr. 1, Abb. 9a) wurde keine weitere Mutation entdeckt. Hier bleibt zu berücksichtigen, dass verborgene Splice-Site-Mutationen, Mutationen in der Promotorregion und größere Deletionen auf diese Weise nicht aufgespürt werden können. Aufgrund der durch den Datenschutz geforderten Anonymisierung von gelagerten Filterpapierkärtchen konnte dieses Individuum nicht weiter charakterisiert werden.

Während die Neugeborenen Nr. 2-4 (Abb. 9a) als bestätigte Falsch Negative Fälle eines MCADD-Screenings, das die oben beschriebenen Kriterien anwendet, anzusehen sind, könnte Kind Nr. 1 aufgrund des biochemischen Phänotyps auch zu dieser Gruppe gehören. Identifizierte Mutationen und biochemische Werte im Erst- und Kontrollscreening dieser Falsch Negativen Fälle sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Für alle übrigen Individuen, Noncarrier für 199T→C oder 985A→G, wurde ein Scatterplot mit identischen Kriterien erstellt (Abb. 9b), um die Qualität der Trennschärfe für diese Gruppen zu überprüfen. Lediglich fünf aller übrigen 578 Fälle lagen oberhalb der definierten Grenzen 1,4 µmol/l für C8 und 7 für C8 / C12. Die gesamten kodierenden Regionen des *ACADM*-Genes dieser fünf Ausreißer wurden ebenfalls retrospektiv sequenziert und zeigten keine Mutationen.

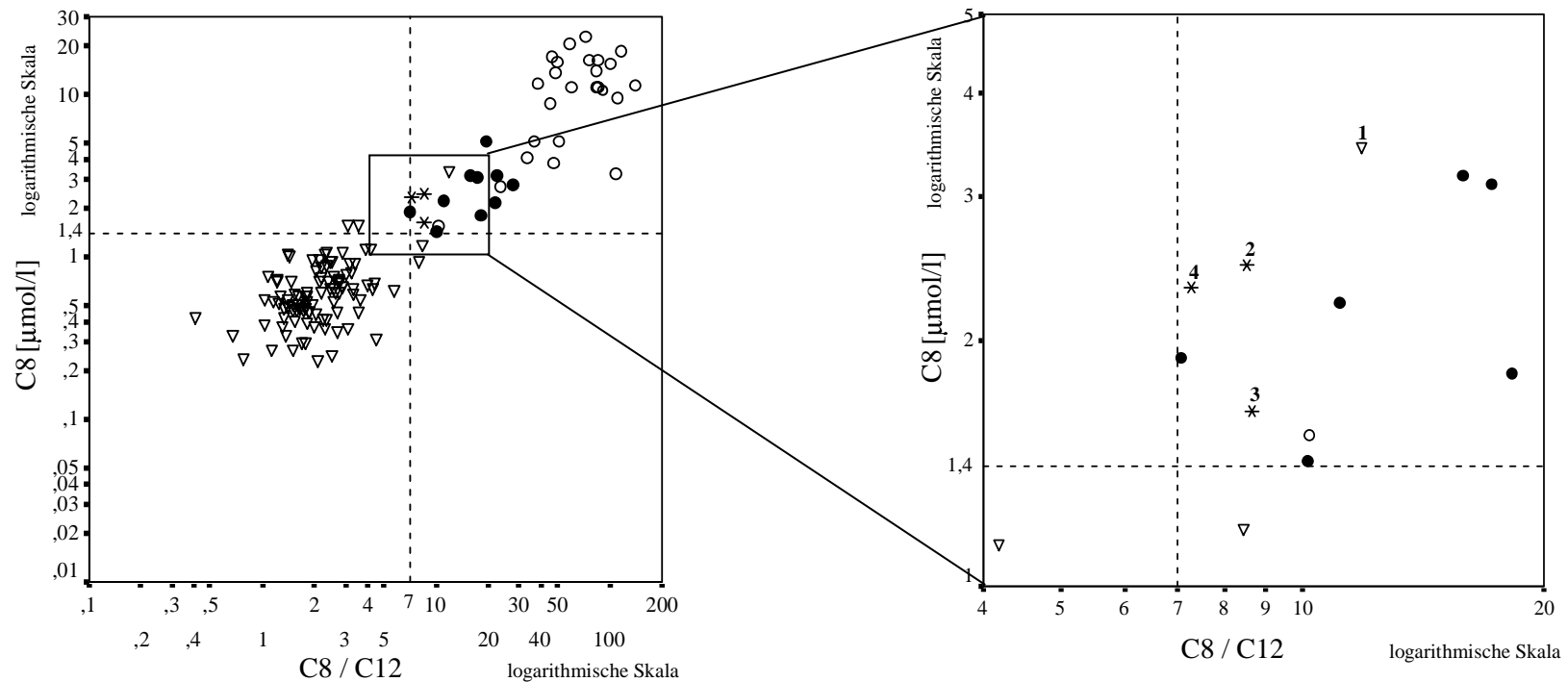


Abbildung 9a. Scatterplot der best diskriminierenden Parameter (C8 [$\mu\text{mol/l}$] und C8 / C12) in logarithmischer Darstellung von 24 für 985A→G homozygoten MCADD-Patienten, symbolisiert durch leere Kreise (\circ), 10 199T→C / 985A→G compound heterozygoten MCADD-Patienten, gefüllte Kreise (\bullet), 102 Carrier für 199T→C oder 985A→G mit erhöhten NGS-Acylcarnitinwerten (78 aus der Studiengruppe, 33 aus der Gruppe der Falsch Positiven mit einer Überlappung von 9 Fällen): Dreiecke (∇) Vier zunächst als Carrier eingeordnete Kinder zeigten zu einem MCADD passende metabolische Marker (Nr. 1-4), drei davon wurden als Falsch Negativ bestätigt (Nr. 2-4, Sternchen (*)). Details siehe Tabelle 14. Gestrichelte Linien: Referenzlinien (cut-offs) an den anhand der ROC Kurven festgelegten Grenzwerten (C8 = 1,4 $\mu\text{mol/l}$, C8 / C12 = 7) zur Unterscheidung zwischen MCADD-Patienten und gesunden Carriern

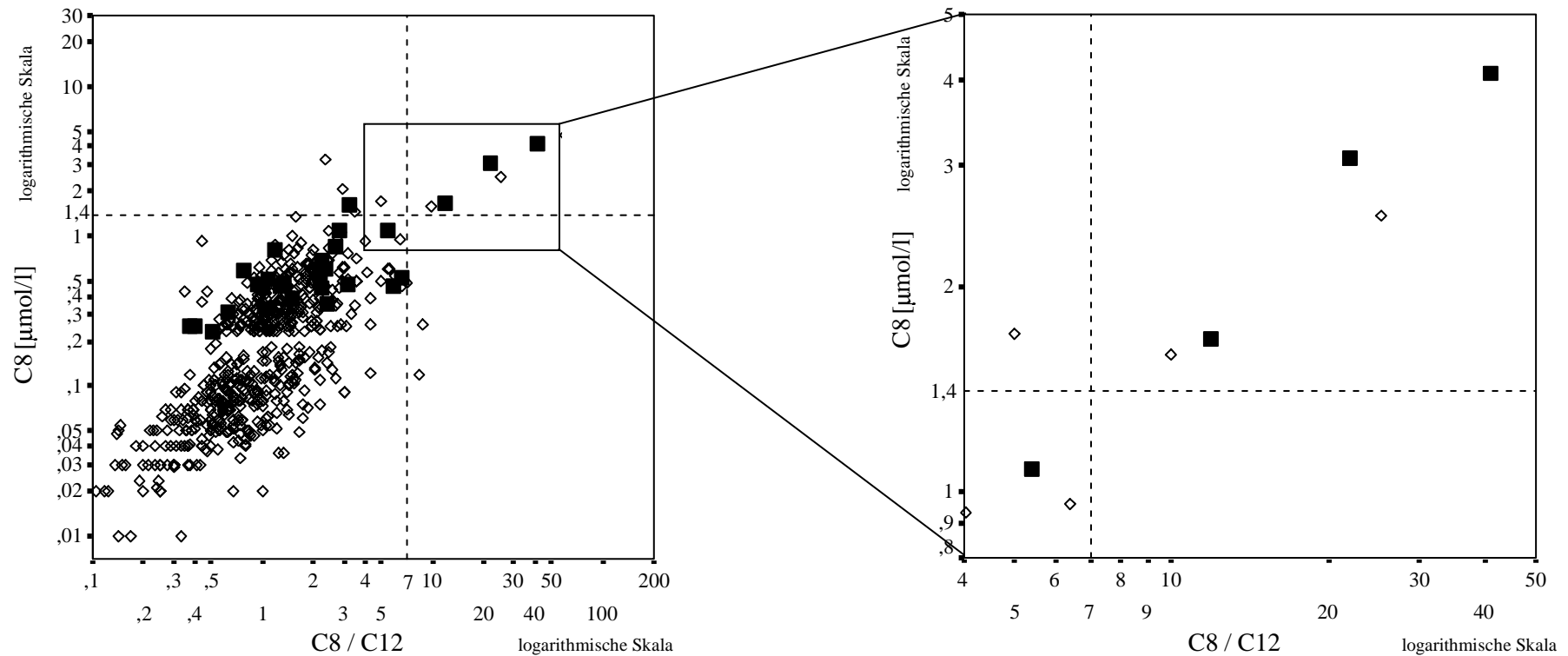


Abbildung 9b. Zu Abbildung 9a analoger Scatterplot der Parameter C8 [$\mu\text{mol/l}$] und C8 / C12 für alle übrigen Individuen, Noncarrier für 199T→C oder 985A→G, symbolisiert durch leere Rauten (Studiengruppe, $n=225$ und gematchte Kontrollen, $n=324$ (\diamond)) und gefüllte Quadrate (Falsch Positive Fälle, $n=29$ (\blacksquare)). Nur fünf der 578 Individuen lagen oberhalb der aus den ROC Kurven definierten cut-offs. Zwei Neugeborene zeigten C8 / C12-Werte unter 0,1 (nicht abgebildet).

Gestrichelte Linien: Referenzlinien (cut-offs) an den anhand der ROC Kurven festgelegten Grenzwerten (C8 = 1,4 $\mu\text{mol/l}$, C8 / C12 = 7) zur Unterscheidung zwischen MCADD-Patienten und gesunden Carriern

Tabelle 13. Durch Sequenzierung identifizierte *ACADM*-Mutationen und jeweils dazugehörige biochemische Phänotypen von vier retrospektiv analysierten Neugeborenen, die zu einem MCADD passende metabolische Marker zeigten: Nr. 1: keine zweite Mutation identifiziert, Nr. 2-4: bestätigt Falsch Negative Fälle (siehe auch Abbildung 9a)

Als diagnostische Grenzen des Neugeborenen Screenings auf MCADD sind jeweils Mittelwert + 4 Standardabweichungen angegeben. Werte über diesen diagnostischen Grenzen sind grau hinterlegt.

Acylcarnitin-Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$.

Fall	Genotyp	Alter ^a	C6	C8	C10	C10:1	C8 / C6	C8 / C10	C8 / C12
			1,56 ^b	0,32 ^b	0,51 ^b	0,69 ^b	4,23 ^b	7,54 ^b	7,88 ^b
1	n.i. ^c / 199T→C	3	1,84	3,44	0,41	0,16	1,87	8,39	11,86
		12	0,85	1,03	0,16	0,24	1,21	6,44	20,60
2	50G→A / 985A→G	3	1,23	2,68	1,86	0,93	2,18	1,44	8,38
		8	0,45	0,31	0,18	0,13	0,69	1,94	2,82
3	698T→C / 985A→G	4	0,35	1,64	0,80	0,43	4,68	2,05	8,63
		9	0,71	0,60	0,27	0,20	0,84	2,22	6,00
4 ^d	797A→G / 985A→G	3	0,83	2,32	0,65	0,41	2,79	3,57	7,25
		10	0,18	0,57	0,10	0,12	3,17	5,70	6,33

^a Alter bei Blutentnahme in Tagen

^b Mittelwert + 4 Standardabweichungen

^c nicht identifiziert

^d erfüllt diagnostische Kriterien für MCADD nicht, jedoch Nachuntersuchung an Tag 10 aufgrund deutlich erhöhter C8-Konzentration

4.2.4 Unterscheidung von Carriern und Noncarriern für 985A→G oder 199T→C mit unauffälligen Acylcarnitin-Konzentrationen im Neugeborenen-Screening (Gruppe 3)

Die Frage nach der Unterscheidung von heterozygoten Individuen mit normalen Acylcarnitin-Konzentrationen und Noncarriern besitzt keine klinische Relevanz. Aus wissenschaftlichem Interesse wurde hier jedoch der Unterschied beleuchtet. Es wurden analog der Analyse der 985A→G homozygoten, 985A→G / 199T→C compound heterozygoten MCADD-Patienten und Carriern mit erhöhten Acylcarnitin-Konzentrationen ROC-Kurven berechnet.

Diese ROC-Kurven (nicht abgebildet) und AUC-Werte (Tabelle 14) zeigen nur für einige Parameter eine wenig bessere Differenzierungsmöglichkeit als eine Zufallszuteilung (AUC-Wert über 0,5). Die Acylcarnitin-Summenparameter erscheinen am besten geeignet.

Tabelle 14. AUC-Werte der ROCs für Carrier und Noncarrier mit normalen Acylcarnitinwerten im NGS (Gruppe 3)

Metabolischer Parameter	AUC-Wert
C6	0,715
C8	0,667
C10	0,802
C10:1	0,563
C8 / C6	0,489
C8 / C10	0,392
C8 / C12	0,630
C6+C8+C10	0,829
C8+C10+C12	0,736
(C8+C10+C12) / (C3+C4+C5)	0,778
(C6+C8+C10) / (C16+C18)	0,832

Für die Summe der mittelkettigen Acylcarnitine C6, C8 und C10, die einen der höchsten AUC-Werte aufweist, wurde anschließend ein Boxplot erstellt (nicht abgebildet), aus dem ersichtlich wird, dass zwischen Heterozygoten und Noncarriern für 985A→G oder 199T→C mit normalen Acylcarnitin-Werten nicht sicher unterschieden werden kann. Die Summe der mittelkettigen Acylcarnitine weist zwar im U-Test eine Signifikanz auf 5%-Niveau auf, eignet sich jedoch nicht zur Unterscheidung im Einzelfall.

Da der überlappende Bereich der Werte dieser beiden Gruppen sehr groß ist und außerdem die klinische Relevanz einer Unterscheidung fehlt, wurden für sie keine cut-offs herausgearbeitet

4.3 Altersabhängigkeit der Acylcarnitin-Konzentrationen

4.3.1 Altersabhängigkeit der Acylcarnitin-Konzentrationen bei MCADD-Patienten mit unterschiedlichen Genotypen

Es stellte sich die Frage, ob die klare Unterscheidung zwischen den *ACADM*-Genotypen 985A→G / 199T→C und 985A→G / 985A→G aufgrund der Acylcarnitinwerte durch das Alter bei Probeentnahme beeinflusst wird, da bekannt ist, dass Acylcarnitinkonzentrationen postnatal ansteigen und danach wieder abfallen. Daher wurden Erst- und Zweitscreeningwerte von genetisch bestätigten MCADD-Patienten dieser beiden Gruppen (siehe auch Tabelle 11, Gruppe 1a und 1b) analysiert (Abbildung 10).

Bei 985A→G homozygoten Individuen zeigten zunächst hohe C8-Konzentrationen einen signifikanten Abfall mit zunehmendem Alter, wobei die Werte initial stärker erhöht waren und der Abfall deutlicher ausgeprägt war als bei compound heterozygoten Kindern mit der milden Mutation 199T→C und 985A→G. Im Gegensatz dazu ändern sich C8 bei Kindern mit Genotyp 199T→C / 985A→G und die Ratios C8 / C10 und C8 / C12 bei beiden untersuchten Gruppen nicht signifikant.

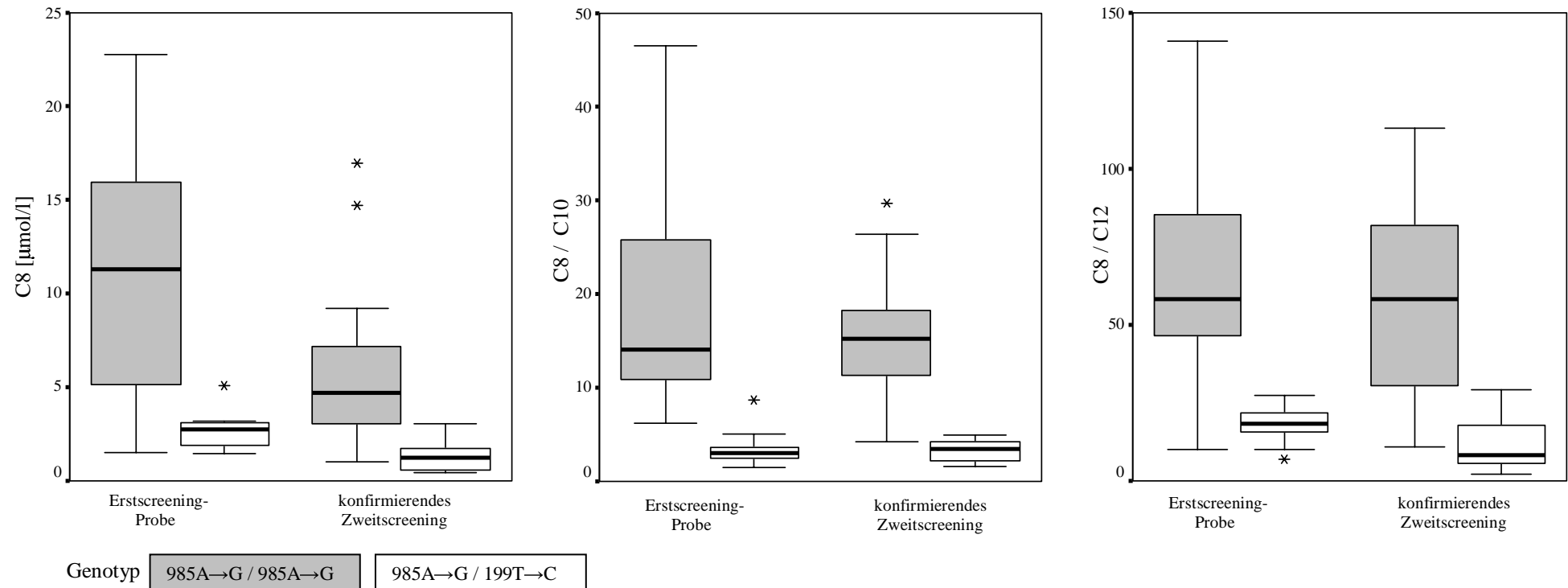


Abbildung 10. C8-Konzentration und Höhe der Ratios C8 / C10 und C8 / C12 im Erst- und im confirmierenden Zweitscreening der beiden *ACADM*-Genotypen von bestätigten MCADD-Patienten (Tabelle 12, Gruppe 1a, Genotyp 985A→G / 985A→G, n = 24; Gruppe 1b, Genotyp 985A→G / 199 T→C, n = 10)

Zwei für 985A→G homozygote Neugeborene zeigten im Erstscreening je eine extrem erhöhte C8 Konzentration (36.7 µmol/l) bzw. C8 / C12 (239.7) (nicht abgebildet). Die C8-Werte sanken mit zunehmendem Alter, wobei der Abfall nur für 985A→G homozygote Neugeborene und nicht für compound Heterozygote (985A→G / 199 T→C) signifikant war, die Änderungen der Werte von C8 / C10 und C8 / C12 blieben für beide Genotypen unter der Signifikanz-Grenze.

Alter bei Blutabnahme (in Tagen; Median ± Standardabweichung):
 Erstscreening: 2,7 ± 0,9
 Confirmierendes Zweitscreening: 7,5 ± 3,5

Zwei Zweitscreeningproben wurden am 36. und 82. Lebenstag gewonnen.

4.3.2 Vergleich der Acylcarnitin-Werte heterozygoter Erwachsener, Kinder und Säuglinge

Um ein umfassenderes Bild der Acylcarnitinwerte von heterozygoten Individuen zu erhalten, wurden die Screeningwerte der im NGS unauffälligen heterozygoten Neugeborenen (aus Gruppe 3) mit denen von heterozygoten Erwachsenen und älteren Kindern (Eltern und Geschwister von MCADD-Patienten) verglichen. Hierbei wurden nur Individuen mit den Mutationen 985A→G und 199T→C berücksichtigt. Die Verteilung des Alters bei Probeabnahme zeigt Tabelle 15.

Tabelle 15. Altersverteilung bei Probeentnahme der Heterozygoten für die *ACADM*-Mutationen 985A→G und 199T→C

	Mittelwert ± Standardabweichung	Minimalwert	Maximalwert
Erwachsene	34,0 ± 5,4 Jahre	26,7 Jahre	47,0 Jahre
Kinder	9,3 ± 4,5 Jahre	1,8 Jahre	13,2 Jahre
Neugeborene	2,6 ± 0,4 Tage	2 Tage	3,5 Tage

Da zwischen den Acylcarnitinwerten der Erwachsenen und Kindern im U-Test keine signifikanten Unterschiede bestanden, wurden diese beiden Gruppen zusammengefaßt und mit den Werten der Neugeborenen verglichen. Es zeigte sich, dass die Acylcarnitine der langkettigen Fettsäuren C12, C14, C16 und C18 und deren abgeleitete Parameter (Ratios, Summen) bei den Neugeborenen im U-Test signifikant höher lagen.

4.4 Retrospektiv bestimmte technische Performance des Neugeborenen-Screenings für MCADD in Bayern

Schließlich wurde die Veränderung der technischen Performance des bayerischen NGS für MCADD durch Vergleich des konventionellen multi-parametrischen Bewertungssystems (Detailbeschreibung siehe (Maier, Liebl et al. 2005)) mit der Anwendung der neuen, durch die Studie definierten cut-off-Werte (1,4 µmol/l für C8 und 7 für C8 / C12) berechnet. Die Berechnung basierte nur auf den Erstscreening-Werten der Blutabnahme im Alter von 36-60 Stunden.

Diejenigen Fälle wurden als „positiv“ definiert, die sowohl im Erst- als auch im bestätigenden Kontrollscreening ein für MCADD charakteristisches Metaboliten-Muster zeigten. „Negative“ Fälle zeigten im Erstscreening entweder normale oder erhöhte Acylcarnitinwerte, im Kontrollscreening jedoch immer ein normales Profil der Parameter. Als „betroffen“ wurden alle Individuen mit zwei durch molekulargenetische Analyse nachgewiesenen *ACADM*-Mutationen oder mit wiederholten für MCADD typischen Acylcarnitinmustern im Blut angesehen.

Die Änderungen (multiparametrisches System / neu definierte cut-offs) durch den Einschluß der Falsch Negativen MCADD-Fälle, entdeckt in dieser Studie, wurden für biochemisch oder durch Mutationsanalyse bestätigte MCADD-Patienten durch Vier-Felder-Tafeln berechnet (Tabelle 16a).

Die in dieser Arbeit gefundene Anzahl Falsch Negativer steigert mit den neu definierten cut-offs die MCADD-Prävalenz von 1 / 8.108 auf 1 / 7.585, die Falsch Negativen Rate des konventionellen multiparametrischen Bewertungssystemes liegt bei 6,5 %. Die Qualität des NGS bleibt mit den in dieser Arbeit neu definierten cut-off-Werte weiter hoch, erkennbar an dem unverändert bleibenden hohen positiv prädiktiven Wert von 42 %. Die Falsch-Positiven-Rate (0,017 %) und Spezifität (99,98 %) verändern sich im Vergleich der beiden Bewertungssysteme nicht (Tabelle 16b).

Tabelle 16a. Vier-Felder-Tafeln zum Vergleich des konventionellen multiparametrischen Bewertungssystems mit den in dieser Arbeit neu definierten cut-off-Werten

	konventionelles multiparametrisches Bewertungssystem			in dieser Arbeit neu definierte cut-off-Werte		
	betroffen	gesund	Summe	betroffen	gesund	Summe
NGS-Testergebnis positiv	58	81	139	58	81	139
NGS-Testergebnis negativ	0	470.108	470.108	4	470.104	470.108
Summe	58	470.189	470.247	62	470.185	470.247

Tabelle 16b. Vergleich der beiden Bewertungssysteme

	konventionelles multiparametrisches Bewertungssystem	in dieser Arbeit neu definierte cut-off-Werte
Prävalenz	1 / 8.108	1 / 7.585
positiv prädiktiver Wert	42 %	42 %
Sensitivität	93,5 %	100 %
Spezifität	99,98 %	99,98 %
Falsch-Positiven-Rate	0,017 %	0,017 %
Falsch-Negativen-Rate	6,5 %	*

* nicht bestimmbar

5 Diskussion

Seit etwa einer Dekade wurde in vielen Ländern weltweit die MS/MS-Technologie in das NGS eingeführt, da sich dadurch die Möglichkeit bietet, mehr als 20 verschiedene angeborene Stoffwechseldefekte mit vergleichsweise geringem Aufwand zu erfassen. Unter diesen bilden die hereditären Störungen des Fettsäurestoffwechsels eine große Gruppe, wobei der MCADD die häufigste darstellt (Inzidenz etwa 1 / 8.000). Einem potentiell ungünstigen Verlauf kann durch eine frühzeitige Diagnose vermutlich wirksam vorgebeugt werden (Nennstiel-Ratzel, Arenz et al. 2005).

Die Beobachtungen von großen prospektiven NGS-Programmen zeigen, dass die Beurteilung von Acylcarnitinprofilen mittels MS/MS eine Screeningmethode für MCADD mit hoher Spezifität, einem hohen positiv prädiktiven Wert und geringen Falsch-Positiven-Raten darstellt (Chace, Hillman et al. 1997; Carpenter, Wiley et al. 2001; Zytkovicz, Fitzgerald et al. 2001; Schulze, Lindner et al. 2003; Wilcken, Wiley et al. 2003; Maier, Liebl et al. 2005). Auch der finanzielle Aufwand steht in günstigem Verhältnis zum Nutzen des NGS (Venditti, Venditti et al. 2003).

Ein direkter Vergleich der diagnostischen Performance der bisher vorliegenden Studien ist allerdings wegen der Verwendung unterschiedlicher metabolischer Parameter und Grenzwerte zur MCADD-Detektion limitiert (Pandor, Eastham et al. 2004).

Außerdem zeigte sich, dass das Spektrum der Genotypen der im MCADD-Screening entdeckten Patienten sich von dem der klinisch durch Stoffwechselkrisen diagnostizierten Patienten unterschied. Hierbei schloss das NGS genetische Varianten ein, die noch nicht bei Patienten mit metabolischer Dekompensation oder Tod beschrieben wurden und die auch einen milderen biochemischen Phänotyp zeigten, z.B den compound heterozygoten Genotyp 985A→G / 199T→C (Maier, Liebl et al. 2005).

5.1 Möglichkeiten einer wissenschaftlichen Bewertung des Neugeborenen-Screenings

Aufgrund dieser Heterogenität der Genotypen aus dem NGS ist zu erwarten, dass auch Allelvarianten mit noch milderem Acylcarnitinprofil existieren, die durch die gängigen Richtlinien zur Erkennung von MCADD nicht detektiert werden.

Eine verlässliche technische Validierung des NGS und speziell eine Schätzung der Falsch Negativen-Rate war bisher aus Mangel an Beobachtungsstudien schwer möglich. Auch zeigt vermutlich ein unbekannter Anteil speziell dieser Patienten erst im späteren Lebensalter

Symptome oder bleibt sogar zeitlebens asymptomatisch - eine Tatsache, die Beobachtungsstudien problematisch gestaltet.

Eine retrospektive Neubewertung von NGS-Daten bietet nun die Möglichkeit, spezifische biochemische Phänotypen dem jeweiligen Genotyp zuzuordnen und somit auch milde, ansonsten unentdeckt bleibende Phänotypen zu bewerten.

Die vorliegende Studie untersuchte im Fall-Kontroll-Design retrospektiv anonymisiert die genetische Basis einer biochemischen „Risiko“-Population. Hierzu wurde aus getrockneten Blutstropfen aus dem NGS nach den zwei häufigsten *ACADM*-Mutationen untersucht, 985A→G und 199T→C, die zusammen 71 % aller mutierten Allele darstellen (Maier, Liebl et al. 2005). Biochemisch war diese „Risiko“-Population im Screening als „MCADD-negativ“ eingestuft worden, zeigte jedoch einen Phänotyp mit zwar nicht MCADD-typischen (<99,5. Perzentile), jedoch über die Norm erhöhten (≥95. Perzentile) Acylcarnitin-Konzentrationen. Zusätzlich wurden alle Falsch Positiven MCADD-Fälle analysiert.

Hypothetisch bestand für diese Kohorten eine höhere Wahrscheinlichkeit, Falsch Negative Fälle, also Individuen mit *ACADM*-Mutationen auf beiden Allelen, die im NGS als „MCADD-negativ“ eingestuft worden waren, zu enthalten, speziell auch im Hinblick auf die als mild beschriebene Mutation 199T→C (Andresen, Dobrowolski et al. 2001).

5.2 Erhöhte Carrierfrequenz bei Individuen mit grenzwertig auffälligem biochemischen Phänotyp („Borderline-MCADD“)

Ein auffälliges Ergebnis war die etwa zehnfach erhöhte Rate an Heterozygoten für die *ACADM*-Mutationen 985A→G und 199T→C in der Studiengruppe im Vergleich zu den gematchten Kontrollen. Die Frequenz für 985A→G von 1 / 4,3 in der Studiengruppe wurde der aus Allelfrequenzen des NGS extrapolierten Frequenz von 1 / 70 gegenüber gestellt. Erwartungsgemäß lag die Carrierfrequenz für 985A→G mit 1 / 2,3 in der Kohorte der Falsch Positiven Fälle noch höher.

Da nur die beiden häufigsten Mutationen, die etwa einen Anteil von 70 % der aus dem NGS bekannten Mutationen bilden, untersucht wurden, liegt die vermutliche hochgerechnete Heterozygotenrate aller Mutationen für die Studiengruppe bei etwa 1 / 3 und für die Falsch Positiven Proben bei 1 / 1,4. Für die Studienpopulation bedeutet dies eine zwanzigfach höhere Carrierfrequenz als für die Normalbevölkerung zu erwarten wäre. Auch muss berücksichtigt werden, dass in Populationen nicht-kaukasischer Abstammung andere Carrierfrequenzen und

andere Mutationen auftreten (Tanaka, Gregersen et al. 1997; Bozkurt, Ozturk et al. 2001; Maier, Liebl et al. 2005). Sowohl die Studienpopulation als auch die Gruppe der Falsch Positiven wurde aus der gesamten bayerischen Bevölkerung akquiriert, die einen gewissen Anteil an Neugeborenen türkischer Abstammung beinhaltet. Der Anteil türkischer Neugeborener an der gesamten Neugeborenen-Population Bayerns beträgt ca. 4,6 % (Maier, Liebl et al. 2005). Da unter der türkischen Bevölkerung häufiger andere Mutationen als die untersuchten zwei auftreten, ist anzunehmen, dass die tatsächliche Carrierfrequenz in der Studiengruppe und der Gruppe der Falsch Positiven noch höher liegt.

Die Heterozygotenrate war offensichtlich abhängig vom Ausmaß der Erhöhung der mittelkettigen Acylcarnitine. Je höher die C8-Konzentrationen lagen, desto höher war die Wahrscheinlichkeit für eine Heterozygotie. Dieses Ergebnis entspricht kürzlich veröffentlichten Beobachtungen (Blois, Riddell et al. 2005).

Die meisten NGS-Proben wurden zu einem relativ frühen Zeitpunkt, 36-48h postnatal, abgenommen, wenn sich ein beträchtlicher Anteil der Neugeborenen noch in einer katabolen Stoffwechselsituation befindet. Offensichtlich ist besonders hierunter bei *ACADM*-Carriern die zunehmend niedrigere MCAD-Enzymaktivität nicht immer ausreichend, um eine vollständig normale Fettsäuren-Homöostase aufrecht zu erhalten. Dass dies auch für die als mild beschriebene Mutation 199T→C gilt (Andresen, Dobrowolski et al. 2001; Maier, Liebl et al. 2005), legt die im Vergleich zur Normalbevölkerung (1 / 480) erhöhte Heterozygotenfrequenz dieser Mutation von 1 / 23 in der Gruppe der Falsch Positiven nahe. Auch lässt sich daraus der Verdacht ableiten, dass selbst diese Mutation in katabolen Ausnahmesituationen durchaus biochemische Auswirkungen, beispielsweise in Form von Stoffwechselkrisen, haben könnte.

Die Tendenz zu höheren Acylcarnitinen bei im NGS biochemisch unauffälligen Heterozygoten im Vergleich zu Noncarriern unterstützt diese Theorie. Jedoch ist diese Tendenz nicht dazu geeignet, Carrier anhand von Acylcarnitinmustern sicher zu identifizieren. Dies ist auch kein Ziel des NGS, da gesunde Individuen nicht stigmatisiert werden sollen.

Es bestätigt sich mit diesen Ergebnissen, dass die phänotypische Ausprägung des MCADD nicht nur von genetischen, den *ACADM*-Mutationen, sondern auch von Umweltfaktoren, wie katabolen Stoffwechsellagen, abhängt. So wurde beispielsweise gezeigt, dass auch eine Homozygotie für die *SCAD*-Mutation 625G→A einen zusätzlichen genetischen Faktor zur Manifestation und Ausprägung des Phänotyps bei MCADD darstellen kann (Korman, Gutman et al. 2004).

Daneben kann metabolischer Stress aufgrund von Frühgeburtlichkeit zu grenzwertigen C8-Erhöhungen bei Heterozygoten im NGS beitragen (Zytkovicz, Fitzgerald et al. 2001; Lehotay, LePage et al. 2004).

Eine Selektions-Bias durch Frühgeburtlichkeit wurde in dieser Studie durch das Matchen der Kontrollgruppe ausgeschlossen.

5.3 Analyse der Acylcarnitinemuster zur Definition von möglichen Trennkriterien

Die Acylcarnitinemuster der Carrier der oben beschriebenen Borderline-Population wurden mit denen konfirmierter MCADD-Patienten aus dem NGS unterschiedlichen Genotyps verglichen. Ziel war es, passende Kriterien zu definieren, um Carrier mit erhöhten Acylcarnitinen von MCADD-Patienten mit milder Krankheitsexpression, d.h. mit milden Acylcarnitinerhöhungen, sicher zu unterscheiden, da ein Auffinden von gesunden Heterozygoten im Screening unerwünscht ist. Als positive Kontroll-Kohorte diente die Gruppe der 985A→G homozygoten Patienten mit klassischen MCADD-typischen Acylcarnitinemustern, die von denen der 985A→G / 199T→C compound Heterozygoten mittels der Ratios C8 / C10 und C8 / C12 am zuverlässigsten getrennt werden konnten.

Bisher sind langfristige Follow-up-Daten von im NGS entdeckten MCADD-Patienten rar. 985A→G homozygote Patienten mit klassischem MCADD scheinen von einer frühen Detektion im NGS durch eine reduzierte Inzidenz an Stoffwechselkrisen und Todesfällen im Vergleich zu ungescreenten Patienten identischen Genotyps zu profitieren (Nennstiel-Ratzel, Arenz et al. 2005).

Der natürliche Verlauf der Krankheit bei compound heterozygoten Patienten aber ist unbekannt. Viele davon, vor allem Individuen mit der offensichtlich milderen Mutation 199T→C, könnten, auch ohne frühe Diagnose durch das NGS, asymptomatisch bleiben. Auch wenn Patienten mit dieser Genvariante bisher in retrospektiven Patientenkohorten noch nicht beobachtet wurden, lässt der derzeitige Wissenstand nicht die Behauptung zu, dass diese Genotypen lediglich asymptotische MCADD-Varianten darstellen.

Daher ist nach wie vor das Ziel der meisten NGS-Programme, das volle Spektrum an biochemischen und genetischen MCADD-Varianten, einschließlich der milden, zu detektieren. Unter diesen Umständen bleibt die klare Unterscheidung zwischen Carriern und MCADD-Varianten mit milder biochemischer Expression im NGS von praktischer Bedeutung.

Die vorliegende Studie zeigte, dass bestätigte compound Heterozygote des Genotyps 985A→G / 199T→C mit geringer Überschneidung von heterozygoten Individuen mittels der Marker C8 und C8 / C12 unterschieden werden können (4 Neugeborene einer Population von 111 Carriern). Diese zwei am häufigsten in unserer Population identifizierten Mutationen stellen 71 % der Allele dar; andere seltenere Varianten spielen vermutlich ebenfalls eine noch undefinierte Rolle.

5.4 Identifikation von Falsch Negativen Individuen im MCADD-Screening

Es wurde die gesamte *ACADM* kodierende Region derjenigen Heterozygoten sequenziert, die mit MCADD-Patienten bezüglich C8 und C8 / C12 in dieser Studie überlappende biochemische Muster zeigten. In 3 von 4 Fällen führte dies tatsächlich zu einer Identifikation einer weiteren Mutation auf dem zweiten Allel, wobei alle drei neue Mutationen darstellten mit unbekanntem funktionellen Konsequenzen. Damit müssen diese Fälle als Falsch Negativ bezeichnet werden, solange das Ziel des MCADD-Screenings die Detektion des vollen Spektrums an *ACADM*-Mutationen bleibt, einschließlich derer mit mildem biochemischen Phänotyp. Neben diesen 4 Individuen wurden bisher im Rahmen einer 4-jährigen Follow-Up-Studie des bayerischen NGS von 470.247 Neugeborenen keine MCADD-Patienten bekannt, die im Screening unerkannt geblieben wären und sich später mit klinischen Symptomen präsentiert hätten.

Das Auftreten der als Falsch Negativ zu klassifizierenden Individuen beeinflusst den Wert der diagnostischen Sensitivität unseres NGS für MCADD (100% → 93,5%). Diese Individuen blieben im NGS unentdeckt, da die Auswertungsrichtlinien eine C8-Erhöhung sowohl im Erst- als auch im Kontrollscreening und eine Erhöhung von mindestens drei weiteren diagnostischen Parametern fordern. Kind Nr. 4 wurde einem Zweitscreening unterzogen, da es, obwohl es die MCADD-Kriterien nicht erfüllte, im Erstscreening eine außergewöhnlich hohe C8-Konzentration zeigte (Tabelle 14).

Absolute Acylcarnitin-Konzentrationen sind bekannterweise tendenziell nach Geburt höher als zu späteren Abnahmezeitpunkten (Cavedon, Bourdoux et al. 2005). Klinisch diagnostizierte MCADD-Patienten jeden Alters zeigen allerdings durchgehend MCADD-typische Acylcarnitmuster, auch außerhalb metabolischer Krisen (Raymond, Bale et al. 1999; Feillet, Steinmann et al. 2003). Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass das oben genannte Phänomen die diagnostische Sensitivität der MCADD-Detektion einschränken kann, besonders wenn biochemisch mildere MCADD-Varianten ausschließlich durch Analyse von

C8 detektiert werden sollen. Eine Altersanpassung der diagnostischen Grenzen für C8 hätte jedoch lediglich bei Individuum Nr. 2 eine Falsch Negative Zuordnung verhindert.

Im Gegensatz hierzu veränderten sich die für MCADD charakteristischen Metaboliten-Ratios innerhalb der ersten 12 Tage nicht signifikant. Ein Abfall zu normalen Werten wurde nur in Einzelfällen beobachtet: C8 / C6 bei Neugeborenem Nr. 3, C8 / C10 bei Kind Nr. 1, C8 / C12 bei den Kindern Nr. 2 und 3.

Die schon in früheren Studien (Chace, Kalas et al. 2003) formulierte Schwierigkeit, präzise cut-off-Werte zu definieren, die alle MCADD-Varianten erfassen, wird durch die Daten dieser retrospektiven Bewertung noch einmal bestätigt.

5.5 Konsequenzen für das Neugeborenen-Screening

Ein Bevölkerungsscreening für MCADD hat, wie jedes andere NGS, aufgrund der großen genetischen Heterogenität dieser Erkrankung seine Grenzen bei der Identifikation aller Individuen mit zwei mutierten Allelen (Andresen, Dobrowolski et al. 2001; Maier, Liebl et al. 2005). Unser Screening-Programm erbrachte eine höhere Gesamtinzidenz für MCADD als vergleichbare Programme anderer Regionen (Chace, Hillman et al. 1997; Andresen, Dobrowolski et al. 2001; Carpenter, Wiley et al. 2001; Zytovicz, Fitzgerald et al. 2001; Schulze, Lindner et al. 2003; Wilcken, Wiley et al. 2003). Jedoch vermochte die vorliegende Studie einzelne unerkannte MCADD-Fälle zu identifizieren.

Dies bestätigt, dass es, unabhängig von unterschiedlichen cut-off-Algorithmen und bisher fehlenden Berichten übersehener Fälle, ratsam erscheint, der Öffentlichkeit die Grenzen des biochemischen NGS für die Detektion aller Varianten einer genetischen Erkrankung wie des MCADD bewußt zu machen.

Dennoch kann mit passenden diagnostischen Kriterien ein NGS für MCADD technisch mit exzellenter Performance und sehr geringer Recall-Rate durchgeführt werden. Dadurch ist es, vom technischen Gesichtspunkt aus gesehen, möglich, die Belastung der weitgehend gesunden Bevölkerung durch unerwünschte Information, wie z.B. der Identifikation von Carriern, die zu einer unnötigen Beunruhigung betroffener Familien führt, oder durch initial nicht eindeutige Befunde sehr gering gehalten werden.

Im NGS kann eine Reduktion der Falsch-Negativen-Rate des Ersts Screenings nur dann erreicht werden, wenn die Sensitivität des bestätigenden Zweitscreenings gleich hoch ist. Wie in Abb. 13 und Tab. 14 gezeigt, kann die Trennschärfe der Detektion aller MCADD-Varianten zu späteren Abnahmezeitpunkten, z.B. des Kontrollscreenings, sinken. Unser Programm schlägt

daher bei allen im Erstscreening für MCADD verdächtigen Kindern eine Bestätigung durch die Sequenzierung der gesamten *ACADM* kodierenden Region vor. Aufgrund der hohen Spezifität des Erstscreenings trifft dieses nur auf 20 Fälle pro 100.000 Neugeborene zu. Alternativ könnten andere Screening-Labors versuchen, eine möglichst hohe diagnostische Sensitivität zu erreichen durch altersangepaßte Acylcarnitingrenzen für Kontrollproben oder andere Interpretationsalgorithmen, die z.B. Acylcarnitin-Ratios (C8 / C10, C8 / C12) als primäre Marker verwenden.

Dennoch bleibt zu diskutieren, ob alle *ACADM*-Varianten im NGS detektiert werden müssen inklusive derer, bei denen ohne NGS bisher kein ungünstiger klinischer Verlauf beschrieben wurde. So bleibt es weiter fraglich, ob alle *ACADM*-Mutationen Krankheitswert besitzen. Andererseits weist die erhöhte Carrierrate auch für die als mild beschriebene Mutation 199T→C unter Individuen mit erhöhten Acylcarnitinen auf eine „metabolische Vulnerabilität“ hin.

Derzeit läßt sich noch keine optimale Balance im MCADD-Screening zwischen maximalem Benefit und minimaler Belastung durch unnötige Kontrolluntersuchungen und Stigmatisierung finden. Diese Situation ist auch aus dem Screening anderer Krankheiten bekannt, wie zum Beispiel durch die Identifikation von milder Hyperphenylalaninämie im Screening auf Phenylketonurie und die Entdeckung von Duarte-Varianten im Galaktosämie-Screening.

Die vorliegenden Daten enthalten das Potential, mittels biochemischer Profile zwischen klassischen MCADD-Genotypen, z.B. 985A→G homozygot, und Allelvarianten milderer biochemischen Phänotyps mit hoher Sensitivität zu unterscheiden. Dies könnte theoretisch die Möglichkeit bieten, das MCADD-Screening nur auf Untergruppen zu richten, die ein hohes Risiko für ein schlechtes klinisches Outcome mit metabolischer Dekompensation und Tod besitzen. Höchstwahrscheinlich ist das Spektrum der Störung von einem fließenden Übergang zwischen gesund und pathologisch gekennzeichnet. Dies betrifft sowohl den Genotyp als auch den biochemischen Phänotyp und die Neigung zu metabolischer Dekompensation.

Zusammenfassend verwendet die vorliegende Studie eine neue Strategie zur Bewertung des NGS auf genetische Erkrankungen mit unbekannter klinischer Expression. Dies wird am Beispiel einer retrospektiven Genotypisierung der häufigsten *ACADM*-Varianten von Neugeborenen gezeigt, die als unauffällig eingeordnet wurden, jedoch subtile biochemische Abnormitäten aufwiesen. Individuen mit Carrier-Status zeigten mit höherer Wahrscheinlichkeit grenzwertige Acylcarnitin-Erhöhungen.

Es wurden passende multi-parametrische biochemische Kriterien definiert, mit deren Hilfe eine verlässliche Differenzierung zwischen Carriern und MCADD-Varianten mit mildem biochemischen Profil ohne substanziellen Verlust in der technischen Performance möglich ist. Die retrospektive Identifikation von einzelnen Falsch Negativen Fällen erlaubte eine annähernde Abschätzung der diagnostischen Sensitivität.

Da der natürliche Verlauf und die Prognose vieler milderer MCADD-Varianten, die im NGS entdeckt werden, durch Beobachtungsstudien bislang nicht verlässlich beurteilt werden können, könnte die vorliegende Methodik als ein generelles Modell für die Evaluation von MS/MS-basierten biochemischen Screeningprogrammen dienen.

6 Zusammenfassung

Das Ziel von Neugeborenencreening (NGS)-Programmen ist die möglichst vollständige Detektion aller erkrankten Kinder bei möglichst sicherer Abgrenzung Gesunder und insbesondere gesunder Anlageträger. In der vorliegenden Studie sollte die Qualität der Auswertungskriterien optimiert werden. Die Minimierung Falsch Positiver Proben vermag die psychologische Belastung betroffener Familien und die finanzielle Belastung von Gesundheitssystemen gering zu halten. Beim Medium-Chain-Acyl-CoA Dehydrogenase-Mangel (MCADD), einer potenziell letalen angeborenen Stoffwechselstörung, finden sich Individuen, die im NGS grenzwertige Acylcarnitinerhöhungen zeigen („Borderline-MCADD“) und bisher aufgrund der Milde der Veränderungen als gesund eingestuft wurden. In dieser Borderline-Gruppe können sich sowohl gesunde Kinder mit Wildtyp-Sequenz auf beiden Allelen, gesunde Kinder mit heterozygotem Genotyp oder auch MCADD-Patienten mit mildem biochemischen Phänotyp (Falsch Negativ) befinden. Die Falsch Negativen Rate im NGS ist aufgrund möglicherweise zeitlebens asymptomatisch bleibender Patienten schwierig zu bestimmen.

Um die Sensitivität des NGS zu validieren und die diagnostische Trennschärfe zu erhöhen, wurden aus 470.247 in Bayern in den Jahren 1999-2002 untersuchten Kindern, unter denen sich 58 mit konfirmiertem MCADD befanden, 938 ausgewählt, die grenzwertige Acylcarnitinerhöhungen zeigten. Hiervon konnten retrospektiv 333 Proben – zusätzlich 69 der insgesamt 81 Falsch Positiven Proben – anonymisiert zur genetischen Untersuchung auf die beiden häufigsten Mutationen, 199T→C und 985A→G, herangezogen werden, die 71 % aller mutierten Allele darstellen. Dies erfolgte durch eine Amplifikation der entsprechenden Allelregion mittels PCR und anschließendem Restriktionsverdau.

Es zeigte sich, dass die Heterozygotenfrequenz für die Mutation 985A→G in der untersuchten Borderline-Gruppe und unter den Falsch Positiven etwa zehnfach erhöht war im Vergleich zu einer bezüglich Geburtsgewicht und Alter bei Probeentnahme gematchten Kontrollgruppe (1 / 4,3 in der Borderline-Gruppe versus 1 / 42). Zusätzlich bestand eine positive Korrelation zwischen der Frequenz der MCADD-Carrier und dem Grad der Acylcarnitinerhöhungen. Da nur ca. 70 % der möglichen Mutationen erfasst wurden, ist anzunehmen, dass die tatsächliche Heterozygotenrate noch höher liegt. Die auffällige Carrierfrequenz deutet darauf hin, dass die anzunehmend niedrigere MCAD-Enzymaktivität nicht immer ausreicht, um eine vollständig normale Fettsäuren-Homöostase aufrecht zu erhalten. Das scheint auch für die als mild beschriebene Mutation 199T→C zu gelten. Der MCADD manifestiert sich als eine Störung,

deren Ausprägung nicht nur von genetischen Faktoren, sondern auch von Umwelteinflüssen bestimmt ist und deren Spektrum von einem fließenden Übergang zwischen gesund und pathologisch gekennzeichnet ist.

Durch eine mit den gewonnenen Daten mögliche Analyse der Acylcarnitinstufen bei (1) MCADD-Patienten unterschiedlichen Genotyps (985A→G / 985A→G und 199T→C / 985A→G) und (2) Carriern der Borderline-Gruppe ließ sich eine Korrelation zwischen Genotyp und biochemischem Phänotyp (Acylcarnitinerhöhungen) nachweisen. Mithilfe von receiver operated characteristic (ROC)-Kurven ließ sich Anzahl und Kombination von NGS-Markern, mithilfe von Scatterplots Grenzwerte definieren, die diese Gruppen hervorragend zu diskriminieren vermochten. Lediglich vier zunächst als MCADD-Carrier identifizierte Proben fanden sich in der Gruppe der MCADD-Patienten.

Um möglicherweise Falsch Negative Fälle zu identifizieren, wurde das gesamte *ACADM*-Gen dieser vier Proben sequenziert. Bei dreien fand sich eine weitere, jeweils bisher nicht beschriebene Mutation auf dem zweiten Allel. Somit müssen diese als Falsch Negativ im NGS angesehen werden. Die vierte Probe zeigte keine weitere Mutation, wobei zu bemerken ist, dass nicht alle Mutationen durch die Sequenzierung erkannt werden können und diese Probe somit ebenfalls Falsch Negativ sein könnte.

Als mögliche diagnostische Fehlerquelle beim NGS wurde die Altersabhängigkeit der Acylcarnitinerhöhungen bei gesunden Individuen, Carriern und MCADD-Patienten untersucht. Stützt man die Auswertung lediglich auf einen Marker, klassischerweise Octanoylcarnitin (C8), kann die diagnostische Sensitivität bei grenzwertigen Proben eingeschränkt sein. Im Gegensatz hierzu zeigen Metaboliten-Ratios, z.B. C8 / C12, auch zu späteren Abnahmezeitpunkten konstant auffällige Werte.

Die Identifizierung von Falsch Negativen Proben mittels der neu definierten Auswertungskriterien verändert die diagnostische Sensitivität des NGS (100% → 93,5%). Nach dem derzeitigen Wissensstand ist jedoch weiterhin nicht vorhersehbar, welche Genotypen bzw. biochemischen Phänotypen innerhalb der sich im NGS abbildenden Heterogenität klinisch auffällig werden bzw. asymptomatisch bleiben.

Schließlich ist zu diskutieren, ob es sinnvoll ist, alle Genotyp-Varianten – einschließlich der potenziell klinisch benignen Formen – zu identifizieren oder sich auf Hochrisiko-Varianten zu beschränken. Letzteres wäre technisch möglich aufgrund der hier erhobenen Daten, welche zwischen Patienten mit dem klassischen 985A→G homozygoten Genotyp und Genotypen mit biochemisch milderer Varianten zu unterscheiden vermögen. Solange jedoch der

Krankheitswert unterschiedlicher Mutationen nicht geklärt ist, wird es das Ziel bleiben, alle MCADD-Patienten zu identifizieren.

7 Literaturverzeichnis

- Albers, S., H. L. Levy, et al. (2001). "Compound heterozygosity in four asymptomatic siblings with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency." J Inherit Metab Dis **24**(3): 417-8.
- Andresen, B. S., S. F. Dobrowolski, et al. (2001). "Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mutations identified by MS/MS-based prospective screening of newborns differ from those observed in patients with clinical symptoms: identification and characterization of a new, prevalent mutation that results in mild MCAD deficiency." Am J Hum Genet **68**(6): 1408-18.
- Andresen, B. S., T. G. Jensen, et al. (1994). "Disease-causing mutations in exon 11 of the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene." Am J Hum Genet **54**(6): 975-88.
- Bennett, M. J., P. Rinaldo, et al. (1991). "Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: postmortem diagnosis in a case of sudden infant death and neonatal diagnosis of an affected sibling." Pediatr Pathol **11**(6): 889-95.
- Blois, B., C. Riddell, et al. (2005). "Newborns with C8-acylcarnitine level over the 90th centile have an increased frequency of the common MCAD 985A>G mutation." J Inherit Metab Dis **28**(4): 551-6.
- Boles, R., Boesel, C., Rinaldo, P. (1996). "Sudden death beyond SIDS." Pediatr Pathol Lab Med **16**: 691-693.
- Bozkurt, N., O. Ozturk, et al. (2001). "New MCAD gene mutation, not previously reported in other nations, found at A1161G in Turkish population." Am J Med Genet **103**(3): 255-6.
- Brackett, J. C., H. F. Sims, et al. (1994). "A novel mutation in medium chain acyl-CoA dehydrogenase causes sudden neonatal death." J Clin Invest **94**(4): 1477-83.
- Carpenter, K., V. Wiley, et al. (2001). "Evaluation of newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 275 000 babies." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **85**(2): F105-9.
- Catzeflis, C., C. Bachmann, et al. (1990). "Early diagnosis and treatment of neonatal medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: report of two siblings." Eur J Pediatr **149**(8): 577-81.
- Cavedon, C. T., P. Bourdoux, et al. (2005). "Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry." Clin Chem **51**(4): 745-52.
- Chace, D. H., S. L. Hillman, et al. (1997). "Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitatively analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry." Clin Chem **43**(11): 2106-13.
- Chace, D. H., T. A. Kalas, et al. (2003). "Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns." Clin Chem **49**(11): 1797-817.

- Clayton, P. T., M. Doig, et al. (1998). "Screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency using electrospray ionisation tandem mass spectrometry." Arch Dis Child **79**(2): 109-15.
- Dezateux, C. (2003). "Newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: evaluating the effects on outcome." Eur J Pediatr **162 Suppl 1**: S25-8.
- Ensenauer, R., J. Vockley, et al. (2004). "A common mutation is associated with a mild, potentially asymptomatic phenotype in patients with isovaleric acidemia diagnosed by newborn screening." Am J Hum Genet **75**(6): 1136-42.
- Feillet, F., G. Steinmann, et al. (2003). "Adult presentation of MCAD deficiency revealed by coma and severe arrhythmias." Intensive Care Med **29**(9): 1594-7.
- Fingerhut, R., W. Roschinger, et al. (2001). "Hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency: acylcarnitine profiles in blood spots are highly specific." Clin Chem **47**(10): 1763-8.
- Gregersen, N., B. S. Andresen, et al. (2001). "Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation defects: Exemplified by acyl-CoA dehydrogenase deficiencies, with special focus on genotype-phenotype relationship." Hum Mutat **18**(3): 169-89.
- Gregersen, N., V. Winter, et al. (1993). "Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: the prevalent mutation G985 (K304E) is subject to a strong founder effect from northwestern Europe." Hum Hered **43**(6): 342-50.
- Gregersen, N., V. Winter, et al. (1994). "Molecular genetic characterization and urinary excretion pattern of metabolites in two families with MCAD deficiency due to compound heterozygosity with a 13 base pair insertion in one allele." J Inher Metab Dis **17**(2): 169-84.
- Haberle, J., S. Pauli, et al. (2003). "Mild citrullinemia in Caucasians is an allelic variant of argininosuccinate synthetase deficiency (citrullinemia type 1)." Mol Genet Metab **80**(3): 302-6.
- Hoffmann, G. F., R. von Kries, et al. (2004). "Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany." Eur J Pediatr **163**(2): 76-80.
- Iafolla, A. K., R. J. Thompson, Jr., et al. (1994). "Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical course in 120 affected children." J Pediatr **124**(3): 409-15.
- Karlson, P., Doenecke, D., Fuchs, G., Koolman, J., Schäfer, G. (1988). Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Knerr, I., Nennstiel-Ratzel, U., Röschinger, W., Maier, E.M., Baumkötter, J., von Kries, R. (2005). "Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel: eine klinisch bedeutsame Stoffwechselstörung." Deutsches Ärzteblatt **102**(38): 2166-2170.
- Kolvraa, S., N. Gregersen, et al. (1982). "In vitro fibroblast studies in a patient with C6-C10-dicarboxylic aciduria: evidence for a defect in general acyl-CoA dehydrogenase." Clin Chim Acta **126**(1): 53-67.

- Korman, S. H., A. Gutman, et al. (2004). "Homozygosity for a severe novel medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mutation IVS3-1G > C that leads to introduction of a premature termination codon by complete missplicing of the MCAD mRNA and is associated with phenotypic diversity ranging from sudden neonatal death to asymptomatic status." Mol Genet Metab **82**(2): 121-9.
- Kwon, C. and P. M. Farrell (2000). "The magnitude and challenge of false-positive newborn screening test results." Arch Pediatr Adolesc Med **154**(7): 714-8.
- Lehotay, D. C., J. LePage, et al. (2004). "Blood acylcarnitine levels in normal newborns and heterozygotes for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: A relationship between genotype and biochemical phenotype?" J Inher Metab Dis **27**: 81- 88.
- Leonard, J. V. and C. Dezateux (2002). "Screening for inherited metabolic disease in newborn infants using tandem mass spectrometry." Bmj **324**(7328): 4-5.
- Liebl, B., R. Fingerhut, et al. (2000). "[Model project for updating neonatal screening in Bavaria: concept and initial results]." Gesundheitswesen **62**(4): 189-95.
- Liebl, B., U. Nennstiel-Ratzel, et al. (2002). "Expanded newborn screening in Bavaria: tracking to achieve requested repeat testing." Prev Med **34**(2): 132-7.
- Liebl, B., U. Nennstiel-Ratzel, et al. (2002). "Very high compliance in an expanded MS-MS-based newborn screening program despite written parental consent." Prev Med **34**(2): 127-31.
- Liebl, B., Nennstiel-Ratzel, U., von Kries, R., Roscher, A.A. (2001). Abschlußbericht Modellprojekt Neugeborenen-Screening in Bayern. Oberschleißheim: 9-10, 15-17.
- Maier, E. M., B. Liebl, et al. (2005). "Population spectrum of ACADM genotypes correlated to biochemical phenotypes in newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency." Hum Mutat **25**(5): 443-52.
- Marsden, D., K. Sege-Petersen, et al. (1992). "An unusual presentation of medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency." Am J Dis Child **146**(12): 1459-62.
- Mathias, D. and H. Bickel (1986). "Follow-up study of 16 years neonatal screening for inborn errors of metabolism in West Germany." Eur J Pediatr **145**(4): 310-2.
- Meyburg, J., A. Schulze, et al. (2001). "Postnatal Changes in Neonatal Acylcarnitine Profile." Pediatr Res **49**(1): 125 - 129.
- Nennstiel-Ratzel, U., S. Arenz, et al. (2005). "Reduced incidence of severe metabolic crisis or death in children with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency homozygous for c.985A>G identified by neonatal screening." Mol Genet Metab **85**(2): 157-9.
- Pandor, A., J. Eastham, et al. (2004). "Clinical effectiveness and cost-effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: a systematic review." Health Technol Assess **8**(12): iii, 1-121.
- Pollitt, R. J. and J. V. Leonard (1998). "Prospective surveillance study of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the UK." Arch Dis Child **79**(2): 116-9.

- Pourfarzam, M., A. Morris, et al. (2001). "Neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency." Lancet **358**(9287): 1063-4.
- Raymond, K., A. E. Bale, et al. (1999). "Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: sudden and unexpected death of a 45 year old woman." Genet Med **1**(6): 293-4.
- Rinaldo, P., A. L. Studinski, et al. (2001). "Prenatal diagnosis of disorders of fatty acid transport and mitochondrial oxidation." Prenat Diagn **21**(1): 52-4.
- Rinaldo, P., H. R. Yoon, et al. (1999). "Sudden and unexpected neonatal death: a protocol for the postmortem diagnosis of fatty acid oxidation disorders." Semin Perinatol **23**(2): 204-10.
- Roscher, A. A., R. Fingerhut, et al. (2001). "Expanded newborn screening using tandem mass spectrometry." Monatsschr Kinderheilkd **149**: 1297-1303.
- Roschinger, W., B. Olgemoller, et al. (2003). "Advances in analytical mass spectrometry to improve screening for inherited metabolic diseases." Eur J Pediatr.
- Ruitenbeek, W., P. J. Poels, et al. (1995). "Rhabdomyolysis and acute encephalopathy in late onset medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency." J Neurol Neurosurg Psychiatry **58**(2): 209-14.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R (1992). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977." Biotechnology **24**: 104-8.
- Schulze, A., M. Lindner, et al. (2003). "Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications." Pediatrics **111**(6 Pt 1): 1399-406.
- Schulze, A., E. Mayatepek, et al. (2002). "Evaluation of 6-year application of the enzymatic colorimetric phenylalanine assay in the setting of neonatal screening for phenylketonuria." Clin Chim Acta **317**(1-2): 27-37.
- Seddon, H. R., A. Green, et al. (1995). "Regional variations in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency." Lancet **345**(8942): 135-6.
- Shetty, A. K., R. D. Craver, et al. (1999). "Delayed diagnosis of fatal medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in a child." Pediatr Emerg Care **15**(6): 399-401.
- Solis, J. O. and R. H. Singh (2002). "Management of fatty acid oxidation disorders: a survey of current treatment strategies." J Am Diet Assoc **102**(12): 1800-3.
- Spiekerkoetter, U., B. Sun, et al. (2003). "MS/MS-based newborn and family screening detects asymptomatic patients with very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency." J Pediatr **143**(3): 335-42.
- Stadler, S. C., R. Polanetz, et al. (2006). "Newborn screening for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: population heterogeneity of MCCA and MCCB mutations and impact on risk assessment." Hum Mutat **27**(8): 748-759.
- Tanaka, K., N. Gregersen, et al. (1997). "A survey of the newborn populations in Belgium, Germany, Poland, Czech Republic, Hungary, Bulgaria, Spain, Turkey, and Japan for

- the G985 variant allele with haplotype analysis at the medium chain Acyl-CoA dehydrogenase gene locus: clinical and evolutionary consideration." Pediatr Res **41**(2): 201-9.
- Touma, E. H. and C. Charpentier (1992). "Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency." Arch Dis Child **67**(1): 142-5.
- Ung, C. (1992). Newborn Screening for medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase (MCAD) deficiency in Nova Scotia. medical school, Dalhousie University.
- Van Hove, J. L., W. Zhang, et al. (1993). "Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: diagnosis by acylcarnitine analysis in blood." Am J Hum Genet **52**(5): 958-66.
- Venditti, L. N., C. P. Venditti, et al. (2003). "Newborn screening by tandem mass spectrometry for medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cost-effectiveness analysis." Pediatrics **112**(5): 1005-15.
- Wilcken, B., J. Hammond, et al. (1994). "Morbidity and mortality in medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency." Arch Dis Child **70**(5): 410-2.
- Wilcken, B., V. Wiley, et al. (2003). "Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry." N Engl J Med **348**(23): 2304-12.
- Wilson, C. J., M. P. Champion, et al. (1999). "Outcome of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency after diagnosis." Arch Dis Child **80**(5): 459-62.
- Yokota, I., P. M. Coates, et al. (1991). "Molecular survey of a prevalent mutation, 985A-to-G transition, and identification of five infrequent mutations in the medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene in 55 patients with MCAD deficiency." Am J Hum Genet **49**(6): 1280-91.
- Ziadeh, R., E. P. Hoffman, et al. (1995). "Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Pennsylvania: neonatal screening shows high incidence and unexpected mutation frequencies." Pediatr Res **37**(5): 675-8.
- Zlotogora, J. (2003). "Penetrance and expressivity in the molecular age." Genet Med **5**(5): 347-52.
- Zschocke, J., A. Schulze, et al. (2001). "Molecular and functional characterisation of mild MCAD deficiency." Hum Genet **108**(5): 404-8.
- Zytkovicz, T. H., E. F. Fitzgerald, et al. (2001). "Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program." Clin Chem **47**(11): 1945-55.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AUC	area under the receiver-operated characteristic curve
BSA	bovines Serum-Albumin; Zusatz für Restriktionsverdau
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS/MS	Elektrospray-Ionisations-Tandemmassenspektrometrie
EtBr	Etidiumbromid
G	Guanin
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim
MCAD	Medium-Chain AcylCoA Dehydrogenase
MCADD	Medium-Chain AcylCoA Dehydrogenase Defizienz, MCAD-Mangel
NGS	Neugeborenenenscreening
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
ROC	receiver-operated characteristic
T	Thymin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
wt	Wildtyp

Freies Carnitin und Acylcarnitine:

C0	freies Carnitin
----	-----------------

kurzkettige Acylcarnitine:

C2	Acetylcarnitin
C3	Propionylcarnitin
C4	Butyrylcarnitin
C5	Pentanoylcarnitin, (Iso) Valerylcarnitin, Methylbutanoylcarnitin
C5:1	Pentenoylcarnitin
C5-OH	Hydroxyisovalerylcarnitin

mittelkettige Acylcarnitine:

C6	Hexanoylcarnitin
C8	Octanoylcarnitin
C10	Decanoylcarnitin
C10:1	Decenoylcarnitin
C10:2	Decadienoylcarnitin
C12	Dodecanoylcarnitin, Lauroylcarnitin

Langkettige Acylcarnitine:

C14	Tetradecanoylcarnitin, Myristoylcarnitin
C14:1	Tetradecenoylcarnitin, Myristoleylcarnitin
C14:2	Tetradecadienoylcarnitin
C14-OH	Hydroxymyristoylcarnitin
C16	Hexadecanoylcarnitin, Palmitoylcarnitin
C16:1	Hexadecenoylcarnitin, Palmitoleylcarnitin
C16-OH	Hydroxypalmitoylcarnitin
C16:1-OH	Hydroxypalmitoleylcarnitin
C18	Octadecanoylcarnitin, Stearoylcarnitin
C18:1	Octadecenoylcarnitin, Oleylcarnitin
C18:2	Octadecadienoylcarnitin, Linoleylcarnitin
C18:1-OH	Hydroxyoleylcarnitin

Dicarboxylierte Acylcarnitine:

C4dc	Dicarboxybutyrylcarnitin
C5dc	Dicarboxypentanoylcarnitin
C6dc	Dicarboxyhexanoylcarnitin
C12dc	Dicarboxydodecanoylcarnitin

9 Danksagung

Ich möchte mich herzlich beim Team des Neugeborenen-Screenings, sowohl im Labor, als auch im Tracking des LGL in Oberschleißheim bedanken, die mich zu jeder Zeit unterstützt, beraten und aufgemuntert haben. Ganz besonders danken möchte ich hier Fr. Dr. Nennstiel.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Müller vom IBE in Großhadern, der Ordnung in die Statistik gebracht hat und Herrn Prof. Müller-Myhsok, dessen wertvolle Tipps mir die Berechnung der Heterozygotenhäufigkeiten ermöglichten.

Besonderer Dank an meine beiden Doktorväter, Prof. A.A. Roscher und seine ideensprühende Kreativität, und speziell an PD Dr. Wulf Röschinger, dessen Elan und Hartnäckigkeit diese Arbeit mit ermöglichten.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir nicht nur Studium und Dissertation finanziert haben, sondern zu allen Zeiten hinter mir standen, ebenso wie meine Schwester Laura.

10 Lebenslauf

Julia Pongratz

geb. 15.8.1978 in Göttingen

Eltern: Marianne Pongratz, geb. Eckert, Dipl. Pädagogin, Lehrerin
Dr. Joachim Pongratz, Facharzt für psychotherapeutische Medizin;
Homöopathie

Geschwister: Laura, geb. 1981, Polizeibeamte der Bundespolizei

Konfession: römisch – katholisch

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1985-1989 Grundschule an der Senftenauerstr., München
1989-1998 neusprachliches Ludwigsgymnasium München
1998 Allgemeine Hochschulreife

Studium: 1998 Studium der Humanmedizin, Ludwig- Maximilians-
Universität München
1998-2000 Vorklinischer Studienabschnitt
2000 Ärztliche Vorprüfung
2000-2005 Klinischer Studienabschnitt
2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003 Dissertationssemester
2004-2005 Praktisches Jahr:
Chirurgie, Klinikum Traunstein
Innere Medizin, Krankenhaus Starnberg
Gynäkologie / Geburtshilfe, Kantonales
Frauenspital Chur, Schweiz
2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
seit Juli 2005 Assistenzärztin, Chirurgische Klinik Dr. Rinecker,
München