



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Epigenetische Marker zur Erkennung von
Carbonylstress bei Neugeborenen mit
Ahornsirupkrankheit“

verfasst von / submitted by

Monika Matijevic

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Assoc. Prof. Bellarmine C. Item, MSc, PhD

Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle Prof. Item, der mich fachlich und menschlich stets unterstützt hat und jederzeit ein offenes Ohr für Fragen hatte. Vielen Dank für Ihre unendliche Geduld, Mühe und Hilfsbereitschaft, besonders im Ausnahmejahr 2020.

Außerdem möchte ich meinen Eltern danken, die mir dieses Studium erst ermöglicht und mich jahrelang motiviert und gestützt haben. Danke auch an meine Geschwister Tina und Leon, für jede Portion Liebe und für jede Portion Ablenkung, die ihr mir geschenkt habt.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner besseren Hälfte Dominic bedanken. Ich werde für immer gerne auf unsere gemeinsame Studienzeit zurückblicken.

Kurzfassung

Hintergrundinformation:

Maple Syrup Urine Disease (MSUD, Ahornsirupkrankheit) ist eine autosomal-rezessive Stoffwechselerkrankung, bei der durch einen Defekt im Enzym BCKAD (branched-chain ketoacid dehydrogenase) die verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin und deren korrespondierende Ketosäuren nicht abgebaut werden können. Unbehandelt kann diese Krankheit zu Ketoazidose, Neurodegeneration, Koma, und folglich zum Tod des Kindes führen. Mit einer Inzidenz von etwa 1:185.000 zählt MSUD zu den seltenen genetischen Erkrankungen. Viele Studien zeigen, dass oxidativer Stress mit dem Krankheitsgeschehen und neurologischen Schäden assoziiert ist.

Ziel:

Das Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob epigenetische Veränderungen im Methylierungsmuster des Gens für das antioxidative Enzym Glutathion-S-Transferase A4 (GSTA4) auftreten und folglich als Biomarker für oxidativen Stress und Carbonylstress angewendet werden können. Diese Veränderungen sollen durch Vergleich von kranken und gesunden Probanden, sowie Probanden mit anderen Stoffwechselerkrankungen eruiert werden.

Methode:

Es wurden Blutkärtchen aus dem Archiv des Nationalen Österreichischen Neugeborenen-Screening-Programms zur DNA-Extraktion herangezogen. Mittels Bisulfitbehandlung (welche eine Unterscheidung zwischen methylierten und nicht-methylierten Cytosinen ermöglicht) sowie anschließender PCR und Sequenzierung wurde die DNA auf ihr Methylierungsmuster in der Promoterregion des GSTA4-Gens untersucht.

Ergebnis:

Wir fokussierten uns auf die Bindungsstelle (5'-ATATTCG-3') für den Transkriptionsfaktor nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) am GSTA4-Gen. Bei einem MSUD-Patienten mit Carnitinmangel konnte eine Demethylierung der Promoterregion des GSTA4-Gens festgestellt werden. Im Anschluss an die Carnitin-Supplementierung des Patienten wurde eine partielle Methylierung statt einer Demethylierung festgestellt. Durch Carnitinmangel und daraus resultierender Erhöhung der Ketosäuren-Konzentration kommt es zu oxidativem Stress und folglich zu Lipidperoxidation. Vermutlich wurde das GSTA4-Gen als Folge der Entstehung der Carbonylverbindung 4-Hydroxynonenal (4-HNE) aktiviert, also demethyliert. Mit dieser epigenetischen Veränderung fanden wir einen potenziellen Biomarker für Carbonylstress in Patienten mit MSUD. Eine Untersuchung von größeren MSUD-Patientenkollektiven wäre notwendig, um diese Ergebnisse zu bestätigen.

Abstract

Background:

Maple Syrup Urine Disease (MSUD) is an autosomal recessive metabolic disorder caused by a defect in the enzyme BCKAD (branched-chain ketoacid dehydrogenase), which results in an accumulation of the branched-chain amino acids leucine, isoleucine and valine and their corresponding ketoacids. If left untreated, this disease can lead to ketoacidosis, neurodegeneration, coma, and consequently child death. MSUD is a rare genetic disease with an incidence of about 1:185.000. Many studies show that oxidative stress is associated with the disease process and neurological damage.

Aims:

The aim of this study is to find out whether there are epigenetic changes in the methylation pattern of the promoter region of the Glutathione-S-transferase A4 (GSTA4) gene, which encodes an antioxidant enzyme. Furthermore we wanted to ascertain if the methylation status can consequently be used as a biomarker for oxidative and carbonyl stress respectively. The epigenetic state was determined by comparing MSUD patients, healthy subjects and subjects with other metabolic diseases respectively.

Methods:

Blood cards from the archive of the National Austrian Newborn Screening Program were used for DNA extraction. The DNA was examined for its methylation pattern in the promoter region of the GSTA4 gene by means of a bisulfite treatment (which enables a distinction between methylated and non-methylated cytosines), as well as subsequent PCR and DNA sequencing.

Results:

We focused on the binding site sequence (5'-ATATTCG-3') of the transcription factor, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), which is located in the promoter region of the GSTA4 gene. In one MSUD patient with a carnitine deficiency, we found demethylation of the binding site. After carnitine supplementation in the patient, a partial methylation was observed instead of a demethylation. As carnitine deficiency results in an increased keto acid concentration, which leads to oxidative stress and consequently to lipid peroxidation, the GSTA4 gene was probably activated (demethylated) as a result of the formation of the carbonyl compound 4-hydroxynonenal (4-HNE). This epigenetic change probably suggests a potential biomarker for carbonyl stress in patients with MSUD. More research on a bigger collective of MSUD patients is needed to confirm these results.

Abkürzungsverzeichnis

4-HNE	4-Hydroxynonenal
5mC	5-Methylcytosin
A	Adenin
BCAA	Branched-chain amino acid
BCKAD	Branched-chain ketoacid dehydrogenase
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CTD	Carnitin Transporter Defekt
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnmts	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
FC	Freies Carnitin
G	Guanin
GST	Glutathion-S-Transferase
GSTA	Glutathion-S-Transferase Alpha
IVA	Isovalerianazidämie
KIC	α -Ketoisocapronsäure
KIV	α -Ketoisovaleriansäure
KMV	α -Keto- β -methylvaleriansäure
MCADD	Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel
MDA	Malondialdehyd
MM	Methylmalonazidämie
MSUD	Maple Syrup Urine Disease, Ahornsirupkrankheit
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PA	Propionazidämie
PKU	Phenylketonurie
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute
T	Thymin

Schlüsselbegriffe

MSUD

Oxidativer Stress

Carbonylstress

Epigenetik

GSTA4

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Hintergrundinformation</i>	1
1.1.1	MSUD	1
1.1.2	Neugeborenen-Screening	4
1.1.3	Epigenetik	4
1.1.4	Carbonylstress & Oxidativer Stress	5
1.1.5	GSTA4	7
1.1.6	Carnitin	8
1.2	<i>Problem der Früherkennung</i>	9
1.3	<i>Forschungsfragen</i>	10
1.4	<i>Hypothese</i>	10
1.5	<i>Forschungsziele</i>	10
2	Material	11
2.1	<i>Stanzen</i>	12
3	Methoden	13
3.1	<i>DNA-Extraktion</i>	13
3.2	<i>Bisulfitbehandlung</i>	16
3.3	<i>PCR</i>	19
3.4	<i>Gelelektrophorese</i>	24
3.5	<i>DNA-Aufreinigung</i>	26
3.6	<i>Sequenzierung</i>	27
4	Resultate	29
4.1	<i>Schmelzkurvenanalyse</i>	31
4.2	<i>Gelelektrophorese</i>	35
4.3	<i>Sequenzierung</i>	36
4.4	<i>Zusammenfassung der Resultate</i>	40
5	Diskussion	41
6	Conclusio	44
	Literaturverzeichnis	45
	Abbildungsverzeichnis	48
	Tabellenverzeichnis	49
	Anhang	50

1 Einleitung

1.1 Hintergrundinformation

1.1.1 MSUD

Die Ahornsirupkrankheit (Englisch: Maple Syrup Urine Disease, MSUD) ist eine angeborene Stoffwechselkrankheit, bei der der Metabolismus bestimmter Aminosäuren beeinträchtigt ist. Bleibt diese Erkrankung unbehandelt, können lebensbedrohliche Zustände für das Neugeborene die Folge sein. Das Neugeborenen-Screening auf MSUD sollte daher idealerweise innerhalb von 24-48 Stunden nach der Geburt erfolgen. Mithilfe von rechtzeitigem und korrektem Screening, Ernährungsberatung, ärztlicher Grundversorgung und Verlaufsüberwachung, können Neugeborene mit MSUD ein gesundes Leben führen. [5]

Die autosomal-rezessive Stoffwechselstörung wird durch einen Defekt des Verzweigt-kettige α -Ketosäuredehydrogenase-Komplex (BCKAD-Komplex) verursacht (siehe **Abbildung 1**), wodurch es zu einer Erhöhung der verzweigt-kettigen Aminosäuren (BCAA, branched chain amino acids) Leucin, Isoleucin und Valin im Blutplasma, Auftreten von α -Ketosäuren im Urin und zur Produktion des krankheitstypischen Alloisoleucin kommt. [4] Erhöhte BCAA-Werte führen zur Toxizität in Skelettmuskeln und im Gehirngewebe. [6, 7]

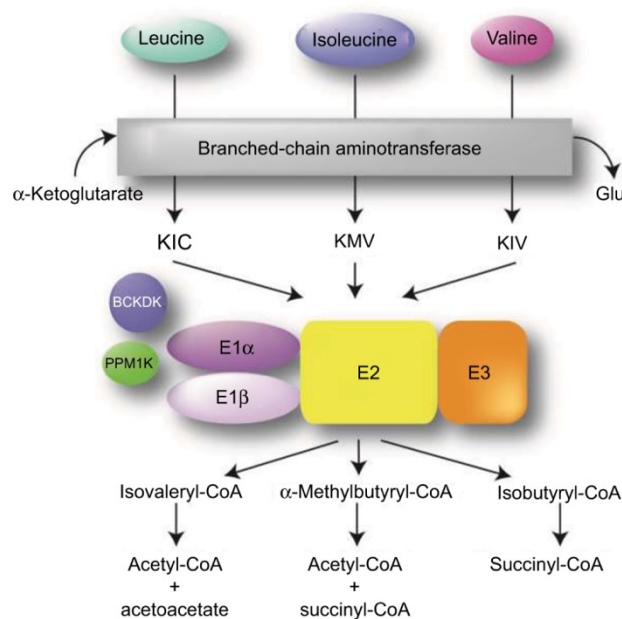


Abbildung 1: Die BCAA werden durch Branched-chain aminotransferase abgebaut, wodurch die α -Ketosäuren KIC, KMV und KIV entstehen. Diese Intermediate unterliegen der oxidativen Decarboxylierung durch BCKAD, welche bei MSUD defekt ist. [4]

Zu den Symptomen der Erkrankung in den ersten Lebenstagen gehören Entwicklungsstörung, Gedeihstörung, Ernährungsprobleme und der auffällige Ahornsirupgeruch des Ohrenschmalzes und des Urins.

Werden die Symptome nicht behandelt, kommt es zu irreversiblen neurologischen Komplikationen und in weiterer Folge zum Tod des Kindes. [4] Die physiologische irreversible Decarboxylierung findet innerhalb der inneren Mitochondrienmembran statt, katalysiert durch den BCKAD-Komplex., welcher aus den drei katalytischen Komponenten E1 (bestehend aus E1 α und E1 β), E2 und E3 aufgebaut ist. [8] Eine große Mehrheit der MSUD-Patienten hat Mutationen in der E1-Untereinheit. [9]

Das Ziel der medizinischen Ernährungstherapie ist es, durch die diätetische Beschränkung der BCAA toxische Metaboliten zu reduzieren, die Akkumulierung der BCAA zu verhindern, Katabolismus vorzubeugen und den Anabolismus durch BCAA-freie Proteine zu unterstützen. Bei schwerkranken Patienten können effektivere Methoden vonnöten sein, wie beispielsweise Dialyse, Hämofiltration oder parenterale Ernährung. [8, 10] Routinemäßiges Neugeborenen-Screening auf MSUD wird unter anderem in den USA, 22 europäischen und acht asiatisch-pazifischen Ländern durchgeführt. [11]

Die Inzidenz von MSUD liegt weltweit ungefähr bei 1:185.000. [4, 12] Einige Populationen, wie beispielsweise die Mennoniten alter Ordnung, weisen deutlich höhere Inzidenzraten (1:358) aufgrund des Gründereffekts auf. [13]

Man kann zwischen fünf verschiedenen Erscheinungsformen unterscheiden, wobei diese nicht durch den Genotyp charakterisiert sind, sondern durch das Alter bei Ausbruch der Krankheit, den Schweregrad der Symptome, das Ansprechen auf Thiamin-Supplementierung und durch biochemische Befunde. [4]

Die **klassische Form** manifestiert sich bereits in den ersten Lebenstagen und ist gekennzeichnet durch eine BCKAD-Enzymaktivität von <2%. Der Ahornsirupgeruch in Ohrenschmalz und Urin tritt bereits in der ersten Lebenswoche auf. Bleibt die klassische Form unbehandelt, weist das Neugeborene u.a. Lethargie, Apnoe, und Opisthotonus, gefolgt von Koma und Tod durch Hirnödem. [14, 15] Bei älteren Patienten mit klassischer MSUD treten bei Leuzinose (d.h. erhöhten Leucin-Werten) u.a. Oberbauchschmerzen, Anorexie, Erbrechen,

Bewegungsstörungen und psychiatrische Symptome auf. [16] In katabolen Phasen, wie beispielsweise Fieber, Infektionen, operativen Eingriffen oder körperlicher Anstrengung, können neurologische Schädigungen durch akute Leucin-Intoxikation auftreten. [17]

Die **Intermediärform** der Ahornsirupkrankheit ist charakterisiert durch eine Rest-Enzymaktivität des BCKAD von bis zu 30%. Die Betroffenen können in der neonatalen Phase als gesund erscheinen, wobei der Ahornsirupgeruch bereits auftreten kann. In den ersten Lebensjahren kann es zu Entwicklungsstörungen kommen und die Anfälligkeit für neurologische Schäden ist ähnlich wie bei der klassischen Form. [12]

Patienten mit **intermittierender Form** sind völlig asymptomatisch und weisen selbst bei uneingeschränkter Ernährung normales Wachstum und eine gesunde neurologische Entwicklung auf. In katabolen Situationen kann es zu klinischen und biochemischen Symptomen analog zu denen der klassischen Form kommen. [4]

Thiamin-responsive Ahornsirupkrankheit ist eine seltene Form, bei der Gene, die für die E2 Untereinheit des BCKAD codieren, pathogen verändert sind. Hier treten ähnliche Symptome wie bei der Intermediärform auf, wobei BCAA-restriktive Diät und Thiamin-Supplementierung zur Behandlung benötigt werden. [4, 18]

Patienten mit **E3-defizienter** MSUD zeigen unterschiedliche Symptome, breit gefächert zwischen frühen neurologischen Manifestationen bis hin zu Lebererkrankungen im Erwachsenenalter. [19, 20]

Die milderen Varianten der Krankheit können beim Neugeborenen-Screening aufgrund von normalen Leucin-Werten übersehen werden. [21] Die Dauer der pathogenen Erhöhung des Leucin-Werts von über 1000 $\mu\text{mol/L}$ korreliert mit dem intellektuellen Fortschritt des Kindes. [22, 23] Der Zielwert der Leucin-Plasmakonzentration in Säuglingen und Vorschulkindern sollte daher 200 $\mu\text{mol/L}$ nicht übersteigen. Eine frühe Diagnose von MSUD, die schnelle Senkung der Leucin-Werte auf unter 1000 $\mu\text{mol/L}$ sowie die langzeitliche biochemische Überwachung haben zusammen einen sehr wichtigen Einfluss auf die geistige und intellektuelle Entwicklung der Patienten. [24]

1.1.2 Neugeborenen-Screening

Im Jahr 1966 wurde das österreichische Neugeborenen-Screening-Programm für angeborene Stoffwechselstörungen und Endokrinopathien eingeführt. Ungefähr vier Millionen Babys, von denen über 2600 Stoffwechselanomalien aufwiesen, wurden in den letzten fünf Jahrzehnten hierzulande untersucht. [25] Seit der Einführung der MS/MS (Tandem Massenspektrometrie) im Jahr 2002 wurde die Detektion solcher Erkrankungen signifikant erhöht. Unter anderem werden Neugeborene auf Phenylketonurie, Galaktosämie, Hypothyreose, Cystische Fibrose, Fettsäureoxidationsstörungen, Organazidopathien und Aminosäureabbaustörungen (wie z.B. MSUD) untersucht. Für diesen Zweck wird durch einen Stich in die Ferse etwas Blut des Neugeborenen auf eine Filterpapierkarte übertragen und an das Neugeborenen Screening Laboratorium der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, an der Medizinischen Universität Wien in Österreich, geschickt. [26]

1.1.3 Epigenetik

Unter Epigenetik versteht man die Lehre der Modifikationen der DNA, die sich auf die Expression von Genen auswirkt, unabhängig von der DNA-Sequenz. Ein gut untersuchtes Beispiel für eine solche Modifikation ist die Methylierung von Nukleotiden (siehe **Abbildung 2**), wodurch die Expression der Gene verändert wird. [27] Die Mehrheit dieser DNA-Methylierungen findet sich auf Cytosinen, denen ein Guanin folgt, den sogenannten CpG-sites, auch CpG-Dinukleotide genannt. [28] DNA-Methyltransferasen (Dnmts) übertragen hierzu Methylgruppen vom S-Adenosylmethionin an die C-5 Stelle des Cytosins. Hierbei entsteht 5-Methylcytosin (5mC). [29] Weitere Beispiele für epigenetische Mechanismen sind Chromatinremodelling Komplexe, Histon-Modifikationen und nicht-codierende RNAs. Diese Prozesse regulieren die Bindung der Transkriptionsmaschinerie an die DNA oder modulieren die Chromatin-Struktur und die Genexpression wird beeinflusst. Verschiedene Umweltfaktoren, wie beispielsweise Ernährung, Rauchen, Alkoholkonsum und Stress, wirken sich auf die genannten Mechanismen aus. [30]

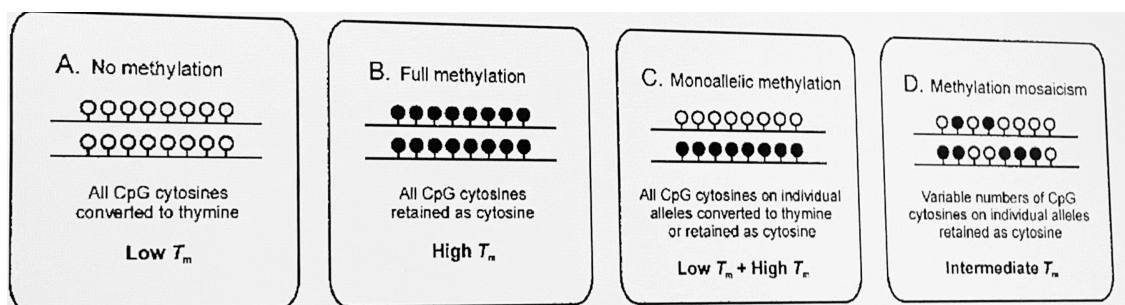


Abbildung 2: Mögliche Methylierungsmuster der DNA. [31]

1.1.4 Carbonylstress & Oxidativer Stress

Oxidativer Stress entsteht erst durch ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien, z.B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS), und Antioxidantien. Oxidantien, die durch normale metabolische Prozesse entstehen [32], können bei übermäßigem Vorhandensein diverse Schäden anrichten und mit unterschiedlichen Krankheiten assoziiert werden [33], wie beispielsweise Bluthochdruck [34], Diabetes [35] oder neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer. [36] In vielen Fällen kommt es durch oxidativen Stress zur Produktion von reaktiven Carbonylen, die möglicherweise durch ihre Anwesenheit zu zellulären Schäden führen. Das Resultat des oxidativen Stresses ist also u.a. die endogene Entstehung von reaktiven Carbonylen, hauptsächlich durch Oxidation bzw. Peroxidation von Lipiden und durch Glykoxidierung (siehe **Abbildung 3**). [2]

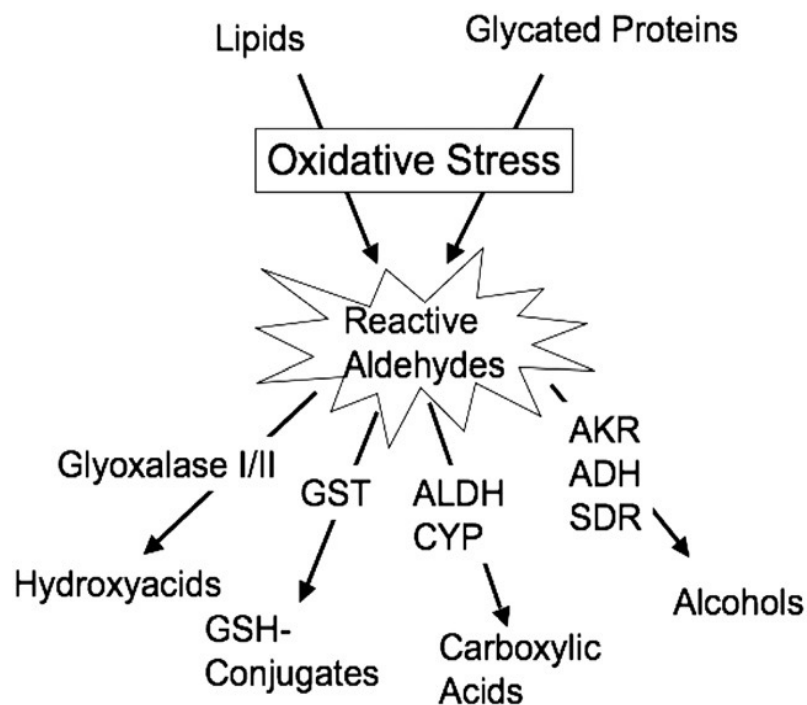


Abbildung 3: Reaktive Aldehyde, entstanden als Konsequenz von oxidativem Stress, und deren Umwandlung durch unterschiedliche Enzyme. [2]

Am besten charakterisiert sind hierbei die reaktiven Aldehyde. Zu ihnen zählen Malondialdehyd (MDA), Hexanal, Acrolein, Glyoxal, Crotonaldehyd, trans-2-Nonenal, 4-Oxo-2-Nonenal, und 4-Hydroxy-2-Nonenal (4-HNE), welche sich allesamt von mehrfach ungesättigten ω -6-Fettsäuren ableiten (siehe **Abbildung 4**). [37-39] Zu den exogenen Antioxidantien zählen beispielsweise Ascorbinsäure (Vitamin C), alpha-Tocopherol (Vitamin E), Resveratrol, Flavonoide, Zink und Arzneistoffe wie Acetylcystein. [40]

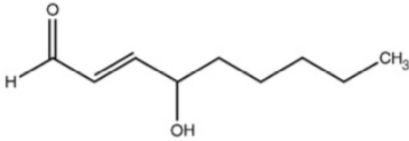
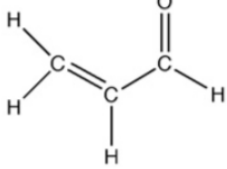
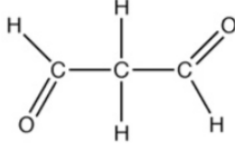
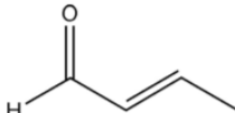
Structure	Name
	4-hydroxynonenal
	Acrolein
	MDA
	Crotonaldehyde

Abbildung 4: Beispiele für reaktive Aldehyde als Produkt von oxidativem Stress. [2]

Reaktive Carbonyle können fatale Folgen für die Zelle haben. Sie können die Funktion von Proteinen und Enzymen stören, Lipidmembranen beschädigen und zur Formierung von DNA-Addukten führen, worauf der Zelltod folgen kann. [41] Durch körpereigene Enzyme können sie in weniger toxische Produkte umgewandelt werden (siehe **Abbildung 3**). Zu diesen Enzymen gehören beispielsweise die Glutathion-S-Transferase (GST), Aldehyddehydrogenase (ALDH), oder Cytochrom P450 (CYP). Bewerkstelligt wird diese Umwandlung in Abbauprodukte durch Oxidation/Reduktion (Phase 1) oder durch Konjugation (Phase 2). [2] Akkumulierende Ketosäuren, wie sie bei MSUD auftreten, können oxidativen Stress verursachen. Bei mit MSUD diagnostizierten Neugeborenen treten außerdem erhöhte Level an Lipidperoxidation, sowie eine erniedrigte Antioxidantien-Kapazität auf. [42]

1.1.5 GSTA4

Glutathion-S-Transferasen haben die Aufgabe, verschiedene Aldehyde, die als Resultat von oxidativem Stress entstanden sind, mit Glutathion (GSH) zu verknüpfen. Dies stellt einen äußerst wichtigen Entgiftungsmechanismus dar. [43] Sie werden weiters in Familien unterteilt, wie beispielsweise Glutathion-S-Transferase Alpha (GSTA), wobei es GSTA1 bis GSTA5 gibt. [2] Sie sind hauptsächlich lokalisiert im Cytosol, jedoch finden sich auch mitochondriale und mikrosomale Glutathion-S-Transferasen. [44] Verschiedene GST wurden in für oxidativen Stress anfälligen Geweben nachgewiesen, u.a. im Gehirn, in der Aorta und im Herzen. [45] Trotz sehr ähnlicher Sequenzen, weisen die GST der alpha-Familie unterschiedliche Spezifitäten für Substrate auf. Das GSTA4-Enzym ist bekannt für die Konjugation von Glutathion mit Lipidperoxidationsprodukten und ist allgemein anerkannt für den selektiven Abbau von 4-HNE (siehe **Abbildung 5**). [46, 47]

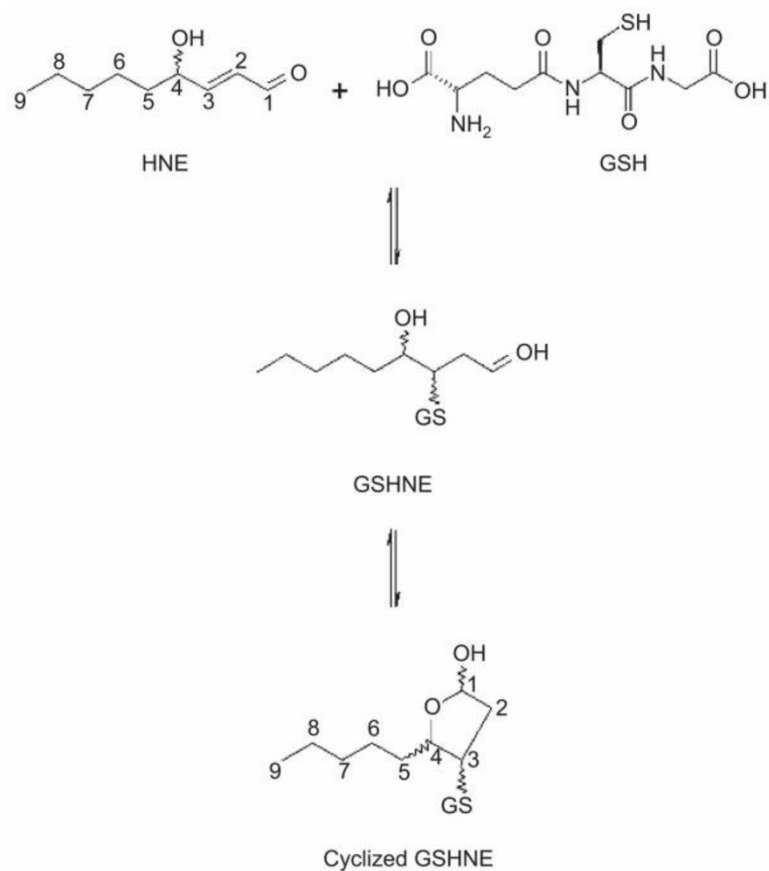


Abbildung 5: Reaktion von GSH mit HNE, gefolgt von einer intramolekularen Cyclisierung. [3]

1.1.6 Carnitin

Bei Patienten mit MSUD verursachen toxische Metaboliten neuronale Apoptose, Krämpfe, und Störungen der Funktion und Entstehung von Neurotransmittern. Außerdem wird der Eintritt von essentiellen Aminosäuren ins Gehirn verhindert. [48] Eine Studie hat gezeigt, dass die Akkumulierung von Metaboliten in MSUD-Patienten die Radikalproduktion erhöht und antioxidative Abwehrmechanismen abgeschwächt werden. [49] Die genauen Mechanismen, die zu Gehirnschädigungen bei MSUD führen, sind jedoch weiterhin unbekannt. Viele Studien zeigen, dass oxidativer Stress zu diesen Schädigungen beiträgt und dass L-Carnitin in MSUD-Patienten signifikant erniedrigt ist. Dieses Defizit ist vor allem bei MSUD-Patienten vorhanden, die mithilfe von BCAA-freien Aminosäuremischungen und proteinarmer Ernährung behandelt werden.

L-Carnitin ist ein essentielles Molekül, welches langkettige Fettsäuren, die für β -Oxidation und ATP-Produktion benötigt werden, in die Mitochondrien transportiert und die antioxidative Kapazität erhöht, und zwar durch die erniedrigte Lipidperoxidation und die gesteigerte Clearance von freien Radikalen. Das Molekül wird sowohl im Körper selbst produziert (zu ca. 25%) und durch Nahrung, wie z.B. durch rotes Fleisch, Milch und Nüsse, aufgenommen (zu ca. 75%). Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Parkinson und Alzheimer, schützt es Zellen vor oxidativen Schäden. Das L-Carnitin Level korreliert jedoch in Bezug auf MSUD nicht mit den Plasmawerten von Leucin, Isoleucin und Valin. L-Carnitin spielt also eine wichtige Rolle als Antioxidans in der Behandlung von Patienten mit MSUD, wobei es noch keine Daten zur idealen Dosis der L-Carnitin-Supplementierung gibt. Die Gabe kann als ergänzende Therapie angesehen werden. [50]

1.2 Problem der Früherkennung

Es ist wichtig zu erwähnen, dass die Messung von Biomarkern für oxidativen Stress eine Lücke in der Wissenschaft darstellt. Verschiedene Biomarker wurden bei verschiedenen Krankheiten erforscht, daher ist es schwierig eine allgemeine Schlussfolgerung für jene zu tätigen. Die WHO (World Health Organization) definiert Biomarker als eine Substanz, eine Struktur oder einen Prozess, den man im Körper oder in Körperflüssigkeiten messen kann und der eine Krankheit beeinflussen bzw. voraussagen kann. Um von klinischem Nutzen zu sein, muss ein Biomarker in angemessener Weise stabil, in einem leicht zugänglichen Gewebe vorhanden, und kosteneffektiv messbar sein. [51]

Fest steht, dass die direkte Messung von 4-HNE, einem Marker für oxidativen Stress, unempfindlich und somit ungenau ist, da das Aldehyd meistens an ein Protein gebunden ist und somit von der Nachweismethode nicht detektiert wird. [39]

1.3 Forschungsfragen

In dieser Studie wird der Methylierungszustand des GSTA4-Gens, welches für das antioxidative Enzym Glutathion-S-Transferase codiert und somit unter anderem 4-HNE abbaut, aus epigenetischer Sicht untersucht. Hierzu werden sowohl Proben von MSUD-Patienten als auch Proben von Gesunden herangezogen. Außerdem wird analysiert, ob sich Unterschiede im Methylierungsmuster als Biomarker für Carbonylstress bei Neugeborenen mit Ahornsirupkrankheit eignen könnten. Daraus ergeben sich folgende Fragen:

- Gibt es einen Unterschied in der Methylierung des GSTA4-Gens zwischen MSUD-Patienten und Kontrollen?
- Wenn ja, besteht die Möglichkeit, das Methylierungsmuster als Biomarker für Carbonylstress bei Neugeborenen mit früh diagnostizierter MSUD heranzuziehen?

1.4 Hypothese

Die Alternativhypothese dieser Forschungsarbeit besagt, dass Unterschiede im Methylierungszustand, und somit auch in der Genexpression von GSTA4, zwischen Gesunden und Patienten mit diagnostizierter MSUD vorliegen.

Die Nullhypothese ist, dass kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht.

1.5 Forschungsziele

1. Mithilfe von DNA-Extraktion, Bisulfitbehandlung, PCR mit darauffolgender hochauflösender Schmelzkurvenanalyse und anschließender DNA-Sequenzierung wird der Methylierungszustand der NF- κ B Bindungsstelle des GSTA4-Gens sowohl bei MSUD-Patienten als auch bei gesunden Kontrollen untersucht.
2. Es soll eruiert werden, ob der Methylierungszustand des Genabschnitts als Biomarker für Carbonylstress bei Neugeborenen mit diagnostizierter MSUD in Erwägung gezogen werden kann.
3. Die Methylierungszustände werden mit denen anderer angeborener Stoffwechselerkrankungen, darunter Phenylketonurie (PKU), Isovalerianazidämie (IVA), Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (MCADD), Methylmalonazidämie (MM), Propionazidämie (PA) und Carnitin-Transporter-Defekt (CTD), verglichen.

2 Material

Die retrospektive Untersuchung von blutgetränkten Filterpapierkärtchen (siehe **Abbildung 6**) aus dem Neugeborenen-Screening-Programm an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde der MedUni Wien ist die Grundlage dieser Arbeit. Im Rahmen des Screenings wurde die Leucin-Blutkonzentration von Neugeborenen mittels Tandemmassenspektrometrie ermittelt, um eine Leuzinose (Synonym für MSUD) festzustellen.

Untersucht wurden drei Gruppen. Die erste Gruppe bestand aus Neugeborenen mit frühdiagnostizierter Ahornsirupkrankheit. In die Studie eingeschlossen wurden hierbei Patienten, die einen Leucin-Wert von $>400\mu\text{mol/L}$ aufwiesen. Die zweite Gruppe stellt gesunde Kontrollen dar, mit einem jeweiligen Leucin-Wert von $<400\mu\text{mol/L}$. In der dritten Gruppe wurden Patienten mit anderen Stoffwechselerkrankungen (IVA, MCADD, PKU, MM, PA) auf die Methylierung des GSTA4-Gens an der NF- κ B Bindungsstelle untersucht.

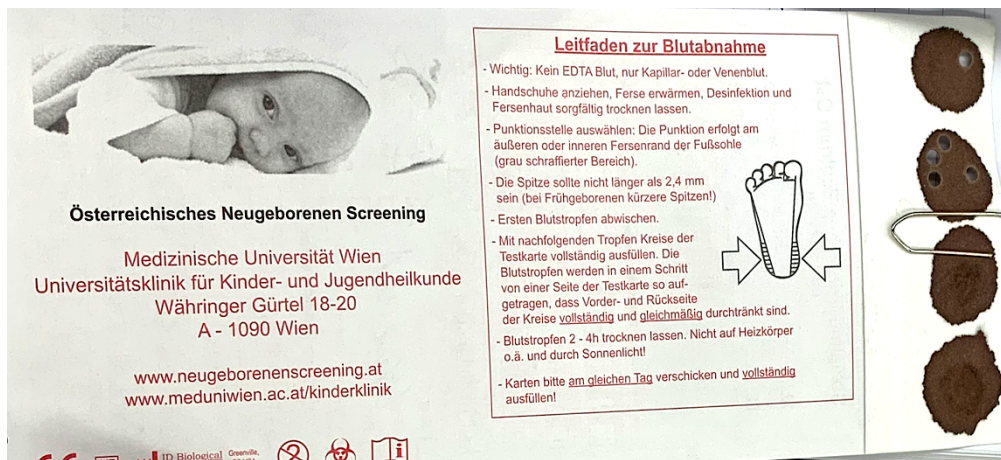


Abbildung 6: Filterpapierkärtchen aus dem Neugeborenen-Screening mit getrockneten Blutproben

Die Kärtchen wurden aus dem Archiv der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde herausgesucht und wie im folgenden Schritt beschrieben gestanzt.

2.1 Stanzen

Aus den getrockneten Blutflecken, die der Ferse von Neugeborenen am dritten Lebenstag (mindestens 36 Stunden nach der Geburt) entnommen wurden, werden nun drei Plättchen pro Probe gestanzt, die in einer Mikrotiterplatte landen und später in ein beschriftetes Eppendorf-Röhrchen (in der weiteren Arbeit auch als Eppi bezeichnet) mittels einer desinfizierten Nadel übertragen. Das Stanzgerät WALLAC DBS PUNCHER (siehe **Abbildung 7**) stanzt hierbei kleine Plättchen mit einem Durchmesser von 3,2mm.

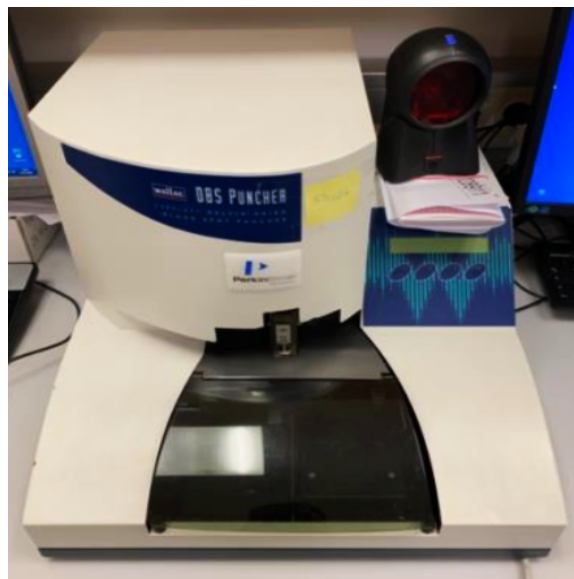


Abbildung 7: Stanzgerät Wallac DBS Puncher

3 Methoden

3.1 DNA-Extraktion

Kurze Beschreibung:

Die DNA der Neugeborenen-Blutproben auf den Filterpapierkärtchen muss zunächst aus dem Zellkern herausgelöst, also extrahiert, werden. Dies geschieht durch Lyse der Erythrozyten und nachfolgender Ausfällung des Erbmaterials mit Ethanol. In den darauffolgenden Schritten muss die DNA mittels Säulchenmethode gewaschen und aus der Säule eluiert werden. Nun steht die gereinigte DNA, frei von Filterpapier und anderen Zellbestandteilen, zur weiteren Aufarbeitung und Analyse zur Verfügung.

Vorbereitung:

Einige Reagenzien des hierbei verwendeten Kits „QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)“ der Firma Qiagen (siehe **Abbildung 8**), die eine Vorbehandlung benötigten, mussten vor der Durchführung der Extraktion aufgelöst bzw. verdünnt werden.



Abbildung 8: DNA-Extraktionskit „QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)“

Folgende Vorbereitungsschritte mussten daher vorgenommen werden:

- Waschpuffer 1- Konzentrat (AW1) mit 25ml Ethanol 96% verdünnen.
- Waschpuffer2-Konzentrat (AW2) mit 30ml Ethanol 96% verdünnen.
- Proteinkinase K-Lyophilisat in 1,2ml Proteaselösung auflösen.

Zum rascheren Ablauf der Extraktion wurden im Voraus diverse Geräte vorbereitet (siehe **Abbildung 9**). Der „Eppendorf Thermomixer comfort“ wurde auf 85°C und 11 Minuten eingestellt, mit einer Schüttelfrequenz von 10 Sekunden bei 650rpm. Die Zentrifuge „Eppendorf Centrifuge 5415R“ wurde auf 1 Minute eingestellt, bei einer Temperatur von 20°C und 8,0krpm. Das Vortex-Gerät wurde eingeschaltet und verwendet, um diverse Lösungen zu mischen bzw. zur Auflösung von festen Bestandteilen.



Abbildung 9: v.l.n.r.: Thermomix; Eppendorf Centrifuge; Vortex-Gerät

Durchführung:

In die Eppis, die jeweils drei Blutstanzen enthielten, mussten 180µl ATL-Buffer pipettiert werden. So wurde durch anschließendes Zentrifugieren und Vortexen das Blut aus dem Filterpapier herausgelöst. Wichtig ist es, darauf zu achten, mithilfe des regelmäßigen Wechsels der Pipettenspitzen (nach jedem Pipettierschritt) eine Kontaminierung der Proben untereinander zu vermeiden. Die Eppis wurden danach bei 80°C für 11 Minuten im Thermomixer inkubiert. Daraufhin wurde abzentrifugiert, um den gesamten Inhalt in den unteren Bereich der Eppis zu bringen. Die Lösung war nun deutlich rot eingefärbt durch das herausgelöste Blut.

Der Thermomixer wurde für den späteren Ablauf auf 56°C und 1h eingestellt. In die Eppis kamen nun 20µl Proteinkinase K, wobei bei einer so geringen Menge auf die vollständige Entleerung der Pipettenspitze geachtet werden musste. Die Proben wurden gevortext und zentrifugiert, um danach für eine Stunde im Thermomixer bei 56°C inkubiert zu werden. Hierbei greift die Proteinkinase Proteine an, baut sie ab und setzt so die DNA frei.

Nach der Inkubation folgte erneut ein Vortex- und Zentrifugierungsschritt und es wurden 200µl AL-Puffer, bei langsamem Aufziehen aufgrund dessen hoher Viskosität, in die Eppis pipettiert. Hierbei musste im Anschluss 1-2 Minuten gevortext werden, um danach zu zentrifugieren. Die Eppis kamen zur erneuten Inkubation, diesmal bei 70°C und für 11 Minuten, in den Thermomixer. Zwischendurch wurde einmal gevortext, um die Ausbeute möglichst zu optimieren. Anschließend wurde zentrifugiert.

Um die DNA auszufällen, musste man darauffolgend 200µl Ethanol 96% in jedes Eppi hinzufügen. Eine sichtbare Trübung signalisierte die Ausfällung des Erbmaterials, da die Löslichkeit der DNA in Ethanol verringert ist. Danach wurde gründlich gevortext und kurz abzentrifugiert.

Der Eppi-Inhalt wurde nun auf eine beschriftete Säule mit Auffangbehälter übertragen („QIAamp Mini Spin Column“), um die DNA von der Lösung zu trennen. Um ebenso die Ausbeute zu erhöhen, wurden die kreisrunden Filterpapierplättchen am Rand des Eppis ausgedrückt, um möglichst viel Probe und somit DNA zu erhalten.

Die Säule musste bei 8,0krpm eine Minute lang zentrifugiert werden, um die gesamte Lösung durch die Säule zu befördern. Die DNA blieb hierbei durch ionische Wechselwirkungen an der Säule hängen. Das Auffangbehältnis wurde samt Flüssigkeit verworfen und durch ein neues ersetzt.

Mittels Waschsritten mit den Waschpuffern AW1 und anschließend AW2 (jeweils 500µl) wurde die DNA gesäubert. Ein frisches Eppi (1,5ml) wurde unterhalb der Säule platziert. Durch zweiminütige Einwirkung von 45µl Elutionspuffer und anschließendes Zentrifugieren für eine Minute wurde die DNA eluiert und musste im Eppi bei -20°C gelagert werden.

3.2 Bisulfitbehandlung

Kurze Beschreibung:

Die Bisulfitbehandlung dient in der epigenetischen Untersuchung von DNA dazu, methylierte Cytosine von nicht-methylierten unterscheiden zu können. Hierbei werden nämlich nicht-methylierte Cytosine zu Uracilen umgewandelt. Methylierte Cytosine bleiben unverändert (siehe **Abbildung 10**).

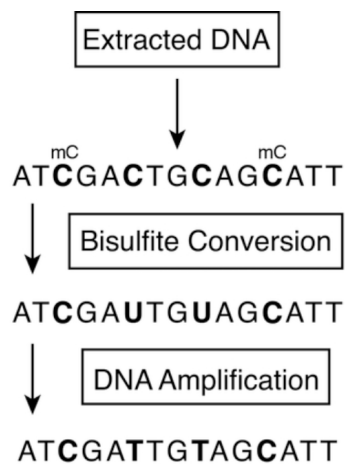


Abbildung 10: Prinzip der Bisulfitkonvertierung. (mC=5-Methylcytosin) [52]

Vorbereitung:

Verwendet wurde das „EpiTect Bisulfit Kit (48)“ der Firma Qiagen (siehe **Abbildung 11**).

Folgende Reagenzien mussten vorbereitet bzw. aufgelöst werden:

- Waschpuffer-Konzentrat mit 30ml Ethanol 96% versetzen und mischen.
- Lyophilisierte Carrier RNA mit 310µl RNase freiem Wasser versetzen und vortexen.
- Bisulfit Mix mit 800µl RNase freiem Wasser versetzen und vortexen. Bei 60°C für 6 Minuten im Thermomixer inkubieren und danach vortexen.



Abbildung 11: „EpiTect Bisulfit Kit (48)“

Durchführung:

Von der extrahierten DNA mussten 40µl in ein 0,5ml Eppi pipettiert werden. Falls die Menge nicht ausreichend war, musste man mit RNase freiem Wasser auf 40µl auffüllen. Hinzu kamen noch 85µl Bisulfit Mix und 15µl DNA Protect Buffer, welches vorher kurz gevortext wurde. Die Lösung hatte nun eine blaue Farbe, was einen korrekten pH-Wert und somit das Vorliegen von DNA signalisiert. Insgesamt hat man nun einen Inhalt von 140µl vorliegen. Das Röhrchen wurde gevortext und zentrifugiert, um danach im Gerät „Eppendorf Mastercycler gradient“ (siehe **Abbildung 12**) das nachfolgende fünfstündige Programm zu durchlaufen.



Abbildung 12: Eppendorf Mastercycler gradient

5 Minuten	95°C	Denaturation
25 Minuten	60°C	Incubation
5 Minuten	95°C	Denaturation
85 Minuten	60°C	Incubation
5 Minuten	95°C	Denaturation
175 Minuten	60°C	Incubation
indefinite	20°C	Hold

Tabelle 1: Einstellung des Programms im Mastercycler

Nachdem das Programm durchlaufen war, konnten die Proben durch die Einstellung „Hold“ über Nacht bei 20°C gelagert werden.

In einem 15ml Röhrchen wurden BL-Puffer und CarrierRNA vermischt, und zwar so, dass pro Proben-Eppi 625µl BL-Puffer und 6,25µl CarrierRNA vorhanden waren. Nach der vollständigen Durchführung des Programms im Mastercycler, wurden die Proben in jeweils neue 1,5ml Eppi-Röhrchen pipettiert. Nun musste man die Proben aufreinigen.

Vom dem BL-Buffer und CarrierRNA Gemisch kamen 560µl in die Eppis. Danach wurde gründlich gevortext. Das Eppi musste zentrifugiert werden, um die Lösung vom Deckel hinunterzudrücken. Der gesamte Inhalt wurde nun in eine Spin Column, die im Kühlschrank gelagert wird, übertragen, wobei die Pipette auf 500µl eingestellt wurde. Nun wurde eine Minute lang bei maximaler rpm-Einstellung zentrifugiert, um die Flüssigkeit durch die Säule zu drücken. Das Filtrat wurde verworfen, um dann 500µl Buffer BW (Wasch-Puffer) auf die Säule zu geben. Danach wurde erneut bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der Auffangbehälter erneut aufgesetzt. Anschließend kamen 500µl Buffer BD (Desulfonierungspuffer) auf die Säule, wobei die Zeit auf 15 Minuten eingestellt wurde, um eine Einwirkzeit zu gewährleisten. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur wurde zentrifugiert, um darauffolgend mit 500µl Waschpuffer die Säule zu waschen und zu zentrifugieren. Nach erneuter Zentrifugation für eine Minute (Trocknung) konnte man das Auffanggefäß verwerfen und die Säule alleine in den Thermomixer geben. Die Säule ließ man für 6 Minuten bei 56°C inkubieren. Hierbei ließ man den Deckel des Thermomixers und den der Säule offen, um eine vollständige Trocknung und dadurch Entfernung des Ethanols zu gewährleisten.

Nach der Trocknung kam die Spin Column in ein frisches 1,5ml Eppi, und darauf 20µl Elutionspuffer, welchen man zwei Minuten einwirken lassen musste. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 12,0krpm für eine Minute hat man das Eluat im unteren Eppi. Inzwischen bereitete man vier kleinere Röhrchen (200µl) auf einem Metallblock auf Eis vor, um das Eluat auf 4µl pro Röhrchen aufzuteilen.

Man hatte am Ende der Bisulfitbehandlung pro Probe 4 Eppis mit jeweils 4µl bisulfitbehandelter DNA, die im Anschluss für die PCR verwendet wurden. Die DNA-Probe muss bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

3.3 PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (englisch: Polymerase-Chain-Reaction) werden kurze, definierte Stücke der DNA in einem hohen Ausmaß und in kurzer Zeit vervielfältigt. Durch wiederholte Schritte der Denaturierung, Anlagerung und Elongation wird dies bewerkstelligt. Ein allgemeines Prinzip der PCR ist schematisch in **Abbildung 13** dargestellt.

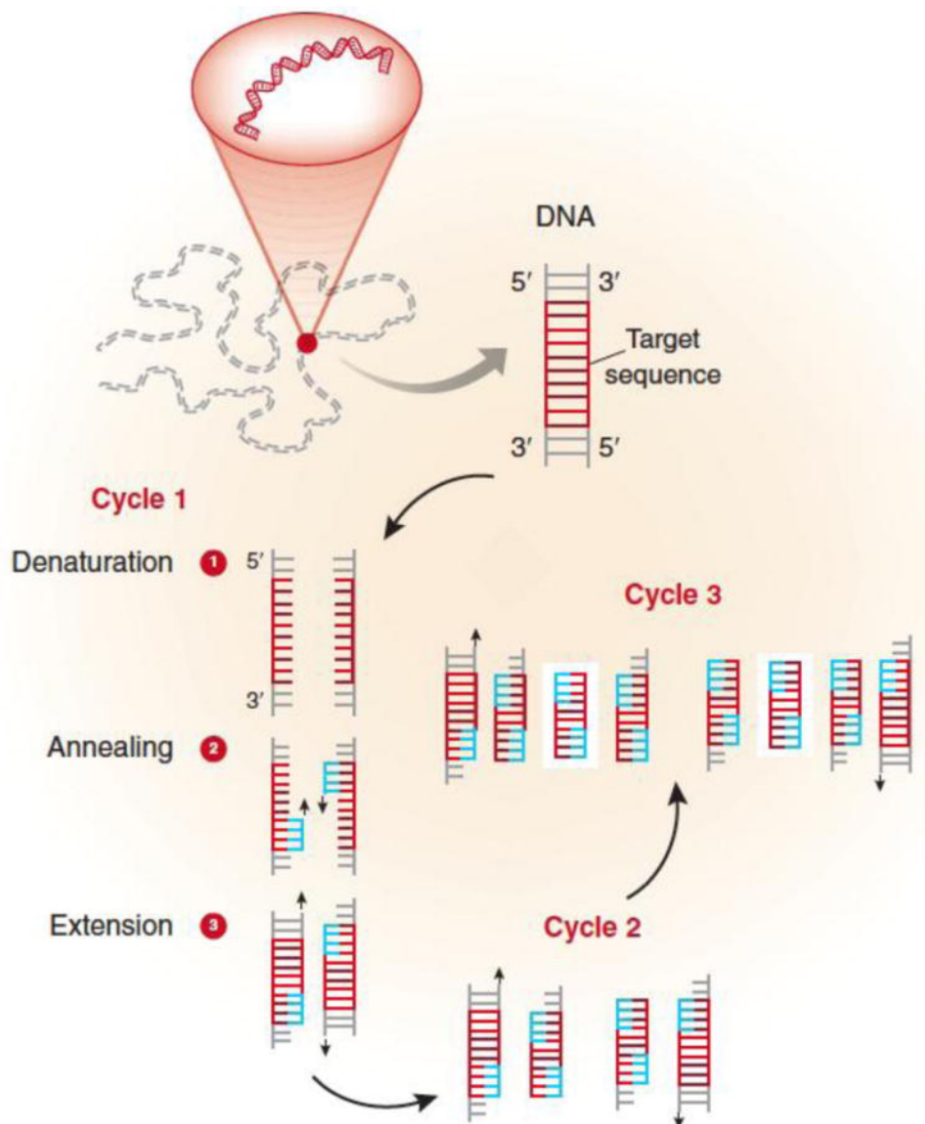


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Prinzips einer PCR. [1]

Kurze Darstellung:

Um die Amplifikation, also Vermehrung von DNA-Abschnitten, durchzuführen, werden verschiedene Komponenten benötigt. Dazu gehören die DNA-Probe (welche zuvor bisulfitbehandelt wurde), die DNA-Taq-Polymerase, Mg^{2+} als Cofaktor und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) als Bausteine für die DNA-Amplifikation. Außerdem ist es wichtig, ein sogenannte Positiv-Probe, welche aus methylierter DNA besteht, in die PCR miteinzubeziehen. Für die Durchführung wurde das Gerät „Rotorgene 6000“ der Firma Corbett (siehe **Abbildung 14**) verwendet. Zwei Negativ-Proben, bestehend aus RNase freiem Wasser, wurden ebenso miteingeschlossen, um die Spezifität der Primer zu gewährleisten.



Abbildung 14: PCR-Gerät „Rotorgene 6000“ von Corbett

Im Grunde genommen besteht die PCR aus drei Schritten. Bei der Denaturierung zu Beginn werden die Doppelstränge der DNA bei hoher Temperatur voneinander getrennt, damit Einzelstränge vorliegen, um für die Primer erreichbar zu sein. In der darauffolgenden Anlagerung (englisch: Annealing) binden die Vorwärts- und Rückwärts-Primer an die einzelsträngige DNA, wobei die Temperatur durch das Gerät gesenkt werden muss. Im dritten Schritt kommt es zu Elongation der DNA durch komplementäre Platzierung der dNTPs mithilfe der Polymerase. Nun hat man eine neu synthetisierte doppelsträngige DNA vorliegen. Im erneuten Ablauf dieser drei PCR-Schritte kommt es zur exponentiellen Vermehrung eines bestimmten und gewünschten DNA-Abschnitts.

Vorbereitung:

Vor der Durchführung der Polymerase Kettenreaktion mussten einige Vorbereitungen getroffen werden. Das Kit „Epitect HRM PCR Kit (100)“ der Firma Qiagen wurde für die Probenvorbereitung verwendet. Alle Schritte fanden hierbei in einer mit Eis gefüllten Styropor-Box statt, auf der ein Metallblock platziert wurde. Direkt in das Eis wurden die einzelnen Primer, der Epitect HRM Mastermix (bestehend aus Taq-Polymerase, an den Farbstoff EvaGreen gekoppelten dNTPs und einem Reaktionspuffer), MgCl₂, RNase freies Wasser und die methylierte Kontrolle vorgelegt (siehe **Abbildung 15**).

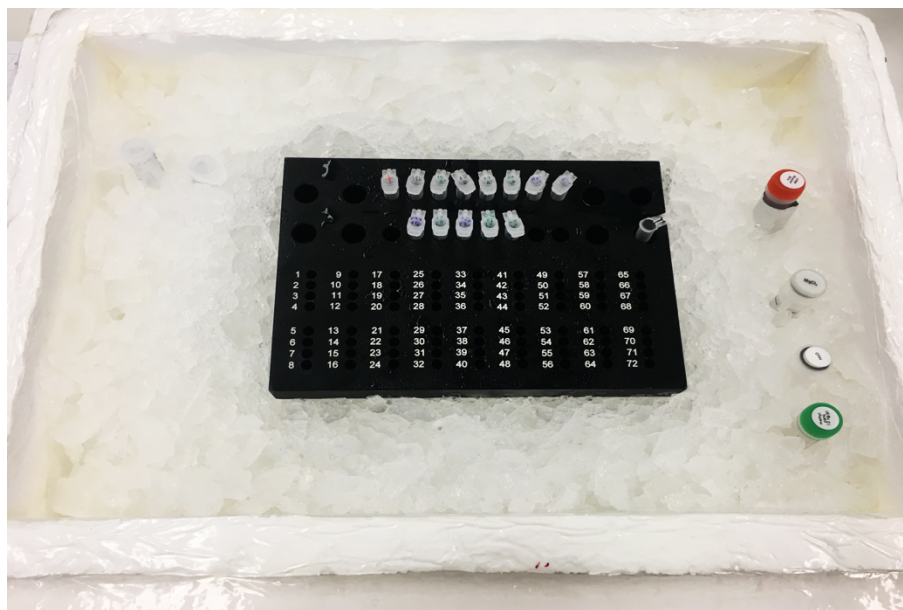


Abbildung 15: Probenvorbereitung für die PCR.

Der Mastermix wurde vorher mit Alufolie umwickelt, um ihn aufgrund der Empfindlichkeit vor Licht zu schützen. Das zuvor bestellte Primer-Lyophilisat musste laut Synthese Report der Firma eurofins (siehe **Abbildung 16**) gründlich in TRIS/EDTA-Puffer aufgelöst und im Anschluss mit RNase freiem Wasser verdünnt werden. Man erhielt somit eine endgültige Konzentration von 10pmol/ml pro Primer.

eurofins | Genomics Seite 1/1

Oligonukleotid-Synthesebericht

medizinische Universität Wien
Kinder und Jugendheilkunde

Auftrags-Nr.: 6991907/11106991907-1
Kunden-Nr.: 87000190
Kd-Auftrags-Nr.: E-Mail 11.08.

Auftragsdatum: 20.08.2020
Labor Nr.: 4054
Anzahl Oligos: 2/2

Eurofins Genomics
Anzingerstraße 7a
D- 85560 Ebersberg

Nr.	Oligoname	Sequenz (5' -> 3')	OD	µg	nmol	Konzentration [pmol/µl]	Vol. für 100pmol/µl	Tm [°C]	MW [g/mol]	GC-Gehalt	Synthese Maßstab	Reinigung	Modifikation	Barcode IDO	QC Report
1	gsta4aFw	ATTCGTATATTTTGATC GAAGATC (25)	5.37	148	19,3	-	193	54,8	7661	28 %	0.05 µmol	HPLC	-	0 2 7 9 6 1 2 0 0	Maldi
2	gsta4agcRev	CGGGCGGGGGCGCGG GACGGCCCGGAATATA AAAACGATCTAACTACG AC (52)	7.55	206	12,7	-	127	> 75	16187	63,5 %	0.05 µmol	HPLC	-	0 2 7 9 6 1 2 0 1	Maldi

Abbildung 16: Bestellprotokoll der Primer

Kurz bevor man diese zur Probe hinzugibt, werden die gewünschten und zusammengehörigen Vorwärts- und Rückwärts-Primer zu gleichen Teilen, und zwar zu je 7µl, in einem 200µl-Eppi gut vermischt.

Durchführung:

Alle verwendeten 200µl Eppis werden sorgfältig beschriftet, ebenso die Positiv-Probe und zwei Negativ-Proben. Die Kontrollprobe dient später in der Schmelzkurvenanalyse als Vergleich zur Proben-DNA. Die Negativ-Probe zeigt an, ob der Primer in Wasser einen Peak ergibt, was nicht vorkommen sollte, da er als unspezifisch gelten würde. In jedem Eppi muss ein Gesamtinhalt von 10µl für die PCR vorhanden sein. Pro Eppi werden 5µl HRM Mastermix, 1µl MgCl₂, und 1µl Primer-Gemisch pipettiert. In die Proben-Eppis müssen 3µl der bisulfitbehandelten DNA gegeben werden, in die Positiv-Probe kommt hingegen 0,9µl methylierte Kontroll-DNA und 2,1µl RNase freies Wasser, um auf eine Gesamtmenge von 10µl zu kommen. In die Negativ-Proben pipettiert man 3µl RNase freies Wasser, hier ist also keine DNA vorhanden.

Nun werden die PCR-Tubes in den Eisblock gesteckt und deren Deckel genau beschriftet, damit es nicht zu Verwechslungen kommt. Der vollständige Inhalt der Proben-Eppis wird gut durchmischt und möglichst verlustfrei in die jeweiligen PCR-Tubes pipettiert. Die Tubes werden gut verschlossen und sind nun bereit, die PCR in einem bestimmten eingestellten Programm zu durchlaufen.

Folgende Einstellungen wurden in das Programm Rotor Gene 6000 Series Software eingegeben:

Denaturierung	95°C	6 Minuten
Amplifikation 1	Touchdown	10 Zyklen
Denaturierung	95°C	10 Sekunden
Annealing	65°C - 60,5°C	(pro Zyklus um 0,5°C niedriger)
Elongation	72°C	10 Sekunden
Amplifikation 2	50 Zyklen	
Denaturierung	95°C	30 Sekunden
Annealing	60,5°C	30 Sekunden
Elongation	72°C	10 Sekunden

Tabelle 2: PCR-Einstellungen in Rotor Gene 6000

In den ersten 6 Minuten denaturiert die DNA bei einer eingestellten Temperatur von 95°C in ihre Einzelstränge. Damit unspezifische Primer-Bindungen verhindert werden, durchläuft die PCR zwei verschiedene Amplifikationsschemen. Durch die Touchdown-Einstellung wird die Temperatur von 65°C bei jedem Zyklus um 0,5°C gesenkt, bis eine Temperatur von 60,5°C erreicht ist (10 Zyklen). Dadurch wurde gewährleistet, dass die Primer spezifisch an ihre komplementäre DNA-Bindungsstelle binden. Danach erfolgte das Annealing bei jedem weiteren Zyklus (50 Zyklen) bei einer Temperatur von 60,5°C. Die Elongation fand bei 72°C statt, was den letzten Schritt eines jeden Zyklus darstellte (siehe **Abbildung 17**). Diese Temperatur ist optimal für die Funktion der Taq-Polymerase, die ans freistehende 3'-OH-Ende des Primers dNTPs einbaut.

So wird der komplementäre Strang synthetisiert und der Zyklus kann von vorne beginnen. Es entstehen also exponentiell identische DNA-Sequenzen mit folglich hoher Ausbeute.

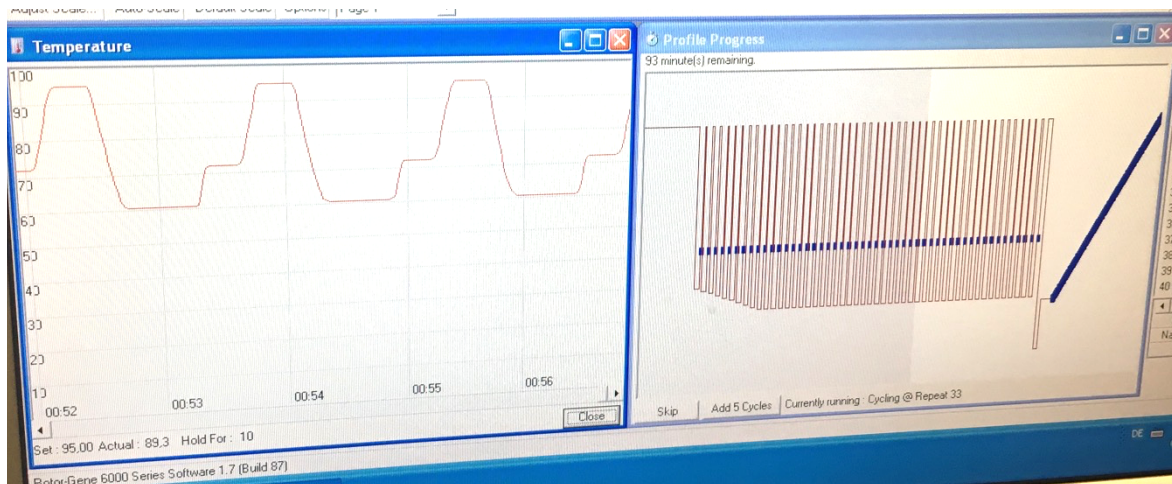


Abbildung 17: Verlauf der PCR. Links: aktueller Temperaturverlauf; Rechts: Gesamteinstellung mit Touchdown.

Nach ungefähr zwei Stunden Laufzeit konnte man die Ergebnisse anhand automatischer Schmelzkurvenanalyse einsehen. Dazu wird nach dem Ablauf der PCR die Temperatur von 60° auf 95°C erhöht, und zwar alle zwei Sekunden um 0,1°C. Dies ermöglicht die Unterscheidung von verschiedenen PCR-Produkten (wie z.B. Primer-Dimer und DNA-Fragment) anhand ihres unterschiedlichen Schmelzverhaltens. Bei einer bestimmten Temperatur denaturiert das DNA-Fragment zu zwei Einzelsträngen und der fluoreszierende Farbstoff EvaGreen wird freigesetzt, der bei einer Wellenlänge von 510nm gemessen wird.

3.4 Gelelektrophorese

Kurze Darstellung:

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle abhängig von ihrer Größe aufgetrennt und mit anderen DNA-Strängen bekannter Größe verglichen. Bei dieser biochemischen-molekularbiologischen Methode wird ein Agarose-Gel hergestellt, die Proben aufgebracht und ein elektrisches Feld angelegt. Kleine, negativ geladene Stränge wandern am schnellsten Richtung Anode (positiv geladen). Große und positiv geladene Moleküle wandern hingegen langsamer und werden von der Kathode (negativ geladen) angezogen. So erfolgt die Auftrennung nach Größe und die DNA-Moleküle können durch Banden nachgewiesen werden. Es kann außerdem festgestellt werden, ob das gewünschte PCR-Produkt auf richtiger Höhe vorliegt.

Vorbereitung:

Als erstes muss das zweiprozentige Agarose-Gel hergestellt werden. In einem Erlenmeyerkolben werden 0,8g Agarose (ein Gelbildner, der aus Rotalgen gewonnen wird) auf eingewogen und mit 40ml TAE-Puffer (bestehend aus TRIS, Acetat und EDTA) versetzt. Der Kolben wird mit Alufolie abgedeckt und auf einer Heizplatte erhitzt, um Agarose aufzulösen. Nach dem Aufkochen wird der Kolben zum Abkühlen heruntergenommen und die Alufolie verworfen. Währenddessen wird die Form zum Gießen des Gels vorbereitet. Hierzu wird eine Bodenplatte zwischen zwei Schienen befestigt und ein Kamm von oben senkrecht hineingesteckt (siehe **Abbildung 18**).

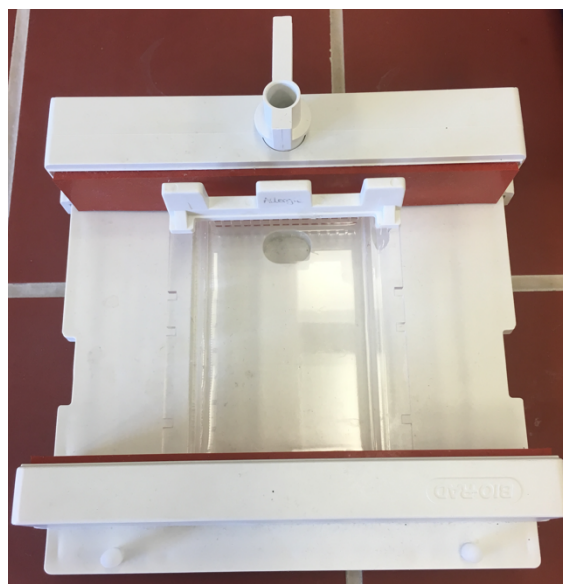


Abbildung 18: Vorbereitung der Gießform

Wenn das Gel etwas abgekühlt ist, gibt man rasch 4µl vom Farbstoff „Gel Red Nucleic Acid Stain in DMSO“ mittels Pipette hinzu und schwenkt langsam. Der Farbstoff wird unter Lichtschutz aufbewahrt und sofort wieder verpackt. Nun wird das Gel vorsichtig in die Ecke der Form gegossen, wobei Luftbläschen vermieden werden sollten. Falls sich Luftbläschen im Bereich des Kamms bilden, sollten diese mit einer Pipette hinausbewegt werden. Das Gel wird mit Alufolie lose abgedeckt und 30 Minuten lang stehen gelassen, um völlig abzukühlen und sich zu verfestigen. Danach wird der Kamm vorsichtig herausgenommen und es bleiben 15 kleine Taschen, in die später Probe pipettiert wird. Nun wird das Gel samt Formboden in das Elektrophorese-Gerät gelegt und der Behälter bis zur Maximum-Markierung mit Puffer aufgefüllt.

Durchführung:

In beschriftete 200µl Eppis werden jeweils 2µl Loading Dye pipettiert, welche einerseits die Dichte der Probe erhöhen soll, um sie in den Geltaschen zu behalten und andererseits die Probe mit einem Farbstoff verbindet, der unter UV-Licht sichtbar bzw. detektierbar ist. Hinzu kommt nun das PCR-Produkt (DNA-Probe), die man vollständig zu 10µl und möglichst ohne Verlust pipettiert. Der gesamte Inhalt wird mithilfe der Pipette gut vermischt und in die jeweiligen Geltaschen vorsichtig pipettiert, wobei zwischen jeder Probe eine Tasche freigelassen wird. In die erste Tasche müssen 6µl der „100bp Gel Pilot Ladder“ pipettiert werden, um das Ergebnis der Gelelektrophorese im Anschluss interpretieren zu können. Nach der Auftragung wird der Deckel aufgesetzt und das rote und schwarze Kabel richtig angeschlossen, welche die Spannung erzeugen. Es wurden 80V und 50 Minuten im Spannungsgeber der Firma „BIO-RAD“ eingestellt (siehe **Abbildung 19**).



Abbildung 19: Gerät zur Einstellung der Spannung für die Agarose-Gelelektrophorese

Nun sah man an der Kathode Luftblasen aufsteigen, was den erfolgreichen Beginn der Elektrophorese darstellte.

Nachdem die Elektrophorese abgeschlossen war, wurde das Gel herausgenommen und in den UV-Transilluminator gelegt. Durch die vorherige Einfärbung mit Loading Dye waren die einzelnen Banden unter UV-Licht gut erkennbar. Am PC wurde außerdem ein Foto erstellt, um die Ergebnisse zu sichern. Mittels eines Skalpell, welches desinfiziert wurde, konnte man die gewünschten Banden herausschneiden und in frische Eppis befördern. Hierbei musste auf den Schutz der Haut (Handschuhe und lange Ärmel) und der Augen (Schutzbrille) vor UV-Strahlung besonders geachtet werden.

Die Eppis wurden bis zur Gelreinigung bei -20°C aufbewahrt.

3.5 DNA-Aufreinigung

Kurze Darstellung:

Um die DNA-Proben zur späteren Sequenzierung schicken zu können, mussten vorher die störenden Gel-Bestandteile entfernt werden.

Vorbereitung:

Zur Aufreinigung der DNA wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen verwendet. Die Zentrifuge wurde auf 13krpm, 1 Minute und 20°C eingestellt. Den Thermomix musste man auf 50°C, 11 Minuten und 650rpm/10 Sekunden einstellen. Die Reagenzien des Kits wurden laut Vorschrift verdünnt.

Durchführung:

Zu jeder Probe kamen 400µl des gelben QG-Puffers hinzu. Die Eppis wurden gut verschlossen und bei 50°C für 11 Minuten im Thermomix inkubiert, wobei nach 6 Minuten alle Proben gevortext wurden. Nach erfolgter Inkubation wurde kräftig gevortext, um sicherzustellen, dass das Gel geschmolzen war. Nun wurden 400µl Isopropanol hinzugefügt, im Anschluss gevortext und kurz zentrifugiert. QIA quick spin columns wurden auf 2ml Collection tubes gesetzt, woraufhin 500µl der Probe auf die Filterscheibe pipettiert wurden. Da die spin columns nur maximal 500µl fassen konnten, musste man die Probe auf zwei

Zentrifugierschritte aufteilen. Nun ließ man die Proben 1 Minute lang zentrifugieren und verwarf das Filtrat, das dabei entstanden war. Die nächste Hälfte der Probe kam nun auf die Säulchen und man ließ erneut 1 Minute lang zentrifugieren. Das Filtrat wurde analog zum ersten Schritt verworfen. Die Collection tubes wurden wiederverwendet und die spin columns wieder aufgesetzt. Es wurden 500µl QG-Puffer in jede Probe pipettiert und für 1 Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und das Unterteil erneut aufgesetzt. Zum Waschen verwendete man anschließend 750µl PE-Puffer und ließ die Proben bei Raumtemperatur 5 Minuten lang bei geschlossenem Deckel inkubieren. Nun wurde für 1 Minute zentrifugiert. Das Unterteil wurde mitsamt Inhalt verworfen und durch ein neues ersetzt. Um die restliche Flüssigkeit zu entfernen, wurde wiederholt für 1 Minute zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden 1,5ml Eppis beschriftet, um die Oberteile der Quick spin columns nach der Zentrifugation draufzusetzen.

Nun wurden 30µl Elution Buffer (EB) in die Mitte des Filters pipettiert und die Proben für 4 Minuten stehen gelassen. Nach Ablauf der Zeit wurde zentrifugiert für 1 Minute. Die reine DNA befindet sich nun im unteren Eppi und kann bei -20°C aufbewahrt werden.

3.6 Sequenzierung

Kurze Darstellung:

Für die Sequenzierung der DNA wurden die Proben zur Firma Eurofins Genomics geschickt, welche die Basenpaarabfolge mithilfe der Didesoxymethode nach Sanger bestimmt.

Vorbereitung:

In ein neues Eppi werden 15µl von den ursprünglichen 30µl der DNA-Probe pipettiert, da für die Sequenzierung nicht mehr benötigt werden. Die verbliebenen 15µl der Probe werden für alle Fälle bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Diese können für spätere Sequenzierungen herangezogen werden. Die beschriftete und etikettierte Probe wird zusammen mit dem verwendeten Primer in einem Kuvert an die Firma geschickt, welche die DNA analysieren soll.

Durchführung:

Bei der Kettenabbruchmethode nach Sanger, auch als Didesoxymethode bezeichnet, wird die Basenabfolge der vorhandenen DNA bestimmt. Der Ablauf dieser Methode erinnert an die einzelnen Schritte einer PCR. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA denaturiert und es entstehen hierbei zwei Einzelstränge. Dies erfolgt bei hoher Temperatur. Wird die Temperatur im zweiten Schritt gesenkt, kommt es zum Annealing des Primers, wobei im Gegensatz zur PCR entweder der forward- oder der reverse-Primer verwendet wird. Im nächsten Schritt kommt es zur Extension des Stranges. Hierzu wird die Temperatur erneut etwas erhöht, damit die Taq-Polymerase arbeiten kann. Komplementär zum DNA-Strang werden dNTPs und ddNTPs (Didesoxynukleotide) eingebaut. Wird zufällig ein Didesoxynukleotid eingebaut, welches außerdem für die spätere Detektion fluoreszenzmarkiert ist, so kommt es zum Kettenabbruch, da dem ddNTP eine OH-Gruppe fehlt. Das folgende Nukleotid kann also nicht angebaut werden, da das 3'-OH-Ende nicht vorhanden ist. Die Synthese dieses Stranges wird also „abgebrochen“, daher auch der Name „Kettenabbruchmethode“.

Durch dieses Verfahren werden also Stränge unterschiedlicher Länge synthetisiert. Nach vielen Zyklen hat man demnach eine Mischung aus Abbruchsträngen, die elektrophoretisch aufgetrennt werden müssen. Mittels Laserdetektion und fluorimetrischer Analyse entsteht ein Chromatogramm, aus dem man die Sequenz ablesen kann. Dabei steht blau für Cytosin, rot für Thymin, schwarz für Guanin und grün für Adenin.

4 Resultate

In dieser Studie wurden 4 MSUD-Patienten und 11 gesunde Patienten (Kontrollen) auf ihre Methylierungsmuster im GSTA4-Gen untersucht und miteinander verglichen. In einer dritten Gruppe wurden 5 Patienten mit anderen Stoffwechselerkrankungen, abgesehen von MSUD, zum erweiterten epigenetischen Vergleich desselben Gens herangezogen. Das Geburtsgewicht lag in der Gruppe der MSUD-Patienten zwischen 1853g und 3380g. In der Gruppe der Gesunden betrug das Gewicht zwischen 2180g und 4150g. Der Blutabnahmezeitpunkt lag bei den meisten Neugeborenen bei 2-3 Tagen nach der Geburt. Hierbei sprach man von der „Erstkarte“. Insgesamt wurden also 25 Blutkärtchen sequenziert und hinsichtlich ihres Methylierungszustands an der NF-κB Bindungsstelle des GSTA4-Gens ausgewertet.

In **Tabelle 3** werden die anonymisierten Grunddaten der MSUD-Patienten dargestellt. Hierbei handelt es sich bei MSUD1, MSUD 2 und MSUD 5a um die jeweiligen Erstkarten. Da die Erstkarte eines Patienten nicht im Archiv auffindbar war, wurden zwei nachfolgende Karten zur Analyse herangezogen (MSUD 3 und MSUD4). Die Kleinbuchstaben „b“ und „c“ hinter der Patientennummer stellen die zweite und dritte Karte dar. Zu diesem Kollektiv zählten also vier MSUD-Patienten.

Probename	Geburtstag	Blutabnahme	Gewicht	Geschlecht
MSUD1	05.11.10	08.11.10	3380	w
MSUD1b	05.11.10	14.11.10		w
MSUD2	11.12.09	13.12.09	2920	w
MSUD2b	11.12.09	18.12.09		w
MSUD2c	11.12.09	27.12.09		w
MSUD3	21.11.13	29.11.13	3680	m
MSUD4	21.11.13	27.12.13		m
MSUD5a	17.11.20	20.11.20	1853	m
MSUD5b	17.11.20	24.11.20		m

Tabelle 3: Gruppe der MSUD-Patienten

In **Tabelle 4** ist die Gruppe der gesunden Patienten grün unterlegt dargestellt. „Ko“ steht hierbei für „Kontrolle“. Die dritte Gruppe, welche Patienten mit anderen Stoffwechselerkrankungen außer MSUD darstellt, ist orange unterlegt. Inkludierte Erkrankungen in dieser Gruppe sind PKU, IVA, MCADD, MM und PA.

Probenname	Geburtstag	Blutabnahme	Gewicht	Geschlecht
4Ko	27.02.14	02.03.14	3490	m
8Ko	14.06.14	17.06.14	3630	w
23Ko	02.07.14	04.07.14	2590	w
5Ko	29.04.14	02.05.14	2310	w
28Ko	01.08.14	05.08.14	3150	w
26Ko	09.09.14	11.09.14	3190	w
15Ko	08.05.15	10.05.15	3410	w
10Ko	12.06.15	15.06.15	3330	m
11Ko	08.10.15	10.10.15	2860	w
6Ko	30.04.14	02.05.14	2180	w
30Ko	04.01.13	07.01.13	4150	w
2bPKU	30.04.14	06.05.14	1990	w
3IVA	02.07.11	06.07.11	2650	w
5aMCADD	22.10.13	26.10.13	3840	w
6MM	22.03.13	24.03.13	2966	m
7PA	21.09.13	23.09.13	3980	w

Tabelle 4: Gruppe der Gesunden (grün) und Gruppe der sonstigen Stoffwechselerkrankungen (orange)

Die Resultate der Schmelzkurvenanalyse, der Elektrophorese und der Sequenzierung werden im Folgenden dargestellt und besprochen. Außerdem wird auf einzelne Patienten und deren Sequenzierungsergebnisse genauer eingegangen. Auch die Leucin-, Valin-, Methionin- und Carnitin-Blutwerte sind wesentlich für die weitere Diskussion.

4.1 Schmelzkurvenanalyse

Im Anschluss an die abgelaufene PCR wurde direkt die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Temperatur in 0,1°C Schritten alle zwei Sekunden erhöht, wobei die Anfangstemperatur 60°C und die Endtemperatur 95°C beträgt. DNA-Doppelstränge brechen auf und der Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen wird freigesetzt und gleichzeitig detektiert. Hierbei muss bedacht werden, dass diese Analysemethode keine quantitativen Werte liefert, sondern zur qualitativen Analyse herangezogen wird. Sie zeigt, ob DNA-Material bzw. das zu untersuchende Gen vorhanden war und amplifiziert wurde. Man kann erste Vermutungen zum Methylierungszustand des Gens aufstellen. Außerdem lassen sich verschiedene PCR-Produkte voneinander durch ihre Peaks unterscheiden, da sie bei unterschiedlichen Temperaturen aufschmelzen.

Für jede PCR dieser Forschungsarbeit wurde eine Positivprobe als Referenz verwendet. Dieser synthetisch hypermethylierte DNA-Strang signalisierte die erfolgreiche Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion.

In der Schmelzkurve (siehe **Abbildung 20**) wird das Fluoreszenzsignal (y-Achse) gegen die Temperatur (x-Achse) aufgetragen. Befanden sich Peaks weit links von der Positivkontrolle (als „+“ dargestellt), gelten sie als hypomethyliert. Sind sie hingegen in der Nähe der Referenz, kann von einer Hypermethylierung ausgegangen werden.

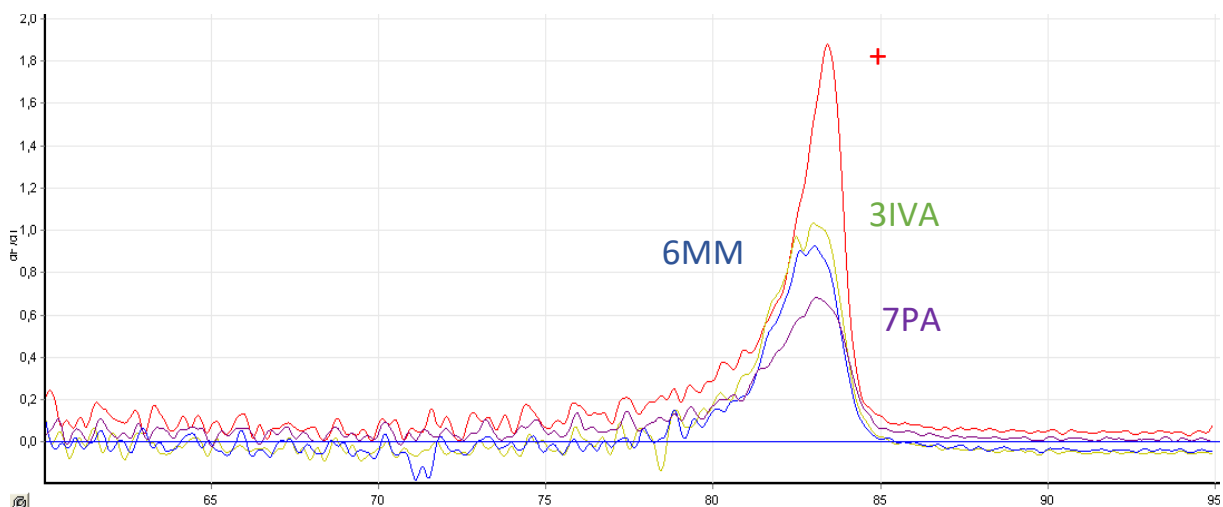


Abbildung 20: Beispiel einer Schmelzkurvenanalyse

Bei der Untersuchung der Schmelzkurvenanalysen wurde festgestellt, dass die Probe MSUD2b kein amplifiziertes Produkt gezeigt hat (siehe **Abbildung 21**). Nach erneuter Durchführung der PCR, um das Ergebnis erneut zu untersuchen und Fehlerquellen auszuschließen, war zu unserer Überraschung ebenso kein Produkt vorhanden, wie in **Abbildung 22** sichtbar.

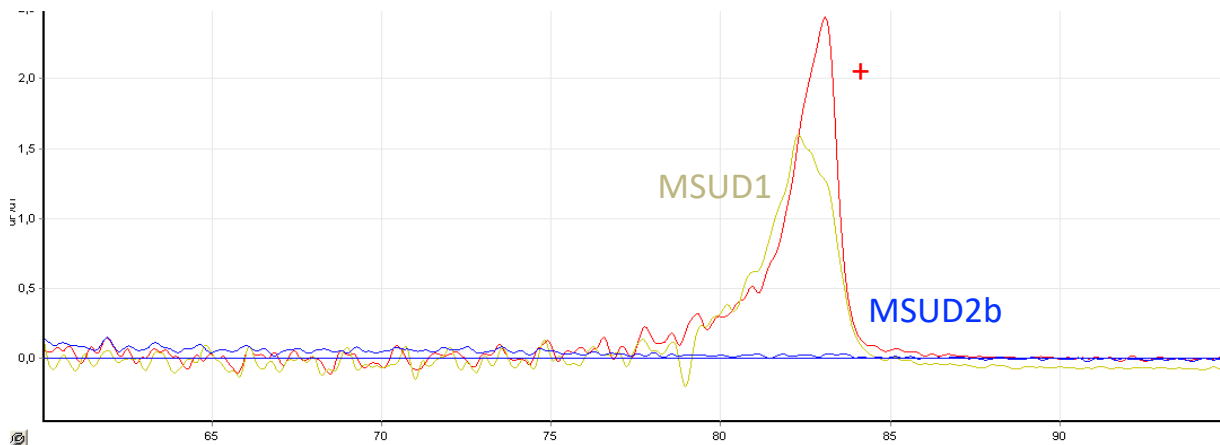


Abbildung 21: Schmelzkurvenanalyse der Proben MSUD1 und MSUD2b

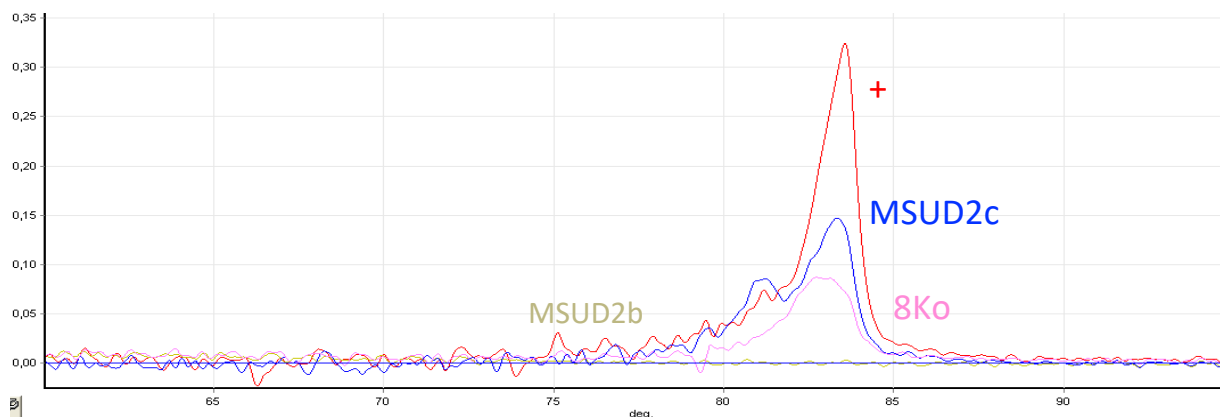


Abbildung 22: Schmelzkurvenanalyse der Proben MSUD2b, MSUD2c und 8Ko

Um zu überprüfen, ob bei MSUD2b überhaupt DNA vorhanden war, bzw. um Fehlerquellen bei der DNA-Extraktion auszuschließen, wurde im Anschluss ein Primerpaar verwendet, welches spezifisch unmethylierte DNA erkennt und an diese bindet. Die PCR wurde also mit sogenannten „GSTA3um“-Primer durchgeführt, welcher außerdem GC-clamp (25bp) enthielt, um die Spezifität der Primerbindung zu erhöhen. So konnte man die Anwesenheit von DNA-Material nachweisen und folglich den gewünschten DNA-Abschnitt sequenzieren.

Die darauffolgende PCR zur Untersuchung der Probe MSUD2b ergab folgende Schmelzkurve (siehe **Abbildung 25**).

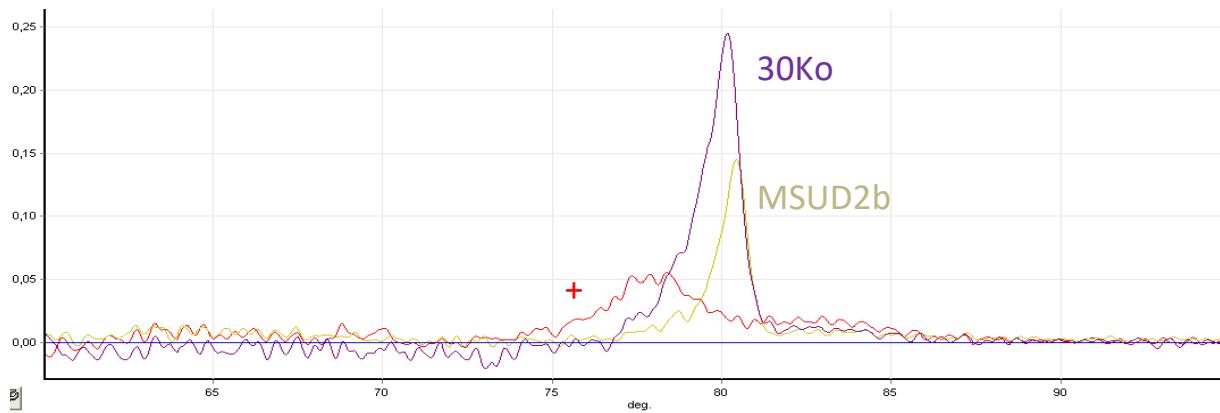


Abbildung 25: Schmelzkurve der Proben MSUD2b und 30Ko mit GSTA4um(gc)-Primer

Wie in der Schmelzkurve ersichtlich, war MSUD2b vorhanden und man konnte eine erste Vermutung über den Methylierungszustand des Gens aufstellen. Aufgrund der Schmelzkurvenanalyse war davon auszugehen, dass der amplifizierte DNA-Abschnitt der Probe MSUD2b hypomethyliert bzw. demethyliert war. Alle anderen Proben zeigten bereits ein PCR-Produkt mit GSTA4-Primer, der methylierte DNA amplifiziert.

4.2 Gelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR wurde mit jeder einzelnen Probe eine Gelelektrophorese durchgeführt, um die PCR-Produkte voneinander zu trennen und den zu untersuchenden DNA-Strang mittels UV-Transilluminator zu detektieren. Um die DNA-Stränge nach Größe zu unterscheiden, wurde eine Ladder auf der ersten Position des Gels mitgeführt.

Die Ergebnisse der MSUD-Proben 2b und 2c sind in **Abbildung 26** dargestellt.

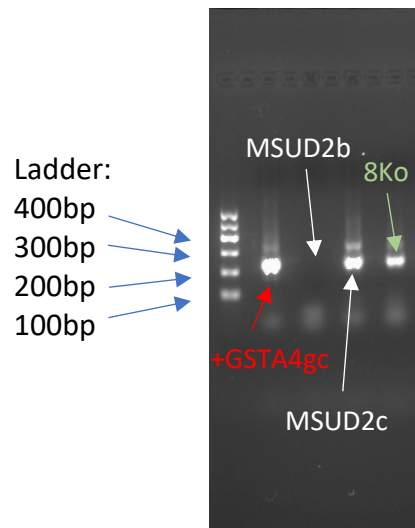


Abbildung 26: Gelelektrophorese der PCR-Produkte und Visualisierung durch UV-Licht

Es ist deutlich erkennbar, dass an der Stelle von MSUD2b (an 3. Position) kein DNA-Produkt vorhanden war. Hierbei wurde bei der PCR das GSTA4gc-Primerpaar verwendet, das spezifisch methylierte DNA erkennt. Der Reverse-Primer enthielt diesbezüglich den genannten GC-Clamp, weswegen man zur Basenpaaranzahl des Produkts noch 25 addieren musste. Die Ladder ermöglicht eine Größenordnung der Genprodukte und ist in 100bp-Schritten aufgeteilt. Die gewünschten DNA-Sequenzen lagen, wie im Gelfoto sichtbar, zwischen 200bp und 300bp und somit im korrekten Bereich. Alle PCR-Produkte, die darüber oder darunter lagen, waren unspezifischen Ursprungs.

Das gewünschte Produkt wies nach der Amplifikation eine Größe von 225bp (200+25) auf und ist auf dieser Höhe bei den Proben MSUD2c und 8Ko sichtbar.

Nun wurde eine Gelelektrophorese mit PCR-Produkten des Primerpaars für unmethylierte DNA durchgeführt, ebenfalls mit GC-Clamp im Reverse Primer.

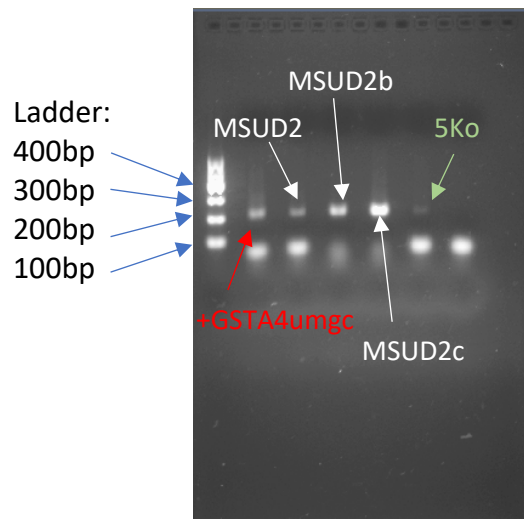


Abbildung 27: PCR-Produkte im UV-Licht nach Gelelektrophorese

Im Gel aus **Abbildung 27** ist im Gegensatz zu **Abbildung 26** das PCR-Produkt von MSUD2b sichtbar, nachdem das GSTA4um(gc)-Primerpaar zur Amplifizierung verwendet wurde. Dies ist erneut ein Hinweis auf Demethylierung des GSTA4-Gens, wobei erst die Sequenzierung ein eindeutiges Ergebnis lieferte. Diesmal war die gesuchte Sequenz auf einer Höhe von 222bp (197+25) sichtbar. Alle anderen Banden waren unspezifische PCR-Produkte, wie beispielsweise Primer-Dimer. Die gewünschten Banden wurden aus den Gelen herausgeschnitten, gereinigt und zur Sequenzierung geschickt.

4.3 Sequenzierung

Die Ergebnisse der Sequenzierung waren nach ungefähr einer Woche sowohl in schriftlicher als auch in grafischer Darstellung verfügbar. CpG-Stellen sowie non-CpG-Stellen waren hierbei ersichtlich. CpG-Dinukleotide beinhalten ein Cytosin, auf das in 5'→3'-Richtung über eine Phosphatbrücke ein Guanin folgt. Hier kommen besonders oft Methylierungen vor. CpG-Inseln sind Bereiche, in denen solche CpG-Dinukleotide besonders oft vorkommen. In **Abbildung 28** ist eine CpG-Insel des untersuchten GSTA4-Gens dargestellt.

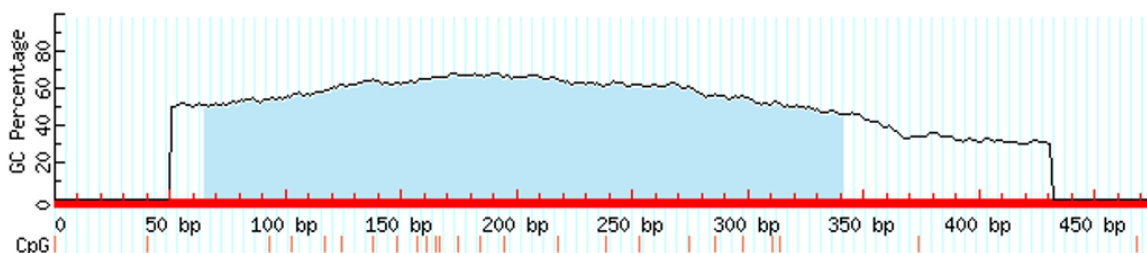


Abbildung 28: Häufigkeit von CpG-Stellen im GSTA4-Gen; blaue Fläche: CpG-Insel; rote Striche: CpG-Stellen

Durch die vorangegangene Bisulfitbehandlung wurden unmethylierte Cytosine in Uracile umgewandelt, an deren Stelle in der PCR ein Thymin eingebaut wurde. Somit waren diese Cytosine im Sequenzierungsergebnis als Thymine erkennbar. Methylierte Cytosine blieben unverändert, und schienen somit auch als solche im Sequenzierungs-Chromatogramm auf. Anhand des Vergleichs des Chromatogramms mit der bisulfitbehandelten DNA-Sequenz (siehe untere Zeile in **Abbildung 24**) konnte man feststellen, wo „ursprüngliche“ Thymin-Basen lagen, und welche Thymin-Basen von einem unmethylierten Cytosin abstammten.

Da die Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors NF-κB von Interesse war, wurde diese Stelle genauer untersucht. Es handelte sich um die Sequenz 5'-ATATTCG-3' im GSTA4-Gen. Hier kann der Transkriptionsfaktor binden und somit die Expression des Gens hervorrufen. Eine Methylierung an dieser Stelle verhindert somit das Andocken des Transkriptionsfaktors und in weiterer Folge die Genexpression. Die hier enthaltene CpG-Stelle wurde daher genauer auf ihre Methylierung untersucht. Diese Stelle wurde bei allen Proben – sowohl MSUD-Patienten als auch Gesunden-Kontrollen und Patienten mit weiteren Stoffwechselerkrankungen – aufgrund der Sequenzierungsergebnisse beurteilt.

Die Karten MSUD2 und MSUD2c (also erste und dritte Karte) ergaben folgendes Ergebnis:

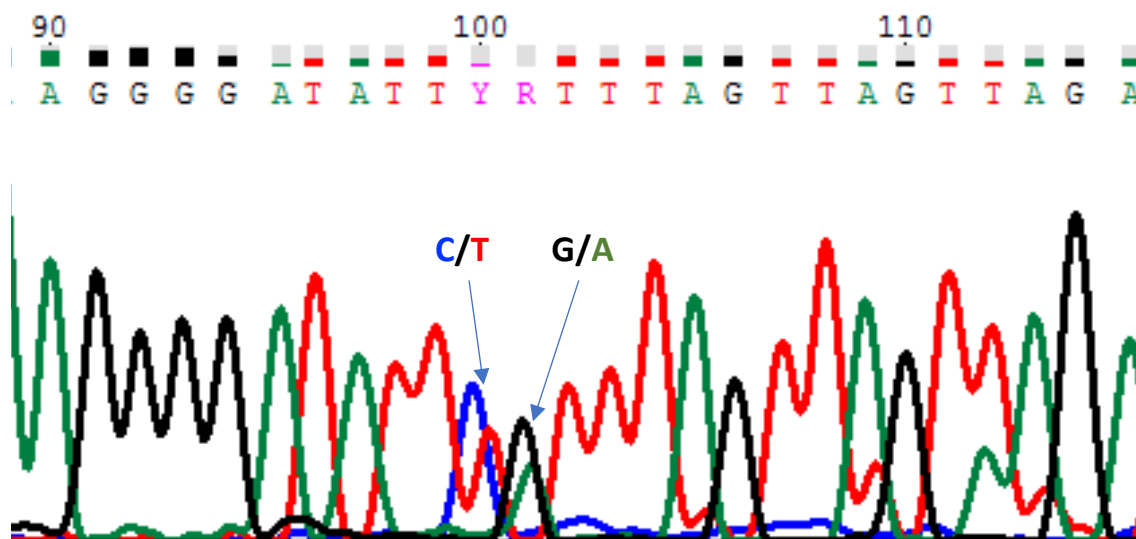


Abbildung 29: Partialmethylierung der CpG-Stelle bei MSUD2 und MSUD2c

Wie in **Abbildung 29** sichtbar, ist ein Allel methyliert, wobei das C nach der Bisulfitbehandlung unverändert blieb, und das andere Allel demethyliert, weswegen das C in ein T umgewandelt wurde. Daher spricht man hier von einer partiellen Methylierung (C/T).

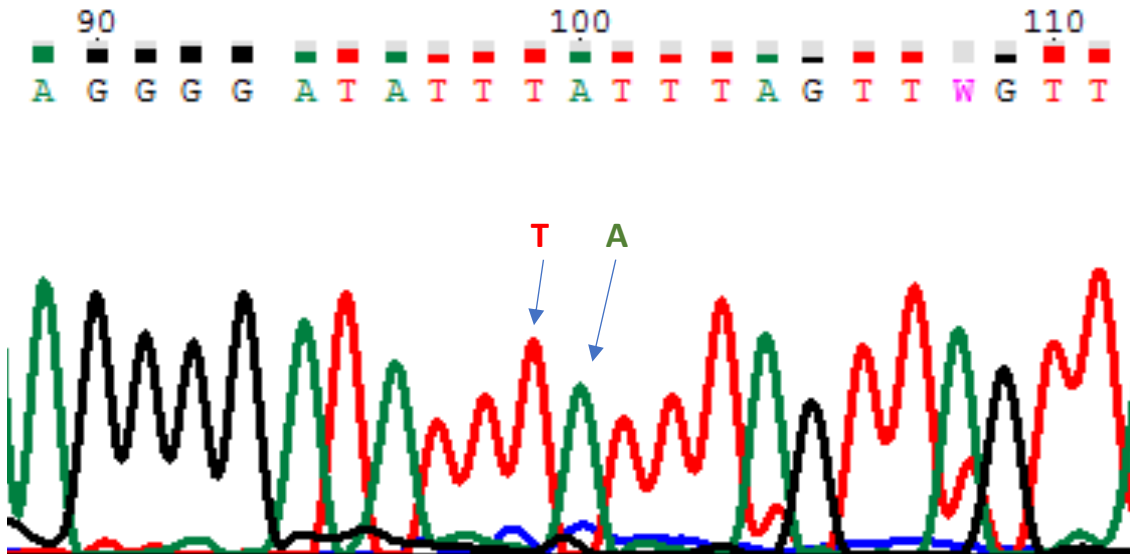


Abbildung 30: Sequenzierungsergebnis mit T:A Substitution

In **Abbildung 30** ist das Sequenzierungsergebnis von MSUD1, MSUD1b, MSUD3, MSUD4, MSUD5a sowie der Gesunden 4Ko, 8Ko, 23Ko, 5Ko, 26Ko, 15Ko, 10Ko, 11Ko und 6 Ko angeführt. Ebenso wiesen die PKU, IVA, MCADD, MM und PA-Proben diese T:A Sequenz auf. Statt C:G zeigten sie also epigenetisch T:A.

In **Abbildung 31** ist das Sequenzierungsergebnis der MSUD2b-Probe dargestellt. Hier wurden Primer verwendet, die spezifisch unmethylierte DNA erkennen. Aus diesem Grund sind in diesem Chromatogramm keine C sichtbar.

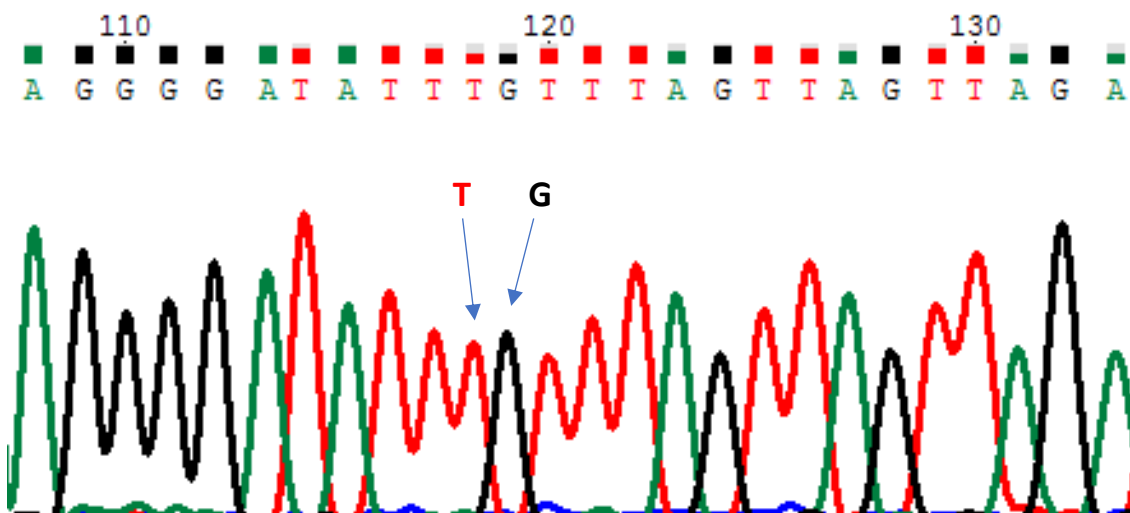


Abbildung 31: Sequenzierungsergebnis der Probe MSUD2b

MSUD2b zeigte an der untersuchten CG-Stelle ein T:G. Somit konnten wir die Demethylierung, die wir zuvor vermutet hatten, an diesem C feststellen. Nach der anfänglichen partiellen Methylierung (MSUD2) hat hier eine Demethylierung stattgefunden.

Um zu sehen, ob diese Demethylierung durch einen niedrigen Wert des Freien Carnitin (FC) bedingt war, wurden zusätzlich Patienten mit Carnitin-Transporter-Defekt (CTD) auf ihre Methylierung in dem betreffenden Gen untersucht. Diese wiesen, wie in **Tabelle 5** ersichtlich, sehr niedrige Carnitinwerte auf. Hier wurde auch der epigenetische Zustand des Gens untersucht und in der Tabelle angeführt.

Probenname	Geschlecht	Leucin	Valin	Methionin	FC	Epigenet. Veränderung
CTD1	w	147,34	147,42	17,52	1	T:A
CTD2	m	168,86	269,78	26,62	12,5	C/T:G/A
CTD3	m	103,33	154,77	17,22	1	C/T:A
CTD4	m	93,78	218,47	20,4	1	C/T:G/A

Tabelle 5: Patienten mit Carnitin-Transporter-Defekt (CTD)

4.4 Zusammenfassung der Resultate

Nach Durchsicht der gesamten Ergebnisse aus der Schmelzkurvenanalyse, der Gelelektrophorese und der Sequenzierung, konnten wir Schlüsse auf den Methylierungszustand des CpG-Dinukleotids in der NF- κ B-Bindungsstelle des GSTA4-Gens ziehen. Nachdem also bei jeder einzelnen Probe der Bereich 5'-ATATTCG-3' betrachtet wurde, konnten die Resultate in **Tabelle 6** zusammengefasst werden. Gezeigt werden hier ebenso die jeweiligen Blutwerte von Leucin, Valin, Methionin und freiem Carnitin (FC) in $\mu\text{mol/l}$, die für die weitere Interpretation und Diskussion wichtig sein werden.

Probenname	Leucin	Valin	Methionin	FC	Epigenet. Veränderung
MSUD1	968,9	500,0	8,5	18	T:A
MSUD1b	2685,6	541,0	11,7	10	T:A
MSUD2	993,0	691,3	9,8	11	C/T:G/A
MSUD2b	1309,8	262,6	3,5	3,1	T:G
MSUD2c	434,6	243,0	2,9	31	C/T:G/A
MSUD3	2831,0	714,7	16,0	20	T:A
MSUD4	595,0	92,9	42,1	30	T:A
MSUD5a	1319,7	438,0	18,6	23	T:A
MSUD5b	4280,0	600,3	20,9	30	C/T:A
4Ko	180,5	150,2	18,4	20	T:A
8Ko	168,1	185,2	20,2	17	T:A
23Ko	90,6	94,3	24,8	35	T:A
5Ko	140,0	80,7	37,4	49	T:A
28Ko	165,0	157,5	22,8	13	C:G
26Ko	118,8	128,5	19,6	14	T:A
15Ko	125,5	74,5	24,0	20	T:A
10Ko	120,5	96,2	17,3	19	T:A
11Ko	241,5	260,0	49,5	28	T:A
6Ko	160,7	115,8	20,9	26	T:A
30Ko	159,49	211,69	22,46	13	C/T:A
2bPKU	158,0	125,1	17,5	50	T:A
3IVA	219,7	231,4	19,2	15	T:A
5aMCAD	181,9	133,6	24,5	43	T:A
6MM	105,0	112,3	22,6	17	T:A
7PA	152,5	212,7	12,2	6	T:A

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse für MSUD-Proben, Kontroll-Proben, und andere Stoffwechselerkrankungen

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Gen für GSTA4 untersucht, welches für das antioxidative Enzym Glutathion-S-Transferase Alpha 4 codiert, das für die Entsorgung des Aldehyds 4-Hydroxynonenal zuständig ist. Dieses Molekül entsteht als Folge von oxidativem Stress durch Lipidperoxidation im Organismus, so auch bei Patienten mit MSUD. Für die Entgiftung wird 4-HNE an reduziertes Glutathion gebunden und aus dem Körper eliminiert.

Der den Proben sequenzierte Genabschnitt enthielt die Promoterregion von GSTA4. Im Fokus stand die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher die Expression des Gens reguliert. Die Methylierung des Cytosins an der Stelle 5'-ATATTCG-3' wurde hier untersucht. Aufgrund von C5-Methylierung am Cytosin kann die Gentranskription durch Verhinderung der Andockung von NF- κ B unterdrückt werden. [53]

Von großem Interesse war hierbei die Änderung des Methylierungszustands in der Zweitkarte der Probe MSUD2 – bezeichnet als MSUD2b. Aufgefallen war diese Probe dadurch, dass die PCR mehrfach kein Produkt geliefert hat. Es war also kein Peak bei MSUD2b sichtbar. Ebenso war in der Gelelektrophorese keine Bande ersichtlich. Aus diesem Grund war anzunehmen, dass das Gen komplett demethyliert ist. Nach der PCR mit einem Primer, der spezifisch unmethylierte Allele erkennt, war das amplifizierte Produkt erst sichtbar und konnte sequenziert werden. Die erste Karte (MSUD2) wies an der NF- κ B Stelle eine partielle Methylierung auf, die Zweitkarte eine Demethylierung. Diese epigenetische Veränderung trat bei keiner anderen Probe auf, weder bei gesunden Kontrollproben noch bei anderen MSUD-Patienten oder diversen anderen Stoffwechselerkrankungen. Um die Ursache für diese Veränderung zu finden, wurde ein besonderes Augenmerk auf die Blutwerte von Leucin, Valin, Methionin und freiem Carnitin gelegt.

Die Valin-Werte von MSUD 2b waren vergleichbar mit denen der Kontrollgruppe, es kam daher nicht als Ursache für die Demethylierung infrage. Bezüglich der Leucin-Werte der MSUD-Patienten sah man, dass diese sehr hoch waren. Den Höchstwert wies MSUD5b mit 4280 μ mol/l Leucin auf, wobei jedoch die beschriebene epigenetische Veränderung nicht sichtbar war. Somit konnte Leucin auch als Auslöser der Demethylierung ausgeschlossen werden. Außerdem zeigten andere Studien, dass die BCAA Leucin, Valin und Isoleucin nicht

direkt für oxidativen Stress bzw. für Lipidperoxidation in MSUD-Patienten verantwortlich sind. [54, 55] Interessanterweise gab es jedoch in MSUD-Patienten eine inverse Korrelation zwischen Methionin-Werten und Parametern für oxidativen Stress. Ein niedriger Methionin-Blutspiegel könnte also Lipidperoxidation verursachen. [55]

Weil jedoch Methionin in der dritten Karte (MSUD2c) immer noch niedrig war, und die Demethylierung hier nicht mehr vorhanden war, konnte Methionin als Ursache der Veränderung in MSUD2b verworfen werden. MSUD2c wies analog zur Erstkarte MSUD2 eine partielle Methylierung auf – die Demethylierung wurde also rückgängig gemacht.

Nun betrachteten wir die Carnitin-Werte. L-Carnitin befördert langkettige Fettsäuren in die Mitochondrien und schützt vor Lipidperoxidation, woraus ein antioxidativer Effekt resultiert. Eine Studie hat diesbezüglich gezeigt, dass durch die Gabe von L-Carnitin Malondialdehyd (MDA), ein Marker für Lipidperoxidation, gesenkt wird. Die L-Carnitin-Konzentration ist also invers proportional zur Lipidperoxidation. [56] Weiters entsorgt L-Carnitin freie Radikale, wobei nicht auszuschließen ist, dass dieser Effekt bereits durch die Entsorgung der akkumulierenden Ketosäuren entsteht. Hierzu ist Carnitin ebenso befähigt. [57] Freies Carnitin war in MSUD2b sehr niedrig mit einem Wert von $3,1\mu\text{mol/l}$. Nach Carnitin-Gabe im Zuge der Therapie des Kindes, welches bereits wegen Trinkunlust stationär aufgenommen wurde und die klassische Form der Ahornsirupkrankheit aufwies, hat sich der Carnitin-Wert normalisiert auf $31\mu\text{mol/l}$ (Probe MSUD2c).

Eine Erklärung für die Demethylierung bei MSUD2b könnte sein, dass durch den äußerst niedrigen Carnitin-Wert die Ketosäuren, die in MSUD-Patienten hoch sind (jedoch nicht gemessen werden), nicht entsorgt werden können und dadurch zusätzlich akkumulieren. Ketosäuren (BCKA), wie beispielsweise α -Ketoisocaproat, können die antioxidativen Schutzmechanismen reduzieren, wodurch es zu oxidativem Stress und Neurodegeneration in MSUD-Patienten kommen könnte. [58] Es kann folglich zur Lipidperoxidation und somit zur Akkumulierung von 4-Hydroxynonenal kommen. Aus diesem Grund könnte die Demethylierung in der Promoterregion des GSTA4-Gens erfolgen, um dessen Expression zu steigern und vorhandenes 4-HNE zu entsorgen.

Patienten mit Carnitin-Transporter-Defekt, die ebenso sehr niedrige Carnitin-Werte hatten, wiesen diese Demethylierung nicht auf. Man kann daher annehmen, dass die Demethylierung in MSUD2b auf die erhöhten Ketosäuren, die spezifisch für MSUD sind, zurückzuführen ist. Patienten mit Carnitin-Transporter-Defekt sind von Ketosäuren nicht betroffen. Diese sind explizit bei MSUD-Patienten erhöht.

Unsere Hypothese ist, dass der Körper durch den niedrigen Carnitin-Wert auf die Ketosäuren in Form von Demethylierung des GSTA4-Gens und in weiterer Folge auf akkumulierendes 4-HNE reagiert hat. Da Carnitin in MSUD2b zu niedrig ist, können die Ketosäuren nicht entfernt werden und führen zum Anstieg von Radikalen und damit zu oxidativem Stress. Infolge dessen kommt es zur Lipidperoxidation von Membranmolekülen und u.a. zur Entstehung von 4-HNE. Durch dessen Anstieg könnte die Bindungsstelle für NF-κB am GSTA4-Gen demethyliert werden, um dem Transkriptionsfaktor eine Andockung zu ermöglichen. GSTA4 kann nun das akkumulierte Aldehyd aus dem Körper eliminieren. Nach Normalisierung des Carnitin-Werts durch Supplementierung entwickelte sich aus der Demethylierung wieder eine partielle Methylierung. Somit ist also diese epigenetische Veränderung als funktionell zu betrachten.

Die gesunden Kontrollen und andere MSUD-Proben wiesen im Vergleich zu MSUD2 an der beobachteten Stelle größtenteils statt C:G ein T:A auf. Dies könnte einerseits auf einen Polymorphismus zurückzuführen sein, bei dem T:A-Substitution vermehrt an CpG-Stellen auftritt. [59] Andererseits ist es möglich, dass durch die künstlich herbeigeführte Deaminierung (Bisulfitbehandlung) das ursprünglich unmethylierte C in ein T übergeführt wurde. Partielle Methylierungen waren nicht unüblich, da sie sowohl bei gesunden Kontrollen als auch bei anderen MSUD-Patienten beobachtet wurden.

6 Conclusio

Der epigenetische Vergleich von Patienten mit MSUD und gesunden Kontrollen hat bei einer MSUD-Probe eine Demethylierung des GSTA4-Gens gezeigt, wobei dieser Patient ein sehr niedriges Carnitin-Level im Blut aufwies. Aus der partiellen Methylierung in der Erstkarte wurde in der nächsten Karte eine Demethylierung. Nach Normalisierung des Carnitins in der dritten Karte wurde die Demethylierung rückgängig gemacht, es erschien hier also erneut eine partielle Methylierung.

Patienten mit anderen Stoffwechselerkrankungen sowie Patienten mit Carnitin-Transporter-Defekt zeigten diese epigenetische Veränderung an der NF- κ B-Bindungsstelle nicht. Daraus resultiert, dass die Demethylierung bei dem betreffenden MSUD-Patienten ein Resultat von erhöhten Ketosäuren sein könnte und somit einen indirekten Marker für diese darstellen würde. Durch das niedrige freie Carnitin können Ketosäuren nicht entfernt werden und akkumulieren, es kommt zu oxidativem Stress und Lipidperoxidation. Das nun erhöhte Auftreten von 4-Hydroxynonenal kann eine Aktivierung der Expression von GSTA4 induzieren. Somit kann GSTA4 durch Demethylierung und darauffolgende Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B aktiviert werden und die Entsorgung von 4-HNE bewerkstelligen.

Diese Arbeit bestätigt vorherige Studien hinsichtlich der positiven Effekte der Carnitin-Supplementierung bei Neugeborenen mit diagnostizierter MSUD. Da die Demethylierung eine Reaktion auf niedriges Carnitin und somit auf erhöhte Ketosäuren darstellen könnte, wäre eine Untersuchung der epigenetischen Veränderung an der NF- κ B-Bindungsstelle nur dann sinnvoll, wenn MSUD vorliegt und freies Carnitin sehr niedrig ist.

Somit könnte diese epigenetische Veränderung als ein früher Biomarker für Carbonylstress und für vorhandenen oxidativen Stress bei MSUD-Patienten mit sehr niedrigem Carnitin-Wert angewendet werden. Weitere Studien und größere Patienten-Kollektive sind jedoch notwendig, um diese Ergebnisse zu bestätigen.

Literaturverzeichnis

1. Garibyan, L. and N. Avashia, *Polymerase chain reaction*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. 1-4.
2. Ellis, E.M., *Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention*. Pharmacol Ther, 2007. **115**(1): p. 13-24.
3. Balogh, L.M. and W.M. Atkins, *Interactions of glutathione transferases with 4-hydroxynonenal*. Drug Metab Rev, 2011. **43**(2): p. 165-78.
4. Blackburn, P.R., et al., *Maple syrup urine disease: mechanisms and management*. Appl Clin Genet, 2017. **10**: p. 57-66.
5. Harris-Haman, P., et al., *Implications of Maple Syrup Urine Disease in Newborns*. Nurs Womens Health, 2017. **21**(3): p. 196-206.
6. Lang, C.H., C.J. Lynch, and T.C. Vary, *BCATm deficiency ameliorates endotoxin-induced decrease in muscle protein synthesis and improves survival in septic mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **299**(3): p. R935-44.
7. Yudkoff, M., et al., *Brain amino acid requirements and toxicity: the example of leucine*. J Nutr, 2005. **135**(6 Suppl): p. 1531S-8S.
8. Chuang, J.L., et al., *Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients: a proposed mechanism for the thiamin-responsive phenotype*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17792-800.
9. Nellis, M.M., et al., *Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression*. Molecular genetics and metabolism, 2003. **80**(1-2): p. 189-195.
10. Frazier, D.M., et al., *Nutrition management guideline for maple syrup urine disease: an evidence- and consensus-based approach*. Mol Genet Metab, 2014. **112**(3): p. 210-7.
11. Therrell, B.L., et al., *Current status of newborn screening worldwide: 2015*. Semin Perinatol, 2015. **39**(3): p. 171-87.
12. Chuang, D., *Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria)*. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 2001: p. 1971-2005.
13. Chapman, K.A., et al., *Incidence of maple syrup urine disease, propionic acidemia, and methylmalonic aciduria from newborn screening data*. Mol Genet Metab Rep, 2018. **15**: p. 106-109.
14. Strauss, K.A., et al., *Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design*. Mol Genet Metab, 2010. **99**(4): p. 333-45.
15. Levin, M.L., et al., *Cerebral edema in maple syrup urine disease*. J Pediatr, 1993. **122**(1): p. 167-8.
16. Carecchio, M., et al., *Movement disorders in adult surviving patients with maple syrup urine disease*. Mov Disord, 2011. **26**(7): p. 1324-8.
17. Thompson, G.N., D.E. Francis, and D. Halliday, *Acute illness in maple syrup urine disease: dynamics of protein metabolism and implications for management*. J Pediatr, 1991. **119**(1 Pt 1): p. 35-41.
18. Scriver, C.R., et al., *Thiamine-responsive maple-syrup-urine disease*. Lancet, 1971. **1**(7694): p. 310-2.
19. Munnich, A., et al., *Congenital lactic acidosis, alpha-ketoglutaric aciduria and variant form of maple syrup urine disease due to a single enzyme defect: dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency*. Acta Paediatr Scand, 1982. **71**(1): p. 167-71.

20. Quinonez, S.C., et al., *Leigh syndrome in a girl with a novel DLD mutation causing E3 deficiency*. *Pediatr Neurol*, 2013. **48**(1): p. 67-72.
21. Puckett, R.L., et al., *Maple syrup urine disease: further evidence that newborn screening may fail to identify variant forms*. *Mol Genet Metab*, 2010. **100**(2): p. 136-42.
22. Snyderman, S.E., *Treatment outcome of maple syrup urine disease*. *Acta Paediatr Jpn*, 1988. **30**(4): p. 417-24.
23. Hilliges, C., D. Awiszus, and U. Wendel, *Intellectual performance of children with maple syrup urine disease*. *Eur J Pediatr*, 1993. **152**(2): p. 144-7.
24. Hoffmann, B., et al., *Impact of longitudinal plasma leucine levels on the intellectual outcome in patients with classic MSUD*. *Pediatr Res*, 2006. **59**(1): p. 17-20.
25. Pollak, A. and D.C. Kasper, *Austrian Newborn Screening Program: a perspective of five decades*. *J Perinat Med*, 2014. **42**(2): p. 151-8.
26. Kasper, D.C., et al., *The national Austrian newborn screening program - eight years experience with mass spectrometry. past, present, and future goals*. *Wien Klin Wochenschr*, 2010. **122**(21-22): p. 607-13.
27. Gayon, J., *From Mendel to epigenetics: History of genetics*. *C R Biol*, 2016. **339**(7-8): p. 225-30.
28. Bird, A.P., *DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA*. *Nucleic Acids Res*, 1980. **8**(7): p. 1499-504.
29. Moore, L.D., T. Le, and G. Fan, *DNA methylation and its basic function*. *Neuropsychopharmacology*, 2013. **38**(1): p. 23-38.
30. Pagiatakis, C., et al., *Epigenetics of aging and disease: a brief overview*. *Aging Clin Exp Res*, 2019.
31. Worm, J., A. Aggerholm, and P. Guldberg, *In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis*. *Clin Chem*, 2001. **47**(7): p. 1183-9.
32. Halliwell, B., *Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment*. *Drugs Aging*, 2001. **18**(9): p. 685-716.
33. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. *Exp Physiol*, 1997. **82**(2): p. 291-5.
34. Touyz, R.M., *Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?* *Hypertension*, 2004. **44**(3): p. 248-52.
35. Robertson, R.P., *Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(41): p. 42351-4.
36. Markesbery, W.R., *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease*. *Free Radic Biol Med*, 1997. **23**(1): p. 134-47.
37. Rindgen, D., et al., *Covalent modifications to 2'-deoxyguanosine by 4-oxo-2-nonenal, a novel product of lipid peroxidation*. *Chem Res Toxicol*, 1999. **12**(12): p. 1195-204.
38. Uchida, K., et al., *Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(26): p. 16058-66.
39. Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. *Free Radic Biol Med*, 1991. **11**(1): p. 81-128.
40. Pisoschi, A.M. and A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. *Eur J Med Chem*, 2015. **97**: p. 55-74.
41. Li, N. and A.E. Nel, *Role of the Nrf2-mediated signaling pathway as a negative regulator of inflammation: implications for the impact of particulate pollutants on asthma*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(1-2): p. 88-98.

42. Mc Guire, P.J., A. Parikh, and G.A. Diaz, *Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism*. Mol Genet Metab, 2009. **98**(1-2): p. 173-80.
43. Esterbauer, H., H. Zollner, and N. Scholz, *Reaction of glutathione with conjugated carbonyls*. Z Naturforsch C Biosci, 1975. **30**(4): p. 466-73.
44. Hayes, J.D., J.U. Flanagan, and I.R. Jowsey, *Glutathione transferases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 51-88.
45. Hayes, J.D. and D.J. Pulford, *The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1995. **30**(6): p. 445-600.
46. Board, P.G., *Identification of cDNAs encoding two human alpha class glutathione transferases (GSTA3 and GSTA4) and the heterologous expression of GSTA4-4*. Biochem J, 1998. **330 (Pt 2)**: p. 827-31.
47. Hubatsch, I., M. Ridderstrom, and B. Mannervik, *Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation*. Biochem J, 1998. **330 (Pt 1)**: p. 175-9.
48. Barschak, A.G., et al., *Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease*. Metab Brain Dis, 2006. **21**(4): p. 279-86.
49. Barschak, A.G., et al., *Maple syrup urine disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles*. Clin Biochem, 2008. **41**(4-5): p. 317-24.
50. Kumru, B. and B. Ozturk Hismi, *Investigation of L - Carnitine Concentrations in Treated Patients with Maple Syrup Urine Disease*. J Pediatr Genet, 2019. **8**(3): p. 133-136.
51. Frijhoff, J., et al., *Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress*. Antioxid Redox Signal, 2015. **23**(14): p. 1144-70.
52. Leti, F., et al., *Methods for CpG Methylation Array Profiling Via Bisulfite Conversion*. Methods Mol Biol, 2018. **1706**: p. 233-254.
53. Antequera, F., *Structure, function and evolution of CpG island promoters*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(8): p. 1647-58.
54. Barschak, A.G., et al., *Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment*. Metab Brain Dis, 2008. **23**(1): p. 71-80.
55. Barschak, A.G., et al., *Amino acids levels and lipid peroxidation in maple syrup urine disease patients*. Clin Biochem, 2009. **42**(6): p. 462-6.
56. Mescka, C.P., et al., *Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: L-carnitine effect*. Int J Dev Neurosci, 2013. **31**(1): p. 21-4.
57. Rani, P.J. and C. Panneerselvam, *Effect of L-carnitine on brain lipid peroxidation and antioxidant enzymes in old rats*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2002. **57**(4): p. B134-7.
58. Sitta, A., et al., *Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress*. Cell Mol Neurobiol, 2014. **34**(2): p. 157-65.
59. Youk, J., *The genome-wide landscape of C:G > T:A polymorphism at the CpG contexts in the human population*. BMC Genomics, 2020. **21:270**.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über Abbau der BCAA und Ketosäuren modifiziert nach [4]	1
Abbildung 2: Mögliche Methylierungsmuster der DNA modifiziert nach [31]	4
Abbildung 3: Reaktive Aldehyde und antioxidative Enzyme modifiziert nach [2]	5
Abbildung 4: Beispiele für reaktive Aldehyde modifiziert nach [2].....	6
Abbildung 5: Reaktion von GSH mit HNE modifiziert nach [3].....	7
Abbildung 6: Foto Blutkärtchen	11
Abbildung 7: Foto Stanzgerät Wallac DBS Puncher	12
Abbildung 8: Foto DNA-Extraktionskit „QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)“	13
Abbildung 9: Fotos v.l.n.r.: Thermomix; Eppendorf Centrifuge; Vortex-Gerät	14
Abbildung 10: Prinzip der Bisulfitkonvertierung modifiziert nach [52].....	16
Abbildung 11: Foto „Epitect Bisulfite Kit (48)“	16
Abbildung 12: Foto Eppendorf Mastercycler gradient.....	17
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Prinzips einer PCR modifiziert nach [1].....	19
Abbildung 14: Foto PCR-Gerät „Rotorgene 6000“ von Corbett	20
Abbildung 15: Foto Probenvorbereitung für die PCR.	21
Abbildung 16: Foto Bestellprotokoll der Primer	21
Abbildung 17: Foto Verlauf der PCR.	23
Abbildung 18: Foto Vorbereitung der Gießform.....	24
Abbildung 19: Foto Gerät zur Einstellung der Spannung für die Agarose-Gelelektrophorese.	25
Abbildung 20: Foto Beispiel einer Schmelzkurvenanalyse.....	31
Abbildung 21: Schmelzkurvenanalyse der Proben MSUD1 und MSUD2b	32
Abbildung 22: Schmelzkurvenanalyse der Proben MSUD2b, MSUD2c und 8Ko.....	32
Abbildung 23: Primersequenz des GSTA4um Primerpaars	33
Abbildung 24: Amplifizierter DNA-Abschnitt und die Primer-Bindungsstellen.....	33
Abbildung 25: Schmelzkurve der Proben MSUD2b und 30Ko mit GSTA4um(gc)-Primer	34
Abbildung 26: Gelelektrophorese und Visualisierung durch UV-Licht.....	35
Abbildung 27: Gelelektrophorese und Visualisierung durch UV-Licht.....	36
Abbildung 28: CpG-Stellen im GSTA4-Gen.....	36
Abbildung 29: Partialmethylierung bei MSUD2 und MSUD2c	37
Abbildung 30: Sequenzierungsergebnis mit T:A Substitution.....	38
Abbildung 31: Sequenzierungsergebnis der Probe MSUD2b.....	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einstellung des Programms im Mastercycler	17
Tabelle 2: PCR-Einstellungen	22
Tabelle 3: Gruppe der MSUD-Patienten	29
Tabelle 4: Gruppe der Gesunden der sonstigen Stoffwechselerkrankungen	30
Tabelle 5: Patienten mit Carnitin-Transporter-Defekt	39
Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse	40

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*innen der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Anhang

Kits für die Methoden

1. Stanzen

3,2mm Durchmesser

Material:

Eppi: Eppendorf Tubes ® 3810X 1,5ml

Ständer: Eppendorf

Handschuhe: SensoNitril (puderfrei, unsteril, latexfrei)

Mikrotiterplatte: Eppendorf

Filterpapierkarte

Lanzette: Haemostillett ®

Wischtuch: Kimberly-Clark Professional ®, KIMTECH science 30x30cm

Reagenzien:

Ethanolum absolutum: AnalaR Normapur

Gerät:

Wallac DBS Puncher

2. DNA-Extraktion

QIAamp ® DNA Blood Mini Kit (50)

Material:

Handschuhe: SensoNitril (puderfrei, unsteril, latexfrei)

Eppi: Eppendorf Tubes ® 3810X 1,5ml

Ständer: Eppendorf

Pipetten: Eppendorf

Spitzen mit Filter: Sorenson; Bioscience, Inc

Spin Column: 5x10 QIAamp Mini Spin Column

Auffanggefäße: 4x50 collection tubes 2ml

Reagenzien:

AL-Buffer (Lysis Buffer): 12ml - lagern bei 15-25°C

AW1-Puffer (Wash Buffer 1): 19ml Konzentrat + 25ml Ethanolum abs. - lagern bei 15-25°C

AW2-Puffer (Wash Buffer 2): 13ml Konzentrat + 30ml Ethanolum abs. - lagern bei 15-25°C

AE-Puffer (Elution Buffer): 15ml - lagern bei 15-25°C

ATL-Puffer (Tissue lysis Buffer): 50ml - lagern bei 15-25°C

Protease QIAGEN ® solvent Lösungsmittel

QIAGEN ® Protease (Proteinkinase K) Lyophilisat + 1,2ml Potease solvent - lagern bei 4°C

Ethanolum absolutum: AnalaR Normapur

Geräte:

Thermomixer: Eppendorf 2ml, Thermomixer comfort

Zentrifuge: Eppendorf Zentrifuge 5415R

Vortex

3. Bisulfitbehandlung

Epitect® Bisulfite Kit (48) für 48 Konversionen

Material:

Handschuhe: SensoNitril (puderfrei, unsteril, latexfrei)

Eppi: Eppendorf Tubes® 3810X 1,5ml

Eppi: Eppendorf Tubes® 0,5ml

Ständer: Eppendorf

Pipetten: Eppendorf

Spitzen mit Filter: Sorenson; Bioscience, Inc

EpiTect® Spin column – lagern bei 2-8°C

Auffanggefäße: collection tubes 2ml

Eis aus Eismaschine ZIEGRA Eismaschinen GmbH

Reagenzien:

6x Bisulfite-Mix (Lyophilisat) + 800µl RNase freies Wasser – lagern bei -20°C nach Auflösung

3x RNase freies Wasser 1,9ml – lagern bei 15-25°C

Carrier RNA 310µg Lyophilisat + 310µl RNase freies Wasser; 50µl Aliquote – lagern bei -20°C nach Auflösung

BL-Puffer (Loading Buffer): 31ml – lagern bei 15-25°C

BW-Puffer (Wash Buffer): 13ml Konzentrat + 30ml Ethanolum abs. – lagern bei 15-25°C

BD-Puffer (Desulfonation Buffer): 3ml Konzentrat + 27ml Ethanolum abs. – lagern bei 15-25°C

EB-Puffer (Elution Buffer): 15ml – lagern bei 15-25°C

Ethanolum absolutum: AnalaR Normapur

Geräte:

Thermomixer: Eppendorf 2ml, Thermomixer comfort

Zentrifuge: Eppendorf Zentrifuge 5415R

Mini-Zentrifuge „Schwammerl“: Sprout

Vortex

Mastercycler: Eppendorf Mastercycler gradient

4. PCR

Epitect HRM PCR Kit (100) für 100 High Resolution Melting Polymerase Kettenreaktionen

Materialien:

Handschuhe: SensoNitril (puderfrei, unsteril, latexfrei)

Eppi 200µl: Eppi Eppendorf 1000x0,2ml

PCR-Platte 96 Eppendorf

Pipetten: Eppendorf

Spitzen mit Filter: Sorenson; Bioscience, Inc

Eisenplatte: Corbett Research

Eis aus Eismaschine ZIEGRA Eismaschinen GmbH

PCR-Tubes: Eppendorf

Reagenzien:

MasterMix: QIAGEN® HRM PCR 1,25ml

RNase freies Wasser 1,9ml

ThermoScientific 25mM MgCl₂ 1,25ml

Epitect® methylated human control DNA (bisulfite converted) 10ng/µl

Eurofins Genomics Primer 100pmol/ μ l: 10 μ l Konzentrat + 90 μ l RNase freies Wasser

Primer:

Gsta4aFw: ATTCGTATATTTTTGATCGAAGATC (25), ID: 027961200

Gsta4agcRev: CGGGCGGGGGCGGGCGGGACGGGCGCCGAATATAAAAACGATCTAACTACGAC (52),
ID:02761201

Geräte:

Vortex

Corbett Research PCR

Software: Rotorgene 6000

5. Elektrophorese

Herstellung des Gels:

Materialien:

Handschuhe: SensoNitril (puderfrei, unsteril, latexfrei)

Erlenmeyerkolben

Messzylinder

Parafilm

Pergamyn Paper 100x100mm

Pipetten: Eppendorf

Spitzen mit Filter: Sorenson, Bioscience, Inc

Gelkammer: Gelschlitten, Gelkamm

Reagenzien:

Aqua dest.

Agarose-Pulver: invitrogen life technologies

TAE-Puffer (BIO-RAD, Tris/Acetic Acid/ EDTA buffer)

Färbemittel: BIOTIUM GelRed Nucleic Acid Stain

Geräte:

Analysenwaage Sartorius

Heizplatte: IKA-Combimag RCH

Elektrophorese:

Materialien:

Handschuhe: SensoNitril (puderfrei, unsteril, latexfrei)

Eppi 200 μ l: Eppi Eppendorf 1000x0,2ml

Pipetten: Eppendorf

Spitzen mit Filter: Sorenson, Bioscience, Inc

Reagenzien:

Ladepuffer (GelPilot Loading Dye): 550 μ l – lagern bei 15-25°C

DNA-Ladder: GelPilot 100bp Ladder (100 lanes, 6 μ l/lane) 600 μ l – lagern bei 4°C

Laufpuffer: BIO-RAD, TAE buffer

Aqua dest.

RNase freies Wasser: 1,9ml – lagern bei 15-25°C

Geräte:

Minizentrifuge „Schwammerl“ Sprout

Elektrophoresekammer BIO-RAD

Power-Supply (Spannungsgeber) BIO-RAD

Auswertung:

Materialien:

Schutzfenster BIO-RAD

Schutzbrille

Handschuhe: SensoNitril (puderfrei, unsteril, latexfrei)

Skalpell: HEINTEL, Sterile Disposable Scalpel

Eppi: Eppendorf Tubes ® 3810X 1,5ml

Ständer: Eppendorf

Reagenzien:

Ethanolum absolutum: AnalaR Normapur

Geräte:

UV-Transilluminator: BIO-RAD

Software: Quantity One

6. DNA-Aufreinigung

QIAquick ® Gel Extraction Kit (250) – lagern bei 15-25°C

Materialien:

Handschuhe: SensoNitril (puderfrei, unsteril, latexfrei)

Eppi: Eppendorf Tubes ® 3810X 1,5ml

Ständer: Eppendorf

Pipetten: Eppendorf

Spitzen mit Filter: Sorenson, Bioscience, Inc

Spin column: 4x QIAquick Spin column – lagern bei 15-25°C

Auffanggefäße: 2x collection tubes 2ml

Reagenzien:

QG-Puffer (Solubilisation buffer with pH indicator): 250ml – lagern bei 15-25°C

Isopropanol (Ph. Eur. 2-Propanol)

PE-Puffer (wash buffer): 55ml Konzentrat + 220ml Ethanolum abs. – lagern bei 15-25°C

EB-Puffer (Elution buffer): 15ml – lagern bei 15-25°C

Geräte:

Thermomixer: Eppendorf 2ml, Thermomixer comfort

Zentrifuge: Eppendorf Zentrifuge 5415R

Vortex