

**Aus dem Klinikum am Steinenberg Reutlingen  
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen  
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Chefarzt: Professor Dr. F. K. Trefz**

**Bestimmung von Referenzwerten für  
krankheitsrelevante Aminosäurenkonzentrationen im  
Trockenblut mittels Tandem-Massenspektrometrie  
in einem Normalkollektiv gesunder Neugeborener**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der  
Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Janine Morgenthaler  
aus  
Reutlingen**

**2004**

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. F. K. Trefz

2. Berichterstatter:

Professor Dr. Ch. F. Poets

3. Berichterstatter:

Professor Dr. G. F. Hoffmann

*Gewidmet meinen Eltern und meiner  
Großmutter Elisabeth*

<b>1</b>	<b><i>EINLEITUNG</i></b>	<b>1</b>
1.1	Neugeborenenscreening	1
1.2	Verwendung der Tandem-Massenspektrometrie (TMS) für das Neugeborenen-Screening	2
1.3	Einflüsse auf das Screening Ergebnis durch die postnatale Adaptation	3
1.4	Aminoazidopathien im Neugeborenen-Screening	3
1.4.1	Hyperphenylalaninämien (HPA)	3
1.4.2	Hypertyrosinämie	7
1.4.3	Ahornsiruperkrankung (Maple Syrup Urine Disease (MSUD), Branched Chain Ketoaciduria)	12
1.4.4	Hypermethioninämie und Homocystinurie	15
1.4.5	Citrullinämie	16
1.5	Ziele und Fragestellung	18
<b>2</b>	<b><i>MATERIAL UND METHODEN</i></b>	<b>19</b>
2.1	Rahmenbedingungen	19
2.2	Probenmaterial	19
2.3	Probengewinnung für das Neugeborenen-Screening	19
2.4	Probengewinnung für die Studie	20
2.5	Dokumentation der klinischen Daten	20
2.6	Dokumentation der Ernährung	20
2.7	Bestimmung des Gestationsalters nach Farr	21
2.8	Probenverarbeitung	22
2.8.1	Geräte für die Probenaufbereitung	22
2.8.2	Geräte für die Analytik	22
2.8.3	Chemikalien und Lösungen	22
2.8.4	Probenverarbeitung	22
2.8.5	Protokoll der Probenvorbereitung	23
2.8.6	Geräteparameter des Tandem-Massenspektrometers (ESI-MS/MS)	23
2.8.7	Tandem-Massenspektrometrie	24
2.9	Rohdatenanalyse	24
2.10	Statistische Analyse	25
2.10.1	Bestimmung der Referenzwerte für Aminosäurenkonzentrationen in einem Normalkollektiv gesunder Neugeborener	25
2.10.2	Bestimmung der Einflussvariablen Alter auf die Aminosäurenkonzentrationen	25
2.10.3	Bestimmung von Referenzbereichen	25
2.10.4	Bestimmung der Einflussgröße Geburtsgewicht, postnataler Gewichtsverlust und Gestationsalter auf die Aminosäurenkonzentrationen	25
2.10.5	Bestimmung der Einflussgröße Geschlecht auf die Aminosäurenkonzentrationen	25
2.10.6	Bestimmung der Einflussgröße Ernährung auf die Aminosäurenkonzentrationen	26
2.11	Einschlusskriterien	26
2.12	Ausschluß von Outlayers	27
2.13	Ausschluß bei fehlenden bzw. falschen Angaben	27
2.14	Screening Methoden und Qualität und Validität der Methoden	27
2.14.1	Methoden zum Nachweis von Aminoazidopathien	27

2.14.2	Bakterieninhibitionstest	27
2.14.3	Chromatographische Methode	28
2.14.4	Enzymatische Methode	28
2.14.5	Fluorometrische Methode	28
2.14.6	HPLC Methode	29
2.14.7	Tandem-Massenspektrometrie (TMS)	29
2.14.8	Diskussion der Methoden	29
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Daten des Untersuchungskollektivs</b>	<b>34</b>
	<b>Tabelle 1:</b> Kenndaten des Untersuchungskollektivs	<b>34</b>
	<b>Tabelle 2:</b> Einteilung der Neugeborenen in Gruppen entsprechend der Ernährung in den ersten fünf Lebenstagen	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der Aminosäurenbestimmung</b>	<b>37</b>
	<b>Tabelle 3:</b> Mittelwert $\pm$ einfache Standardabweichung (SD), Median und Quantile der Aminosäurekonzentrationen von 1542 Proben in den ersten fünf Lebenstagen	<b>37</b>
3.2.1	Vergleich der Methoden HPLC und TMS zur Bestimmung der Aminosäurenkonzentration	38
<b>3.3</b>	<b>Verlauf der Aminosäurenkonzentration in den ersten fünf Lebenstagen</b>	<b>39</b>
	<b>Tabelle 4:</b> Verlauf der Aminosäurekonzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) in den ersten fünf Lebenstagen	<b>40</b>
	<b>Tabelle 5:</b> Verlauf der Quotienten der Aminosäuren in den ersten fünf Lebenstagen	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>Korrelation der Aminosäurenkonzentration mit dem postnatalen Gewichtsverlust</b>	<b>52</b>
<b>3.5</b>	<b>Verlauf der Aminosäurenkonzentration bei Mädchen und Jungen</b>	<b>52</b>
<b>3.6</b>	<b>Verlauf der Aminosäurenkonzentration bei unterschiedlichem Geburtsgewicht</b>	<b>56</b>
<b>3.7</b>	<b>Verlauf der Aminosäurenkonzentration bei unterschiedlichem Gestationsalter</b>	<b>56</b>
<b>3.8</b>	<b>Verlauf der Aminosäurenkonzentration bei unterschiedlichen Ernährungsformen</b>	<b>58</b>
	<b>Tabelle 6:</b> Abhängigkeit der Aminosäurenkonzentration von der Ernährung	<b>58</b>
<b>3.9</b>	<b>Patienten mit Risiko für PKU - Konzentrationsverlauf der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin im Trockenblut</b>	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungen einzelner krankheitsrelevanter Aminosäuren</b>	<b>67</b>
<b>4.2</b>	<b>Vergleich eigener Daten über Einflussgrößen mit der Literatur</b>	<b>68</b>
4.2.1	Alter	68
4.2.2	Ernährung	69
4.2.3	Gewichtsverlust	70
4.2.4	Geburtsgewicht	71
4.2.5	Geschlecht	71
4.2.6	Gestationsalter	72
4.2.7	Pathologischer Phenylalaninverlauf in einer Risikogruppe	73

<b>4.3</b>	<b>Weitere in der Literatur beschriebene Einflüsse</b>	<b>73</b>
4.3.1	Circadianer Rhythmus	73
4.3.2	Genetik	74
4.3.3	Hormone	74
<b>4.4</b>	<b>Schlußfolgerung</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>79</b>
6.1	Verzeichnis der Abkürzungen	79
6.2	Verzeichnis der Abbildungen	80
6.3	Verzeichnis der Tabellen	82
6.4	Vergleich der Aminosäurekonzentrationen	83
6.4.1	Eigene Daten	83
6.4.2	Sander et al. (2000)	84
6.4.3	Schulze et al. (1999)	85
6.4.4	Reilly et al. (1998)	86
6.4.5	Pohlandt (1978)	87
6.4.6	Chace et al. (1995, 1996, 1997)	88
6.5	Hinweise zur Statistik	89
6.5.1	Modell für altersabhängige Referenzbereiche der Aminosäurekonzentrationen (AS)	89
6.5.2	Erläuterungen zur Darstellung der Ergebnisse	90
6.6	Aufklärungsschrift zum Erweiterten Neugeborenen Screening	91
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>TABELLARISCHER LEBENSLAUF</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>116</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 *Neugeborenen*screening

Das Neugeborenen-Screening ist eine Untersuchung zur Früherkennung angeborener Stoffwechselstörungen und Endokrinopathien. Neugeborene mit behandelbaren metabolischen und endokrinen Erkrankungen sollen dadurch frühzeitig und vollständig erfasst werden. Die präsymptomatische Diagnose und Therapie soll eine erfolgreiche Behandlung ermöglichen und irreversible Schäden der geistigen Entwicklung und lebensbedrohliche Entgleisungen des Stoffwechsels verhindern.

Das Neugeborenen-Screening auf Phenylketonurie (PKU) gilt als „Paradebeispiel“ für einen erfolgreichen Einsatz einer Präventivmaßnahme in der Kinderheilkunde: Durch die Entwicklung einer sensitiven Methode zur Erkennung erhöhter Phenylalanin-Spiegel im Blut durch Guthrie (Guthrie, 1963, 1996) und einer einfachen Blutentnahme und Probenversandmöglichkeit („Guthriekarte“) wurde die Organisation eines generellen Neugeborenen-Screenings auf PKU möglich. Die nächste Voraussetzung, eine erfolgreiche Behandlung der PKU, war durch die Arbeiten von Bickel et al. möglich geworden (Bickel et al., 1954). Die großen Erfolge des Neugeborenen-Screenings auf PKU hatte zur Folge, dass in den darauffolgenden Jahren weitere Erkrankungen in das Neugeborenen-Screening aufgenommen wurden. Im allgemeinen Neugeborenen-Screening wurde die Früherkennung folgender Erkrankungen empfohlen: Phenylketonurie (PKU), Galaktosämie, Hypothyreose, Biotinidase-Mangel und Adrenogenitales Syndrom (Ständige Kommission für das Neugeborenen-Screening, 1997).

Der empfohlene Untersuchungsumfang an Erkrankungen wird durch mehrere Kriterien festgelegt. Voraussetzungen sind ein signifikanter Krankheitswert, positive Kosten-Nutzen-Relation, die Erkennung einer latenten oder frühen Symptomatik, ausreichendes Wissen über die physiologischen Hintergründe und den Verlauf der Erkrankung, eine anerkannte Methode zur Diagnostik, die für die Bevölkerung zumutbar ist und akzeptiert wird, die Behandelbarkeit der Erkrankung bzw. der Nutzen für das Kind, die Verfügbarkeit von Bestätigungsdiagnostik und Nachsorgestrukturen und eine ständige Weiterentwicklung des Neugeborenen-Screenings. Außerdem muss eine ausreichende Methodensicherheit gegeben sein, die eine hohe diagnostische Sensitivität (alle erkrankten Neugeborenen sollen erfasst werden) und vertretbare Rate an Kontrolluntersuchungen (Recall-Rate < 0,1%) aufgrund von falsch positiven Ergebnissen aufweist (Wilson and Jungner, 1968).

Die bislang verfügbaren Untersuchungsmethoden für das allgemeine Neugeborenen-Screening benutzen mikrobiologische, enzymatische, chromatographische und fluorometrische Methoden zum Nachweis erhöhter Phenylalaninwerte von kapillär entnommenen Blutproben auf Filterpapier.

### **1.2 Verwendung der Tandem-Massenspektrometrie (TMS) für das Neugeborenen-Screening**

In den letzten Jahren wurde für die Diagnostik von Aminoazidopathien, Fettsäureoxidationsstörungen sowie Organoazidämien aus Trockenblut in vielen Screeninglabors die TMS eingeführt. In einem Analysegang des TMS können über 20 Parameter aus Trockenblut quantitativ bestimmt werden. Der hohe Informationsgehalt durch die simultane Messung multipler Komponenten aus einer Probe erlaubt die Charakterisierung einer Erkrankung durch mehrere Metabolite im Gegensatz zu älteren Methoden, bei denen nur ein für die Erkrankung repräsentativer Metabolit gemessen wurde. Für die Diagnostik der Phenylketonurie kann z.B. nicht nur ein erhöhter Phenylalaninwert herangezogen werden, sondern die zusätzliche Bestimmung der Tyrosinkonzentration und die Bildung des Quotienten aus Phenylalanin und Tyrosin ermöglicht eine weitere Verbesserung von Sensitivität und Spezifität. Die TMS hat den weiteren Vorteil, dass sie vorhandene Organisationsstrukturen bzw. die Verwendung von Trockenblut nutzen kann („Guthriekarte“). Die technologische Weiterentwicklung dieser Methoden ermöglichte einen hohen Probendurchsatz und die Automatisierung der Screeninguntersuchungen.

Neben der technologischen Weiterentwicklung des Neugeborenen-Screenings ergab sich eine zunehmende Veränderung im Gesundheitswesen in den meisten Industrieländern. Die Einführung von Kostenpauschalen führte und führt immer noch dazu, dass Frauen nach der Geburt möglichst schnell entlassen werden. Das hatte zur Folge, dass die bisherigen Screeningempfehlungen (Neugeborenen-Screening am 4.- 7. Lebenstag) organisatorische Probleme aufwarfen (Ständige Kommission für das Neugeborenen-Screening (1997)).

Gleichzeitig ergab sich aus medizinischer Sicht das Bedürfnis, den Screeningzeitpunkt möglichst früh zu terminieren, da nur so akut verlaufende Erkrankungen (z.B. Ahornsückerkrankung (MSUD) oder Organoazidopathien) rechtzeitig erkannt und behandelt werden können (Chace et al. 1995, 1997).

Inzwischen gehen die Empfehlungen soweit, dass bereits nach der 36. Lebensstunde ein Neugeborenen-Screening möglich ist, wenn die TMS eingesetzt wird. (Ständige Scree-

ningkommission der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (DGKJ) (2002)).

### **1.3 Einflüsse auf das Screening Ergebnis durch die postnatale Adaptation**

Die „Vorverlegung“ des Neugeborenen-Screenings auf die 36. Lebensstunde bedeutet eine verbesserte Früherkennung. Andererseits stellt sich die Frage, ob nicht durch die starken physiologischen und biochemischen Veränderungen nach der Geburt die Spezifität und Sensitivität der Screeninguntersuchungen beeinträchtigt wird. So weiß man schon länger, dass z.B. bei der PKU die Phenylalaninkonzentration im fetalen Blut normal ist und erst nach Geburt ansteigt (McCabe und McCabe, (1983), American Academy of Pediatrics Committee on Genetics, (1982). Bei anderen Erkrankungen wie z.B. dem MCAD-Defekt scheint es umgekehrt zu sein: bei früher postnataler Probenentnahme ist der pathognomische Metabolit Octanoylcarnitin höher als am 5.-10. Lebenstag (Chace et al., 1997).

Neben dem Einfluss des Alters des Kindes wird in vielen Empfehlungen immer noch die Bedeutung einer adäquaten Milchfütterung (Muttermilch oder Säuglingsmilch) diskutiert (Department of Health and Social Security, Welsh Office, (1969), Zabransky, (1997)). Während diese für den Nachweis einer erhöhten Galaktose im Blut nach wie vor gilt, ist sie für die Früherkennung anderer Erkrankungen bei Verwendung entsprechender Methoden nicht notwendig (Ständige Screeningkommission der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (DGKJ) (2002)). Über andere postnatale Einflüsse auf die Screeningparameter gibt es bislang keine systematischen Daten.

### **1.4 Aminoazidopathien im Neugeborenen-Screening**

#### **1.4.1 Hyperphenylalaninämien (HPA)**

Die essentielle Aminosäure Phenylalanin ist ein Grundbaustein für die Eiweißsynthese und wird dem Körper über die Nahrung zugefügt oder entsteht durch den Abbau von körpereigenem Eiweiß. Bei einer normalen eiweißhaltigen Ernährung wird wesentlich mehr Phenylalanin aufgenommen als für die Eiweißsynthese benötigt wird (Young und Pellett, 1987, American Academy of Pediatrics, 1976, Basile-Filho et al., 1997).

Ein Großteil des überschüssigen Phenylalanins wird in der Leber in die Aminosäure Tyrosin umgewandelt, die eine Vorstufe für die Neurotransmittersynthese darstellt (Kaufman, 1976). Diese Reaktion wird durch das Enzym Phenylalaninhydroxylase

(PAH, EC 1.14.16.1) und den Cofaktor Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) katalysiert. (Kaufman, 1971, Kaufman, 1963).

Ein Defekt des PAH Enzyms sowie ein Mangel an Cofaktor BH<sub>4</sub> vermindern die Aktivität des Enzymsystems. Die Phenylalaninspiegel in Blut und Organen steigen an und Tyrosin wird zu einer essentiellen Aminosäure. Erhöhte Phenylalaninkonzentrationen führen während der Entwicklung des Gehirns zu irreversiblen Schäden, nach Abschluß der Hirnentwicklung zu reversiblen Funktionseinschränkungen (Lentze et al., 2001).

Die Phenylketonurie (PKU) (McKusick 261600) und die Non-PKU HPA werden autosomal rezessiv vererbt und beruhen auf Mutationen des *PAH*-Gens, das auf dem Chromosom 12q22-q24.1 lokalisiert ist (Lidsky, 1985). Mehrere hundert krankheitsauslösende Mutationen beinhaltet das PAHdb, eine öffentliche on-line Datenbank über die spezifische Lokalisation von Mutationen der PAH (Scriver et al., 2000). In der europäischen Bevölkerung beträgt die Inzidenz der PKU 1:10.000 Lebendgeburten (Scriver und Kaufman, 2001).

Die Höhe der Phenylalaninspiegel im Blut, die diätetische Phenylalanintoleranz sowie die Restaktivität des PAH Enzyms (Guttler, 1980) unterteilen die HPA in die schwerwiegende PKU und die mildere Non-PKU HPA. Weitere HPA Formen sind die transitorische HPA, die HPA aufgrund eines BH<sub>4</sub>- Mangels durch Störungen der Dihydrobiopterinsynthese oder der Dihydrobiopterinreduktase und die HPA aufgrund maternaler PKU.

#### 1.4.1.1 PKU und Non-PKU HPA

Unbehandelt führt die Erkrankung zu deutlicher geistiger und weniger ausgeprägter statomotorischer Retardierung mit Mikrozephalie, cerebralen Krampfanfällen und weiteren neurologischen Auffälligkeiten (Bickel et al, 1954).

Die Pathogenese der gestörten Hirnentwicklung weist darauf hin, daß Phenylalanin selbst die schädigende Wirkung ausübt, da die oxidativen Abbauprodukte von Phenylalanin keine hohen intrazerebralen Konzentrationen erreichen, um auf die verschiedenen Enzymsysteme einzuwirken (Kaufman, 1976). Die hohen Phenylalaninkonzentrationen haben wahrscheinlich Auswirkungen auf den Myelinstoffwechsel und schädigen sowohl die Funktion der Nerven als auch die normale Entwicklung der Gehirnstruktur in einer äußerst vulnerablen Phase (Bauman and Kemper, 1982). Außerdem werden die Proteinsynthese und die Neurotransmittersynthese gestört (McKean, 1972, Trefz, 2000).

Eine Behandlung, die eine normale körperliche und geistige Entwicklung ermöglicht, entwickelte Horst Bickel mit einer phenylalaninarmen Diät (Bickel et al., 1953, Koch et

al., 1987, Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria, 1993). Daraufhin wurde verstärkt die frühzeitige Identifizierung von PKU-Patienten vorangetrieben, die durch das Neugeborenen-Screening mit dem Bakterieninhibitionstest von Robert Guthrie (Guthrie, 1961) möglich wurde.

Die optimale Behandlung der PKU beinhaltet: (1) Den Beginn der Diät im ersten Lebensmonat, da die Intelligenzleistung mit einem frühzeitigen Diätbeginn korreliert (Barclay et al., 1988, Smith, 1990). (2) Das Einhalten der Diät im Kindes- und Jugendalter, möglicherweise sogar lebenslang, und auf jeden Fall präkonzeptionell und während der Schwangerschaft zum Schutz des Feten (Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria, 1993). (3) Eine ausreichende Eiweißaufnahme, die zu normalen Phenylalaninwerten im Plasma führt und damit das Wachstum und die Entwicklung nicht beeinträchtigt (Scriver und Kaufman, 2001).

Die Einhaltung der Diät wird durch Beschränkungen bei der Ernährung, einem drastischen Wechsel des Lebensstiles, sowie den oft unzureichenden Eigenschaften der Phenylalaninprodukte in Hinblick auf Geschmack und Geruch erschwert und oft nicht konsequent fortgeführt (Scriver und Kaufman, 2001). Die resultierende Erhöhung der Phenylalaninkonzentration im Blut führen bei Kindern zu pathologischen Veränderungen des Nervensystems, zur Verschlechterung kognitiver Fähigkeiten und zu Verhaltensstörungen (Thompson et al., 1990, Smith et al., 1989, 1990, Waisbren et al., 1994). Allerdings korrelieren hohe Phe-Konzentrationen im Blut in jedem Lebensalter mit Störungen des Myelinstoffwechsels und neurologischer Verschlechterung, auch wenn eine diätetische Behandlung im Kindesalter durchgeführt wurde (Thompson et al., 1990, 1993, Toft et al., 1994).

#### *1.4.1.2 Maternale PKU*

Ein weiterer wichtiger Aspekt der lebenslangen diätetischen Behandlung sind die Risiken für die Feten von PKU-Patientinnen während der Schwangerschaft. Die Hyperphenylalaninämie führt zur Embryopathie bzw. Fetopathie (Scriver, 1967, Kirkman, 1992, Lenke und Levy, 1980), die das Wachstum beeinträchtigt, zu angeborenen Fehlbildungen (Lenke und Levy, 1980), Mikrozephalie und geistiger Retardierung des Feten führt. Patientinnen mit Hyperphenylalaninämie sollten bereits vor der Schwangerschaft eine Beratung erhalten und die Diät bereits zu diesem Zeitpunkt wieder konsequent aufnehmen und während der gesamten Schwangerschaft strikt einhalten.

Eine normale Entwicklung des Feten ist durch die genaue Einhaltung der Behandlung vor und während der Schwangerschaft möglich (Thompson et al., 1991, Drogari et al.,

1987, Clark und Cockburn, 1991, Brenton und Haseler, 1990, Platt et al., 1992, Güttler et al., 1990).

#### *1.4.1.3 Transiente Hyperphenylalaninämie*

Bei einigen Neugeborenen wird eine HPA im Neugeborenen-Screening nachgewiesen, die bei einer Zweituntersuchung nicht mehr vorhanden ist. Diese transienten HPA haben keine weitere klinische Bedeutung (Scriver und Kaufman, 2001). Eine maternale HPA kann in den ersten zwei Lebenstagen zu einem solchen Effekt führen (Levy und Lobbregt, 1995).

#### *1.4.1.4 Hyperphenylalaninämie durch Tetrahydrobiopterin (BH4)-Mangel*

BH4 ist ein Cofaktor der Hydroxylierungsreaktion von Phenylalanin zu Tyrosin, dessen Mangel in den meisten Fällen zu einer HPA führt. Ein Mangel an BH4 beruht auf Genmutationen, die Enzyme für das Recycling oder die Synthese von BH4 beeinträchtigen. BH4 ist auch ein Cofaktor für die Hydroxylierung von Tyrosin und Tryptophan. Der Mangel an BH4 führt somit zu Störungen der Hydroxylierungsreaktionen und zur Störung der Synthese der entsprechenden Neurotransmittervorstufen L-Dopa und 5-Hydroxytryptophan.

Die Häufigkeit von BH4-Defekten beträgt 1- 2 % der Neugeborenen mit HPA und liegt somit ungefähr bei 1:1Mio. Geburten (Blau et al., 2001).

Patienten mit Phenylalaninerhöhungen aufgrund eines BH4-Mangels zeigen trotz frühzeitiger Diagnose unter Behandlung mit lediglich einer Phe-armen Diät fortschreitende neurologische Symptome und versterben frühzeitig, da zusätzlich die Gabe der Neurotransmittervorstufen L-Dopa und 5-Hydroxytryptophan (Kaufman et al., 1983), sowie Carbidopa als Decarboxylase-Inhibitor (Bartholomè und Byrd, 1975) notwendig ist. Bei manchen Defekten ist auch BH4 zur Senkung der Phenylalaninkonzentration im Blut (Ponzone et al., 1993, Al-Aqeel et al., 1992) erforderlich. Das Ziel der Behandlung ist die Beherrschung der HPA und die Korrektur des Neurotransmitter-Mangels (Blau et al., 2001).

Da es sich bei dem BH4-Mangel um eine schwerwiegende jedoch behandelbare Erkrankung handelt, die im Neugeborenen-Screening nicht von anderen HPA-Formen differenziert werden kann, sollte schon bei leicht erhöhter, persistierender HPA, ein selektives Screening auf einen BH4-Mangel durchgeführt werden (Dhondt, 1991, Blau et al., 1996). Das selektive Screening beinhaltet die Durchführung eines Tests auf das Ansprechen der Phenylalaninkonzentrationen auf die Gabe von BH4, die Analyse von Pterinen

im Urin und die Messung der Aktivität des Enzyms Dihydropteridinreduktase im Blut (Blau et al., 2001).

#### 1.4.2 Hypertyrosinämie

Die Aminosäure Tyrosin wird dem Körper aus zwei Quellen zugeführt, der Nahrung und der Hydroxylierung von Phenylalanin. Tyrosin wird als Vorstufe zur Synthese von Neurotransmittern, Schilddrüsenhormonen und Melaninpigmenten benötigt. Der größte Anteil von Tyrosin wird in Proteine eingebaut oder in mehreren Reaktionsschritten in den Hepatozyten abgebaut.

Zu den Ursachen einer Hypertyrosinämie zählen mehrere angeborene autosomal rezessive Erkrankungen des Tyrosinstoffwechsels, schwere Leberfunktionsstörungen, die transiente Tyrosinämie des Neugeborenen und weitere hier nicht besprochene (Skorbut, Hyperthyreose, postprandialer Status). Die häufigste Ursache kurzfristiger Hypertyrosinämien sind die transiente neonatale Tyrosinämie und Lebererkrankungen (Mitchell et al., 2001).

Kurzzeitige Perioden von erhöhtem Tyrosin werden vom Körper gut toleriert, chronische Hypertyrosinämien gehen aber zum Teil mit neurologischen Störungen und Entwicklungsverzögerungen einher, deren kausaler Zusammenhang noch nicht eindeutig bewiesen ist (Rice et al., 1989, Mamunes et al., 1976, Light et al., 1973) und der auch im Gegensatz dazu steht, dass Kinder mit hepatorenalear Tyrosinämie eine normale Intelligenz und keine Beeinträchtigung des ZNS aufweisen (Mitchell et al., 2001).

##### 1.4.2.1 *Transiente Hypertyrosinämie des Neugeborenen*

Die transiente Hypertyrosinämie (OMIM 276500) ist die häufigste Störung des Aminosäurestoffwechsels (Scriver und Rosenberg, 1973). Als Ursache wird die Unreife des Enzyms 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (pHPPD) in Zusammenhang mit einem vermehrten Abbau von Tyrosin vermutet. Die geringe Aktivität der pHPPD im Fetus und Neugeborenen (Ohisalo et al., 1982, Fellmann et al., 1972) aufgrund der späten Reifung des Enzyms (Mitchell et al., 2001) sowie die hohen Konzentrationen von 4-Hydroxyphenylpyruvat und dessen Derivate (Scriver und Rosenberg, 1973, Goodwin, 1972) bei Patienten mit transienter Tyrosinämie weisen auf den Mangel an pHPPD als Hauptursache der transienten Tyrosinämie hin.

Risikofaktoren für die Entwicklung einer transienten Hypertyrosinämie sind die Frühgeburtlichkeit, eine hohe Proteinzufuhr und eine unzureichende Vitamin C Aufnahme (Scriver und Rosenberg, 1973, Wong et al., 1967). Ascorbinsäure stellt einen Cofaktor des Enzyms pHPPD dar (Mitchell et al., 2001).

Die isolierte Hypertyrosinämie bei einem asymptomatischen Neugeborenen, die durch Gabe von Ascorbinsäure oder spontan mithilfe einer Diät zurück geht und gleichzeitig keine Zeichen einer Leber-, Nieren- oder Hautschädigungen aufweist, unterscheidet die transiente Tyrosinämie von anderen Hypertyrosinämien.

In den meisten Fällen ist die transiente Tyrosinämie ein biochemischer Befund bei einem ansonsten unauffälligen Neugeborenen (Menkes et al., 1966, Partington et al., 1968). In einigen Fällen allerdings ging die transiente Tyrosinämie mit Lethargie und reduzierter motorischer Aktivität beim Neugeborenen einher (Light et al., 1973). Bei einigen Patienten mit transienter Tyrosinämie wurde eine reduzierte intellektuelle Prognose angedeutet (Rice et al., 1989, Mamunes et al., 1976). Eine Studie zur Klärung dieser Frage wurde noch nicht durchgeführt.

Obwohl die transiente Tyrosinämie des Neugeborenen meistens gutartig verläuft, ist es wichtig, die Proteinzufuhr einzuschränken und Ascorbinsäure zu verabreichen, um die Tyrosin-Spiegel so schnell wie möglich zu senken. Meistens nehmen die Tyrosinwerte im Serum innerhalb von Stunden nach der Gabe von Ascorbinsäure ab (Light et al., 1966). Bei einer unauffälligen klinischen Untersuchung und Familienanamnese in Bezug auf eine hepatorenale Tyrosinämie, sollte die Tyrosinbestimmung 2 bis 3 Tage nach Ascorbinsäure Gabe wiederholt werden, um mit Sicherheit von einer transienten Form der Hypertyrosinämie ausgehen zu können (Mitchell et al., 2001).

#### *1.4.2.2 Tyrosinämie Typ I (Hepatorenale Tyrosinämie)*

Die Ursache der rezessiv vererbten hepatorenen Tyrosinämie (OMIM 276700) ist ein Mangel des Enzyms Fumarylacetoacetat-Hydrolase (FAH), einem der letzten Enzyme in der Abbaukaskade des Tyrosins (Kvittingen et al., 1981, Lindblad et al., 1977, Fällström et al., 1979, Berger et al., 1981, Gray et al., 1981).

Durch den Enzymblock entstehen vermehrt die Metabolite Maleylacetoacetat, Fumarylacetoacetat, Succinylacetoacetat und Succinylaceton, die möglicherweise toxisch auf Leber, Niere und peripheres Nervensystem einwirken (Mitchell et al., 2001). Die Inzidenz wird generell auf 1:100.000-120.000 geschätzt (Halvorsen, 1980), in einer Region in der Provinz Quebec in Kanada (Saguenay-Lac St.Jean) sind größere Patientengruppen beschrieben (De Braakeleer und Larochelle, 1990, Bergeron et al., 1974).

Die Symptome der Erkrankung variieren stark und beinhalten Leberfunktionsstörungen, akutes Leberversagen, Leberzirrhose, hepatozelluläres Karzinom, renales Fanconi-Syndrom, Glomerulosklerose und Störungen des peripheren Nervensystems (Mitchell et al., 2001).

Das Manifestationsalter variiert zwischen der ersten Lebenswoche und 6 Monaten (van Spronsen et al., 1994). Durch eine katabole Stoffwechsellage, wie z.B. bei einer Infektion kann eine akute hepatische Krise ausgelöst werden. Initialsymptome sind Erbrechen, Durchfall, Fieber, Ödeme, Ikterus, Hepatomegalie und Gerinnungsstörungen (Mitchell et al., 2001).

Je jünger das Kind bei der ersten Manifestation ist, desto grösser ist das Risiko an der Grunderkrankung zu sterben (van Spronsen et al., 1994). Ein frühzeitige Diagnose ist daher anzustreben.

In getrockneten Blutproben kann die Tyrosinkonzentration und die Konzentrationen von Metaboliten wie Methionin, Succinylaceton und Aminolävulinsäure, die bei der hepatorenen Tyrosinämie auffällig sind, gemessen werden.

Die alleinige Messung der Tyrosinkonzentration hat den Nachteil, dass sich die Werte mit denen der transienten Tyrosinämie überlappen. Ein wiederholter Screening Test nach 2 bis 6 Wochen eliminiert möglicherweise die falsch positiven Ergebnisse der transienten Tyrosinämie (Halvorsen, 1980) führt allerdings zu einer späteren Behandlung von Neugeborenen mit hepatorenen Tyrosinämie und einige Patienten sind zum Zeitpunkt des Zweitscreenings bereits symptomatisch (van Spronsen et al., 1994, Laroche et al., 1967). Die Tyrosinkonzentration im Blut steigt nach der Geburt an und kann somit bei einer frühzeitigen Probenabnahme noch relativ niedrig sein. Aufgrund der zunehmend schnelleren Entlassung der Neugeborenen und damit auch früheren Probenabnahme treten vermehrt falsch-negative Ergebnisse auf, wenn man einen relativ hohen Grenzwert wählt. Bei einem niedrigeren Grenzwert steigt andererseits die Anzahl der falsch positiven Ergebnisse, die zu einer Kontrolluntersuchung führen, dramatisch an.

Im Gegensatz zur Tyrosinkonzentration ist die Konzentration von Succinylaceton bereits kurz nach der Geburt erhöht. In Quebec wird seit April 1997 Tyrosin durch Succinylaceton beim Screening erfolgreich ersetzt. Eine weitere Möglichkeit ist die Festlegung eines relativ niedrigen Grenzwertes für Tyrosin, der bei Überschreiten eine indirekte Messung des Succinylacetons mittels Bestimmung der Delta-Aminoslävulinsäure-Dehydratase nach sich zieht (Schulze et al. 2001).

Das schwierigste diagnostische Problem stellt die Hypertyrosinämie in Zusammenhang mit einer Leberfunktionsstörung da. Zum einen muß die hepatorene Tyrosinämie bei Leberfunktionsstörungen unbekannter Ursache in Betracht gezogen werden, zum anderen kann das zu diagnostischen Schwierigkeiten bei Leberzellerkrankungen mit sekundärer Hypertyrosinämie führen. Sowohl das Muster der Aminosäurenbestimmung im

Plasma, als auch das Auftreten einer Tubulopathie gibt keine eindeutige Auskunft. Der Nachweis von Succinylaceton im Blut oder Urin bestimmt die Diagnose der hepatorena- len Tyrosinämie (Mitchell et al., 2001).

Die Behandlung mit einer Phenylalanin und Tyrosin restriktiven Diät erscheint sinnvoll, da ein frühzeitiger Beginn der Diät die Tubulopathie verbessert bzw. verhindert. Die Menge an Phenylalanin und Tyrosin ist abhängig vom Gedeihen und klinischen Zustand des Kindes und orientiert sich nur grob am Plasma-Tyrosin-Spiegel. Die Behandlung mit der Diät bleibt jedoch schwierig, da es keine verlässlichen biologischen Parameter gibt, mit denen der Erfolg der Stoffwechseleinstellung überprüft werden kann. Die Diät als auch beständig normale Tyrosinwerte haben keinen Einfluss auf das Vorranschreiten der Leberzirrhose (Mitchell et al., 1995).

Die Lebertransplantation war die einzige weitere Therapiemöglichkeit, bis 1992 das Medikament NTBC (2-(2-Nitro-4-Trifluormethyl-Benzoyl)-1,3-Cyclohexandion ) entwickelt wurde (Lindstedt et al., 1992). Die Behandlung mit NTBC bedeutete einen wesentlichen Schritt in der Therapie der hepatorena- len Tyrosinämie. NTBC ist ein Inhibitor von 4-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase, einem Enzym in der frühen Kaskade des Tyrosinabbaus, der somit das Entstehen der möglicherweise toxischen Metabolite Succinylaceton, Aminolävulinsäure, Maleylacetoacetat und Fumarylacetoacetat verhindert. Dafür steigen die Metabolite 4-Hydroxyphenylpyruvat, 4-Hydroxyphenyllactat und Tyrosin an, sofern eine Diät die Aufnahme der Vorstufen nicht begrenzt. Die Behandlung mit NTBC ist innerhalb von Stunden wirksam und vermindert das Risiko für eine Dekompensation von Leber oder Nervensystem (Mitchell et al., 2001). Einzelne Ergebnisse geben Anlaß zu der Annahme, dass die Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms durch eine NTBC-Behandlung verringert werden kann (Holme und Lindstedt, 1998).

#### *1.4.2.3 Tyrosinämie Typ II (oculocutane Tyrosinämie)*

Weitere Bezeichnungen der Erkrankung sind Tyrosinaminotransferase-Mangel, Keratosis palmoplantaris mit Cornea-Dystrophie und Richner-Hanhart Syndrom. Die Ursache der rezessiv vererbten oculocutanen Tyrosinämie (OMIM 276600) ist ein Mangel des Enzyms Tyrosin-Aminotransferase (TAT), dem ersten Enzym in der Abbaukaskade des Tyrosins. Das Gen der TAT konnte auf dem Chromosom 16q22.1-q22.3 lokalisiert werden (Natt et al., 1987).

Die Erkrankung ist sehr selten. Es sind bislang lediglich etwa 50 Patienten unterschiedlichster Herkunft beschrieben. Haut-, Augen- und ZNS- Beteiligung sind Kardinalsymptome der Erkrankung. Die Augenbeteiligung manifestiert sich meist im ersten Lebensjahr, die Hautbeteiligung nach dem ersten Lebensjahr. Charakteristische Symptome der

Augenbeteiligung ist die beidseitig ausgeprägte schmerzhaft Keratitis mit Photophobie und Augentränen. Die momentane Hypothese bezüglich den Cornea Läsionen geht von einer Kristallisierung von Tyrosin in den Epithelzellen der Cornea aus (Mitchell et al., 2001). Die schlechte Löslichkeit von Tyrosin (Scriver und Rosenberg, 1973) mag dabei eine Rolle spielen. Die Löslichkeit von Tyrosin ist temperaturabhängig, wodurch es in schlecht durchbluteten, kühleren Körperregionen zur Präzipitation von Tyrosinkristallen und damit zu einer Entzündungsreaktion kommt. Hauptsächlich betroffen davon sind deshalb Cornea, Hand- und Fußsohlen (Harms und Wendel, 2001). Typische Symptome der Hautbeteiligung sind schmerzhaft palmoplantare Hyperkeratosen. In weniger als 50 Prozent der Patienten wird eine milde mentale Retardierung nachgewiesen (Goldsmith, 1983, Balato et al., 1986).

Die Tyrosinkonzentrationen im Plasma (Goldsmith, 1983, Balato et al., 1986, Colditz et al., 1984, Chitayat et al., 1992) und Urin sind erhöht. Auch die Ausscheidung von Tyrosinabbauprodukten im Urin ist trotz des Enzymblocks erhöht, was dadurch erklärt wird, daß bei hohen Tyrosinkonzentrationen vermehrt Tyrosinabbau in den Mitochondrien durch das Enzym Aspartat-Aminotransferase stattfindet. Die typischen klinischen Befunde im Zusammenhang mit einer Hypertyrosinämie sind beweisend für die Diagnose. Der Plasma-Phenylalanin-Spiegel ist normal und im Urin lassen sich die Tyrosinmetabolite 4-Hydroxyphenylpyruvat, 4-Hydroxyphenyllactat, 4-Hydroxyphenylacetat, N-Acetyltyrosin und 4-Tyramin nachweisen. Im Neugeborenencreening kann die Erkrankung noch vor dem Auftreten von klinischen Symptomen anhand der ausgeprägten Hypertyrosinämie entdeckt werden und eine frühzeitige Therapie eingeleitet werden. Therapeutisch kann ein Rückgang der Augen- und Hautsymptome mit einer Phenylalanin- und Tyrosinarmen Diät erreicht werden, allerdings treten die Symptome bei Diätabbruch wieder auf. Orale Retinoide verbessern die Läsionen der Haut, ohne dabei die Tyrosinwerte zu beeinträchtigen (Mitchell et al., 2001).

Es gibt noch keinen Konsens über den Beginn der Diät und den angestrebten Tyrosinkonzentrationen, um möglichen neurologischen Schäden vorzubeugen. Einige Autoren empfehlen einen Zielwert von Tyrosin im Blut von 600  $\mu\text{M}$  (Hervé et al., 1986).

Im Hinblick auf die Inzidenz der mentalen Retardierung sollten die maternalen Plasma-Tyrosin-Spiegel während der Schwangerschaft aufmerksam überwacht werden (Francis et al., 1992).

#### 1.4.2.4 Tyrosinämie Typ III (primärer 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (pHPPD)-Mangel)

Die Tyrosinämie Typ III (OMIM 276710) ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Die Ursache ist ein sehr seltener Mangel des Enzyms 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (pHPPD), dem zweiten Enzym in der Abbaukaskade des Tyrosins.

Einzelne Patienten wurden ausführlich beschrieben (Endo et al., 1983, Francis et al., 1992, Origuchi et al., 1982, Preece et al., 1996, Cerone, 1997, Ellaway et al., 2001). Auffällig wurden sie überwiegend durch neurologische Symptome nach der Neugeborenen-Periode, einige wurden auch im Neugeborenenenscreening entdeckt (Preece et al., 1996, Ellaway et al., 2001). Der Enzymdefekt führt zu erhöhten Plasma-Tyrosin-Spiegeln und zu einer vermehrten Ausscheidung von Tyrosin-Metaboliten (Mitchell et al., 2001, Ellaway et al., 2001).

Als häufigstes Merkmal trat eine psychomotorische Retardierung auf, wobei keine Beziehung zwischen der Höhe der Tyrosin-Spiegel und dem Verlauf der Erkrankung hergestellt werden konnte. Bei allen Patienten waren die Leber- und Nierenfunktion normal und es wurden weder Haut- noch Augenveränderungen beobachtet. Der Einfluß einer tyrosinarmen Diät auf den Verlauf der Erkrankung ist weitgehend unklar, allerdings scheint die Diät zumindest im frühen Kindesalter positive Effekte zu haben (Ellaway et al., 2001).

#### 1.4.3 Ahornsiruperkrankung (Maple Syrup Urine Disease (MSUD), Branched Chain Ketoaciduria)

Verschiedene genetische Defekte führen zu einem Mangel der Aktivität des Multienzymkomplexes der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase (branched-chain 2-keto acid dehydrogenase, BCKA-DH). Der Multienzymkomplex besteht aus den Untereinheiten E1 $\alpha$ , E1 $\beta$ , E2 und E3 und benötigt das Coenzym Thiaminpyrophosphat. Der Stoffwechselblock führt zu erhöhten Konzentrationen der verzweigtkettigen, essentiellen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin, sowie der daraus resultierenden verzweigtkettigen alpha Ketosäuren im Blut und Gewebe. Hervorstechendes Merkmal ist der karamellartige Ahornsirupgeruch des Urins und anderer Körperflüssigkeiten unbehandelter Patienten, der der Erkrankung ihren Namen gab. Die Häufigkeit der MSUD wird weltweit auf 1:185.000 geschätzt. Bei den Mennoniten in Pennsylvania beträgt die Häufigkeit ca. 1:176 aufgrund der hohen Konsanguinitätsrate (Chuang und Shih, 2001).

Die MSUD kann aufgrund des klinischen Schweregrades und dem Ansprechen auf die Gabe des Cofaktors Thiamin in fünf unterschiedliche Phänotypen unterteilt werden: die klassische Form, die intermediäre Form, die intermittierende Form, die auf den Cofaktor

Thiamin ansprechende Form und die durch einen Mangel der Untereinheit E3 verursachte Form.

Der Enzymdefekt führt zu erhöhten Konzentrationen von verzweigtkettigen Aminosäuren (insbesondere des Leucins) und deren 2-Ketosäuren im Blut und Gewebe, die schwere Funktionsstörungen des Zentralnervensystems bewirken. Insbesondere Leucin und die zugehörige 2-Ketoisocaproinsäure (KIC) sind neurotoxisch.

Die klassische MSUD ist die schwerwiegendste und häufigste Form und kann in der Neugeborenenperiode zur Enzephalopathie führen. Der Katabolismus nach der Geburt und die Ernährung mit Säuglingsmilch oder Muttermilch führen zu einem raschen Anstieg der pathologischen Metabolite im Plasma und Urin.

Neugeborene mit klassischer MSUD werden typischerweise zwischen dem 4. und 7. Lebenstag auffällig, sobald Leucin und KIC eine kritische Schwelle erreichen. Somnolenz und Trinkschwäche sind erste Symptome, nachfolgend kommt es zu einem Gewichtsverlust und fortschreitenden neurologischen Symptomen wie Hypo- und Areflexie, Rumpfhypotonie und Hypertonie der Extremitäten, vorgewölbte Fontanelle, zerebrale Krampfanfälle, respiratorische Insuffizienz und Koma, die unbehandelt zum Tod führen (Chuang und Shih, 2001, Hoffmann und Mayatepek, 2001). Das EEG kann bei vorhandenen neurologischen Symptomen ein typisches Muster mit kammähnlichem Rhythmus aufweisen (Treacy et al., 1992, Estivill et al., 1985, Iinuma et al., 1992, Tharp, 1992, Hoffmann und Mayatepek, 2001) und ein Hirnödem ist eine gefürchtete Komplikation. Können die Metabolite schnell gesenkt werden, sind die Symptome reversibel. Bestehen die hohen Spiegel über den 14. Lebenstag hinaus, muss mit bleibenden Zerebralschäden und daraus resultierender Intelligenzminderung gerechnet werden.

Bei der intermediären Form der MSUD liegt eine höhere Restaktivität der BCKA-DH vor, die zwischen 3 und 30 % der Norm betragen kann. Patienten haben persistierende hohe Spiegel der verzweigtkettigen Aminosäuren und neurologische Störungen, werden jedoch nicht durch metabolische Krisen in der Neugeborenenperiode auffällig. Manche haben während des ganzen Lebens keine akute metabolische Dekompensation. Die meisten Patienten werden im Alter zwischen 5 Monaten und 7 Jahren wegen einer Entwicklungsverzögerung oder Krampfanfällen diagnostiziert (Verdu et al., 1985, Rittinger et al., 1986, Kalyanaraman et al., 1972), einige hatten Episoden von Ketoazidosen (Gonzalez-Rios et al., 1985, Velazquez et al., 1981, Duran et al., 1978, Van der Horst und Wadman, 1971).

Bei der intermittierenden Form der MSUD liegt die Restaktivität des BCKA Komplexes zwischen 5 und 20 % der Norm. Die Patienten zeigen eine normale Entwicklung bezüg-

lich Wachstum und Intelligenz. Die Laborwerte, insbesondere die Konzentrationen der verzweigtkettigen Aminosäuren, sind im Intervall unauffällig. Allerdings besteht das Risiko einer metabolischen Dekompensation in Stresssituationen, die letal sein kann (Goedde et al., 1970, Valman et al., 1973, Morris und Fisher, 1966, Zipf et al., 1979). Die ersten Symptome treten hauptsächlich im Alter zwischen 5 Monaten und 2 Jahren im Zusammenhang mit Infektionen auf. Dann können auch die erhöhten Spiegel der charakteristischen Aminosäuren und organischen Säuren nachgewiesen werden.

MSUD Patienten, die auf Thiamin Gabe ansprechen, sind heterogen. Sie zeigen keine akuten Episoden der Erkrankung in der Neugeborenenperiode und der klinische Verlauf entspricht dem der intermediären Form. Die verabreichte Dosis von Thiamin reicht von 10 mg bis 1000 mg pro Tag und zeigt einen eingeschränkten Erfolg. Kein Patient konnte allein mit Thiamin behandelt werden, bei allen Patienten war zusätzlich eine diätetische Leucinrestriktion erforderlich (Chuang und Shih, 2001).

Der E3-Mangel ist sehr selten. Der klinische Phänotyp ähnelt der intermediären Form, wird aber von schweren Laktatazidosen begleitet. Das Profil der organischen Säuren beinhaltet erhöhte Ausscheidung von Laktat und Citratzyklusmetaboliten sowie der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren. Patienten mit einem E3-Mangel sind in den ersten Monaten meist unauffällig. Im Alter zwischen 8 Wochen und 6 Monaten führt die Entwicklung einer persistierenden Laktatazidose zu fortschreitender neurologischer Verschlechterung. Eine erfolgreiche Behandlung ist bislang nicht verfügbar. (Matalon et al., 1984, Robinson et al., 1977, Sakaguchi et al., 1986).

Das erweiterte Neugeborenen-Screening mittels TMS erkennt die MSUD über erhöhte Leucin- und Isoleucin-Konzentrationen. (Yoshino et al., 1986). Patienten mit der intermittierenden Form bleiben unentdeckt, wenn sie asymptomatisch sind, ebenso wie Patienten der auf Thiamin ansprechenden Form (Chuang und Shih, 2001). Die weitere Diagnostik umfasst die Aminosäurenanalyse im Plasma mittels HPLC, wobei der Nachweis von Alloisoleucin pathognomonisch für die MSUD ist. Zusätzlich sollten die organischen Säuren im Urin bestimmt werden.

Die Therapie bei akuter metabolischer Dekompensation beinhaltet zum einen die schnelle Elimination der neurotoxischen Metabolite durch Blutaustauschtransfusion oder extrakorporale Dialyse. Zum anderen muss der Katabolismus durch eine hohe Kalorienzufuhr über Kohlenhydrate und Fett unterbrochen werden (Berry et al., 1991, Townsend und Kerr, 1982).

Die lebenslange Therapie erfolgt mit einer Diät, die die Zufuhr der verzweigtkettigen Aminosäuren beschränkt. Der Proteinbedarf des Körpers wird durch ein Aminosäuren-

gemisch gedeckt, das diese Aminosäuren nicht enthält. Die Plasmakonzentration des Leucins sollte damit  $< 300 \mu\text{mol/l}$  gehalten werden.

Patienten mit der intermediären Form können bei hoher Restaktivität des Enzyms mit einer im Proteingehalt mäßig eingeschränkten Proteinmenge auskommen. Patienten mit der intermittierenden Form brauchen evtl. nur während Stresssituationen eine hochkalorische Ernährung mit Proteinreduktion.

Die Prognose unbehandelter Patienten ist sehr schlecht. Die Mehrzahl der Patienten sterben in den ersten Lebensmonaten an wiederholten metabolischen Krisen und neurologischer Verschlechterung, häufig ausgelöst durch Infektionen. Patienten die solche Krisen überlebt haben, leiden unter schweren neurologischen Störungen wie mentaler Retardierung, Spastik und gelegentlich an kortikaler Blindheit (Chuang und Shih, 2001).

Bei Diagnosestellung vor dem 5. Lebensstag und konsequenter Therapie ist die Prognose befriedigend (Hoffmann und Mayatepek, 2001). Die Verlaufsbeobachtung von behandelten Patienten, die hauptsächlich im Neugeborenen-Screening entdeckt wurden oder aufgrund klinischer Auffälligkeiten untersucht wurden, ergab bei einem Drittel der Patienten Intelligenzquotienten über 90 und bei einem weiteren Drittel zwischen 70 und 90, ca. ein Fünftel der Patienten mit klassischer MSUD starben, die meisten aufgrund akuter Komplikationen im Zusammenhang mit Infektionen (Chuang und Shih, 2001).

#### 1.4.4 Hypermethioninämie und Homocystinurie

Erhöhte Konzentrationen von Methionin im Blut können durch zwei angeborene Erkrankungen verursacht sein: Die isolierte Hypermethioninämie und die Homocystinurie aufgrund eines Mangels des Enzyms Cystathionin- $\beta$ -Synthase. Bei der isolierten Hypermethioninämie ist der Abbau von Methionin vermindert, in einigen Fällen liegt ein Mangel des Enzyms Methionin-Adenosyltransferase vor. Es wurde sowohl eine normale als auch eingeschränkte geistige Entwicklung bei Patienten beobachtet (Mudd et al., 1995a).

Bei der Homocystinurie führt ein unzureichender Abbau von Homocystein zu Cystathionin über die Homocysteinerhöhung zu einer Akkumulation von Methionin. Erste Symptome beinhalten Linsendislokation (Ectopia lentis), mentale Retardierung, neurologische Störungen und Skelettfehlbildungen. Eine präsymptomatische Diagnose, meistens durch das Neugeborenen-Screening, und die Therapie mit einer methioninarmen Diät, der Gabe von Cystin und insbesondere die Pyridoxinsubstitution (Vitamin B6, ein Cofaktor der Cystathionin- $\beta$ -Synthase) führt zu einer enormen Verbesserung der Prognose dieser Kinder (Mudd et al., 1995b).

#### 1.4.5 Citrullinämie

Die Citrullinämie ist eine autosomal rezessive Erkrankung, die durch einen Mangel des Enzyms Argininosuccinat-Synthetase (ASS) zu einer Anhäufung von Citrullin in den Körperflüssigkeiten führt. ASS ist das dritte Enzym des Harnstoffzyklus, welches die Bildung von Argininsuccinat aus Citrullin und Aspartat katalysiert. Durch den Enzymdefekt entsteht ein Block im Harnstoffzyklus, wodurch die Elimination von Ammoniak gestört ist, der in hohen Konzentrationen toxisch ist. Die Citrullinämie beruht auf genetisch heterogenen Defekten und es werden unterschiedliche klinische Ausprägungen mit unterschiedlicher Restaktivität des Enzyms Argininosuccinat-Synthetase beobachtet. Am häufigsten ist die klassische Citrullinämie Typ I, bei der ein Mangel der ASS in allen Körpergeweben besteht. Der Gendefekt ist auf Chromosom 9q34.1 lokalisiert. Meist manifestiert sich die Citrullinämie Typ I bereits im Neugeborenen- und Säuglingsalter. Unbehandelt führt sie zu einer massiven Hyperammonämie, die häufig tödlich endet.

Eine mildere Form, die als Citrullinämie Typ II bezeichnet wird und sich häufig erst im Erwachsenenalter manifestiert, wurde vor allem in Japan beobachtet (Yamada et al., 1980, Saheki et al., 1981, 1982, Kobayashi et al., 1994, Ohta et al., 1996, Kurasawa et al., 1998). Die Citrullinämie Typ II weist einen Mangel der leberspezifischen ASS auf und ist auf Chromosom 7q21.3 lokalisiert (Kobayashi et al., 1999). Das Gen codiert einen mitochondrialen Aspartat-Glutamat-Carrier, das Citrin, und führt nicht nur zur Citrullinämie Typ II bei Erwachsenen, sondern auch zu intrahepatischer Cholestase und transients Citrullinämie bei Neugeborenen (Ohura et al., 2001, Yamaguchi et al., 2002).

Auch sehr milde und asymptomatische Formen der Citrullinämie, die lediglich mit einer erhöhten Citrullinkonzentration im Blut einhergehen und keine hyperammonämischen Krisen haben, sind beschrieben (Ruitenbeeck et al., 2000, Häberle et al., 2002).

Die klinischen Symptome von Neugeborenen mit Citrullinämie Typ I zeigen sich häufig schon in den ersten Lebenstagen zunächst relativ unspezifisch durch Nahrungsverweigerung und Erbrechen. Rasch kommt es zu einer allgemeinen Lethargie mit einer muskulären Hypotonie, die auch von Krampfanfällen begleitet sein kann. Im weiteren entwickelt sich ein tiefes Koma mit einem fehlenden Ansprechen auf Schmerzreize. Die Leber kann vergrößert sein und häufig zeigt sich eine Erhöhung der Transaminasen.

Nach erfolgreicher Behandlung der initialen Krise können immer wieder Episoden mit Hyperammonämien auftreten, begleitet von Erbrechen, Lethargie, Kopfschmerzen, Tremor, Krampfanfällen oder Ataxie (Morrow et al., 1967, Vidailhet et al., 1971). Häu-

fig ist die geistige Entwicklung gestört (McMurray et al., 1963) und in der Computertomographie (CT) zeigen sich Zeichen einer Hirnatrophie.

Biochemisch sind die Kardinalmerkmale der Citrullinämie neben der Erhöhung von Citrullin im Blut (meist um das 40- fache des Normalwertes (Ballard, et al., 1978)) die erhöhte Ausscheidung von Orotsäure im Urin und die Hyperammonämie. Die Konzentrationen von Glutamin, Alanin und Aspartat sind im Plasma meist erhöht, die Konzentration von Arginin ist relativ niedrig.

Die Therapie in der akuten Phase der initialen neonatalen Hyperammonämie erfolgt nach einem Notfallschema, das den Stop der Proteinzufuhr, eine hochkalorische Ernährung (Kohlenhydrate, Insulin und Fett), Medikamente, die den Ammoniakspiegel senken und forcierte Diurese oder bei sehr hohen Ammoniakkonzentrationen Hämodiafiltration beinhaltet (Nyhan und Ozand,1998).

Die langfristige Behandlung erfolgt durch die Gabe von Natriumbenzoat, Natriumphenybutyrat und Argininhydrochlorid, die zu einer Ammoniakreduktion und einer verminderten Bildung von Ammoniak führen. Zusätzlich wird eine eiweißreduzierte Diät durchgeführt. Der Erfolg der Behandlung variiert stark, sowohl eine normale Entwicklung (Melnik et al., 1993) als auch eine deutliche Beeinträchtigung der geistigen Entwicklung wurden beobachtet (Maestri et al., 1995). Die Prognose in Bezug auf die geistige Entwicklung hängt von der Dauer und Ausprägung der initialen Hyperammonämie, und weiterer Episoden ab. Die Möglichkeit, durch frühzeitige Therapie bei pränataler Diagnose Hyperammonämien und deren Wiederauftreten zu vermeiden und Episoden frühzeitig und effektiv zu behandeln sollte die Prognose verbessern (Msall et al., 1984, Donn et al., 1984).

### **1.5 Ziele und Fragestellung**

Bislang erhobene Untersuchungen zur Bestimmung von Normalwerten beschränken sich auf ein kleines Kollektiv, bei dem mittels konventioneller Methoden (Moore und Stein, 1951, Spackman, 1958) in den ersten Lebenstagen die Aminosäurekonzentrationen im Plasma bestimmt wurden (Pohlandt, 1978). Die von den Screeningzentren ermittelten Referenzwerte gründen sich auf die „Screening-Population“ (Sander et al., 2000, Schulze et al., 1999).

Die vorliegende Arbeit hatte deshalb zum Ziel, in einem Normalkollektiv gesunder, reifer Neugeborener, Normalwerte für die durch TMS bestimmbaren krankheitsrelevanten Aminosäuren zu definieren und Einflussgrößen wie Alter des Neugeborenen, Ernährung, postnataler Gewichtsverlust, Geburtsgewicht, Gestationsalter und Geschlecht zu evaluieren.

Darüber hinaus sollte ein Beitrag zu einem besseren Verständnis des Aminosäuren- bzw. Eiweißstoffwechsels in den ersten Lebenstagen gewonnen werden.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Rahmenbedingungen**

Die Studie wurde vom 01.09.1998 bis 31.11.1999 in der Kinderklinik und der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Reutlingen durchgeführt. In diesem Zeitraum wurden die klinischen Daten und die Screening Ergebnisse der Trockenblutproben von 2159 Neugeborenen erfaßt.

### **2.2 Probenmaterial**

Auf der Station wurden die Mütter durch eine Aufklärungsschrift (siehe Anhang) über die zusätzlich durchgeführten Untersuchungen bei ihrem Kind aufgeklärt. Eine schriftliche Zustimmung zu dieser Untersuchung ist nach Rücksprache mit dem Leiter der Screeningkommission, Prof. E. Harms, Münster, nicht erforderlich.

Die Blutentnahme wurde im Rahmen des Neugeborenen Screenings zwischen 6 und 120 Stunden nach Geburt von den Schwestern des Kinderzimmers (bei ambulanten Geburten von den Hebammen) abgenommen.

### **2.3 Probengewinnung für das Neugeborenen-Screening**

Nach den Empfehlungen der ständigen Screening-Kommission zur Probengewinnung darf nur Nativblut, kapillär mittels Fersenpunktion oder venös abgenommen, verwendet werden. Bei der Blutentnahme durch Fersenpunktion müssen Handschuhe getragen werden und die Punktionsstelle wird desinfiziert. Die Ferse wird mit einer Hand fixiert, der Einstich erfolgt mit einer sterilen Lanzette am Fußsohlenrand. Der erste Blutstropfen wird mit einem sterilen, trockenen Tupfer abgewischt, mit den nachfolgenden Tropfen werden die Kreise der Testkarte vollständig ausgefüllt. Die Blutstropfen werden durch leichte Berührung von einer Seite der Testkarte aufgetragen, bis Vorder- und Rückseite der Kreise vollständig und gleichmäßig durchtränkt sind. Bei zu kleinen Blutstropfen kann weiteres Blut von außen an den bereits vorhandenen Fleck herangebracht werden. Die Probenqualität hängt unter anderem von der Vermeidung folgender Fehlerquellen ab: Der alte Fleck wird mehrfach oder von Vorder- und Rückseite betropft oder das Filterpapier wird gegen die Punktionsstelle gedrückt, wodurch keine gleichmäßige Verteilung des Blutes erreicht wird, die Ferse wird gequetscht, wodurch Gewebsflüssigkeit die Probe verdünnt.

Die Karte sollte dann mindestens eine Stunde flach liegend, um eine ungleichmäßige Verteilung des Blutes zu vermeiden, bei Raumtemperatur getrocknet werden. Die Karte

darf nicht erhitzt werden, die Blutflecken sollen nirgends aufliegen und das Filterpapier darf nur mit Handschuhen angefasst werden. Anschließend wird die Karte noch am selben Tag in das Screening-Labor verschickt, Angaben zur Identität des Neugeborenen und des Einsenders sind auf der Karte dokumentiert (Liebl et al, 2000).

#### **2.4 Probengewinnung für die Studie**

Vor Versand in das auswärtige Screeninglabor wurden zwei kreisförmige Areale von 3 mm Durchmesser (entsprechen 10  $\mu$ L) mit einer Lochstanze ausgestanzt.

Anschließend wird die Guthrie-Karte, welche bis auf die zwei Stanzlöcher unversehrt ist, ohne Zeitverzögerung dem auswärtigen Screeninglabor zugesandt, so dass keine Beeinträchtigung für das Routinescreening oder eine zusätzliche Belastung für das Neugeborene entsteht.

Die ausgestanzten Areale werden in ein Eppendorfcup gegeben. Zur sicheren Dokumentation werden Etikettensätze mit internen Patientennummern verwendet, welche den Eppendorfcup, den Probenbegleitschein und den Erfassungsbogen der klinischen Daten kennzeichnen.

Auf dem Probenbegleitschein wird die Patientenummer, der Ort der Probenabnahme (Kreißaal (KS) , Kinderzimmer (Kizi) oder Station) und das Datum der Probenerfassung eingetragen.

Die Proben werden zusammen mit dem anonymen Probenbegleitschein in das Analysekuplabor gebracht.

#### **2.5 Dokumentation der klinischen Daten**

Die klinischen Daten werden zuerst auf dem Erfassungsbogen notiert und anschließend in ein eigens entwickeltes Dokumentationssystem (Informed) eingetragen.

Folgende Daten werden der Guthrie-Karte, dem Geburtenbuch oder aus der Krankenakte (Kurve) des Neugeborenen entnommen: Name, Patientenummer, Krankenstation, Geschlecht, Geburtsgewicht, Geburtsdatum und –uhrzeit, Gestationsalter, Zeitpunkt und Gewicht bei Probenabnahme, Art und Menge der Ernährung, Gewichtsverlust und transcutaner Bilirubinwert.

#### **2.6 Dokumentation der Ernährung**

Die Art der Ernährung wurde in folgende Gruppen unterteilt:

- „nüchtern-Gruppe“: Ohne Ernährung bei früher Probenentnahme
- „Muttermilch-Gruppe“: Erhielt ausschließlich Muttermilch

- „Formula-Gruppe“: Erhielt Säuglingsmilch (Alete HA, Beba OHA, Hipp HA, Humana HA, Pre Beba)
- „Primergen®-Gruppe“: Erhielt zusätzlich zur Muttermilch ein Energiesupplement auf Aminosäurenbasis<sup>1</sup>, bestehend aus einzelnen Aminosäuren, milcheiweißfrei

Analyse		
pro 100g/100ml		
Brennwert	[kJ]	252
Brennwert	[kcal]	60
Eiweiß	gesamt [g]	0,7
Fett	gesamt [g]	3,6
Kohlenhydrate	gesamt [g]	6,3
Glucose	[g]	0,09
Maltose	[g]	0,3
Lactose	[g]	2
Maltodextrin	[g]	4
Natrium	[g]	0,02
Kalium	[mg]	50
Phosphor	[mg]	10
Osmolarität	[mosmol/l]	200

## 2.7 Bestimmung des Gestationsalters nach Farr

Die Beurteilung des Gestationsalters erfolgt anhand von Reifezeichen der Haut, Ohren, Brustwarzen, Körperbehaarung, Hoden bzw. Labien und Fußfältelung.

<sup>1</sup> Nähere Angaben zu Primergen®:

Produktgruppe: Energie- & Elektrolytlösungen mit Aminosäuren/Proteinen, Fetten und Kohlenhydraten.

Verkehrsbezeichnung: Energie- und Flüssigkeitsergänzung für Neugeborene.

Zusammensetzung: Fructosefrei, glutenfrei.

Ergänzungen zum Produkt: Zur oralen Energieversorgung von Neugeborenen in den ersten Lebensstunden/-tagen. Zur Prophylaxe und Therapie von Hypoglykämien. Kein natives Eiweiß, sondern einzelne Aminosäuren. Darreichungsform: Flüssig/trinkfertig.

Zutaten: Entmineralisiertes Wasser, Maltodextrin, pflanzliche und tierische Fette und Öle in veränderlichen Gewichtsanteilen, Lactose, Aminosäuren, Kaliumcarbonat, Natriumcarbonat, Kaliumcitrat.

Zubereitung: Trinkfertige Lösung zum Füttern auf Trinktemperatur erwärmen.

## **2.8 Probenverarbeitung**

### 2.8.1 Geräte für die Probenaufbereitung

Lochstanze, 3mm Durchmesser, Fa. Sauer, Hannover

Verdampfer mit Heizblock, 32 Plätze, Fa. Liebisch, Bielefeld

Umluftschrank, Heraeus

### 2.8.2 Geräte für die Analytik

Tandemmassenspektrometer, Perkin Elmer Sciex, API 365 MS/MS

Autosampler, Perkin Elmer, Typ 200

Binäre Pumpe, Perkin Elmer, Typ 200

2-Kanal Degasser, Perkin Elmer, Typ 200

manuelle Spritze, Hamilton

### 2.8.3 Chemikalien und Lösungen

Alle nachfolgenden Chemikalien und Lösungsmittel wurden bei Sigma Aldrich, St. Louis, USA bezogen: Methanol (99,9 % HPLC-grade); Acetonitril (99,93% HPLC-grade); Wasser (HPLC-grade); Valin (98 %); Leucin (98 %); Isoleucin (98 %); Methionin (99 %); Phenylalanin (98 %); Tyrosin (98 %); Citrullin (99 %).

Von Fluka, Buchs, Schweiz wurde die Ameisensäure (p.a., ~98 %) und von Regis Technologies Inc., Morton Grove, USA die butanolische Salzsäure (3 N HCl) bezogen

### 2.8.4 Probenverarbeitung

Aus dem Eppendorfcup wird eines der Trockenblut- Areale der Probenverarbeitung zugeführt und das andere als Kontrolle bei Zimmertemperatur in einem Eppendorfcup gelagert.

Die Probenverarbeitung für die Bestimmung der Aminosäuren im Trockenblut erfolgt nach publizierten Methoden (Rashed et al., 1995). Es wird weniger deuterierter Standard benötigt, da die Menge an Probenmaterial geringer ist (Stanze mit 3 mm Durchmesser).

Das Probenmaterial wird in einem Eppendorfcup mit dem „Daily Working Standard“ versetzt, der sich aus einem Methanol/Wasser-Gemisch und den internen Standards der Aminosäuren in Form von deuterierten stabilen Isotopen zusammensetzt. Die Methanol-

lösung dient der Extraktion der Aminosäuren, der Proteinfällung und der Abtrennung des Extrakts von der verbleibenden Papiermatrix.

Nach Eindampfen des Methanols erfolgt die Derivatisierung mit Butanol-HCL. Die Aminosäuren werden durch die Derivatisierung (Bildung von Butylestern) basischer, wodurch die Sensitivität erhöht wird. Nach dem Eindampfen werden die Butylester in einer mobilen Phase aus 50 % Acetonitril, 50 % HPLC-Wasser und 0,025 % Ameisensäure aufgenommen und mit einer Flussrate von 30 µl/min durch die Ionenquelle in das Tandem-Massenspektrometer eingespritzt. Die Effizienz der Ionisierung wird durch die Zugabe von 0,025 % Ameisensäure erhöht (Gerätehandbuch zum TMS API 365, Perkin Elmer).

#### 2.8.5 Protokoll der Probenvorbereitung

- Areal aus der Trockenblutprobe (Stanzendurchmesser = 3 mm) in ein Eppendorfcup geben.
- 100 µl „Daily Working Standard“ (Methanol/Wasser-Gemisch mit deuterierten Standards) dazupipettieren.
- 20 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler extrahieren.
- Lösung in ein Autosamplervial (Deckel mit Schlitz) überführen.
- Unter Stickstoffstrom bei 45°C vollständig verdampfen (ca. 10 min).
- 60 µl HCL\* n-Butanol (c = 3,0 mol/l) zugeben und mischen.
- 20 min bei 65°C derivatisieren (Wärmeschränk mit Lüfter).
- HCl \* n-Butanol sofort verdampfen.
- 200 µl mobile Phase dazugeben (50 % Acetonitril, 50 % HPLC-Wasser, 0,025 % Ameisensäure).
- Vial auf Vortex mischen.

#### 2.8.6 Geräteparameter des Tandem-Massenspektrometers (ESI-MS/MS)

- MS/MS Quelle: Ionenspray
- Injeziertes Volumen: 30 µl
- Säule: Keine
- Mobile Phase: 50 % Acetonitril, 50 % HPLC-Wasser, 0,025 % Ameisensäure
- Flussrate: 0,03 ml/min

- Detektion der Aminosäuren: Neutralabspaltungsanalyse 102 D
- Quantifizierung der Aminosäuren mit deuterierten Standards

### 2.8.7 Tandem-Massenspektrometrie

Für die Bestimmung der Aminosäuren wird die in Chace et al., (1993) und Rashed et al., (1995) beschriebenen Methoden verwendet.

Das Probenmaterial wird in der Ionenquelle unter Hitze im Hochvakuum in Ionen überführt. Die geladenen Ionen werden ladungsabhängig in einem elektrischen Feld beschleunigt und in ein erstes Quadrupolmassenspektrometer geführt. Dort erfolgt eine Vorselektion der Ionen entsprechend ihrem Verhältnis Masse/Ladung ( $m/z$ ). Die Ionen werden durch ein Hochfrequenzfeld massenabhängig in Schwingungen versetzt und die Schwingungsamplitude bleibt nur für Ionen einer bestimmten Masse so klein, dass sie passieren können. Die vorselektierten Ionen werden in einer mit Stickstoff gefüllten Kollisionszelle fragmentiert. Die ionisierten Butylester der meisten Aminosäuren verlieren bei der Kollision mit Stickstoff ein sog. Neutralteilchen (Ameisensäurebutylester, 102 Da) (Rashed et al., 1995).

In einem weiteren Quadrupolmassenspektrometer werden die fragmentierten Ionen aufgetrennt und einem Detektor zugeführt. Durch Synchronisation der Massenspektrometer und Untersuchung aller Ionen, die ein Neutralteilchen (102 Da) verlieren, entsteht das Aminosäurenprofil. Für die Beurteilung stehen zum einen die absoluten Konzentrationen, durch die Kenntnis der Konzentrationen interner Standards, und zum anderen die Verhältnisse einzelner Metabolite zueinander zur Verfügung (Liebl et al., 2000). Die Validierung der Methode wurde von Chace et al., (1999) durchgeführt.

## 2.9 Rohdatenanalyse

Die Analysedaten der Trockenblutproben werden mit den klinischen Daten aus dem Programm Informed in Excel 97 zusammengeführt und anschließend in das Statistikprogramm JMP 3.2.2 von SAS Institute importiert. In JMP wurden die Daten anhand der Einschlusskriterien bereinigt und der Ausschluß bei Outlayern und fehlenden bzw. falschen Angaben durchgeführt.

## **2.10 Statistische Analyse**

### **2.10.1 Bestimmung der Referenzwerte für Aminosäurenkonzentrationen in einem Normalkollektiv gesunder Neugeborener**

Bestimmung von arithmetischem Mittel  $\pm$  einfacher Standardabweichung, Median und Quantilen (10 %, 90 %, 97,5 %, 99,5 %) der Aminosäurenkonzentrationen von 1542 Proben.

### **2.10.2 Bestimmung der Einflussvariablen Alter auf die Aminosäurenkonzentrationen**

Das Alter wurde in Gruppen für den 1. bis 5. Lebensjahr unterteilt und die Mittelwerte der log-Normalverteilten Daten nach Tukey-Kramer HSD (honestly significant difference) mit "Compare all pairs" (Tukey, 1953, 1994, Kramer, 1956) untersucht. Darstellung der Ergebnisse mit 10%- und 90%-Quantil, Quantil Box Plot (25.-75. Perzentile) und Means Diamonds (Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts) aus JMP (s. Anhang).

### **2.10.3 Bestimmung von Referenzbereichen**

Die Einflussgröße Alter auf die Aminosäurenkonzentrationen wurde mit einem quadratischen Modell der log- Normalverteilung auf dem 0,05-Signifikanzniveau mit "Loglikelihood" bei "Nonlinear Fit" überprüft und in einem 95 % Referenzbereich dargestellt. In dem quadratischen Modell einer Normalverteilung steigen die logarithmierten Werte der Aminosäurenkonzentrationen mit dem Alter quadratisch an. Es wurde zugelassen, dass sich die Standardabweichung mit dem Alter linear verändern kann (Modellformel siehe Anhang). Die Berechnung des Modells wurde mit Standardisierten Residuen überprüft, bei angenommenem Modell wurden Referenzbereiche erstellt.

### **2.10.4 Bestimmung der Einflussgröße Geburtsgewicht, postnataler Gewichtsverlust und Gestationsalter auf die Aminosäurenkonzentrationen**

Der Einfluss von Geburtsgewicht, postnatalen Gewichtsverlust und Gestationsalter auf die Aminosäurenkonzentrationen wurde durch Regressionsanalyse mit Varianzanalyse untersucht, die Untersuchungen wurden in Tage unterteilt durchgeführt, um den Störfaktor Alter zu minimieren.

### **2.10.5 Bestimmung der Einflussgröße Geschlecht auf die Aminosäurenkonzentrationen**

Der Einfluss von Geschlecht auf die Aminosäurenkonzentrationen wurde nach Dunnett's Methode mit "Compare with control" (Dunnett, 1955) durchgeführt, die Untersu-

chung wurde in Tage unterteilt, um den Störfaktor Alter zu minimieren. Darstellung der Ergebnisse mit 10%- und 90%-Quantil, Quantil Box Plot (25.-75. Perzentile) und Means Diamonds (Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts) aus JMP (s. Anhang).

#### 2.10.6 Bestimmung der Einflussgröße Ernährung auf die Aminosäurenkonzentrationen

Die Ernährung wurde in 3 Gruppen unterteilt: Muttermilch, Muttermilch + Energiesupplement (Primergen) und Säuglingsmilch.

Der Einfluss der Ernährung auf die Aminosäurenkonzentrationen wurde nach der Dunnett's Methode mit "Compare with control" durchgeführt, mit der Muttermilch-Gruppe als Kontrolle. Die Untersuchung wurde in Tage unterteilt durchgeführt, um den Störfaktor Alter zu minimieren.

Darstellung der Ergebnisse mit 10%- und 90%-Quantil, Quantil Box Plot (25.-75. Perzentile) und Means Diamonds (Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts) aus JMP (s. Anhang).

Ein gegenseitiger Einfluss der Variablen oder ein Einfluss weiterer unbekannter Variablen kann nicht ausgeschlossen werden.

### **2.11 Einschlusskriterien**

Folgende Einschlusskriterien sollen ein repräsentatives Kollektiv für gesunde, reifgeborene Neugeborene mit einem normalen Ernährungszustand und Gewichtsverlauf gewährleisten:

- Stationär behandelte Neugeborene werden ausgeschlossen.
- Das Gestationsalter soll  $\geq 37$  Schwangerschaftswochen und  $\leq 42$  Schwangerschaftswochen betragen, um Frühgeborene und Übertragene auszuschließen.
- Das Geburtsgewicht soll zwischen 2500 g und 4500 g betragen, um Hypotrophe und Hypertrophe Neugeborene auszuschließen.
- Der postnatale Gewichtsverlust soll zwischen 0 und  $-10$  % des Geburtsgewichts liegen.
- Die kapilläre Blutentnahme soll in den ersten 5 Lebenstagen erfolgen.

### **2.12 Ausschluß von Outlayers**

- Die Guthriekarte mit der Patientenummer 160 mußte ausgeschlossen werden, da sie verunreinigt war. Die Kontrolluntersuchung ergab unauffällige Werte.
- Die Patientenummer 1859 zeigte stark erhöhte Valin-Werte, dadurch wird sie bei der Valin-Bestimmung ausgeschlossen.
- Bei der Bestimmung der Aminosäure Citrullin sind Nullwerte bei Patient Nr. 38, 641, 1522, 1650, 1870, 2075 und 2140 aufgetreten. Diese Proben werden bei den Bestimmungen der Citrullinkonzentrationen ausgeschlossen.
- Bei der Untersuchung der Einflußgröße Ernährung wurden alle Neugeborene, die nüchtern waren, ausgeschlossen.

### **2.13 Ausschluß bei fehlenden bzw. falschen Angaben**

- Bei der Erfassung klinischer Daten fehlt bei Patient Nr.1416 die Angabe Geschlecht und bei Patient Nr.1847 die Angabe Milch und Ernährung.

### **2.14 Screening Methoden und Qualität und Validität der Methoden**

Die für das Screening empfohlenen Erkrankungen sowie die dafür benutzten Methoden müssen bestimmte Voraussetzungen (siehe Einleitung) erfüllen, um die Qualität und Durchführbarkeit einer Untersuchung, die alle Neugeborenen einschließt, zu gewährleisten. Eine Voraussetzung davon ist die Methodensicherheit der Screening-Untersuchung, die eine hohe diagnostische Sensitivität und Spezifität benötigt.

#### **2.14.1 Methoden zum Nachweis von Aminoazidopathien**

Die bislang durchgeführten Untersuchungen für das allgemeine Neugeborenen-Screening benutzen mikrobiologische, enzymatische, chromatographische und fluorometrische Methoden zum Nachweis der Phenylalaninwerte von kapillär entnommenen Blutproben auf Filterpapier.

#### **2.14.2 Bakterieninhibitionstest**

Bei dem Bakterieninhibitionstest von Guthrie wird ein Bakterienstamm mit einem kompetitiven Inhibitor, der die Phenylalaninsynthese hemmt, in einem phenylalaninfreien Agar auf Platten gegossen. Ein Plättchen der Blutproben auf Filterpapier wird auf den Agar gelegt. Das enthaltene Phenylalanin hebt die Wirkung des kompetitiven Inhibitors auf. Die Bakterien bilden einen Wachstumshof um die Probe, dessen Durchmesser proportional zum Gehalt an Phenylalanin in der Blutprobe ist. Der Durchmesser des Wachstumshofs einer Probe wird visuell mit Standards verglichen, die eine bekannte

Menge an Phenylalanin enthalten (Kim und Levy, 1998). Die Sensitivität ist relativ hoch, Phenylalanin-Spiegel von 180-240  $\mu\text{M}$  (3- 4 mg/dl) können nachgewiesen werden. Allerdings ist die Methode semiquantitativ, wird manuell durchgeführt und Antibiotikagaben bei Säuglingen zum Zeitpunkt der Probenabnahme beeinflussen die Methode (Dougherty und Levy, 1999).

#### 2.14.3 Chromatographische Methode

Eine Reihe von Techniken, die entweder Vollblut oder Urin auf Filterpapier getrocknet verwenden, wurden von Efron et al. (1964) berichtet und beinhalten die Möglichkeit, außer der PKU eine Reihe weiterer Aminoazidopathien nachzuweisen. Plättchen getrockneter Proben auf Filterpapier werden in vorgestanzte Löcher im Chromatographie-Papier gebracht, übernacht in Lösung chromatographiert, getrocknet und dann mit Isatin-Ninhydrin Mixtur zum Nachweis der Aminosäuren gefärbt. Die Dünnschichtchromatographie führt zu einer besseren Gewinnung von Komponenten, analysiert schneller, mit erhöhter Sensitivität und besserer Auflösung als die Papierchromatographie, ist jedoch teurer und wird nur in Einzelfällen für das Neugeborenen-Screening genutzt (Dougherty und Levy, 1999).

#### 2.14.4 Enzymatische Methode

Das Enzym Phenylalanindehydrogenase katalysiert die Nikotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) abhängige oxidative Desaminierung von Phenylalanin zu Phenylpyruvatamionak und NADH (Wendel et al., 1990, Keffler et al, 1994). Der quantitative Nachweis von Phenylalanin erfolgt durch NADH Bestimmung und ist damit spezifisch für Phenylalanin mit minimaler Beeinträchtigung durch Tyrosin. Allerdings bestehen Zweifel hinsichtlich Zuverlässigkeit und Sensitivität des Assays.

#### 2.14.5 Fluorometrische Methode

Der Nachweis von Phenylalanin erfolgt durch die fluoreszierende Sichtbarmachung eines Phenylalanin-Ninhydrin Produktes durch ein Dipeptid (McCaman and Robins, 1962). Dadurch kann Phenylalanin aus Trockenblutproben quantitativ gemessen werden, unabhängig von der Gegenwart anderer Aminosäuren und die Messung kann automatisch durchgeführt werden. Möglicherweise ist die Sensitivität gegenüber dem Bakterieninhibitionsassay erhöht, allerdings kann auch nur ein Substrat gemessen werden (Dougherty und Levy, 1999).

#### 2.14.6 HPLC Methode

Die „High pressure liquid chromatography“ ist eine quantitative Methode und ermöglicht den Nachweis von Phenylalanin und Tyrosin sowie weitere Aminosäuren und kann automatisch durchgeführt werden (Qu et al., 1991). Die hohe Sensitivität und der Nachweis von Phenylalanin und Tyrosin ermöglicht die Bestimmung des Phenylalanin/Tyrosin- Quotienten und verbessert damit das Screening für die PKU. Die chromatographischen Methoden sind jedoch zeitintensiver und schwieriger zu automatisieren und werden dadurch hauptsächlich zur Bestätigung erhöhter Werte anderer Tests genutzt und nicht als primärer Test (Dougherty und Levy, 1999).

#### 2.14.7 Tandem-Massenspektrometrie (TMS)

Die Tandem-Massenspektrometrie besteht aus zwei in Reihe geschalteten Massenspektrometern. Im ersten Massenspektrometer werden ionisierte Moleküle der aufgearbeiteten Trockenblutprobe getrennt und im zweiten analysiert. Eine Vortrennung wird nicht benötigt und auch komplexe biologische Proben können direkt analysiert werden. Die Vorteile der Methode liegen in der Schnelligkeit der Analyse und dem hohen Informationsgehalt durch die Möglichkeit mehrere Metabolite aus einer Trockenblutprobe zu messen. Damit kann eine Erkrankung, wie die PKU, nicht nur durch erhöhte Phenylalaninwerte, sondern auch durch das Verhältnis von Phenylalanin zu Tyrosin bestimmt und von erhöhten Phenylalaninwerten anderer Ursachen unterschieden werden.

Die mit TMS gemessenen Aminosäurenkonzentrationen liegen im Vergleich zur HPLC und dem Bakterieninhibitionstest etwas niedriger, jedoch konnte eine gute Korrelation der Werte von TMS und HPLC gezeigt werden (Chace et al., 1998). Die Methode ist noch sensitiver als die HPLC und wesentlich schneller (Sander und Janzen, 1999).

#### 2.14.8 Diskussion der Methoden

Die mikrobiologischen (Guthrie und Susi, 1963) und die chromatographischen (Scriver et al., 1964) Methoden sind semiquantitativ, deren Genauigkeit bei dem Nachweis geringer Phenylalaninkonzentrationen begrenzt ist, die gerade für ein frühzeitiges Screening von Bedeutung sind. Ein Vergleich des Bakterieninhibitionstest mit chromatographischen Analysen ergibt eine 3 bis 7-fach höhere Präzision der chromatographischen Methoden, problematisch sind vor allem die unteren Konzentrationsbereiche (Centers for Disease control, (1998)).

Enzymatische (Keffler et al., 1994), fluorometrische (McCamen und Robins, 1992) und die HPLC Methoden sind quantitativ auch im unteren Konzentrationsbereich und haben

den zusätzlichen Vorteil eines geringen Variationskoeffizienten (Scriver et al., 2001). Mit der Enzymatischen und Fluorometrischen Methode kann allerdings nur ein Substrat bestimmt werden und das nicht so genau wie bei der TMS, wodurch häufiger falsch-positive Ergebnisse bestimmt werden (Chace et al., 1998).

Die chromatographischen Methoden sind zeitaufwendiger, so benötigt die HPLC für eine Probe eine Laufzeit von 15- 35 Minuten und eignet sich dadurch weniger für ein Massenscreening. Die TMS benötigt für eine Probe < 2 Minuten und bestimmt zahlreiche Metabolite.

Die TMS bietet den Vorteil einer relativ einfachen Probenaufbereitung und ermöglicht die Automatisierung der Untersuchung. Die Bestimmung zahlreicher Parameter erweitert den Untersuchungsumfang auf andere Erkrankungen im Neugeborenen-Screening. Zusätzlich zur PKU können zahlreiche Störungen im Stoffwechsel von Aminosäuren, Organischen Säuren und Fettsäuren diagnostiziert werden. All diese Erkrankungen können aus einer einzigen Probe untersucht werden, wodurch sich der Screening-Ablauf von „ein Test für eine Störung“ zu „ein Test für viele Störungen“ geändert hat, das generell ein Prinzip des Screenings darstellen sollte (Levy, 1998). Ein Ausschluss von Erkrankungen wie z.B. der MSUD aufgrund der Tatsache, dass es sich um eine sehr seltenen Erkrankung handelt, ist nun nicht mehr zu rechtfertigen, da eine kleine Menge Trockenblut für die TMS ausreicht und für weitere Untersuchungen genug Material übrig bleibt. Ein Grossteil der Kosten und Beunruhigungen durch das Screening entstehen aufgrund falsch-positiver Ergebnisse und daraus resultierenden Zweituntersuchungen. Daher ist es bedeutend, dass die TMS trotz der erhöhten Anzahl untersuchter Störungen, eine geringere Rate an falsch-positiven Ergebnissen als herkömmliche Methoden, wie der Bakterieninhibitionstest oder die Fluorometrie, aufweist (Levy, 1998, Chace et al., 1998). Die Reduzierung der falsch-positiven Ergebnisse ergibt sich zum einen aus einem verbesserten quantitativen Nachweis durch die Verwendung stabiler Isotope als internen Standard, wie auch durch den Nachweis mehrerer Metaboliten, statt nur eines einzigen. Die hohe Sensitivität ermöglicht eine frühzeitige Diagnostik wenige Tage nach Geburt, die z.B. bei der MSUD oder dem MCAD Defekt von großer Bedeutung ist, da hierdurch lebensbedrohliche Entgleisungen durch eine rechtzeitige Therapie verhindert werden. Ebenso kann die Einstellung einer diätetischen Therapie von Patienten mit der Methode überprüft werden.

#### *2.14.8.1 Qualität der TMS*

Um Parameter angeborener Stoffwechselerkrankungen zuverlässig zu messen und gleichzeitig geringe Kosten, eine hohe Effizienz, Genauigkeit und Qualität beizubehal-

ten, muss der Überprüfung und Wartung aller Schritte des gesamten Untersuchungsverfahrens ein hohes Maß an Aufmerksamkeit gewidmet werden. Diese Schritte beinhalten die Probengewinnung und Probenaufarbeitung, die Analyse mit TMS, die Umwandlung von Rohdaten (Massenspektren) in klinisch bedeutsame Ergebnisse (Konzentrationen), die Fachkenntnis die Ergebnisse zu interpretieren, damit die klinische Diagnosestellung zu erleichtern und die Nachsorgestrukturen und Weiterentwicklung, damit der maximale Profit des Neugeborenen-Screenings in die Prävention von Symptomen einer Erkrankung oder in verbesserte Behandlungen umgesetzt wird (Chace et al., 1999b).

Die Verwendung von Trockenblut bietet einige Vorteile und ist ein praktisches Verfahren zur Probengewinnung, jedoch ist die quantitative Bestimmung unter Verwendung dieses Probenmaterials auch von der Art und Eigenschaft des verwendeten Filterpapiers, Menge des aufgetropften Blutes, Hämatokrit und Größe der ausgestanzten Probe abhängig (Chace et al., 1999b).

#### *2.14.8.2 Validierung der TMS*

Die Sensitivität und Präzision der Analysen wurde von Sander et al. (2000) in einer Auswertung von über 120 000 Proben untersucht. Die beispielhaft für Phenylalanin beschriebene, innerhalb eines Versuchs erreichte Präzision (Intraassay) liegt bei einem Variationskoeffizient von 3,62 %, die Präzision von Test zu Test (Interassay) bei 4,77 %, für weitere Metabolite ergaben sich Werte in vergleichbarer Höhe.

Die Werte (Intraassay/ Interassay) stehen im Einklang mit den Bestimmungen von Rasched et al. (1995) für Phenylalanin (4,11/ 5,08).

Ein Vergleich der Methoden TMS/ HPLC/ Fluorometrie ergab folgende Ergebnisse bezüglich der Variationskoeffizienten für Phenylalanin (mg/dl): Interassay (4,9/ 6,5/ 9,2), Intraassay (3,9/ 4,0/ 7,8) und untere Linearitätsgrenze (0,1/ 0,5/ 0,8) (Sander und Janzen, 1999).

Der Einfluß der Präanalytik wurde von Sander und Janzen (1999) untersucht und ergab einen größeren Einfluss von Hämatokrit und eluierbare Blutmenge auf die Aussagefähigkeit des Messwertes, als die Präzision des Analyseverfahrens. So zeigt die Menge des je Flächeneinheit aufgetropften Blutes auf der Testkarte in der Praxis erhebliche Variationen und führt leicht zur Unterschreitung der für die Analyse vorgegebenen Blutmenge von 50 %.

Der Grenzwert des Hämatokrit ist im Neugeborenen-Screening für Phenylalanin bei 0,5 (50 %) festgelegt, da sich mit dem Hämatokrit auch der Serumanteil und parallel die Phenylalaninkonzentration im Vollblut ändert. Allerdings variiert der Hämatokrit in der

Neugeborenenphase deutlich und die physiologischen Werte liegen zwischen 42 % und 66 %. Bei kranken Kinder gilt ein noch breiterer Bereich (Camitta, 1996).

#### *2.14.8.3 Gründe für falsch negative Ergebnisse*

Ein Screeningtest wird nicht alle Fälle von persistierender HPA erkennen, jedoch ist die Fehlerquote gering und kann weiter verringert werden (Medical Research Council Steering Committee for the MRC/DHSS Phenylketonuria Register, 1981, Holtzman et al., 1986, Hanley et al., 1997).

Die Ursache nicht erkannter Fälle liegt meist an Fehlern bei der Probenabnahme oder Verfahrensfehler (Medical Research Council Steering Committee for the MRC/DHSS Phenylketonuria Register, 1981, Holtzman et al., 1986, McCabe und McCabe, 1983).

Aber auch biologische Gründe spielen eine Rolle (Hanley et al., 1997, Binder et al., 1979, Morris et al., 1983, Walker et al., 1981).

Eine Wiederholung der Untersuchung nicht erkannter Fälle von PKU wurde anhand der originalen Blutproben auf Filterpapier durchgeführt und die normalen Phenylalaninwerte des ursprünglichen Screenings bestätigten sich (Binder et al., 1979, Morris et al., 1983, Walker et al., 1981).

Bei dem klassischen PKU Phänotyp ist ein solches Ergebnis selten, tritt aber bei der Non-PKU HPA häufiger auf und Mädchen sind vermehrt betroffen (Hanley et al., 1997, Holtzman et al., 1974, Scriver, 1982, Laberge et al., 1987). Folglich werden einige Mädchen mit HPA beim Screening nicht erkannt und sind sich deshalb des Risikos der maternalen HPA für Ihre Nachkommen nicht bewusst.

Falsche Ergebnisse können durch Artefakte wie Kontaminierung der Probe mit Ampicillin (Mabry et al., 1988, Wilcken et al., 1989, Kremensky und Kalalydjieva, 1989) totale parenterale Ernährung mit bestimmten Aminosäuremischungen (Mitton et al., 1988) und sogar aufgrund von Variabilität der Filterpapiere hinsichtlich Absorption und Wiedergewinnung von Metaboliten (Slazyk et al., 1988) entstehen.

Da die Erfahrungen des Neugeborenen-Screenings für PKU und damit verbunden Störungen weiterhin zunehmen, kann eine moderate Anzahl an falsch-positiven Ergebnissen zugunsten einer erhöhten Sensitivität toleriert werden (Scriver und Kaufman, 2001).

Außerdem reduziert die TMS durch die Bestimmung von Quotienten und der hohen Sensitivität den Großteil der durch andere Methode entstanden falschen Ergebnisse. In einigen Untersuchungen mit der Methode der TMS zeigten sich sogar weder falsch-negative noch falsch-positive Ergebnisse (n = 27 000) (Bartlett et al., 1997).

#### *2.14.8.4 Allgemeine Einflüsse auf Methoden*

Das Phenylalanin ist in Blutproben bei richtiger Lagerung des Filterpapiers jahrelang stabil (Levy et al., 1985) und wiederholte Messungen sind retrospektiv durchführbar.

Die Aminosäurenkonzentrationen zeigten sich bei der Lagerung bei Raumtemperatur über Jahre hinweg stabil (Levy et al., 1985, Chace et al., 1999a).

Jede quantitative Methode sollte die Einwirkungen von Klima und Jahreszeit auf die Phenylalaninkonzentration in Blutproben auf Filterpapier kompensieren (Hill, 1969, Lambert, 1994).

Die Qualität des Filterpapiers hat ebenso Einfluss auf die Bestimmung der Aminosäurenkonzentration, wie auch der Hämatokrit-Wert (Chace et al., 1999a).

Diverse methodische Ungenauigkeiten wurden auf ihre Auswirkungen hin untersucht, die Bestimmung von Quotienten statt einzelner Aminosäurenkonzentrationen gleicht diese Fehlerquellen zum Teil wieder aus (Chace et al., 1996b).

### 3 ERGEBNISSE

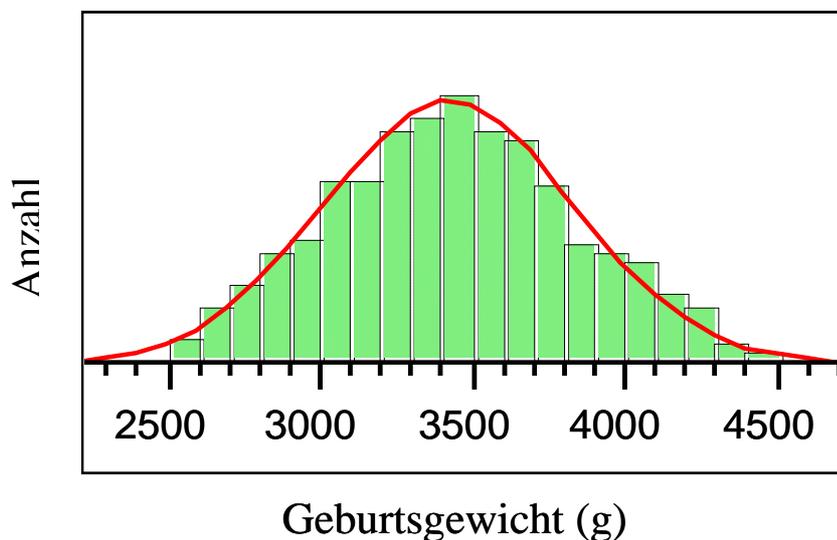
#### 3.1 Daten des Untersuchungskollektivs

In die Studie wurden 1542 Neugeborene aufgenommen. Die Anzahl der Mädchen (51,4 %) war größer als die Anzahl der Jungen (48,6 %).

**Table 1:** Kenndaten des Untersuchungskollektivs

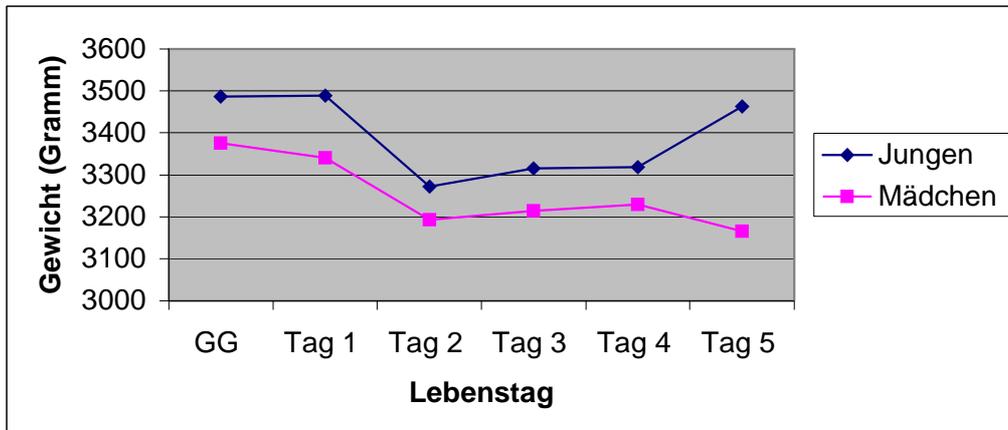
Das Geburtsgewicht lag bei Mädchen signifikant niedriger (Student`s t-Test: \*p < 0,0001) als bei Jungen. Der postnatale Gewichtsverlust, das Gestationsalter und das Alter zum Zeitpunkt der Probenabnahme unterschied sich nicht in Abhängigkeit vom Geschlecht. Alle Angaben in Mittelwert ± einfache Standardabweichung.

Neugeborene	Männlich	Weiblich
n	749	792
Gestationsalter (Wochen)	39,6 ± 1	39,6 ± 1
Geburtsgewicht (g)	3487 ± 424	3376 ± 395 *
Gewichtsverlust (% Geburtsgewicht)	-4,8 ± 2	-5,0 ± 2
Alter bei Screening (h)	69 ± 18	67 ± 19



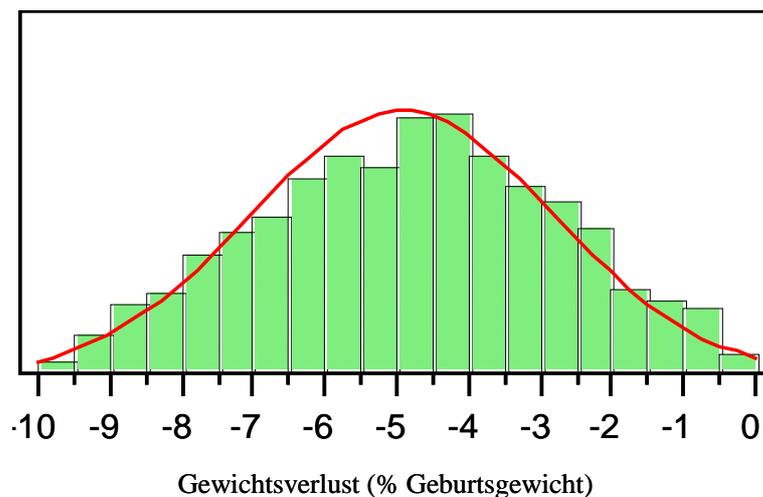
**Abbildung 1:** Histogramm des Geburtsgewichts der Studienpopulation

Das Geburtsgewicht von 1542 Neugeborenen betrug im Mittel 3430 ± 413 g. (Mittelwert ± einfache Standardabweichung).



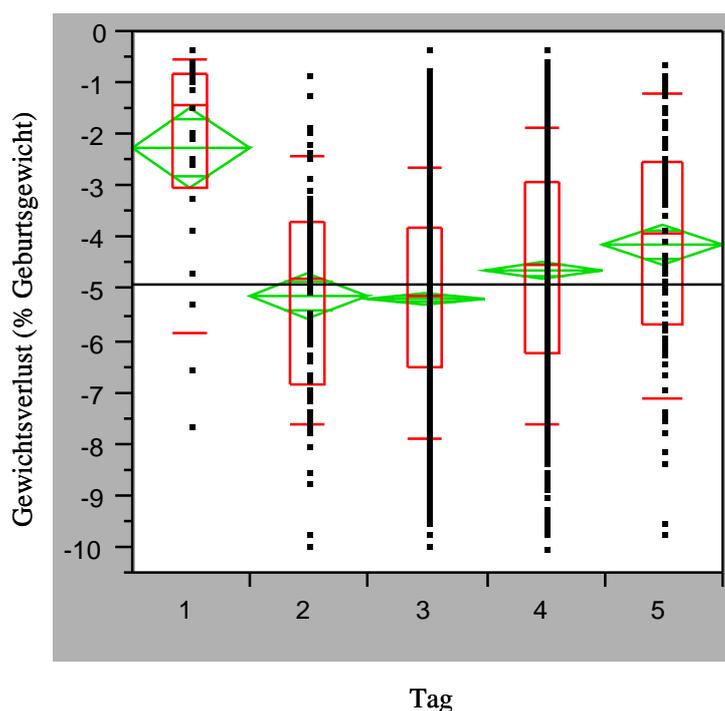
**Abbildung 2:** Gewichtsverlauf (g) in den ersten 5 Lebenstagen bei Jungen und Mädchen

Das Geburtsgewicht (GG) lag bei Mädchen ( $\bar{x} = 3376$  g) signifikant niedriger (Student's t-Test:  $p < 0,0001$ ) als bei Jungen ( $\bar{x} = 3487$  g).



**Abbildung 3:** Histogramm des postnatalen Gewichtsverlust (% Geburtsgewicht).

Mittelwert und einfache Standardabweichung betragen  $-4,8 \pm 2,2$  %.



**Abbildung 4:** Verlauf des postnatalen Gewichtsverlusts (% Geburtsgewicht) über die ersten fünf Lebenstage.

Mittelwert und einfache Standardabweichung betragen  $-4,8 \pm 2,2$  %. Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10 %-bzw. 90 %- Quantil.

**Tabelle 2:** Einteilung der Neugeborenen in Gruppen entsprechend der Ernährung in den ersten fünf Lebenstagen

Alle Angaben in Mittelwert (MW)  $\pm$  einfache Standardabweichung (SD).

Gruppe	n	%
Muttermilch	802	52%
Formula (Säuglingsmilch)	101	6,6%
Primergen® (Energiesupplement zusätzlich zur Muttermilch)	616	40%
Keine Zufütterung (nüchtern)	22	1,4%
	MW $\pm$ SD	Bereich
Menge der Nahrung pro Tag (ml/kg bw)	11,9 $\pm$ 21	2,6 -212

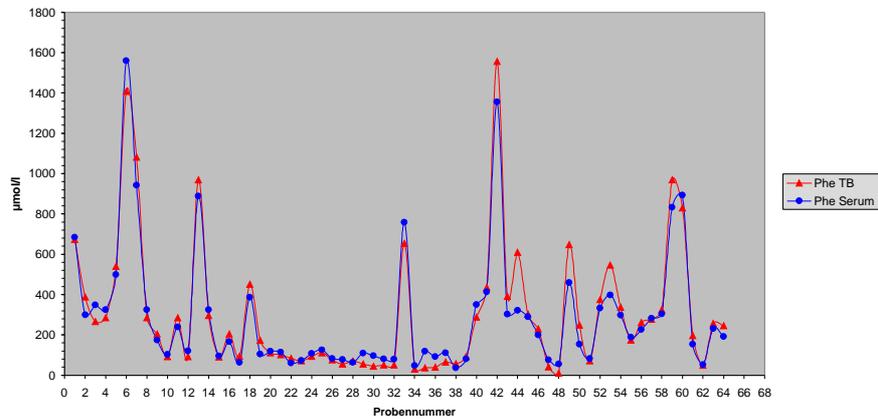
### 3.2 Ergebnisse der Aminosäurenbestimmung

**Tabelle 3:** Mittelwert  $\pm$  einfache Standardabweichung (SD), Median und Quantile der Aminosäurekonzentrationen von 1542 Proben in den ersten fünf Lebens-  
tagen

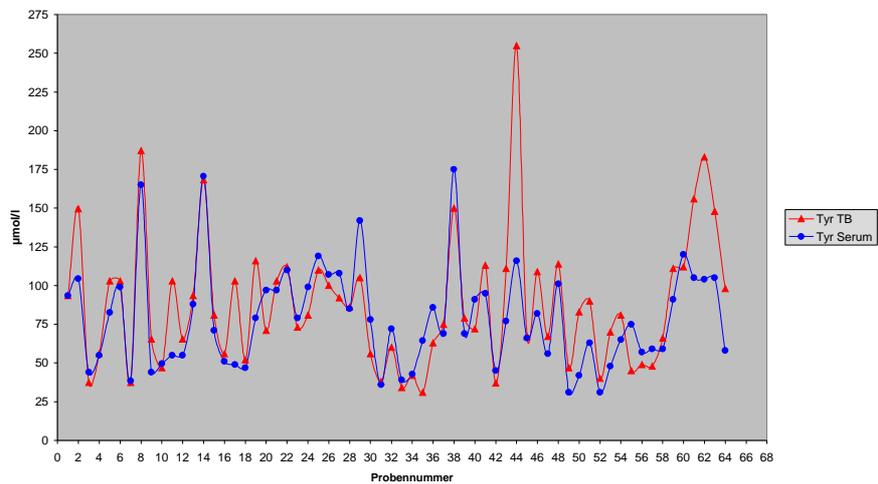
Alle Angaben in Mittelwert  $\pm$  einfache Standardabweichung.

	Mittelwert	Median	Quantil	Quantil	Quantil	Quantil
			10 %	90 %	97,5%	99,5%
<b>Aminosäuren</b>	[ $\mu\text{mol/l}$ ]					
Phenylalanin	63 $\pm$ 15	62	46	82	97	118
Tyrosin	99 $\pm$ 41	91	56	149	192	293
Leucin+Isoleucin	196 $\pm$ 51	189	139	258	320	392
Methionin	26 $\pm$ 9	25	16	36	43	57
Citrullin	12 $\pm$ 6	11	6	19	27	42
Valin	185 $\pm$ 66	170	123	257	368	495
<b>Quotienten</b>						
Phe/Tyr	0,72 $\pm$ 0,25	0,68	0,43	1,04	1,29	1,56
Fisher-Quotient	2,52 $\pm$ 0,97	2,31	1,66	3,57	5,4	6,81
Met/Leu+Ile	0,14 $\pm$ 0,05	0,13	0,084	0,20	0,24	0,31
Leu+Ile/Phe	3,22 $\pm$ 1	3,02	2,26	4,37	6,02	8,0
Val/Phe	3,05 $\pm$ 1,37	2,72	1,98	4,38	6,95	9,89

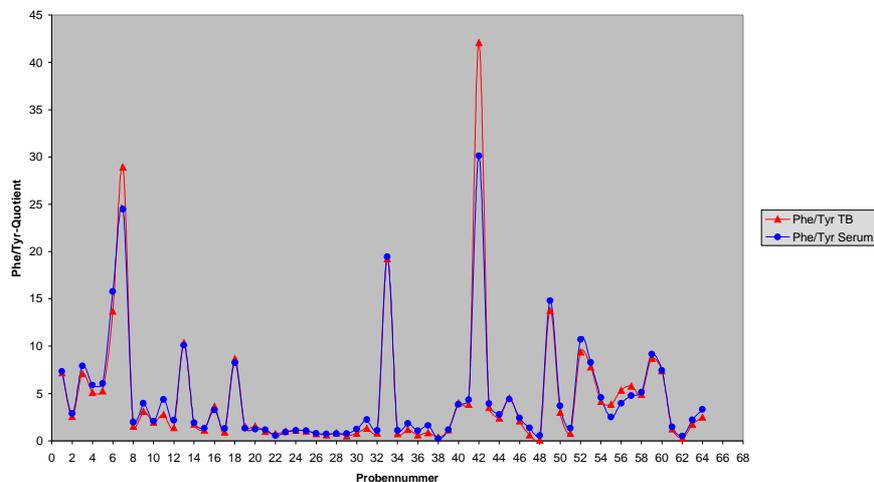
### 3.2.1 Vergleich der Methoden HPLC und TMS zur Bestimmung der Aminosäurenkonzentration



**Abbildung 5:** Vergleich zwischen der Phenylalaninkonzentration im Serum (HPLC) und Trockenblut (TMS) bei Patienten mit Phenylketonurie.



**Abbildung 6:** Vergleich zwischen der Tyrosinkonzentration im Serum (HPLC) und Trockenblut (TMS) bei Patienten mit Phenylketonurie.



**Abbildung 7:** Vergleich zwischen Phe/Tyr-Quotient im Serum (HPLC) und Trockenblut (TMS) bei Patienten mit Phenylketonurie.

### 3.3 Verlauf der Aminosäurenkonzentration in den ersten fünf Lebensstagen

Es zeigte sich eine Abhängigkeit verschiedener Aminosäurenkonzentrationen vom Alter. Die Aminosäurenkonzentrationen am 1. Lebenstag unterschieden sich stark von den folgenden vier Lebensstagen. Es ergab sich eine signifikante Zunahme vom 1. bis 5. Lebenstag für Leucin+Isoleucin und Tyrosin und eine signifikante Abnahme für Phenylalanin, Methionin, den Phe/Tyr-Quotienten und den Quotienten Methionin/Leucin+Isoleucin (Met/Leu+Ile).

Der Fisher-Quotient (Leucin+Isoleucin+Valin/Phenylalanin+Tyrosin), der Quotient Valin/Phenylalanin (Val/Phe) und der Quotient Leucin+Isoleucin/Phenylalanin (Leu+Ile/Phe) zeigen in den ersten drei Lebensstagen einen Anstieg und nehmen dann wieder ab. Die Konzentration von Valin und Citrullin im Blut blieb unverändert. Es wurden Referenzbereiche in einem 95% Konfidenzintervall für Phenylalanin, Tyrosin, Methionin, den Fisher-Quotienten, den Quotienten Met/Leu+Ile, den Quotienten Leu+Ile/Phe und den Quotienten Val/Phe erstellt.

**Tabelle 4:** Verlauf der Aminosäurekonzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) in den ersten fünf Lebenstagen

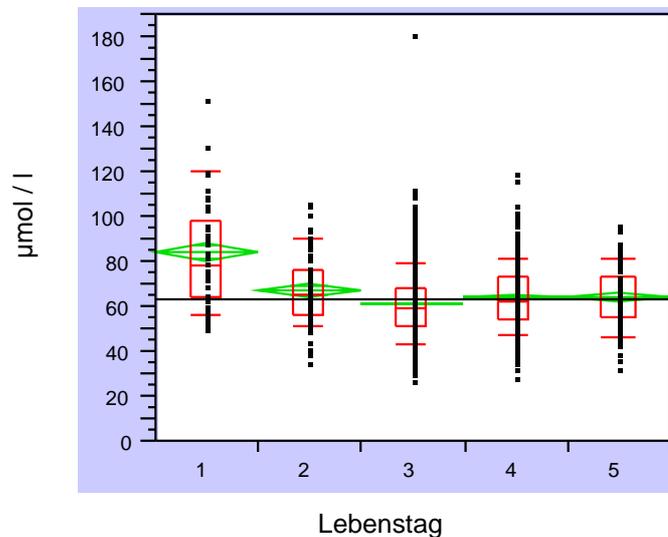
Alle Angaben in Mittelwert  $\pm$  einfache Standardabweichung. Signifikanz nach Tukey-Kramer HSD, Compar all pairs: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Citrullin: Werte mit 0 ausgeschlossen ( $n=1535$ ). Valin: Nr.1859 ausgeschlossen ( $n=1541$ ).

Aminosäuren ( $\mu\text{mol/l}$ )		Tag 1 ( $n=46$ )	Tag 2 ( $n=78$ )	Tag 3 ( $n=876$ )	Tag 4 ( $n=447$ )	Tag 5 ( $n=95$ )
<b>Phenylalanin</b>	<b>Mean <math>\pm</math> SD</b>	<b>85 <math>\pm</math> 25</b>	<b>68 <math>\pm</math> 15</b>	<b>61 <math>\pm</math> 15</b>	<b>64 <math>\pm</math> 14</b>	<b>64 <math>\pm</math> 13</b>
**** Tag 1 zu Tag 2-5	Median	79	66	60	63	64
*** Tag 3 zu Tag 2+4	10%Quantil	56	52	44	48	47
	90%Quantil	120	90	80	82	82
<b>Tyrosin</b>	<b>Mean <math>\pm</math> SD</b>	<b>95 <math>\pm</math> 37</b>	<b>95 <math>\pm</math> 29</b>	<b>87 <math>\pm</math> 36</b>	<b>114 <math>\pm</math> 42</b>	<b>131 <math>\pm</math> 49</b>
**** Tag 5 zu Tag 1-3	Median	89	92	82	109	123
**** Tag 3 zu Tag 4	10%Quantil	55	67	51	67	74
*** Tag 4 zu Tag 1+2	90%Quantil	150	139	129	171	195
** Tag 4 zu Tag 5						
<b>Leucin+Isoleucin</b>	<b>Mean <math>\pm</math> SD</b>	<b>157 <math>\pm</math> 39</b>	<b>195 <math>\pm</math> 52</b>	<b>200 <math>\pm</math> 54</b>	<b>192 <math>\pm</math> 42</b>	<b>205 <math>\pm</math> 48</b>
**** Tag1 zu Tag 2-5	Median	147	188	190	189	200
	10%Quantil	118	141	141	140	150
	90%Quantil	211	271	264	247	271
<b>Methionin</b>	<b>Mean <math>\pm</math> SD</b>	<b>36 <math>\pm</math> 12</b>	<b>28 <math>\pm</math> 8</b>	<b>25 <math>\pm</math> 9</b>	<b>26 <math>\pm</math> 7</b>	<b>26 <math>\pm</math> 8</b>
**** Tag 1 zu Tag 3-5	Median	35	28	24	25	25
*** Tag 1 zu Tag 2	10%Quantil	23	18	15	18	18
*** Tag 2 zu Tag 3	90%Quantil	53	38	36	35	36
*** Tag 3 zu Tag 4						
<b>Citrullin</b>	<b>Mean <math>\pm</math> SD</b>	<b>13 <math>\pm</math> 6</b>	<b>13 <math>\pm</math> 5</b>	<b>12 <math>\pm</math> 7</b>	<b>12 <math>\pm</math> 6</b>	<b>12 <math>\pm</math> 6</b>
( $n=1535$ )	Median	13	13	11	11	11
	10%Quantil	6	6	6	6	5
	90%Quantil	21	20	19	18	21
<b>Valin</b>	<b>Mean <math>\pm</math> SD</b>	<b>176 <math>\pm</math> 74</b>	<b>189 <math>\pm</math> 70</b>	<b>189 <math>\pm</math> 75</b>	<b>175 <math>\pm</math> 43</b>	<b>190 <math>\pm</math> 48</b>
	Median	164	189	169	170	184
( $n=1541$ )	10%Quantil	118	126	119	125	138
	90%Quantil	239	189	281	230	251

**Table 5:** Verlauf der Quotienten der Aminosäuren in den ersten fünf Lebenstagen

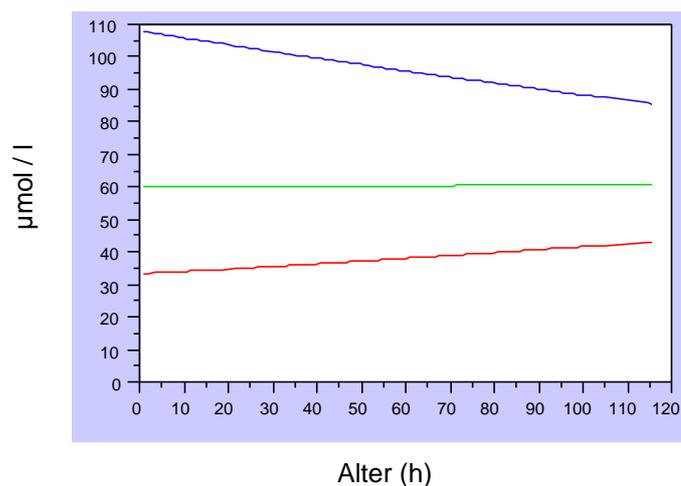
Alle Angaben in Mittelwert (MW) ± einfache Standardabweichung. Signifikanz nach Tukey-Kramer HSD, Compar all pairs: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001.

Aminosäuren- Quotienten		Tag 1 (n=46)	Tag 2 (n=78)	Tag 3 (n=876)	Tag 4 (n=447)	Tag 5 (n=95)
<b>Quotient Phe/Tyr</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>0,95 ± 0,28</b>	<b>0,77 ± 0,26</b>	<b>0,77 ± 0,25</b>	<b>0,62 ± 0,19</b>	<b>0,55 ± 0,19</b>
**** Tag 1 zu Tag 3-5	Median	0,91	0,71	0,74	0,6	0,5
** Tag 1 zu Tag 2	10% Quantil	0,57	0,53	0,48	0,4	0,33
** Tag 4 zu Tag 5	90% Quantil	1,36	1,07	1,09	0,88	0,79
<b>Fisher Quotient</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>1,96 ± 0,72</b>	<b>2,48 ± 0,95</b>	<b>2,78 ± 1,09</b>	<b>2,16 ± 0,59</b>	<b>2,13 ± 0,58</b>
**** Tag 3 zu Tag 1,4,5	Median	1,89	2,26	2,5	2,1	2,11
*** Tag 1 zu Tag 2	10% Quantil	1,32	1,52	1,85	1,58	1,42
** Tag 2 zu Tag 3	90% Quantil	2,41	4,26	4,02	2,85	2,77
* Tag 2 zu Tag 4						
<b>Quotient Met/Leu+Ile</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>0,23±0,07</b>	<b>0,15±0,05</b>	<b>0,13 ± 0,05</b>	<b>0,14±0,03</b>	<b>0,13±0,04</b>
**** Tag 1 zu Tag 2-5	Median	0,22	0,15	0,13	0,14	0,13
**** Tag 3 zu Tag 4	10% Quantil	0,15	0,10	0,08	0,10	0,09
*** Tag 2 zu Tag 3	90% Quantil	0,31	0,23	0,19	0,18	0,18
<b>Quotient Leu+Ile/Phe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>1,95 ± 0,55</b>	<b>3,01 ± 1,08</b>	<b>3,39 ± 1,10</b>	<b>3,06 ± 0,71</b>	<b>3,25 ± 0,80</b>
**** Tag 1 zu Tag 2-5	Median	1,84	2,67	3,10	2,97	3,13
**** Tag 3 zu Tag 4	10% Quantil	1,38	1,84	2,37	2,27	2,42
*** Tag 3 zu Tag 2+4	90% Quantil	2,56	4,76	4,76	4,03	4,36
<b>Quotient Val/Phe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>2,23 ± 1,31</b>	<b>2,95 ± 1,44</b>	<b>3,23 ± 1,6</b>	<b>2,80 ± 0,76</b>	<b>3,04 ± 1,02</b>
**** Tag 1 zu Tag 3-5	Median	1,91	2,43	2,79	2,66	2,84
*** Tag 1 zu Tag 2	10% Quantil	1,40	1,80	2,00	2,02	2,16
*** Tag 3 zu Tag 4	90% Quantil	3,02	5,34	5,16	3,73	4,10



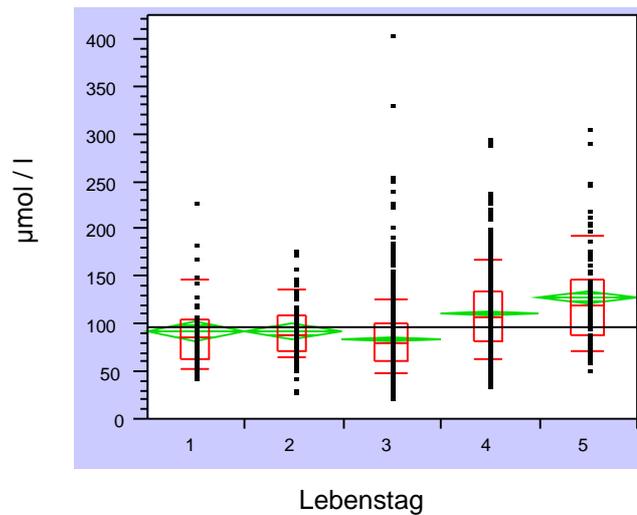
**Abbildung 8:** Phenylalaninkonzentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) und Alter (1. – 5. Lebenstag).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%-Quantil. Signifikanz nach Tukey-Kramer HSD mit Compare all pairs: Der Unterschied am 1. Lebenstag (LT) ist hoch signifikant ( $p < 0.0001$ ) zu den folgenden, der Unterschied am 2. LT ist signifikant ( $p < 0.001$ ) zum 3. LT, der Unterschied am 3. LT ist signifikant zum 4. LT. Die Phenylalaninkonzentration nimmt in den ersten 2 Lebenstagen ab.



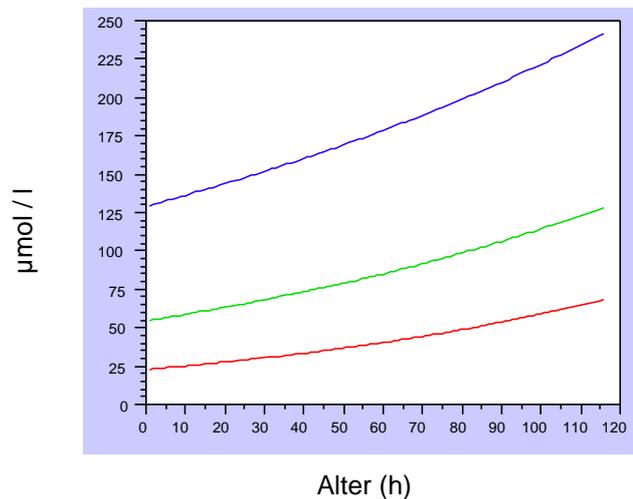
**Abbildung 9:** Altersabhängiger Referenzbereich der Phenylalaninkonzentration.

Blau: 97,5% Quantil, grün: 50% Quantil, rot: 2,5% Quantil.



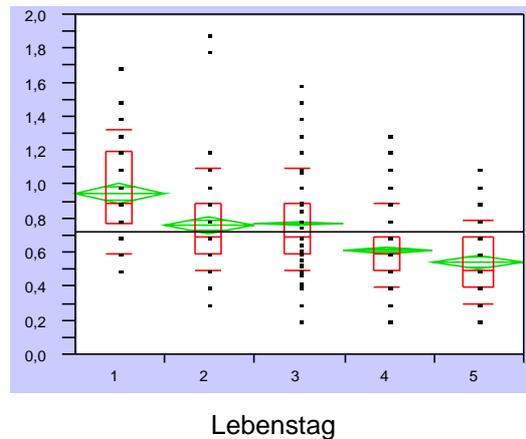
**Abbildung 10:** Tyrosinkonzentration und Alter (1. – 5. Lebenstag).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%-Quantil. Signifikanz nach Tukey-Kramer HSD mit Compare all pairs: Der Unterschied am 1. Lebenstag (LT) ist hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) zum 5. LT und signifikant ( $p < 0,01$ ) zum 4. LT, der Unterschied am 2. LT ist hoch signifikant zum 5. LT, signifikant ( $p < 0,01$ ) zum 4. LT, der Unterschied am 4. LT ist mäßig signifikant ( $p < 0,05$ ) zum 5. LT. Die Tyrosinkonzentration steigt am 4. und 5. Lebenstag an.



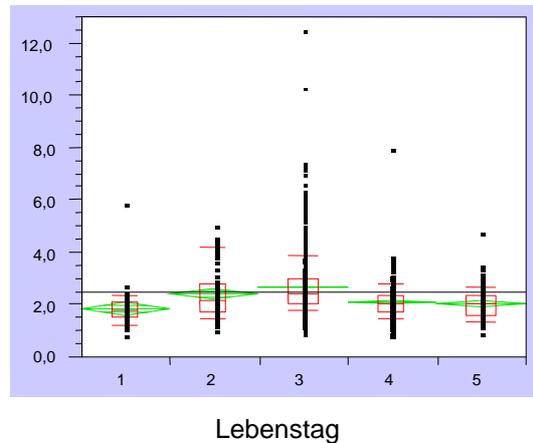
**Abbildung 11:** Altersabhängiger Referenzbereich der Tyrosinkonzentration.

Blau: 97,5% Quantil, grün: 50% Quantil, rot: 2,5% Quantil.



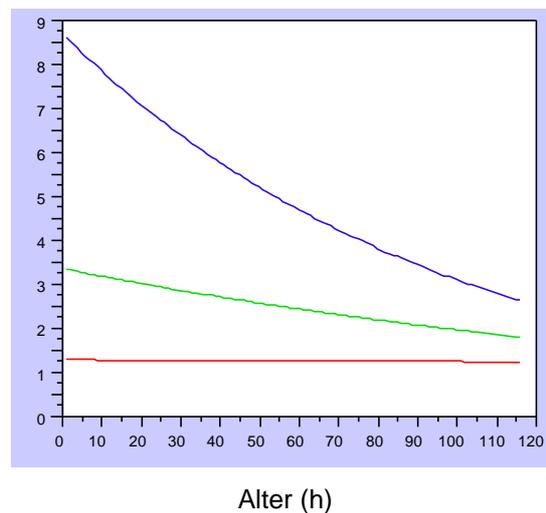
**Abbildung 12:** *Phe/Tyr Quotient und Alter (1. – 5. Lebensstag).*

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%-Quantil. Signifikanzen nach Tukey-Kramer HSD mit Compare all pairs: Der Unterschied am 1. Lebensstag (LT) ist hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) zum 3., 4. und 5. LT und signifikant ( $p < 0,01$ ) zum 2. LT, der Unterschied am 2. LT ist hoch signifikant zum 4. und 5. LT, der Unterschied am 3. LT ist hoch signifikant zum 4. und 5. LT, der Unterschied am 4. LT ist signifikant zum 5. LT. Der Phe/Tyr-Quotient nimmt in den ersten 5 Lebenstagen ab.



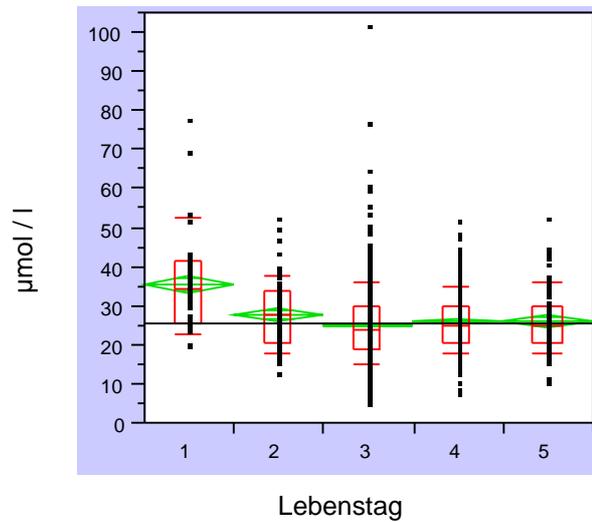
**Abbildung 13:** Fisher Quotient und Alter (1. – 5. Lebensstag).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%-Quantil. Signifikanzen nach Tukey-Kramer HSD mit Compare all pairs: Der Unterschied am 1. Lebensstag (LT) ist hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) zum 3. LT und äußerst signifikant ( $p < 0,001$ ) zum 2. LT, der Unterschied am 2. LT ist signifikant ( $p < 0,01$ ) zum 3. LT und mäßig signifikant ( $p < 0,05$ ) zum 4. LT, der Unterschied am 3. LT ist hoch signifikant zum 4. und 5. LT. Der Fisher Quotient steigt in den ersten 3 LT an und nimmt dann wieder ab.



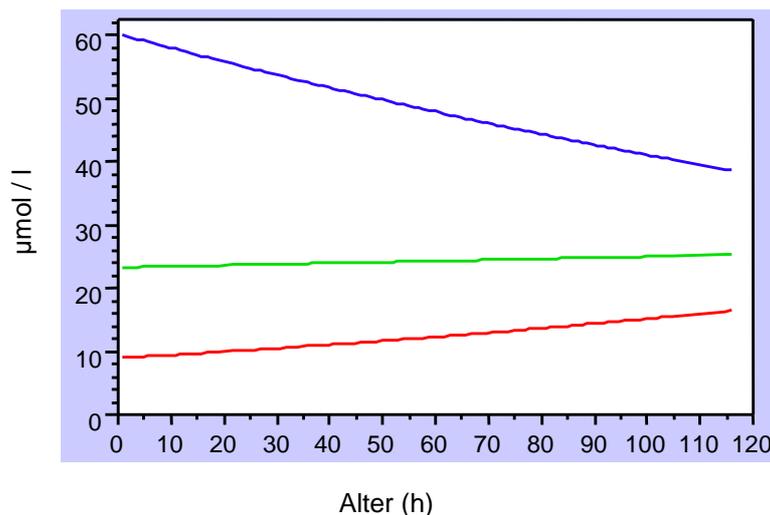
**Abbildung 14:** Altersabhängiger Referenzbereich des Fisher Quotienten.

Blau: 97,5% Quantil, grün: 50% Quantil, rot: 2,5% Quantil.



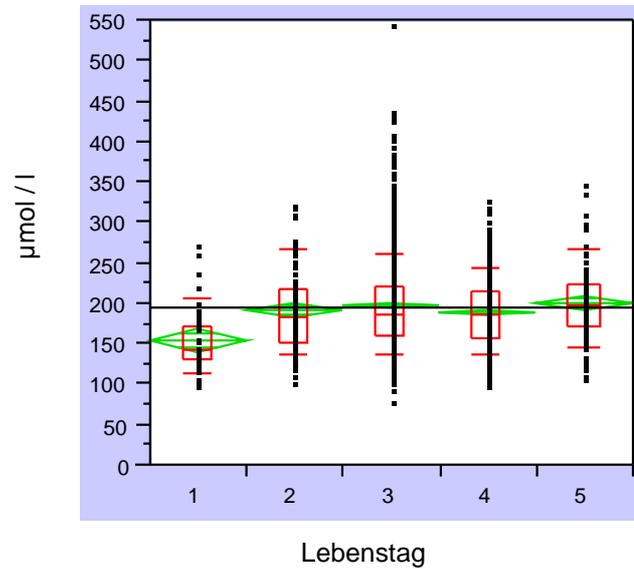
**Abbildung 15:** Methioninkonzentration und Alter (1. – 5. Lebenstag).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil. Signifikanzen nach Tukey-Kramer HSD mit Compare all pairs : Der Unterschied am 1. Lebenstag (LT) ist signifikant ( $p < 0,01$ ) zum 2. LT und hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) zum 3., 4. und 5. LT, der Unterschied am 2. LT ist signifikant ( $p < 0,01$ ) zum 3. LT, der Unterschied am 3. LT ist signifikant zum 4. LT. Die Methioninkonzentration nimmt in den ersten 2 LT ab.



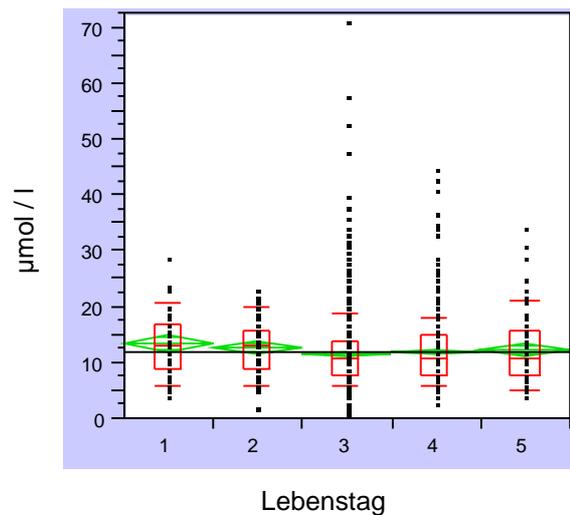
**Abbildung 16:** Altersabhängiger Referenzbereich der Methioninkonzentration.

Blau: 97,5% Quantil, grün: 50% Quantil, rot: 2,5% Quantil.



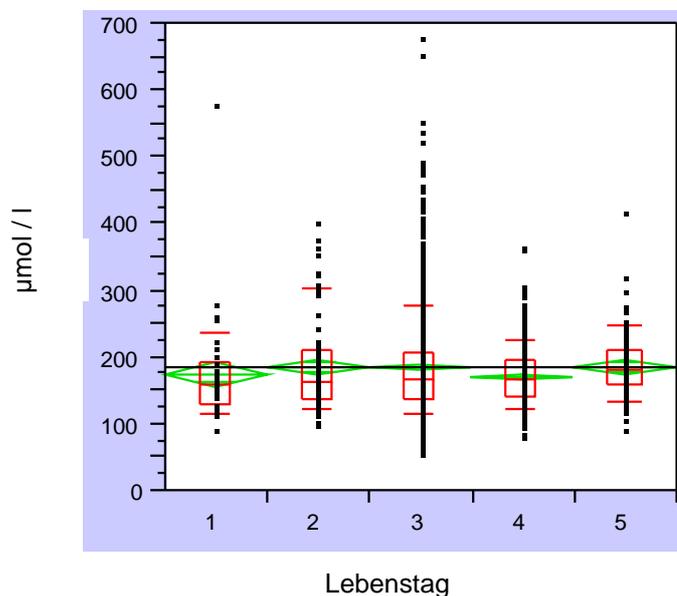
**Abbildung 17:** Leucin+Isoleucinkonzentration und Alter (1. – 5. Lebenstag).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil. Signifikanzen nach Tukey-Kramer HSD mit Compare all pairs : Der Unterschied am 1. LT ist hoch signifikant ( $p < 0.0001$ ) zu den übrigen LT. Die Leucin+Isoleucinkonzentration nimmt in den ersten 2 LT zu.



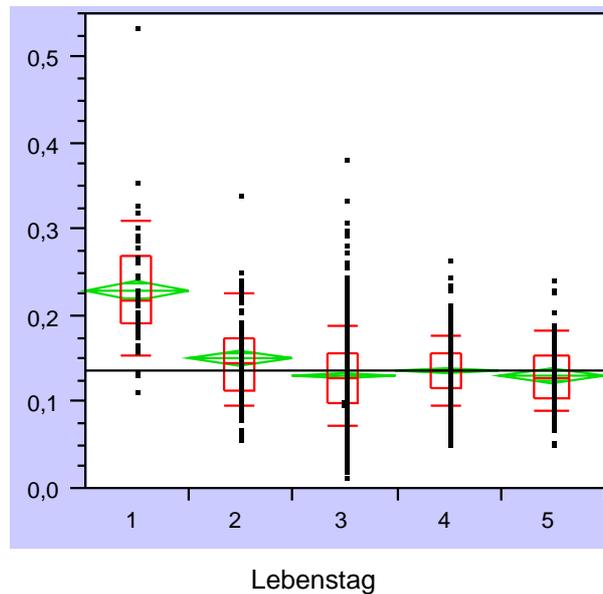
**Abbildung 18:** Citrullinkonzentration und Alter (1. – 5. Lebenstag).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil. Die Citrullinkonzentration zeigt in den ersten 5 Lebenstagen nur geringfügige Veränderungen ohne signifikante Unterschiede.



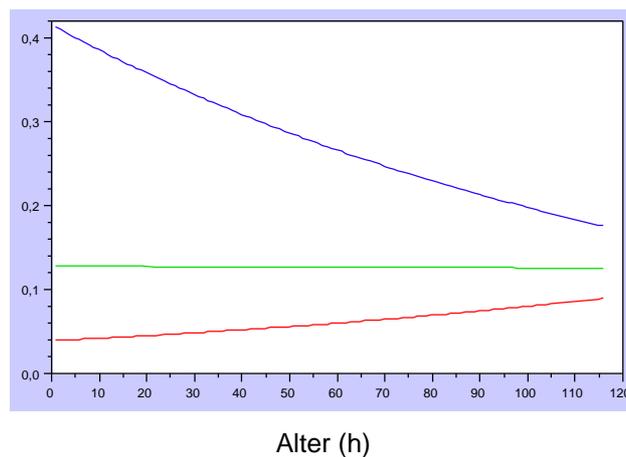
**Abbildung 19:** Valinkonzentration und Alter (1. – 5 Lebenstag).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil. Die Valinkonzentration zeigt nur geringfügige Veränderungen in den ersten 5 Lebenstagen ohne signifikante Unterschiede.



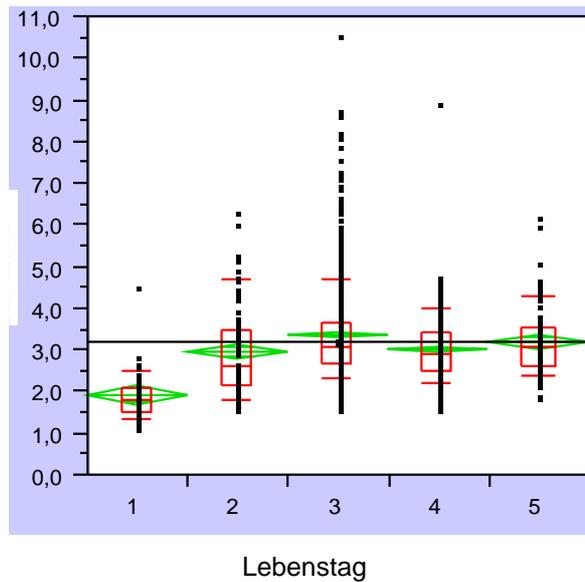
**Abbildung 20:** Quotient Methionin/Leucin+Isoleucin und Alter (1. – 5 Lebenstag).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil. Signifikanzen nach Tukey-Kramer HSD mit Compare all pairs: Der Unterschied am 1. Lebenstag (LT) ist hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) zu den folgenden LT. Der Unterschied am 3. LT ist signifikant ( $p < 0,01$ ) zum 2. LT und hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) zum 4. LT. Der Quotient Methionin/Leucin+Isoleucin nimmt in den ersten zwei Lebenstagen ab.



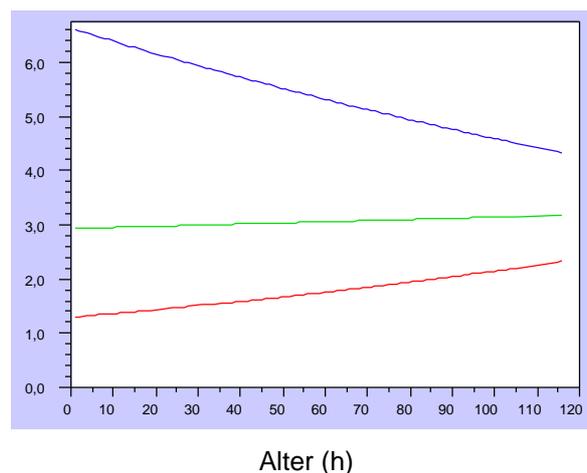
**Abbildung 21:** Altersabhängiger Referenzbereich des Quotienten Methionin / Leucin+Isoleucin).

Blau: 97,5% Quantil, grün: 50% Quantil, rot: 2,5% Quantil.



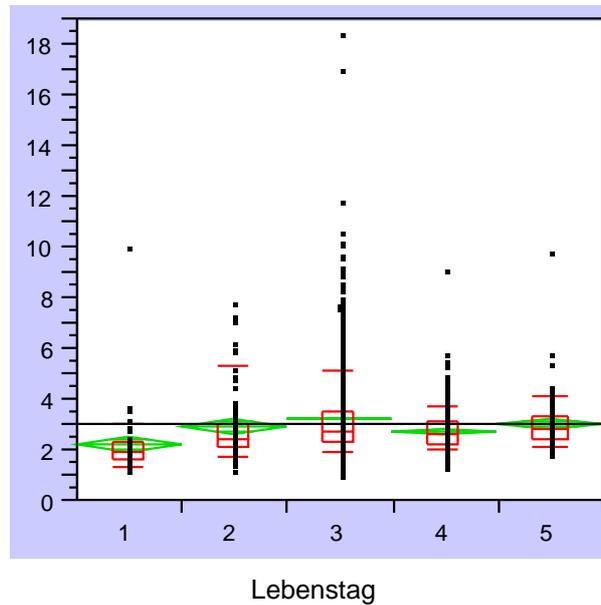
**Abbildung 23:** Quotient Leucin+Isoleucin/ Phenylalanin und Alter (1. – 5. Lebenstag).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil. Signifikanzen nach Tukey-Kramer HSD mit Compare all pairs: Der Unterschied am 1. Lebenstag (LT) ist hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) zu den folgenden LT. Der Unterschied am 3. LT ist signifikant ( $p < 0,01$ ) vom 2. LT und hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) zum 4. LT. Der Quotient Leucin+Isoleucin/Phenylalanin steigt in den ersten 3 Lebenstagen an und nimmt dann wieder ab.



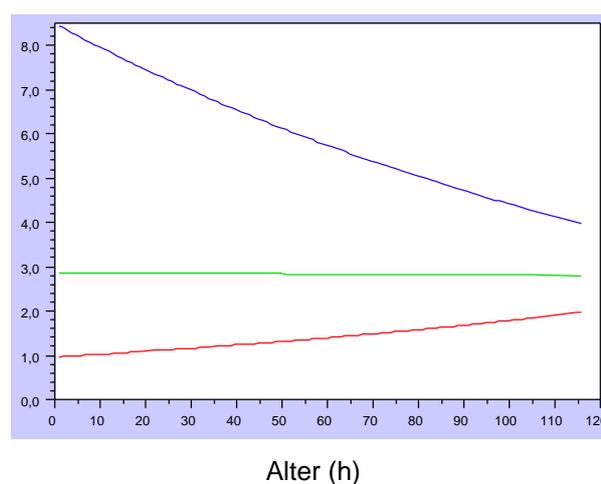
**Abbildung 22:** Altersabhängiger Referenzbereich des Quotienten Leucin+Isoleucin/ Phenylalanin.

Blau: 97,5% Quantil, grün: 50% Quantil, rot: 2,5% Quantil.



**Abbildung 24:** Quotient Valin/Phenylalanin und Alter (1. – 5. Lebenstag).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%-Quantil. Signifikanzen nach Tukey-Kramer HSD mit Compare all pairs: Der Unterschied am 1. Lebenstag (LT) ist hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) zum 3. – 5. LT und signifikant ( $p < 0,001$ ) zum 2. LT. Der Unterschied am 3. LT ist signifikant ( $p < 0,001$ ) zum 4. LT. Der Quotient Valin/Phenylalanin steigt in den ersten 3 Lebenstagen an und nimmt dann wieder ab.



**Abbildung 25:** Altersabhängiger Referenzbereich des Quotienten Valin/Phenylalanin.

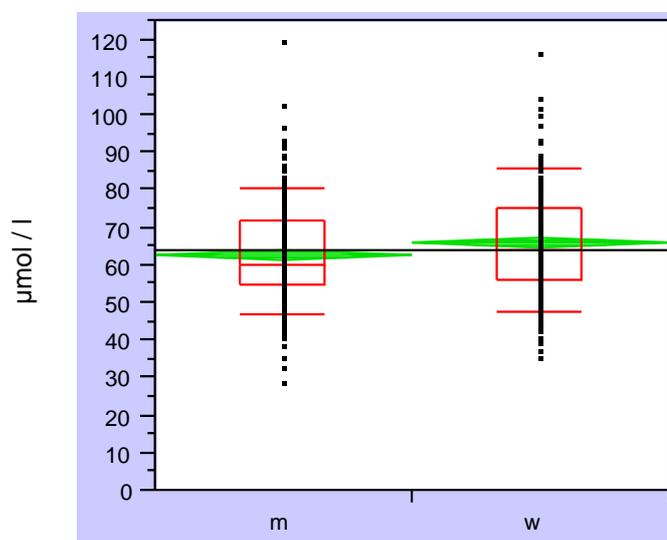
Blau: 97,5% Quantil, grün: 50% Quantil, rot: 2,5% Quantil.

### 3.4 Korrelation der Aminosäurenkonzentration mit dem postnatalen Gewichtsverlust

Die Gruppen am 4. und 5. Lebenstag wurden zusammengefaßt (n = 520). Es ergaben sich folgende Korrelationen (Regressionsanalyse mit Varianzanalyse) zwischen dem Gewichtsverlust (in % des Geburtsgewichts) und den Aminosäurenkonzentrationen im Trockenblut: Phenylalanin (r = 0,17, p < 0,001), Tyrosin (r = -0,15, p < 0,001), Phe/Tyr-Quotient (r = 0,27, p < 0,0001) und Leucin/Isoleucin (r = -0,15, p < 0,001).

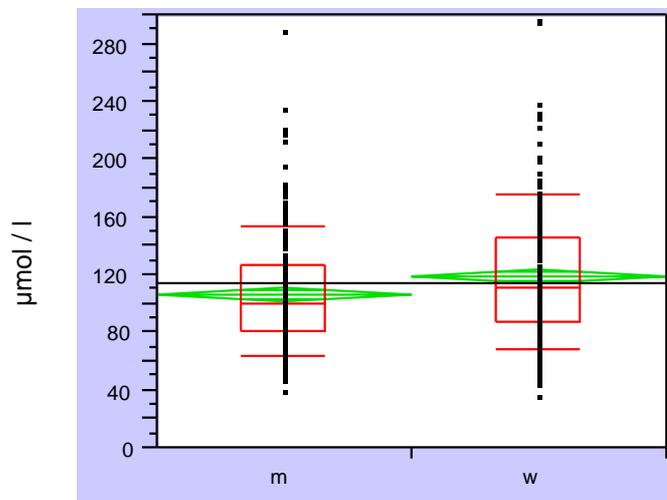
### 3.5 Verlauf der Aminosäurenkonzentration bei Mädchen und Jungen

Am 4. Lebenstag (n = 447) waren die Konzentrationen folgender Aminosäuren bei Mädchen signifikant (nach Dunnett`s mit Compare with control) größer als bei Jungen: Phenylalanin (p < 0,05), Tyrosin (p < 0,01), Methionin (p < 0,01), Valin (p < 0,001) und Citrullin (p < 0,05). Der Phe/Tyr-Quotient war signifikant größer bei Jungen als bei Mädchen (p < 0,05).



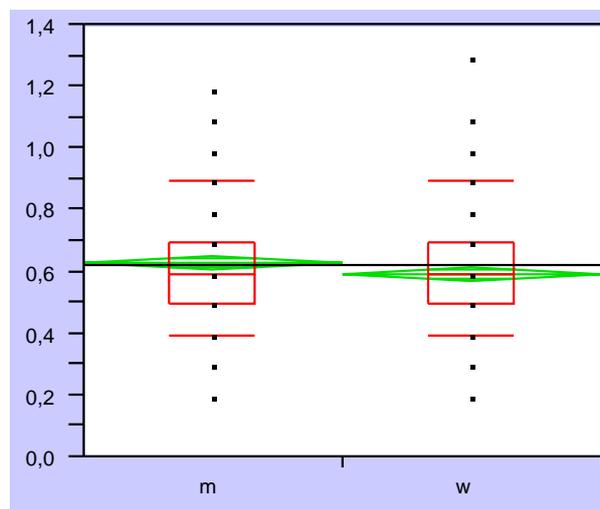
**Abbildung 26:** Phenylalaninkonzentration bei Mädchen und Jungen am 4. Lebenstag (n = 447).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw.90%- Quantil. Die Phenylalaninkonzentration bei Mädchen ( $\bar{x} = 66 \mu\text{mol/l}$ ) ist signifikant größer (p < 0,05) als bei Jungen ( $\bar{x} = 63 \mu\text{mol/l}$ ).



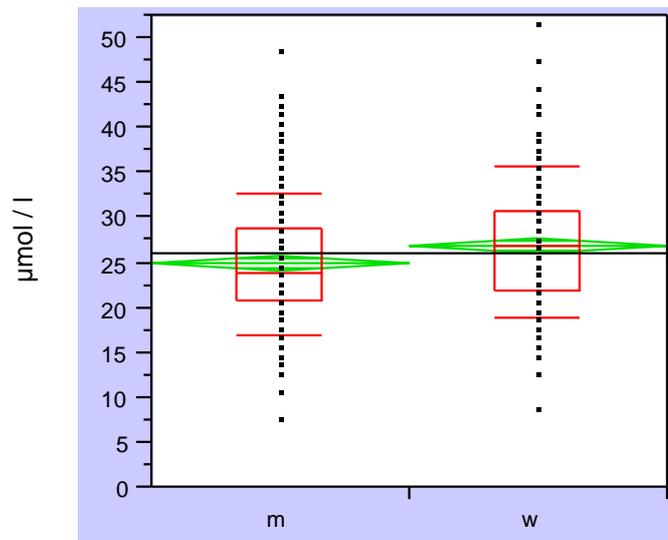
**Abbildung 27:** Tyrosinkonzentration bei Mädchen und Jungen am 4. Lebensstag ( $n = 447$ ).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw.90%- Quantil. Die Tyrosinkonzentration bei Mädchen ( $\bar{x} = 121 \mu\text{mol/l}$ ) ist signifikant größer ( $p < 0,01$ ) als bei Jungen ( $\bar{x} = 108 \mu\text{mol/l}$ ).



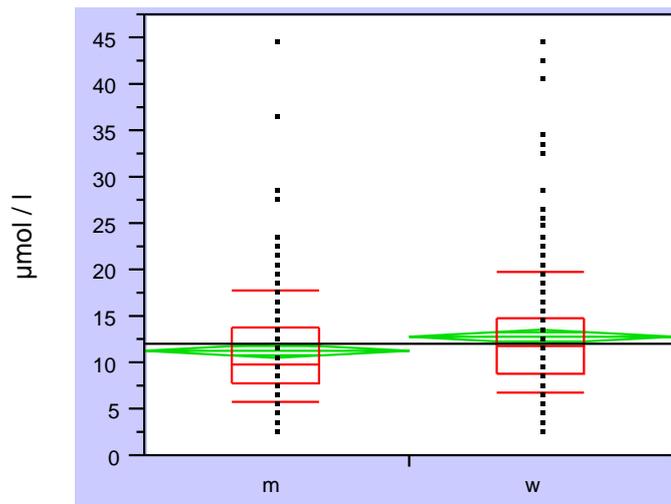
**Abbildung 28:** Phe/Tyr-Quotient bei Mädchen und Jungen am 4. Lebensstag ( $n = 447$ ).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw.90%- Quantil. Der Phe/Tyr-Quotient ist bei Jungen ( $\bar{x} = 0,63$ ) signifikant größer ( $p < 0,058$ ) als bei Mädchen ( $\bar{x} = 0,60$ ).



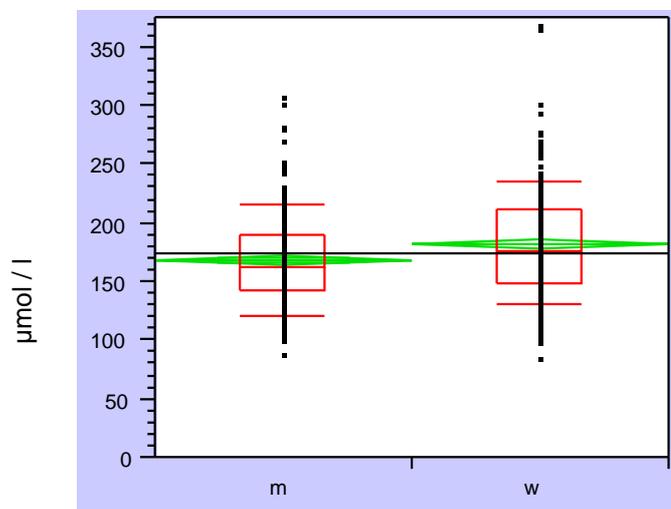
**Abbildung 29:** Methioninkonzentration bei Mädchen und Jungen am 4. Lebensstag ( $n = 447$ ).

Die Methioninkonzentration bei Mädchen ( $\bar{x} = 27 \mu\text{mol/l}$ ) ist signifikant größer ( $p < 0,01$ ) als bei Jungen ( $\bar{x} = 25 \mu\text{mol/l}$ ). Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10% - bzw. 90%- Quantil.



**Abbildung 30:** Citrullinkonzentration bei Mädchen und Jungen am 4. Lebensstag ( $n = 447$ ).

Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil. Die Citrullinkonzentration bei Mädchen ( $\bar{x} = 12,8 \mu\text{mol/l}$ ) ist signifikant größer ( $p < 0,02$ ) als bei Jungen ( $\bar{x} = 11,5 \mu\text{mol/l}$ ).



**Abbildung 31:** Valinkonzentration bei Mädchen und Jungen am 4. Lebensstag ( $n = 447$ ).

Die Valinkonzentration bei Mädchen ( $\bar{x} = 183 \mu\text{mol/l}$ ) ist signifikant größer ( $p < 0,001$ ) als bei Jungen ( $\bar{x} = 69 \mu\text{mol/l}$ ). Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil.

### 3.6 Verlauf der Aminosäurenkonzentration bei unterschiedlichem Geburtsgewicht

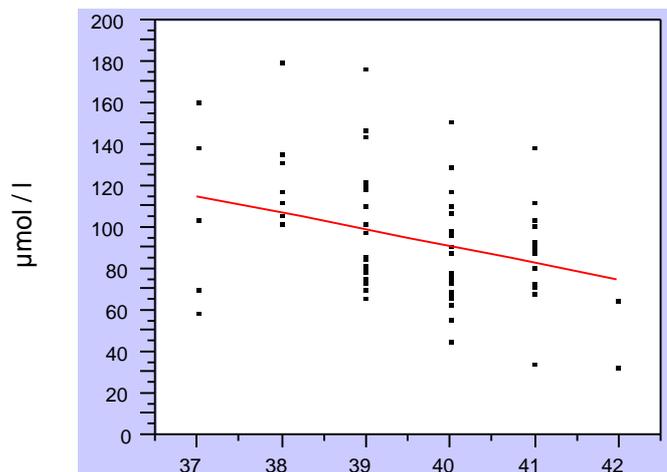
Die Gruppen am 1. und 2. Lebenstag für Tyrosin und den Phe/Tyr-Quotienten wurden zusammengefasst (n = 124): Die Tyrosinkonzentration ( $r = -0,29$ ,  $p < 0,0011$ ) und der Phe/Tyr-Quotient ( $r = 0,26$ ,  $p < 0,01$ ) korrelieren (Regressionsanalyse mit Varianzanalyse) mit dem Geburtsgewicht.

Am 4. Lebenstag korrelieren die Valinkonzentration ( $r = 0,15$ ,  $p < 0,01$ ) und die Methioninkonzentration ( $r = 0,13$ ,  $p < 0,01$ ) (Regressionsanalyse mit Varianzanalyse) mit dem Geburtsgewicht.

### 3.7 Verlauf der Aminosäurenkonzentration bei unterschiedlichem Gestationsalter

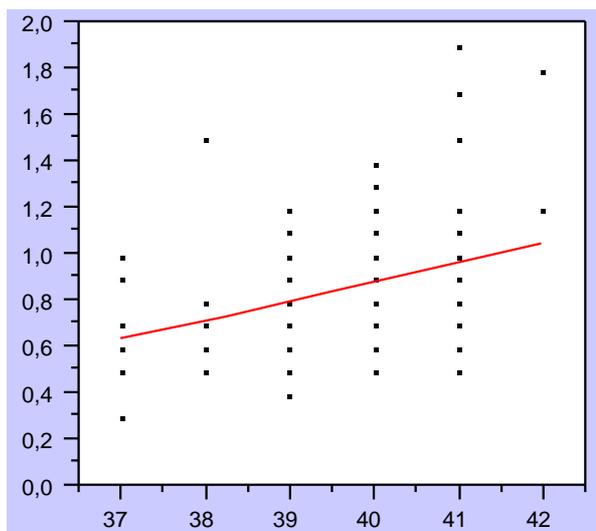
Am 2. Lebenstag (n = 78) korreliert die Tyrosinkonzentration (Regressionanalyse mit Varianzanalyse:  $r = -0,33$ ,  $p < 0,01$ ) mit dem Gestationsalter.

Die Gruppen am 1. und 2. Lebenstag wurden für den Phe/Tyr-Quotienten zusammengefasst (n = 124): Der Phe/Tyr-Quotient korreliert in den ersten zwei Lebenstagen (Regressionanalyse mit Varianzanalyse:  $r = 0,35$ ,  $p < 0,0001$ ) mit dem Gestationsalter.



**Abbildung 32:** Tyrosinkonzentration und Gestationsalter am 2. Lebenstag (n = 78).

Die Tyrosinkonzentration nimmt mit zunehmendem Gestationsalter ab ( $r = -0,33$ ,  $p < 0,01$ ).



**Abbildung 33:** *Phe/Tyr-Quotient und Gestationsalter.*

Der Phe/Tyr-Quotient steigt in den ersten zwei Lebenstagen mit zunehmendem Gestationsalter an ( $r = 0,35$ ,  $p < 0,0001$ ).

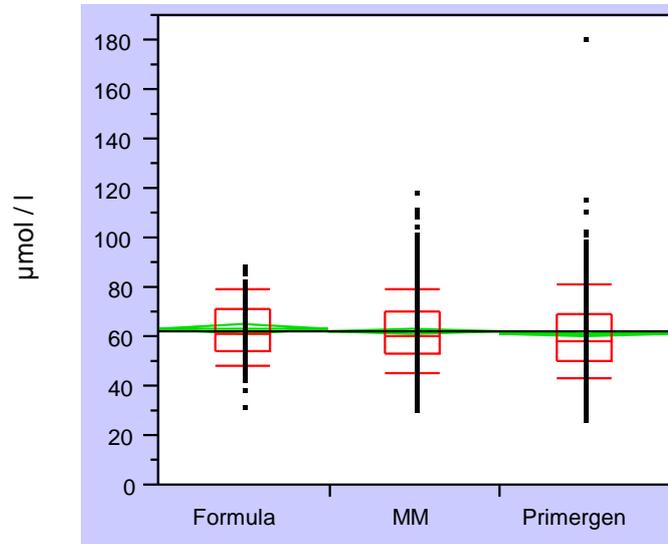
### 3.8 Verlauf der Aminosäurenkonzentration bei unterschiedlichen Ernährungsformen

Es wurden 3 Ernährungsgruppen verglichen: Muttermilch, Formula Säuglingsmilch und Primergen Energiesupplement zusätzlich zur Muttermilch.

**Tabelle 6:** Abhängigkeit der Aminosäurenkonzentration von der Ernährung

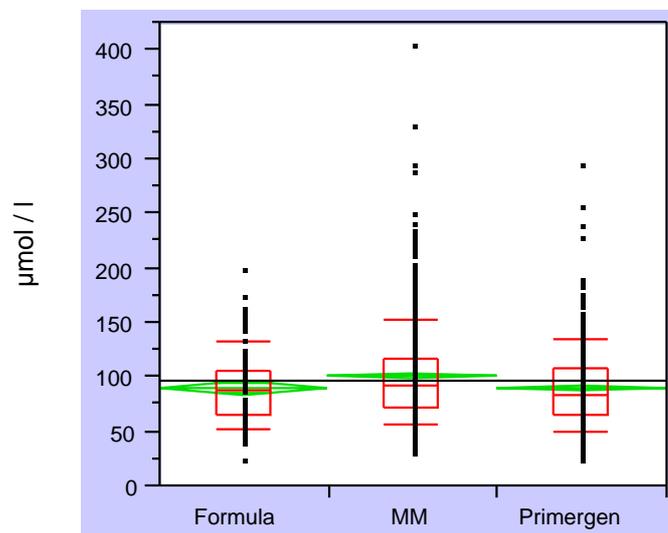
Aminosäuren im Trockenblut (Mittelwerte) bei gesunden Neugeborenen mit unterschiedlichen Ernährungen. Es wurden 3 Ernährungsgruppen verglichen: Muttermilch (n = 683), Formula Säuglingsmilch (n = 91) und Primergen Energiesupplement (n = 548) zusätzlich zur Muttermilch. Die Gruppen am 3. und 4. Lebenstag wurden zusammengefaßt (n = 1322). Signifikanzen nach Dunnett`s mit "Compare with control" mit der Muttermilch-Gruppe als Kontrolle. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,0001.

Aminosäure (µmol/l)	Muttermilch	Formula Säuglingsmilch	Primergen Energie- supplement
	µmol / l		
Phenylalanin	63 ± 14	63 ± 12	61 ± 15 *
Tyrosin	102 ± 43	91 ± 32 *	90 ± 36 ***
Leucin + Isoleucin	199 ± 49	187 ± 40 *	197 ± 54
Valin	184 ± 66	165 ± 41 *	187 ± 70
Methionin	25 ± 8	28 ± 8 **	26 ± 9 *
Citrullin	12 ± 6	13 ± 6	12 ± 7
<b>Quotienten</b>			
Phe/Tyr	0,69 ± 0,24	0,76 ± 0,22 **	0,75 ± 0,24 ***
Fisher-Quotient	2,47 ± 0,89	2,40 ± 0,80	2,71 ± 1,12 ***



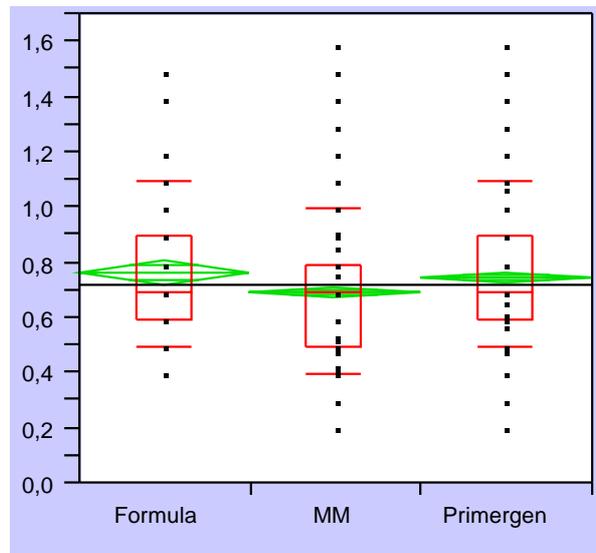
**Abbildung 34:** Abhängigkeit zwischen Phenylalaninkonzentration und Ernährung.

Bei der Ernährung mit Primergen zusätzlich zur Muttermilch liegt die Phenylalaninkonzentration ( $\bar{x} = 61 \mu\text{mol/l}$ ) niedriger ( $p < 0,05$ ) als bei der Ernährung ausschließlich mit Muttermilch ( $\bar{x} = 63 \mu\text{mol/l}$ ). Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil.



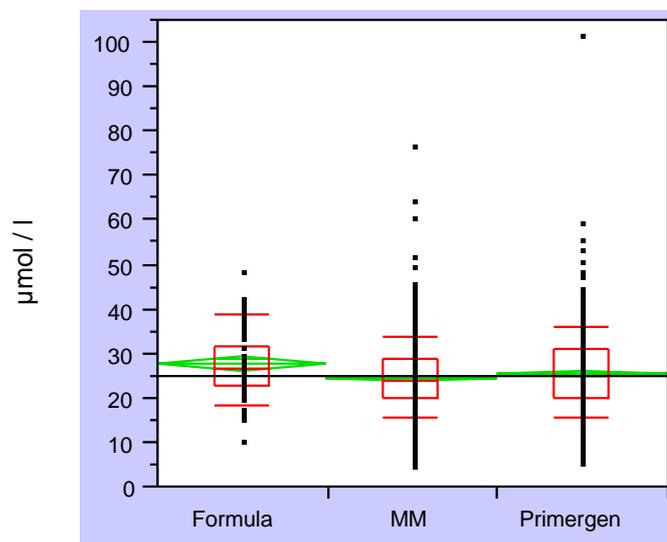
**Abbildung 35:** Abhängigkeit zwischen Tyrosinkonzentration und Ernährung.

Die Tyrosinkonzentration ist im Vergleich zwischen der Ernährung ausschließlich mit Muttermilch ( $\bar{x} = 102 \mu\text{mol/l}$ ) und der Ernährung mit Formula ( $\bar{x} = 91 \mu\text{mol/l}$ ) und Primergen ( $\bar{x} = 90 \mu\text{mol/l}$ ) erniedrigt. Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil



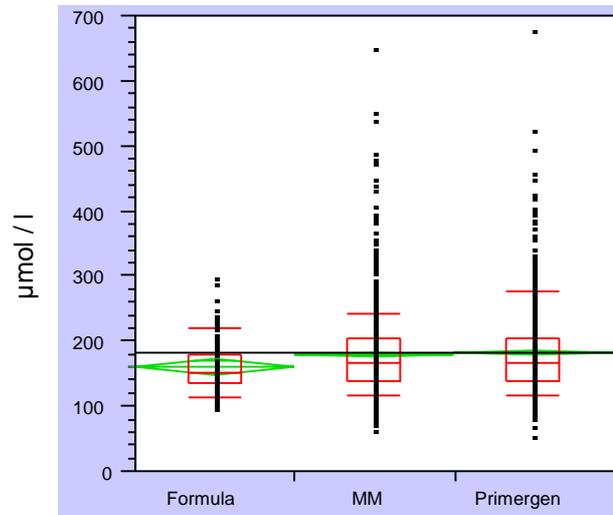
**Abbildung 36:** Abhängigkeit zwischen Phe/Tyr-Quotient und Ernährung.

Der Phe/Tyr-Quotient ist im Vergleich zwischen der Ernährung mit Muttermilch ( $\bar{x} = 0,69$ ) und der Ernährung mit Formula ( $\bar{x} = 0,76$ ) und Primergen ( $\bar{x} = 0,75$ ) erhöht. Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil.



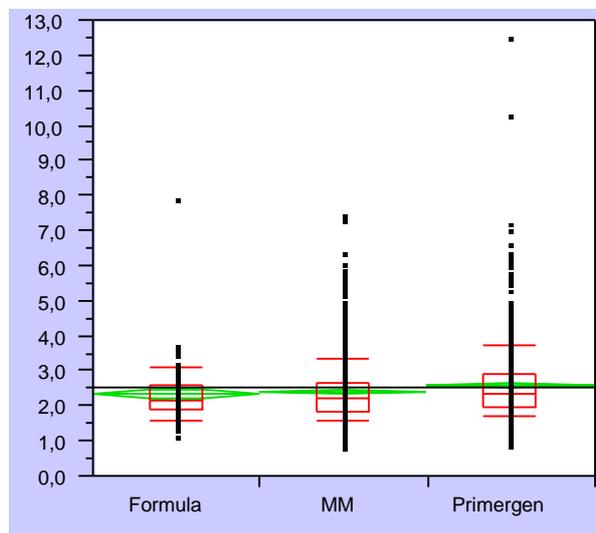
**Abbildung 37:** Abhängigkeit zwischen Methioninkonzentration und Ernährung.

Die Methioninkonzentration ist im Vergleich zwischen der Ernährung mit Muttermilch ( $\bar{x} = 25\mu\text{mol/l}$ ) und der Ernährung mit Formula ( $\bar{x} = 28\mu\text{mol/l}$ ) und Primergen ( $\bar{x} = 26\mu\text{mol/l}$ ) erhöht. Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil.



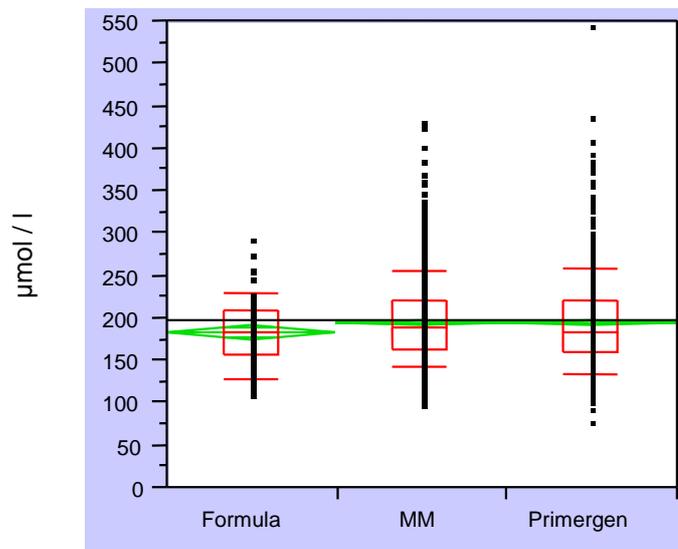
**Abbildung 38:** *Abhängigkeit der Valinkonzentration von der Ernährung.*

Die Valinkonzentration ist im Vergleich zwischen der Ernährung mit Muttermilch ( $\bar{x} = 184 \mu\text{mol/l}$ ) und der Ernährung mit Formula ( $\bar{x} = 165 \mu\text{mol/l}$ ) erniedrigt. Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw.90%- Quantil.



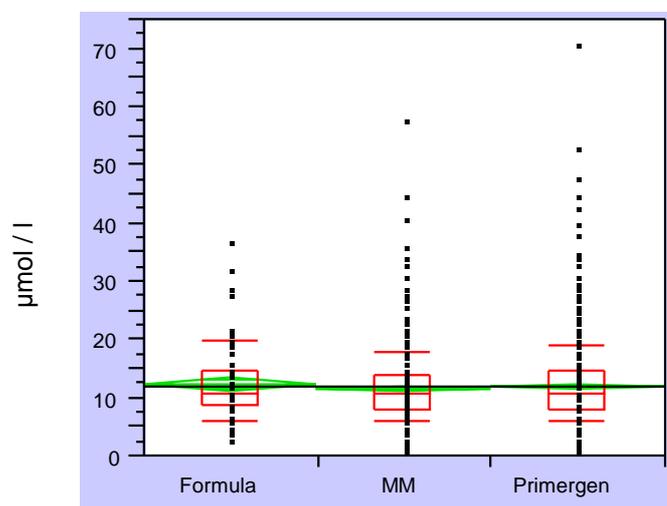
**Abbildung 39:** *Abhängigkeit zwischen Fisher-Quotient und Ernährung.*

Der Fisher-Quotient ist im Vergleich zwischen der Ernährung mit Muttermilch ( $\bar{x} = 2,47$ ) und der Ernährung mit Primergen ( $\bar{x} = 2,71$ ) erhöht. Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil.



**Abbildung 40:** *Abhängigkeit zwischen Leucin+Isoleucinkonzentration und Ernährung.*

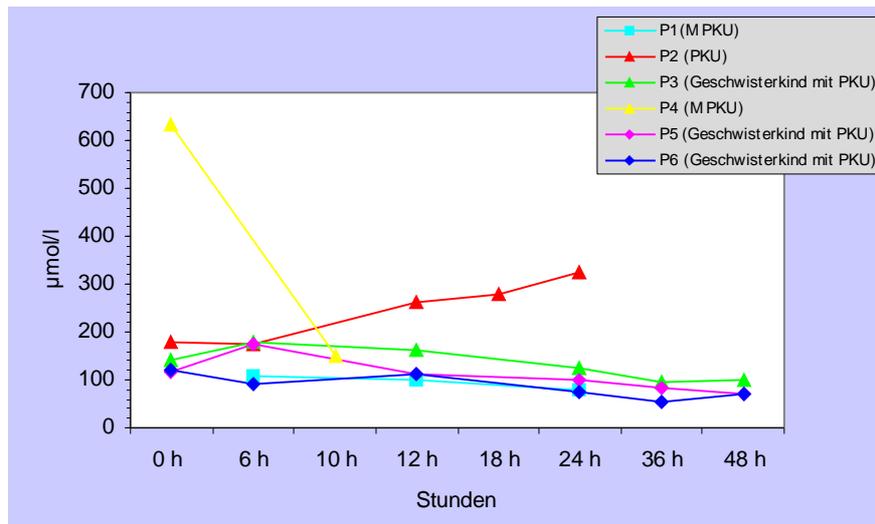
Die Leucin+Isoleucinkonzentration ist im Vergleich zwischen der Ernährung mit Muttermilch ( $\bar{x} = 199 \mu\text{mol/l}$ ) und der Ernährung mit Formula ( $\bar{x} = 187 \mu\text{mol/l}$ ) erniedrigt. Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil.



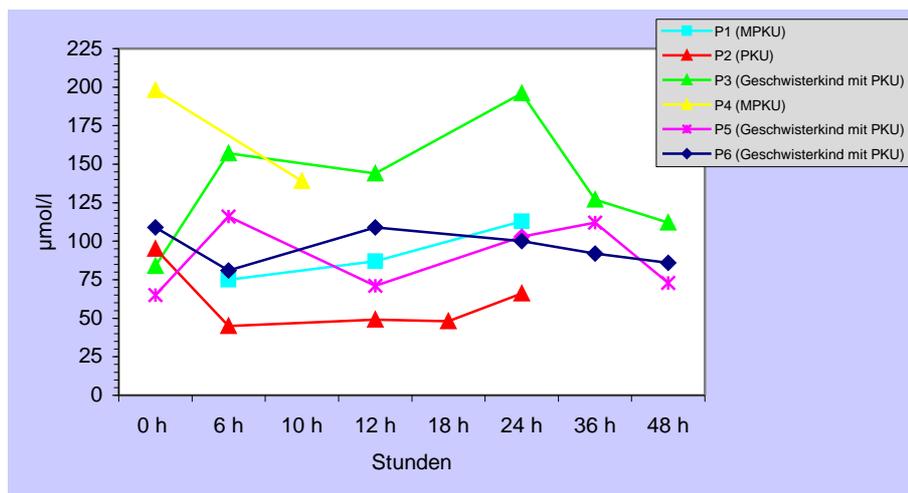
**Abbildung 41:** *Abhängigkeit zwischen Citrullinkonzentration und Ernährung.*

Die Citrullinkonzentration zeigt keinen Unterschied in Abhängigkeit zur Ernährung. Grün: Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts, rote Box: 25.-75. Perzentile, rote Querstriche: 10%- bzw. 90%- Quantil.

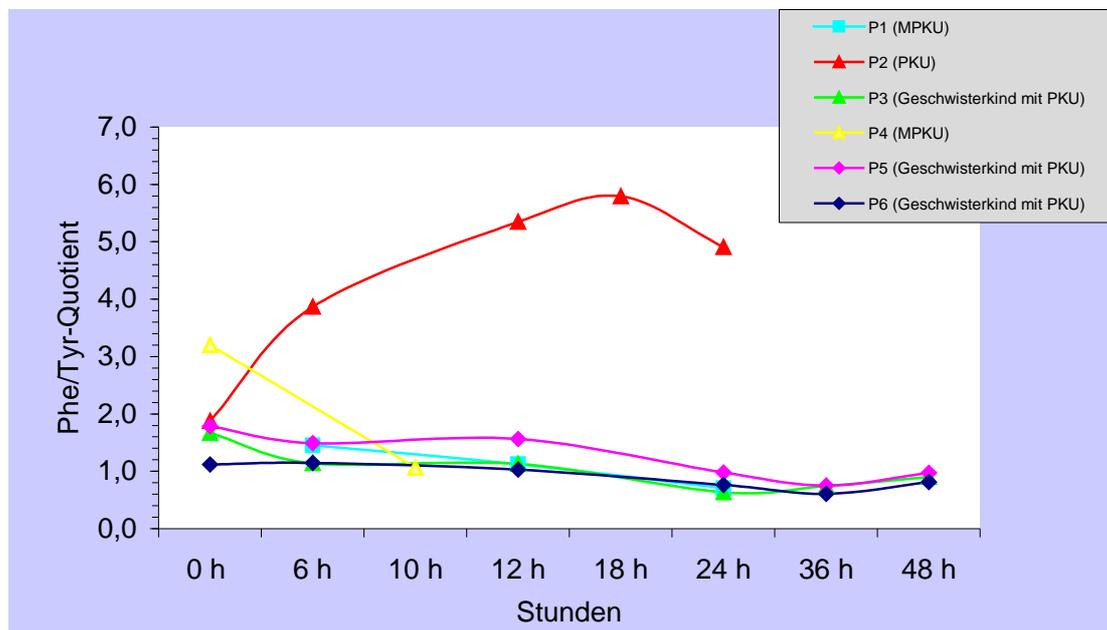
### 3.9 Patienten mit Risiko für PKU - Konzentrationsverlauf der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin im Trockenblut



**Abbildung 42:** Verlauf der Phenylalaninkonzentration in den ersten 48 Lebensstunden bei 6 Neugeborenen (Zeitpunkt Geburt (0h) im Nabelschnurblut gemessen).



**Abbildung 43:** Verlauf der Tyrosinkonzentration in den ersten 48 Lebensstunden bei 6 Neugeborenen mit Risiko für Phenylketonurie.



**Abbildung 44:** Verlauf des Phe/Tyr-Quotient in den ersten 48 Lebensstunden bei 6 Neugeborenen mit Risiko für Phenylketonurie.

## 4 DISKUSSION

In der hier vorgelegten Arbeit werden erstmals an einem größeren Normalkollektiv Referenzwerte für krankheitsrelevante Aminosäuren vorgestellt. Dies war möglich, da die TMS durch Verwendung interner, mit stabilen Isotopen markierter Standards, eine hohe Präzision der Messung erlaubt (Chace et al., 1999b). Eine weitere Voraussetzung bestand darin, dass die Proben bei einem gesunden Kollektiv von Neugeborenen gewonnen werden konnten. Im Gegensatz zu einem „Screeningkollektiv“, bei dem weder das Geschlecht noch klinische Details wie Geburtsgewicht, Gestationsalter, exakter Screeningzeitpunkt, Begleiterkrankungen, Art der Ernährung oder pathologische Gewichtsabnahmen bekannt sind, standen diese Daten in der hier vorgelegten Arbeit zur Verfügung. Mit Hilfe einer speziell hierzu konzipierten Datenbank wurden diese Parameter von 2159 Neugeborenen dokumentiert. Die Durchführung erfolgte in einem Krankenhaus der Grundversorgung und repräsentiert damit ein möglichst unselektioniertes Patientengut mit größtenteils „normalen“ Verläufen. Bislang vorliegende „Normalwerte“ beziehen sich auf kleine Kollektive „gesunder“ Neugeborener, ohne dass weitere Details genannt sind (Pohlandt, 1978). Auf die grundsätzliche Problematik der Erstellung von Normalwerten für Plasma-Aminosäuren wurde bei Bremer et al. (1981) ausführlich eingegangen. Darin wird beschrieben, dass die Bestimmung von Normalwerten, durch Individuen, die als normal angesehen werden, einen fiktiven Zustand beschreibt, der auch Zufälle, methodische Schwierigkeiten und den Grad der Erkenntnisse über die untersuchten Variablen widerspiegelt.

Das Normalkollektiv der hier vorgelegten Arbeit wurde durch folgende Kriterien definiert: Der Screeningzeitpunkt lag innerhalb der ersten 5 Lebenstage. Das Geburtsgewicht lag zwischen 2500g und 4500g, um hypotrophe Neugeborene (small for gestational age, SGA), oder hypertrophe Neugeborene, z.B. von Müttern mit Gestationsdiabetes auszuschließen. Das Gestationsalter lag zwischen der 37. und der 42. Schwangerschaftswoche. Der postnatale Gewichtsverlust lag bei maximal –10 %, entsprechend des als physiologischen betrachteten Bereichs (Bauer et al., 2001). Die in die Untersuchung aufgenommenen Neugeborenen zeigten keine klinischen Hinweise für eine perinatale Infektion bzw. eine Leukozyten-, oder CRP-Erhöhung oder andere Erkrankungen wie Postasphyxie und Anpassungsstörungen. Bei Verdacht auf eine Hyperbilirubinämie wurde der Verlauf des transcutanen Bilirubinwertes bestimmt und bei dem Nachweis für eine über dem Grenzwert liegende Hyperbilirubinämie wurden die Neugeborenen von der Untersuchung ausgeschlossen. Diese Einschlusskriterien erfüllten 1542 Neugeborene, deren Daten hier ausgewertet wurden. Zusätzlich dokumentiert wurde das Ge-

schlecht und die Ernährung der Neugeborenen. Die Untersuchung wurde im Rahmen des regulären Neugeborenen-Screenings durchgeführt, ohne zusätzliche Belastung des Neugeborenen durch Blutentnahmen oder Verzögerung der Diagnostik. Aus der Trockenblutkarte wurden lediglich zwei Proben für die vorliegende Untersuchung ausgestanzt, anschließend wurden die Karten umgehend ohne Zeitverzögerung an das auswärtige Screeninglabor verschickt. Die hier ermittelten Aminosäurekonzentrationen aus einem Normalkollektiv sowie Daten aus der Literatur werden tabellarisch dargestellt (siehe Anhang 6.4.).

Bei Sander et al. (2000) wurden 14 000 Trockenblutproben aus dem Allgemeinen Neugeborenen-Screening ausgewertet, der Screeningzeitpunkt lag zu 97,5 % innerhalb der ersten 5 Lebenstage, vom 3., 4. und 5. Lebenstag stammten 19,8 %; 48,9 %, und 22,6 % der Blutentnahmen. Das Geburtsgewicht war bei 53 % aller eingesandten Proben bekannt, davon wurde bei knapp 3 % der Neugeborenen ein Geburtsgewicht unter 2000g festgestellt. Der Median wie auch die obere Perzentile der Aminosäurekonzentrationen, liegt niedriger als bei den hier vorliegenden Ergebnissen. Der Phe/Tyr-Quotient stimmt gut überein. Möglicherweise sind die geringeren Werte bei Sander et al. teilweise auf einen durchschnittlich späteren Screeningzeitpunkt zurückzuführen, die hier vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass Phenylalanin und Methionin mit dem Alter abnehmen. Gerade in den ersten 3 Lebenstagen ist diese Abnahme am deutlichsten und dieser Zeitraum ist bei Sander et al. nur zu ca. 20 % vertreten, wohingegen in der vorgelegten Studie in diesem Zeitraum 64 % der Messungen durchgeführt wurden. Die Tyrosin-, Leucin+Isoleucin- und Valinwerte sind in der vorgelegten Arbeit höher als bei Sander et al., trotz der in der vorgelegten Arbeit beobachteten Tatsache, dass Tyrosin und Leucin+Isoleucin mit dem Alter zunehmen. Ob für diese Diskrepanz Unterschiede in der Ernährung, Methodik oder andere Einflussgrößen zuständig sind, konnte nicht geklärt werden.

Bei Schulze et al. (1999) wurden 3000 Trockenblutproben aus dem Allgemeinen Neugeborenen-Screening von „gesunden“ (Screeningwerte im Referenzbereich) Neugeborenen, auf die Konzentrationen von Phenylalanin und Tyrosin mit TMS untersucht.

Der Median und die 99. Perzentile liegen bei Phenylalanin und dem Phe/Tyr-Quotienten über und bei der Tyrosinkonzentration unter den hier vorliegenden Werten, möglicherweise aufgrund von Unterschieden in den Geräteeinstellungen.

Bei Reilly et al. (1998) wurden 493 Trockenblutproben aus dem Allgemeinen Neugeborenen-Screening von Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht über 2500g zwischen dem 1. und 5. Lebenstag mit HPLC untersucht. Der Median der Phenylalaninkonzentra-

tion liegt deutlich über den hier vorgelegten Werten, während die Konzentrationen von Tyrosin, Leucin+Isoleucin, Valin, Methionin und Citrullin im unteren Drittel der hier vorgelegten Bereiche liegen.

Die höheren Werte für Phenylalanin bei Reilly et al. (1998) sind wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Meßmethoden mitbedingt, weitere nicht bekannte Einflussgrößen, wie das Durchschnittsalter der Neugeborenen, können diesen Unterschied noch verstärkt haben.

Bei Pohlandt et al. (1978) wurden 40 Plasmaproben „normaler, reifer Neugeborener“ mit einem Durchschnittsalter von 4,4 Tagen chromatographisch untersucht. Der Median aller Aminosäurenkonzentrationen außer Citrullin liegt unter den hier vorgelegten Ergebnissen, am deutlichsten zeigt sich der Unterschied bei den Konzentrationen von Phenylalanin und Tyrosin, die 20- 30 % niedriger liegen. Die unterschiedlichen Meßmethoden stellen sicherlich eine Ursache für diese Unterschiede dar und die niedrigeren Phenylalaninwerte bei Pohlandt et al. können durch einen späteren Screeningzeitpunkt, bzw. durch die bei ihm verwendeten Plasmaproben mitbeeinflusst sein.

#### **4.1 Untersuchungen einzelner krankheitsrelevanter Aminosäuren**

Bei Chace et al. (1996) wurden in 909 Trockenblutproben von „nicht betroffenen“ (keine Hypermethioninämie oder Homocystinurie) Neugeborenen die Methioninkonzentrationen untersucht. Die Methioninkonzentration und der Quotient Methionin/Leucin+Isoleucin stimmen mit den hier vorgelegten Werten gut überein (siehe Tabelle 1).

Die Methioninkonzentrationen sind bei betroffenen Neugeborenen häufig nur geringfügig erhöht. Die Bestimmung des Quotienten Methionin/Leucin+Isoleucin ermöglicht eine deutliche Verbesserung der Diagnostik auf Hypermethioninämie und eine Reduzierung von falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen (Chace et al., 1996).

Bei Chace et al. (1995) wurden in >10 000 Trockenblutproben „nicht betroffener“ (keine MSUD) Neugeborener die Konzentrationen von Leucin+Isoleucin und Valin mit TMS untersucht (siehe Tabelle 1). Die Aminosäurenkonzentrationen und Quotienten der Mittelwerte liegen deutlich unter den hier vorgelegten Werten: Leucin+Isoleucin (-23 %), Valin (-29%), Quotient Leucin+Isoleucin/Phenylalanin (-22%), Valin/Phenylalanin (-29%).

## **4.2 Vergleich eigener Daten über Einflussgrößen mit der Literatur**

### **4.2.1 Alter**

Einen deutlichen Einfluss zeigt das Alter auf die Aminosäurenkonzentrationen. In den hier vorgelegten Ergebnissen ergibt sich eine signifikante Zunahme vom 1. bis 5. Lebenstag für Leucin+Isoleucin und Tyrosin.

Eine signifikante Abnahme ergibt sich für Phenylalanin, Methionin, den Phe/Tyr-Quotient und den Quotient Met/Leu+Ile. Die Ergebnisse stehen mit Ghadimi und Pecora, (1964), Lindblad und Baldesten (1967), und Reisner et al., (1973) im Einklang.

Ein genereller Abfall aller beobachteten Aminosäurenkonzentrationen in den ersten Lebensstunden konnte wie bei Lindblad und Baldesten (1967) in dem hier vorgelegten Kollektiv nicht beobachtet werden. Die Tyrosinkonzentration zeigt auch in den ersten Lebensstunden einen Anstieg und die Valin- und Citrullinkonzentrationen im Blut blieben unverändert. Der Fisher-Quotient, der Quotient Val/Phe und der Quotient Leu+Ile/Phe zeigen in den ersten drei Lebenstagen einen Anstieg und nehmen dann wieder ab.

Es wurden darüber hinaus in der hier vorgelegten Untersuchung Referenzbereiche in einem 95 % Konfidenzintervall für Phenylalanin, Tyrosin, Methionin, den Fisher-Quotienten, den Quotienten Met/Leu+Ile, den Quotienten Leu+Ile/Phe und den Quotienten Val/Phe für die ersten 5 Lebenstage erstellt.

Eine Erklärung für den Abfall einiger Aminosäurekonzentration stellt die Trennung des Neugeborenen vom maternalen-fetalen Kreislauf dar. Für zahlreiche Aminosäuren wurden Carrier Systeme in der Plazenta identifiziert. Der aktive Transport der Aminosäuren durch die Plazenta erfolgt in der microvillösen Membran, von dort diffundieren die meisten Aminosäuren passiv durch die Basalmembran in den fetalen Kreislauf.

Der Transport der Aminosäuren durch die Plazenta ist durch eine Diffusions-Clearance beschränkt, die durch moderate Veränderungen der uterinen Durchblutung unbeeinflusst, jedoch bei extremen Veränderungen gestört ist. Die Carrier Systeme unterscheiden sich in ihrer ph-Sensitivität, wodurch sich die relativen Verhältnisse der transportierten Aminosäuren verändern.

Der in der vorgelegten Arbeit beobachtete Anstieg der Tyrosinkonzentration in den ersten Lebenstagen stimmt mit Beobachtungen von Dickinson et al. (1970) überein.

Bei Chace et al. (1998) wurden 208 Trockenblutproben von Neugeborenen in den ersten 24 Lebensstunden mit TMS untersucht, die zuvor mittels Fluorometrie untersucht wurden. Bei 93 Proben, die initial ein negatives Ergebnis zeigten, liegen die Medianwerte

der Phenylalaninkonzentration und des Phe/Tyr-Quotienten um ca. 10 % niedriger und die Tyrosinkonzentration um ca. 10 % höher als bei den hier vorgelegten Werten (n=46) in den ersten 24 Lebensstunden. Die höheren Werte für Tyrosin bei Chace et al. (1998) könnten durch das Gestationsalter der untersuchten Neugeborenen verursacht sein. In der hier vorliegenden Arbeit korreliert ein abnehmendes Gestationsalter mit erhöhten Tyrosinkonzentrationen, und auch bei Frühgeborenen in der Literatur ist bekannt, dass sie erhöhte Tyrosinwerte aufweisen (Avery et al., 1967, Ghadimi und Pecora, 1964).

Bei initial als falsch-positiv gemessenen Werten (n=91) mittels Fluorometrie liegen die Konzentrationen bei Wiederholung der Bestimmung mit TMS für Phenylalanin über und für Tyrosin unter dem Median der hier vorgelegten Werte, der Phe/Tyr-Quotient stimmt gut überein (Chace et al., 1998).

Die Anzahl der falsch-positiven Ergebnisse der Fluorometrie konnte durch die TMS von 91 auf 1 reduziert werden, alle Patienten mit HPA und PKU wurden durch beide Methoden identifiziert.

#### 4.2.2 Ernährung

Die Einflussgröße Ernährung ergab in der hier vorgelegten Untersuchung, dass bei gestillten Neugeborenen die Konzentrationen von Tyrosin und Leucin+Isoleucin höher und von Methionin, dem Phe/Tyr-Quotienten und dem Fisher-Quotienten niedriger sind, als bei der Ernährung mit einem Energiesupplement zusätzlich zur Muttermilch und der Ernährung mit Säuglingsmilch.

Bei Munro (1972) wird beschrieben, dass die Bedürfnisse Neugeborener an essentiellen Aminosäuren größer sind, als bei Erwachsenen. Obwohl Muttermilch nur ca. 0,8 g/dl reines Protein enthält, besteht dieses hochwertige Protein zu 45 % aus essentiellen Aminosäuren (Imura et al., 1998).

Bei Gaull et al. (1982) wurde bei Müttern mit reifen Neugeborenen gleiche Aminosäurekonzentrationen in der Muttermilch bei Frauen unterschiedlicher ethnischer Herkunft und Ernährung festgestellt.

Bei Rigo et al. (1994) wurden die Aminosäurekonzentrationen im Plasma am 5. Lebenstag von 25 Neugeborenen mit Aminosäureanalyser untersucht, deren Ernährung entweder aus Muttermilch oder Säuglingsmilch bestand. Die klinischen Angaben bezüglich Geburtsgewicht, Gestationsalter und Gewichtsverlust stimmen mit den Kriterien der hier vorgelegten Arbeit überein. Die Aminosäurekonzentrationen von Phenylalanin und Tyrosin in der Säuglingsmilch (Nidal HA, Nestlé) sind ca. 40 % niedriger als in der

Muttermilch. Die Plasmakonzentrationen der Neugeborenen für die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin ergaben signifikant niedrigere Werte bei der Ernährung mit Säuglingsmilch statt der Ernährung mit Muttermilch. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen der vorliegenden Untersuchung überein.

Eine weitere Untersuchung ergab ebenso erniedrigte Tyrosinkonzentrationen bei Neugeborenen in der ersten Lebenswoche, die mit Säuglingsmilch statt mit Muttermilch ernährt wurden (Rigo et al., 1989) und bestätigt damit auch die hier vorgelegten Ergebnisse an einem größeren Kollektiv.

Ein weiterer Einfluss der Ernährung auf die Aminosäurekonzentrationen wurde von Tikanoja et al. beschrieben, der die Plasmakonzentrationen von Aminosäuren postprandial bei Neugeborenen am 5. –7. Lebenstag bestimmt hat, die in Nahrungsgruppen unterteilt waren und entweder nur Muttermilch oder zusätzlich Säuglingsnahrung bekommen hatten. In allen Gruppen zeigte sich ein Anstieg der Plasmakonzentrationen bereits 30 Minuten nach der Mahlzeit. Der Anstieg von Phenylalanin, Tyrosin und Methionin erfolgt in der frühen postprandialen Phase. Am deutlichsten zeigt sich der postprandiale Anstieg bei Leucin (73-145 %), Isoleucin (120-290 %) und Valin (48-65 %) (Tikanoja, 1982). Da in der hier vorgelegten Untersuchung der Zeitpunkt der Probenentnahmen nicht bestimmbar war, können hierzu keine Aussagen gemacht werden.

Bei Bremer et al. (1981) wird beschrieben, dass nach dem 4. Lebenstag die Plasmakonzentrationen der Aminosäuren bei reifen Neugeborenen von der Proteinaufnahme abhängig sind. Ebenso führt eine hohe Proteinaufnahme zu transienten Hyperaminoazidämien, speziell bei Tyrosin und Methionin (Bremer et al., 1981). Dies lag in dem hier vorgelegten Kollektiv sicher nicht vor.

#### 4.2.3 Gewichtsverlust

Es besteht in der hier vorgelegten Untersuchung ein Einfluss des postnatalen Gewichtsverlusts auf die Konzentration des Phe/Tyr-Quotienten, welcher auch in Anbetracht der Einflussgröße Alter bestehen bleibt.

Die physiologische postnatale Gewichtsabnahme bis zu 10 % des Geburtsgewichts resultiert vor allem aus der Flüssigkeitsausscheidung mit Beginn der Diurese. Dadurch erfolgt die Adaptation des Neugeborenen an die trockene extrauterine Umgebung durch Reduktion seines großen Extrazellulärraums. (Bauer et al., 2001). In der hier vorliegenden Untersuchung zeigten alle Kinder eine physiologische Gewichtsabnahme von < 10 % des Geburtsgewichtes, so dass ein „physiologischer Katabolismus“ bestand. Bei Kindern mit Phenylketonurie ist bekannt, dass im Rahmen einer katabolen Stoffwechsellage auch bei guter diätetischer Einstellung der Phenylalaninspiegel im Blut ansteigt.

#### 4.2.4 Geburtsgewicht

Die Einflussgröße Geburtsgewicht korreliert in der vorgelegten Untersuchung mit der Tyrosinkonzentration und dem Phe/Tyr-Quotienten, wobei die Tyrosinkonzentration mit steigendem Geburtsgewicht abfällt und der Phe/Tyr-Quotient mit steigendem Geburtsgewicht ansteigt. Diese Konstellation steht möglicherweise auch in direktem Zusammenhang mit der Einflussgröße Gestationsalter, da Neugeborene mit niedrigem Gestationsalter meist auch ein geringeres Geburtsgewicht aufweisen und somit bei der Untersuchung der Variablen nicht zu trennen sind.

Die Einbeziehung von Geburtsgewicht und Alter in die Untersuchung von Reilly et al. (1998) zeigte auch in kleinem Umfang Auswirkungen auf die Bestimmung der falsch-positiven Ergebnisse. Dies traf mit der Beobachtung zusammen, dass 20 % der falsch-positiven ein Geburtsgewicht < 2500g hatten. Weitere nicht bekannte Variablen scheinen für die verbliebenen falsch-positiven Ergebnisse zu bestehen.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Bremer et al. (1981), der von einem Einfluss der Reife des Neugeborenen auf die postnatale Adaptation der Plasmakonzentrationen in den ersten Lebenswochen ausgeht.

Haymond et al. (1974) beschreibt eine erhöhte Gesamtkonzentration von Aminosäuren bei hypotrophen Neugeborenen (SGA) im Vergleich zu eutrophen Neugeborenen und es finden sich erhöhte Plasmakonzentrationen von Tyrosin bei diesen Neugeborenen. Bei SGA-Kindern mit Hypoglykämie sind auch die Konzentrationen von Tyrosin, Phenylalanin, Valin, Isoleucin und Methionin erhöht. Unterschiedliche Ergebnisse zeigte Reisner et al. (1973), der niedrigere Konzentrationen von Isoleucin und Methionin bei SGA-Kindern feststellte.

Das fetale Geburtsgewicht korreliert positiv mit maternalen Konzentrationen zahlreicher Aminosäuren (Metzger et al., 1980).

#### 4.2.5 Geschlecht

Die Einflussgröße Geschlecht ergab in der vorgelegten Untersuchung am 4. Lebenstag bei Phenylalanin, Tyrosin, Methionin, Valin und Citrullin höhere Konzentration bei Mädchen als bei Jungen, der Phe/Tyr-Quotient unterschied sich am deutlichsten und ergab höhere Werte bei Jungen als bei Mädchen. Ob dies eine geschlechtsspezifische Ursache hat oder auf einer anderen Variablen begründet ist, konnte nicht geklärt werden.

Bislang bestehende Untersuchungen der Literatur beziehen sich auf Schulkinder oder Erwachsene, für Neugeborene oder Säuglinge wurden bislang keine Untersuchungen beschrieben.

Bei Armstrong et al. (1973) wird beschrieben, dass bei Schulkindern (6-18 Jahre) die Leucinkonzentration im Plasma bei Jungen mehr ansteigt, als bei Mädchen, und dass eine positive Korrelation der Plasmakonzentrationen für das Geschlecht bei Citrullin, Methionin und Tyrosin besteht.

Bei Oepen und Oepen (1965) wird beschrieben, dass der Aminosäurespiegel im Serum bei Frauen generell niedriger liegt, als bei Männern. Signifikant niedrigere Werte bestehen für Valin, Isoleucin, Leucin und am deutlichsten für Phenylalanin und Tyrosin.

In der hier vorgelegten Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass auch bei Neugeborenen bereits Unterschiede zwischen Jungen und Mädchen am 4. Lebenstag bestehen. Im Gegensatz zu den Untersuchungen bei Erwachsenen ergaben sich bei Neugeborenen erhöhte Werte der Konzentrationen von Phenylalanin, Tyrosin, Methionin, Valin und Citrullin für Mädchen.

#### 4.2.6 Gestationsalter

Die Einflussgröße Gestationsalter ergab in der hier vorgelegten Untersuchung am 2. Lebenstag abnehmende Tyrosinkonzentrationen und einen zunehmenden Phe/Tyr-Quotienten mit ansteigendem Gestationsalter in einem Normalkollektiv gesunder, reifer (37- 42 Schwangerschaftswoche) Neugeborener.

Die Unreife einiger Enzymsysteme können zu erhöhten Aminosäurekonzentrationen, speziell bei Frühgeborenen aber auch bei Neugeborenen führen.

Die transiente Hypertyrosinämie (OMIM 276500) ist die häufigste Störung des Aminosäurestoffwechsels (Scriver und Rosenberg, 1973). Als Ursache wird die Unreife des Enzyms 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (pHPPD) in Zusammenhang mit einem vermehrten Abbau von Tyrosin vermutet. Die geringe Aktivität der pHPPD beim Fetus und Neugeborenen (Ohisalo et al., 1982, Fellman et al., 1972 ) aufgrund der späten Reifung des Enzyms (Mitchell et al., 2001) sowie die hohen Konzentrationen von 4-Hydroxyphenylpyruvat und dessen Derivate (Scriver und Rosenberg, 1973, Goodwin, 1972) bei Patienten mit transienter Tyrosinämie weisen auf den Mangel an pHPPD als Hauptursache der transienten Tyrosinämie hin.

#### 4.2.7 Pathologischer Phenylalaninverlauf in einer Risikogruppe

Die hier vorgelegte Verlaufsbeobachtung der Konzentrationen von Phenylalanin und Tyrosin sowie des Phe/Tyr-Quotienten in den ersten 48 Lebensstunden bei 6 Neugeborenen mit Risiko für PKU zeigte schon ab der 6. Lebensstunde deutlich erhöhte Phenylalaninwerte und einen stark erhöhten Phe/Tyr-Quotienten bei einem Patienten mit gesicherter PKU (Mutation: R408W/R408W) im Vergleich zum restlichen Untersuchungskollektiv, unabhängig von Beginn oder Art der Ernährung.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Verlaufsbeobachtung eines PKU Patienten von Chace et al. (1998) bei dem ebenfalls ab der 6. Lebensstunde ein erhöhter Phenylalanin-Spiegel und eine noch deutlichere Erhöhung des Phe/Tyr-Quotienten zu beobachten ist.

Liegt sowohl eine Erhöhung der Konzentrationen von Phenylalanin und Tyrosin vor und ist damit kein erhöhter Quotient vorhanden, so handelt es sich meist um eine Leberfunktionsstörung, wie sie z.B. bei einer nicht behandelten Galaktosämie („early onset“) beobachtet wird (Sander und Janzen, 1999).

Liegt den veränderten Konzentrationen der Aminosäuren eine Leberfunktionsstörung oder biliäre Atresie zugrunde, so kann dies mithilfe des Fisher Quotienten (Leucin+Isoleucin+Valin/ Phenylalanin+Tyrosin) nachgewiesen werden. Bei Störungen der Leberfunktion nimmt die Konzentration verzweigtkettiger Aminosäuren (Leucin+Isoleucin und Valin) ab und die Konzentration aromatischer Aminosäuren (Phenylalanin und Tyrosin) nimmt zu. Damit weist ein erniedrigter Fisher Quotient auf eine Leberfunktionsstörung als Ursache der veränderten Aminosäurekonzentrationen hin (Byrd et al., 1993, Kawahara et al., 1999). In dem hier vorgelegten Kollektiv war kein Neugeborenes mit einer Leberfunktionsstörung.

### **4.3 Weitere in der Literatur beschriebene Einflüsse**

#### 4.3.1 Circadianer Rhythmus

Ein Circadianer Rhythmus der Aminosäurekonzentrationen wird sogar schon bei Neugeborenen am ersten Lebenstag ermittelt (Feigin und Haymond, 1970), unabhängig von der Proteinaufnahme. Corticosteroide haben möglicherweise einen Einfluss auf diesen Rhythmus, sind jedoch nicht dafür ursächlich, da dieser auch bei Hypophysektomie und Adrenalektomie bestehen bleibt. Bei viralen oder bakteriellen Infekten, sowie Impfungen wurde bei Kindern und Erwachsenen ein Wechsel des Circadianen Rhythmus beobachtet (Bremer et al., 1981). Bei allen Aminosäuren wurde ein Circadianer Rhythmus

beobachtet, das Ausmaß, sowie die Zeit dieser Fluktuation, wird von der Proteinaufnahme mit beeinflusst (Wurtman et al., 1968).

#### 4.3.2 Genetik

Bei Scriver et al. (1985) wurden die physiologischen Einflüsse auf Plasmakonzentrationen der Aminosäuren bei Erwachsenen untersucht. Berücksichtigt wurden unterschiedliche Zeitpunkte der Probenabnahme, Geschlecht und Ernährung.

Das Geschlecht zeigt einen Einfluss auf die Konzentrationen von Tyrosin und Leucin, die bei Frauen niedrigere sind, als bei Männern. Die hier vorgelegten Werte bei Neugeborenen ergaben dagegen erhöhte Aminosäurekonzentrationen bei Mädchen für Phenylalanin, Tyrosin, Methionin, Valin und Citrullin.

Bei Scriver et al. (1985) ergibt die Fastendauer über Nacht nur für Valin geringer Werte, im Vergleich zu der Gruppe, in der nicht gefastet wurde. Für Isoleucin und Methionin wurden tageszeitliche Schwankungen beobachtet, mit höheren Werten mittags als morgens, ansonsten überraschte die Homeostase der restlichen Aminosäuren zu unterschiedlichen Tageszeiten.

Den größten Einfluss stellen interessanterweise nicht intraindividuelle Unterschiede, wie Ernährung oder Tageszeitpunkt der Probenabnahme dar, sondern die interindividuellen Unterschiede, die im Hinblick auf ein relativ identisches Umfeld, wahrscheinlich durch den Genotyp bestimmt werden, der einen wichtigen Einfluss auf den Phänotyp der Aminosäurekonzentrationen im Plasma darstellt. Zahlreiche Gene sind für die Aufrechterhaltung der Homeostase jeder einzelnen Aminosäuren verantwortlich (Scriver und Rosenberg, 1973) und einige Theorien schreiben die interindividuellen Unterschiede einem genetischem Polymorphismus zu (Harris, 1982). Diese Beobachtungen führen das Thema der biochemischen Individualität von Garrod und Williams fort (Garrod, 1902, Williams, 1963).

#### 4.3.3 Hormone

Verschiedene Hormone haben einen Einfluss auf die Plasmakonzentrationen der Aminosäuren. Das Wachstumshormon, Insulin, Adrenalin und die weiblichen Genitalhormone senken den Aminosäuregehalt im Serum, ACTH, Thyroxin und Nebennierenrindenhormone steigern den Aminosäuregehalt im Serum (Schreier und Plückthun, 1950).

Progesteron ist zwar ein kataboles Hormon, aber die Plasmakonzentrationen der Aminosäuren im maternalen Stoffwechsel nehmen bei steigender Progesteronkonzentration ab, wahrscheinlich aufgrund eines verstärkten Verbrauchs an Aminosäuren in der Leber (Robinson und Prendergast, 1996).

#### **4.4 *Schlußfolgerung***

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die hier untersuchten Einflüsse auf die Aminosäurenkonzentrationen bei gesunden Neugeborenen in den ersten Lebenstagen für die Praxis des Neugeborenen-Screenings zu vernachlässigen sind. Einzige Ausnahme ist der Einfluß des Alters der Kinder, besonders in den ersten 24 - 48 Lebensstunden. Dies hat einen unmittelbaren Einfluß auf die Problematik eines „Frühscreenings“ in den ersten 24 Lebensstunden, nicht nur für die Endokrinopathien, wie Hypothreose und Adrenogenitales Syndrom, sondern auch für das Screening auf Aminoazidopathien.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Durch den Einsatz der Tandem-Massenspektrometrie (TMS) im Neugeborenen-screening ergibt sich die Möglichkeit, das Screening auf metabolische Erkrankungen unter anderem im Bereich des Aminosäurenstoffwechsels zu erweitern. Neben der Phenylketonurie (PKU) können damit auch andere Aminoazidopathien, wie die Ahornsirup-Erkrankung, Hypertyrosinämie und Citrullinämie, diagnostiziert werden. Eine frühzeitige, präsymptomatische Diagnose und Therapie dieser Erkrankungen soll den Behandlungserfolg verbessern und vor allem irreversible Schäden der geistigen Entwicklung und lebensbedrohliche Entgleisungen des Stoffwechsels verhindern. Ein frühzeitiger Beginn der Therapie setzt auch eine frühzeitige Diagnostik voraus, die durch die sensitivere Technik der TMS möglich ist. Die Möglichkeit z.B. Phenylalanin und Tyrosin als Quotienten messen zu können, verbessert die Sensitivität und Spezifität der PKU Diagnostik.

Bislang gibt es noch keine Referenzwerte von quantitativ mittels TMS gemessenen Konzentrationen krankheitsrelevanter Aminosäuren in einem Normalkollektiv gesunder, reifer Neugeborener und deren Abhängigkeit von Alter, Gestationsalter, Geschlecht, Geburtsgewicht, Gewichtsverlust und Ernährung. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Einflüsse dieser Faktoren auf die Aminosäurenkonzentrationen gesunder Neugeborener zu untersuchen und Referenzwerte für ein gesundes Kollektiv zu erstellen.

Weiterhin wurden Konzentrationen von Phenylalanin und Tyrosin und damit des Phe/Tyr-Quotienten in den ersten 48. Lebensstunden von 6 Patienten mit Risiko für PKU (Geschwisterkind mit PKU, Mutter mit PKU und ein Patient mit PKU) gemessen, um Aufschluß über den frühest möglichen Zeitpunkt (zwischen dem 1. und 5. Lebens-tag) der Diagnosestellung PKU mittels TMS zu gewinnen.

Es wurden 2159 Neugeborene untersucht, wovon 1542 Neugeborene folgende Einschlusskriterien erfüllten: Geburtsgewicht  $\geq 2500\text{g} \leq 4500\text{g}$ , Gestationsalter  $\geq 37$  Schwangerschaftswochen  $\leq 42$  Schwangerschaftswochen, postnataler Gewichtsverlust zwischen 0 und  $-10\%$  des Geburtsgewichts, keine stationär behandlungsbedürftigen Neugeborene z.B. aufgrund von Hyperbilirubinämie, Adaptationsstörungen, Infektionen oder anderen Erkrankungen. Bei allen Neugeborenen wurde täglich das Körpergewicht und die Art der Ernährung dokumentiert. Die Art der Ernährung wurde in 3 Gruppen eingeteilt: Muttermilch, Muttermilch + Energiesupplement (Primergen®) und Säuglingsmilch. Die Blutentnahme erfolgte kapillär im Rahmen des Neugeborenen-Screenings entsprechend den Empfehlungen der ständigen Screeningkommission.

Die Konzentrationen folgender Aminosäuren und krankheitsrelevanter Quotienten wurden mittels TMS aus Trockenblut bestimmt: Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr), Phe/Tyr-Quotient, Leucin (Leu) + Isoleucin (Ile), Valin (Val), Methionin (Met), Citrullin (Cit), Fisher-Quotient ( $\text{Leu}+\text{Ile}+\text{Val}/\text{Phe}+\text{Tyr}$ ), Quotient  $\text{Met}/\text{Leu}+\text{Ile}$ , Quotient  $\text{Leu}+\text{Ile}/\text{Phe}$ , Quotient  $\text{Val}/\text{Phe}$ .

Es zeigte sich eine Abhängigkeit verschiedener Aminosäurenkonzentrationen vom Alter. Es ergab sich eine signifikante Zunahme vom 1. bis 5. Lebenstag für Leucin+Isoleucin und Tyrosin und eine signifikante Abnahme für Phenylalanin, Methionin, den Phe/Tyr-Quotient und den Quotient  $\text{Met}/\text{Leu}+\text{Ile}$ . Der Fisher-Quotient, der Quotient  $\text{Val}/\text{Phe}$  und der Quotient  $\text{Leu}+\text{Ile}/\text{Phe}$  zeigen in den ersten drei Lebenstagen einen Anstieg und nehmen dann wieder ab. Die Konzentrationen von Valin und Citrullin im Blut blieben unverändert. Es wurden Referenzbereiche in einem 95 % Konfidenzintervall für Phenylalanin, Tyrosin, Methionin, den Fisher-Quotienten, den Quotienten  $\text{Met}/\text{Leu}+\text{Ile}$ , den Quotienten  $\text{Leu}+\text{Ile}/\text{Phe}$  und den Quotienten  $\text{Val}/\text{Phe}$  für die ersten 5 Lebenstage erstellt.

Der postnatale Gewichtsverlust beeinflusst die Konzentration des Phe/Tyr-Quotienten, der umso höher liegt, je größer der Gewichtsverlust ist.

Die Einflussgröße Ernährung zeigt Tendenzen, dass bei gestillten Neugeborenen die Konzentrationen von Tyrosin und Leucin+Isoleucin höher und von Methionin, dem Phe/Tyr-Quotienten und dem Fisher-Quotienten niedriger sind als bei der Ernährung mit einem Energiesupplement zusätzlich zur Muttermilch und der Ernährung mit Säuglingsmilch.

Die Einflussgröße Geschlecht ergab bei Phenylalanin, Tyrosin, Methionin, Valin und Citrullin höhere Konzentration bei Mädchen als bei Jungen, der Phe/Tyr-Quotient unterschied sich am deutlichsten und ergab höhere Konzentrationen bei Jungen als bei Mädchen. Ob dies eine geschlechtsspezifische Ursache hat oder auf einer anderen Variablen begründet ist, konnte nicht geklärt werden.

Die Einflussgröße Geburtsgewicht korreliert mit der Tyrosinkonzentration und dem Phe/Tyr-Quotienten, wobei die Tyrosinkonzentration mit steigendem Geburtsgewicht abfällt und der Phe/Tyr-Quotient mit steigendem Geburtsgewicht ansteigt.

Die Einflussgröße Gestationsalter ergab abnehmende Tyrosinkonzentrationen und einen zunehmenden Phe/Tyr-Quotienten mit ansteigendem Gestationsalter.

Der Verlauf der Konzentrationen von Phenylalanin und Tyrosin sowie des Phe/Tyr-Quotienten in den ersten 48 Lebenstunden der 6 Neugeborenen mit Risiko für PKU

zeigte schon ab der 6. Lebensstunde deutlich erhöhte Phenylalaninwerte und einen stark erhöhten Phe/Tyr-Quotienten bei einem Patienten mit gesicherter PKU (Mutation: R408W/R408W) im Vergleich zum restlichen Untersuchungskollektiv, unabhängig von Beginn oder Art der Ernährung.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Abnahmezeitpunkt den größten Einfluss auf die Konzentration krankheitsrelevanter Aminosäuren hat und sich deren Konzentration in den ersten 48 Lebensstunden am stärksten ändert. Bemerkenswert ist, dass auch andere Variablen wie Gestationsalter, Geschlecht, Geburtsgewicht, postnataler Gewichtsverlust und Ernährung die Aminosäurenkonzentrationen bei gesunden, reifgeborenen Neugeborenen beeinflussen. Diese Veränderungen sind jedoch für die Praxis des Neugeborenen-Screenings auf Aminoazidopathien sicher vernachlässigbar. Der in einem Fall eines PKU-Kindes dokumentierte kontinuierliche Anstieg des Phenylalanins gleich nach Geburt ist in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten und zeigt, dass für das Neugeborenen-Screening auf PKU eine vorherige Milchfütterung bzw. Stillen nicht notwendig ist.

## 6 ANHANG

### 6.1 Verzeichnis der Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ASS	Argininsuccinat-Synthetase
BCAA	Branch-chain-amino-acid
BCKA-DH	branched-chain-2-keto-acid-dehydrogenase
BH4	Tetrahydrobiopterin
Cit	Citrullin
DGKJ	Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
ESI-MS/MS	Elektrospray- (Ionenspray) mit zwei Massensfiltern
FAH	Fumarylacetoacetat-Hydrolase
Formula	Säuglingsmilch
FR	Fisher Ratio (Leucin+Isoleucin+Valin/ Phenylalanin+Tyrosin)
GG	Geburtsgewicht
HPA	Hyperphenylalaninämie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
KIC	2-Ketoisocapronsäure
KIC	2-Ketoisocapronsäure
Kizi	Kinderzimmer
KS	Kreissaal
Leu+Ile	Leucin+Isoleucin
LT	Lebenstag
MCAD	Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency
Mean	Mittelwert
Met	Methionin
MM	Muttermilch
MPKU	Maternale Phenylketonurie
MSUD	Maple Syrup Urine Disease = Ahornsiruperkrankung
n	Anzahl
NTBC	2-(2-Nitro-4-Trifluormethyl-Benzoyl)-1,3-Cyclohexandion
PAH	Phenylalaninhydroxylase
Phe	Phenylalanin
pHPPD	4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase
PKU	Phenylketonurie
Primergen	Energiesupplement zusätzlich zur Muttermilch
SD	Standardabweichung
SSW	Schwangerschaftswochen
SGGN	Small-for-Gestational-Age Newborns
TAT	Tyrosin-Aminotransferase
TMS	Tandem-Massenspektrometrie
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

## 6.2 Verzeichnis der Abbildungen

ABBILDUNG 1: HISTOGRAMM DES GEBURTSGEWICHTS DER STUDIENPOPULATION....	34
ABBILDUNG 2: GEWICHTSVERLAUF (G) IN DEN ERSTEN 5 LEBENSTAGEN BEI JUNGEN UND MÄDCHEN.....	35
ABBILDUNG 3: HISTOGRAMM DES POSTNATALEN GEWICHTSVERLUST (% GEBURTSGEWICHT).....	35
ABBILDUNG 4: VERLAUF DES POSTNATALEN GEWICHTSVERLUSTS (% GEBURTSGEWICHT) ÜBER DIE ERSTEN FÜNF LEBENSTAGE.....	36
ABBILDUNG 5: VERGLEICH ZWISCHEN DER PHENYLALANINKONZENTRATION IM SERUM (HPLC) UND TROCKENBLUT (TMS) BEI PATIENTEN MIT PHENYLKETONURIE.....	38
ABBILDUNG 6: VERGLEICH ZWISCHEN DER TYROSINKONZENTRATION IM SERUM (HPLC) UND TROCKENBLUT (TMS) BEI PATIENTEN MIT PHENYLKETONURIE.....	38
ABBILDUNG 7: VERGLEICH ZWISCHEN PHE/TYR-QUOTIENT IM SERUM (HPLC) UND TROCKENBLUT (TMS) BEI PATIENTEN MIT PHENYLKETONURIE.....	39
ABBILDUNG 8: PHENYLALANINKONZENTRATION ( $\mu\text{MOL/L}$ ) UND ALTER (1. – 5. LEBENSTAG).....	42
ABBILDUNG 9: ALTERSABHÄNGIGER REFERENZBEREICH DER PHENYLALANINKONZENTRATION.....	42
ABBILDUNG 10: TYROSINKONZENTRATION UND ALTER (1. – 5. LEBENSTAG).....	43
ABBILDUNG 11: : ALTERSABHÄNGIGER REFERENZBEREICH DER TYROSINKONZENTRATION.....	43
ABBILDUNG 12: PHE/TYR QUOTIENT UND ALTER (1. – 5. LEBENSTAG).....	44
ABBILDUNG 13: FISHER QUOTIENT UND ALTER (1. – 5. LEBENSTAG).....	45
ABBILDUNG 14: ALTERSABHÄNGIGER REFERENZBEREICH DES FISHER QUOTIENTEN.....	45
ABBILDUNG 15: METHIONINKONZENTRATION UND ALTER (1. – 5. LEBENSTAG).....	46
ABBILDUNG 16: ALTERSABHÄNGIGER REFERENZBEREICH DER METHIONINKONZENTRATION.....	46
ABBILDUNG 17: LEUCIN+ISOLEUCINKONZENTRATION UND ALTER (1. – 5. LEBENSTAG).....	47
ABBILDUNG 18: CITRULLINKONZENTRATION UND ALTER (1. – 5. LEBENSTAG).....	48
ABBILDUNG 19: VALINKONZENTRATION UND ALTER (1. – 5 LEBENSTAG).....	48
ABBILDUNG 20: QUOTIENT METHIONIN/LEUCIN+ISOLEUCIN UND ALTER (1. – 5 LEBENSTAG).....	49
ABBILDUNG 21: ALTERSABHÄNGIGER REFERENZBEREICH DES QUOTIENTEN.....	49
ABBILDUNG 23: QUOTIENT LEUCIN+ISOLEUCIN/ PHENYLALANIN UND ALTER (1. – 5. LEBENSTAG).....	50
ABBILDUNG 24: QUOTIENT VALIN/PHENYLALANIN UND ALTER (1. – 5. LEBENSTAG).....	51
ABBILDUNG 25: ALTERSABHÄNGIGER REFERENZBEREICH DES QUOTIENTEN VALIN/PHENYLALANIN.....	51
ABBILDUNG 26: PHENYLALANINKONZENTRATION BEI MÄDCHEN UND JUNGEN AM 4. LEBENSTAG (N = 447).....	52
ABBILDUNG 27: TYROSINKONZENTRATION BEI MÄDCHEN UND JUNGEN AM 4. LEBENSTAG (N = 447).....	53
ABBILDUNG 28: PHE/TYR-QUOTIENT BEI MÄDCHEN UND JUNGEN AM 4. LEBENSTAG (N = 447).....	53
ABBILDUNG 29: METHIONINKONZENTRATION BEI MÄDCHEN UND JUNGEN AM 4. LEBENSTAG (N = 447).....	54
ABBILDUNG 30: CITRULLINKONZENTRATION BEI MÄDCHEN UND JUNGEN AM 4. LEBENSTAG (N = 447).....	55
ABBILDUNG 31: VALINKONZENTRATION BEI MÄDCHEN UND JUNGEN AM 4. LEBENSTAG (N = 447).....	55

---

ABBILDUNG 32: TYROSINKONZENTRATION UND GESTATIONSALTER AM 2. LEBENSTAG (N = 78).....	56
ABBILDUNG 33: PHE/TYR-QUOTIENT UND GESTATIONSALTER.....	57
ABBILDUNG 34: ABHÄNGIGKEIT ZWISCHEN PHENYLALANINKONZENTRATION UND ERNÄHRUNG.....	59
ABBILDUNG 35: ABHÄNGIGKEIT ZWISCHEN TYROSINKONZENTRATION UND ERNÄHRUNG.....	59
ABBILDUNG 36: ABHÄNGIGKEIT ZWISCHEN PHE/TYR-QUOTIENT UND ERNÄHRUNG.....	60
ABBILDUNG 37: ABHÄNGIGKEIT ZWISCHEN METHIONINKONZENTRATION UND ERNÄHRUNG.....	60
ABBILDUNG 38: ABHÄNGIGKEIT DER VALINKONZENTRATION VON DER ERNÄHRUNG.....	61
ABBILDUNG 39: ABHÄNGIGKEIT ZWISCHEN FISHER-QUOTIENT UND ERNÄHRUNG.....	61
ABBILDUNG 40: ABHÄNGIGKEIT ZWISCHEN LEUCIN+ISOLEUCINKONZENTRATION UND ERNÄHRUNG.....	62
ABBILDUNG 41: ABHÄNGIGKEIT ZWISCHEN CITRULLINKONZENTRATION UND ERNÄHRUNG.....	62
ABBILDUNG 42: VERLAUF DER PHENYLALANINKONZENTRATION IN DEN ERSTEN 48 LEBENSSTUNDEN BEI 6 NEUGEBORENEN (ZEITPUNKT GEBURT (0H) IM NABELSCHNURBLUT GEMESSEN).....	63
ABBILDUNG 43: VERLAUF DER TYROSINKONZENTRATION IN DEN ERSTEN 48 LEBENSSTUNDEN BEI 6 NEUGEBORENEN MIT RISIKO FÜR PHENYLKETONURIE.....	63
ABBILDUNG 44: VERLAUF DES PHE/TYR-QUOTIENT IN DEN ERSTEN 48 LEBENSSTUNDEN BEI 6 NEUGEBORENEN MIT RISIKO FÜR PHENYLKETONURIE.....	64

### 6.3 Verzeichnis der Tabellen

TABELLE 1: KENNDATEN DES UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIVS.....	34
TABELLE 2: EINTEILUNG DER NEUGEBORENEN IN GRUPPEN ENTSPRECHEND DER ERNÄHRUNG IN DEN ERSTEN FÜNF LEBENSTAGEN.....	36
TABELLE 3: MITTELWERT $\pm$ EINFACHE STANDARDABWEICHUNG (SD), MEDIAN UND QUANTILE DER AMINOSÄUREKONZENTRATIONEN VON 1542 PROBEN IN DEN ERSTEN FÜNF LEBENSTAGEN.....	37
TABELLE 4: VERLAUF DER AMINOSÄUREKONZENTRATION ( $\mu$ MOL/L) IN DEN ERSTEN FÜNF LEBENSTAGEN.....	40
TABELLE 5: VERLAUF DER QUOTIENTEN DER AMINOSÄUREN IN DEN ERSTEN FÜNF LEBENSTAGEN.....	41
TABELLE 6: ABHÄNGIGKEIT DER AMINOSÄURENKONZENTRATION VON DER ERNÄHRUNG.....	58

## 6.4 Vergleich der Aminosäurekonzentrationen

### 6.4.1 Eigene Daten

Probenanzahl	n = 1542						
Probenmaterial	Trockenblut						
Methode	TMS						
	Arithmeti- sches Mittel $\pm$ SD	Median	10 %- Quantil	90 %- Quantil	97,5 %- Quantil	99,5 %- Quantil	Bereich
	[ $\mu\text{mol/l}$ ]						
Aminosäuren							
Phenylalanin	63 $\pm$ 15	62	46	82	97	118	28-182
Tyrosin	99 $\pm$ 41	91	56	149	192	293	26-408
Leucin+Isoleucin	196 $\pm$ 51	189	139	258	320	392	81-549
Valin	185 $\pm$ 66	170	123	257	368	495	58 - 683
Methionin	26 $\pm$ 9	25	16	36	43	57	5 - 102
Citrullin	12 $\pm$ 6	11	6	19	27	42	1,0 - 71
Phe/Tyr-Quotient	0,72 $\pm$ 0,25	0,68	0,43	1,04	1,29	1,56	0,20 - 1,90
Fisher-Quotient	2,52 $\pm$ 0,97	2,31	1,66	3,57	5,4	6,81	0,89-12,56
Quotient Met/Leu+Ile	0,14 $\pm$ 0,05	0,13	0,084	0,2	0,24	0,31	0,016-0,54
Quotient Leu+Ile/Phe	3,22 $\pm$ 1	3,02	2,26	4,37	6,02	8	1,17-10,64
Quotient Val/Phe	3,05 $\pm$ 1,37	2,72	1,98	4,38	6,95	9,89	1,08-18,46

## 6.4.2 Sander et al. (2000)

Probenanzahl	n = 14 000			
Probenmaterial	Trockenblut			
Methode	TMS			
	Arithmetisches Mittel	Median	95. Perzentile	99. Perzentile
	$\mu\text{mol/l}$ (mg/dl)			
<b>Aminosäuren</b>				
Phenylalanin	44,2 (0,73)	43,6 (0,72)		72,7 (1,20)
Tyrosin	67,4 (1,22)	62,4 (1,13)		150,8 (2,73)
Leucin+Isoleucin	166,4 (2,18)	161,1 (2,11)		285,5 (3,74)
Valin	130,8 (1,53)	127,4 (1,49)		221,4 (2,59)
Methionin	22,8 (0,34)	22,2 (0,33)		41,6 (0,62)
Citrullin	13,7 (0,24)	12,6 (0,22)		28 (0,49)
Phe/Tyr-Quotient	0,66		1,07	
Fisher-Quotient				
Quotient Met/Leu+Ile				
Quotient Leu+Ile/Phe				
Quotient Val/Phe				

## 6.4.3 Schulze et al. (1999)

Probenanzahl	n = 3000	
Probenmaterial	Trockenblut	
Methode	TMS	
	Median	99,5 Perzentile
	µmol/l	
Aminosäuren		
Phenylalanin	76	<133
Tyrosin	76	<251
Leucin+Isoleucin		
Valin		
Methionin		
Citrullin		
Phe/Tyr-Quotient	1	<2,68
Fisher-Quotient		
Quotient Met/Leu+Ile		
Quotient Leu+Ile/Phe		
Quotient Val/Phe		

## 6.4.4 Reilly et al. (1998)

Probenanzahl	n = 493	
Probenmaterial	Trockenblut	
Methode	HPLC	
	Median	Bereich $\pm$ 2 SD
	$\mu\text{mol/l}$	
Aminosäuren		
Phenylalanin	93	57-151
Tyrosin		72-254
Leucin+Isoleucin		Ile: 27-84, Leu: 84-259
Valin		108-305
Methionin		16-55
Citrullin		
Phe/Tyr-Quotient		0,41-1,14
Fisher-Quotient		
Quotient Met/Leu+Ile		
Quotient Leu+Ile/Phe		
Quotient Val/Phe		

## 6.4.5 Pohlandt (1978)

Probenanzahl	n = 40			
Probenmaterial	Plasma			
Methode	HPLC			
	Median	Bereich $\pm$ 2 SD	10. Perzentile	90. Perzentile
	$\mu\text{mol/l}$			
Aminosäuren				
Phenylalanin	41	16-71	23	63
Tyrosin	72	32-128	45	117
Leucin+Isoleucin	Ile: 49, Leu: 103	Ile: 27-80, Leu: 61-183	Ile: 32, Leu: 73	Ile: 71, Leu: 160
Valin	153	78-142	108	184
Methionin	20	6,3-36	13	29
Citrullin	13	3,4-34	5,8	20
Phe/Tyr-Quotient	0,57	0,5-0,55	0,51	0,54
Fisher-Quotient Quotient Met/Leu+Ile				
Quotient Leu+Ile/Phe				
Quotient Val/Phe				

## 6.4.6 Chace et al. (1995, 1996, 1997)

Jahr	1995	1996	1998
Probenanzahl	n = 1096 (Leu+Ile) n = 791 (Val)	n = 909	n = 93
Probenmaterial	Trockenblut	Trockenblut	Trockenblut
Methode	TMS	TMS	TMS
	Mittelwert $\pm$ SD $\mu\text{mol/l}$	Mittelwert $\pm$ SD $\mu\text{mol/l}$	Median $\mu\text{mol/l}$
Aminosäuren			
Phenylalanin			68
Tyrosin			97
Leucin+Isoleucin	151 $\pm$ 47		
Valin	131 $\pm$ 58		
Methionin		19 $\pm$ 8,3	
Citrullin			
Phe/Tyr-Quotient			0,73
Fisher-Quotient			
Quotient Met/Leu+Ile		0,16 $\pm$ 0,04	
Quotient Leu+Ile/Phe	2,5 $\pm$ 0,49		
Quotient Val/Phe	2,18 $\pm$ 0,51		

## 6.5 Hinweise zur Statistik

6.5.1 Modell für altersabhängige Referenzbereiche der Aminosäurenkonzentrationen (AS)

$$-\ln \left( \frac{e^{-\left( \frac{\log(AS) - (\text{mean0} + \text{mean1} \times \text{Alter})^2}{\text{SD0} + \text{SD1} \times \text{Alter}} \right)^2}}{\sqrt{3,1415 \times 2 \times (\text{SD0} + \text{SD1} \times \text{Alter})}} \right)$$

## 6.5.2 Erläuterungen zur Darstellung der Ergebnisse

### 6.5.2.1 Means Diamonds (In den Abbildungen grün dargestellt)

„Means Diamonds“ stellen den Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwerts für jede untersuchte Gruppe dar. Die horizontale Linie durch jeden „Diamond“ zeigt den Mittelwert der Gruppe. Die Höhe des „Diamond“ repräsentiert das 95%-Konfidenzintervall des Standardfehlers des Mittelwerts jeder Gruppe und die Breite des „Diamond“ stellt die Probenanzahl der untersuchten Gruppe dar.

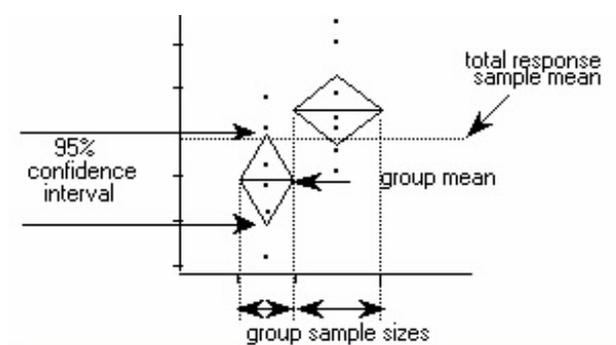


Abbildung aus JMP 3.2.2

### 6.5.2.2 Quantil Box Plot (In den Abbildungen rot dargestellt)

Die horizontale Linie innerhalb der Box stellt den Median der untersuchten Gruppe dar, die obere und untere Begrenzung der Box die 25. und 75. Perzentile. Die Linien oberhalb und unterhalb der Box zeigen das 10%- und 90%-Quantil.

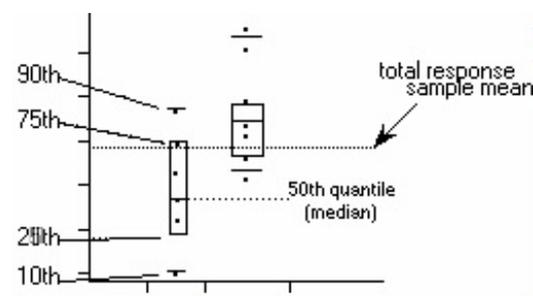


Abbildung aus JMP 3.2.2

## **6.6 Aufklärungsschrift zum Erweiterten Neugeborenen-Screening**

### **Neugeborenen-Screening: ELTERNINFORMATION**

Das Neugeborenen-Screening ist eine Blutuntersuchung, die in ganz Deutschland bei allen Neugeborenen durchgeführt wird.

#### **Warum wird bei meinem Kind ein Bluttest durchgeführt?**

Es soll gewährleistet werden, daß Ihr Kind so gesund wie möglich aufwächst. Ein einfacher Bluttest informiert über die Gesundheit Ihres Kindes. Er ist Teil des sogenannten Neugeborenen-Screenings. Hierunter versteht man eine Untersuchung bei allen Neugeborenen, um seltene angeborene Erkrankungen frühzeitig erkennen zu können, d.h. noch bevor gesundheitliche Beschwerden und Schädigungen auftreten (s.u.). Durch die frühzeitige Diagnostik und Behandlung können ansonsten schwer verlaufende Krankheiten geheilt oder in Ihrem Verlauf günstig beeinflusst werden.

#### **Ist das Neugeborenen-Screening neu?**

Nein. Das Neugeborenen-Screening wurde 1968 durch Prof. H. Bickel in Deutschland als auch in anderen Industrieländern eingeführt. Bis jetzt allerdings war diese Screeninguntersuchung auf die Erkennung von 2 - 3 Erkrankungen beschränkt. Bislang wurde bei allen Kindern die Phenylketonurie (eine Eiweißstoffwechselerkrankung) und die angeborene Unterfunktion der Schilddrüse getestet. Neue Methoden erlauben es jetzt, zahlreiche weitere Erkrankungen testen zu können.

#### **Wie verlaufen diese Erkrankungen?**

Manche dieser Erkrankungen haben einen sehr schweren, andere einen kaum erkennbaren schleichenden Verlauf. Einige Erkrankungen verursachen eine schwere Störung der kindlichen Entwicklung.

#### **Aber mein Kind ist völlig gesund! Sind diese Tests überhaupt notwendig?**

Ja, sie sind es. Die meisten Kinder zeigen in den ersten Tagen, manchmal auch in den ersten Wochen und Monaten überhaupt keine gesundheitlichen Beschwerden. Trotzdem kommt es durch krankmachende Stoffwechselprodukte zu schwerwiegenden Schäden. Diese Stoffwechselprodukte werden mit modernen Methoden durch den Bluttest sichtbar gemacht. Unter der Mitwirkung spezialisierter Ärzte weiß Ihr Kinderarzt oder Hausarzt, wie man in einem solchen Fall Ihrem Kind helfen kann. Meistens kann behandelt werden, bevor es zu schweren Schäden kommt.

#### **Aber in unserer Familie ist nie eine Stoffwechselerkrankung aufgetreten!**

Die Erkrankungen, um die es hier geht, sind sehr selten. Auch Ihr Kind wird mit größter Wahrscheinlichkeit ganz gesund sein. Allerdings kommen die wenigen Kinder mit dieser Erkrankung fast immer aus ganz gesunden Familien. Das Ziel dieses Vorsorgeprogramms ist es, diese Kinder früher zu erkennen und zu behandeln.

#### **Wie wird der Test bei meinem Kind durchgeführt?**

Alle Teste können aus ein paar Blutropfen durchgeführt werden, die wie bisher durch einen kleinen Stich in die Ferse gewonnen werden. Durch die jetzt neu hinzugekommenen Teste wird Ihr Kind nicht **mehr** belastet als früher.

### **Werde ich über das normale Testergebnis informiert?**

Normalerweise werden Sie nicht benachrichtigt, wenn alle Testergebnisse unauffällig sind. Bei allen Kindern werden jedoch die Ergebnisse dem Krankenhaus mitgeteilt. Der für das Kinderzimmer zuständige Arzt kontrolliert die korrekte Rückmeldung. Wenn Sie irgendwelche Fragen haben, können Sie die Nummer 2003324 anrufen.

Wenn auch in diesem Fall „keine Nachricht“ eine gute Nachricht ist, müssen Sie wissen, daß dieser Test nicht alle überhaupt möglichen Erkrankungen erkennt und nicht zu 100 % gewährleistet, daß alle untersuchten Erkrankungen auch immer gefunden werden. Aus diesem Grunde empfehlen wir, auf alle Fälle regelmäßig die Vorsorgeuntersuchung (gelbes Heft!) bei Ihrem Kind durchführen zu lassen.

### **Bedeutet eine erneute Testung, daß mein Kind eine dieser seltenen Erkrankungen hat?**

Nicht unbedingt. Sollten Sie zu Hause einen Anruf für einen Wiederholungstest erhalten, kann dies verschiedene Gründe haben. Die häufigste Ursache für einen Wiederholungstest ist, daß das Testergebnis nicht eindeutig ist. Ein 2. Test ist dann notwendig. In sehr seltenen Fällen kann es jedoch sein, daß aufgrund des Testergebnisses Ihr Arzt sofort auf eine Behandlung drängt, selbst wenn die Bestätigung durch den 2. Test noch nicht vorliegt.

### **Was ist, wenn mein Kind eine dieser seltenen Erkrankungen hat, kann es dann geheilt werden?**

Da die meisten dieser Erkrankungen angeborene chemische Probleme im Stoffwechsel verursachen, können sie nicht „geheilt“ werden, so wie die Augenfarbe auch nicht verändert werden kann. Eine Behandlung mit einer speziellen Diät oder auch mit Medikamenten kann jedoch in den meisten Fällen schwerwiegende Folgen vermeiden oder gar völlig verhindern.

### **Wenn mein Kind eine solche seltene Erkrankung hat, werden nachfolgende Kinder die gleiche Erkrankung haben?**

Zur Beantwortung dieser Frage ist eine sehr persönliche Beratung notwendig. Diese Beratung erfolgt in einer humangenetischen Beratungsstelle, Ihr Hausarzt bzw. Kinderarzt wird Sie hierüber weiter informieren und Sie ggf an eine solche Stelle überweisen.

### **Wie kann ich meinen Arzt unterstützen, meinem Kind zu helfen?**

Bitte hinterlassen Sie Ihre Telefonnummer, über die Sie zuhause rasch erreichbar sind. Haben Sie kein eigenes Telefon, geben Sie die Nummer eines Verwandten oder Nachbarn an, wo wir Sie erreichen können. Denken Sie bitte daran, daß es sehr wichtig ist, Ihrem Kind schnell zu helfen, wenn eine solche seltene Erkrankung vorliegt. Mit Ihrer Kooperation helfen Sie, daß eine neue Generation von Kindern gesund heranwachsen kann.

**Prof. Dr. med. F.K. Trefz**  
Chefarzt Kinderklinik

**Prof. Dr. med. S. Kunz**  
Chefarzt Frauenklinik

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Al-Aqeel, A., Ozand, P.T., Gascon, G., Hughes, H., Reynolds, C.T., Subramanyan, S.B. (1992)

Response of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency to tetrahydrobiopterin  
J.Child.Neurol, 7, 26

American Academy of Pediatrics, (1976)

Committee on Nutrition: special diets for infants with inborn errors of amino acid metabolism  
Pediatrics, 57(5), 783- 92

American Academy of Pediatrics Committee on Genetics, (1982)

New issues in newborn screening for phenylketonuria and congenital hypothyroidism  
Pediatrics, 69,104

Armstrong, M.D., Stave, U. (1973)

A study of plasma free amino acid levels. II. Normal values for children and adults  
Metabolism, 22(4), 561-569

Avery, M.E., Clow, C.L., Menkes, J.H., Ramos, A., Scriver, C.R., Stern, L., Wassermann, B.P. (1967)

Transient tyrosinemia of the newborn: Dietary and clinical aspects  
Pediatrics, 39, 378

Balato, N., Cusano, F., Lembo, G., Santoianni, P. (1986)

Tyrosinemia type II in two cases previously reported as Richner-Hanhart syndrome  
Dermatologica, 173, 66

Ballard, R.A., Vinocur, B., Reynolds, J.W. (1978)

Transient hyperammonemia of the preterm infant  
New. Engl. J. Med, 299, 920

Barclay, A., Walton, O. (1988)

Phenylketonuria: implications of initial serum phenylalanine levels on cognitive development  
Psychol. Rep, 63, 135-142

Bartlett, K., Eaton, S.J., Pourfarzam, M. (1997)

New developments in neonatal screening  
Arch. Dis. Child, 77, 151-154

Basile-Filho, A., el-Khoury, A.E., Beaumier, L., Wang, S.Y., Young, V.R. (1997)

Continuous 24-h L-[1-13C]phenylalanine and L-[3,3-2H2]tyrosine oral-tracer studies at an intermediate phenylalanine intake to estimate requirements in adults  
Am. J. Clin. Nutr, 65(2), 473-88

- Bauer, K., Groneck, P., Speer, C.P. (2001)  
Neonatologie, 156-238  
In: Speer, C.P., Gahr, M. : Pädiatrie  
1.Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg
- Bauman, M.L., Kemper, T.L. (1982)  
Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria Acta. Neuropathol, 58, 55-63
- Berger, R., Smit, G.P., Stoker-de, Vries S.A., Duran, M., Ketting, D., Wadman, S.K. (1981)  
Deficiency of fumarylacetoacetase in a patient with hereditary tyrosinemia  
Clin. Chim. Acta, 114, 37
- Bergeron, P., Laberge, C., Grenier, A. (1974)  
Hereditary tyrosinemia in the province of Quebec: Prevalence at birth and geographic distribution  
Clin. Genet, 5, 157
- Berry, G.T., Heidenreich, R., Kaplan, P., Levine, F., Mazur, A., Palmieri, M.J., Yudkoff, M., Segal, S. (1991)  
Branched-chain amino acid-free parenteral nutrition in the treatment of acute metabolic decompensation in patients with maple syrup urine disease  
N. Engl. J. Med, 324, 175-9
- Bickel, H., Gerrard, J., Hickmans, E.M. (1953)  
Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria  
Lancet, 17(2), 812-3
- Bickel, H., Gerrard, J., Hickmans E.M. (1954)  
The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenylketonuric child  
Acta Paediatrica, 43, 64-77
- Binder, J., Johnson, C.F., Saboe, B., Krug-Wispe, S. (1979)  
Delayed elevation of serum phenylalanine level in a breast-fed child  
Pediatrics, 63, 334-6
- Blau, N., Thöny, B., Spada M., Ponzzone, A. (1996)  
Tetrahydrobiopterin and inherited hyperphenylalaninemias  
Turk. J. Pediatr, 38, 19
- Blau, N., Thöny, B., Cotton, R.G.H., Hyland, K. (2001)  
Disorders of Tetrahydrobiopterin and Related Biogenic Amines, 1725-1776  
In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Valle, D., Sly, W.: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease;  
8.Aufl., Volume II, Mc Graw Hill, New York

- Bremer, H.J., Duran, M., Kamerling, J.P., Przyrembel, H., Wadman, S.K. (1981)  
Normal values. Urine, 185-7  
In: Disturbances of amino acids metabolism clinical chemistry and diagnosis;  
Baltimore, Urban and Schwarzenberg
- Brenton, D.P., Haseler, M.E. (1990)  
Maternal phenylketonuria, 175  
In: Fernandes, J., Saudubray, J.-M., Tada, K.: Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and  
Treatment;  
Berlin, Springer Verlag
- Byrd, D.J., Wiltfang, A., Rodeck, B., Latta, A., Burdelski, M., Brodehl, J. (1993)  
The plasma amino acid profile and its relationships to standard quantities of liver func-  
tion in infants and children with extrahepatic biliary atresia and preterminal liver cirrho-  
sis  
Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem, 31, 197-204
- Camitta, B.M. (1996)  
The anemias, 1378-1380  
In: Behrman, R.E., Kliegmann, R.M., Arvin, A.M.: Textbook of pediatrics;  
15th edn, Saunders, Philadelphia
- Centers for disease control, U.S. department of health and human services, (1998)  
Newborn screening. Quality assurance programm, summary report  
15 Atlanta, GA, 30341
- Cerone, R., Holme, E., Schiaffino, M.C., Caruso, U., Maritano, L., Romano, C. (1997)  
Tyrosinemia type III: Diagnosis and ten-year follow-up  
Acta. Paediatr, 86, 1013
- Chace, D.H., Millington, D.S., Terada, N, Kahler, S.G., Roe, C.R., Hofman, L.F. (1993)  
Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyro-  
sine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry  
Clin. Chem, 39(1), 66-71
- Chace, D.H., Hillman, S.L., Millington, D.S., Kahler, S.G., Roe, C.R., Naylor, E.W.  
(1995)  
Rapid diagnosis of maple syrup urine disease in blood spots from newborns by tandem  
mass spectrometry  
Clin. Chem, 41(1), 62-68

Chace, D.H., Hillman, S.L., Millington, D.S., Kahler, S.G., Adam, B.W., Levy, H.L. (1996)

Rapid diagnosis of homocystinuria and other hypermethioninemias from newborns' blood spots by tandem mass spectrometry

Clin. Chem, 42(3), 349-355

Chace D.H., Hillman, S.L., Van Hove, J.L.K., Naylor, E.W. (1997)

Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry

Clin. Chem, 43, 2106-2113

Chace, D.H., Sherwin, J.E., Hillman, S.L., Lorey, F., Cunningham, G.C. (1998)

Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours

Clin. Chem, 44,12, 2405-2409

Chace, D.H., Adam, B.W., Smith S.J, Alexander, J.R., Hillman, S.L., Hannon, W.H. (1999a)

Validation of accuracy-based amino acid reference material in dried-blood spots by tandem mass spectrometry for newborn screening assays

Clin. Chem, 45,1269-1277

Chace, D.H., DiPerna, J.C., Naylor, E.W. (1999b)

Laboratory integration and utilization of tandem mass spectrometry in neonatal screening: a model for clinical mass spectrometry in the next millennium

Acta Paediatr. Suppl, 432,45-7

Chitayat, D., Balbul, A., Hani, V., Mamer, O.A., Clow, C., Scriver, C.R. (1992)

Hereditary tyrosinaemia type II in a consanguineous Ashkenazi Jewish family: Intrafamilial variation in phenotype; absence of parental phenotype effects on the fetus

J. Inherit. Metab. Dis, 15,198

Chuang, D.T., Shih, V.E. (2001)

Maple Syrup Urine Disease (Branched-Chain Ketoaciduria), 1971-2005

In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease

Volume 2, 8th ed. New York, St. Louis, San Francisco, Auckland, Bogotá, Caracas, Lisbon, Madrid, Mexico City, Milan, Montreal, New Delhi, San Juan, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto, McGraw-Hill

Clark, B.J., Cockburn, F. (1991)

Management of inborn errors of metabolism during pregnancy

Acta. Paediatr. Scand. Suppl, 373, 43

Colditz, P.B., Yu, J.S., Billson, F.A., Rogers, M., Moolloy, H.F., O'Halloran, M., Wilcken, B. (1984)  
Tyrosinaemia II  
Med. J. Aust, 141, 244

De Braekeleer, M., Larochelle, J. (1990)  
Genetic epidemiology of hereditary tyrosinemia in Quebec and in Saguenay-Lac-St-Jean  
Am. J. Hum. Genet, 47, 302

Department of Health and Social Security, Welsh Office, (1969)  
Screening for early detection of phenylketonuria  
London: DHSS, HM 69,72

Dhondt, J.L. (1991)  
Strategy for the screening of tetrahydrobiopterin deficiency among hyperphenylalaninaemic patients: 15-years experience  
J. Inherited. Metab. Dis, 14, 117

Dickinson, J.C., Rosenblum, H., Hamilton, P.B. (1970)  
Ionexchange chromatography of the free amino acids in the plasma of infants under 2,500 gm at birth  
Pediatrics, 45, 606-613

Donn, S.M., Wilson, G.N. and Thoene, J.G. (1984)  
Prevention of neonatal hyperammonemia in citrullinemia  
Clin. Res, 32, 806A

Dougherty, F.E., Levy, H.L. (1999)  
Present newborn screening for phenylketonuria, 144-149  
In: Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews Phenylketonuria Wiley & Sons, New York, Vol.5

Drogari, E., Smith, I., Beasley, M., Lloyd, J.K. (1987)  
Timing of strict diet in relation to fetal damage in maternal phenylketonuria An International collaborative study by the MCR/DHSS Phenylketonuria Register  
Lancet, 2, 927

Dunnett, C.W. (1955)  
A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control  
Journal of the American Statistical Association, Vol.50, 1096-1121

Duran, M., Tielens, A.G., Wadman, S.K., Stigter, J.C., Kleijer, W.J. (1978)  
Effects of thiamine in a patient with a variant form of branched-chain ketoaciduria  
Acta Paediatr. Scand, 67, 367-72

- Efron, M.L., Young, D., Moser, H.W. (1964)  
A simple chromatographic screening test for the detection of disorders of amino acid metabolism  
N. Engl. J. Med, 270,1378-1383
- Ellaway, C.J., Holme, E., Standing, S., Preece, M.A., Green, A., Ploechl, E., Ugarte, M., Trefz, F.K., Leonard, J.V. (2001)  
Outcome of Tyrosinaemia Type III  
J. Inherit. Metab. Dis, 24, 824-32
- Endo, F., Kitano, A., Uehara, I., Nagata, N., Matsuda, I., Shinka, T., Kuhara, T., Matsumoto, I. (1983)  
Four-hydroxyphenylpyruvic acid oxidase deficiency with normal fumarylacetoacetase: A new variant form of hereditary hypertyrosinemia  
Pediatr. Res, 17, 92
- Estivill, E., Sanmarti, F.X., Vidal, R., Alvira, R., Lizarraga, I., Linares, J. (1985)  
Comb-like rhythm: an EEG pattern peculiar to leucinosis  
An. Esp. Pediatr, 22, 123-7
- Fällström, S.-P., Lindblad, B., Lindstedt, S., Steen G. (1979)  
Hereditary tyrosinemia-fumarylacetoacetase deficiency  
Pediatr. Res, 13, 78
- Feigin, R.D., Haymond, M.W. (1970)  
Circadian periodicity of blood amino acids in the neonate  
Pediatrics, 45,782-91
- Fellman, J.H., Fujita, T.S., Roth, E.S. (1972)  
Assay, properties and tissue distribution of p-hydroxyphenylpyruvate hydroxylase  
Biochim. Biophys. Acta, 284, 90
- Fishler, K., Azen, C.G., Henderson, R., Friedman, E.G., Koch, R. (1987)  
Psychoeducational findings among children treated for phenylketonuria  
Am. J. Ment. Defic, 92(1), 65-73
- Folling, A. (1934)  
Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechsellanomalie in Verbindung mit Imbezillitat  
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem,277,169-79
- Francis, D.E.M., Kirby, D.M., Thompson, G.N. (1992)  
Maternal tyrosinaemia II: Management and successful outcome  
Eur. J. Pediatr, 151, 196

- Friedman, P.A., Kaufman, S. (1971)  
A study of the development of phenylalanine hydroxylase in fetuses of several mammalian species  
Arch. Biochem. Biophys, 146, 321
- Garrod, A.E. (1902)  
The incidence of alkaptonuria. A study in chemical individuality  
Lancet, 2, 1616-1620
- Gaull, G., Sturman, J.A., Raiha, N.C.R. (1972)  
Development of mammalian sulfur metabolism: absence of cystathionase in human fetal tissues  
Pediatr. Res, 6, 538
- Gaull, G.E., Jensen, R.G., Rassin, D.K, Mallory, M.H. (1982)  
Human milk as food, 120  
In: Milunsky, Friedman, Gluck Advances in perinatal medicine  
New York: Plenum, 47
- Ghadimi, H., Pecora, P. (1964)  
Plasma amino acids after birth  
Pediatrics, 34,182-191
- Giardini, O., Cantani, A., Kennaway, N.G., D'Eufemia, P. (1983)  
Chronic tyrosinemia associated with 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase deficiency with acute intermittent ataxia and without visceral and bone involvement  
Pediatr. Res, 27, 25
- Goedde, H.W., Langenbeck, U., Brackertz, D., Keller, W., Rokkones, T., Halvorsen, S., Kiil, R., Merton, B. (1970)  
Clinical and biochemical-genetic aspects of intermittent branched-chain ketoaciduria. Report of two Scandinavian families  
Acta Paediatr. Scand, 59, 83-7
- Goldsmith, L.A. (1983)  
Tyrosinemia and related disorders, 287  
In: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S.:  
The Metabolic Basis of Inherited Disease;  
5th ed, New York, McGraw-Hill
- Goodwin, B.L. (1972)  
Tyrosine Catabolism. The Biological, Physiological, and Clinical Significance of p-Hydroxyphenylpyruvate Oxidase  
Oxford, England, Oxford University Press

- Gray, R.G., Patrick, A.D., Preston, F.E., Whitfield, M.F. (1981)  
Acute hereditary tyrosinaemia type I: Clinical, biochemical and haematological studies in twins  
*J. Inherit. Metab. Dis*, 4, 37
- Guthrie, R. (1961)  
Blood screening for phenylketonuria [letter]  
*JAMA*, 25, 178(8), 863
- Guthrie, R., Susi, A. (1963)  
A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants  
*Pediatrics*, 32(3), 338- 43
- Guthrie, R. (1996)  
The introduction of newborn screening for phenylketonuria  
*Eur. J. Pediatr*, 155, 4
- Guttler F. (1980)  
Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood  
*Acta. Paediatr. Scand. Suppl*, 280,1-80
- Häberle, J., Pauli, S., Linnebank, M., Kleijer, W.J., Bakker, H.D., Wanders, F.J.A., Harms, E., Koch, H.G. (2002)  
Structure of the human argininosuccinate synthetase gene and an improved system for molecular diagnostics in patients with classical and mild citrullinemia  
*Hum. Genet.*, 110, 327-333
- Halvorsen, S. (1980)  
Screening for disorders of tyrosine metabolism, 45  
In: Bickel, H., Guthrie, R., Hammerson, G.: *Neonatal Screenings for Inborn Errors of Metabolism*;  
New York, Springer-Verlag
- Hanley, W.B., Demshar, H., Preston, M.A., Borczyk, A., Schoonheydt, W.E., Clarke, J.T., Feigenbaum, A. (1997)  
Newborn phenylketonuria (PKU) Guthrie (BIA) screening and early hospital discharge  
*Early Hum. Dev*, 47, 87-96
- Harms, E., Wendel, U. (2001)  
Störungen des Stoffwechsels von Aminosäuren und organischen Säuren, 310  
in: Lentze, M.J., Schulte, F.J., Schaub, J., Spranger, J.: *Pädiatrie: Grundlagen und Praxis*;  
Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio, Springer-Verlag

- Harris, H. (1982)  
Molecular aspects of genetic heterogeneity, 3-11  
In: Cockburn, F., Gitzelmann, R.: Inborn errors of metabolism in humans;  
Lancaster, England
- Haymond, M.W., Karl, I.E., Pagliara, A.S. (1974)  
Increased gluconeogenic substrates in the small-for-gestational-age infant  
Engl. J. Med, 291, 322-328
- Hervé, F., Moreno, J.L., Ogier, H., Saudubray., J.M., De Prost, Y., Duffier, J.L.,  
Charpentier, C., Lemonnier, F., Frezal, J. (1986)  
Incurable keratitis and chronic palmoplantar hyperkeratosis with hypertyrosinemia.  
Cure using a tyrosine-restricted diet. Type II tyrosinemia  
Arch. Fr. Pediatr, 43, 19
- Hill, J.B. (1969)  
A climatological factor influencing the determination of phenylalanine in blood of new-  
born infants in North Carolina  
Biochem. Med, 2, 261
- Hoffmann, G.F., Mayatepek, E. (2001)  
Stoffwechselerkrankungen, 105-151  
In: Speer, C.P., Gahr, M. Pädiatrie;  
1.Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Holme, E., Lindstedt, S. (1998)  
Tyrosinaemia type I and NTBC [2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-  
cyclohexanedione]  
J. Inherit. Metab. Dis, 21, 507
- Holtzman, C., Slazyk, W.E., Cordero, J.F., Hannon, W.H. (1986)  
Descriptive epidemiology of missed cases of phenylketonuria and congenital hypothy-  
roidism Pediatrics, 78, 553-8
- Holtzman, N.A., Meek, A.G., Mellits, E.D., Kallman, C.H. (1974)  
Neonatal screening for phenylketonuria. 3. Altered sex ratio; extent and possible causes  
J. Pediatr, 85, 175-81
- Iinuma, K., Saito, T., Wada, Y., Onuma, A., Takamatsu, N. (1976)  
Electroencephalograms in a case of maple syrup urine disease: their relation to serum  
levels of branched-chain amino acids Tohoku  
J. Exp. Med, 120, 191-5
- Imura, K., Okada, A. (1998)  
Amino acid metabolism in pediatric patients  
Nutrition, 14(1),143-8

- Jervis, G.A. (1947)  
Studies on phenylpyruvic oligophrenia: the position of the metabolic error  
J. Biol. Chem, 169(3), 651-6
- Kalyanaraman, K., Chamukuttan, S., Arjundas, G., Gajanan, N., Ramamurthi, B. (1972)  
Maple syrup urine disease (branched-chain keto-aciduria) variant type manifesting as hyperkinetic behaviour and mental retardation. Report of two cases  
J. Neurol. Sci, 15, 209-17
- Kaufman, S. (1963)  
The structure of phenylalanine hydroxylation cofactor  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 50, 1085
- Kaufman, S. (1971)  
The phenylalanine hydroxylating system from mammalian liver  
Adv. Enzymol, 35, 245-319
- Kaufman, S. (1976)  
Phenylketonuria: Biochemical Mechanisms  
Adv. Neurochem, 2, 1-132
- Kaufman, S., Kapatos, G., Rizzo, W.B., Schulman, J.D., Tamarkin, L., Van Loon, G.R. (1983)  
Tetrahydropterin therapy for hyperphenylalaninemia caused by defective synthesis of tetrahydropterin  
Ann. Neurol, 14, 308
- Kawahara, H., Kamata, S., Okada, A., Hasegawa, T., Wasa, M., Fukui, Y. (1999)  
The importance of the plasma amino acid molar ratio in patients with biliary atresia  
Surgery, 125, 487-497
- Keffler, S., Denmeade, R., Green, A. (1994)  
Neonatal screening for phenylketonuria: Evaluation of an automated enzymatic method  
Ann. Clin. Biochem, 31, 134-139
- Kim, S.Z., Levy, H.L. (1998)  
Newborn screening, 305-14  
In: Taeusch, H.W., Ballard, R.A. Diseases of the newborn  
7th ed. Philadelphia, Saunders
- Kirkman, H.N. (1992)  
Projections of a rebound in frequency of mental retardation from phenylketonuria  
Appl. Res. Ment. Retard, 3, 319
- Kobayashi, K., Shaheen, N., Terazono, H., Saheki, T. (1994)  
Mutations in argininosuccinate synthetase mRNA of Japanese patients, causing classical citrullinemia  
Am. J. Hum. Genet, 55, 1103-1112

- Koch, R., Wenz, E. (1987)  
Phenylketonuria  
Annu. Rev. Nutr, 7, 117-35
- Kramer, C.Y. (1956)  
Extension of Multiple Range Tests to Group Means with Unequal Sample Sizes  
Biometrics, 12, 307-310
- Kremensky, I., Kalaydjieva, L. (1989)  
Avoiding sources of error in PKU screening  
Am. J. Clin. Pathol, 92, 396-7
- Kuhara, T., Shinka, T., Inoue, Y., Matsumoto, M., Yoshino, M., Sakaguchi, Y., Matsumoto, I. (1983)  
Studies of urinary organic acid profiles of a patient with dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency  
Clin. Chim. Acta, 133, 133-40
- Kurasawa, G., Shiotsuka, S., Nakajo, J., Nagao, M., Ohisi, M., Aida, T., Tanaka, T. (1998)  
A case report of citrullinemia induced by pregnancy  
Nissanpu. Kantoren. Kaihou, 35, 3-7
- Kvittingen, E.A., Jellum E., Stokke., O. (1981)  
Assay of fumarylacetoacetate fumarylhydrolase in human liver-deficient activity in a case of hereditary tyrosinemia  
Clin. Chim. Acta, 115, 311
- Laberge, C., Ferreira, P., Grenier, A., Laframboise, R., Morissette, J. (1987)  
Hyperphenylalaninemia. The Canadian and Quebec experience  
Arch. Fr. Pediatr, 44, 643-7
- Lambert, D.M. (1994)  
The genetic epidemiology of hyperphenylalaninemia in Quebec (abstr)  
Thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research McGill University, Montreal
- Larochelle, J., Mortezaei, A., Belanger, M., Tremblay, M., Claveau, J.C. Aubin, G. (1967)  
Experience with 37 infants with tyrosinemia  
Can. Med. Assoc, 97, 1051
- Lenke, R.R., Levy, H.L. (1980)  
Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. An international survey of untreated and treated pregnancies  
N. Engl. J. Med, 303, 1202

- Levy, H.L., Simmons, J.R., MacCready, R.A. (1985)  
Stability of amino acids and galactose in the newborn screening filter paper blood specimen  
*J. Pediatr*, 107, 757-760
- Levy, H.L., Lobbregt, D. (1995)  
Postnatal clearance of maternally derived phenylalanine in offspring of maternal phenylketonuria: Implications for newborn screening  
*Screening*, 4, 79
- Levy, H.L. (1998)  
Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry: A New Era  
*Clin. Chem*, 44, 2401-2402
- Lidsky, A.S., Law, M.L., Morse, H.G., Kao, F.T., Rabin, M., Ruddle, F.H., Woo, S.L. (1985)  
Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(18), 6221-5
- Liebl, B., Muntau, A.C., Fingerhut R., Knerr, I., Röschinger W, Olgemöller B., Roscher, A.A. (2000)  
Screening-Handbuch: Fachschrift zum bayerischen Neugeborenen-Screening-Programm 1.Aufl., SHS, 8-11
- Light, I.J., Berry, H.K., Sutherland, J.M. (1966)  
Aminoacidemia of prematurity  
*Am. J. Dis. Child*, 112, 229
- Light, I.J., Sutherland, J.M., Berry, H.K. (1973)  
Clinical significance of tyrosinemia of prematurity  
*Am. J. Dis. Child*, 125, 243
- Lindblad, B., Lindstedt, S., Stehen, G. (1977)  
On the enzymic defects in hereditary tyrosinemia  
*Proc. Natl. Acad. Sc.*,74, 4641
- Lindblad, B.S., Baldesten, A, (1967)  
The normal venous plasma free amino acid levels of non-pregnant women and of mother and child during delivery  
*Acta Paediatr. Scand*, 56, 37
- Lindstedt, S., Holme, E., Lock, E.A., Hjalmarson, O., Strandvik, B. (1992)  
Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase  
*Lancet*, 340, 813

- Mabry, C.C., Reid, M.C., Kuhn, R.J. (1988)  
A source of error in phenylketonuria screening  
*Am. J. Clin. Pathol*, 90, 279-83
- Maestri, N.E., Clissold, D.B. and Brusilow, S.W. (1995)  
Longterm survival of patients with argininosuccinate synthetase deficiency  
*J. Pediatr*, 122, 929
- Mamunes, P., Prince, P.E., Thornton, N.H., Hunt, P.A., Hitchcock, E.S. (1976)  
Intellectual deficits after transient tyrosinemia in the term neonate  
*Pediatrics*, 57, 675
- Matalon, R., Stumpf, D.A., Michals, K., Hart, R.D., Parks, J.K., Goodman, S.I. (1984)  
Lipoamide dehydrogenase deficiency with primary lactic acidosis: favorable response to treatment with oral lipoic acid  
*J. Pediatr*, 104, 65-9
- McCabe, E.R., McCabe, L., Mosher, G.A. (1983)  
Newborn screening for phenylketonuria: predictive validity as a function of age  
*Pediatrics (United States)*, 72(3), 390-8
- McCabe, E.R.B., McCabe, L. (1983)  
Screening for PKU in sick or premature neonates  
*J. Pediatr*, 103, 502
- McCaman, M.W., Robins, E. (1962)  
Fluorometric method for the determination of phenylalanine in serum  
*J. Lab. Clin. Med*, 59, 885-890
- McKean, C.M. (1972)  
The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamin metabolism in the human brain  
*Brain Res*, 47, 469-476
- McMurray, W.C., Rathbun, J.C., Mohyuddin, R. (1963)  
Citrullinämia  
*Pediatrics*, 32, 347
- Medical Research Council Steering Committee for the MRC/DHSS Phenylketonuria Register, (1981)  
Routine neonatal screening for phenylketonuria in the United Kingdom 1964-78  
*BMJ*, 1, 1680
- Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria (1993)  
Phenylketonuria due to phenylalanine hydroxylase deficiency: an unfolding story  
*BMJ*, 306 (6870), 115-9

- Melnyk, A.R., Matalon, R., Henry, B.W. (1993)  
Prospective management of a child with neonatal citrullinemia  
J. Pediatr, 122, 96
- Menkes, J.H., Chernick, V., Ringel, B. (1966)  
Effect of elevated blood tyrosine on subsequent intellectual development of premature infants J. Pediatr, 69, 583
- Metzger, B.E., Phelps, R.L., Fienkel, N., Navickas, I.A. (1980)  
Effects of gestational diabetes on diurnal profiles of plasma glucose, lipids and individual amino acids  
Diabetes Care, 3, 402-409
- Mitchell, G.A., Lambert, M., Tanguay, R.M. (1995)  
Hypertyrosinemia, 1077  
In: Scriver, C.R., Beaudet, A., Sly, W., Valle, D.: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease;  
Volume 1, 7th ed. New York, McGraw-Hill
- Mitchell, G.A., Grompe, M., Lambert, M., Tanguay, R.M. (2001)  
Hypertyrosinemia, 1777  
In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D.: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease;  
Volume 2, 8th ed. New York, St. Louis, San Francisco, Auckland, Bogotá, Caracas, Lisbon, Madrid, Mexico City, Milan, Montreal, New Delhi, San Juan, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto, McGraw-Hill
- Mitton, S.G., Burston, D., Brueton, M.J. (1988)  
Hyperphenylalanaemia in parenterally fed newborn infants  
Lancet, 24- 31, 2 (8626-8627), 1497- 8
- Moore, S., Stein, W. (1951)  
Aminoacid determination, methods and techniques  
J. Biol. Chem, 192, 663-670
- Morris, A.F., Holton, J.B., Burman, D., Colley, J.R. (1983)  
Phenylalanine and tyrosine levels in newborn screening blood samples  
Arch. Dis. Child, 58, 271-5
- Morris, M.D., Fisher, D.A., Fiser, R. (1966)  
Late-onset branched-chain ketoaciduria: (maple syrup urine disease)  
J. Lancet, 86, 149-52
- Morrow III, G., Barness, L.A. and Efron, M.L. (1967)  
Citrullinemia with defective urea production  
Pediatrics, 40, 565

- Msall, M., Batshaw, M.L., Suss, R. (1984)  
Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis  
New. Engl. J. Med, 301, 1500
- Mudd, S.H., Levy, H.L., Tangerman, A., Boujet, C.H., Buist, N., Davison-Mundt, A. (1995a)  
Isolated persistent hypermethioninemia  
Am. J. Hum. Genet, 57, 882-92
- Mudd, S.H., Levy, H.L., Skovby, F. (1995b)  
Disorders of transsulfuration, 1279-327  
In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D.: The metabolic and molecular bases of inherited disease;  
7th ed, New York, McGraw-Hill
- Munro, H.N. (1972)  
Amino acid requirements and metabolism and their relevance to parenteral nutrition  
In: Wilkinson, A.W.: Parenteral nutrition ondon;  
Churchill Livingstone, 34
- Natt, E., Westphal, E.M., Toth-Fejehl, S.E., Magenis, R.E., Buist, N.R., Rettenmeier, R., Scherer, G. (1987)  
Inherited and de novo deletion of the tyrosine aminotransferase gene locus at 16q22.1q22.3 in a patient with tyrosinemia type II  
Hum. Genet, 77, 352
- Nyhan, W.L., Ozand, P.T. (1998)  
Atlas of Metabolic Diseases  
Chapman & Hall, 174
- Oepen, H., Oepen, I. (1965)  
Geschlechtsspezifische Konzentrationsunterschiede der Serum-Aminosäuren  
Klinische Wochenschrift, 43(4), 211-214
- Ohisalo, J.J., Laskowska-Klita, T., Andersson, S.M. (1982)  
Development of tyrosine aminotransferase and p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activities in fetal and neonatal human liver  
J. Clin. Invest, 70, 198
- Ohta, N., Saito, T., Hayashi, Y., Sakai, N., Saito, H., Hiroi, M. (1996)  
A case of citrullinemia repeatedly induced by pregnancy  
Acta Obst. Gynaec. Jpn, 48, 351-354
- Origuchi, Y., Endo, F., Kitano, A., Nagata, N., Matsuda, I. (1982)  
Sural nerve lesions in a case of hypertyrosinemia  
Brain Dev, 4, 463

- Partington, M.W., Delahaye, D.J., Masotti, R.E., Read, J.H., Roberts, B. (1968)  
Neonatal tyrosinaemia: A follow-up study  
Arch. Dis. Child, 43, 195
- Pohlandt, F. (1978)  
Plasma amino acid concentrations in newborn infants breast-fed ad libitum  
J.Pediatr, 92, 614-616
- Ponzone, A., Guardamagna, O., Dianzani, I., Ponone, R., Ferrero, G.B., Spada, M., Cotton, R.G.H. (1993)  
Catalytic activity of tetrahydrobiopterin in dihydropteridine reductase deficiency and indications for treatment  
Pediatr.Res, 33, 125
- Preece, M.A., Rylance, G.W., Macdonald A., Green, A., Gray, R.G.F. (1996)  
A new case of tyrosinemia typ III detected by neonatal screening  
J. Inherit. Metab. Dis, 19, 32
- Qu, Y., Miller, J.B., Slocum, R.H., Shapira, E. (1991)  
Rapid automated quantitation of isoleucine, leucine, tyrosine, and phenylalanine from dried blood filter paper specimens  
Clin. Chim. Acta, 203,191-198
- Raiha, N.C.R. (1974)  
Biochemical basis for nutritional management of preterm infants  
Pediatrics, 53, 174
- Rashed, M.S., Ozand, P.T., Bucknall, M.P., Little, D. (1995)  
Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry  
Ped. Res, 38 (3), 324-331
- Reilly, A.A., Bellisario, R., Pass, K.A. (1998)  
Multivariate discrimination for phenylketonuria (PKU) and non-PKU hyperphenylalaninemia after analysis of newborns' dried blood-spot specimens for six amino acids by ion-exchange chromatography  
Clin. Chem, 44(2), 317-2
- Reisner, S.H, Aranda, J.V., Colle, E., Papageorgiou, A., Schiff, D., Scriver, C.R., Stern, L. (1973)  
The effect of intravenous glucagon on plasma amino acids in the newborn  
Pediatr. Res, 7(4), 184-91
- Rice, D.N., Houston, I.B., Lyon, I.C., Macarthur, B.A., Mullins, P.R., Veale, A.M., Guthrie, R. (1989)  
Transient neonatal tyrosinaemia  
J. Inherit. Metab. Dis, 12, 13

- Rigo, J., Verloes, A., Senterre, J. (1989)  
Plasma amino acid concentrations in term infants fed human milk, a whey-predominant formula, or a whey hydrolysate formula  
*J. Pediatr*, 115, 752-5
- Rigo, J., Salle, B.L., Cavero, E., Richard, P., Putet, G., Senterre, J. (1994)  
Plasma amino acid and protein concentrations in infants fed human milk or a whey protein hydrolysate formula during the first month of life  
*Acta Paediatr*, 83, 127-131
- Rittinger, O., Bachmann, C., Irnberger, T., Pilz, P., Walter, G.F., Wendel, U., Plochl, E. (1986)  
The intermediate form of maple syrup disease  
*Klein. Padiatr*, 198, 37-43
- Robinson, B.H., Taylor, J., Sherwood, W.G. (1977)  
Deficiency of dihydrolipoyl dehydrogenase (a component of the pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complexes): a cause of congenital chronic lactic acidosis in infancy  
*Pediatr. Res*, 11, 1198-202
- Robinson, S., Prendergast, C.H. (1996)  
Protein metabolism in pregnancy  
*Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 10(4), 571-587
- Ruitenbeeck, W., Saheki, T., Smeitink, J.A.M., Simonis-Bik, A.M.C., Kobayashi, K., Wevers, R.A., Kwast, H., De Abreu, R.A., de Jong, J.G.N., Trijbels J.M.F. (2000)  
Moderate citrullinemia without hyperammonemia in a child with mutated and deficient argininosuccinate synthetase  
*J. Inherit. Metab. Dis*, 23, 56
- Ryan, W.L., Orr, W. (1986)  
Phenylalanine conversion to tyrosine by the human fetal liver  
*Arch. Biochem. Biophys*, 113, 684
- Saheki, T., Ueda, A., Hosoya, M., Kusumi, K., Takada, S., Tsuda, M., Katsunuma, T. (1981)  
Qualitative and quantitative abnormalities of argininosuccinate synthetase in citrullinemia  
*Clin. Chim. Acta*, 109, 325-335
- Saheki, T., Ueda, A., Ilizima, K., Yamada, N., Kobayashi, K., Takahashi, K., Katsunuma, T. (1982)  
Argininosuccinate synthetase activity in cultured skin fibroblasts of citrullinemic patients  
*Clin. Chim. Acta*, 118, 93-97

Sakaguchi, Y., Yoshino, M., Aramaki, S., Yoshida, I., Yamashita, F., Kuhara, T., Matsumoto, I., Hayashi, T. (1986)

Dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency: a therapeutic trial with branched-chain amino acid restriction

Eur. J. Pediatr, 145, 271-4

Sander, J., Janzen, N. (1999)

Optimierte Labortechnik für das Neugeborenen-Screening auf Phenylketonurie und andere Hyperphenylalaninämien

Monatsschr. Kinderheilkd, 147, 480-485

Sander, J., Janzen, N., Sander, S., Melchior, U., Steuerwald, U. (2000)

Tandemmassenspektrometrie: Beitrag zum Neugeborenen-Screening auf angeborene Störungen des Stoffwechsels

Monatsschr. Kinderheilkd, 148, 771-777

Schreier, K., Plückthun, H. (1950)

Untersuchungen über den Gehalt an freien Aminosäuren im Serum und Urin

Biochemische Zeitschrift, 320, 447-465

Schulze, A., Kohlmüller, D., Mayatepek, E. (1999)

Sensitivity of electrospray-tandem mass spectrometry using the phenylalanine/tyrosine-ratio for differential diagnosis of hyperphenylalaninemia in neonates

Clinica Chimica Acta, 283, 15-20

Scriver, C.R., Davies, E., Cullen, A.M. (1964)

Application of a simple method to the screening of plasma for a variety of aminoacidopathies Lancet, 2, 230

Scriver, C.R. (1967)

Treatment in medical genetics, 45

In: Crow, J.F., Neel, J.V.: Proceedings of the Third International Congress of Human Genetics

Baltimore, The Johns Hopkins Press

Scriver, C.R., Rosenberg, L.E. (1973)

Distributions of amino acids in body fluids, 39-60

In: Amino acid metabolism and its disorders;

Philadelphia, Saunders

Scriver, C.R. (1982)

Screening for medical intervention: the PKU experience

Prog. Clin. Biol. Res., 103 Pt B, 437-45

Scriver, C.R., Gregory, D.M., Sovetts, D. (1985)

Normal plasma free amino acid values in adults: The influence of some common physiological variables

Metabolism, 34, 868

- Scriver, C.R., Kaufman, S., Eisensmith, R.C., Woo, S.L.C. (1995)  
The hyperphenylalaninemias  
In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W., Valle, D.  
The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease  
7.Aufl., Volume I, 1015-1075, Mc Graw Hill, New York
- Scriver, C.R., Waters, P.J., Sarkissian, C., Ryan, S., Prevost, L., Cote, D., Novak, J., Teebi, S., Nowacki, P.M. (2000)  
PAHdb: a locus-specific knowledgebase  
Hum. Mutat, 15(1), 99-104
- Scriver, C.R., Kaufman, S. (2001)  
Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency, 1667-1724  
In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Valle, D., Sly, W.: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease;  
8.Aufl., Volume II, Mc Graw Hill, New York
- Shih, V.E. (1984)  
Maple-syrup-urine disease  
N. Engl. J. Med, 310, 596-7
- Slazyk, W.E., Phillips, D.L., Therrell, B.L. Jr., Hannon, W.H. (1988)  
Effect of lot-to-lot variability in filter paper on the quantification of thyroxine, thyrotropin, and phenylalanine in dried-blood specimens  
Clin Chem, 34, 53-8
- Smith, I. (1974)  
Atypical phenylketonuria accompanied by a severe progressive neurological illness unresponsive to dietary treatment  
Arch. Dis. Child, 49, 245
- Smith, I., Beasley, M.G., Ades, A.E. (1990)  
Effect on intelligence of relaxing the low phenylalanine diet in phenylketonuria  
Arch. Dis. Child, 65, 311-316
- Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S. (1958)  
Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids  
Analyt. Chem, 30, 1190-1206
- Ständige Kommission für das Neugeborenen-Screening, (1997)  
Richtlinien zur Organisation und Durchführung des Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechselstörungen und Endokrinopathien in Deutschland  
Monatsschr. Kinderheilkd, 145, 770-772

Ständige Screeningkommission der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (DGKJ), (2002)  
Neue Screening-Richtlinien  
Monatsschr. Kinderheilkd, 150, 1424-1440

Tharp, B.R. (1992)  
Unique EEG pattern (comb-like rhythm) in neonatal maple syrup urine disease  
Pediatr. Neurol, 8, 65-8

Thompson, G.N., Francis, D.E.M., Kirby, D.M., Compton, R. (1991)  
Pregnancy in phenylketonuria: Dietary treatment aimed at normalizing maternal plasma phenylalanine concentration  
Arch. Dis. Child, 66, 1346

Tikanoja, T., Simell, O., Viikari, M., Järvenpää, A.L. (1982)  
Plasma amino acids in term neonates after a feed of human milk of formula. II. Characteristic changes in individual amino acids  
Acta Paediatr. Scand, 71, 391-397

Townsend, I., Kerr, D.S. (1982)  
Total parenteral nutrition therapy of toxic maple syrup urine disease  
Am. J. Clin. Nutr, 36, 359-65

Treacy, E., Clow, C.L., Reade, T.R., Chitayat, D., Mamer, O.A., Scriver, C.R. (1992)  
Maple syrup urine disease: interrelations between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination  
J. Inherit. Metab. Dis, 15, 121-35

Trefz, F.K. (2000)  
Human Pathophysiology  
In: Report of the NIH consensus development conference on Phenylketonuria (PKU): Screening and Management  
October 16-18, Bethesda, Maryland

Tukey, J.W. (1953)  
The problem of multiple comparisons  
Unpublished manuscript. Siehe Tukey, J.W. (1994), 1-300

Tukey, J.W. (1994)  
The Problem of Multiple Comparisons, 1-300  
In: Braun, H.I.: The Collected Works of John W. Tukey  
Volume VIII, New York: Chapman & Hall

Udenfriend, S., Cooper, J.R. (1952)  
The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine  
J. Biol. Chem, 194(2), 503-11

- Valman, H.B., Patrick, A.D., Seakins, J.W., Platt, J.W., Gompertz, D. (1973)  
Family with intermittent maple syrup urine disease  
Arch. Dis. Child, 48, 225-8
- van der Horst, J.L., Wadman, S.K. (1971)  
A variant form of branched-chain keto aciduria  
Acta Paediatr. Scand, 60, 594-9
- van Spronsen, F.J., Thomasse, Y., Smit, G.P.A., Leonard, J.V., Clayton, P.T., Fidler, V., Berger, R., Heymans, H.S. (1994)  
Hereditary tyrosinemia type I: A new clinical classification with difference in prognosis on dietary treatment  
Hepatology, 20, 1187
- Velazquez, A., Montiel, F., Sahw, K.N., Carnevale, A., del Castillo, V. (1981)  
Maple syrup urine disease. Genetic heterogeneity, heterozygote diagnosis and new therapeutic approach (author's transl)  
Rev. Invest. Clin, 33, 273-9
- Verdu, A., Lopez-Herce, J., Pascual-Castroviejo, I., Martinez-Bermejo, A., Ugarte, M., Garcia, M.J. (1985)  
Maple syrup urine disease variant form: presentation with psychomotor retardation and CT scan abnormalities  
Acta Paediatr. Scand, 74, 815-8
- Vidailhet, M., Levin, B., Dautrevaux, M. (1971)  
Citrullinemia  
Arch. Franc. Pediatr, 28, 521
- Walker, V., Clayton, B.E., Ersser, R.S., Francis, D.E., Lilly, P., Seakins, J.W., Smith, I., Whiteman, P.D. (1981)  
Hyperphenylalaninaemia of various types among three-quarters of a million neonates tested in a screening programme  
Arch. Dis. Child, 56, 759-64
- Wendel, U., Lombeck, I., Bremer, H.J. (1983)  
Maple-syrup-urine disease  
N. Engl. J. Med, 308, 1100-1
- Wendel, U., Koppelkamm, M., Hummel, W., Sander, J., Langenbeck, U. (1990)  
A new approach to the newborn screening for hyperphenylalaninurias: use of L-phenylalanine dehydrogenase and microtiter plates  
Clin. Chim. Acta, 192, 165-170
- Wilcken, B., Brown, A.R., Liu, A., Jones, K. (1989)  
Eliminating some possible errors in phenylketonuria screening  
Am. J. Clin. Pathol, 92, 396

- Williams, R.J. (1963)  
Biochemical individuality. The basis for the genotrophic concept  
New York, John Wiley and Sons, Science editions 97-105
- Wilson, J.M.G, Jungner, G. (1968)  
Principles of screening for disease  
Geneva, World Health Organization, 26-39
- Wong, P.W.K., Lambert, A.M., Komrower, G.M. (1967)  
Tyrosinaemia and tyrosyluria in infancy  
Dev. Med. Child. Neurol, 9, 551
- Wurtman, R.J., Rose, C.M., Chou, C., Larin, F.F. (1968)  
Daily rhythms in the concentrations of various amino acids in human plasma  
The New England Journal of Medicine, 279 (4), 171-5
- Yamada, N., Fukui, M., Ishii, K., Shibata, H., Okabe, H., Ohomiya, H., Matsunobu, A., Nishizima, M. (1980)  
A case of adult form hypercitrullinemia with consciousness disturbance and marked hypertransaminasemia after delivery  
Gastroenterol. Jpn, 77, 1655-1660
- Yoshida, I., Sweetman, L., Nyhan, W.L. (1986)  
Metabolism of branched-chain amino acids in fibroblasts from patients with maple syrup urine disease and other abnormalities of branched-chain ketoacid dehydrogenase activity  
Pediatr. Res, 20, 169-74
- Yoshino, M., Koga, Y., Yamashita, F. (1986)  
A decrease in glycine cleavage activity in the liver of a patient with dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency  
J. Inherit. Metab. Dis, 9, 399-400
- Young, V.R., Pellett, P.L. (1987)  
Protein intake and requirements with reference to diet and health  
Am. J. Clin. Nutr, 45, 1323-43
- Zabransky, S. (1997)  
Neugeborenen screening auf metabolische und endokrine Störungen  
Der Kinderarzt, 28(4), 418-425
- Zipf, W.B., Hieber, V.C., Allen, R.J. (1979)  
Valine-toxic intermittent maple syrup urine disease: a previously unrecognized variant  
Pediatrics, 63, 286-94
- Zlotkin, S.H., Bryan, M.H., Anderson, G.H. (1981)  
Cysteine supplementation to cysteine free intravenous feeding regimens in newborn infants  
Am. J. Clin. Nutr, 34, 914

## 8 TABELLARISCHER LEBENS LAUF

### Persönliche Daten:

Name: Janine Morgenthaler  
 Geburtsdatum: 26.07.1975  
 Geburtsort: Reutlingen  
 Staatsangehörigkeit: Deutsch  
 Familienstand: Ledig  
 Eltern: Franz Morgenthaler, Masseur  
 Sonja Morgenthaler, Physiotherapeutin

### Ausbildung:

Juni 1995 Abitur am Johannes-Kepler-Gymnasium, Reutlingen  
 Sommersemester 1996 Humanmedizinstudium an der Universität Tübingen  
 März 1998 Physikum an der Universität Tübingen  
 März 1999 1. Staatsexamen an der Universität Tübingen  
 April 2002 2. Staatsexamen an der Universität Tübingen  
 April 2002-Mai 2003 Praktisches Jahr an der Universität Heidelberg, Wahlfach  
 Pädiatrie  
 09.05.2003 3. Staatsexamen an der Universität Heidelberg  
 ab 01.10.2003 Ärztin im Praktikum an der Universitätskinderklinik Heidel-  
 berg

### Praktika:

Dez. 1995- Feb. 1996 Pflegepraktikum im Klinikum am Steinenberg, Reutlingen  
 Sep./Okt.1998 Famulatur Innere Medizin im Klinikum am Steinenberg,  
 Reutlingen  
 Sep. 1999- Feb. 2000 Forschungssemester am Kennedy Krieger Institute and De-  
 partments of Neurology and Pediatrics, The Johns Hopkins  
 University School of Medicine, Baltimore, USA, Thema:  
 Very-Long-chain Acyl-CoA Synthetases (Veröffentlichung:  
 Steinberg S. et al., J.Biol.Chem.,(2000),Vol.275,45,35162-  
 35169)  
 Sep./Okt. 2000 Famulatur Pädiatrie im Klinikum am Steinenberg, Reutlingen  
 Feb./Mär 2001 Famulatur Pädiatrie im Universitätsklinikum Heidelberg  
 Okt. 2001- Feb. 2002 Wissenschaftliche Hilfskraft bei Pseudokrapp-Studie in der  
 Kinderklinik Reutlingen

### Dissertation:

Sept.1998 Dissertationsbeginn bei Herrn Prof. Dr. F. K. Trefz im Klini-  
 kum am Steinenberg (Lehrkrankenhaus der Universität Tü-  
 bingen)  
 Juni 1999 Vorstellung der Arbeit auf dem 4th Meeting of the Interna-  
 tional Society for Neonatal Screening in Stockholm  
 Sept. 1999 Vorstellung der Arbeit auf der 95. Jahrestagung der Deut-  
 schen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
 in München  
 Sept.2003 Vorstellung der Arbeit auf der ICIEM 2003 (IXth Internatio-  
 nal Congress on Inborn Errors of Metabolism) in Brisbane,  
 Australien

## 9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. F. K. Trefz möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas, die hervorragende Betreuung und für seine stete Diskussionsbereitschaft und wertvollen Anregungen danken.

Dem Zentrum für Stoffwechseldiagnostik (ZfS) Reutlingen gilt mein Dank für die experimentellen Möglichkeiten und Herrn Dipl.-Chem. M. Göggerle für seine Hilfsbereitschaft, sowie allen anderen Labormitarbeitern und Krankenschwestern des Klinikum am Steinenberg Reutlingen.

Herrn Dr. G. Frauendienst-Egger möchte ich für die Mithilfe bei der Organisation und insbesondere für die Datenbankerstellung danken.

Frau D. Scheible gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Proben- und Datengewinnung.

Herrn H. Brehl von SHS Heilbronn möchte ich für die Förderung dieser Arbeit danken.

Frau B. Trefz-Schedukat möchte ich für ihre unermüdliche und tatkräftige Unterstützung in den arbeitsintensiven Phasen danken.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Sonja und Franz Morgenthaler, die mich immer bei meinen Zielen unterstützt haben.