

Aus dem Institut/der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Endokrinologie,
Gastroenterologie und Stoffwechselmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Evaluation einer Methode zur Bestimmung der Acylcarnitine
und Acylglycine im Urin mittels Fließinjektion und
tandem-massenspektrometrischer Detektion**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christina Femppel

aus Aalen

Datum der Promotion: 22. Juni 2014

Inhaltsverzeichnis

ABSTRAKT	IV
1 EINLEITUNG	6
1.1 NEUGEBORENENSCREENING (NGS)	6
1.2 ERWEITERTES NGS MIT DEM TANDEM-MS	7
1.3 KLINISCHE BESONDERHEITEN DER UNTERSUCHTEN ERKRANKUNGEN	8
1.3.1 Fettsäureoxidationsdefekte	9
1.3.2 Organoazidopathien	12
1.3.3 Aminoazidopathien	15
1.4 FRAGESTELLUNG/ZIELSETZUNG	16
2 METHODE	19
2.1 PATIENTENKOLLEKTIV UND MATERIALGEWINNUNG	19
2.2 PROBENAUFBEREITUNG	22
2.3 TANDEM-MASSENSPEKTROMETRIE	23
2.3.1 Funktionsweise und instrumenteller Aufbau	23
2.3.2 Weitere Begrifflichkeiten zur Massenspektrometrie	27
2.3.3 Protokoll der programmierten Methode	28
2.4 AUSWERTUNG DER MESSDATEN	29
2.4.1 Kalibrierung	29
2.4.2 Konzentrationsbestimmung	31
2.5 ANALYSEN ZUR METHODENVALIDIERUNG	34
2.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG	35
2.6.1 Allgemeine Begrifflichkeiten zur Statistik	35
2.6.2 Angewendete Testverfahren	36
3 ERGEBNISSE	38
3.1 METHODENVALIDIERUNG	38
3.2 NORMALBEFUNDE	39
3.2.1 Referenzwerte	39
3.2.2 Alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede	40
3.3 UNTERSUCHTE STOFFWECHSELDEFEKTE	44
3.3.1 Mittelkettiger Acyl-CoA-Dehydrogenase Defekt	44
3.3.2 Methylmalonazidurie	48
3.3.3 Propionazidämie	51
3.3.4 Isovalerianazidämie	55
3.3.5 Glutarazidurie Typ II	58
3.3.6 Glutarazidurie Typ I	60
3.3.7 3-Methylcrotonylglycinurie	62
3.3.8 Andere	66
3.3.9 Übersicht	67
4 DISKUSSION	69

4.1	METHODENVALIDIERUNG.....	69
4.1.1	Durchgeführte Untersuchungen	69
4.1.2	Diskussion der Anwendungsmöglichkeit der Methode	70
4.2	NORMALBEFUNDE	73
4.3	UNTERSUCHTE STOFFWECHSELDEFEKTE	75
4.3.1	Mittelkettiger Acyl-CoA-Dehydrogenase Defekt.....	75
4.3.2	Methylmalonazidurie.....	75
4.3.3	Propionazidämie	76
4.3.4	Isovalerianazidämie.....	77
4.3.5	Glutarazidurie Typ II.....	77
4.3.6	Glutarazidurie Typ I.....	77
4.3.7	3-Methylcrotonylglycinurie.....	78
4.3.8	Andere.....	78
4.3.9	Mögliche Einflüsse auf das Ausscheidungsmuster	79
4.3.10	Unterscheidung der Krankheiten untereinander	80
4.4	WEITERE ANMERKUNGEN	80
4.5	FAZIT UND PERSPEKTIVEN.....	81
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	83
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	90
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	93
8	DIAGRAMMVERZEICHNIS.....	94
9	TABELLENVERZEICHNIS	95
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	96
11	LEBENS LAUF	98
12	PUBLIKATION UND WISSENSCHAFTLICHER VORTRAG	99
	DANKSAGUNG	100

Abstrakt

Die Trockenblutanalyse der Acylcarnitine mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) ist ein für das Neugeborenenenscreening etabliertes Verfahren zur Diagnose von Fettsäureoxidationsdefekten (FAO) und Organoazidopathien (OA). Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Evaluation einer neuen Methode zur Bestimmung nicht derivatisierter Acylcarnitine und Acylglycine im Urin mittels Fließinjektion und tandem-massenspektrometrischer Detektion (FIA-MS/MS).

614 Urinproben von gesunden Probanden (n = 359) sowie von Patienten mit MCAD-Defekt (MCADD) (n = 98), Methylmalonazidurie (MMA) (n = 53), Propionazidämie (PA) (n = 19), Isovalerianazidämie (IVA) (n = 19), Glutarazidurie Typ II (GA II) (n = 15), Glutarazidurie Typ I (GA I) (n = 12), 3-Methylcrotonylglycinurie (3-MCG) (n = 11), anderen FAO (n = 10), Tyrosinämie Typ I (Tyr I) (n = 10) und Ahornsiruperkrankung (MSUD) (n = 8) wurden mit einer Fließinjektionsmethode mittels Triple-Quadrupol Massenspektrometrie auf 37 Acylcarnitine und 17 Acylglycine untersucht.

Die Stoffwechselerkrankung MCADD war mit 94% Sensitivität und 93% Spezifität anhand folgender Marker des Acylcarnitin- und Acylglycinprofils zu detektieren: P-C3G, C5OHG, C6G, C7G, C8DCG, C8OHG, C6, C8 und C10:1. Die MMA wurde mit 94% Sensitivität und 96% Spezifität (Marker: C3), die PA mit 100% Sensitivität und 100% Spezifität (Marker: C3), die IVA mit 100% Sensitivität und 98% Spezifität (Marker: C5, C5G), die GA I mit 92% Sensitivität und 94% Spezifität (Marker: C5DC) und die 3-MCG mit einer Sensitivität und einer Spezifität von jeweils 100% (Marker: C5:1G, C5OHG, C5OH, C8OHG) diagnostiziert. Andere charakteristische Marker waren: C4DC für MMA, C5OHG, C0, C5:1G, C8OHG für PA und C8OHG für IVA, sowie C5:1, C7G und C5G für 3-MCG. Für die Krankheitsgruppen GA II, andere FAO, Tyr I und MSUD ließen sich keine charakteristischen Parameter evaluieren.

Mit schneller Probenaufarbeitung und hohem Probendurchsatz sind Acylcarnitine und Acylglycine mittels FIA-MS/MS im Urin sicher detektierbar. Spezifische Ausscheidungsmuster lassen mit hoher Sensitivität und Spezifität die Diagnose bestimmter FAO und OA zu. Als zusätzliches Analyseverfahren in der Routinediagnostik könnte diese Methode in Zukunft eine schnelle Konfirmation von Verdachtsdiagnosen ermöglichen und zu mehr Sicherheit in der Diagnosestellung beitragen.

Abstract

The diagnosis of inborn errors of metabolism by measuring acylcarnitines in dried blood spots by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) is a well-established method which is used for newborn screening programs. The aim of this study was the evaluation of a fast and reliable method for confirming the diagnosis of fatty acid oxidation disorders (FAO) and organic acidemias (OA) by determining not derivatized acylcarnitines and acylglycines in urine with a new flow injection and tandem mass spectrometry detection (FIA-MS/MS) method.

We determined 37 acylcarnitines and 17 acylglycines in 614 urine samples from healthy individuals (n = 359), and in 255 samples from patients with FAO and OA: patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD) (n=98), methylmalonic aciduria (MMA) (n = 53), propionic aciduria (PA) (n = 19), isovaleric aciduria (IVA) (n = 19), glutaric aciduria type II (GA II) (n = 15), glutaric aciduria type I (GA I) (n = 12) and 3-methylcrotonylglycinuria (3-MCG) (n = 11), other FAO (n = 10), tyrosinemia type I (Tyr I) (n = 10) and maple syrup urine disease (MSUD) (n = 8). Age-related reference values for acylcarnitines and acylglycines were defined in healthy individuals and disease-specific acylcarnitines and acylglycines were evaluated.

MCADD was identified with 94% sensitivity and 93% specificity on the basis of the following acylcarnitine and acylglycine profile: P-C3G, C5OHG, C6G, C7G, C8DCG, C8OHG, C6, C8 and C10:1. MMA was diagnosed with 94% sensitivity and 96% specificity (metabolite: C3), PA with 100% sensitivity and 100% specificity (metabolite: C3), IVA with 100% sensitivity and 98% specificity (metabolites: C5, C5G), GA I with 92% sensitivity and 94% specificity (metabolite: C5DC) and 3-MCG with 100% sensitivity and 100% specificity (metabolites: C5:1G, C5OHG, C5OH, C8OHG). Other characteristic metabolites were: C4DC for MMA, C5OHG, C0, C5:1G and C8OHG for PA, C8OHG for IVA as well as C5:1, C7G and C5G for 3-MCG. In GA II, other FAO, Tyr I and MSUD no characteristic metabolites were identified.

These data show that determination of acylcarnitines and acylglycines in urine by FIA-MS/MS is a reliable and fast method for the diagnosis of FAO and OA. Therefore FIA-MS/MS may be established as a new routine method for the confirmation of FAO and OA.

1 Einleitung

1.1 Neugeborenencreening (NGS)

Je früher eine schwerwiegende Erkrankung entdeckt wird, desto gezielter und erfolgreicher kann diese behandelt werden. Ziel ist es daher bestenfalls Erkrankungen in epidemiologischen Untersuchungen bereits in einem noch klinisch symptomlosen Krankheitsstadium durch ein sogenanntes Screening zu erkennen. Neugeborene werden so bereits kurz nach der Geburt auf einige angeborene Erkrankungen gescreent.

Die Anfänge des NGS machte 1963 Robert Guthrie, der einen mikrobiologischen Bakterien-Hemmtest entwickelte, mit dem es gelang, flächendeckend das Fersenblut Neugeborener als Trockenblut (s. Abbildung 1) auf die Krankheit Phenylketonurie zu testen.^{1,2} Diese Methode wurde als NGS kurze Zeit später auch in Deutschland etabliert: in der BRD im Jahr 1969 und in der DDR im Jahr 1971.^{3,4}

Seit 2002 wird zur Durchführung des NGS der Einsatz der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) empfohlen.⁵ Die Einführung der MS/MS zeigte überzeugende Erfolge.⁶⁻¹⁰ Daher wurde das erweiterte NGS mit dem Tandem-Massenspektrometer (Tandem-MS) schließlich im Dezember 2004 vom Gemeinsamen Bundesausschuss der Ärzte und Krankenkassen zusätzlich zu den konventionellen Methoden in die Kinder-Richtlinien aufgenommen.¹¹ Im Rahmen des NGS wurden in Deutschland im Jahr 2011 insgesamt 666.145 Neugeborene auf zwei Endokrinopathien und zwölf angeborene Stoffwechselerkrankungen getestet.¹² Die entsprechenden Krankheiten sind Tabelle 1 und 2 zu entnehmen. Bei jedem 1.297. Neugeborenen wurde eine dieser „Screening-Zielkrankheiten“ diagnostiziert.¹²

Unbehandelt führen die meisten dieser angeborenen Stoffwechseldefekte zu akuter oder chronischer Enzephalopathie mit Entwicklungsretardierung, zu multiplen Organschäden oder können letal enden. Bei später Diagnosestellung sind die bereits aufgetretenen Schäden irreversibel. Daher ist eine frühe Diagnosestellung bei präsymptomatischen Neugeborenen im Zuge des NGS für die Prognose entscheidend. Durch eine früh einsetzende gezielte diätetische und/oder medikamentöse Therapie können schwerwiegende Folgeschäden verhindert und in den meisten Fällen eine normale Entwicklung der Kinder gewährleistet werden.^{13,14}

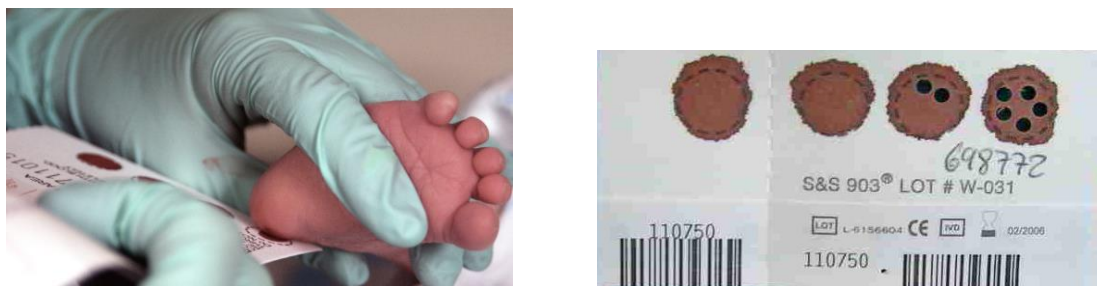


Abbildung 1: Trockenblutkarte für das NGS

a) Entnahme von Fersenblut bei einem Neugeborenen (übernommen aus USAF Photographic Archives)ⁱ und b) betroffene Trockenblutkarte

1.2 Erweitertes NGS mit dem Tandem-MS

Die Analyse mit dem Tandem-MS beruht auf dem für die Erkrankungen charakteristischen Veränderungen des Profils von Acylcarnitinen und Aminosäuren im Trockenblut.¹⁴ Fettsäureoxidationsdefekte (FAO) oder Organoazidopathien (OA) führen zu einem Anstau von Acyl-Coenzym A (CoA) vor dem entsprechenden Enzymdefekt. Dieses freie Acyl-CoA wird zum Teil an Carnitin gekoppelt. Die hierbei entstehenden Acylcarnitinerester können freigesetzt werden und sind dann im Blut nachzuweisen.¹⁵ Mit dem Tandem-MS ist es möglich über vierzig Stoffwechselstörungen zu erkennen.^{6,10,14} Einige dieser Erkrankungen sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Auswahl an mit dem Tandem-MS erfassbarer Stoffwechselerkrankungen

HG ⁱⁱ	Erkrankung	Enzymdefekt	Schlüsselmetabolite ¹⁵⁻¹⁷ und eigene Erfahrungen	OMIM ⁱⁱⁱ	NGS ^{iv}
FAO	MCAD-Defekt	Mittelkettige-Acyl-CoA-Dehydrogenase	C6, C8, C10:1, C10 ^v	#201450	+
	LCHAD-Defekt	Langkettige-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase	C16:1OH, C16OH, C18:1OH, C18OH	#609016	+
	VLCAD-Defekt	(Über-)Langkettige-Acyl-CoA-Dehydrogenase	C14:1, C14:2, C14	#201475	+
	CACT-Mangel	Carnitin-Acylcarnitin-Translokase	C2, C18:1, C16, C18:2, C18	#212138	+

ⁱ Quelle: USAF Photographic Archives (U.S. Air Force photo/Staff Sgt Eric T. Sheler. The blood of a two week-old infant is collected for Phenylketonuria screening. Posted 12/19/2007)

ⁱⁱ HG: Hauptgruppe

ⁱⁱⁱ OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man siehe auch www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

^{iv} NGS: Neugeborenen screening laut Kinder-Richtlinie¹¹

^v Die vollen Namen, der hier und im weiteren Verlauf als Formel wiedergegebenen Metaboliten, finden sich im Abkürzungsverzeichnis

	CPT-I-Mangel	Carnitin-Palmitoyltransferase-I	C0, (erniedrigt: C16, C18:2, C18:1)	#255120	+
	CPT-II-Mangel	Carnitin-Palmitoyltransferase-II	C0, C2, C18:1, C16, C18:2, C18	#600650	+
	MAD-Mangel (Glutarazidurie II)	Multiple Acyl-CoA-Dehydrogenase	C4-C18	#231680	-
	SCAD-Defekt	Kurzkettige-Acyl-CoA-Dehydrogenase	C4	#201470	-
OA	Glutarazidurie Typ I	Glutaryl-CoA-Dehydrogenase	C5DC	#231670	+
	Isovalerianazidämie	Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase	C5	#243500	+
	Propionazidämie	Propionyl-CoA-Carboxylase	C3	#606054	-
	Methylmlonazidurie	Methylmalonyl-CoA-Mutase oder Cobalamin-Defekt	C3, C4DC	#251000 #251100	-
	3-Methylcrotonyl-glycinurie	3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase	C5OH	#210200	-
AA ^{vi}	Phenylketonurie	Phenylalanin-Hydroxylase	Phenylalanin, Tyrosin	#261600	+
	Ahornsirupkrankheit	Verzweigt-kettiger α -Ketosauren Dehydrogenase-Komplex	Valin, Isoleucin, Leucin	#248600	+
	Citrullinämie	Argininosuccinat-Synthetase	Citrullin	#215700	-

Tabelle 2: Mit konventionellen Methoden erfasste Zielkrankheiten des NGS

Erkrankung	OMIM
Hypothyreose	(#218300)
Adrenogenitales Syndrom	#201910
Galaktosämie	#230400
Biotinidasemangel	#253260

1.3 Klinische Besonderheiten der untersuchten Erkrankungen

Es folgt eine Beschreibung der in dieser Arbeit untersuchten Stoffwechselerkrankungen. Umrissen sind die drei Hauptgruppen der Erkrankungen. Zudem werden die jeweils untersuchten Stoffwechseldefekte etwas detaillierter aufgegriffen.

^{vi} AA: Amionozidopathien

1.3.1 Fettsäureoxidationsdefekte

Die β -Oxidation der kurz- bis langkettigen Fettsäuren findet in den Mitochondrien statt und dient der Energiegewinnung in katabolen Phasen. Langkettige Fettsäuren können nur als Acylcarnitine die innere Mitochondrienmembran passieren und müssen zum Transport über die Mitochondrienmembran an Carnitin gekoppelt werden. Der aus vier Einzelreaktionen bestehende Abbau der Fettsäuren erfolgt durch die schrittweise Freisetzung von Acetyl-CoA (C2). Dabei kommen je nach Kettenlänge der abzubauenen Fettsäuren spezifische Enzyme zum Einsatz.^{14,18} Die folgende Abbildung 2 gibt schematisch den Ablauf der Fettsäureoxidation und Defekte dieses Stoffwechselprozesses wieder. Außerdem sind der Abbildung einige Carnitinzyklusdefekte zu entnehmen.

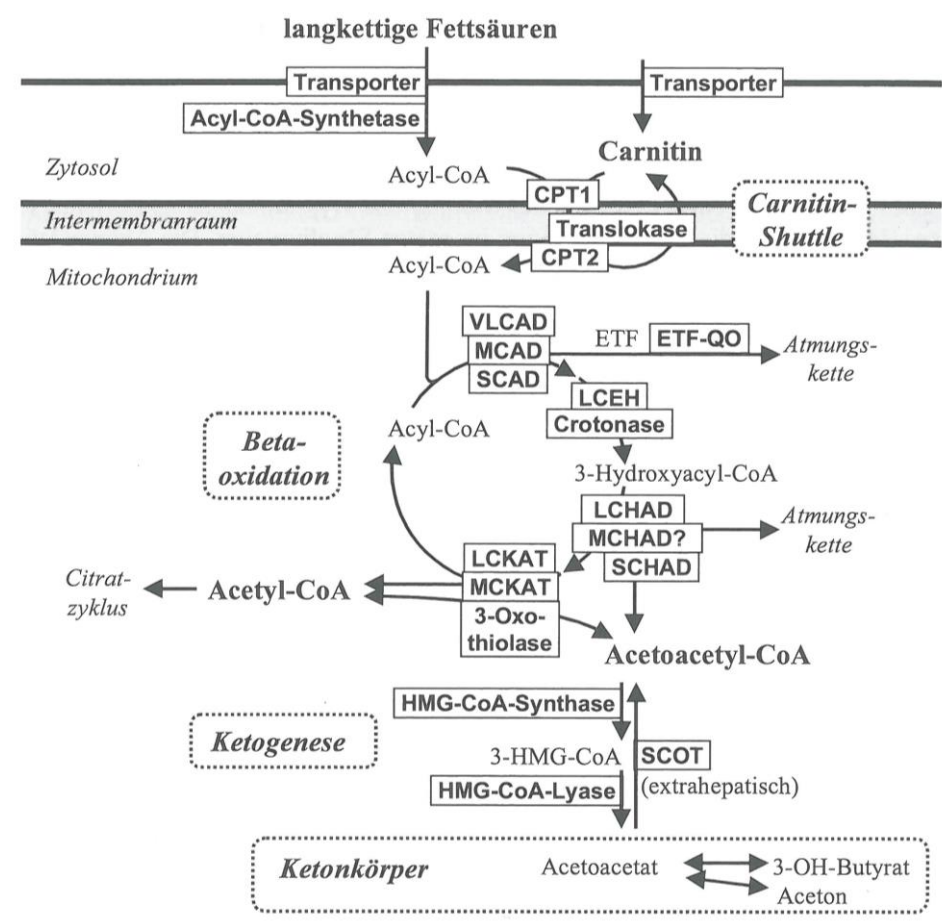


Abbildung 2: Ablauf der Fettsäureoxidation

Biochemischer „Pathway“ der mitochondrialen β -Oxidation der Fettsäuren und die entsprechenden FAO sowie Carnitinzyklusdefekte (übernommen von Zschocke)¹⁹

Alle FAO folgen einem autosomal-rezessiven Erbgang.¹⁴ Klinisch auffällig werden die meisten Patienten erstmalig während eines fieberhaften Infektes oder verlängerter Nüch-

ternphasen.¹³ In diesen Situationen hat der Körper einen erhöhten Energiebedarf und greift auf die Fettreserven zurück. Da der Fettsäurenabbau bei diesen Patienten erheblich beeinträchtigt ist, steht weder genug Acetyl-CoA zum weiteren Abbau im Citratzyklus noch genug Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA zur Ketogenese bereit. Zudem ist die Gluconeogenese gehemmt. In der Folge erleiden die Patienten eine hypoketotische Hypoglykämie.¹⁸ Die akkumulierenden Acylcarnitine sind im Blut nachweisbar und das freie Carnitin ist erniedrigt. Im Urin findet sich eine vermehrte Ausscheidung von Dicarbonsäuren sowie von Acylglycinen.¹⁸ Der Nachweis der Erkrankungen gelingt durch den Nachweis der charakteristische Metaboliten in Blut und Urin. Zur Diagnosesicherung können enzymatische und molekulargenetische Analysen herangezogen werden.^{13,14} Therapeutisches Ziel sind in erster Linie die Vermeidung verlängerter Nüchternphasen sowie eine konsequente Notfalltherapie. Eventuell sind diätische Maßnahmen oder auch eine Supplementation von L-Carnitin zu erwägen. Bei entsprechender Behandlung ist die Prognose meist gut und die Kinder können sich altersgerecht entwickeln.^{13,14}

Defekt der Acyl-CoA-Dehydrogenase mittelkettiger Fettsäuren (MCADD)

Dieser Defekt betrifft den ersten Schritt der Fettsäurenoxidation mittelkettiger Fettsäuren mit einer Kettenlänge von sechs bis zwölf Kohlenstoffatomen (C6-C12).¹³ Es handelt sich um die häufigste Erkrankung der Fettsäurenoxidation mit einer Prävalenz von 1:8.720 im Jahr 2011 in Deutschland.¹² Klinisch auffällig werden die Patienten meist zwischen dem dritten und fünfzehnten Lebensmonat, auch asymptomatische Verläufe sind beschrieben.¹³ Die erste Entgleisung kann tödlich enden und gleicht in diesem Fall dem plötzlichen Kindstod.^{20,21} Die führende Klinik ähnelt dem Reye-Syndrom mit Enzephalopathie und Leberfunktionsstörung.^{14,21,22} Charakteristisch ist die Erhöhung mittelkettiger Acylcarnitinverbindungen (C6, C8, C8:1, C10:1) im Plasma sowie Glycinkonjugate (C6G, C8DCG) und Dicarbonsäuren mittlerer Kettenlänge im Urin.^{13,23}

Defekt der Acyl-CoA-Dehydrogenase langkettiger Fettsäuren (VLCADD)

Der VLCAD-Mangel betrifft den Abbau langkettiger Fettsäuren (>C14).²⁴ Die Prävalenz der Erkrankung im Jahr 2011 in Deutschland betrug 1:60.244.¹² Unterschieden werden:

- i. neonatale Form mit Kardiomyopathie
- ii. infantile Form mit hypoketotischer Hypoglykämie
- iii. juvenile/adulte Form mit Myopathie²⁵

Die pathologisch nachweisbaren Schlüsselmetaboliten sind C14, C14:1 und C14:2.²⁶

Defekt der 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase langkettiger Fettsäuren (LCHADD)

Der LCHAD-Mangel betrifft den dritten Schritt der Fettsäureoxidation langkettiger Fettsäuren (>C16)²⁷ und hatte im Jahr 2011 in Deutschland eine Prävalenz von 1:165.671.¹² Klinisch zeigen sich ausgeprägte muskuläre, hepatische und neurologische Symptome und eine Pigmentretinopathie.^{13,28} Charakteristisch sind eine Hydroxy-Dicarbonazidurie mittlerer Kettenlängen und eine Erhöhung der hydroxylierten Acylcarnitine C16OH, C18:1OH, C18:2OH.^{14,29} Neben dem isolierten LCHAD-Mangel gibt es Patienten, bei denen alle Enzyme des Mitochondrialen-Trifunktionalen-Proteins defekt sind. Dieses aus mehreren Untereinheiten bestehende Protein hat neben der beschriebenen Dehydrogenase-(LCHAD-) noch eine Hydratase-(Langkettige Enoyl-CoA Hydratase-) und eine Thiolase-(Langkettige 3-Ketoacyl-CoA Thiolase-) Aktivität.¹⁴

Multipler Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel / Glutarazidurie Typ II (GA II)

Fehlerhaft ist das Elektronentransfer-Flavoprotein oder die ETF-Cytochrom-Q-Oxidoreduktase. Dadurch ist die Funktion aller NAD⁺-abhängigen Dehydrogenasen beeinträchtigt, was sowohl die Fettsäureoxidation als auch den Abbau einiger Aminosäuren (v.a. Valin, Leucin, Isoleucin, Lysin) betrifft.¹⁴ Da diese Erkrankung keine Zielkrankheit im NGS in Deutschland ist, fehlen Zahlen zur Prävalenz. Es wird zwischen drei Verlaufsformen unterschieden:

- i. schwere neonatale Form bei Neugeborenen mit Fehlbildungen, vor allem Nierenzysten, die häufig letal endet³⁰
- ii. mildere neonatale Form mit meist letal verlaufender Kardiomyopathie^{31,32}
- iii. infantile/juvenile Form mit Myopathie und Hepatopathie^{33,34}

Pathologisch sind Erhöhungen der Dicarbonsäuren, einiger Acylglycine und einiger Acylcarnitine im Urin sowie einer Reihe von Acylcarnitine (C4-C18) im Trockenblut.^{13,34}

Defekt der Acyl-CoA-Dehydrogenase kurzkettiger Fettsäuren (SCADD)

Gestört ist hier der Stoffwechsel kurzkettiger Fettsäuren mit einer Kettenlänge von vier bis sechs Kohlenstoffatomen (C4-C6).¹³ Die Inzidenz ist aufgrund der wenigen bis heute bestätigten Fälle unbekannt. Beschrieben werden klinische Symptome wie muskuläre Hypotonie und psychomotorische Retardierung.³⁵ Viele Patienten sind jedoch asymptomatisch oder zeigen nur eine milde Klinik.³⁶ Pathologisch sind Ausscheidungen von Ethylmalonat, Methylsuccinat, C4G und C4.¹³

Carnitinzyklusdefekte am Beispiel des Carnitinpalmitoyltransferase-I-Mangels (CPT I)

Das Enzym Carnitinpalmitoyltransferase bildet Acylcarnitine und ist somit notwendig für den Transport langkettiger Fettsäuren über die Mitochondrienmembran in das Mitochondrium. Insgesamt wurden bisher unter 100 Fälle dieser Erkrankung publiziert.¹⁴ Klinisch typisch ist eine Kombination aus Hepato- und Enzephalopathie.^{13,37} Charakteristisch sind eine erhöhte Konzentration des freien Carnitins und erniedrigte Konzentrationen der langkettigen Acylcarnitine im Plasma.^{38,39}

1.3.2 Organoazidopathien

OA umfassen Störungen des Aminosäuren- und Fettstoffwechsels. Benannt ist diese autosomal-rezessiv vererbte Krankheitsgruppe nach den durch Gaschromatografie-Massenspektrometrie (GC-MS) nachweisbaren organischen Säuren im Urin.^{39,40}

Ursachen der OA sind Defekte intramitochondrial gelegener Enzyme, welche für den Abbau CoA-aktivierter Carbonsäuren notwendig sind. Folglich stauen sich diese toxischen Carbonsäuren an und hemmen eine Reihe von mitochondrialen Stoffwechselwegen.¹³ Durch die Akkumulation der Acyl-CoA-Ester fehlt freies CoA-SH, was zudem zu einer Hemmung CoA-SH-abhängiger Stoffwechselprozesse führt. Durch Esterbindung der akkumulierenden Acylgruppen an Carnitin bilden sich Acylcarnitine, die mit dem Urin ausgeschieden werden und einen Carnitinverlust verursachen können.¹³ Stoffwechselentgleisungen drohen insbesondere in katabolen Phasen oder durch Eiweißexzesse. In diesen Situationen stauen sich die toxischen Metaboliten in kurzer Zeit an, was zu akuter Enzephalopathie mit schweren Hirnschädigungen oder zum Tod führen kann.¹⁴ Die Therapie besteht aus einer Restriktion der Zufuhr von natürlichem Eiweiß und einer Supplementation der nicht betroffenen Aminosäuren in Form eines speziellen Aminosäurengemisches sowie eventuell einer Supplementation von Carnitin und Cofaktoren. Eine katabole Stoffwechsellage ist streng zu vermeiden, und bei einer Stoffwechselentgleisung muss eine strikte Notfalltherapie durchgeführt werden.^{13,14}

In der Diagnostik steht der Nachweis der organischen Säuren im Urin mittels GC-MS sowie die Analyse der Acylcarnitine aus Trockenblut mit dem Tandem-MS an erster Stelle. Zur Konfirmationsdiagnostik können enzymatische und molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt werden.^{6,13}

3-Methylcrotonylglycinurie (3-MCG)

Es handelt sich hierbei um einen Defekt der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase. Durch den Mangel dieses biotinabhängigen Enzyms ist der Leucinabbau gestört.¹⁴ Die Inzidenz liegt bei etwa 1:40.000.¹⁰ Klinisch präsentiert sich diese Erkrankung äußerst variabel; sehr selten weisen Patienten frühe neurologische Symptome auf, und die meisten Patienten bleiben zeitlebens asymptomatisch.¹⁴ Da ein Großteil der Patienten benigne Phänotypen aufweist,⁴¹ ist diese Erkrankung inzwischen nicht mehr Bestandteil des NGS in Deutschland. Die laborchemisch entscheidenden Metaboliten sind 3-Methylcrotonylglycin, 3-Hydroxyisovalerat und C5OH.¹⁴

Methylmalonazidurie (MMA)

Bei der MMA liegt ein Defekt des Adenosylcobalamin abhängigen Enzyms Methylmalonyl-CoA-Mutase vor. Unterschieden wird zwischen einem primären Enzymdefekt aufgrund einer Mutation ohne Restaktivität (mut^0 - Mutation), einer Mutation mit Restaktivität des Enzyms (mut^- - Mutation) oder einem Mangel des Cofaktors Adenosylcobalamin bedingt durch Defekte im Cobalamin-Stoffwechsel.⁴² Bei den Cobalamin-Stoffwechseldefekten kann ausschließlich der Methylmalonatstoffwechsel (CblA, CblB) oder zudem die Remethylierung von Homozystein zu Methionin betroffen sein (CblC-CblG).⁴² Die Gesamtinzidenz liegt ungefähr bei 1:50.000.¹⁴ Es gibt sowohl foudroyante Verlaufsformen mit schweren ketoazidotischen Entgleisungen und Hyperammonämie bis hin zum Tod, als auch mildere Formen bei denen eine psychomotorische Retardierung im Vordergrund steht.⁴² Zu den Komplikationen im Verlauf zählen extrapyramidale Bewegungsstörungen, Osteoporose und eine progrediente Niereninsuffizienz.^{14,43,44} Im Urin sind die Metaboliten Methylmalonsäure, 3-Hydroxypropionat, Methylcitrat und C3-G nachweisbar. Mit dem Tandem-MS lassen sich C3 und C4DC detektieren.^{42,45}

Propionazidämie (PA)

Aufgrund eines Defekts der biotinabhängigen Propionyl-CoA-Carboxylase kann Propionyl-CoA nicht verstoffwechselt werden. Das Propionyl-CoA entsteht vor allem beim Abbau von Isoleucin, Valin, Methionin, Threonin, ungeradzahligen Fettsäuren, Thymin, Uracil und Cholesterolseitenketten.¹³ Die Häufigkeit dieser Erkrankung liegt ungefähr bei 1:100.000.⁴⁶ Das akkumulierende Propionyl-CoA hemmt wichtige Enzyme im Energiestoffwechsel und im Harnstoffzyklus, was zu Hyperammonämie, metabolischer Azidose, Hyperlaktatämie, Ketose und Hypoglykämie führt. Durch eine Hemmung des Glycin-Abbaus kommt es zudem zu einer Hyperglycinämie.⁴² Aufgrund der Knochenmarktoxizität

kommt es zu Thrombozytopenie und Leukopenie.¹⁴ Meistens tritt die schwerwiegende neonatale Form auf.⁴² Im Verlauf können die Patienten eine Kardiomyopathie, Pankreatitis, Niereninsuffizienz, Optikusatrophie, Hautprobleme, extrapyramidale Bewegungsstörungen und Hirninfarkte entwickeln.^{14,42,47–50} Laborchemisch relevant ist der Nachweis von Methylcitrat, C3G und 3-Hydroxypropionat im Urin und von C3 im Trockenblut.^{14,42,45,46}

Glutarazidurie Typ I (GA I)

Dieser Stoffwechseldefekt betrifft die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase, ein zentrales Enzym im Lysin-, Hydroxylysin- und Tryptophanabbau.⁵¹ In Deutschland trat dieser Enzymdefekt im Jahr 2011 mit einer Häufigkeit von 1:94.669 auf.¹² Diese Erkrankung unterscheidet sich von den anderen OA, da die Kinder zunächst keine akute Stoffwechselentgleisung aufweisen, sondern zunächst lediglich durch eine Makrozephalie auffällig werden. Die ersten klinischen Symptome treten mit durchschnittlich neun Lebensmonaten im Rahmen einer akuten enzephalopathischen Krise auf.^{14,52} Es entwickeln sich eine Striatumnekrose und eine fronto-temporale Atrophie mit resultierender schwerer irreversibler und progredienter dyston-dyskinetischer Bewegungsstörung.^{14,53,54} Es sind auch chronische und spät-manifeste adulte Verlaufsformen mit Leukoenzephalopathie bekannt.⁵⁵ Pathologisch zeigen sich eine erhöhte Ausscheidung von Glutarsäure und 3-Hydroxy-Glutarsäure im Urin und ein Nachweis von C5DC im Trockenblut.⁵⁶

Isovalerianazidämie (IVA)

Betroffen ist das Enzym Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase, welches am Abbau der Aminosäuren Leucin beteiligt ist.⁴² Die Prävalenz der Erkrankung war im Jahr 2011 in Deutschland 1:110.448.¹² Etwa die Hälfte der Patienten erleidet eine akute neonatale Stoffwechselkrise, die unter anderem auffällig werden kann mit Ketoazidose, Hyperammonämie, Lethargie, Koma, cerebralen Krampfanfällen und einem charakteristischen „Schweißfußgeruch“.^{14,42} Circa 50% der Patienten weisen eine chronisch intermittierende Form auf, die sich bis ins Erwachsenenalter hinein mit rezidivierender Ketoazidose und psychomotorischer Retardierung manifestieren kann.⁴² Die charakteristischen organischen Säuren im Urin sind C5G und 3- und 4-Hydroxyisovaleriansäure. C5 ist zudem im Trockenblut erhöht.^{14,42}

1.3.3 Aminoazidopathien

Die AA sind in ihrer Pathogenese und Ätiologie den OA sehr ähnlich. Es handelt sich um Störungen im Abbau und Umbau von Aminosäuren. Meist liegt ein Defekt von zytosolischen Enzymen vor und die sich anstauenden Metaboliten wirken neuro- oder hepatotoxisch. Auch diese Erkrankungen werden in der Regel diätisch mit einer Restriktion der Zufuhr an natürlichem Eiweiß und einer Supplementation spezieller Aminosäuregemische behandelt.¹³

Diese Krankheitsgruppe ist in dieser Arbeit von untergeordneter Bedeutung, daher wird nur kurz auf zwei der hier exemplarisch untersuchten Krankheiten eingegangen.

Tyrosinämie Typ I (Tyr I)

Dieser autosomal-rezessiv vererbte Defekt betrifft das Enzym Fumarylacetoacetat-Hydrolase und somit den Abbau der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Die Prävalenz beträgt ungefähr 1:100.000 Neugeborene.⁵⁷ Unterschieden wird zwischen:

- i. akuter Form mit Manifestation vor dem sechsten Lebensmonat mit akutem Leberversagen
- ii. subakuter Form mit Beginn zwischen dem sechsten Lebensmonat und dem ersten Lebensjahr
- iii. chronischer Form mit Beginn nach dem ersten Lebensjahr und zirrhotischem Umbau der Leber, Rachitis und tubulären Resorptionsstörungen¹⁴

Neben dem Risiko eines hepatozellulären Karzinoms entwickeln sich oft Nierenfunktionsstörungen, neurologische Krisen und eine Rachitis.⁵⁸⁻⁶⁰ Diagnostisch ausschlaggebend ist der Nachweis der organischen Säure Succinylaceton in Urin und Plasma. Im Plasma sind insbesondere die Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Methionin erhöht.¹⁴

Ahornsirupkrankheit oder „maple syrup urine disease“ (MSUD)

Betroffen ist der Verzweigt-kettige-2-Ketosäuren-Dehydrogenase-Komplex, ein Multienzymkomplex, der für den Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin benötigt wird.¹³ Die Prävalenz der Erkrankung betrug in Deutschland im Jahr 2011 1:165.671 Neugeborene.¹² Unterschieden werden auch hier drei Verlaufsformen:

- i. schwere neonatale Form mit Manifestation in den ersten Lebenstagen mit schwerer Ketoazidose, Enzephalopathie oder Tod

- ii. intermediäre Form mit Ernährungsproblemen, Entwicklungsrückstand und psychomotorischer Retardierung
- iii. intermittierende Form mit Entgleisungen in katabolen Situationen⁴²

Namensgebend ist der Uringeruch nach Ahornsirup.¹⁴ Mögliche neurologische Komplikationen sind zerebrale Ödeme und Myelinisierungsstörungen.^{61,62} Diagnostisch relevant sind eine Erhöhung der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin sowie der Nachweis von allo-Isoleucin im Plasma und die erhöhte Ausscheidung verzweigtkettiger Oxo- und Hydroxysäuren im Urin.¹³

1.4 Fragestellung/Zielsetzung

Einige angeborene Stoffwechselerkrankungen entsprechen nicht den von Wilson und Jungner 1968 formulierten Screening-Kriterien,⁶³ daher sind nicht alle Stoffwechselerkrankungen, die mittels MS/MS diagnostiziert werden können, Bestandteil des NGS. Bei einem positiven Befund im NGS erfolgt umgehend eine Kontrolle der Analyse; bei einem hochgradigen Verdacht auf eine Stoffwechselstörung erfolgt eine gezielte Konfirmationsdiagnostik. Deren Ziel ist der Nachweis spezifischer Metabolite, die direkt oder indirekt auf den entsprechenden Enzymdefekt zurückschließen lassen. Dabei gängige Methoden sind die Metaboliten-Untersuchungen von Blut, Plasma, Urin und Liquor.^{13,64} Dazu zählen auch die Analysen von Acylcarnitinen im Trockenblut mittels MS/MS^{65,66} und von organischen Säuren im Urin mittels GC-MS.³⁹ Diese Untersuchungsverfahren, insbesondere die GC-MS, sind arbeitsaufwendig, zeitintensiv und haben einen geringen Probendurchsatz.⁶⁷ So dauert die Analyse und Auswertung der organischen Säuren im Urin derzeit mehrere Stunden und erlaubt lediglich in Ausnahmefällen die Erstellung eines Befundes am Tag des Probeneingangs. Zudem kann die Diagnose der Erkrankungen im gut kompensierten metabolischen Stadium der Erkrankung schwierig sein, und milde Formen können leicht übersehen werden.^{67,68} Daher ist die Entwicklung eines neuartigen Analyseverfahrens, das eine schnellere Konfirmation von Verdachtsdiagnosen ermöglicht, anzustreben. Neben einer schnelleren Befunderhebung bietet ein ergänzendes Analyseverfahren zusätzliche Sicherheit in der Diagnosestellung. Dies trägt dazu bei, unnötige Behandlungen zu vermeiden und Kinder mit erblichen Stoffwechselerkrankungen schnellstmöglich zu therapieren.

Wie oben bereits dargestellt, beruht der Nachweis von FAO und OA auf einer Akkumulation von Acylcarnitinen. Zudem zeigt sich, dass diese Acylcarnitine zum Teil effektiv renal

ausgeschieden und nur schlecht tubulär rückresorbiert werden, sodass sie in relativ hoher Konzentration im Urin detektierbar sind.^{69,70} So konnten bereits früher mit Methoden wie der Fast Atom Bombardment Massenspektrometrie charakteristische Acylcarnitine im Urin einiger Patienten mit Stoffwechseldefekten bestimmt werden.^{71–73} Neben der bereits erwähnten Kopplung an Carnitin wird das akkumulierende Acyl-CoA zum Teil auch mit Glycin verestert.⁷⁴ Durch die Analyse der organischen Säuren im Urin mit GC-MS ist bekannt, dass für einige Stoffwechselerkrankungen spezifische Acylglycine im Urin nachzuweisen sind.^{39,75} Die Ausscheidung der Acylcarnitine und Acylglycine scheint überdies, anders als die Ausscheidung organischer Säuren, nahezu unabhängig von der klinischen Verfassung des Patienten zu sein.^{76,77}

Die MS/MS hat sich erfolgreich bewährt und zeichnet sich durch einen hohen Probandendurchsatz in sehr kurzer Zeit, die Möglichkeit der Automatisierung vieler Arbeitsschritte sowie präzise Ergebnisse aus. Neben der Bestimmung der Acylcarnitine im Trockenblut können diese im Plasma mittels MS/MS bestimmt werden.^{15,78,79} Die Frage ist daher, ob sich diese Methode ebenfalls zur Detektion von Acylcarnitinen und Acylglycinen im Urin eignet.

Einige Studien berichteten bereits vom erfolgreichen Nachweis dieser Substanzgruppen im Urin mittels MS/MS und lieferten erste Hinweise auf charakteristische Erhöhungen einzelner Acylcarnitine sowie Acylglycine für verschiedene angeborene Stoffwechselerkrankungen. So entwickelten Mueller et al. eine Methode, die mittels Elektrosprayionisation und tandem-massenspektrometrischer Detektion (ESI-MS/MS) butylierte Acylcarnitine im Urin ohne vorherige chromatografische Trennung nachwies. Sie bestimmten Referenzwerte für einige Acylcarnitine im Urin und untersuchten 18 Patienten mit metabolischen Störungen. Es gelang, Patienten mit FAO und Patienten mit OA von gesunden Kontrollpersonen abzugrenzen. Dabei waren die gefundenen Acylcarnitinprofile sowohl während einer akuten Stoffwechselentgleisung als auch in ausgeglichener Stoffwechsellage diagnostisch relevant.⁷⁶ Kobayashi et al. orientierten sich an der Methode von Mueller et al. und werteten Acylcarnitinprofile von 45 Patienten mit OA und FAO aus. Selbst bei unauffälliger Blutanalyse konnte, insbesondere bei mit L-Carnitin substituierten Patienten, ein Anstieg der diagnostischen Acylcarnitine im Urin gegenüber den von Mueller et al. veröffentlichten Referenzwerten gemessen werden.⁸⁰ Auch Duranti et al. wiesen mit ESI-MS/MS Acylcarnitine im Urin nach. Sie untersuchten die Ausscheidung langkettiger Dicarboxylcarnitine und sehr langkettiger Monocarboxylcarnitine bei Patienten mit peroxisoma-

len Erkrankungen.⁸¹ Smith et al. analysierten unter anderem im Urin butylierte Acylcarnitester mit ESI-MS/MS. Für sie war der direkte Nutzen der Acylcarnitinprofile im Urin aufgrund der diagnostischen Komplexität eingeschränkt, jedoch waren diese nützlich zur Bestätigung und weiterführenden Diagnostik ausgewählter Erkrankungen, wenn gängige Untersuchungen keine eindeutige Diagnose zuließen.¹⁵ Die Arbeitsgruppe um Pitt et al. entwickelte zwei ESI-MS/MS Methoden für Testungen im Urin. Sie analysierten zum einen positiv geladene butylierte Aminosäuren und Acylcarnitine und zum anderen negativ geladene organische Säuren in verdünnten Proben ohne vorherige Butylierung. Bei den meisten getesteten Stoffwechseldefekten war mindestens ein Metabolit gegenüber Kontrollwerten relevant erhöht.⁸² Auch Rebolledo-Fernandez et al. entwickelten und validierten ES-MS/MS Methoden, die es unter anderem ermöglichten butylierte Acylcarnitine (im positiven Ionenmodus) und einige Acylglycine (im negativen Ionenmodus) im Urin zu diagnostischen Zwecken schnell und zuverlässig zu bestimmen.⁸³ Bonafé et al. untersuchten methylierte Urinproben mittels ESI-MS/MS. Sie fanden charakteristische Acylglycinprofile für verschiedene metabolische Störungen. Insbesondere für den MCAD-Mangel und den MAD-Mangel ließen sich, unabhängig vom klinischen Status der Patienten, stets spezifische Ausscheidungsmuster der Acylglycine im Urin nachweisen.⁷⁷ Auch Ombrone et al. detektierten, nach vorheriger Flüssigkeitschromatografie, erfolgreich einige Acylglycine im Urin mittels MS/MS.⁸⁴

Alle diese Studien wiesen darauf hin, dass die Detektion von Acylcarnitinen und Acylglycinen im Urin erfolgversprechend zu sein scheint. Durchgeführt wurden die Studien jedoch meist an sehr kleinen Patientenkollektiven für lediglich einige wenige Erkrankungen. Ebenso fehlen aussagekräftige statistische Daten.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Evaluation einer Methode zur Bestimmung der Acylcarnitine und Acylglycine im Urin mittels Fließinjektion und tandem-massenspektrometrischer Detektion (FIA-MS/MS). Anhand der Proben gesunder Probanden werden Referenz- und Kontrollwerte für Acylcarnitine und Acylglycine im Urin ermittelt und darüber hinaus an einem Patientenpool charakteristische Musterprofile dieser beiden Substanzgruppen im Urin für verschiedene angeborene Stoffwechselerkrankungen erstellt. Schließlich ist die diagnostische Aussagekraft dieser Ausscheidungsprofile zu prüfen. Langfristiges Ziel ist die schnelle Konfirmation einer Verdachtsdiagnose aus dem Neugeborenen- oder selektiven Screening anhand des Acylcarnitin- bzw. Acylglycinprofils im Urin.

2 Methode

2.1 Patientenkollektiv und Materialgewinnung

Für diese Studie fand ausschließlich Restmaterial von Urinproben aus der Routinediagnostik Verwendung. Die Proben kamen aus dem Fachbereich Endokrinologie und Stoffwechsel (Labor Berlin GmbH, vormals Interdisziplinäres Endokrinologisches und Stoffwechsellabor der Charité) und sind dort ursprünglich zur Untersuchung der organischen Säuren eingegangen. Nach erfolgter Diagnostik wurden die Urinproben bei -20°C konserviert und bei gegebener Eignung mit der hier vorgestellten Methode erneut analysiert. Die Untersuchung umfasste Proben aus dem Zeitraum November 2009 bis Februar 2011. Eingang fanden Urinproben vom Neugeborenen- bis zum Erwachsenenalter ohne pathologischen Befund und alle jener Patienten, mit einer gesicherten Diagnose einer der zu untersuchenden Stoffwechselerkrankungen. Diese Patienten wurden alle in der Stoffwechselsprechstunde der Klinik für Pädiatrie m. S. Endokrinologie, Gastroenterologie und Stoffwechselmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin betreut. Entsprechend des Endbefundes der Routinediagnostik erfolgte eine Zuordnung der Proben in eine der folgenden Gruppen.

- **Kontrollgruppe**

Stoffwechselgesunde Probanden: alle im Untersuchungszeitraum eingegangen Urinproben, bei denen die erweiterte Stoffwechseldiagnostik einen unauffälligen Befund erbrachte

- **Angeborene Stoffwechseldefekte**

Gruppe A: Alle im Untersuchungszeitraum eingegangen Proben von Patienten mit nachgewiesenen FAO oder OA. Diese Gruppe war unterteilt in die folgenden Untergruppen:

- MCADD
- MMA
- PA
- IVA
- GA I
- GA II
- 3-MCG
- Andere FAO: VLCADD, SCADD, LCHADD, CPT I

Gruppe B: Aus der Erkrankungsgruppe der AA wurden lediglich stichprobenartig einige wenige Urinproben aus dem gesamten Untersuchungszeitraum herausgegriffen und exemplarisch für die nachstehenden beiden Erkrankungen untersucht:

- Tyr I
- MSUD

Als Goldstandard, das heißt als etabliertes Verfahren zur Diagnosestellung des wahren Krankheitsstatus der Probanden,⁸⁵ dienen die Verfahren der erweiterten Stoffwechsellagnostik: die Bestimmung der organischen Säuren im Urin mittels GC-MS, die Bestimmung der Aminosäuren im Plasma mittels Ionenaustauschchromatografie sowie die Trockenblutanalyse auf Acylcarnitine mittels MS/MS.

Ausgeschlossen wurden Urinproben mit zu geringem Restmaterial und Urinproben, deren Endbefund keine eindeutige Zuordnung in eine der oben genannten Gruppen zuließ.

Bei der Einteilung erfolgte keine Unterscheidung der Stoffwechsellage der entsprechenden Erkrankung. Die untersuchten Proben stammen sowohl von Patienten mit einer akuten Stoffwechsellage, als auch von Patienten in einem gut kompensierten Stadium der Erkrankung. Vorwiegend handelte es sich um Verlaufskontrollen von Patienten mit einer ausgeglichenen Stoffwechsellage.

Tabelle 3 zeigt das erfasste Patientenkollektiv. Die niedrigen Prävalenzen der Stoffwechselfekte (z.B. MCADD 1:8.720¹²) bedingen kleine Fallzahlen. Aus diesem Grund wurden auch unterschiedliche Urinproben des gleichen Patienten untersucht. Diese Proben stammten von unterschiedlichen Tagen und waren daher nicht aus der gleichen Stoffwechsellage, sodass diese als unabhängige Proben zu werten sind.

Tabelle 3: Untersuchte Urinproben

Diagnose	Probenanzahl	Patientenanzahl	Verlaufsform
Normalbefunde	359	345	
MCADD	98	33	mild: 6 moderat: 38 klassisch: 54
MMA	53	mut-0-Mut.: 23 Proben von 2 Patienten Cbl-Defekt: 30 Proben von 6 Patienten	moderat: 21 klassisch: 32
PA	19	3	moderat: 8 schwer: 11
IVA	19	6	mild: 19
GA II	15	3	mild: 15
GA I	12	4	mild: 6 moderat: 4 schwer: 2
3-MCG	11	4	benigne: 11
andere FAO	10	VLCADD: 6 Proben von 3 Patienten SCADD: 2 Proben von 1 Patient LCHADD: 1 Probe CPT I: 1 Probe	mild: 9 schwer: 1
Tyr I	10	1	klassisch: 10
MSUD	8	6	mild: 3 schwer: 5

Die 359 Proben der stoffwechselgesunden Probanden wurden den fünf Altersgruppen aus Diagramm 1 zugeteilt.

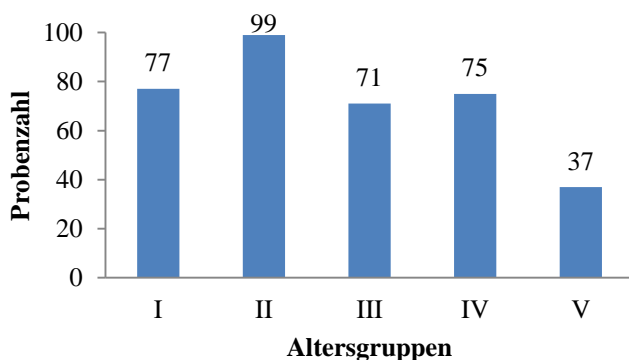


Diagramm 1: Einteilung der Altersgruppen

Gruppe I: < 1 Monat; Gruppe II \geq 1 Monat bis < 2 Jahre; Gruppe III \geq 2 Jahre bis < 5 Jahre; Gruppe IV \geq 5 Jahre bis < 16 Jahre; Gruppe V \geq 16 Jahre

Insgesamt wurden 129 Proben weiblicher und 230 Proben männlicher stoffwechselgesunder Probanden überprüft.

Die Ethikkommission stimmte dem geplanten Projekt zu (Antragsnummer: EA2/065/11).

2.2 Probenaufbereitung

Vorbereitung der Urinprobe

Um für die folgenden Urinuntersuchungen einen möglichen Matrixeffekt zu minimieren, wurden die Proben vor der Analyse auf einen Kreatininwert von 1mmol/l verdünnt. Entsprechend des bereits im Vorfeld im Fachbereich Klinische Chemie photometrisch mit Hilfe der Jaffé-Reaktion⁸⁶ bestimmten Kreatininwertes erfolgte eine Verdünnung mit destilliertem Wasser (H₂O). Es schloss sich eine dreiminütige Zentrifugation^{vii} der verdünnten Urinproben mit 10.000 Umdrehungen an. Nachfolgend wurden 20µl des Überstandes in ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die weitere Aufbereitung unterschied sich für die beiden untersuchten Substanzgruppen und wird getrennt erläutert.

Aufbereitung für die Acylcarnitinbestimmung

Diese Aufbereitung erfolgte modifiziert nach Mueller et al.⁷⁶ Mit dem Ziel einer schnelleren und einfacheren Aufbereitung erfolgte jedoch keine Butylierung.

- Zugabe von 180µl Methanol (CH₄O) pro Well (Verdünnung 1:10)
- 10 Minuten schütteln der Mikrotiterplatte auf einem Schüttler^{viii}
- 30 Minuten Inkubation im Kühlschrank
- 10µl Überstand in eine neue Mikrotiterplatte pipettieren
- Zugabe von je 100µl Standardlösung je Well
- 10 Minuten schütteln

Bei dem verwendeten internen Standard handelte es sich um ein fertiges Standard-Kit der Firma Chromsystems^{ix}, Bestandteil des Kits zur Analyse von Aminosäuren und Acylcarnitinen in Trockenblut. Die einzelnen Konzentrationen der im Standard enthaltenen deuterierten Acylcarnitine sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

^{vii} Zentrifuge: Biofuge pico Heraeus instruments

^{viii} Heidolph Titramax 101 450 rpm

^{ix} MassChrom® Internal Standard Labeled Amino Acid, Acylcarnitines Order no. 55004

Aufbereitung für die Acylglycinbestimmung

Diese Vorbereitung der Urinproben orientierte sich an Pitt et al.⁸²

- Zugabe von 200µl Standardlösung pro Well
- 10 Minuten schütteln der Mikrotiterplatte
- 30 Minuten Inkubation im Kühlschrank

Die interne Standardlösung entstammte eigener Herstellung. Alle verwendeten Reinstanzen wurden von Dr. Herman J. ten Brink^x bezogen. Die Standardlösung enthielt D3-Propionylglycin, D9-Isovalerylglycin, D3-Hexanoylglycin und D3-Dodecanoylglycin gelöst in CH₄O und hat eine Konzentration von 5µmol/l.

2.3 Tandem-Massenspektrometrie

Einleitend folgen Grundlagen zum angewendeten Verfahren der MS/MS. Im Anschluss wird die entwickelte Methode vorgestellt.

2.3.1 Funktionsweise und instrumenteller Aufbau

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, das Ionen in der Gasphase nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) auftrennt und anschließend registriert. Die erzeugten Massenspektren zeigen, welche Ionen in welchen relativen Mengen gebildet wurden und geben somit Rückschlüsse auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung von Substanzproben.⁸⁷

Grundsätzlich besteht ein Massenspektrometer aus vier Funktionseinheiten.⁸⁸

- I. Probenzuführung
- II. Ionenerzeugung
- III. Massentrennung
- IV. Ionennachweis

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Tandem-MS handelte es sich um das Triple-Quadrupol Massenspektrometer 4000QTRAP[®] der Firma AB Sciex^{xi} (s. Abbildung 3). Die verwendete Ionisationstechnik ist die Elektrosprayionisation.

^x Dr. Herman J. ten Brink VU Medical Center Amsterdam, Niederlande (www.vumc.nl/metabool/index.html)

^{xi} (<http://www.absciex.com/products/mass-spectrometers/qtrap-systems/4000-qtrap-lcmsms-system>)



Abbildung 3: Tandem-MS

Verwendetes Tandem-MS 4000QTRAP® der Firma AB Sciex. Außerdem abgebildet sind der Autosampler sowie das HPLC-System.

I. Probenzuführung

An das Massenspektrometer ist ein Autosampler^{xii} angeschlossen. Dies ist ein kleiner Roboter, der nach einem voreingestellten Programm die benötigte Probenmenge aus der vorbereiteten Mikrotiterplatte entnimmt und über ein Hochdruckflüssigkeitschromatografie(HPLC)-System^{xiii} in das Massenspektrometer injiziert. Bei der hier verwendeten Methode wurde keine Trennsäule verwendet, sodass im Vorfeld keine chromatografische Trennung der Lösung erfolgte. Man spricht in diesem Fall von einer Fließinjektionsanalyse (FIA).

II. Ionen-Erzeugung

Bei der hier verwendeten Elektrosprayionisation wird die Probenlösung durch eine feine Metallkapillare geleitet, an deren Spitze eine Hochspannung angelegt ist. Dadurch kommt es zur Verstäubung und Aufladung der Lösung. Die Aerosolbildung wird zusätzlich unterstützt durch einen Stickstoff (N₂)-Strom („Nebulizer Gas“). Es entstehen Nebeltröpfchen, welche einen Überschuss an positiver oder negativer Ladung aufweisen. Durch Verdampfung des neutralen Lösungsmittels, unterstützt durch einen Strom heißen N₂, werden die Tröpfchen immer kleiner, während ihre Oberflächenladung stetig zunimmt. Wird eine bestimmte Ladungsgrenze, das sogenannte Rayleigh-Limit erreicht, übersteigt die Coulomb-Abstoßung der gleichsinnigen Ladungen die Oberflächenspannung und die Tröpfchen zerfallen in kleinere Tröpfchen (Coulomb-Explosion). Zur endgültigen Entstehung freier Ionen gibt es zwei Modellvorstellungen:

^{xii} HTS PAL der Firma CTC Metabolitics

^{xiii} HPLC: UFLC prominence der Firma Shimadzu, bestehend aus Controller, zwei Hochdruckgradientenpumpen mit Degasser und einem Säulenofen

- „charged residue model“: Es bleiben nach mehrfacher Wiederholung dieses Prozesses am Ende nur hoch geladene Ionen zurück
- „ion evaporation model“: Es kommt schließlich zum Austritt von Ionen aus den Tropfen in die Gasphase

Der Übertritt der Ionen in die Gasphase findet bei normalem Luftdruck statt. Da die Vorgänge im Analysatorteil im Hochvakuum stattfinden, werden die Ionen nun über ein Blendsystem unter Absaugung von Luft und Lösungsmitteldämpfen in das Massenspektrometer überführt.^{39,87,89} Abbildung 4 zeigt schematisch das Prinzip der Elektrosprayionisation.

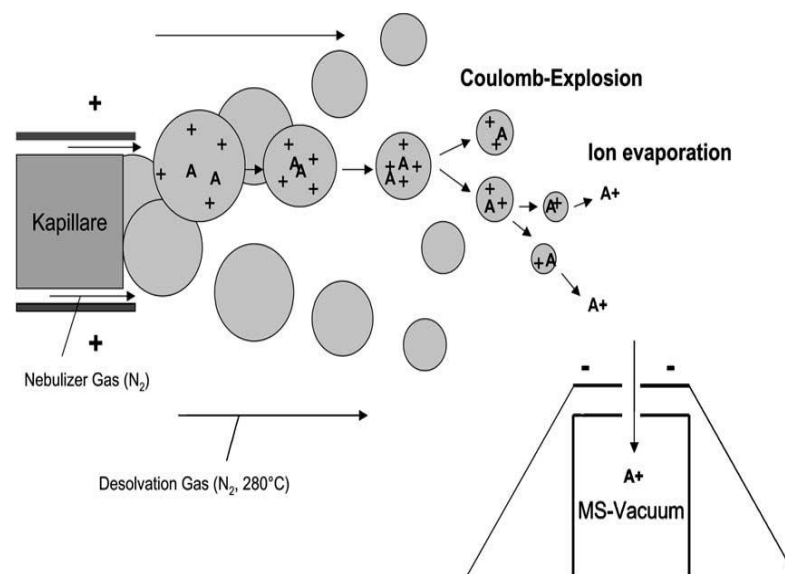


Abbildung 4: Prinzip der Elektrosprayionisation zur Erzeugung freier Ionen (übernommen von Vogeser)⁸⁹

Die durch eine Metallkapillare geleitete Probenlösung wird verstäubt und aufgeladen. Durch Verdampfung des Lösungsmittels werden die entstandenen Tröpfchen immer kleiner, während ihre Oberflächenladung stetig zunimmt. Schließlich übersteigt die Abstoßung der gleichsinnigen Ladungen die Oberflächenspannung und die Tropfen zerfallen weiter, bis nur noch freie Ionen zurück bleiben bzw. freie Ionen austreten, welche in das Tandem-MS überführt werden.

III. Massentrennung

In den Quadrupol-Analysatoren erfolgt die Ionentrennung durch Ablenkung der verschiedenen Massen mittels elektrischer Felder. Ein Quadrupol besteht aus vier parallel und quadratisch zueinander angeordneten Stabelektroden, dabei sind die sich gegenüberliegenden Elektroden elektrisch miteinander verbunden. An diese werden eine variable und jeweils entgegengesetzte Gleichspannung und eine radiofrequenz-modulierbare Wechsel-

spannung angelegt. Treten nun die durch eine Spannung beschleunigten Ionen in diesen Quadrupol ein, werden sie durch die anliegende Frequenz in eine spiralförmige Flugbahn gebracht. Durch eine geeignete Abstimmung der Gleich- und Wechselspannung wird erreicht, dass nur ein Ion einer spezifischen Masse eine stabile Oszillation ausführt und das Stabsystem durchqueren kann. Die Ionen anderer Massen werden zu stark abgelenkt und seitlich aus dem Quadrupol entfernt. Das hier verwendete Tandem-MS arbeitet mit zwei hintereinander geschalteten Massenfiltern. Zunächst wird ein Ion definierter Masse („Mutter-Ion“) im ersten Quadrupol selektiert und anschließend in eine Kollisionszelle gelenkt. Beim Zusammenstoß mit dem sich in der Kollisionskammer befindenden Inertgas zerfallen die Ionen auf Grund der Stoßenergie in Fragmentionen („Tochter-Ionen“). Diese werden im Anschluss einem zweiten Quadrupol-Massenfilter zugeleitet. Hier wird erneut ein spezifisches Ion (Fragment) herausgefiltert und schließlich dem Detektor zugeführt.^{39,87–89}

Abbildung 5 illustriert das Prinzip der MS/MS schematisch.

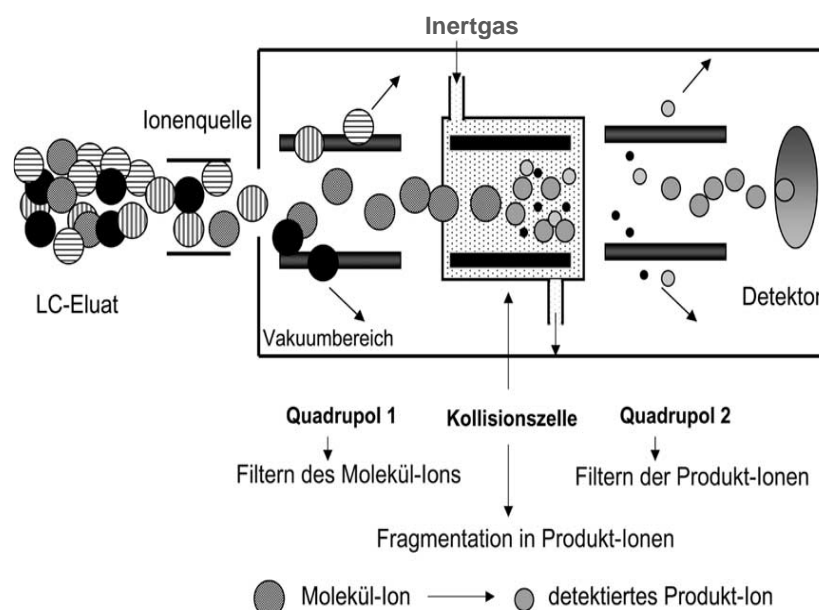


Abbildung 5: Prinzip der MS/MS (übernommen von Vogeser)⁸⁹

Selektion von Ionen in den Quadrupolen, Bildung von Fragmentionen in der Kollisionskammer und abschließende Detektion spezifischer Ionen

IV. Ionennachweis

Am Ausgang des Analysators befindet sich ein Detektor, auf dem die Ionensorten nacheinander auftreffen. Ein Sekundärelektronenvervielfacher registriert die Intensitäten der Entladungsströme. Die erhaltenen Signale werden digitalisiert und auf dem angeschlossenen Computer gespeichert.⁸⁷

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der hierfür konzipierten Software Analyst^{®xiv}. Das Diagramm 2 zeigt beispielhaft ein von Analyst[®] erzeugtes Massenspektrum für Acylcarnitine einer Kalibrationsprobe. Aufgetragen ist die gemessene Intensität in Abhängigkeit vom m/z der detektierten Metaboliten. Im dargestellten Beispiel sind deutliche Peaks für die Molmassen 246 (C5), 288 (C8), 372 (C14) und 400 (C16) erkennbar.

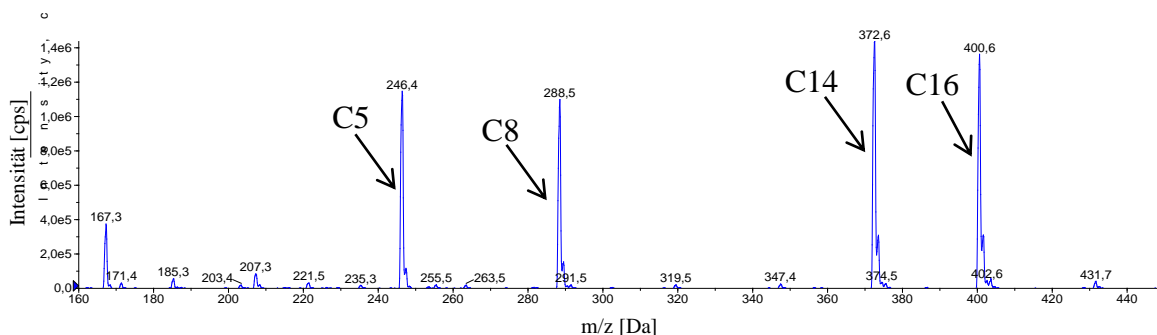


Diagramm 2: Beispiel für ein Massenspektrum einer Kalibrationsprobe

Gemessen wurden die Acylcarnitine C5, C8, C14 und C16.

Die MS/MS ermöglicht es, in weniger als einer Sekunde zwischen einer Vielzahl spezifischer Massenübergängen von Mutter- auf Tochter-Ionen hin und her zu wechseln, weshalb gleichzeitig zahlreiche Metaboliten quantifiziert werden können.⁸⁹ Die Bestimmung der Acylcarnitine und Acylglycine mit der hier beschriebenen Methode dauert pro aufbereiteter Urinprobe lediglich vier Minuten.

2.3.2 Weitere Begrifflichkeiten zur Massenspektrometrie

Beim „**Multiple Reaction Monitoring**“ (MRM) Verfahren (Abbildung 6) wird im ersten Quadrupol ein Mutter-Ion selektiert, dieses im zweiten Quadrupol fragmentiert und im dritten Quadrupol ein charakteristisches Tochter-Ion selektiert und bestimmt.

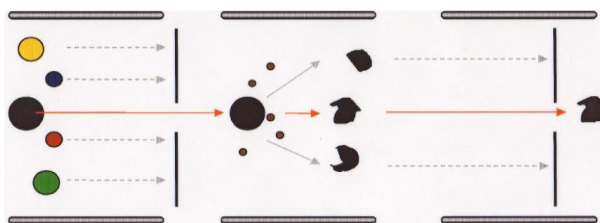


Abbildung 6: MRM Verfahren (übernommen von ABSciex)^{xv}

Fragmentierung eines zuvor selektierten Mutter-Ions und Detektion eines Tochter-Ions.

^{xiv} Analyst[®] 1.5.1 der Firma Applied Biosystems

^{xv} Mit freundlicher Genehmigung von ABSciex: Abbildung aus Schulungsunterlagen der Firma ABSciex (<http://www.absciex.com/>) zum API 2000

Beim „**Precursor Ion Scan**“ Verfahren (Abbildung 7) wird der erste Quadrupol so eingestellt, dass die Mutter-Ionen zeitlich versetzt den Quadrupol passieren können. Im zweiten Quadrupol wird wiederum fragmentiert und im dritten Quadrupol schließlich ein charakteristisches Ion selektiert. Dieses Verfahren war möglich, da sowohl die Acylcarnitine als auch die Acylglycine das jeweils charakteristische Fragment bilden. Damit ist die Erfassung der jeweiligen ganzen Substanzklasse möglich.

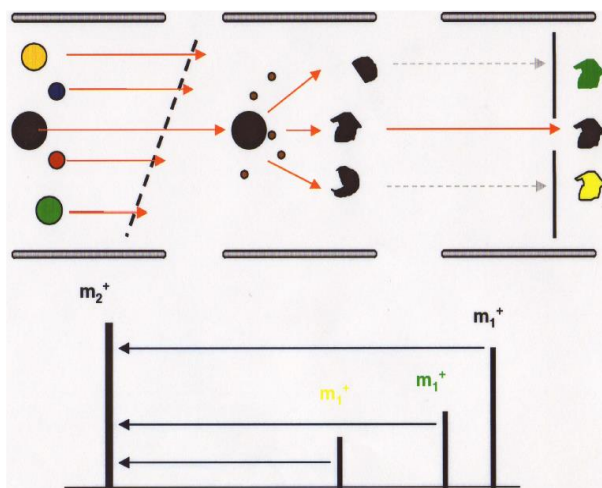


Abbildung 7: Precursor Ion Scan Verfahren (übernommen von ABSciex)^{xv}

Zeitlich versetzte Fragmentierung von Mutter-Ionen und Detektion charakteristischer Tochter-Ionen.

2.3.3 Protokoll der programmierten Methode

Die folgende Tabelle 4 stellt die vorgenommenen Einstellungen am Tandem-MS dar. Die Massenübergänge, die Steuerung des Flusses und die charakteristischen Energien wurden durch die manuelle Injektion reiner Kalibratoren optimiert. Programmiert wurde eine Methode für die Bestimmung der Acylcarnitine und eine separate Methode zur Bestimmung der Acylglycine. Außerdem wurde für alle auf den internen Standard D9-C5-Glycin bezogene Metaboliten innerhalb der Methode für Acylglycine ein zusätzliches Experiment programmiert. Dies war nötig, da sich herausstellte, dass anderenfalls die unten beschriebene Berechnung der Konzentration mit dem Programm ChemoView^{TM®xvi} für diese Metaboliten zu falschen Ergebnissen geführt hätte.

^{xvi} Software ChemoViewTM Von der Firma AB SCIEX, Deutschland

Tabelle 4: Einstellungen am Tandem-MS

	Acylcarnitine	Acylglycine	D9-C5-Glycin
Analyseverfahren	Flow Injection	Flow Injection	Flow Injection
Scan Typ	Precursor Ion	Precursor Ion	MRM
Polarität	Positiv	Negativ	Negativ
Anzahl der Scans	30	56	
Q1 Massenbereich	m/z 160 – 450	m/z 100 – 430	m/z 166,9
Q3 Precursor Ion	m/z 85	m/z 74	m/z 75
Kapillarspannung	5500 V	-4500 V	-4500 V
Kollisionsgas	N ₂	N ₂	N ₂
Spüllösung	H ₂ O & CH ₄ O	H ₂ O & CH ₄ O	H ₂ O & CH ₄ O
DP ^{xvii}	49 – 60 V	(-45) – (-110) V	(-70) V
CE ^{xviii}	26 – 57 V	(-14) – (-58) V	(-18) V
CXP ^{xix}	6 – 14 V	(-5) – (-11) V	(-3) V
Injektionsvolumen	20 µl	20 µl	20 µl
Laufmittel	Chromsystems ^{xx}	Chromsystems ^{xx}	Chromsystems ^{xx}
Flussrate	Beginn 200µl/min nach 0,5 Min 60µl/min nach 0,8 Min 200µl/min	Beginn 200µl/min nach 0,5 Min 60µl/min nach 0,8 Min 200µl/min	Beginn 200µl/min nach 0,5 Min 60µl/min nach 0,8 Min 200µl/min

2.4 Auswertung der Messdaten

2.4.1 Kalibrierung

Die Empfindlichkeit des Massenspektrometers, das heißt die ermittelte Peakhöhe in Abhängigkeit von der eingesetzten Substanzmenge, variierte für die verschiedenen Metaboliten. So war bei gleichen ursprünglichen Konzentrationen zum Beispiel die Peakhöhe im Massenspektrum von C5G im Vergleich zu C5:1G bis zu 30 Mal höher. Obwohl beide Substanzen die gleiche Kettenlänge besitzen, ionisierte C5:1G aufgrund der Doppelbin-

^{xvii} Declustering Potential

^{xviii} Collision Energy

^{xix} Cell Extrance Potential

^{xx} Kitbestandteil des Kits zur Bestimmung von Aminosäuren und Acylcarnitinen mittels LC-MS/MS von Chromsystems Heimbургstraße 3 81243 München Bestellnummer: REF 55001

derung um ein Vielfaches schlechter. Daher war es nötig, für jeden zu untersuchenden Metaboliten mit entsprechenden Reinsubstanzen eine Kalibrationsfunktion zu erstellen. Die Steigung der ermittelten Kalibrationsfunktion gab dabei die Empfindlichkeit an.⁸⁷ Es erfolgte eine dreimalige Erstellung entsprechender Kalibrierungskurven. Dafür wurden Lösungen mit verschiedenen Reinsubstanzen^{xxi} in den Konzentrationen 40µmol/l, 80µmol/l, 120µmol/l, 160µmol/l und 200µmol/l hergestellt. Die verwendeten Reinsubstanzen und das jeweils verwendete Lösungsmittel finden sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Lösungsmittel und Reinsubstanzen der Kalibrierung

Substanz	C2G	C3G	C5:1G	C5G	C6G	C8DCG	C14G	C18:1G	
Lösungsmittel	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	C ₂ H ₆ O	H ₂ O	H ₂ O	C ₂ H ₆ O	C ₂ H ₆ O	
Substanz	P-C3G	C4G	C7G	C0	C2	C8	C5	C14	C16
Lösungsmittel	C ₂ H ₆ O	C ₂ H ₆ O	C ₂ H ₆ O	H ₂ O	H ₂ O	CH ₄ O	CH ₄ O	CH ₄ O	CH ₄ O

(C₂H₆O = Ethanol)

Die Aufarbeitung entsprach der üblichen Aufarbeitung für das Tandem-MS mit der Ausnahme, dass statt der 20µl Urin die Zugabe von 20µl des jeweiligen Lösungsmittels erfolgte. Der Mittelwert aller drei grafisch ermittelten Steigungen wurde als Maß für die Empfindlichkeit gewählt. Im Folgenden wurde dieser Wert als „Response Faktor“ bezeichnet. Die berechneten und im Weiteren angewendeten Response Faktoren sind Tabelle 6 zu entnehmen. Für einige Metaboliten waren keine Reinsubstanzen vorhanden und somit keine Ermittlung eigener Kalibrationsfunktionen möglich. Für diese Metaboliten wurde der Response Faktor eins angenommen.

Das folgende Diagramm 3 gibt exemplarisch zwei erstellte Kalibrationsfunktionen wieder.

^{xxi} Alle Substanzen bezogen von Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com) und Dr. Herman J. ten Brink VU Medical Center Amsterdam, Niederlande (www.vumc.nl/metabool/index.html), sowie von BACHEM (<http://shop.bachem.com/ep6sf/>). Genaue Zuordnung s. Tabelle 6

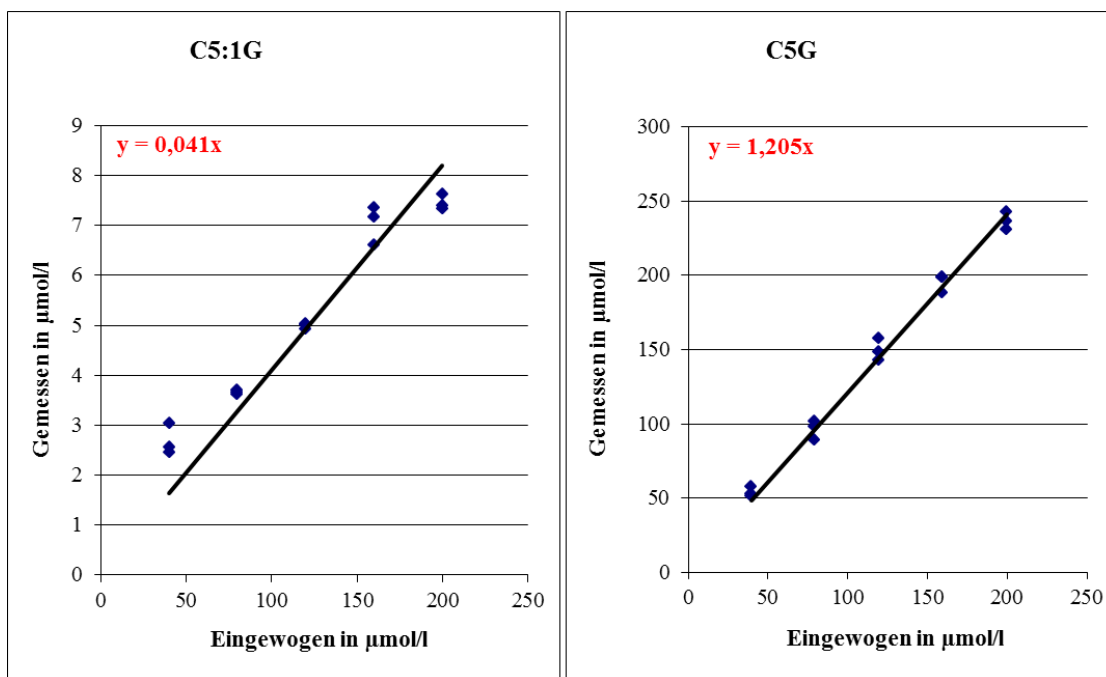


Diagramm 3: Kalibrationsfunktionen

Geringere Empfindlichkeit des Tandem-MS bei der Detektion von C5:1G ($y=0,041x$) im Vergleich zu C5G ($y=1,205x$).

2.4.2 Konzentrationsbestimmung

Vor der Analyse wurde jeder Probe eine bekannte Konzentration eines internen Standards zugesetzt. In dieser Arbeit kamen deuterierte Analoga der jeweiligen Metaboliten zur Anwendung. Die ermittelten Peakhöhen der gesuchten Metaboliten wurden in Relation zu den Peakhöhen der internen Standards gesetzt. Da die Konzentration des jeweiligen internen Standards bekannt war, konnte aus dem Flächenquotienten des Analytensignals zum internen Standard die gesuchte Konzentration errechnet werden.^{39,90} War kein eigener stabilisotopenmarkierter Standard für den Metaboliten vorhanden, so wurde der Standard verwendet, dessen molekulare Masse der des Metaboliten am nächsten kam. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit der Software ChemoView^{TM®}. Nach entsprechender Programmierung berechnete diese Software aus den von Analyst[®] erstellten Massenspektren die Konzentrationen der gesuchten Metaboliten. Die gesuchten Konzentrationen konnten dann einer entsprechenden Tabelle entnommen werden. Tabelle 6 zeigt alle in ChemoView^{TM®} programmierten zu analysierenden Substanzen, deren verwendeten Abkürzungen, deren Zuordnung zu den jeweiligen internen Standards, sowie deren Molmassen und den jeweiligen Response Faktor. Die Molmassen wurden der Human Metabolome Data-

base^{xxii} entnommen oder selbst berechnet. Zudem sind die entsprechenden Konzentrationen der internen Standards zu entnehmen. In einigen Fällen konnte aufgrund der gleichen Molmasse zweier unterschiedlicher Acylcarnitine nicht zwischen diesen unterschieden werden. Die Konzentration dieser isobaren Verbindungen wurde folglich als Summe der entsprechenden Mengen beider Metaboliten erfasst. Daher sind diese Isobare auch in Tabelle 6 als Summe abgebildet. Zu Bedenken ist, dass auch andere hier nicht ausdrücklich erwähnte Isobare mit erfasst werden könnten.

Tabelle 6: Programmierung ChemoViewTM[®]

Substanz	Abkürzung	Molmasse	Interner Standard	Konzentration ^{xxiii}	Response Faktor	Hersteller ^{xxiv}
Carnitin	C0	162,1	D9-C0	0,353	0,99	SA
Acetylcarnitin	C2	204,1	D3-C2	1,57	0,87	SA
Propionylcarnitin	C3	218,1	D3-C3	0,042	1	X
Butyrylcarnitin	C4	232,1	D3-C4	0,019	1	X
Hydroxybutyrylcarnitin + Malonylcarnitin	C4OH + C3DC	248,2	D3-C4	0,019	1	X
Isovalerylcarnitin	C5	246,2	D9-C5	0,022	0,69	H
Tiglylcarnitin	C5:1	244,2	D9-C5	0,022	1	X
Glutarylarnitin + Hydroxyhexanoylcarnitin	C5DC + C6OH	276,1	D6-C5DC	0,017	1	X
3-Hydroxyisovalerylcarnitin + Methylmalonylcarnitin	C5OH + C4DC	262,2	D9-C5	0,022	1	X
Hexanoylcarnitin	C6	260,2	D3-C6	0,019	1	X
Adipylcarnitin	C6DC	290,2	D6-C5DC	0,017	1	X
Octanoylcarnitin	C8	288,0	D3-C8	0,02	0,62	H
Octenoylcarnitin	C8:1	286,2	D3-C8	0,02	1	X
Decanoylcarnitin	C10	316,2	D3-C10	0,021	1	X
Decenoylcarnitin	C10:1	314,2	D3-C10	0,021	1	X
Hydroxydecenoylcarnitin	C10:1OH	330,3	D3-C10	0,021	1	X
Decadienoylcarnitin	C10:2	312,2	D3-C10	0,021	1	X
Dodecanoylcarnitin	C12	344,3	D3-C12	0,02	1	X

^{xxii} Siehe <http://www.hmdb.ca/>

^{xxiii} Konzentration des internen Standards in $\mu\text{mol/l}$

^{xxiv} Hersteller von dem die Reinsubstanz bezogen wurde.

SA: Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com)

H: Dr. Herman J. Brink VU Medical Center Amsterdam, NL (www.vumc.nl/metabool/index.html)

B: Bachem (<http://shop.bachem.com/ep6sf/>)

X: keine Reinsubstanz vorhanden gewesen

Dodecenoylcarnitin	C12:1	342,3	D3-C12	0,02	1	X
Hydroxydodecenoylcarnitin	C12:1OH	358,3	D3-C12	0,02	1	X
Hydroxydodecanoylcarnitin	C12OH	360,3	D3-C12	0,02	1	X
Myristoylcarnitin	C14	372,3	D3-C14	0,018	0,54	H
Tetradecenoylcarnitin	C14:1	370,3	D3-C14	0,018	1	X
Hydroxytetradecenoylcarnitin	C14:1OH	386,3	D3-C14	0,018	1	X
Tetradecadienoylcarnitin	C14:2	368,3	D3-C14	0,018	1	X
Hydroxytetradecanoylcarnitin	C14OH	388,3	D3-C14	0,018	1	X
Palmitoylcarnitin	C16	400,3	D3-C16	0,037	0,59	H
Hexadecenoylcarnitin	C16:1	398,3	D3-C16	0,037	1	X
Hydroxyhexadecenoylcarnitin	C16:1OH	414,3	D3-C16	0,037	1	X
Hydroxyhexadecanoylcarnitin	C16OH	416,3	D3-C16	0,037	1	X
Stearoylcarnitin	C18	428,3	D3-C18	0,33	1	X
Octadecenoylcarnitin	C18:1	426,3	D3-C18	0,033	1	X
Hydroxyoctadecenoylcarnitin	C18:1OH	442,4	D3-C18	0,033	1	X
Octadecadienoylcarnitin	C18:2	424,4	D3-C18	0,033	1	X
Hydroxyoctadecadienoylcarnitin	C18:2OH	440,4	D3-C18	0,033	1	X
Hydroxyoctadecanoylcarnitin	C18OH	444,4	D3-C18	0,033	1	X
Hydroxymethylglutarylcarnitin	HMG	306,3	D6-C5DC	0,017	1	X
Acetylglycin	C2G	116	D3-C3G	5	0,8	H
Phenylacetylglycin	P-C2G	192	D3-C6G	5	1	X
Propionylglycin	C3G	130,1	D3-C3G	5	0,97	H
Phenylpropionylglycin	P-C3G	206	D3-C6G	5	0,83	H
Isobutyrylglycin	C4G	144	D3-C3G	5	0,83	H
Hydroxybutyrylglycin	C4OHG	160	D9-C5G	5	1	X
Tiglylglycin	C5:1G	156,1	D9-C5G	5	0,04	H
Glutarylglycin	C5DCG	188	D9-C5G	5	1	X
Isovalerylglycin	C5G	158,1	D9-C5G	5	1,18	H
Hydroxyvalerylglycin	C5OHG	174	D9-C5G	5	1	X
Hexanoylglycin	C6G	172,1	D3-C6G	5	0,97	H
Heptenoylglycin	C7:1G	184	D3-C6G	5	1	X
Heptanoylglycin	C7G	186	D3-C6G	5	1,12	H
Suberylglycin	C8DCG	230,1	D3-C12G	5	0,55	H
7-Hydroxyoctanoylglycin	C8OHG	216	D3-C12G	5	1	X
Myristoylglycin	C14G	284,4	D3-C12G	5	0,9	B
Oleoylglycin	C18:1G	338,3	D3-C12G	5	0,91	SA

2.5 Analysen zur Methodenvalidierung

Nachweisgrenze

Um zu bestimmen, in welchem Konzentrationsbereich die hier angewandte Methode zuverlässig misst, wurde das „Limit of Detection“ (LOD) bestimmt. Diese Nachweisgrenze ist definiert als die kleinstmögliche Menge eines Metaboliten, die vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden ist. Im Allgemeinen ist hierunter die Konzentration eines Metaboliten zu verstehen, deren Signal im Massenspektrum einen dreimal höheren Peak ergibt als die Peakhöhe des zu detektierenden Hintergrundrauschens eines Leerwertes.⁹¹ Zur Bestimmung des LOD wurden Verdünnungsreihen der angesetzten Kalibrierungslösungen in den Konzentrationen 5 μM , 4 μM , 3 μM , 2 μM , 1 μM , 0,5 μM , 0,4 μM , 0,3 μM , 0,2 μM und 0,1 μM hergestellt, analysiert und die erhaltenen Massenspektren mit der Software Analyst[®] ausgewertet.

Matrixeffekt

Der Matrixeffekt ist die direkte oder indirekte Beeinflussung oder Verfälschung der Messergebnisse durch in der Probe vorkommende interferierende Metaboliten.⁹² Ohne Matrixeffekt ist die vorher eingewogene Konzentration einer Substanz in jedem Untersuchungsmedium in gleicher Höhe zu messen. Eruiert wurde ein möglicher Matrixeffekt der Untersuchungsmatrix Urin. Erstellt wurden hierfür je drei Messreihen von Urinproben dreier verschiedener gesunder Probanden, welche mit den Reinsubstanzen (s. Tabelle 5) auf 40 $\mu\text{mol/l}$ aufgestockt wurden. Anschließend erfolgte ein Vergleich mit den detektierten Konzentrationen der entsprechenden Kalibrierungsreihe bei 40 $\mu\text{mol/l}$ in den jeweiligen Kalibrierungsmatrices H_2O , CH_4O oder $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (s. Tabelle 5). Pro Metabolit wurden je neun Messwerten im Urin korrespondierende Messwerte der Kalibrierungsreihe gegenübergestellt. Mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben erfolgte ein Vergleich der detektierten Konzentrationen auf signifikante Unterschiede. Bei einem nicht signifikanten Testergebnis ist davon auszugehen, dass der Matrixeffekt vernachlässigbar ist.

Präzision der Messungen

Variationskoeffizienten (CV) geben an, mit welchem zufälligen Fehler eine Methode behaftet misst. Um die Präzision der Messung innerhalb eines Versuchs zu ermitteln, wurde zehnmal dieselbe Probe in einem Versuchsdurchlauf analysiert. Eine Untersuchung derselben Probe an zehn unterschiedlichen Tagen diente der Bestimmung der erreichbaren Reproduzierbarkeit von Test zu Test. Beide Testungen erfolgten für drei unabhängige

Urinproben, die mit den Reinsubstanzen der Kalibrierung (s. Tabelle 5) auf die Konzentrationen $4\mu\text{mol/l}$ und $20\mu\text{mol/l}$ aufgestockt wurden. Die jeweiligen CV berechneten sich aus dem Mittelwert aller bestimmten Konzentrationen dividiert durch die Standardabweichung und wurden in Prozent angegeben. Die CV sollten nicht größer als 15% sein.⁹²

2.6 Statistische Auswertung

2.6.1 Allgemeine Begrifflichkeiten zur Statistik

Sensitivität

Die Empfindlichkeit eines Testverfahrens wird durch die Sensitivität wiedergegeben. Unter dieser ist die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Test unter den tatsächlich Kranken zu verstehen. Sie wird berechnet, indem die Zahl der Erkrankten mit positivem Test durch die Gesamtzahl der Erkrankten dividiert wird.^{93,94}

Spezifität

Die Spezifität steht für die Treffsicherheit des Testverfahrens, Gesunde richtig zu erkennen. Sie gibt die Wahrscheinlichkeit für einen negativen Test unter den tatsächlich Gesunden an. Diese wird berechnet, indem die Zahl der Gesunden mit negativem Test durch die Gesamtzahl der Gesunden dividiert wird.^{93,94}

Schwellenwert

Bei stetigen Merkmalen ist für die binäre Testentscheidung, ob ein Test positiv im Sinne von krank oder negativ im Sinne von gesund ausfällt, eine Trenngröße notwendig. Dieser Schwellenwert trennt den pathologischen vom physiologischen Bereich. Die erhobenen Messwerte werden mit diesem Schwellenwert verglichen. Ist der Messwert größer oder gleich dem entsprechenden Schwellenwert, wird von einem positiven, anderenfalls von einem negativen Befund gesprochen.⁸⁵

Beziehung zwischen Sensitivität und Spezifität

Je höher die Sensitivität ausfällt, desto geringer ist die Spezifität. Liegt eine schwerwiegende aber behandelbare Erkrankung vor und können falsch positive Befunde mit annehmbarem Aufwand und akzeptabler Belastung geklärt werden, ist eine hohe Sensitivität anzustreben. Spezifische Tests sind zur Bestätigung einer Diagnose hilfreich und sind anzustreben, wenn falsch positive Ergebnisse physische, emotionale und finanzielle Belastung bedeuten und keine erfolgsversprechende Therapie bekannt ist.^{85,93} Ziel dieser Arbeit

soll ein Kompromiss aus hoher Sensitivität und möglichst hoher Spezifität des Testverfahrens sein.

Signifikanz

Das Signifikanzniveau für alle durchgeführten Analysen wurde auf kleiner 0,05 ($p < 0,05$) festgelegt.

2.6.2 Angewendete Testverfahren

Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurven

ROC-Kurven vermitteln einen bildlichen Eindruck der Überlegenheit eines Tests gegenüber der Zufallsdiagnose zur Differenzierung zwischen gesunden und kranken Probanden. Hierzu werden die Werte für die Sensitivität über die Werte der Gegenwahrscheinlichkeit der Spezifität (1-Spezifität) abgetragen. Dabei korreliert die Testgenauigkeit mit der Fläche unter der Kurve („area under the curve“ (AUC)). Beträgt die Fläche 0,5, ist der Test nicht besser als die zufällige Zuweisung „krank“ oder „gesund“, siehe Abbildung 8 links. Flächenanteile größer als 0,9 gelten als ausgezeichnet, Flächen zwischen 0,8 und 0,9 als gut und zwischen 0,7 und 0,8 als noch akzeptabel. Bei Flächen von eins, rechts in Abbildung 8 dargestellt, sind falsche Befunde ausgeschlossen.^{85,93–96}

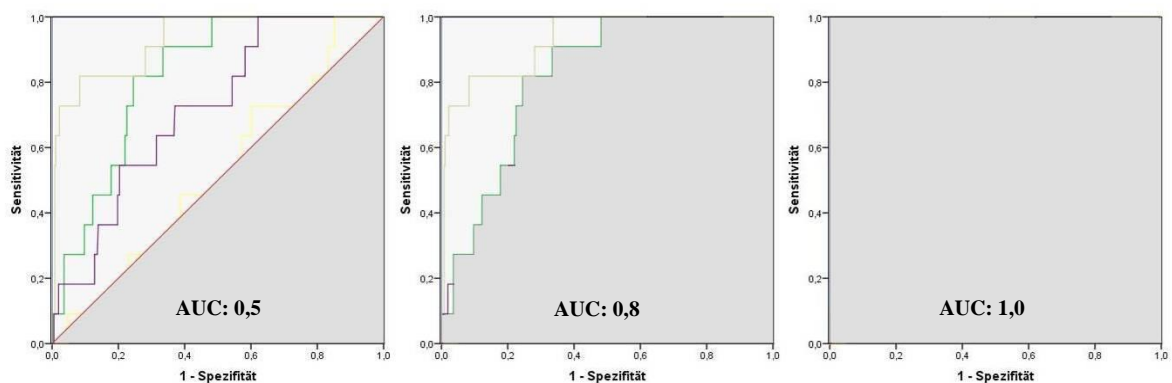


Abbildung 8: Prinzipdarstellung zur Auswertung von ROC-Kurven

Ist $AUC \geq 0,8$ kann ein Test gut zwischen Kranken und Gesunden unterschieden.

Mit Hilfe von ROC-Kurven wurden für die einzelnen Erkrankungen die charakteristischen Metaboliten sowie deren zugehörigen Schwellenwerte ermittelt.

Weitere angewandte Testverfahren und verwendete Software

Zur Überprüfung altersspezifischer und geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Aus-

scheidung der Metaboliten kam der nichtparametrische Rangsummentest von Mann-Whitney-U zur Anwendung.⁹⁷ Mit Hilfe von Kreuztabellen⁹⁷ erfolgte die Berechnung der Sensitivitäten und Spezifitäten für verschiedene Parameterkombinationen charakteristischer Metaboliten. Zur Berechnung des Matrixeffektes wurde der t-Test für unabhängige Stichproben⁹⁷ verwendet. Im Prinzip erfüllten die beiden großen Patientengruppen MCADD und MMA ebenfalls alle Voraussetzungen zur Durchführung einer logistischen Regressionsanalyse. Allerdings stellte sich heraus, dass die Ergebnisse, die mit den ROC-Kurven ermittelt wurden, aufgrund der Varianz der Parameter valider waren, sodass dieses Verfahren nicht weiter zur Anwendung kam.

ChemoView^{TM®} erstellte eine Tabelle mit den berechneten Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ der jeweils gesuchten Metaboliten. Um die gefundenen Konzentrationen der verschiedenen Urinproben vergleichbar zu machen, war eine unabhängige Größe nötig. Daher wurden die Konzentrationen in mmol/mol Kreatinin umgerechnet.¹⁵ Diese und einige weitere Berechnungen wurden mit Microsoft Excel^{xxv} durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS[®] Version 19 der Firma IBM.

^{xxv} Deutsche Version von Microsoft Excel 2010

3 Ergebnisse

3.1 Methodenvalidierung

Nachweisgrenze

Liegt die detektierte Konzentration eines Metaboliten oberhalb des LOD der Reinsubstanz dieses Metaboliten, so ist die Messung valide. Je geringer die Konzentration eines Metaboliten in der Untersuchungsprobe ist und je weiter diese Konzentration unterhalb des bestimmten LOD liegt, desto weniger genau ist diese mit der angewendeten Methode zu messen. Die im Einzelnen ermittelten Nachweisgrenzen sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: LOD der untersuchten Reinsubstanzen

C5G	C14G	P-C3G	C7G	C2G	C3G	C18:1G	C4G	C6G	C5:1G	C8DCG	C14	C16	C8	C5	C2	C0
0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	1	1	0,2	0,2	0,4	1	2	3
Nachweisgrenze in $\mu\text{mol/l}$																

Matrixeffekt

Für die Gruppe der Acylcarnitine war der durchgeführte t-Test auf Unterschiede der Messwerte in der Matrix Urin und in der Matrix H_2O beziehungsweise CH_4O für alle untersuchten Standardsubstanzen nicht signifikant. Für die Gruppe der Acylglycine war der t-Test nicht signifikant für die Substanzen C2G, C3G, C5:1G und C8DCG. Ein signifikantes Testergebnis ergab sich hingegen für die Substanzen C6G, P-C3G, C14G, C18:1G, C5G, C4G und C7G.

Präzision der Messungen

Die CV im selben Versuchsdurchlauf schwankten zwischen 2% und 15%, wobei sich nur für einen der sechs erhobenen CV der Substanz C16 (Urin 1 mit der Konzentration $4\mu\text{mol/l}$) ein Wert von 15% ergab und alle übrigen CV deutlich kleiner waren. Die CV für die Testung an zehn unterschiedlichen Tagen sind Tabelle 8 zu entnehmen. CV > 20% sind grau hinterlegt.

Tabelle 8: CV in Prozent der Testungen an zehn unterschiedlichen Tagen

Urin	aufgestockte Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	C0	C2	C5	C8	C14	C16	C14G	C18:1G	C2G	C3G	C4G	C5:1G	C5G	C6G	C7G	C8DCG	P-C3G
		1	4	11	9	10	12	16	27	9	18	10	10	13	20	10	8	8
1	20	11	7	10	9	12	15	21	18	7	7	7	12	7	5	6	15	6
2	4	13	9	14	8	15	20	11	24	7	11	8	24	10	7	12	8	13
2	20	19	16	14	15	21	20	9	11	5	6	11	13	8	7	7	9	6
3	4	12	14	18	14	23	25	9	8	7	14	11	12	7	11	11	12	8
3	20	20	16	21	19	20	21	15	17	9	8	9	8	5	6	7	14	11

3.2 Normalbefunde

3.2.1 Referenzwerte

Aus den erhobenen Daten aller stoffwechselgesunden Probanden wurden Referenzwerte ermittelt. Da es sich bei den Messwerten um nichtnormalverteilte Daten handelte, wurde hierfür als oberer Cut off die 97,5. Perzentile gewählt. Diese Darstellung ist eine gängige Methode.⁹⁸ Für die Diagnostik spielte der untere Cut off (z.B. die 3. Perzentile) keine Rolle, daher wurden als Referenzwerte lediglich die 97,5. Perzentilen errechnet. Die ermittelten Referenzwerte der jeweiligen Metaboliten sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Referenzwerte (oberer Cut off) der untersuchten Metaboliten im Urin

Acylcarnitine		Acylcarnitine		Acylglycine	
C0	67,7	C4OH+C3DC	0,47	C5:1G	48,8
C2	34,3	C14:1	0,43	C2G	23,0
C8:1	3,88	C12	0,42	C4OHG	16,9
C4	3,69	C14	0,32	P-C2G	5,37
C5	2,95	C12OH	0,29	C5G	4,66
C6DC	2,69	C12:1	0,28	C7:1G	4,23
C5DC+C6OH	2,20	C14:1OH	0,17	C4G	3,82
C10:2	2,16	C14:2	0,15	C3G	2,50
C3	1,80	C16OH	0,14	C6G	2,28
C5OH+C4DC	1,20	C14OH	0,13	C5OHG	1,92
C5:1	1,02	C16:1	0,12	C5DCG	1,51
C8	0,97	C16:1OH	0,10	C8DCG	1,02
C10:1	0,82	C18	0,10	C8OHG	0,53
HMG	0,78	C18:1	0,10	C7G	0,39
C12:1OH	0,66	C18:2OH	0,10	P-C3G	0,34
C10	0,62	C18:2	0,09	C14G	0,30
C16	0,61	C18:1OH	0,09	C18:1G	0,15
C10:1OH	0,52	C18OH	0,07		
C6	0,52				

■ = 97,5. Perzentile der detektierten Konzentration [mmol/mol Kreatinin]

3.2.2 Alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede

Es ergaben sich signifikante Altersunterschiede im Ausscheidungsprofil für viele Parameter zwischen den Altersgruppen I-III. Zwischen den Altersgruppen IV-V zeigten sich nur für einige wenige Parameter signifikante Unterschiede, sodass diese Gruppen zu einer Gruppe zusammengefasst wurden. Der Einfluss des Alters auf die ermittelten Referenzwerte ist beispielhaft den Diagrammen 4 und 5 zu entnehmen.

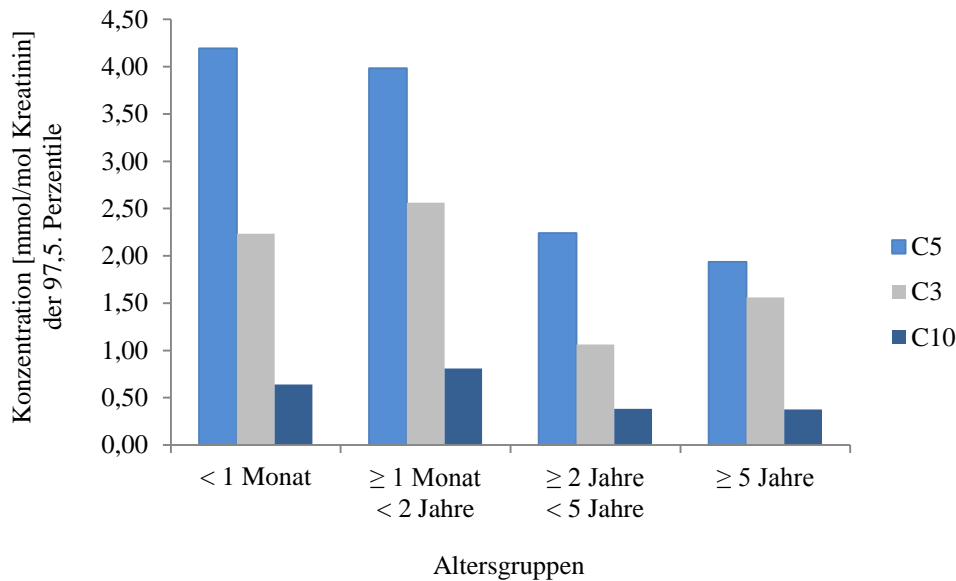


Diagramm 4: Altersunterschiede im Ausscheidungsprofil der Acylcarnitine

Beispiel für die Altersabhängigkeit der Ausscheidung anhand der Acylcarnitine C3, C5 und C10

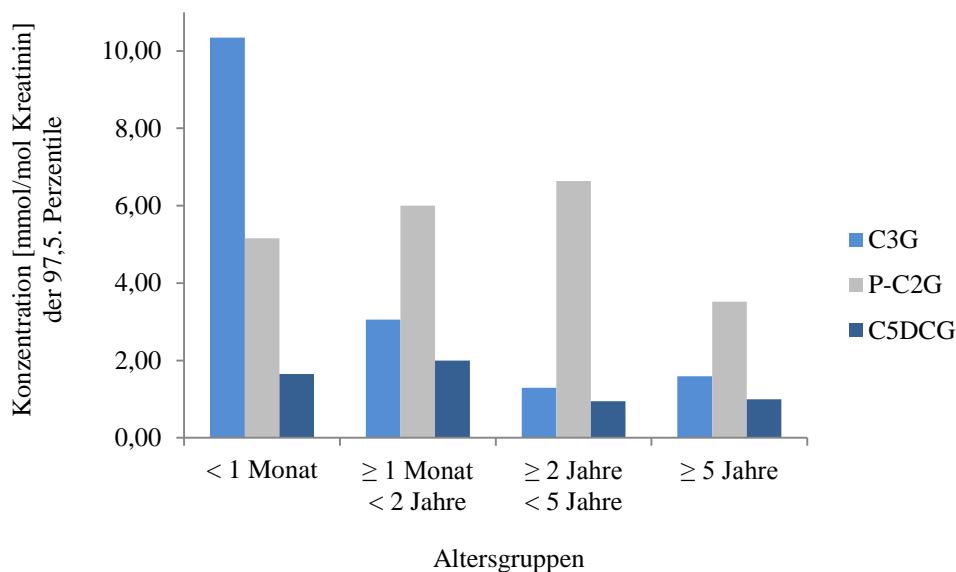


Diagramm 5: Altersunterschiede im Ausscheidungsprofil der Acylglycine

Beispiel für die Altersabhängigkeit der Ausscheidung anhand der Acylglycine C3G, P-C2G und C5DCG

Hier ist zu sehen, dass die Referenzwerte für die gemessenen Metaboliten bei Probanden < 2 Jahre tendenziell höher waren als die bei Probanden ≥ 2 Jahre.

Eine Zusammenstellung der 97,5. Perzentilen der gemessenen Konzentrationen in mmol/mol Kreatinin in Abhängigkeit vom Alter für die einzelnen Metaboliten findet sich in Tabelle 10.

Tabelle 10: 97,5. Perzentile der altersabhängigen Ausscheidung

a)	< 1 Monat	≥ 1 Monat < 2 Jahre	≥ 2 Jahre < 5 Jahre	≥ 5 Jahre	b)	< 1 Monat	≥ 1 Monat < 2 Jahre	≥ 2 Jahre < 5 Jahre	≥ 5 Jahre
	[mmol/mol Kreatinin]					[mmol/mol Kreatinin]			
C0	67,32	93,85	45,75	47,79	C2G	28,25	25,36	22,07	15,48
C2	31,77	36,31	16,60	60,51	P-C2G	5,16	6,00	6,64	3,52
C3	2,24	2,56	1,06	1,56	C3G	10,34	3,05	1,30	1,60
C4	1,31	4,23	3,66	2,85	P-C3G	0,35	0,32	0,32	3,90
C4OH+C3DC	0,48	0,56	0,32	0,80	C4G	2,54	3,96	4,31	4,11
C5	4,19	3,99	2,24	1,94	C4OHG	28,27	20,70	12,92	16,23
C5:1	1,21	1,21	0,95	0,83	C5:1G	39,64	57,13	136,14	35,85
C5DC+C6OH	2,21	2,75	2,27	2,15	C5DCG	1,65	2,00	0,95	1,00
C5OH+C4DC	1,47	1,22	1,27	0,76	C5G	2,53	6,75	5,45	3,08
C6	0,52	0,54	0,45	0,76	C5OHG	1,35	1,97	2,08	1,88
C6DC	3,42	2,99	1,94	1,80	C6G	1,96	3,61	2,31	5,15
C8	1,68	1,17	0,88	0,50	C7:1G	3,25	7,04	4,86	2,13
C8:1	2,74	5,82	4,08	2,87	C7G	0,45	0,47	0,32	0,49
C10	0,64	0,81	0,38	0,38	C8DCG	1,40	1,66	0,75	2,74
C10:1	0,52	1,17	0,80	0,68	C8OHG	0,46	0,60	0,51	0,62
C10:1OH	0,61	0,63	0,49	0,36	C14G	0,28	0,33	0,27	0,26
C10:2	0,46	1,02	5,01	1,33	C18:1G	0,11	0,16	0,18	0,12
C12	0,52	0,52	0,35	0,29					
C12:1	0,25	0,38	0,32	0,26					
C12:1OH	0,74	0,71	0,73	0,50					
C12OH	0,50	0,31	0,18	0,16					
C14	0,39	0,35	0,28	0,27					
C14:1	0,69	0,44	0,41	0,30					
C14:1OH	0,16	0,19	0,21	0,15					
C14:2	0,20	0,16	0,11	0,11					
C14OH	0,14	0,15	0,13	0,12					
C16	0,72	0,70	0,60	0,51					
C16:1	0,16	0,15	0,11	0,11					
C16:1OH	0,18	0,12	0,08	0,08					
C16OH	0,19	0,15	0,13	0,12					
C18	0,12	0,10	0,10	0,07					
C18:1	0,12	0,10	0,10	0,07					
C18:1OH	0,09	0,11	0,08	0,08					
C18:2	0,10	0,09	0,13	0,08					
C18:2OH	0,11	0,10	0,11	0,10					
C18OH	0,12	0,07	0,05	0,06					
HMG	0,67	1,00	0,71	0,49					

Es ließen sich keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede feststellen.

Die Diagramme 6 und 7 zeigen Normalbefunde eines Acylcarnitin- und Acylglycinprofils eines zufällig ausgewählten stoffwechselgesunden Probanden zum Vergleich mit den im Weiteren aufgeführten Detektionsprofilen der Patientenproben.

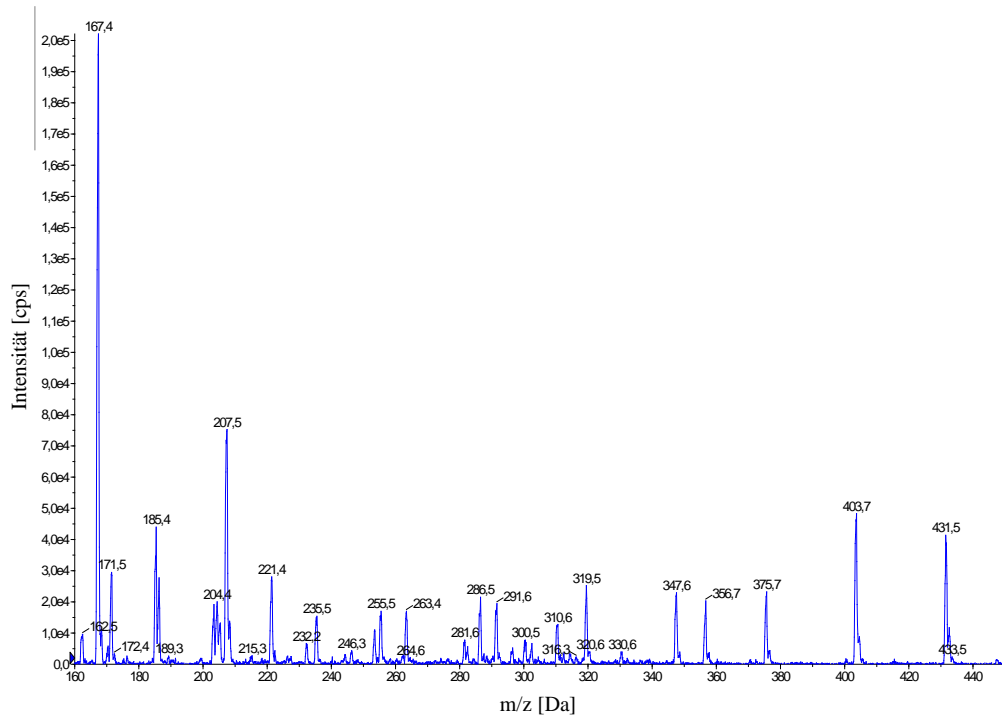


Diagramm 6: Acylcarnitinprofil eines gesunden Probanden

Aufgetragen ist die gemessene Intensität in Abhängigkeit vom m/z der detektierbaren Metaboliten

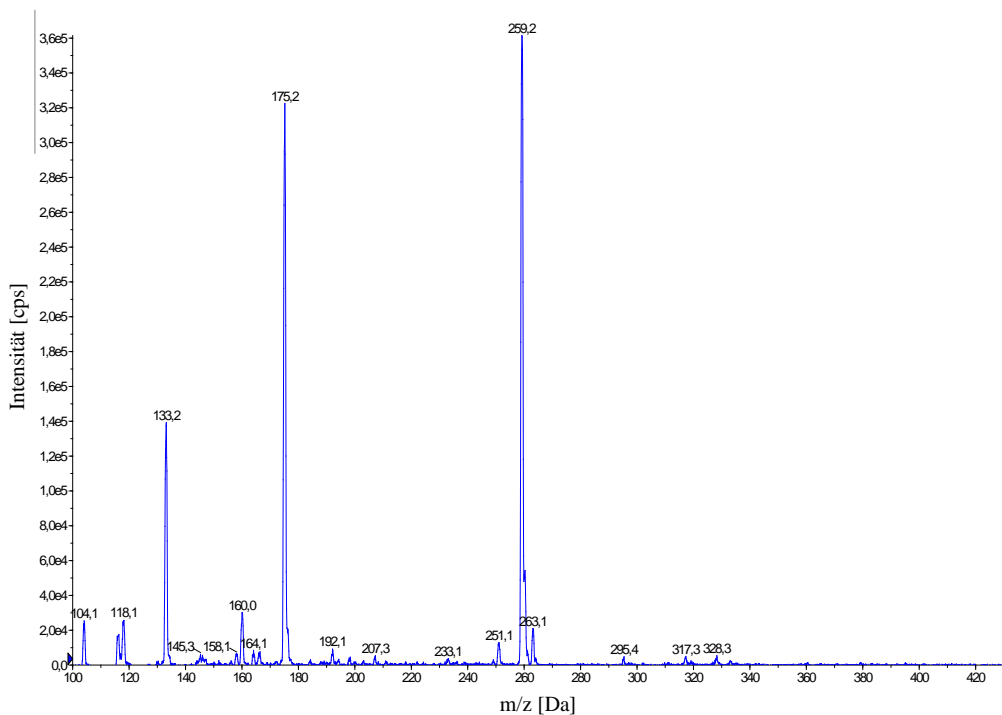


Diagramm 7: Acylglycinprofil eines gesunden Probanden

Aufgetragen ist die gemessene Intensität in Abhängigkeit vom m/z der detektierbaren Metaboliten

3.3 Untersuchte Stoffwechseldefekte

Nachfolgend wird auf die Stoffwechseldefekte eingegangen, dabei soll die angewandte Vorgehensweise am Beispiel des MCADD exemplarisch erläutert werden. Die Handhabung war für alle Stoffwechseldefekte analog, sodass im Weiteren die Ergebnisse ohne Erklärung des Vorgehens präsentiert werden.

3.3.1 Mittelkettiger Acyl-CoA-Dehydrogenase Defekt

Zu Beginn erfolgte die Betrachtung exemplarischer Acylcarnitin- und Acylglycinprofile eines zufällig ausgewählten Patienten mit MCADD, welche den Diagrammen 8 und 9 zu entnehmen sind. Die Profile wurden den Detektionsprofilen eines Gesunden (s. Diagramme 6 und 7) gegenübergestellt. Die sich im direkten Vergleich erhöht zeigenden Peaks wurden mit Pfeilen markiert und entsprechend beschriftet. Die Profile geben einen ersten Eindruck darüber, welche Metaboliten für den MCADD eine erhöhte Ausscheidung im Urin aufwiesen.

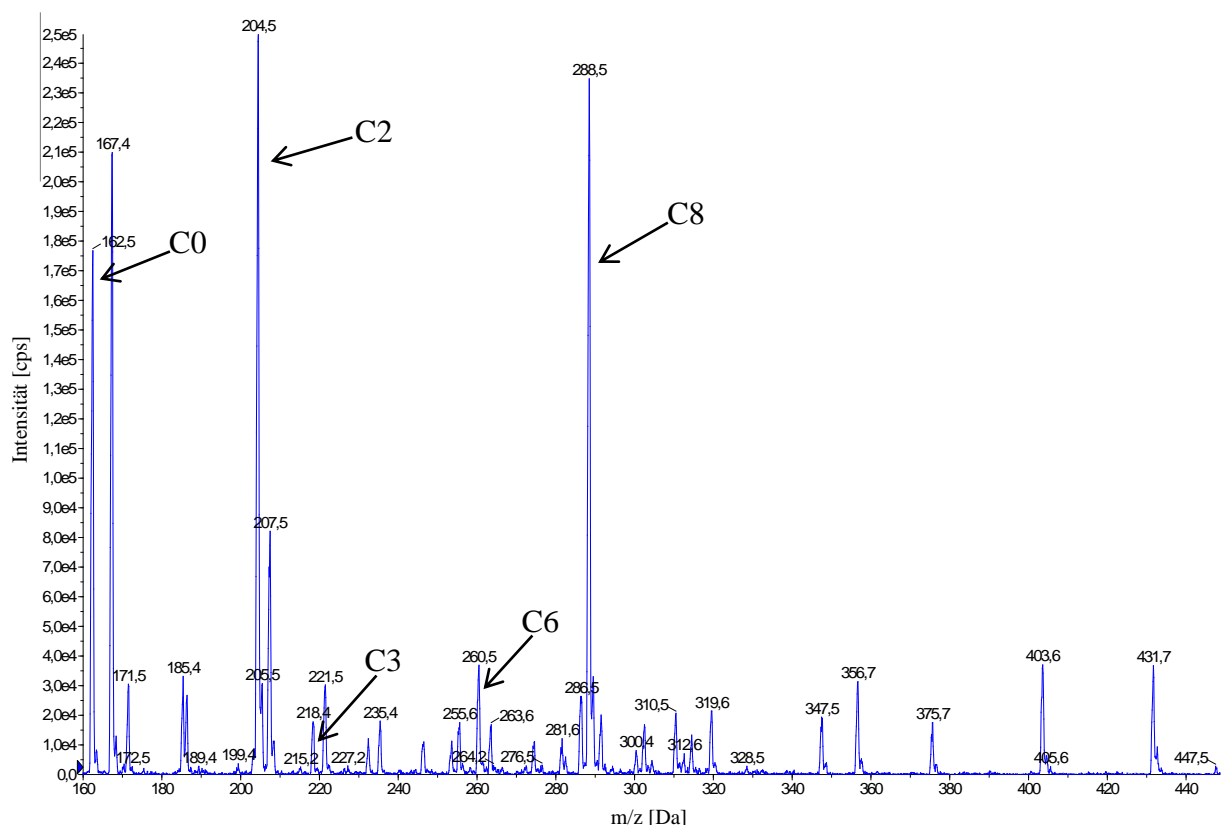


Diagramm 8: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit MCADD

Die Acylcarnitine C0, C2, C3, C6 und C8 sind gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detektierbar.

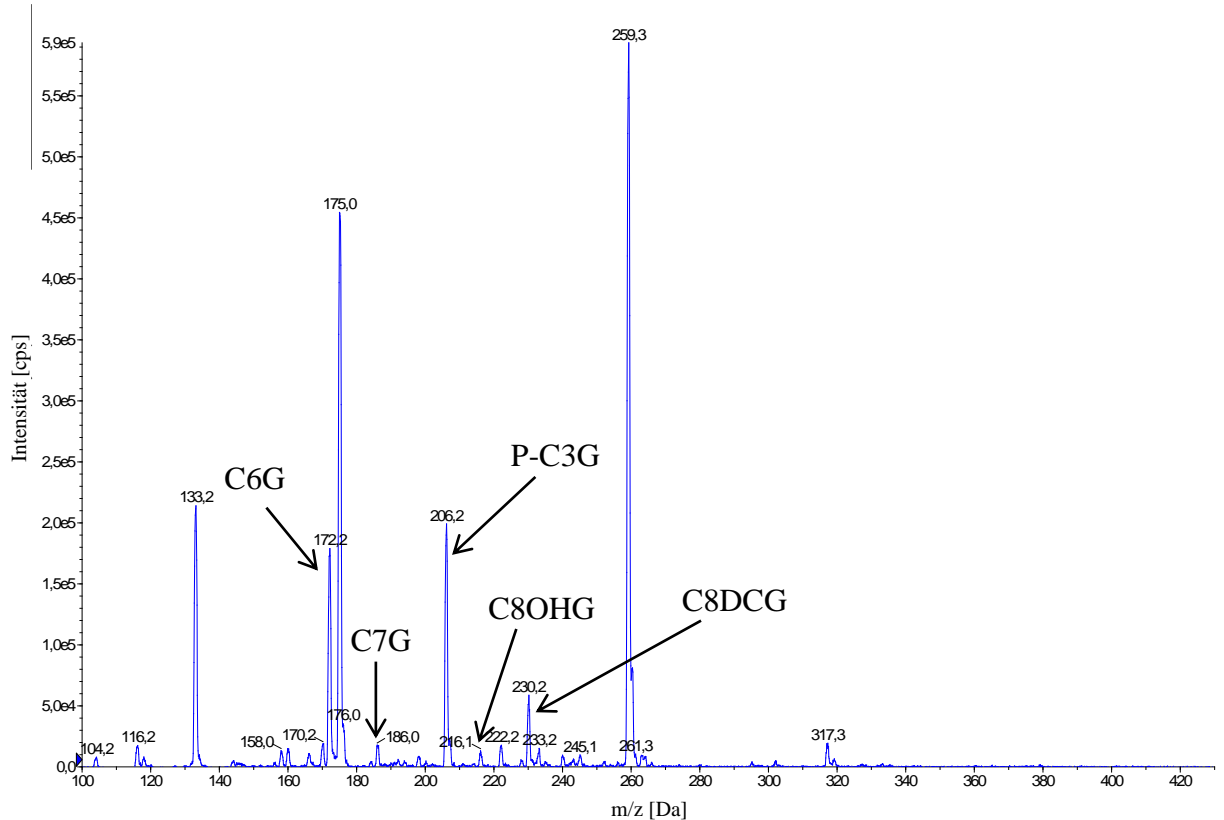


Diagramm 9: Acylglycinprofil eines Patienten mit MCADD.

Die Acylglycine C6G, C7G, P-C3G, C8OHG und C8DCG sind gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detektierbar.

Zur weiteren statistischen Auswertung wurden ROC-Kurven angefertigt. Diese verglichen die Patientengruppe mit MCADD mit der Gruppe der stoffwechselgesunden Probanden. In einem Koordinatensystem wurden für verschiedene Schwellenwerte die sich ergebenden Sensitivitätswerte und die Werte für die Gegenwahrscheinlichkeit der Spezifität (1-Spezifitätswerte) aufgetragen. Das Diagramm 10 gibt diese ROC-Kurven und die jeweiligen Werte für die AUC wieder.

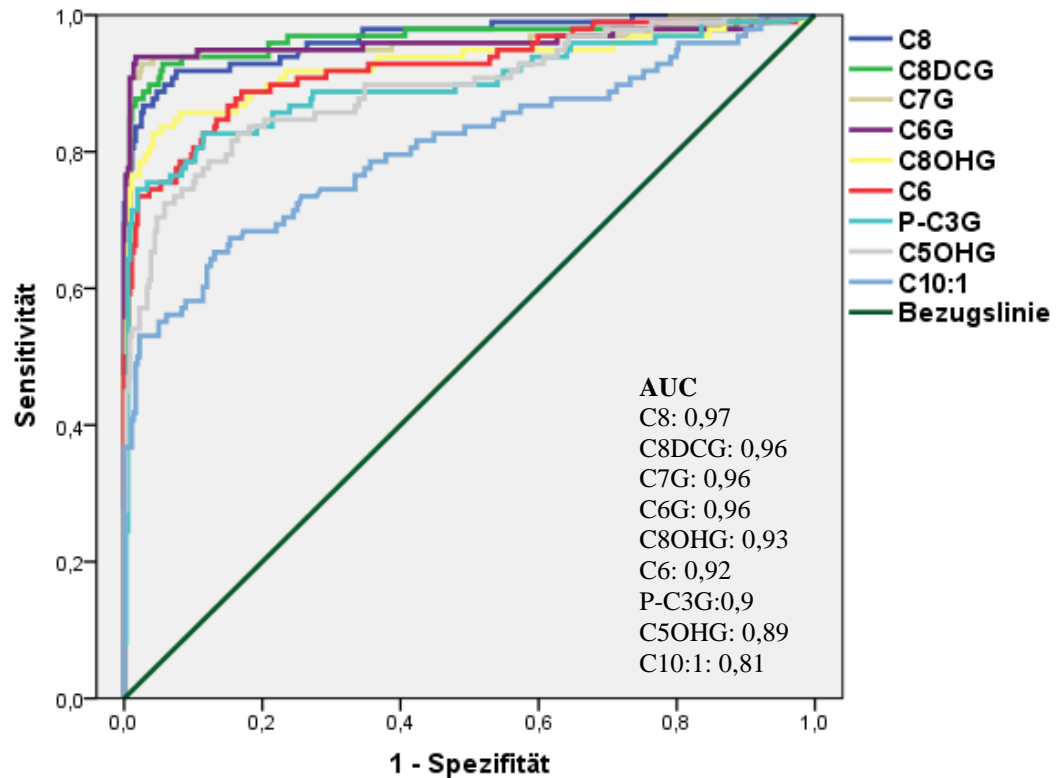


Diagramm 10: ROC-Kurven zur Unterscheidung Gesunder von an MCADD Erkrankten

Dargestellt sind die ROC-Kurven sowie die Werte für die AUC. Aufgeführt sind alle Metaboliten, für die sich Flächenanteile $> 0,8$ ergaben und die somit gut geeignet waren zur Differenzierung zwischen gesunden und kranken Probanden.

Für alle Parameter, für die sich in den ROC-Kurven ein Wert für die AUC von 0,8 oder größer ergab und die somit geeignet zur Unterscheidung zwischen erkrankt und gesund waren, wurden verschiedene Schwellenwertkonzentrationen in mmol/mol Kreatinin bestimmt. Zusammengestellt wurden aus allen ermittelten Schwellenwerten in Diagramm 11 alle jene, welche am geeignetsten schienen, den MCADD mit ausreichender Treffsicherheit zu diagnostizieren. Angegeben ist, mit welcher Sensitivität beziehungsweise Spezifität bei gegebenem Schwellenwert ein Patient mit MCADD richtig identifiziert wurde.

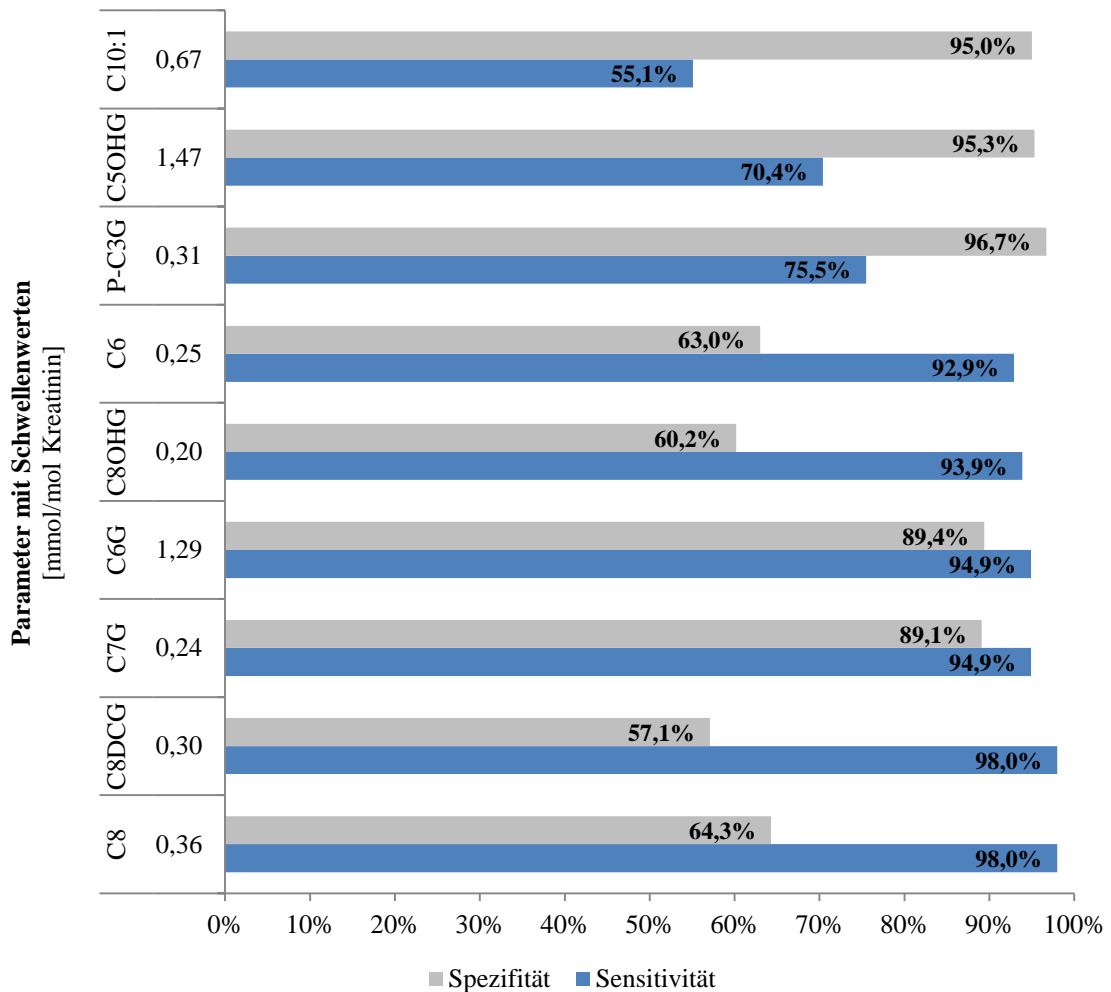


Diagramm 11: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit MCADD

Waren die angegebenen Metaboliten im Urin in einer Konzentration \geq des angegebenen Schwellenwertes zu detektieren, so konnte die Diagnose MCADD mit der dargestellten Spezifität bzw. Sensitivität gestellt werden.

Zur Optimierung der Diagnosekonfirmation wurden im Anschluss verschiedene Parameterkombinationen empirisch ermittelt. Die sich im Sinne eines Kompromisses aus möglichst hoher Sensitivität und möglichst hoher Spezifität besonders zu eignenden Kombinationen sind in Diagramm 12 dargestellt. Gemessene Konzentrationen größer oder gleich des Schwellenwertes galten als pathologisch. Treffen alle Bedingungen der Parameterkombination zu, wurde die Urinprobe mit der angegebenen Sensitivität beziehungsweise Spezifität als Urinprobe eines Patienten mit MCADD diagnostiziert.

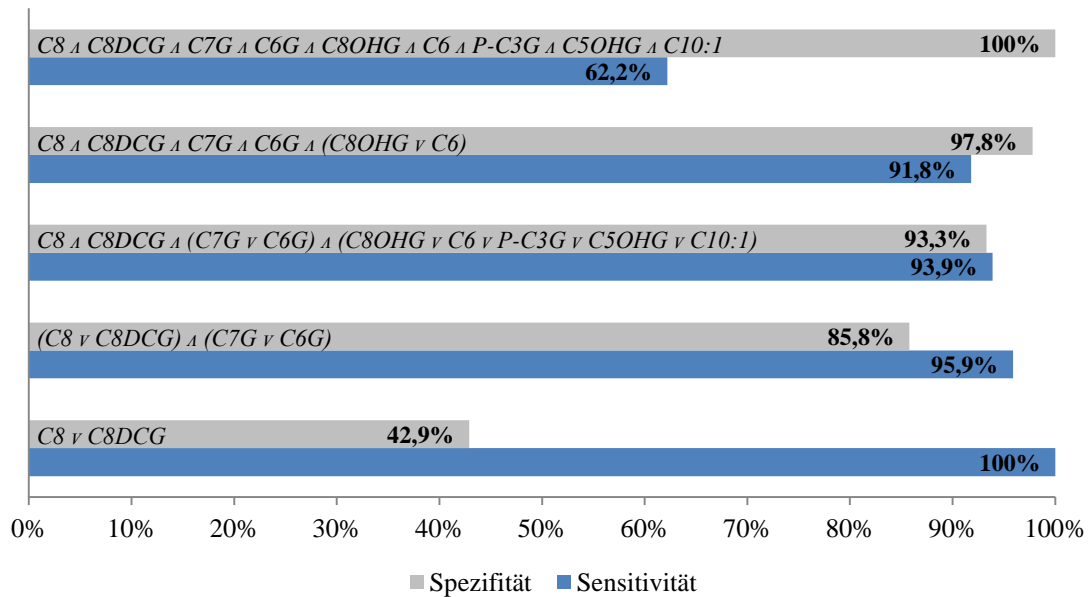


Diagramm 12: Optimierung der Diagnostik des MCADD

Kombination aus C8, C8DCG, C7G, C6G, C8OHG, C6, P-C3G, C5OHG, C10:1

Verknüpfung der Parameter mit den Bedingungen „und“ (\wedge) sowie „oder“ (\vee). Gemessene Konzentrationen \geq der festgesetzten Schwellenwerte aller in einer Parameterkombination genannten Metaboliten ließen die Diagnose MCADD mit der dargestellten Spezifität (oberer Balken) bzw. Sensitivität (unterer Balken) zu.

3.3.2 Methylmalonazidurie

Die Diagramme 13 und 14 geben exemplarisch Acylcarnitin- und Acylglycinprofile eines zufällig ausgewählten Patienten mit der Erkrankung MMA wieder.

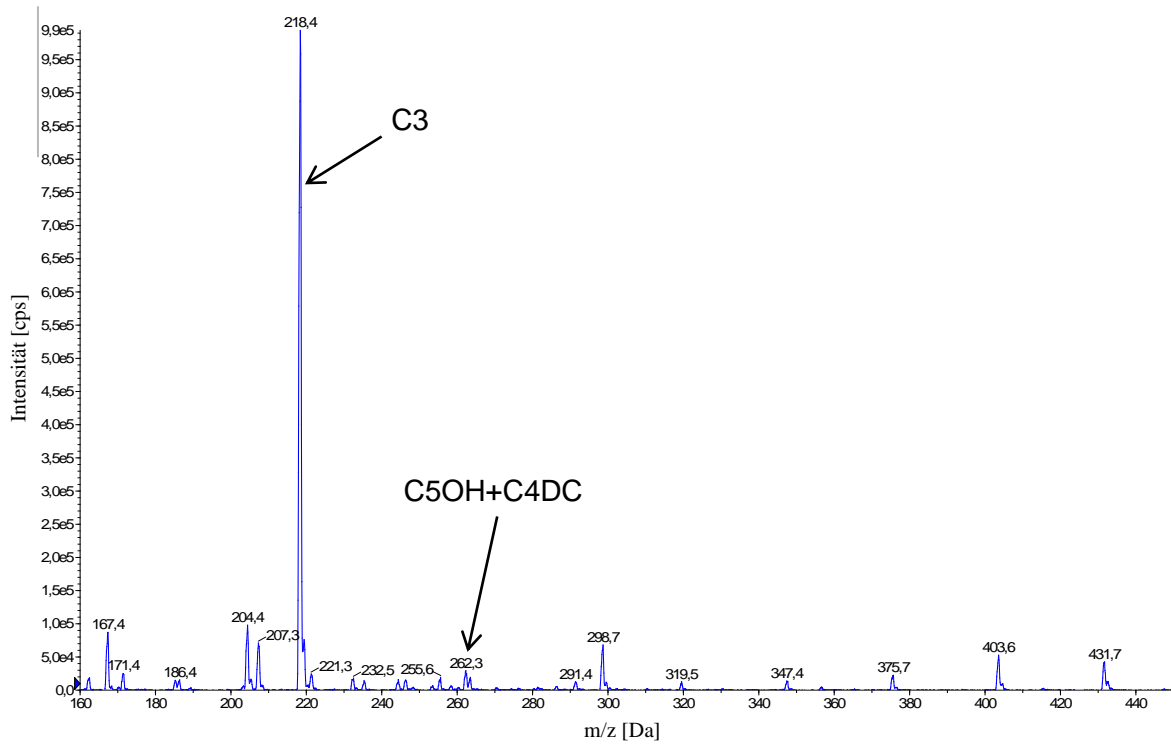


Diagramm 13: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit MMA

Die Acylcarnitine C3 und C5OH+C4DC sind gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detekierbar

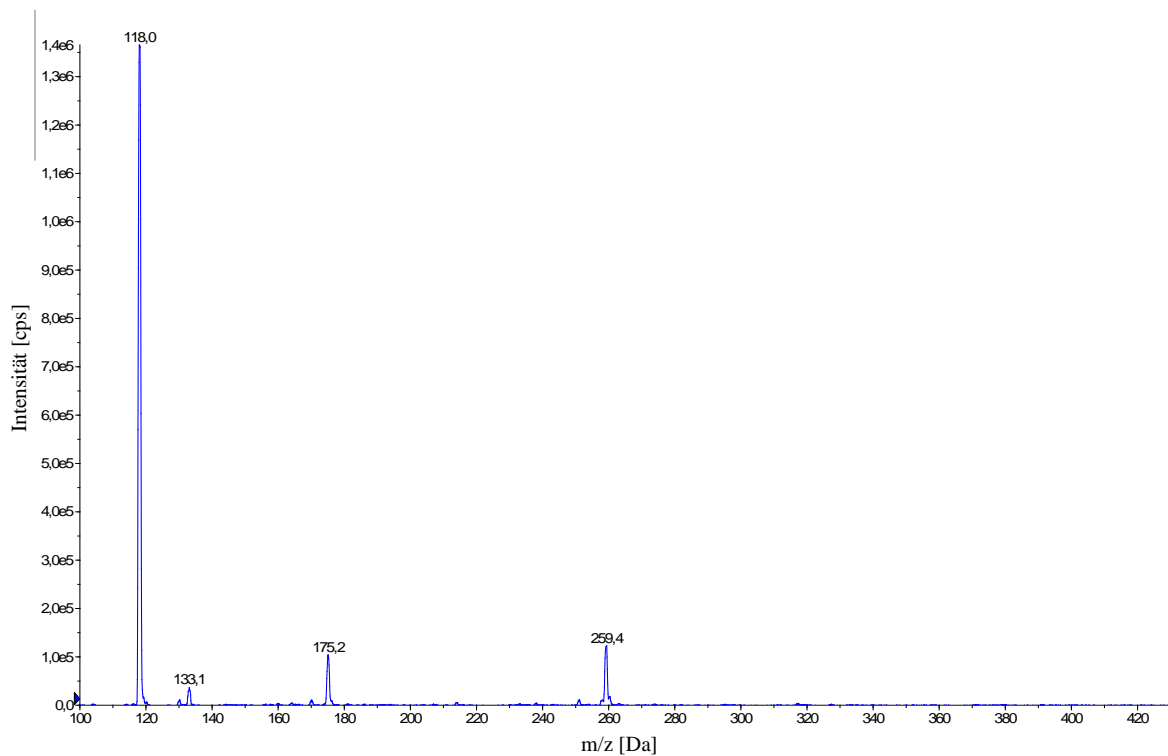


Diagramm 14: Acylglycinprofil eines Patienten mit MMA

In diesem zufällig ausgewählten Profil war kein Acylglycin gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detekierbar.

Auch für diese Erkrankung erfolgte eine genauere Untersuchung der MMA-Patienten im Vergleich zur gesunden Normalpopulation mit Hilfe von ROC-Kurven. Diese ROC-Kurven sind in Diagramm 15 dargestellt.

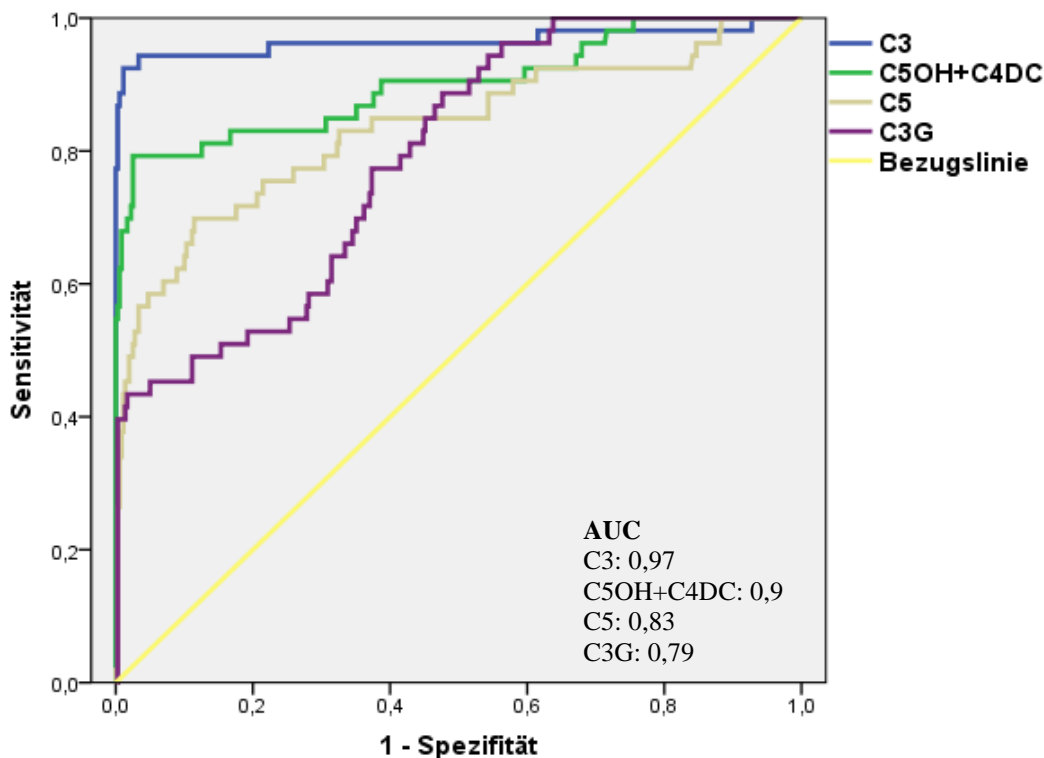


Diagramm 15: ROC-Kurven zur Unterscheidung Gesunder von an MMA Erkrankten

Dargestellt sind die ROC-Kurven sowie die Werte für die AUC. Aufgeführt sind alle Metaboliten, für die sich Flächenanteile $> 0,8$ ergaben und die somit gut geeignet waren zur Differenzierung zwischen gesunden und kranken Probanden.

Die abgeleiteten Schwellenwerte in mmol/mol Kreatinin für die charakteristischen Metaboliten finden sich in Diagramm 16. Diagramm 17 hingegen verdeutlicht Parameterkombinationen, die sich zur Optimierung der Diagnosekonfirmation als am sensitivsten und spezifischsten darstellten.

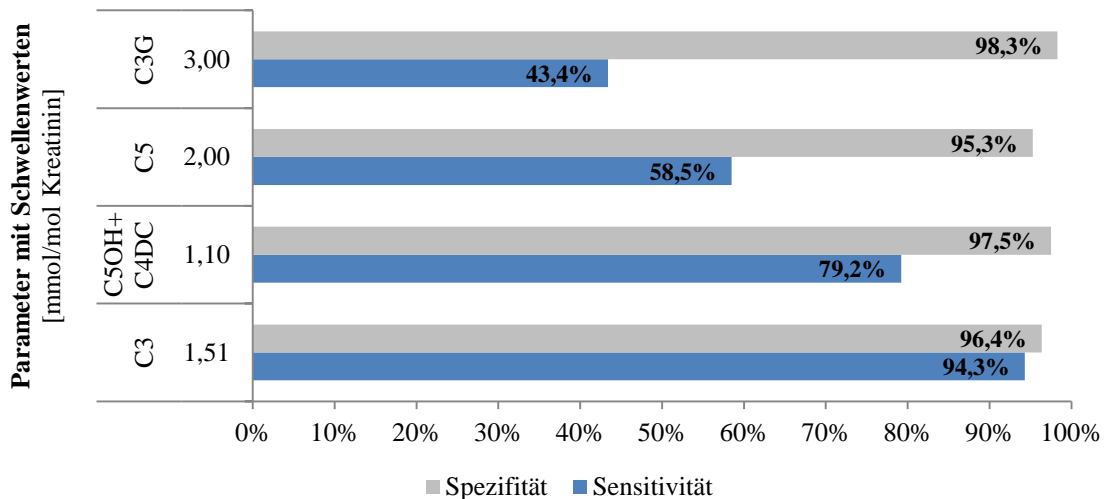


Diagramm 16: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit MMA

Waren die angegebenen Metaboliten im Urin in einer Konzentration \geq des angegeben Schwellenwertes zu detektieren, so konnte die Diagnose MMA mit der dargestellten Spezifität bzw. Sensitivität gestellt werden.

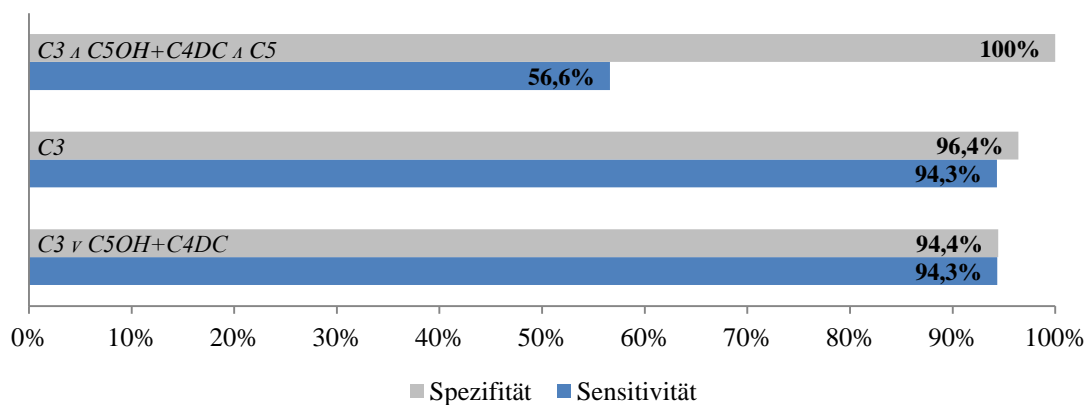


Diagramm 17: Optimierung der Diagnostik der MMA; $C3 \geq 1,51$ mmol/mol Kreatinin

Verknüpfung der Parameter mit den Bedingungen „und“ (\wedge) sowie „oder“ (\vee). Gemessene Konzentrationen \geq der festgesetzten Schwellenwerte aller in einer Parameterkombination genannten Metaboliten ließen die Diagnose MMA mit der dargestellten Spezifität (oberer Balken) bzw. Sensitivität (unterer Balken) zu.

3.3.3 Propionazidämie

Zunächst werden die Diagramme 18 und 19 angeführt, die auffällige Peaks in den Acylcarnitin- und Acylglycinprofile eines Patienten mit der Erkrankung PA im Vergleich zu einem Gesunden demonstrieren.

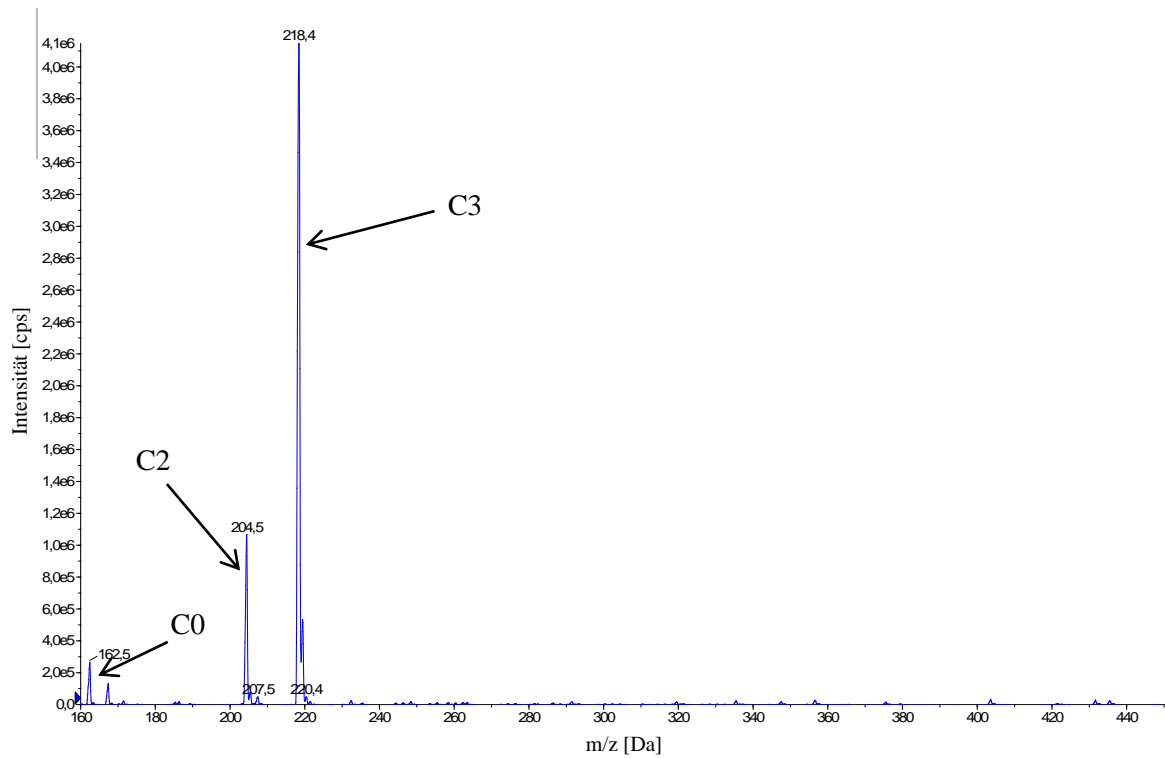


Diagramm 18: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit PA

Die Acylcarnitine C0, C2 und C3 sind gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detektierbar.

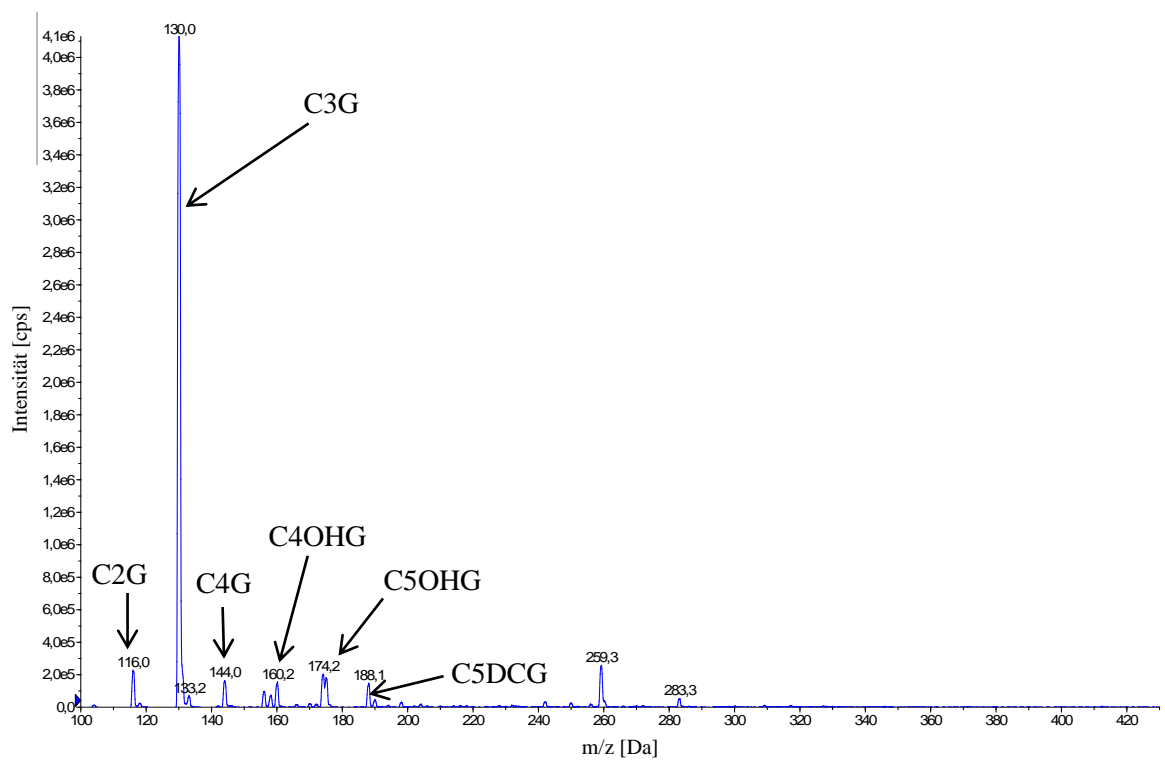


Diagramm 19: Acylglycinprofil eines Patienten mit PA

Die Acylglycine C2G, C3G, C4G, C5OHG und C5DCG sind gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detektierbar.

Diagramm 20 zeigt die erstellten ROC-Kurven und die jeweiligen AUC-Werte.

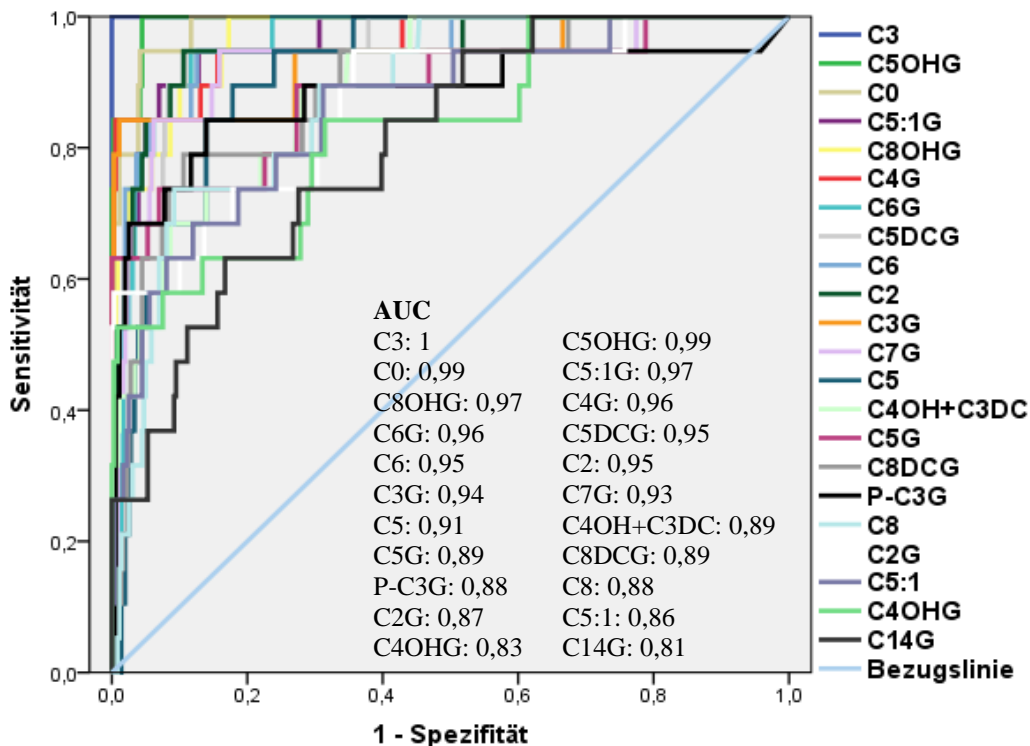


Diagramm 20: ROC-Kurven zur Unterscheidung Gesunder von an PA Erkrankten

Dargestellt sind die ROC-Kurven sowie die Werte für die AUC. Aufgeführt sind alle Metaboliten, für die sich Flächenanteile $> 0,8$ ergaben und die somit gut geeignet waren zur Differenzierung zwischen gesunden und kranken Probanden.

Auch hier wurden entsprechende Schwellenwerte in mmol/mol Kreatinin festgelegt, welche Diagramm 21 zu entnehmen sind. Die grafische Darstellung beschränkt sich hier aus Gründen der Übersicht auf die zehn charakteristischsten Metaboliten. Die sich zur Diagnosekonfirmation der PA gut geeignet habenden Parameterkombinationen veranschaulicht Diagramm 22.

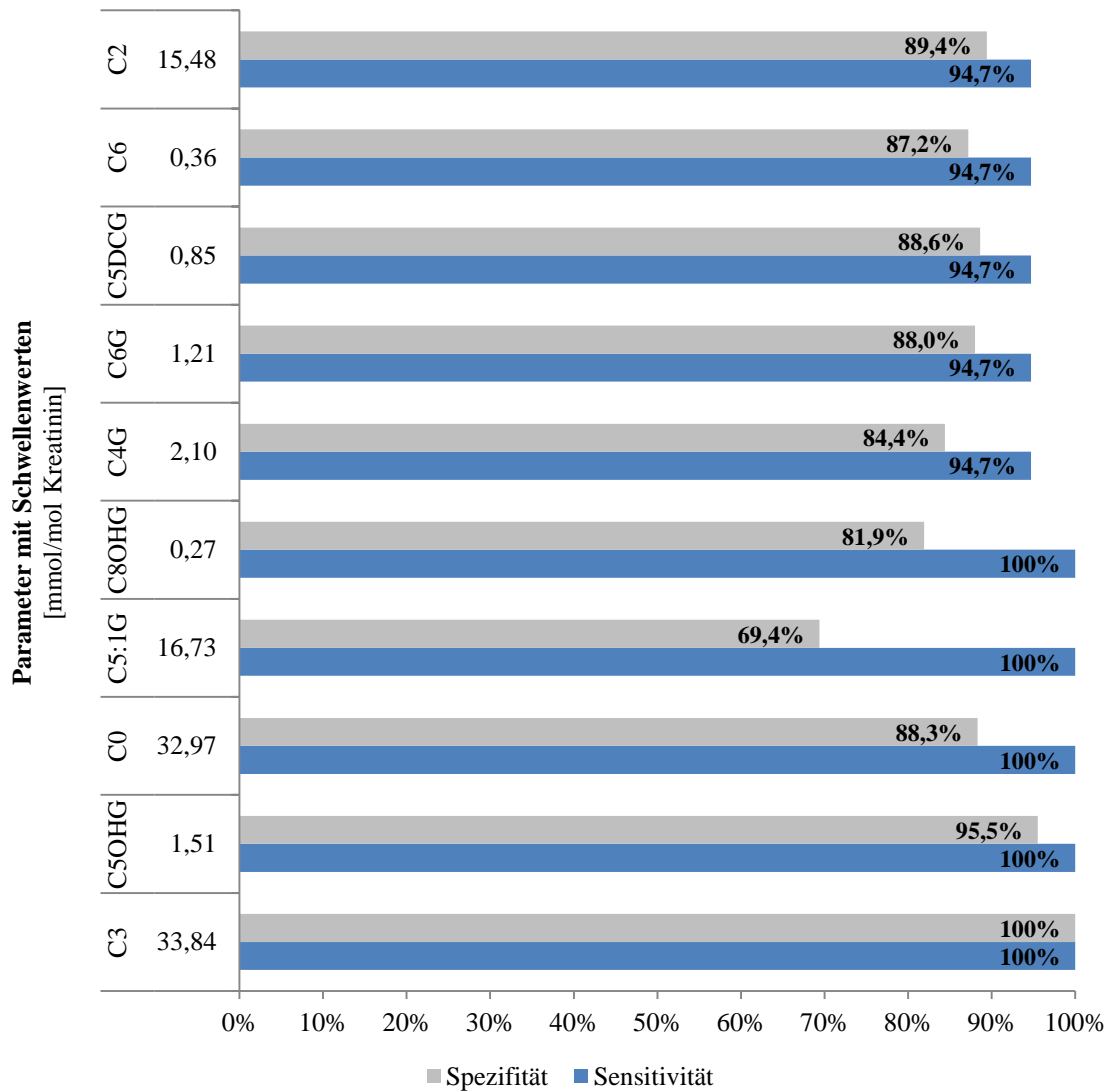


Diagramm 21: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit PA

Waren die angegebenen Metaboliten im Urin in einer Konzentration \geq des angegeben Schwellenwertes zu detektieren, so konnte die Diagnose PA mit der dargestellten Spezifität bzw. Sensitivität gestellt werden.

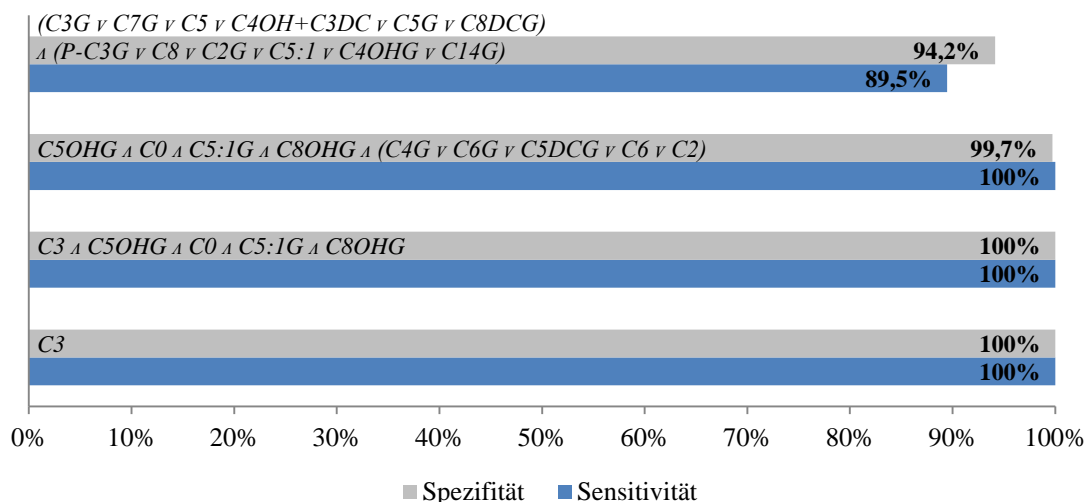


Diagramm 22: Optimierung der Diagnostik der PA

C3 oder Kombination aus C3, C5OHG, C0, C5:1G und C8OHG

Verknüpfung der Parameter mit den Bedingungen „und“ (∧) sowie „oder“ (v). Gemessene Konzentrationen \geq der festgesetzten Schwellenwerte aller in einer Parameterkombination genannten Metaboliten ließen die Diagnose PA mit der dargestellten Spezifität (oberer Balken) bzw. Sensitivität (unterer Balken) zu. Folgende Schwellenwerte [mmol/mol Kreatinin] wurden in Diagramm 21 nicht genannt und sind daher hier aufgeführt: C3G = 3,82; C7G = 0,36; C5 = 1,98; C4OH+C3DC = 0,37; C5G = 9,75; C8DCG = 0,83; P-C3G = 0,32; C8 = 0,76; C2G = 40,26; C5:1 = 0,88; C4OHG = 23,69; C14G = 0,36.

3.3.4 Isovalerianazidämie

Den Diagrammen 23 und 24 sind die Acylcarnitin- und Acylglycinprofile eines zufällig ausgewählten Patienten mit der Erkrankung IVA zu entnehmen. Zum Vergleich sei auf die Profile Gesunder in den Diagrammen 6 und 7 verwiesen.

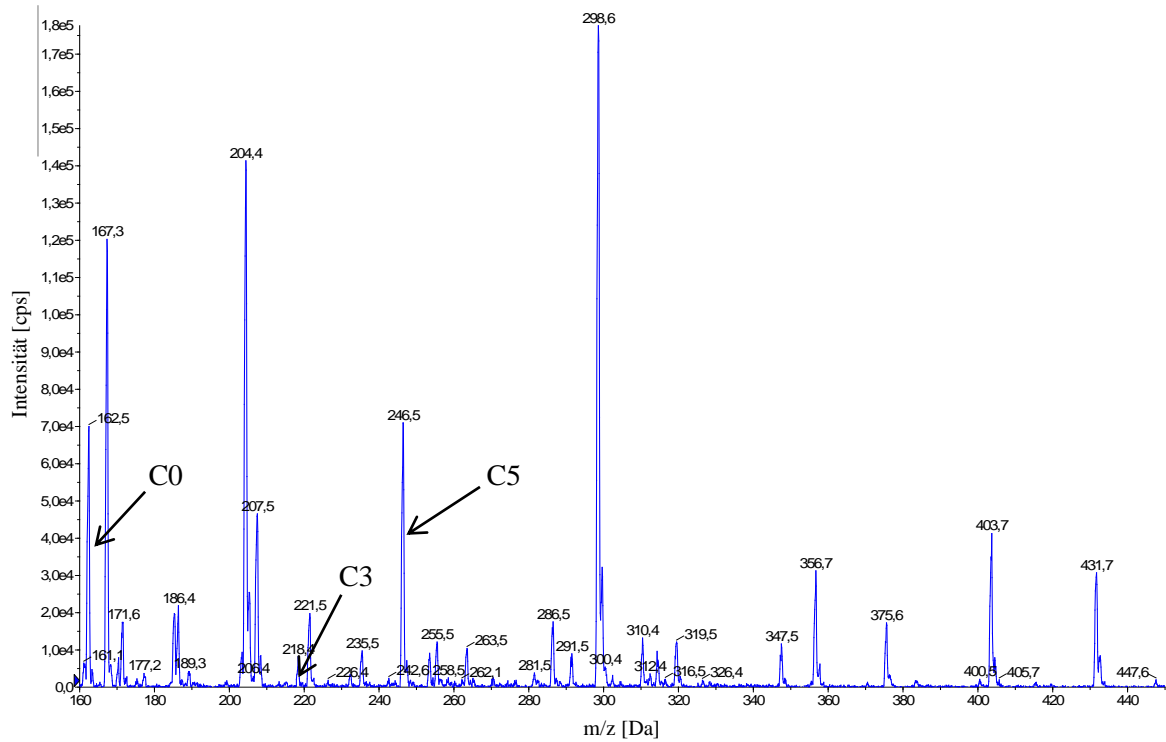


Diagramm 23: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit IVA

Die Acylcarnitine C0, C3 und C5 sind gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detektierbar.

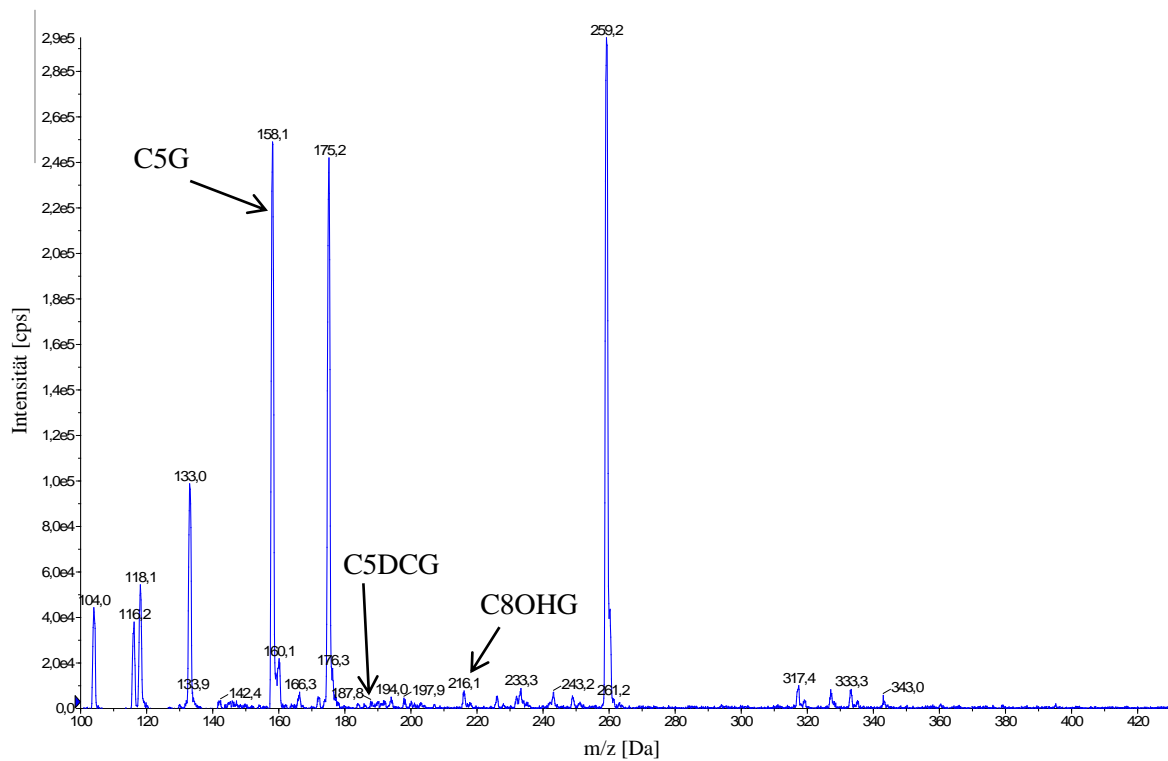


Diagramm 24: Acylglycinprofil eines Patienten mit IVA

Die Acylglycine C5G, C5DCG und C8OHG sind gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detektierbar.

Das nachstehende Diagramm 25 verdeutlicht die ROC-Kurven und die AUC-Werte.

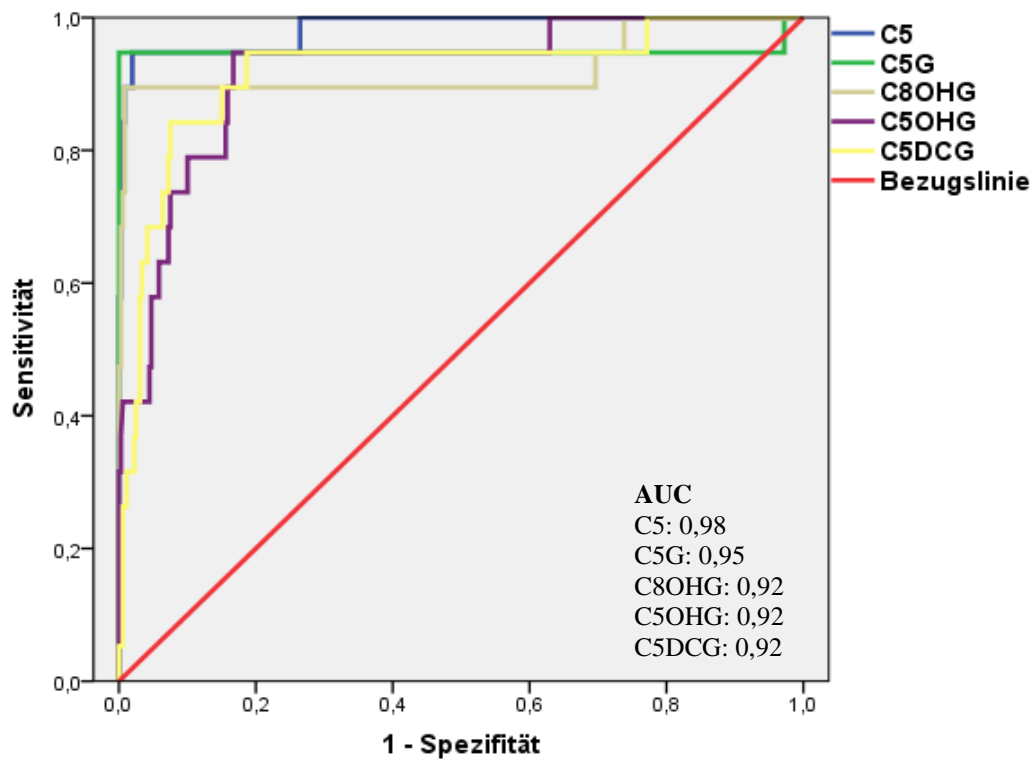


Diagramm 25: ROC-Kurven zur Unterscheidung Gesunder von an IVA Erkrankten

Dargestellt sind die ROC-Kurven sowie die Werte für die AUC. Aufgeführt sind alle Metaboliten, für die sich Flächenanteile $> 0,8$ ergaben und die somit gut geeignet waren zur Differenzierung zwischen gesunden und kranken Probanden.

Das Diagramm 26 legt die gefundenen Schwellenwerte dar. Die sich aus den Schwellenwerten ergebenden optimalen Parameterkombinationen sind in Diagramm 27 dargestellt.

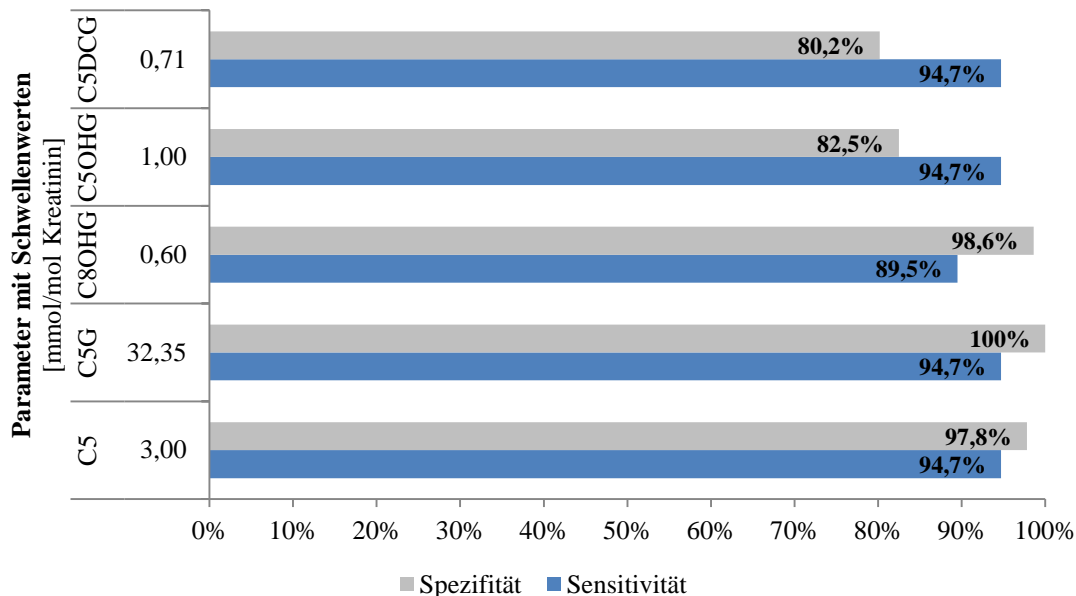


Diagramm 26: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit IVA

Waren die angegebenen Metaboliten im Urin in einer Konzentration \geq des angegeben Schwellenwertes zu detektieren, so konnte die Diagnose IVA mit der dargestellten Spezifität bzw. Sensitivität gestellt werden.

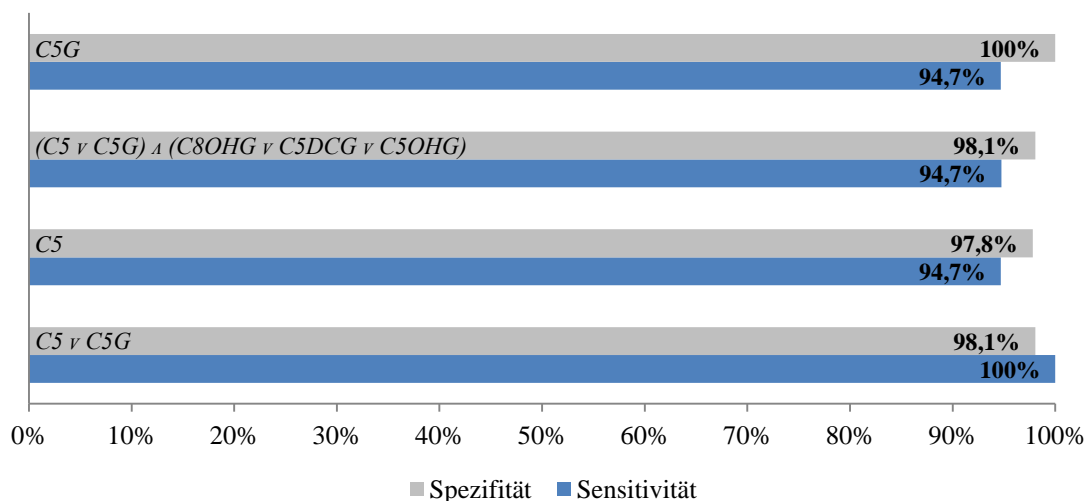


Diagramm 27: Optimierung der Diagnostik der IVA; Kombination aus C5 und C5G

Verknüpfung der Parameter mit den Bedingungen „und“ (\wedge) sowie „oder“ (\vee). Gemessene Konzentrationen \geq der festgesetzten Schwellenwerte aller in einer Parameterkombination genannten Metaboliten ließen die Diagnose IVA mit der dargestellten Spezifität (oberer Balken) bzw. Sensitivität (unterer Balken) zu.

3.3.5 Glutarazidurie Typ II

Die Diagramme 28 und 29 demonstrieren Detektionsprofile eines zufällig ausgewählten Patienten mit GA II. In Analogie zu den Profilen eines gesunden Probanden waren keine eindeutigen Peaks feststellbar.

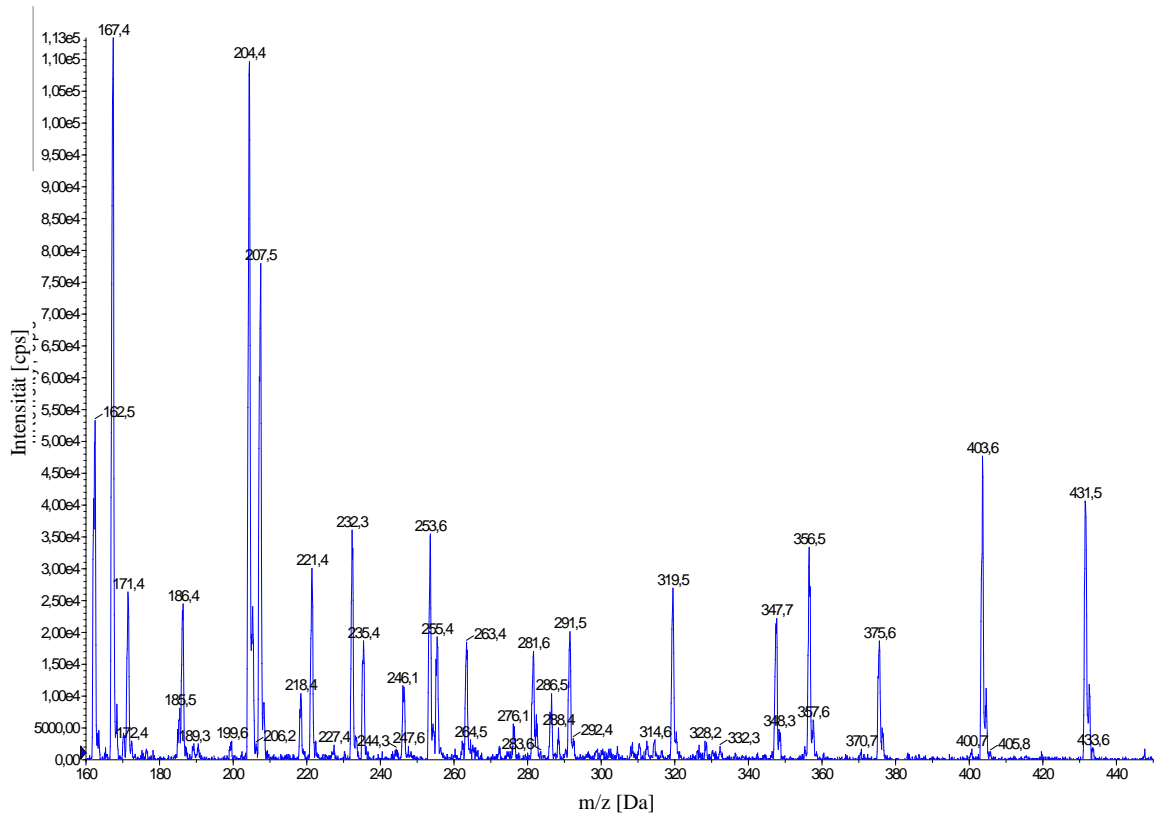


Diagramm 28: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit GA II

Es war kein Acylcarnitin gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detektierbar.

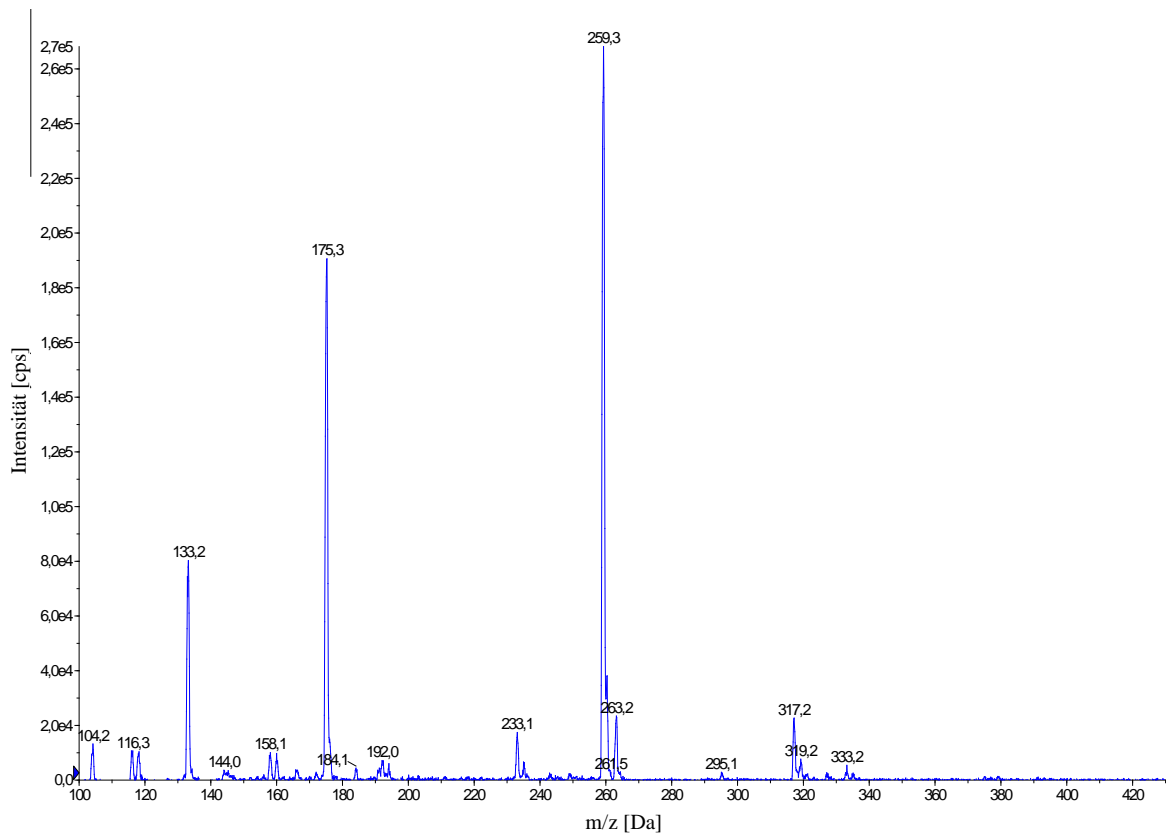


Diagramm 29: Acylglycinprofil eines Patienten mit GA II

Es war kein Acylglycin gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detektierbar.

Auch die statistische Auswertung mit Hilfe der ROC-Kurven erbrachte keine markanten Parameter. Einzig der Parameter C4G hatte einen AUC-Wert größer 0,8. Jedoch zeigte sich dieser, wie Tabelle 11 zu entnehmen ist, wenig sensitiv und spezifisch.

Tabelle 11: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit GA II

Parameter	Schwellenwert (mmol/mol Kreatinin)	Sensitivität	Spezifität	AUC
C4G	0,75	100,0%	37,9%	0,82
C4G	1,45	73,3%	67,4%	
C4G	3,83	40,0%	97,8%	

3.3.6 Glutarazidurie Typ I

Nachfolgend dargestellt sind zunächst die Acylcarnitin- und Acylglycinprofile eines Patienten mit GA I. Auffällige Peaks im Ausscheidungsmuster sind markiert.

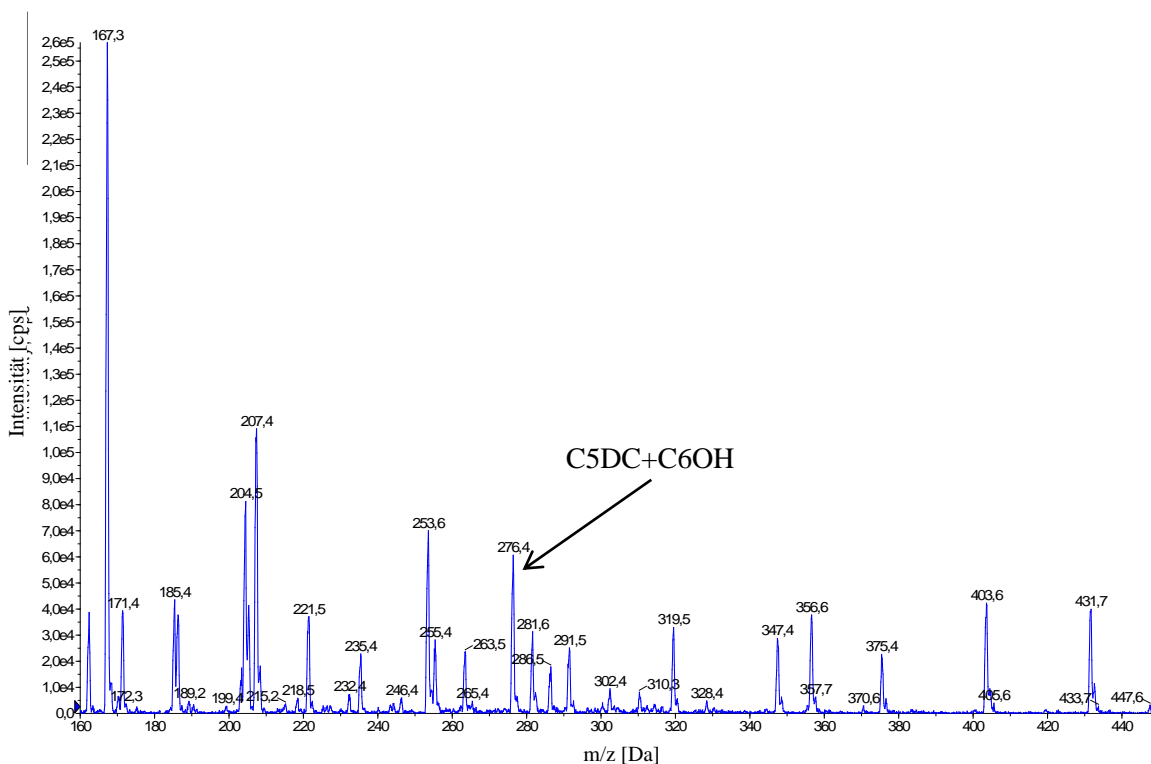


Diagramm 30: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit GA I

Das Acylcarnitin C5DC+C6OH war gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detektierbar.

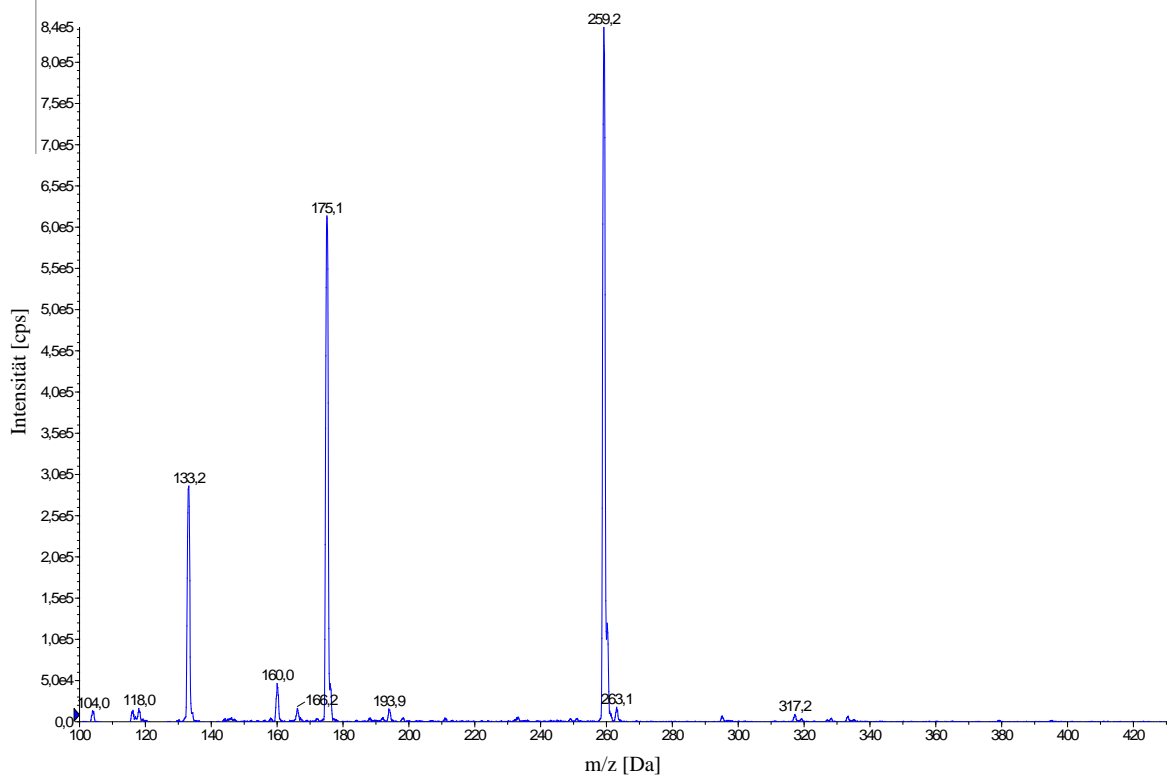


Diagramm 31: Acylglycinprofil eines Patienten mit GA I

Es war kein Acylglycin gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detektierbar.

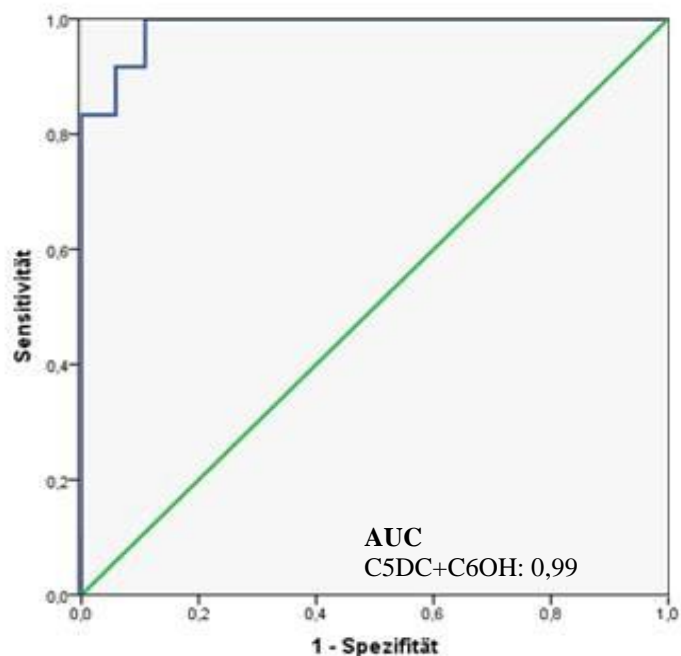


Diagramm 32: ROC-Kurve zur Unterscheidung Gesunder von an GA I Erkrankten

Dargestellt ist die ROC-Kurve sowie der Wert für die AUC des Metaboliten C5DC+C6OH. Dies war mit einem Flächenanteile von 0,99 der einzige Metabolit, der ausgezeichnet geeignet war zur Differenzierung zwischen gesunden und kranken Probanden.

Die statistische Auswertung bestätigte, dass sich für die GA I nur ein typischer Parameter definieren ließ. Das Diagramm 32 gibt die ROC-Kurve des eruierten Parameters C5DC+C6OH wieder.

Verschiedene Schwellenwertkonzentrationen und deren Treffsicherheit in der Diagnostik der GA I dokumentiert Diagramm 33.

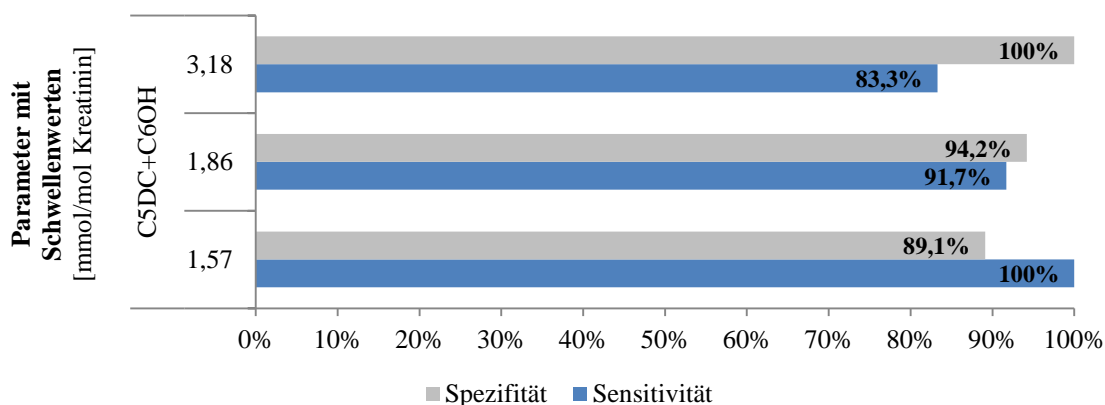


Diagramm 33: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit GA I

$C5DC+C6OH \geq 1,86$ mmol/mol Kreatinin

Waren die angegebenen Metaboliten im Urin in einer Konzentration \geq des angegeben Schwellenwertes zu detektieren, so konnte die Diagnose GA I mit der dargestellten Spezifität bzw. Sensitivität gestellt werden.

3.3.7 3-Methylcrotonylglycinurie

In den Diagrammen 34 und 35 sind die auf den ersten Blick auffallenden Peaks im Vergleich zu den Detektionsprofilen eines Gesunden hervorgehoben.

Die statistische Auswertung erbrachte für diesen Stoffwechseldefekt sehr empfindliche Marker. Dem Diagramm 36 können die ROC-Kurven und die teils sehr guten AUC-Werte entnommen werden.

Bei der Betrachtung der angesetzten Schwellenwerte wird deutlich, dass sich selbst für einzelne Werte Sensitivitäten und Spezifitäten von hundert Prozent erreichen ließen (s. Diagramm 37). Die hier berücksichtigten Parameterkombinationen für eine exakte Diagnosestellung sind entsprechend in Diagramm 38 dargestellt.

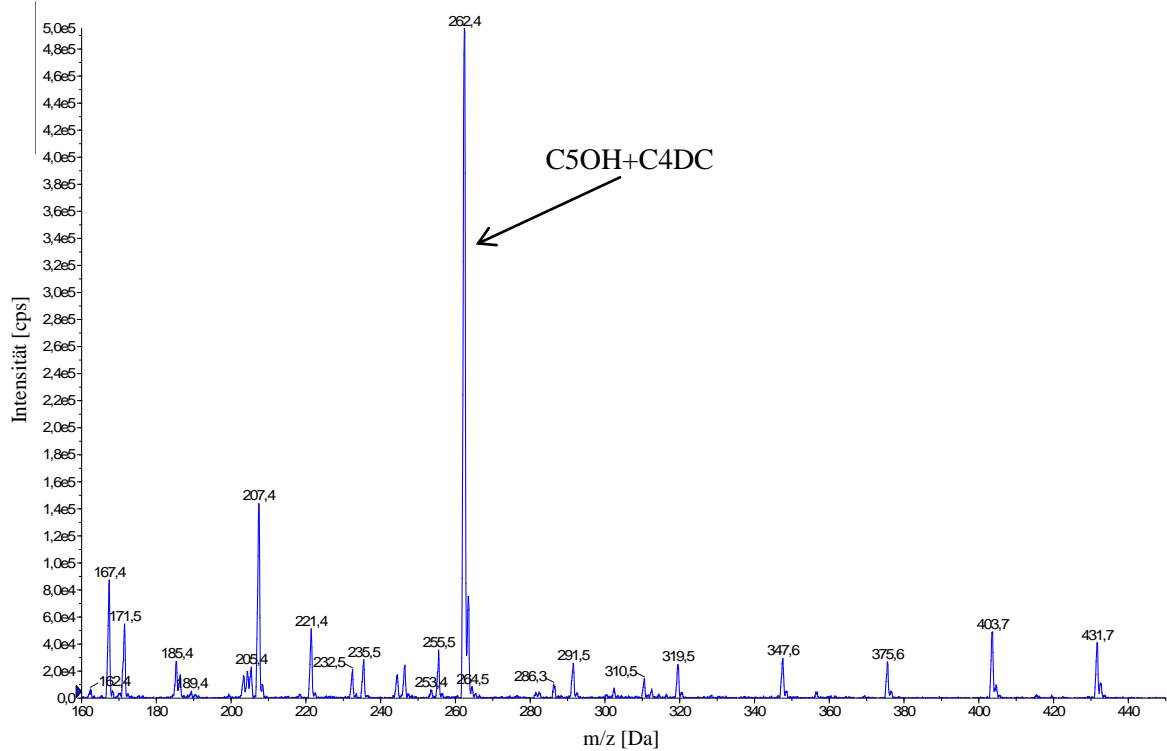


Diagramm 34: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit 3-MCG

Das Acylcarnitine C5OH+C4DC war gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detektierbar.

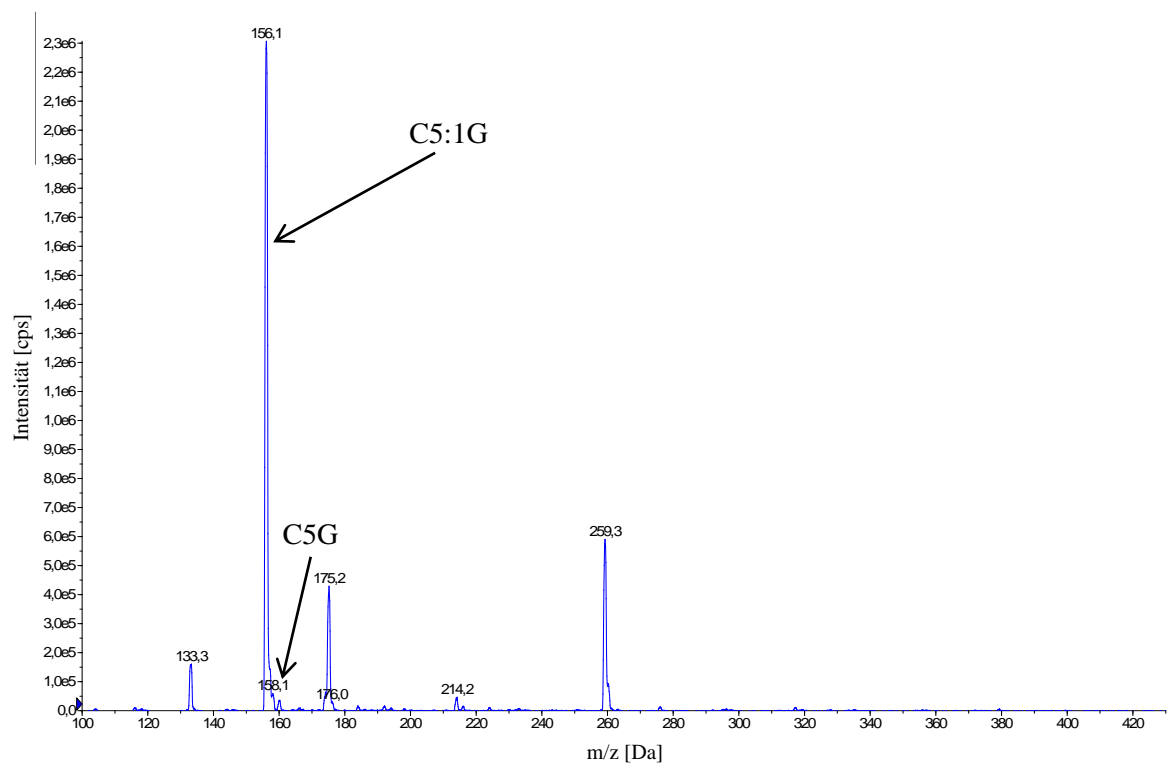


Diagramm 35: Acylglycinprofil eines Patienten mit 3-MCG

Die Acylglycine C5:1G und C5G waren gegenüber einem Stoffwechselgesunden in erhöhter Intensität detektierbar.

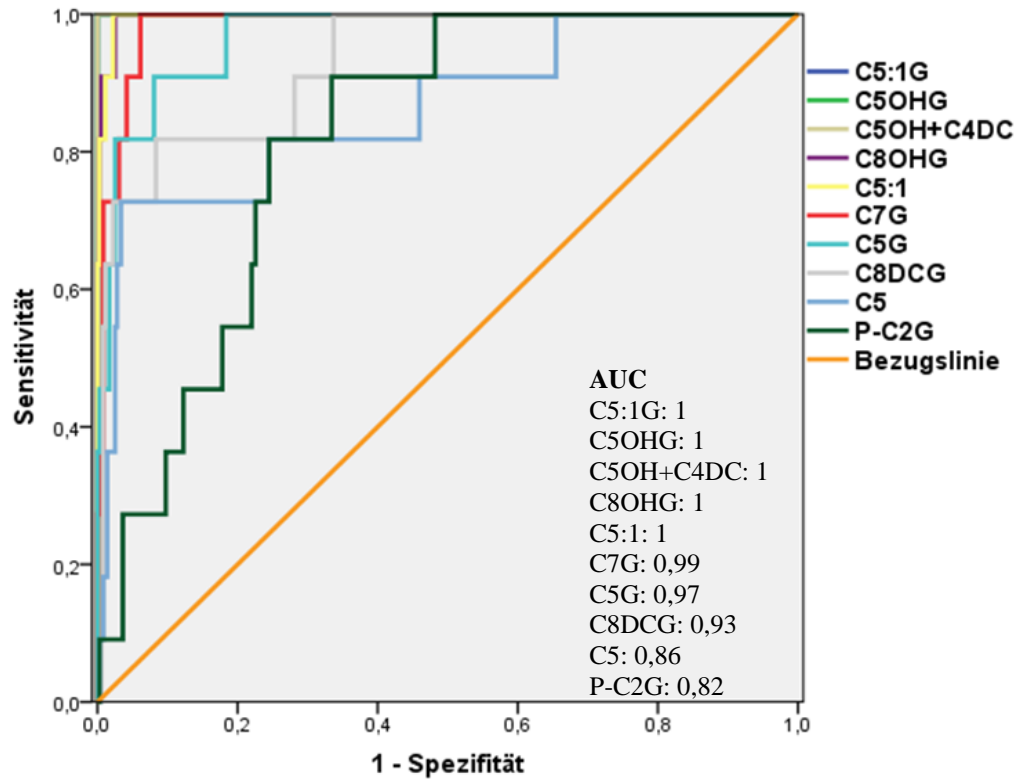


Diagramm 36: ROC-Kurven zur Unterscheidung Gesunder von an 3-MCG Erkrankten

Dargestellt sind die ROC-Kurven sowie die Werte für die AUC. Aufgeführt sind alle Metaboliten, für die sich Flächenanteile $> 0,8$ ergaben und die somit gut geeignet waren zur Differenzierung zwischen gesunden und kranken Probanden.

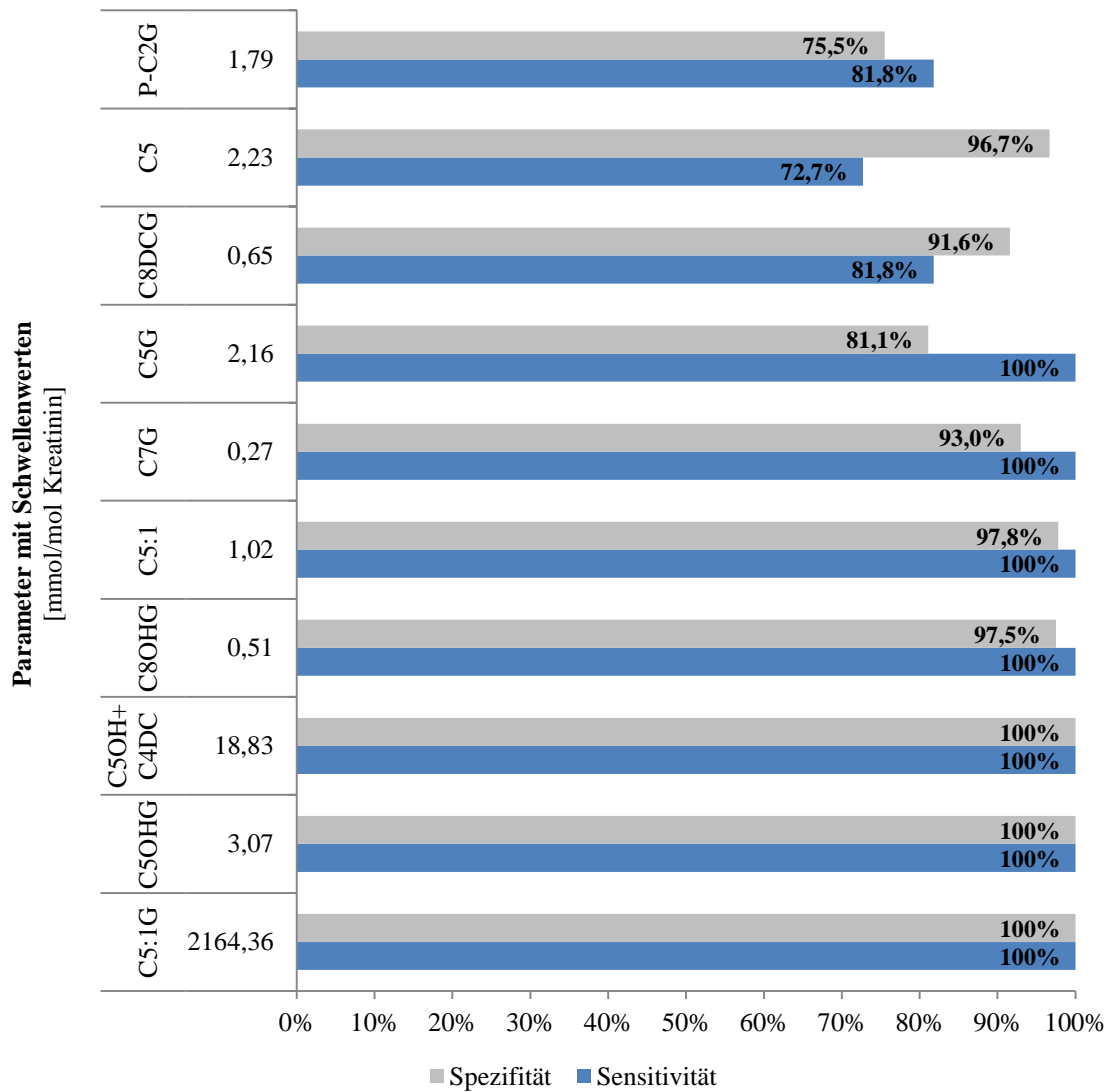


Diagramm 37: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit 3-MCG

Waren die angegebenen Metaboliten im Urin in einer Konzentration \geq des angegeben Schwellenwertes zu detektieren, so konnte die Diagnose 3-MCG mit der dargestellten Spezifität bzw. Sensitivität gestellt werden.

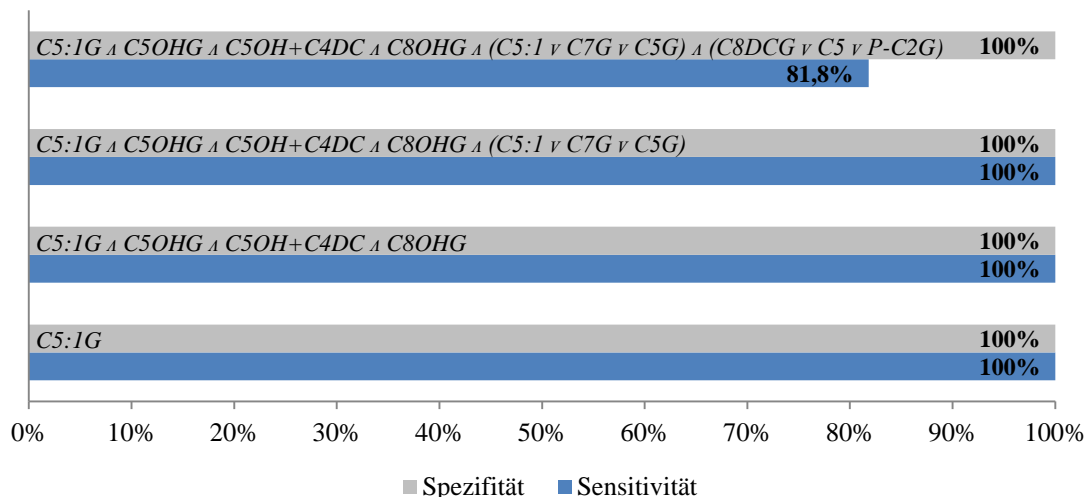


Diagramm 38: Optimierung der Diagnostik der 3-MCG

Kombination aus C5:1G, C5OHG, C5OH+C4DC, C8OHG, C5:1, C7G, C5G

Verknüpfung der Parameter mit den Bedingungen „und“ (\wedge) sowie „oder“ (\vee). Gemessene Konzentrationen \geq der festgesetzten Schwellenwerte aller in einer Parameterkombination genannten Metaboliten ließen die Diagnose 3-MCG mit der dargestellten Spezifität (oberer Balken) bzw. Sensitivität (unterer Balken) zu.

3.3.8 Andere

Andere FAO

Die statistische Auswertung erbrachte keine prägnanten Marker für diese Krankheitsgruppe. Allein der Parameter C8OHG war, wie Tabelle 12 zeigt, mäßig auffallend. Aufgrund geringer Probenzahlen konnten die Unterformen dieser Erkrankungsgruppe (VLCADD, SCADD, LCHADD, CPT I) nicht getrennt mit Hilfe von ROC-Kurven beurteilt werden. Auch bei der Analyse der Unterformen in Bezug auf Erhöhungen einzelner Metaboliten über Werte der 97,5. Perzentile ließen sich keine aufschlussreichen Parameter evaluieren.

Tabelle 12: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit anderen FAO

Parameter	Schwellenwert (mmol/mol Kreatinin)	Sensitivität	Spezifität	AUC
C8OHG	0,19	90,0%	58,2%	0,79
C8OHG	0,23	70,0%	73,3%	
C8OHG	0,40	50,0%	95,3%	

Tyr I

Lediglich für den Parameter C10:2 ergaben sich AUC-Werte größer als 0,8. Eine Festle-

gung ausreichend sensibler Schwellenwerte war, wie Tabelle 13 zu entnehmen ist, jedoch nicht möglich.

Tabelle 13: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit Tyr I

Parameter	Schwellenwert (mmol/mol Kreatinin)	Sensitivität	Spezifität	AUC
C10:2	0,29	100,0%	56,5%	0,85
C10:2	0,41	80,0%	74,9%	
C10:2	1,03	40,0%	95,0%	

MSUD

Die Auswertung erbrachte keine bedeutsamen Marker.

3.3.9 Übersicht

Die nachfolgende Tabelle 14 gibt einen abschließenden Überblick über die vorgestellten Ergebnisse.

Tabelle 14: Überblick über die diagnostisch relevanten Parameter

	MCADD	MMA	IVA	PA	GAI II	GAI	3-MCG	andere FAO	Tyr I	MSUD
Acylcarnitine	C0									
	C2				✓					
	C3		✓		✓					
	C4				✓					
	C4OH+C3DC				✓					
	C5		✓	✓	✓			✓		
	C5:1				✓			✓		
	C5DC+C6OH				✓					
	C5OH+C4DC		✓		✓		✓			
	C6	✓			✓					
	C6DC									
	C8	✓			✓					
	C8:1									
	C10									
	C10:1	✓								
	C10:1OH									
	C10:2									✓
	C12									
	C12:1									
	C12:1OH									
	C12OH									
	C14									
	C14:1									
	C14:1OH									
	C14:2									
	C14OH									
	C16									
	C16:1									
	C16:1OH									
	C16OH									
	C18									
	C18:1									
	C18:1OH									
C18:2										
C18:2OH										
C18OH										
HMG										
Acylglycine	C2G				✓					
	P-C2G		✓		✓		✓			
	C3G				✓					
	P-C3G	✓			✓					
	C4G				✓	✓				
	C4OHG				✓					
	C5:1G				✓			✓		
	C5DCG				✓					
	C5G			✓	✓			✓		
	C5OHG	✓		✓	✓			✓		
	C6G	✓			✓			✓		
	C7:1G				✓					
	C7G	✓			✓			✓		
	C8DCG	✓			✓			✓		
	C8OHG	✓		✓	✓			✓	✓	
	C14G				✓					
	C18:1G				✓					

4 Diskussion

4.1 Methodenvalidierung

4.1.1 Durchgeführte Untersuchungen

Nachweisgrenze

Die ermittelten Nachweisgrenzen variierten teils stark, so war C0 bis zu einer Konzentration von $3\mu\text{mol/l}$ zuverlässig zu messen, wohingegen C5G bis zu einer Konzentration von $0,1\mu\text{mol/l}$ empfindlich zu detektieren war. Insgesamt waren die Nachweisgrenzen der Substanzgruppe der Acylglycine etwas niedriger als die der Acylcarnitine. Es ist davon auszugehen, dass die im Urin vorhandenen Salze ein starkes Hintergrundrauschen verursachen und schwache Signale in diesem Rauschen untergehen. Die Möglichkeit, die Nachweisgrenzen durch eine Butylierung der Urinproben zu verbessern, wird im Folgenden diskutiert (s. 4.1.2). Da nicht für alle in dieser Arbeit untersuchten Substanzen eine Reinstanz zur Verfügung stand, konnte das LOD nicht für alle Metaboliten bestimmt werden. Nur wenige Substanzen hatten eine Nachweisgrenze unter $0,2\mu\text{mol/l}$. Letztendlich war davon auszugehen, dass alle ermittelten Konzentrationen nahe dieser Nachweisgrenze nur eingeschränkt beurteilbar waren und eine quantitative Messung in diesem Grenzbe-
reich nicht sicher möglich war. Insgesamt wurden die untersuchten Substanzen im Regelfall in sehr geringer Konzentration ausgeschieden. Strenggenommen handelte es sich somit bei den meisten erhobenen Messdaten um semiquantitative Daten.

Matrixeffekt

Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, zeigte sich nur für die Acylglycine ein signifikanter Matrixeffekt, insbesondere bei den Acylglycinen, die im Lösungsmittel $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ kalibriert wurden. Der Matrixeffekt ist immer abhängig von der Masse, der Zusammensetzung der Probe und dem Lösungsmittel. In der Untersuchungsmatrix Urin führt vor allem der variable Gehalt an Salzen zu einer signifikanten Suppression der Ionensignale.⁸² Bisher ist die Elektrosprayionisation im negativen Ionenmodus weniger verstanden als die Elektrosprayionisation im positiven Ionenmodus, sodass keine abschließende Erklärung zur stärkeren Auswirkung des Matrixeffektes bei der Detektion der Acylglycine gegeben werden kann. Eine mögliche Erklärung für den deutlicheren Matrixeffekt im Falle einer Kalibration in $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ wäre, dass $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ kleinste Partikel aus den Proberöhrchen löst, welche dann zu einer Interaktion führen können. Zur effektiven Ausschaltung des Matrixeffektes wäre eine chromatografische Trennung nötig. Eine Bestimmung ohne vorherige Chromatografie

- wie in dieser Arbeit - ist daher semiquantitativ. Zum Ausgleich des Matrixeffektes wird in der Regel ein deuterierter interner Standard mitgeführt. Es war jedoch nicht für jeden Metaboliten ein eigener interner Standard verfügbar. Außerdem zeigte sich für den Metaboliten C5G trotz eigenem Standard ein signifikanter Matrixeffekt. Diese Variabilität der Messung könnte an einer unzureichenden, nicht sehr stabilen Übertragung von Ladungen liegen, da zu viele andere Moleküle vorhanden sind, die Ladungen aufnehmen können und gegebenenfalls weitergeben. Da die Matrix in der Regel einen großen Einfluss hat, ist es anzuraten, Matrix-basierte Kalibrierungskurven zu verwenden. Dies ist jedoch im Fall von humanem Material schwierig, da es zum einen kompliziert ist, eine „künstliche Matrix“ zu erstellen, und zum anderen mit dieser vorhandene interindividuelle Unterschiede nicht ausgeglichen werden.⁹⁹ Eine Minimierung des Matrixeffektes wäre auch durch eine weitere Verdünnung möglich, wobei der Matrixeffekt nicht linear sondern logarithmisch mit der Konzentration korreliert, das heißt eine zehnfache Verdünnung reduziert den Matrixeffekt auf lediglich 60%. Für die Zukunft sollte für jeden Metaboliten ein eigener stabilisotopenmarkierter Standard zur Verfügung stehen und bereits die Kalibration in einer künstlichen Urinmatrix erfolgen, wie zum Beispiel von Pitt et al. 2002 publiziert.⁸²

Präzision der Messung

Die Messungen waren für die Testungen innerhalb des gleichen Versuchsdurchlaufs präzise. Auch für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für Messungen an zehn verschiedenen Tagen ergaben sich akzeptable CV. Wobei die ermittelten CV für die Substanzen C2, C8 und C8DCG zwar über 15%, jedoch noch unter 20% lagen. Einige CV für die Substanzen C0, C5, C14, C16, C14G, C18:1G und C5:1G lagen über 20%. Insgesamt wiesen die Acylglycine etwas kleinere CV als die Acylcarnitine auf. Im Allgemeinen gelten Schwankungsbreiten von 15% als akzeptabel.⁹² Allerdings beziehen sich diese Vorgaben auf massenspektrometrische Methoden mit vorheriger Chromatografie. Da in dieser Arbeit eine Fließinjektionsmethode ohne vorherige Trennung zur Anwendung kam, ist sicherlich der Schluss zulässig, hier breitere Schwankungsbreiten bis 20% zu akzeptieren. Insgesamt war somit die Präzision der Messung mit dieser Methode ausreichend.

4.1.2 Diskussion der Anwendungsmöglichkeit der Methode

Isobare/Isomere

Wie oben bereits beschrieben wurde in dieser Arbeit anhand der Molmasse auf die Metaboliten zurückgeschlossen. Ein Rückschluss aus der Molmasse auf die chemische Struktur

war jedoch nicht möglich. Daher konnte in dieser Arbeit für die Molmasse 248,2 nicht zwischen C4OH und C3DC, für die Molmasse 262,2 nicht zwischen C5OH und C4DC und für die Molmasse 276,1 nicht zwischen C5DC und C6OH unterschieden werden. Diese Metaboliten wurden daher jeweils als Summe angegeben. Auch die Position der Hydroxygruppe war nicht bestimmbar. C4DC beinhaltet daher sowohl Methylmalonat, als auch Succinat. Auch C4 kann als Butyrylcarnitin entweder aus dem Fettsäureoxidationsmetabolismus oder als Isobutyrylcarnitin aus dem Valin-Metabolismus stammen.¹⁵ C5 kann neben dem Isovalerylcarnitin, auch als Verunreinigung für Pivaloylcarnitin stehen. Dies wird bei mit Pivalinsäure haltigen Antibiotika^{xxvi} therapierten Patienten gebildet.¹⁰⁰ Außerdem sind beispielsweise C3DC und C8OH sowie C5DC und C10OH als Mischung zu detektieren.¹⁵ Allgemein gilt, je länger die Kettenlänge desto wahrscheinlicher ist eine Isomerbildung.

Um zwischen Isobaren unterscheiden zu können, müsste im Vorfeld eine chromatografische Trennung des Substanzgemisches erfolgen.¹⁰¹ Mit dem Ziel, eine schnelle Methode zu entwickeln, fiel die Entscheidung in dieser Arbeit bewusst gegen ein solches Verfahren und dem damit verbundenen zeitlichen Mehraufwand. Bei gegebener Molmasse wurde es als ausreichend genau angesehen, den am wahrscheinlichsten vorliegenden Metaboliten zu postulieren.

Semiquantitative Daten

Wie bereits beschrieben, sind die hier erhobenen Daten gewissermaßen semiquantitativ. Es war gleichwohl davon auszugehen, dass die Ausscheidung der Acylcarnitine und Acylglycine im Urin zwischen den Kranken und den Gesunden in hinreichender Größe variiert, sodass zu diagnostischen Zwecken semiquantitative Daten ausreichen. Die statistische Auswertung erfolgte jedoch unter der Annahme quantitativer Daten. Somit bestätigte die mathematische Auswertung die Gültigkeit der hier vorgestellten Methode. Die bestimmten Schwellenwerte sollten allerdings als Annäherung betrachtet und nicht starr bis zu mehreren Nachkommastellen vorausgesetzt werden. Vielmehr sind die Schwellenwerte in einer gewissen Schwankungsbreite individuell zu beurteilen. Allgemein gilt: Je höher der Schwellenwert ist, desto valider ist er. So fanden sich für die Erkrankungen IVA, PA und 3-MCG für einige Parameter Grenzwerte mit Konzentrationen größer 10 mmol/mol Kreatinin, welche eine hohe Treffsicherheit haben und einen größeren Schwankungsbereich tolerieren. Bei allen anderen hier untersuchten Stoffwechseldefekten lagen die Schwellen-

^{xxvi} In Deutschland sind diese nicht verfügbar

werte im einstelligen Bereich. Diese sind daher weniger valide und dulden nur kleinere Abweichungen. In diesen Fällen sollte mit den empfohlenen Parameterkombinationen gearbeitet werden.

Butylierung

Fraglich ist, ob es durch eine Butylierung der Urinproben vor der Analyse möglich gewesen wäre, empfindlichere Daten zu erlangen. Da jedoch eine Butylierung mit wesentlich mehr Zeitaufwand verbunden ist, bleibt abzuwägen, inwieweit dieser Mehraufwand tatsächlich Vorteile gegenüber der hier dargestellten Methode bietet. Zur Beurteilung wäre es nötig, einen Versuch mit derivatisierten Urinproben zu unternehmen und die erhaltenen Ergebnisse zu vergleichen. Allgemein wird durch Butylierung das Molekül größer, wodurch es sich besser ionisieren lässt und folglich mit höherer Intensität detektiert werden kann.³⁹ Dadurch wird das Hintergrundrauschen kleiner, das Signal zu Rausch Verhältnis größer und damit der Nachweis empfindlicher. Jedoch bedeutet eine Butylierung eine Aufarbeitung von zwei Stunden und ist unter Umständen durch eine längere und zum Teil kompliziertere Aufarbeitung fehlerbehafteter, was wiederum zu unpräziseren Ergebnissen führen könnte. Eine Arbeit, die eine MS/MS Methoden mit und eine MS/MS Methode ohne Derivatisierung verglich, kam zu dem Schluss, dass es für die meisten der dort bestimmten Aminosäuren und Acylcarnitine nur geringfügige Unterschiede (<15%) in der Höhe der Intensität der Messung zwischen beiden Methoden gab.¹⁰² Zusammenfassend scheint eine Butylierung daher keine signifikanten Vorteile zu bieten.

Chromatografische Trennung

Eine chromatografische Trennung im Vorfeld im Sinne einer LC (liquid chromatography)-MS/MS Methode würde, wie oben bereits angedeutet, zu einer Reduktion des Matrixeffektes führen und daher genauere Messungen ermöglichen. Allerdings fiel auch in diesem Fall die Entscheidung bewusst gegen eine Trennung und für eine FIA-MS/MS zu Gunsten einer schnelleren und einfacheren Methode.

Vorteile gegenüber der Bestimmung organischer Säuren mittels GC-MS

Es gibt die Möglichkeit, die Analyse zu automatisieren, wobei das ursprüngliche Ziel einer automatischen Auswertung, aufgrund der komplexen Parameterkombinationen zu hinterfragen ist. Die Analyse ist deutlich schneller, und es sind nur 40µl Urinprobe für die gesamte Analyse nötig. Für die Aufarbeitung von 96 Urinproben benötigt eine geübte Person ungefähr eine Stunde. Der Zeitaufwand pro Analyse liegt für das Tandem-MS bei zwei

Minuten. Da pro Probe jeweils eine Analyse für die Acylcarnitine und eine für die Acylglycine erhoben werden muss, ergibt sich somit insgesamt eine Dauer von lediglich vier Minuten pro Probe.

Precursor Ion Scan

In dieser Methode kamen hauptsächlich Prec-Scan-Experimente zur Anwendung. Dies war gewollt, um neue bisher unbekannte Substanzen zu detektieren. Allerdings wurden keine neuen Substanzen gefunden. In Zukunft ist daher zu erwägen, ob nicht nur MRM-Experimente mit den sich in dieser Arbeit als geeignet gezeigten Parameter ausgeführt werden sollten. Einzelne MRM-Scans sind zeitlich ebenso schnell wie Prec-Scans hätten aber eventuell den Vorteil, dass sie genauer wären.

4.2 Normalbefunde

Anhand von 359 Urinproben stoffwechselgesunder Probanden gelang es repräsentative Referenzwerte für Acylcarnitine und Acylglycine im Urin zu etablieren.

Laborübergreifende Ergebnisse

In der Vergangenheit wurden für einige Acylcarnitine unter anderem bereits Referenzwerte im Urin von Smith et al. und Mueller et al. eingeführt.^{15,76} Auch für einige Acylglycine im Urin gab es schon publizierte Referenzwerte.^{77,103} Ein direkter Vergleich der hier erhobenen Referenzwerte mit früher veröffentlichten war jedoch unmöglich, da die Schwellenwerte oft andersartig festgelegt wurden. Zudem schränkten unterschiedliche Untersuchungsbedingungen und unterschiedliche Methoden einen direkten Vergleich ein. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass die erhobenen Referenzwerte für jedes Labor getrennt zu bestimmen sind, um die Labor und Geräte spezifischen Faktoren miteinzubeziehen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es erstmals gelang, in diesem Umfang sowohl für Acylcarnitine als auch für Acylglycine Referenzwerte festzulegen.

97,5. Perzentile als Cut off

Mit insgesamt 359 Proben stoffwechselgesunder Probanden gelang es uns, eine repräsentative, altersunabhängige 97,5. Perzentile zu generieren. Die ursprüngliche Vermutung, dass die Ausscheidung charakteristischer Metabolite bei Patienten mit Stoffwechseldefekten weit über der 97,5. Perzentile liegt, konnte nicht aufrechterhalten werden. So war es oftmals nötig, die endgültigen Schwellenwerte unter der 97,5. Perzentile anzusetzen, um nicht

zu viele stoffwechselkranke Patienten zu übersehen. Kombinationen aus verschiedenen auffälligen Parametern halfen bei Referenzwerten unter der 97,5. Perzentile wiederum, die Zahl der Falsch-Positiven zu minimieren.

Altersspezifische Unterschiede

Die statistische Auswertung erbrachte altersabhängige Unterschiede in der Ausscheidung der Acylcarnitine und der Acylglycine. Folglich wurden auch altersabhängige 97,5. Perzentilen bestimmt. Da diese Perzentilen im Schnitt nur mit weniger als 100 Proben pro Altersgruppe zu generieren waren, waren diese anfällig gegenüber Ausreißern. Insgesamt schienen insbesondere die jüngeren Individuen (< 2 Jahre) höhere Referenzwerte im Urin aufzuweisen. Um jedoch eine endgültige Aussage treffen zu können, müssten die Untersuchungen an einem breiteren Probandenkollektiv erfolgen. Die kleinen Fallzahlen machten es zudem unmöglich, diese Alterseffekte in Bezug auf die Ausscheidungsmuster im Krankheitsfall zu evaluieren. Ein altersspezifischer Effekt ist gerade für Schwellenwerte, die deutlich unter der 97,5. Perzentile liegen, nicht auszuschließen. Die Sensitivität und die Spezifität der Diagnostik könnte wahrscheinlich unter Berücksichtigung dieser Alterseffekte zusätzlich gesteigert werden.

Für die Acylcarnitinkonzentration im Trockenblut wie auch im Urin waren gewisse altersabhängige Unterschiede bereits bekannt.^{76,104} Mueller et al. fanden eine signifikant höhere Acylcarnitinausscheidung bei den Neonaten, was die Tendenz in dieser Arbeit bekräftigte.⁷⁶ Bonafé et al. konnten hingegen keine altersabhängigen Unterschiede in der Acylglycinausscheidung feststellen.⁷⁷

Weitere Unterschiede

Es konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im Ausscheidungsmuster gefunden werden.

Mueller et al. fanden eine inverse Relation zwischen der Kettenlänge und der Ausscheidungsrate der Acylcarnitine.⁷⁶ Ein ähnlicher Effekt ließ sich auch in dieser Arbeit feststellen. So zeigten sowohl die Acylcarnitine als auch die Acylglycine mit kurzer Kettenlänge tendenziell eine höhere Ausscheidung als langkettige Acylcarnitine und Acylglycine.

4.3 Untersuchte Stoffwechseldefekte

4.3.1 Mittelkettiger Acyl-CoA-Dehydrogenase Defekt

Für diese Erkrankung gefundene charakteristische Acylcarnitine sind C6, C8 und C10:1. Diese waren in der bisherigen Literatur schon beschrieben.^{76,80,82} Auch die typischen Acylglycine P-C3G, C6G, C7G, C8DCG und C8OHG sind bereits beschrieben worden.^{77,82,84} Über diese Metaboliten hinaus konnte in dieser Arbeit erstmals der Parameter C5OHG als Marker für den MCADD identifiziert werden.

Um eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten, mussten die Schwellenwerte der evaluierten Parameter teilweise so niedrig angesetzt werden, dass diese alleinstehend wenig aussagekräftig waren. Bei der Betrachtung von Parameterkombinationen aus mehreren charakterisierenden Metaboliten wurde allerdings deutlich, dass es trotz niedriger Schwellenwerte möglich war, sensitiv und zugleich spezifisch Kranke von Gesunden zu unterscheiden. Insgesamt gilt, dass je mehr der charakterisierenden Metaboliten in Konzentrationen über den festgelegten Schwellenwerten zu detektieren sind, desto wahrscheinlicher handelt es sich um eine pathologische Urinprobe. Die sichere Diagnose ist über ein individuelles Abgleichen des gefundenen Ausscheidungsprofils mit den aufgeführten Parameterkombinationen möglich. Im besten Fall war unter Berücksichtigung einer Kombination aus den Metaboliten C8, C8DCG, C7G, C6G, C8OHG, C6, P-C3G, C5OHG und C10:1 die Diagnosestellung der Erkrankung MCADD mit einer Sensitivität von 94% und einer Spezifität von 93% realisierbar. Auch wenn es sich hierbei um eine theoretische statistische Annahme handelte, so ist der Schluss zulässig, dass anhand des Acylcarnitin- und Acylglycinprofils im Urin Gesunde von Patienten mit MCADD zuverlässig zu unterscheiden sind.

4.3.2 Methylmalonazidurie

Mit den Parametern C3, C5, C4DC und C3G konnten die in der Literatur beschriebenen diagnostischen Parameter bestätigt und ebenfalls als die diagnostischen Parameter der ersten Wahl identifiziert werden.^{76,77,80,82}

Wie bereits beschreiben war es nicht möglich, zwischen den Isobaren C4DC und C5OH zu unterscheiden. Allerdings ist bei dieser Erkrankung davon auszugehen, dass es sich überwiegend um eine Erhöhung von C4DC handelt, sodass für die MMA eine erhöhte Ausscheidung von C4DC postuliert wird.

Die Spezifität, mit der die Erkrankung zu diagnostizieren war, stieg mit der Anzahl der einbezogenen Parameter und wurde im Fall einer Erhöhung aller Parameter über den festgelegten Schwellenwert maximal. Allerdings waren die bestimmten Metaboliten nicht sehr sensitiv, sodass die Diagnose dennoch am sichersten zu stellen war, indem ausschließlich der Parameter C3 betrachtet wurde. Für diesen Fall ergaben sich eine Sensitivität von 94% und eine Spezifität von 96%. Betrachtete man allerdings ausschließlich den Parameter C3, war eine Abgrenzung zur Erkrankung PA nicht gegeben, da C3 auch für diese Erkrankung der sensitivste und zugleich spezifischste Parameter war. Der Parameter C4DC war für diese Erkrankung hingegen nicht typisch, und andererseits ergaben sich für diese Erkrankung eine Reihe weiterer Metaboliten, die wiederum nicht für die MMA bezeichnend waren. Im konkreten Anwendungsfall ist ein individuelles Abwägen notwendig, insgesamt ist aber eine orientierende Entscheidung zwischen gesund und an MMA erkrankt aufgrund des Acylcarnitin- und Acylglycinprofils im Urin gegeben.

4.3.3 Propionazidämie

Als allgemein typisch für diese Erkrankung konnten bisher die Metaboliten C3 und C3G evaluiert werden.^{76,77,80,82,84} Auch wurden bereits unspezifische Erhöhungen für die Acylcarnitine C0, C2, C5 und C8 sowie für die Acylglycine C4G, C5G, C5:1G und C6G beschrieben.^{76,77,80,84} Darüber hinaus konnten in dieser Arbeit erstmals weitere für eine PA charakteristische Parameter identifiziert werden: Dies sind für die Acylcarnitine C6, C4OH+C3DC und C5:1 sowie für die Acylglycine C5OHG, C8OHG, C5DCG, C7G, C8DCG, P-C3G, C2G, C4OHG und C14G.

Auffallend ist, dass viele der ermittelten Parameter in dieser Form bisher nicht bekannt waren. Einige der hier untersuchten Urinproben stammten von einer Patientin mit einer schweren Verlaufsform der Erkrankung. Urinproben dieser Patientin zeigten auch in der routinemäßigen Untersuchung der organischen Säuren im Urin stets ein sehr ausgeprägtes Ausscheidungsprofil. Auf einen möglichen Einfluss der Verlaufsform einer Erkrankung auf die Ausscheidungsmuster wird auch im Folgenden (s. 4.3.9) eingegangen.

Eine gesicherte Diagnose der PA ist bei einer Erhöhung der Parameter C3, C5OHG, C0, C5:1G und C8OHG über den festgelegten Schwellenwert gegeben.

4.3.4 Isovalerianazidämie

Prägnant war für diese Erkrankung die Ausscheidung von C5 und C5G im Urin.^{76,77,82,84} Erstmals konnten die Metaboliten C8OHG, C5OHG und C5DCG als charakteristische Parameter für die IVA identifiziert werden. Diese Parameter erwiesen sich für diese Erkrankung als relativ sensitiv und spezifisch, sodass die Schwellenwerte teilweise hoch angesetzt werden konnten. Die Diagnose der Erkrankung IVA war 100% sensitiv und 98% spezifisch bei einer Erhöhung von C5 oder C5G über den angesetzten Schwellenwert. Auch für diese Erkrankung lässt sich somit die diagnostische Aussagekraft des Acylcarnitin- und Acylglycinprofils im Urin bestätigen.

4.3.5 Glutarazidurie Typ II

Für diese Erkrankungsgruppe ließen sich keine charakteristischen Metaboliten evaluieren und auch die Detektionsprofile waren unauffällig. Lediglich der Parameter C4G war geringfügig erhöht. Allerdings war dieser aufgrund einer geringen Sensitivität und Spezifität zu diagnostischen Zwecken nicht geeignet. Auch Bonafé et al. und Ombrone et al. fanden bei Patienten mit GA II erhöhte Konzentrationen von C4G im Urin. Sie konnten außerdem teilweise die Acylglycine C5G, C6G und C8DCG im Urin dieser Patienten detektieren.^{77,84} Auch in der Vergangenheit ließen sich keine spezifischen Acylcarnitine im Urin dieser Patienten finden.⁸⁰ Lediglich Pitt et al. fanden bei einem Patienten mit GA II eine erhöhte Konzentration des Metaboliten C5DC.⁸² Insgesamt scheint es somit schwierig zu sein, Patienten mit GA II anhand ihres Acylcarnitin- und Acylglycinprofils im Urin von stoffwechselgesunden Probanden zu unterscheiden. Allerdings ist anzumerken, dass alle in diese Erkrankungsgruppe eingeschlossenen Patienten einen sehr milden Krankheitsverlauf hatten. Auch Untersuchungen mit den Standardverfahren zeigten für diese Patienten bei guter Stoffwechsellage keine pathologischen Befunde (s. hierzu auch 4.3.9).

4.3.6 Glutarazidurie Typ I

Für diese Erkrankung ließ sich mit C5DC+C6OH nur ein charakteristischer Metabolit erarbeiten. Es ist am ehesten davon auszugehen, dass es sich hierbei, wie auch schon zuvor beschrieben, um eine Erhöhung des Metaboliten C5DC handelt.^{80,82} Eine ebenfalls publizierte Erhöhung von C5 im Urin dieser Patienten ist möglicherweise auf eine spontane Decarboxylierung von C5DC zurückzuführen.^{76,80} Auch Bonafé et al. konnten keine typischen Acylglycine im Ausscheidungsmuster dieser Patienten im Urin festmachen.⁷⁷

Unter Einbeziehung des Parameters C5DC war es möglich, eine diagnostische Sensitivität von 92% und eine diagnostische Spezifität von 94% zu erreichen. Somit ist es möglich, mit diesem Parameter eine Vorselektion für die Wahrscheinlichkeit des Bestehens der Erkrankung GA I vorzunehmen.

4.3.7 3-Methylcrotonylglycinurie

Diese Erkrankung zeigte sehr deutliche Auffälligkeiten im Ausscheidungsmuster. Aus der Literatur waren typische Erhöhungen von C5OH bekannt.^{80,82} Daher lässt sich darauf schließen, dass die Erhöhung der Metabolitensumme C5OH+C4DC im Urin dieser Patienten hauptsächlich auf C5OH zurückzuführen ist. Zusätzlich zeigten sich in dieser Arbeit die Metaboliten C5:1G, C5OHG, C8HOG und C5:1 sehr prägnant und ließen bei Überschreitung des festgesetzten Schwellenwertes die Diagnose mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von mindestens 98% zu. Auch die Parameter C7G, C5G, C8DCG, C5 und P-C2G waren für diese Erkrankung charakteristisch. Die genannten Metaboliten sind mit Ausnahme von C5OH in dieser Form bisher nicht beschrieben worden und ließen sich für die Erkrankung 3-MCG erstmalig als diagnostische Marker evaluieren. Insgesamt kann dieser Stoffwechseldefekt anhand einer Reihe von einzelnen Metaboliten und Parameterkombinationen zweifelsfrei, d.h. mit 100%iger Sensitivität und Spezifität, diagnostiziert werden.

4.3.8 Andere

Für die Gruppe der anderen FAO war ausschließlich der Parameter C8OHG auffällig. Die Empfindlichkeit dieses Parameters schien jedoch zu diagnostischen Zwecken nicht ausreichend. Auch bei isolierter Betrachtung der Unterformen dieser Gruppe zugeordneter Stoffwechseldefekte konnten keine typischen Ausscheidungsprofile gefunden werden. In der Literatur konnten bisher für Patienten mit VLCADD und LCHADD ebenfalls keine spezifischen Veränderungen im Ausscheidungsprofil festgestellt werden.^{77,80} Über die Erkrankung SCADD gibt es wenige Daten, so war in einigen Urinproben der Parameter C4G oder auch der Metabolit C4 erhöht messbar.^{77,80} Befunde zur Erkrankung CPT I waren derzeit nicht zu finden.

Auch für die Erkrankungsgruppe der Tyr I ließ sich mit dem Parameter C10:2 allenfalls ein Parameter mit geringer diagnostischer Bedeutung ermitteln. Ebenso zeigten die Patienten

mit MSUD keine Auffälligkeiten im Ausscheidungsprofil der Acylcarnitine und Acylglycine im Urin. In den bisher publizierten Studien blieben die AA unberücksichtigt.

Insgesamt ist die Diagnostik anhand des Acylcarnitin- und Acylglycinprofils im Urin für diese Krankheitsgruppen somit zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich und es sollte auf herkömmliche Verfahren zurückgegriffen werden. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass insbesondere für die anderen FAO dennoch typische Parameter existieren, die aufgrund der Zusammensetzung des Patientenkollektivs und der damit niedrigen Patientenzahl in dieser Untergruppe nicht herauszuarbeiten waren. Es könnte sich daher lohnen diese Stoffwechselerkrankungen an einem breiteren Patientenkollektiv erneut zu untersuchen.

4.3.9 Mögliche Einflüsse auf das Ausscheidungsmuster

Verlaufsform der Erkrankung

Auffällig ist, dass die Höhe der Schwellenwerte für die einzelnen Krankheiten stark variierte. Neben dem Umstand, dass dies durch die Unterschiedlichkeit der Erkrankungen zu erklären ist, bleibt die Frage offen, ob nicht auch die verschiedenen Verlaufsformen der Erkrankung eine Rolle spielen könnten. Es ist anzunehmen, dass im Fall einer klassischen oder schweren Verlaufsform der Anfall toxischer Metabolite größer ist als im Fall einer moderaten oder milden Verlaufsform. Die Tabelle 3 gibt daher auch einen groben Überblick darüber, wie häufig welche Verlaufsform der Erkrankung vorlag. Zu entnehmen ist, dass für die Krankheiten GA I und GA II die milden und moderaten Verlaufsformen überwogen und das Ausscheidungsmuster dieser somit gut mit den Verlaufsformen korrelierte. Für die Erkrankung PA hingegen überwog die schwere Verlaufsform, und es fand sich ein deutlicheres Ausscheidungsmuster. An anderer Stelle in dieser Arbeit wurde in diesem Zusammenhang bereits auf einen Patienten dieser Krankheitsgruppe mit bekannten prägnanten Profilen auch in den organischen Säuren im Urin hingewiesen. Die Stoffwechselerkrankungen MMA und MCADD hingegen zeigten trotz vieler klassischer Verlaufsformen weniger prägnante Ausscheidungsmuster als die Erkrankung IVA mit ausschließlich milden Verlaufsformen. Auffällig ist zudem, dass die sich klinisch ausschließlich benigne präsentierende Erkrankung 3-MCG, die deutlichsten Auffälligkeiten im Ausscheidungsmuster der Acylcarnitine und Acylglycine im Urin aufwies. Die Verlaufsform einer Erkrankung ist daher sicherlich von Bedeutung, scheint aber dennoch nicht den maßgeblichen Einfluss auf die Ausscheidungsprofile zu haben.

Stoffwechsellage

Es erfolgte keine Differenzierung der Urinproben in Hinblick auf die Stoffwechsellage der Erkrankung zum Zeitpunkt der Uringewinnung. Während einer Entgleisung sind die entsprechenden Acylcarnitine und Acylglycine im Urin sicherlich in den höchsten Konzentrationen zu detektieren. Die meisten der hier untersuchten Urinproben stammten aus Routinekontrollen von Patienten mit einer ausgeglichenen Stoffwechsellage, sodass davon auszugehen ist, dass die gefundenen Parameter in gleicher Weise für andere Patienten mit gut eingestellter Stoffwechsellage gelten und für den Fall einer Entgleisung die Veränderungen im Acylcarnitin- und Acylglycinprofil noch signifikanter sind.

4.3.10 Unterscheidung der Krankheiten untereinander

Die meisten Metaboliten waren nicht ausschließlich für eine angeborene Stoffwechselerkrankung charakterisierend, sondern waren vielmehr bei mehreren Erkrankungen auffällig. Daher war es bei Betrachtung lediglich einzelner Metaboliten oft unmöglich, auf die zugrunde liegende Stoffwechselerkrankung zurückzuschließen. Beschrieben wurde dies bereits an anderer Stelle für die Erkrankungen MMA und PA. Anhand der präsentierten unterschiedlichen Parameterkombinationen war es jedoch möglich, zwischen allen hier untersuchten Stoffwechseldefekten zu unterscheiden. Es sei an dieser Stelle auch auf Tabelle 14 verwiesen, die dies deutlich veranschaulicht. So konnte anhand der vorliegenden Untersuchungen ein sicheres Profil für die Erkrankungen MCADD, MMA, PA, IVA, GA I und 3-MCG definiert werden.

4.4 Weitere Anmerkungen

Alter der Substanzproben

Die Konzentrationen an Acylcarnitinen und Aminosäuren im Trockenblut nehmen mit zunehmendem Alter der Probe ab.¹⁰⁵ Im Laufe dieser Versuchsreihe wurden detektierte Konzentrationen von mehreren Wochen alten Kalibrationsproben mit ermittelten Konzentrationen frisch angesetzter Kalibrationsproben verglichen. Es zeigten sich keine Konzentrationsunterschiede der untersuchten Acylcarnitine im Urin. Daher ist davon auszugehen, dass die Konzentration der Acylcarnitine bei -20°C stabil bleibt. Für die Acylglycine wurde dieser Aspekt in dieser Arbeit nicht separat untersucht, jedoch konnten Fong et al. in ihrer Studie darlegen, dass die Konzentration der Acylglycine im Urin für mindestens 3

Monate stabil blieb, wenn die Probe bei -20°C konserviert wurde.¹⁰³ Zusammenfassend kann damit hervorgehoben werden, dass es möglich ist, Urinproben für spätere Untersuchungen über einen längeren Zeitraum zu konservieren.

Mögliche Verunreinigungen

Zum Untersuchungszeitpunkt wurden am gleichen Tandem-MS parallel ebenfalls andere Experimente durchgeführt, sodass eine Verunreinigung durch fremde Substanzen trotz gründlicher Spülung des Gerätes und ausreichender Kalibrierung nicht sicher auszuschließen war. So stellte sich bei einer gründlichen Reinigung des Tandem-MS kurz nach der Messreihe zur Bestimmung der Nachweisgrenzen heraus, dass das Gerät durch eines dieser Experimente stark verunreinigt war. Daher wären unter anderen Umständen die Nachweisgrenzen eventuell noch empfindlicher zu bestimmen gewesen. Ebenso konnte eine Verschleppung von Probe zu Probe nicht sicher ausgeschlossen werden. Bei gelegentlich zur Kontrolle mitgelaufenen Leerproben war jedoch keine Beeinträchtigung zu eruieren.

Bezug auf Kreatinin

Die Zuverlässigkeit der Messung hängt von der Zuverlässigkeit der Messung des Kreatininwertes ab. Der Kreatininwert hängt wiederum von Faktoren wie der Muskelmasse oder der Nierenfunktion ab. Daher wären ein Sammelurin über 24 Stunden und ein Bezug des Kreatinins auf das Körpergewicht oder die Körperoberfläche unter analytischen Gesichtspunkten wahrscheinlich besser, allerdings wenig praktikabel.⁷⁶

4.5 Fazit und Perspektiven

Die hier evaluierte Methode ist geeignet, um zuverlässig und äußerst sensitiv Acylcarnitine und Acylglycine im Urin zu detektieren. Es ist möglich, bestimmte FAO und OA innerhalb kurzer Zeit und mit einem hohen Probendurchsatz sicher zu erkennen und valide zu diagnostizieren.

Es besteht zweifelsfrei ein Gewinn darin, diese Methode in Zukunft weiter zu evaluieren und auszubauen. Es könnte getestet werden, ob ein zusätzlicher Präzisionsgewinn durch Butylierung oder vorherige chromatografische Trennung zu erzielen ist und welchen Nutzen ein möglicher Präzisionsgewinn im Vergleich zum zeitlichen Mehraufwand hat. Zudem sollte für jeden der untersuchten Parameter ein eigener stabilisotopenmarkierter Stan-

dard zur Verfügung stehen und eine Kalibration in einer künstlichen Urinmatrix erfolgen. Auch mögliche altersspezifische Unterschiede sollten weiter eruiert werden.

Um diese Methode als Testverfahren standardmäßig etablieren zu können, ist zunächst noch zu erörtern, inwiefern eine sichere Diagnosefindung für Urine von Probanden unbekannter Diagnose mit den hier gewonnenen Kenntnissen möglich ist und inwieweit die mit dieser Methode erhobenen Diagnosen dann mit denen, die mit den Methoden der Routinediagnostik gestellt wurden, übereinstimmen. Zudem sollte eine Kontrolle an einem breiteren Patientenkollektiv und gegebenenfalls eine laborübergreifende Inspektion erfolgen.

Diese Methode wird sicherlich ihren Platz in der Routine-Stoffwechselanalytik finden. Insbesondere scheint sie geeignet zu sein als eine Art Voranalyse von im Labor eingehenden unbekanntem Urinproben, die eine schnelle orientierende Zuordnung in die Kategorien krank und gesund ermöglicht. Auch ein Einsatz als Diagnostikum zur Überprüfung von Verlaufskontrollen ist denkbar, hierfür sollte eine weitere Evaluation in Bezug auf mögliche Unterschiede im Ausscheidungsprofil während unterschiedlicher Stoffwechsellagen erfolgen.

5 Literaturverzeichnis

1. Guthrie R, Susi A. a simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963;32:338–43.
2. Guthrie R. The introduction of newborn screening for phenylketonuria. A personal history. *Eur. J. Pediatr* 1996;155:4-5.
3. Mathias D, Bickel H. Follow-up study of 16 years neonatal screening for inborn errors of metabolism in West Germany. *Eur. J. Pediatr* 1986;145:310–2.
4. Machill G, Grimm U, Ahlbehrendt I, et al. Results of selective screening for inborn errors of metabolism in the former East Germany. *Eur. J. Pediatr* 1994;153:14-6.
5. Interdisziplinäre Screeningkommission der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin. Neue Screening-Richtlinien. *Monatsschr Kinderheilkd* 2002;150:1424–40.
6. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N. Engl. J. Med* 2003;348:2304–12.
7. Dionisi-Vici C, Deodato F, Röschinger W, Rhead W, Wilcken B. ‘Classical’ organic acidurias, propionic aciduria, methylmalonic aciduria and isovaleric aciduria: Long-term outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis* 2006;29:383–9.
8. Sander J, Janzen N, Sander S, Melchior U, Steuerwald U. Tandemmassenspektrometrie, Beitrag zum Neugeborenen-Screening auf angeborene Störungen des Stoffwechsels. *Monatsschr Kinderheilkd* 2000;148:771–7.
9. Roscher AA, Fingerhut R, Liebl B, Olgemöller B. Erweiterung des Neugeborenen-Screenings durch Tandemmassenspektrometrie. *Monatsschr Kinderheilkd* 2001;149:1297–303.
10. Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications. *Pediatrics* 2003;111:1399–406.
11. Bundesausschuss der Ärzte und Krankenkassen. Richtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen über die Früherkennung von Krankheiten bei Kindern bis zur Vollendung des 6. Lebensjahres ("Kinder-Richtlinien"), 2011. (Accessed October 9, 2013, at http://www.screening-dgns.de/PDF/Screeningrichtlinie_NGS_2011_BAnz.pdf).
12. Deutsche Gesellschaft für Neugeborenen-Screening e.V. Nationaler Screeningreport 2011, 2013. (Accessed October 9, 2013, at http://www.screening-dgns.de/PDF/Screeningreport_2011.pdf).
13. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease, Volume I. 7th ed. New York: McGraw-Hill, Inc., Health Professions Division, 1995.

14. Fernandes J, Saudubray J, van den Berghe G, Walter JH. *Inborn Metabolic Diseases, Diagnosis and Treatment*. 4th ed. Heidelberg, Germany: Springer Medizin Verlag, 2006. 52-306.
15. Smith EH, Matern D. Acylcarnitine Analysis by Tandem Mass Spectrometry. *Curr Protoc Hum Genet* 2010;64:1-20.
16. Lehotay DC, Hall P, Lepage J, Eichhorst JC, Etter ML, Greenberg CR. LC-MS/MS progress in newborn screening. *Clin Biochem* 2011;44:21-31.
17. McHugh D, Cameron C, Abdenur J, et al. Clinical validation of cutoff target ranges in newborn screening of metabolic disorders by tandem mass spectrometry: a world-wide collaborative project. *Genet Med* 2011;13:230-54.
18. Vianey-Liaud C, Divry P, Gregersen N, Mathieu M. The inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *J. Inherit. Metab. Dis* 1987;10 Suppl 1:159-98.
19. Zschocke J, Hoffmann GF. *Vademecum Metabolicum, Diagnose und Therapie erblicher Stoffwechselkrankheiten*. 3rd ed. Stuttgart, Deutschland: Schattauer, 2004:93.
20. Ding JH, Roe CR, Iafolla AK, Chen YT. Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency and sudden infant death. *N. Engl. J. Med* 1991;325:61-2.
21. Iafolla AK, Thompson R, Roe CR. Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical course in 120 affected children. *J Pediatr* 1994;124:409-15.
22. Bougnères PF, Rocchiccioli F, Kølvråa S, et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in two siblings with a Reye-like syndrome. *J. Pediatr* 1985;106:918-21.
23. Duran M, De K, Wadman SK, Bruinvis L, Ketting D. The differential diagnosis of dicarboxylic aciduria. *J Inherit Metab Dis* 1984;7 Suppl 1:48-51.
24. Yamaguchi S, Indo Y, Coates PM, Hashimoto T, Tanaka K. Identification of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in three patients previously diagnosed with long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 1993;34:111-3.
25. Andresen BS, Olpin S, Poorthuis BJ, et al. Clear correlation of genotype with disease phenotype in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Am J Hum Genet* 1999;64:479-94.
26. Vianey-Saban C, Divry P, Brivet M, et al. Mitochondrial very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical characteristics and diagnostic considerations in 30 patients. *Clin Chim Acta* 1998;269:43-62.
27. El-Fakhri M, Middleton B. The existence of an inner-membrane-bound, long acyl-chain-specific 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in mammalian mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1982;713:270-9.
28. Jackson S, Bartlett K, Land J, et al. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 1991;29:406-11.
29. van Hove JL, Kahler SG, Feezor MD, et al. Acylcarnitines in plasma and blood spots of patients with long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis* 2000;23:571-82.

30. Lehnert W, Wendel U, Lindenmaier S, Böhm N. Multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency (glutaric aciduria type II), congenital polycystic kidneys, and symmetric warty dysplasia of the cerebral cortex in two brothers. I. Clinical, metabolic, and biochemical findings. *Eur. J. Pediatr* 1982;139:56–9.
31. Sweetman L, Nyhan WL, Tauner DA, Merritt TA, Singh M. Glutaric aciduria Type II. *J Pediatr* 1980;96:1020–6.
32. Goodman SI, Stene DO, McCabe ER, et al. Glutaric acidemia type II: clinical, biochemical, and morphologic considerations. *J Pediatr* 1982;100:946–50.
33. Visser M de, Scholte HR, Schutgens RB, et al. Riboflavin-responsive lipid-storage myopathy and glutaric aciduria type II of early adult onset. *Neurology* 1986;36:367–72.
34. Spiekerkötter U. Störungen der Fettsäureoxidation. *Monatsschr Kinderheilkd* 2006;154:1231–44.
35. Bhala A, Willi SM, Rinaldo P, Bennett MJ, Schmidt-Sommerfeld E, Hale DE. Clinical and biochemical characterization of short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Pediatr* 1995;126:910–5.
36. Shirao K, Okada S, Tajima G, et al. Molecular pathogenesis of a novel mutation, G108D, in short-chain acyl-CoA dehydrogenase identified in subjects with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Hum Genet* 2010;127:619–28.
37. Demaugre F, Bonnefont JP, Mitchell G, et al. Hepatic and muscular presentations of carnitine palmitoyl transferase deficiency: two distinct entities. *Pediatr Res* 1988;24:308–11.
38. Stanley CA, Sunaryo F, Hale DE, Bonnefont JP, Demaugre F, Saudubray JM. Elevated plasma carnitine in the hepatic form of carnitine palmitoyltransferase-1 deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1992;15:785–9.
39. Blau N, Duran M, Gibson KM. *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics, With 176 Figures and 113 Tables*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 2008:53-805.
40. Goodman SI. An introduction to gas chromatography-mass spectrometry and the inherited organic acidemias. *Am J Hum Genet* 1980;32:781–92.
41. Stadler S, Polanetz R, Maier E, et al. Newborn screening for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: population heterogeneity of MCCA and MCCB mutations and impact on risk assessment. *Hum Mutat* 2006;27:748–59.
42. Mönch E, Link R. *Diagnostik und Therapie bei angeborenen Stoffwechselstörungen*. 2nd ed. Heilbronn, Deutschland: SPS Verlagsgesellschaft, 2006:27-683.
43. Baumgartner ER, Viardot C. Long-term follow-up of 77 patients with isolated methylmalonic acidemia. *J Inherit Metab Dis* 1995;18:138–42.
44. Hörster F, Hoffmann G. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of methylmalonic aciduria-recent advances and new challenges. *Pediatr Nephrol* 2004;19:1071-4.
45. Chace DH, DiPerna JC, Kalas TA, Johnson RW, Naylor EW. Rapid diagnosis of methylmalonic and propionic acidemias: quantitative tandem mass spectrometric analysis of propionylcarnitine in filter-paper blood specimens obtained from newborns. *Clin Chem* 2001;47:2040–4.

46. Leonard J, Vijayaraghavan S, Walter J. The impact of screening for propionic and methylmalonic acidemia. *Eur J Pediatr* 2003;162 Suppl 1:21-4.
47. Lehnert W, Sperl W, Suormala T, Baumgartner ER. Propionic acidemia: clinical, biochemical and therapeutic aspects. Experience in 30 patients. *Eur J Pediatr* 1994;153:68-80.
48. Ianchulev T, Kolin T, Moseley K, Sadun A. Optic nerve atrophy in propionic acidemia. *Ophthalmology* 2003;110:1850-4.
49. Surtees RA, Matthews EE, Leonard JV. Neurologic outcome of propionic acidemia. *Pediatr. Neurol* 1992;8:333-7.
50. Bodemer C, De P, Bachollet B, et al. Cutaneous manifestations of methylmalonic and propionic acidemia: a description based on 38 cases. *Br J Dermatol* 1994;131:93-8.
51. Goodman SI, Markey SP, Moe PG, Miles BS, Teng CC. Glutaric aciduria; a "new" disorder of amino acid metabolism. *Biochem Med* 1975;12:12-21.
52. Bjugstad KB, Goodman SI, Freed CR. Age at symptom onset predicts severity of motor impairment and clinical outcome of glutaric acidemia type 1. *J. Pediatr* 2000;137:681-6.
53. Kyllerman M, Skjeldal OH, Lundberg M, et al. Dystonia and dyskinesia in glutaric aciduria type I: clinical heterogeneity and therapeutic considerations. *Mov Disord* 1994;9:22-30.
54. Strauss K, Puffenberger E, Robinson D, Morton D. Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2003;121C:38-52.
55. Bahr O, Mader I, Zschocke J, Dichgans J, Schulz JB. Adult onset glutaric aciduria type I presenting with a leukoencephalopathy. *Neurology* 2002;59:1802-4.
56. Baric I, Zschocke J, Christensen E, et al. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I. *J Inherit Metab Dis* 1998;21:326-40.
57. Scott C. The genetic tyrosinemias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006;142C:121-6.
58. Weinberg AG, Mize CE, Worthen HG. The occurrence of hepatoma in the chronic form of hereditary tyrosinemia. *J Pediatr* 1976;88:434-8.
59. Forget S, Patriquin HB, Dubois J, et al. The kidney in children with tyrosinemia: sonographic, CT and biochemical findings. *Pediatr Radiol* 1999;29:104-8.
60. Mitchell G, Larochelle J, Lambert M, et al. Neurologic crises in hereditary tyrosinemia. *N Engl J Med* 1990;322:432-7.
61. Schönberger S, Schweiger B, Schwahn B, Schwarz M, Wendel U. Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol. Genet. Metab* 2004;82:69-75.
62. Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, Puffenberger EG, Kelley RI. Diagnosis and Treatment of Maple Syrup Disease: A Study of 36 Patients. *Pediatrics* 2002;109:999-1008.
63. Wilson JMG, Jungner G. Principles and practice of screening for disease, World health organization Geneva 1968. *Public health papers* 1968;(34):7-150.

64. Lehnert W. Long-term results of selective screening for inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr* 1994;153:9-13.
65. Chace DH, Hillman SL, van Hove JL, Naylor EW. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin. Chem* 1997;43:2106-13.
66. van Hove JL, Zhang W, Kahler SG, et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: diagnosis by acylcarnitine analysis in blood. *Am. J. Hum. Genet* 1993;52:958-66.
67. Vianey-Saban C, Guffon N, Delolne F, Guibaud P, Mathieu M, Divry P. Diagnosis of inborn errors of metabolism by acylcarnitine profiling in blood using tandem mass spectrometry. *J. Inherit. Metab. Dis* 1997;20:411-4.
68. Gallagher RC, Cowan TM, Goodman SI, Enns GM. Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency and newborn screening: Retrospective analysis of a low excretor provides further evidence that some cases may be missed. *Mol Genet Metab* 2005;86:417-20.
69. Yoshino M, Tokunaga Y, Watanabe Y, et al. Effect of supplementation with -carnitine at a small dose on acylcarnitine profiles in serum and urine and the renal handling of acylcarnitines in a patient with multiple acyl-coenzyme A dehydrogenation defect. *J Chromatogr B* 2003;792:73-82.
70. Zamora S, Benador N, Lacourt G, Girardin E. Renal handling of carnitine in ill pre-term and term neonates. *J. Pediatr* 1995;127:975-8.
71. Chalmers RA, Roe CR, Stacey TE, Hoppel CL. Urinary excretion of l-carnitine and acylcarnitines by patients with disorders of organic acid metabolism: evidence for secondary insufficiency of l-carnitine. *Pediatr Res* 1984;18:1325-8.
72. Ribes A, Riudor E, Briones P, Christensen E, Campistol J, Millington DS. Significance of bound glutarate in the diagnosis of glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis* 1992;15:367-70.
73. Montgomery JA, Mamer OA. Measurement of urinary free and acylcarnitines: quantitative acylcarnitine profiling in normal humans and in several patients with metabolic errors. *Anal. Biochem* 1989;176:85-95.
74. Bartlett K, Gompertz D. The specificity of glycine-N-acylase and acylglycine excretion in the organicacidaemias. *Biochem Med* 1974;10:15-23.
75. Carter SM, Midgley JM, Watson DG, Logan RW. Measurement of urinary medium chain acyl glycines by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 1991;9:969-75.
76. Mueller P, Schulze A, Schindler I, Ethofer T, Buehrdel P, Ceglarek U. Validation of an ESI-MS/MS screening method for acylcarnitine profiling in urine specimens of neonates, children, adolescents and adults. *Clin. Chim. Acta* 2003;327:47-57.
77. Bonafé L, Troxler H, Kuster T, et al. Evaluation of Urinary Acylglycines by Electrospray Tandem Mass Spectrometry in Mitochondrial Energy Metabolism Defects and Organic Acidurias. *Mol Genet Metab* 2000;69:302-11.
78. Vreken P, van Lint AE, Bootsma AH, Overmars H, Wanders RJ, van Gennip AH. Quantitative plasma acylcarnitine analysis using electrospray tandem mass spectrometry for the diagnosis of organic acidaemias and fatty acid oxidation defects. *J. Inherit. Metab. Dis* 1999;22:302-6.

79. Rizzo C, Boenzi S, Wanders RJ, Duran M, Caruso A, Dionisi-Vici C. Characteristic Acylcarnitine Profiles in Inherited Defects of Peroxisome Biogenesis: A Novel Tool for Screening Diagnosis Using Tandem Mass Spectrometry. *Pediatr Res* 2003;53:1013–8.
80. Kobayashi H, Hasegawa Y, Endo M, Purevsuren J, Yamaguchi S. ESI–MS/MS study of acylcarnitine profiles in urine from patients with organic acidemias and fatty acid oxidation disorders. *J Chromatogr B* 2007;855:80–7.
81. Duranti G, Boenzi S, Rizzo C, et al. Urine acylcarnitine analysis by ESI–MS/MS: A new tool for the diagnosis of peroxisomal biogenesis disorders. *Clin Chim Acta* 2008;398:86–9.
82. Pitt JJ, Eggington M, Kahler SG. Comprehensive screening of urine samples for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry. *Clin. Chem* 2002;48:1970–80.
83. Rebollido-Fernandez MM, Castiñeiras DE, Bóveda MD, Couce ML, Cocho JA, Fraga JM. Development of electrospray ionization tandem mass spectrometry methods for the study of a high number of urine markers of inborn errors of metabolism. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 2012;26:2131–44.
84. Ombrone D, Salvatore F, Ruoppolo M. Quantitative liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry analysis of urinary acylglycines: application to the diagnosis of inborn errors of metabolism. *Anal Biochem* 2011;417:122–8.
85. Weiß C, Rzany B. *Basiswissen Medizinische Statistik*. Heidelberg, Deutschland: Springer, 2008.
86. Campins F, Tortajada G, Meseger L, Blasco G, Sevillano C, Molins L. Creatinine determination in urine samples by batchwise kinetic procedure and flow injection analysis using the Jaffe reaction: chemometric study. *Talanta* 2001;55:1079–89.
87. Budzikiewicz H, Schäfer M. *Massenspektrometrie, Eine Einführung*. Fünfte, vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage. Weinheim, Deutschland: John Wiley & Son Ltd, 2005.
88. Hesse M, Meier H, Zeeh B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 6th ed. Stuttgart, Deutschland: Thieme, 2002.
89. Vogeser M. Anwendung der HPLC-Tandem-Massenspektrometrie in der klinischen Chemie. *J Lab Med* 2004;28:195–204.
90. Arnecke R, Olgemöller B. LC-MS und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS), Technische Grundlagen und Einsatz im klinischen Labor. *MTA Dialog* 2003;4:934–7.
91. Mallet A. *Dictionary of mass spectrometry*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 2009.
92. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, 2001. (Accessed October 9, 2013, at <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceCompilanceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>).

93. Hilgers R, Bauer P, Scheiber V. Statistik und ihre Anwendungen, Einführung in die medizinische Statistik. Heidelberg, Deutschland: Springer Berlin Heidelberg, 2007.
94. Hsieh F, Turnbull BW. Nonparametric and semiparametric estimation of the receiver operating characteristic curve. *The Annals of Statistics* 1996;24:25–40.
95. Janssen J, Laatz W. Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows, Eine anwendungsorientierte Einführung in das Basissystem und das Modul Exakte Tests. 6th ed. Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
96. Metz CE, Herman BA, Shen JH. Maximum likelihood estimation of receiver operating characteristic (ROC) curves from continuously-distributed data. *Stat Med* 1998;17:1033–53.
97. Brosius F. SPSS 12, [das mitp-Standardwerk ; fundierte Einführung in SPSS, alle statistischen Verfahren mit praxisnahen Beispielen, auf der CD: alle Daten aus dem Buch]. 1st ed. Bonn, Deutschland: Mitp, 2004.
98. Harris EK. Statistical aspects of reference values in clinical pathology. *Prog Clin Pathol* 1981;8:45–66.
99. Dolan John. HPLC Solutions, 2012. (Accessed October 9, 2013, at <http://www.sepscience.com/Techniques/LC/Articles/217-/HPLC-Solutions-88-Matrix-Effects>).
100. Shigematsu Y, Hata I, Tanaka Y. Stable-isotope dilution measurement of isovaleryl-glycine by tandem mass spectrometry in newborn screening for isovaleric acidemia. *Clin Chim Acta* 2007;386:82–6.
101. Maeda Y, Ito T, Suzuki A, et al. Simultaneous quantification of acylcarnitine isomers containing dicarboxylic acylcarnitines in human serum and urine by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 2007;21:799–806.
102. De J, Chace D, Lim T, Mei J, Hannon W. Comparison of amino acids and acylcarnitines assay methods used in newborn screening assays by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2010;411:684–9.
103. Fong BM, Tam S, Leung KS. Quantification of acylglycines in human urine by HPLC electrospray ionization-tandem mass spectrometry and the establishment of pediatric reference interval in local Chinese. *Talanta* 2012;88:193–200.
104. Cavedon CT, Bourdoux P, Mertens K, et al. Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. *Clin. Chem* 2005;51:745–52.
105. Strnadova K, Holub M, Muhl A, et al. Long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dried blood spots. *Clin Chem* 2007;53:717–22.

6 Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminoazidopathien
AUC	Fläche unter der Kurve
CH ₄ O	Methanol
C ₂ H ₆ O	Ethanol
CoA	Coenzym A
CPT I	Carnitinpalmitoyltransferase-I-Mangel
CV	Variationskoeffizienten
C0	Carnitin
C2	Acetylcarnitin
C2G	Acetylglycin
C3	Propionylcarnitin
C3DC	Malonylcarnitin
C3G	Propionylglycin
C4	Butyrylcarnitin
C4DC	Methylmalonylcarnitin
C4G	Isobutyrylglycin
C4OH	Hydroxybutyrylcarnitin
C4OHG	Hydroxybutyrylglycin
C5	Isovalerylcarnitin
C5:1	Tiglylcarnitin
C5DC	Glutarylcarnitin
C5DCG	Glutarylglycin
C5G	Isovalerylglycin
C5:1G	Tiglylglycin
C5OH	3-Hydroxyisovalerylcarnitin
C5OHG	Hydroxyvalerylglycin
C6	Hexanoylcarnitin
C6DC	Adipylcarnitin
C6G	Hexanoylglycin
C6OH	Hydroxyhexanoylcarnitin
C7G	Heptanoylglycin
C7:1G	Heptenoylglycin

C8	Octanoylcarnitin
C8:1	Octenoylcarnitin
C8DCG	Suberylglycin
C8OHG	7-Hydroxyoctanoylglycin
C10	Decanoylcarnitin
C10:1	Decenoylcarnitin
C10:1OH	Hydroxydecenoylcarnitin
C10:2	Decadienoylcarnitin
C12	Dodecanoylcarnitin
C12:1	Dodecenoylcarnitin
C12OH	Hydroxydodecanoylcarnitin
C12:1OH	Hydroxydodecenoylcarnitin
C14	Myristoylcarnitin
C14:1	Tetradecenoylcarnitin
C14:2	Tetradecadienoylcarnitin
C14G	Myristoylglycin
C14OH	Hydroxytetradecanoylcarnitin
C14:1OH	Hydroxytetradecenoylcarnitin
C16	Palmitoylcarnitin
C16:1	Hexadecenoylcarnitin
C16OH	Hydroxyhexadecanoylcarnitin
C16:1OH	Hydroxyhexadecenoylcarnitin
C18	Stearoylcarnitin
C18:1	Octadecenoylcarnitin
C18:2	Octadecadienoylcarnitin
C18:1G	Oleoylglycin
C18OH	Hydroxyoctadecanoylcarnitin
C18:1OH	Hydroxyoctadecenoylcarnitin
C18:2OH	Hydroxyoctadecadienoylcarnitin
ESI-MS/MS	Elektrosprayionisation Tandem-Massenspektrometrie
FAO	Fettsäureoxidationsdefekte
FIA	Fließinjektionsanalyse
FIA-MS/MS	Methode mit Fließinjektion und tandem-massenspektrometrischer Detektion
GA I	Glutarazidurie Typ I

GA II	Glutarazidurie Typ II
GC-MS	Gaschromatografie-Massenspektrometrie
HMG	Hydroxymethylglutarylarnitin
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatografie
IVA	Isovalerianazidämie
LCHADD	Defekt der 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase langkettiger Fettsäuren
LOD	Limit of Detection
MCADD	Defekt der Acyl-CoA-Dehydrogenase mittelkettiger Fettsäuren
3-MCG	3-Methylcrotonylglycinurie
MMA	Methylmalonazidurie
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSUD	Ahornsirupkrankheit
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
N ₂	Stickstoff
NGS	Neugeborenenenscreening
OA	Organoazidopathien
PA	Propionazidämie
P-C2G	Phenylacetylglycin
P-C3G	Phenylpropionylglycin
ROC	Receiver Operating Characteristic
SCADD	Defekt der Acyl-CoA-Dehydrogenase kurzkettiger Fettsäuren
Tandem-MS	Tandem-Massenspektrometer
Tyr I	Tyrosinämie Typ I
VLCADD	Defekt der Acyl-CoA-Dehydrogenase langkettiger Fettsäuren

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Trockenblutkarte für das NGS.....	7
Abbildung 2: Ablauf der Fettsäureoxidation	9
Abbildung 3: Tandem-MS	24
Abbildung 4: Prinzip der Elektrosprayionisation zur Erzeugung freier Ionen	25
Abbildung 5: Prinzip der MS/MS	26
Abbildung 6: MRM Verfahren	27
Abbildung 7: Precursor Ion Scan Verfahren.....	28
Abbildung 8: Prinzipdarstellung zur Auswertung von ROC-Kurven.....	36

8 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Einteilung der Altersgruppen.....	21
Diagramm 2: Beispiel für ein Massenspektrum einer Kalibrationsprobe.....	27
Diagramm 3: Kalibrationsfunktionen	31
Diagramm 4: Altersunterschiede im Ausscheidungsprofil der Acylcarnitine	41
Diagramm 5: Altersunterschiede im Ausscheidungsprofil der Acylglycine	41
Diagramm 6: Acylcarnitinprofil eines gesunden Probanden	43
Diagramm 7: Acylglycinprofil eines gesunden Probanden	43
Diagramm 8: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit MCADD	44
Diagramm 9: Acylglycinprofil eines Patienten mit MCADD.	45
Diagramm 10: ROC-Kurven zur Unterscheidung Gesunder von an MCADD Erkrankten	46
Diagramm 11: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit MCADD	47
Diagramm 12: Optimierung der Diagnostik des MCADD	48
Diagramm 13: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit MMA.....	49
Diagramm 14: Acylglycinprofil eines Patienten mit MMA	49
Diagramm 15: ROC-Kurven zur Unterscheidung Gesunder von an MMA Erkrankten	50
Diagramm 16: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit MMA	51
Diagramm 17: Optimierung der Diagnostik der MMA	51
Diagramm 18: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit PA.....	52
Diagramm 19: Acylglycinprofil eines Patienten mit PA	52
Diagramm 20: ROC-Kurven zur Unterscheidung Gesunder von an PA Erkrankten	53
Diagramm 21: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit PA	54
Diagramm 22: Optimierung der Diagnostik der PA	55
Diagramm 23: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit IVA	56
Diagramm 24: Acylglycinprofil eines Patienten mit IVA	56
Diagramm 25: ROC-Kurven zur Unterscheidung Gesunder von an IVA Erkrankten	57
Diagramm 26: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit IVA	58
Diagramm 27: Optimierung der Diagnostik der IVA.....	58
Diagramm 28: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit GA II	59
Diagramm 29: Acylglycinprofil eines Patienten mit GA II.....	59
Diagramm 30: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit GA I.....	60
Diagramm 31: Acylglycinprofil eines Patienten mit GA I.....	61
Diagramm 32: ROC-Kurve zur Unterscheidung Gesunder von an GA I Erkrankten	61
Diagramm 33: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit GA I.....	62
Diagramm 34: Acylcarnitinprofil eines Patienten mit 3-MCG	63
Diagramm 35: Acylglycinprofil eines Patienten mit 3-MCG.....	63
Diagramm 36: ROC-Kurven zur Unterscheidung Gesunder von an 3-MCG Erkrankten ...	64
Diagramm 37: Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit 3-MCG.....	65
Diagramm 38: Optimierung der Diagnostik der 3-MCG.....	66

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auswahl an mit dem Tandem-MS erfassbarer Stoffwechselerkrankungen.....	7
Tabelle 2:	Mit konventionellen Methoden erfasste Zielkrankheiten des NGS	8
Tabelle 3:	Untersuchte Urinproben.....	21
Tabelle 4:	Einstellungen am Tandem-MS	29
Tabelle 5:	Lösungsmittel und Reinsubstanzen der Kalibrierung	30
Tabelle 6:	Programmierung ChemoView™®	32
Tabelle 7:	LOD der untersuchten Reinsubstanzen.....	38
Tabelle 8:	CV in Prozent der Testungen an zehn unterschiedlichen Tagen	39
Tabelle 9:	Referenzwerte (oberer Cut off) der untersuchten Metaboliten im Urin	40
Tabelle 10:	97,5. Perzentile der altersabhängigen Ausscheidung.....	42
Tabelle 11:	Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit GA II.....	60
Tabelle 12:	Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit anderen FAO.....	66
Tabelle 13:	Empfindlichkeit der Detektion von Patienten mit Tyr I	67
Tabelle 14:	Überblick über die diagnostisch relevanten Parameter.....	68

10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christina Femppel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Evaluation einer Methode zur Bestimmung der Acylcarnitine und Acylglycine im Urin mittels Fließinjektion und tandem-massenspektrometrischer Detektion selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Christina Femppel hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation: Femppel C, Lange S, Klein J, Hennermann JB. Evaluation einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung der Acylcarnitine und Acylglycine im Urin. In: Abstracts der 26. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS). „Metabolische Enzephalopathien“, 7.-9. März 2012 in Fulda. Monatsschrift Kinderheilkunde 2012;160:299-314.

Beitrag im Einzelnen:

Veröffentlichter Abstrakt im Rahmen einer Poster Präsentation auf der 26. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS) im März 2012 in Fulda.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12 Publikation und wissenschaftlicher Vortrag

Femppel C, Lange S, Klein J, Hennermann JB. Evaluation einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung der Acylcarnitine und Acylglycine im Urin. In: Abstracts der 26. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS). „Metabolische Enzephalopathien“, 7.-9. März 2012 in Fulda. Monatsschrift Kinderheilkunde 2012;160:299-314.

Poster Präsentation auf der 26. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS) im März 2012 in Fulda.

„In preparation“: Femppel Christina, Lange Sabine, Klein Jeannette, Hennermann Julia B. Diagnosis of inborn errors of metabolism by measurement of acylcarnitines and acylglycines in urine using a FIA-MS/MS-method.

Danksagung

Zu großem Dank verpflichtet bin ich meinen beiden Betreuerinnen PD Dr. J. B. Hennermann und Dr. J. Klein. Ich danke Ihnen für die Überlassung des Themas, die freundschaftliche Beratung, konstruktive Diskussionen und eine tolle Zusammenarbeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Lange für das Sammeln und Bereitstellen der Urinproben.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen danken für das große Vertrauen, dass sie mir stets entgegengebracht haben und für die liebevolle Unterstützung und immerwährenden Rückhalt in allen Lebenslagen. Meiner Mutter danke ich zudem für zahlreiche Gespräche über statistische Zusammenhänge.

Ein besonderer Dank gilt meinem wunderbaren Freund Max, der jederzeit für mich da war, mich immer wieder aufgeheitert hat und mir sehr damit half, nicht über Word und Excel zu verzweifeln.

Nicht zuletzt möchte ich allen Verwandten und Freunden fürs Korrekturlesen und die zahlreichen Ratschläge danken.