

**‘n STUDIE VAN GEÏNDUSEERDE METABOLIESE WEË
WEENS ‘n AANGEBORE DEFEEK VAN DIE
VERTAKTEKETTING- α -KETOSUUR
DEHIDROGENASE-KOMPLEKS.**

deur

Jacco Dry
M.Sc.

Proefskrif voorgelê vir die graad Philosophiae Doctor in die Departement Biochemie en Mikrobiologie aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.

Promotor: Prof. L.J. Mienie
Medepromotor: Dr M. Duran

Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys
Potchefstroom

1997

Inhoudsopgawe:

Lys van afkortings	i
Lys van diagramme	iii
Lys van figure.....	vii
Lys van tabelle.....	xii
Abstract.....	xv
Opsomming.....	xvii
1 Hoofstuk 1: Inleiding.....	1
1.1 Inleiding.....	1
2 Hoofstuk 2: Literatuuroorsig en doelstelling	3
2.1 Inleiding.....	3
2.1.1 Benaderingswyse vir die studie van geïnduseerde metaboliese weë	4
2.2 Historiese oorsig van Maple Syrup-uriendefek	9
2.3 Normale vertakteketting-aminosuurkatabolisme	10
2.3.1 Inleiding.....	10
2.3.2 Normale katabolisme van vertakteketting-aminosure.....	11
2.3.3 Die vertakteketting-aminotransferase	16
2.3.4 Die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks	16
2.4 Maple Syrup-uriendefek (MSUD)	19
2.4.1 Inleiding.....	19

2.4.2	Kliniese fenotipes.....	20
2.4.3	Diagnose van MSUD	23
2.4.4	Vorming van <i>allo</i> -isoleusien.....	24
2.4.5	Behandeling van MSUD	25
2.5	Doelstelling.....	26
3	Hoofstuk 3: Materiaal, instrumentasie en metodes	27
3.1	Inleiding	27
3.2	Materiaal	28
3.2.1	Pasiënt MM.....	28
3.2.2	Pasiënte EM en BM	30
3.2.3	Pasiënt OH	31
3.3	Instrumentasie.....	32
3.3.1	Kreatinienbepalings	32
3.3.2	Gas-chromatografie.....	32
3.3.3	Gas-chromatografie-massaspektrometrie.....	32
3.3.4	Kwantifisering van organiese sure.....	33
3.3.5	Vloeistofchromatografie-massaspektrometrie	34
	3.3.5.1 <i>Kwantifisering van aminosure</i>	36
	3.3.5.2 <i>Kwantifisering van asiel-karnitienmetaboliete</i>	37
3.4	Metodes.....	38
3.4.1	Inleiding	38
3.4.2	Organiese suurekstraksie	38
3.4.3	Derivatisering.....	39
3.4.4	Aminosuur voorbereiding vir LC-ES-MS-MS-analise.....	40
3.4.5	Vorbereiding van die asiel-karnitiene vir LC-ES-MS-MS-analise.....	40
3.4.6	Fraksionering van organiese sure.....	41
3.4.7	Vorming van chloorsoute van organiese sure.....	42
3.4.8	Konjuseringsreaksies	42
	3.4.8.1 <i>Sintese van 5-hidroksihidantoïene</i>	43
	3.4.8.2 <i>Sintese van die vertakteketting-2-hidroksisuurkonjugate</i>	43

3.4.8.3 Sintese van die vertakteketting-2-ketosuurkonjugate.....	44
3.4.8.4 Sintese van N-isobutiriel-, N-2-metielbutiriel- en N-isovalerielkonjugate.....	44
3.4.8.5 Sintese van die N-laktiel- en N-Asetiel-konjugate	44
3.4.8.6 Sintese van 3-hidroksi-butiriel-alanien en 3-hidroksi-butirielglisien..	45
3.4.9 Hidrolisering van asiel-karnitiene.....	45
3.4.10 Sintese van 2-isopropielappelsuur	46
3.4.11 Sintese van 2-isopropielfumaarsuur.....	47

4 Hoofstuk 4. Resultate: Geïnduseerde metaboliete uit die vertakteketting-aminosure48

4.1 Inleiding.....	48
4.2 Metaboliete gevorm uit leusien, isoleusien en valien	49
4.2.1 Asetillering.....	49
4.2.2 N-Laktielkonjugate	55
4.2.3 Konjugate van die vertakteketting-aminosure met 2-hidroksi-isovaleriaansuur	58
4.2.4 Konjugate van die vertakteketting-aminosure met 2-hidroksi-isokaproësuur	62
4.2.5 Konjugate van die vertakteketting-aminosure en 2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur	64
4.2.6 Opsomming en bespreking van konjureringsreaksies.....	65
4.2.7 Anaboliese weë wat geïnduseerde metaboliete vanaf vertakteketting-aminosure kan vorm.....	73
4.2.7.1 Kreatiensinteseweg.....	73
4.2.7.2 Heemsinteseweg.....	80
4.2.8 Dekarboksilering van valien, leusien en isoleusien	81
4.2.9 Opsomming en bespreking van geïnduseerde anaboliese weë met leusien, isoleusien en valien as uitgangstowwe	83

5	Hoofstuk 5. Resultate: Primêre geïnduseerde metaboliete uit die vertakteketting-2-ketosure.....	86
5.1	Inleiding.....	86
5.2	Primêre geïnduseerde metaboliete gevorm uit die vertakte-ketting-2-ketosure .	87
5.2.1	Konjugering van die 2-ketosure met die vertakteketting-aminosure	87
5.2.2	Vertakteketting-2-ketosure en asetiel-KoA	109
5.2.3	2-Ketosure en ureum.....	114
5.3	Opsomming van metaboliete gevorm uit die vertakteketting-2-ketosure.....	116
6	Hoofstuk 6. Resultate: Geïnduseerde metaboliete uit die vertakteketting-2-hidroksisure.....	121
6.1	Inleiding.....	121
6.2	Geïnduseerde metaboliete.....	122
6.2.1	Dikarboksielsuur- en laktoonvorming	122
6.2.2	Vertakteketting-2-hidroksisuurdimere.....	125
6.3	Metaboliete met nie-direkte MSUD-oorsprong.....	132
6.3.1	Mediumketting-vertakteketting-2-hidroksisure	132
7	Hoofstuk 7: Gevolgtrekking en bespreking.....	135
7.1	Inleiding.....	135
7.2	Geïnduseerde metaboliete uit die vertakteketting-aminosure.....	135
7.3	Hidantoïenanaloë in die urine van MSUD-pasiënte	136
7.4	Vorming van amiene.....	137
7.5	Konjugering van die 2-ketosure met die vertakteketting-aminosure	138
7.6	Konjugering van asetiel-KoA met 2-keto-isovaleriaansuur.....	141
7.7	Geïnduseerde metaboliete uit 2-hidroksisure.....	142
7.8	Voorgestelde behandeling.....	142
	Bylaag A.....	147

Bylaag B	149
Bibliografie	151
Bedankings	162
Index	163

Lys van afkortings

BSTFA	:	Bis(Trimetielsiliel)-trifluoroasetamied
CID-spektrum	:	Botsinggeïnduseerde fragmentspektrum
<i>E. coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
E₁	:	Vertakteketting-2-ketosuurdekarboksilase
E₂	:	Dihidrolipoïel transasilase
E₃	:	Dihidrolipoïel dehidrogenase
ES-MS-MS	:	Elektrosproei tandemmassaspektrometer
GC	:	Gas-chromatografie
GC-MS	:	Gas-chromatografie-massaspektrometrie
2-HIC	:	2-Hidroksi-isokaproësuur
2-HIV	:	2-Hidroksi-isovaleriaansuur
2-HMV	:	2-Hidroksi-3-metielvaleriaansuur
N-2-HIVISOLEU	:	N-2-Hidroksi-isovalerielisoleusien
N-2-HIVLEU	:	N-2-Hidroksi-isovaleriellesien
N-2-HIVVAL	:	N-2-Hidroksi-isovalerielvalien
HMG-KoA	:	β-Hidroksie-β-metielglutariel-KoA
HPLC	:	Hoëdruk-vloeistofchromatografie
2-KIC	:	2-Keto-isokaproësuur
2-KIV	:	2-Keto-isovaleriaansuur
2-KMV	:	2-Keto-3-metielvaleriaansuur
KoA	:	Ko-ensiem A

LC-ES-MS-MS	:	Vloeistofchromatografie-elektrosproei- tandemmassaspektrometer
LC-MS-MS	:	Vloeistofchromatografie-massaspektrometrie- massaspektrometrie
M.W.	:	Molekulêre massa
MSUD	:	Maple Syrup-uriendefek
PKU	:	Fenielketonurie
TMCS	:	Trichlorometielsilaan
TMS	:	Trimetielsilaan
TPP	:	Tiamienpirofosfaat

Lys van diagramme:

Hoofstuk 2: Literatuur oorsig en doelstelling

Diagram 2-1 Skematiese voorstelling van die kataboliese weg vir valien 13

Diagram 2-2 Skematiese voorstelling van die leusien kataboliese weg14

Diagram 2-3 Skematiese voorstelling van die isoleusien kataboliese weg 15

Diagram 2-4 Skematiese voorstelling van die werking van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks 17

Diagram 2-5 Skematiese voorstelling van die vorming van die gesubstitueerde tiamien pirofosfaatderivaat verbinding tydens die eerste stap in die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks19

Hoofstuk 3: Materiaal, instrumentasie en metodes

Diagram 3-1 Skematiese voorstelling van die oorsprong van die neutrale fragment van 102 ame soos voorgestel deur Chace *et al.*, (1995:65) 36

Hoofstuk 4: Resultate: Geïnduseerde metaboliete uit die vertakteketting-aminosure

Diagram 4-1 Voorstelling van geïnduseerde metaboliete wat potensieel vanaf leusien, isoleusien en valien gevorm kan word 50

Diagram 4-2 Metaboliete wat gevorm word (donker) en moontlik gevorm kan word (kursief) vanuit die konjugering van valien 67

Diagram 4-3 Metaboliete wat gevorm word (donker) en moontlik gevorm kan word (kursief) vanuit die konjugering van leusien 68

Diagram 4-4 Metaboliete wat gevorm word (donker) en moontlik gevorm kan word (kursief) vanuit die konjugering van isoleusien 68

Diagram 4-5 Skematiese voorstelling van die normale kreatiensinteseveg 75

Diagram 4-6 Skematiese voorstelling van die gewysigde kreatiensinteseveg indien glisien met die vertakteketting-aminosure vervang word. Soos aangedui in bogenoemde diagram, kan die syketting (aangedui met *R*) enige van die sykettings van die vertakteketting-aminosure voorstel 76

Diagram 4-7 Skematiese voorstelling van die vorming van die vertakteketting-amiene vanaf die ooreenstemende aminosure 82

Diagram 4-8 Opsomming van metaboliete wat moontlik gevorm kan word uit moontlike geïnduseerde anaboliese weë. Die donker-gedrukte metaboliete is wel opgespoor, terwyl die kursief-gedrukte metaboliete nie opgespoor kon word nie 85

Hoofstuk 5: Resultate: Primêre geïnduseerde metaboliete uit die vertakteketting-2-ketosure

Diagram 5-1 Voorstelling van geïnduseerde metaboliete wat potensieel vanaf 2-keto-isovaleriaansuur, 2-keto-isokaproësuur en 2-keto-3-metielvaleriaansuur gevorm kan word 88

- Diagram 5-2** Skematiese voorstelling van die moontlike meganisme van vorming van die vertakteketting-aldehyd en ander metaboliëte vanaf die ooreenstemende 2-ketosuur. Die moontlike meganisme van vorming van ω -hidroksisuur deur ω -oksidasie word ook aangetoon97
- Diagram 5-3** Skematiese voorstelling van die reaksies van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks 99
- Diagram 5-4** Skematiese voorstelling van die vorming van isobutiriëldihidrolipoamied en lipoamied 100
- Diagram 5-5** Skematiese voorstelling van die normale kataboliese weg van tiamienpirofosfaat 103
- Diagram 5-6** Skematiese voorstelling van die vorming van moontlike gesubstitueerde 11-hidrotiochroom verbindings 104
- Diagram 5-7** Skematiese voorstelling van die konjugasie van asetiël-KoA en die vertakteketting-2-ketosure111
- Diagram 5-8** Skematiese voorstelling van die anaboliese weg van leusien soos gevind in eensellige organismes (Gottschalk, 1986:48)114
- Diagram 5-9** Skematiese voorstelling van die moontlike meganisme van vorming van hidantoïene uit die vertakte-ketting-2-ketosure en ureum 116
- Diagram 5-10**Opsomming van die voorgestelde metaboliëte wat moontlik gevorm kan word uit 2-keto-isovaleriaansuur. Die metaboliëte wat geïdentifiseer kon word, word donker aangedui, terwyl die kursief-gedrukte verbindings nie opgespoor is in die urine van MSUD-pasiënte nie 118

Diagram 5-11 Opsomming van die voorgestelde metaboliete wat moontlik gevorm kan word uit 2-keto-isokaproësuur. Die metaboliete wat geïdentifiseer kon word, word donker aangedui, terwyl die kursief-gedrukte verbindings nie opgespoor is in die urine van MSUD-pasiënte nie .. 119

Diagram 5-12 Opsomming van die voorgestelde metaboliete wat moontlik gevorm kan word uit 2-keto-3-metielvaleriaansuur. Die metaboliete wat geïdentifiseer kon word, word donker aangedui, terwyl die kursief-gedrukte verbindings nie opgespoor is in die urine van MSUD-pasiënte nie 120

Hoofstuk 6: Resultate: Geïnduseerde metaboliete uit die vertakteketting-2-hidroksisure

Diagram 6-1 Voorstelling van geïnduseerde metaboliete wat potensieel vanaf 2-hidroksi-isovaleriaansuur, 2-hidroksi-isokaproësuur en 2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur gevorm kan word 123

Diagram 6-2 Skematiese voorstelling van die moontlike vorming van laktone en dikarboksiësure. Die moontlike produkte wat gevorm kan word van 2-hidroksi-isovaleriaansuur, 2-hidroksi-isokaproësuur en 2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, word aangetoon in die diagram 124

Diagram 6-3 Skematiese voorstelling van die konjugering van die vertakteketting-2-hidroksisure 126

Diagram 6-4 Skematiese voorstelling van normale α -oksidase en waar die geïnduseerde vertakteketting-2-hidroksisure moontlik hierdie weg inhibeer (White *et al.*, 1978:581 - 583) 134

Lys van figure:

Hoofstuk 4: Resultate: Geïnduseerde metaboliete uit die vertakteketting-aminosure

Figuur 4-1	Massaspektrum van <i>N</i> -asetielvalien-mono-TMS	51
Figuur 4-2	Massaspektrum van <i>N</i> -asetielisoleusien-mono-TMS	52
Figuur 4-3	Massaspektrum van <i>N</i> -asetielleusien-mono-TMS	52
Figuur 4-4	Massaspektrum van <i>N</i> -laktielvalien-di-TMS	57
Figuur 4-5	Massaspektrum van <i>N</i> -laktielleusien-di-TMS	58
Figuur 4-6	Massaspektrum van <i>N</i> -laktielisoleusien-di-TMS	58
Figuur 4-7	Totale ioonchromatogram vanaf 15 tot 25 minute om die elueringstyd van die onderskeie TMS-derivate van die <i>N</i> -2-hidroksi-isovaleriel-vertakteketting-aminosuurkonjugate aan te dui. 1: <i>N</i> -Laktielleusien; 2: <i>N</i> -Laktielisoleusien; 3: <i>N</i> -2-Hidroksi-isovalerielvalien; 4: Akonitiensuur; 5: <i>N</i> -2-Hidroksi-isovaleriellesien; 6: <i>N</i> -2-Hidroksi-isovalerielisoleusien; 7: Hipuursuur; 8: Sitroensuur	60
Figuur 4-8	Massaspektrum van <i>N</i> -2-hidroksi-isovalerielvalien-di-TMS	60
Figuur 4-9	Massaspektrum van <i>N</i> -2-hidroksi-isovaleriellesien-di-TMS	61
Figuur 4-10	Massaspektrum van <i>N</i> -2-hidroksi-isovalerielisoleusien-di-TMS	61

Figuur 4-11	Massaspektrum van <i>N</i> -2-hidroksi-isokaproïelvalien-di-TMS	63
Figuur 4-12	Massaspektrum van <i>N</i> -2-hidroksi-isokaproïelleusien-di-TMS	64
Figuur 4-13	Massaspektrum van <i>N</i> -2-hidroksi-isokaproïelisoleusien-di-TMS ...	64
Figuur 4-14	Massaspektrum van <i>N</i> -2-hidroksi-3-metielvalerielleusien-di-TMS .	66
Figuur 4-15	Massaspektrum van <i>N</i> -asetielglisien-mono-TMS	71
Figuur 4-16	Massaspektrum van <i>N</i> -laktielglisien-mono-TMS	71
Figuur 4-17	Massaspektrum van <i>N</i> -2-hidroksi-isovaleriëlgliënsien-di-TMS	72
Figuur 4-18	Totale ionchromatogram om die elueringsposisie van die 5-hidroksi-5-isopropielhidantoïen aan te toon. Die pieke is geïdentifiseer as 1: 2-hidroksi-glutaarsuur; 2: 5-hidroksi-5-isopropielhidantoïen; 3: ρ -hidroksi-fenielasynsuur; 4: onbekend; 5: onbekend; 6: <i>N</i> -laktielisoleusien; 7: onbekend; 8: akonitiensuur	78
Figuur 4-19	Massaspektrum van 5-hidroksi-5-isopropielhidantoïen-tri-TMS	78
Figuur 4-20	Massaspektrum van 5-hidroksi-5-metielpropielhidantoïen-tri-TMS .	79
Figuur 4-21	Massaspektrum van 5-hidroksi-5-isobutiriëlhidantoïen-tri-TMS	79
Figuur 4-22	Massaspektrum van die metaboliet in die urine van 'n MSUD-pasiënt wat vermoedelik die hidantoïen-tri-TMS-derivaat is wat vanaf <i>allo</i> -isoleusien gevorm word	80
Figuur 4-23	Massaspektrum van isobutiëlamienstandaard soos verkry met behulp van ES-MS-MS	83

Hoofstuk 5: Resultate: Primêre geïnduseerde metaboliëte uit die vertakteketting-2-ketosure

Figuur 5-1	Totale ionchromatogram van 'n organiese suurekstrak van die urine van 'n MSUD-pasiënt om die elueringsposisie van die <i>N</i> -isobutiriël-vertakteketting-aminosuurkonjugate aan te toon. 1: Interne standaard (3-feniëlbottersuur); 2: Appelsuur; 3: <i>N</i> -Isobutirielleusien; 4: <i>N</i> -Isobutiriëlisoleusien; 5: <i>N</i> -2-Metielbutiriëlvaien; 6: <i>N</i> -Isovaleriëlleusien; 7: <i>N</i> -Isovaleriëlisoleusien; 8: <i>N</i> -2-Metielbutiriëlleusien; 9: ρ -Hidroksi-feniëlasynsuur; 10: <i>N</i> -2-Metielbutiriëlisoleusien; 11: <i>N</i> -Laktiëlleusien; 12: Akonitiensuur ..	89
Figuur 5-2	Massaspektrum van <i>N</i> -isobutiriëlvaien-mono-TMS	90
Figuur 5-3	Massaspektrum van <i>N</i> -isobutiriëlleusien-mono-TMS	90
Figuur 5-4	Massaspektrum van <i>N</i> -isobutiriëlisoleusien-mono-TMS	91
Figuur 5-5	Massaspektrum van <i>N</i> -isovaleriëlvaien-mono-TMS	92
Figuur 5-6	Massaspektrum van <i>N</i> -isovaleriëlleusien-mono-TMS	92
Figuur 5-7	Massaspektrum van <i>N</i> -isovaleriëlisoleusien-mono-TMS	93
Figuur 5-8	Massaspektrum van <i>N</i> -2-metielbutiriëlvaien-mono-TMS	94
Figuur 5-9	Massaspektrum van <i>N</i> -2-metielbutiriëlleusien-mono-TMS	94
Figuur 5-10	Massaspektrum van <i>N</i> -2-metielbutiriëlisoleusien-mono-TMS	95
Figuur 5-11	Massaspektrum van die gesubstitueerde tiamien- en 11-hidrotiochroomstandaard	106

Figuur 5-12	Massaspektrum om die dogter-ione van die gesintetiseerde standaard (hidroksi-isovalerieltiamien) met 'n molekulêre massa van 351 ame aan te toon	106
Figuur 5-13	Massaspektrum om die dogter-ione van die gesintetiseerde standaard (hidroksi-isovaleriel-11-hidrotiochroom) met 'n molekulêre massa van 349 ame aan te toon	107
Figuur 5-14	Ouer-ione van fragment 122 ame soos gevorm word tydens die analise van 'n urienmonster van pasient MM	108
Figuur 5-15	Massaspektrum van 2-isopropielappelsuur-tri-TMS	112
Figuur 5-16	Massaspektrum van 2-isopropielfumaarsuur-di-TMS	113
Hoofstuk 6: Resultate: Geïnduseerde metaboliete uit die vertakteketting-2-hidroksisure		
Figuur 6-1	Massaspektrum van 2-keto-3-hidroksi-4-metielfuraan-mono-TMS	125
Figuur 6-2	Massaspektrum van 2-hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-isovaleriaansuur-di-TMS	127
Figuur 6-3	Massaspektrum van 2-hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-isokaproësuur-di-TMS	127
Figuur 6-4	Massaspektrum van 2-hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur-di-TMS	128
Figuur 6-5	Massaspektrum van 2-hidroksi-isokaproëiel-2-hidroksi-isovaleriaansuur-di-TMS	129

Figuur 6-6	Massaspektrum van 2-hidroksi-isokaproïel-2-hidroksi-isokaproësuur-di-TMS	129
Figuur 6-7	Massaspektrum van 2-hidroksi-isokaproïel-2-hidroksi-3-metiel-valeriaansuur-di-TMS	130
Figuur 6-8	Massaspektrum van 2-hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-isovaleriaansuur-di-TMS	131
Figuur 6-9	Massaspektrum van 2-hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-isokaproësuur-di-TMS	132
Figuur 6-10	Massaspektrum van 2-hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-3-metiel-valeriaansuur-di-TMS	132
Figuur 6-11	Massaspektrum van 2-hidroksi-dekanoësuur-di-TMS	135
Figuur 6-12	Massaspektrum van vermoedelik 2-hidroksi-3-metielnonanoësuur-di-TMS	135

Hoofstuk 7: Gevolgtrekking en bespreking

Figuur 7-1	Asiel-karnitienkonjugate soos gevind in die urine van 'n MSUD-pasiënt	144
Figuur 7-2	Profiel van die vrye karnitien voor alkaliese hidrolise	145
Figuur 7-3	Asiel-karnitienprofiel van dieselfde urine van 'n MSUD-pasiënt na 'n alkaliese hidrolise	145
Figuur 7-4	Profiel van die vrye karnitien na die alkaliese hidrolise	146

Lys van tabelle:

Hoofstuk 2: Literatuur oorsig en doelstelling

Tabel 2-1	Normale serumwaardes van die vertakteketting-aminosure, vertakteketting-2-ketosure en hul ooreenstemmende 2-hidroksisure (Wendel <i>et al.</i> , 1980:57-63; Shigematsu <i>et al.</i> , 1983:183-189; Lancaster <i>et al.</i> , 1974:257-265; Snyderman <i>et al.</i> , 1984:851-853) ..	24
------------------	--	----

Hoofstuk 3: Materiaal, instrumentasie en metodes

Tabel 3-1	Urinêre vertakteketting-aminosuurkonsentrasies soos bepaal in die urine van pasiënt MM. Monsters 2 - 5 is bepaal met 'n tandem massaspektrometer	29
Tabel 3-2	Konsentrasies van die vertakteketting-2-ketosure en -2-hidroksisure in die urine van pasiënt MM soos bepaal tydens opeenvolgende urienmonsters oor 'n tydperk van vier maande	29
Tabel 3-3	Serumkonsentrasies van die vertakteketting-aminosure by pasiënte EM en BM	30
Tabel 3-4	Urinêre organiese sure in die urine van pasiënte EM en BM	31

Hoofstuk 4: Resultate: Geïnduseerde metaboliete uit die vertakteketting-aminosure

Tabel 4-1	Urinêre konsentrasies van die <i>N</i> -asetiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate	53
------------------	--	----

Tabel 4-2	Konsentrasies van <i>N</i> -asetielleusien, -isoleusien en -valien in die urine van pasiënt MM	54
Tabel 4-3	Urinêre aminosuurkonsentrasies van pasiënte MM, EM en OH	54
Tabel 4-4	Konsentrasies van die vertakteketting-2-ketosure en -2-hidroksisure in die urine van MSUD-pasiënte	55
Tabel 4-5	Konsentrasies van die urinêre <i>N</i> -laktielkonjugate van die vertakteketting-aminosure in die urine van MSUD-pasiënte	56
Tabel 4-6	Urinêre konsentrasies van die <i>N</i> -2-hidroksi-isovaleriel-vertakteketting-aminosuurkonjugate. Pasiënt MM is oor 'n tydperk van vier maande gemonitor en hierdie resultate is aangedui as monster 1 tot 5	62
Tabel 4-7	Urinêre konsentrasies van 5-hidroksi-5-isopropielhidantoïen, 5-hidroksi-5-metielpropielhidantoïen en 5-hidroksi-5-isobutirielhidantoïen. (N/O = Nie opspoorbaar)	80
Tabel 4-8	Die waardes soos gebruik met die ES-MS-MS vir die bepaling van isobutielamien	84

Hoofstuk 5: Resultate: Primêre geïnduseerde metaboliete uit die vertakteketting-2-ketosure

Tabel 5-1	Urinêre konsentrasies van die <i>N</i> -asielkonjugate soos gevind by die MSUD-pasiënte wat in hierdie studie gebruik is	96
Tabel 5-2	Resultate van die ensiem-bepaling van pasiënt MM soos verkry is met behulp van ES-MS-MS	101

Tabel 5-3 Toestande wat gebruik is tydens die LC-ES-MS-MS-analises (dogter-ione van 349 ame en 351 ame asook ouer-ione van 122 ame) van die gesintetiseerde tiamien- en tiochroomderivate 105

Abstract

The first description of a patient with Maple Syrup Urine Disease was done in 1954. Since then several other patients with the same deficiency of the branched chain 2-keto-acid dehydrogenase enzyme have been described. To date, diet has mainly been used as a treatment for these patients. This has resulted in this study which aims at identifying the possible toxic metabolites and metabolic pathways involved in the formation of these metabolites and, in doing so, to try and obtain a better clinical-biochemical relationship. This information could possibly lead to the improvement of the treatment of these patients.

To achieve this goal, an analytical-biochemical approach was used to predict the formation of possible metabolites that can be formed as a result of a deficiency of the branched chain 2-keto-acid dehydrogenase enzyme. This approach entails that the possible induced metabolites are predicted based on a knowledge of the mechanisms of existing metabolic pathways. These metabolites are then synthesized, or if possible, commercially obtained. The mass spectrum of the compound is then obtained by using standard techniques such as electron impact ionization mass spectrometry, chemical ionization mass spectrometry and liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. The existence of these metabolites in the urine of MSUD patients are subsequently investigated by using the obtained mass spectra.

In this manner more than seventy metabolites have been identified in the urine of patients with Maple Syrup Urine Disease of which approximately sixty are new metabolites. The remainder of the metabolites have been discussed previously in the literature or could not be identified positively during this study. Although some of the metabolites are present in low concentrations in the urine, the intracellular concentrations might be high enough to influence enzyme reactions, either by

inhibition of the enzyme or by means of competition of the induced metabolite with the normal substrate of the enzyme.

It also appears from the results obtained during this study that the rate of the enzyme reactions in individual patients can to a large extent contribute to the prognosis of the individual patient. It also appears from the results that the concentrations or availability of co-factors such as thiamin pyrophosphate could play an important role in patients suffering from Maple Syrup Urine Disease.

Opsomming

Sedert die eerste beskrywing van 'n pasiënt met Maple Syrup-uriendefek in 1954, is verskeie ander pasiënte met dieselfde defek van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-ensiem beskryf. Tot nou is hoofsaaklik van dieet gebruik gemaak om hierdie pasiënte te behandel. Dit het aanleiding gegee tot hierdie studie wat ten doel het om die moontlike toksiese metaboliete en metaboliese weë, betrokke by die vorming van die metaboliete te identifiseer en om 'n beter klinies-biochemiese beeld te verkry. Hierdie kennis kan moontlik tot 'n verbeterde behandeling vir hierdie pasiënte lei.

Om in dié doel te slaag, is gebruik gemaak van 'n analities-biochemiese benadering om die metaboliete te voorspel wat moontlik gevorm kan word as gevolg van 'n defek van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-ensiem. Hierdie benadering behels dat potensieel geïnduseerde metaboliete op grond van die kennis van meganismes van bestaande metaboliese weë voorspel word. Hierdie metaboliete is dan chemies gesintetiseer, of indien moontlik, in die handel verkry. Spektre is dan verkry van die standaard met behulp van elektronionisasie-massaspektrometrie, chemiese-ionisasie-massaspektrometrie en vloeistofchromatografie-elektrosproei-tandem-massaspektrometrie die teenwoordigheid van die moontlike metaboliete in die urine van pasiënte is dan met die verkrygte spektre ondersoek.

Op hierdie wyse is meer as sewentig metaboliete geïdentifiseer by pasiënte met Maple Syrup-uriendefek, waarvan ongeveer sestig nuwe metaboliete is. Die oorblywende metaboliete is óf reeds in die literatuur bekend óf is nie positief geïdentifiseer in hierdie studie nie. Hoewel sommige van die metaboliete in lae konsentrasies in die urine van hierdie pasiënte voorkom, is die intrasellulêre konsentrasies moontlik hoog genoeg om 'n invloed op ensiemreaksies te hê, hetsy deur middel van inhibisie van

die ensiem(e), of deur middel van kompetisie van die geïnduseerde metaboliet met die normale substraat van die ensiem.

Dit wil ook voorkom uit die resultate verkry uit hierdie studie, dat die tempo van reaksies by individuele persone in 'n groot mate kan bydra tot die prognose van 'n bepaalde pasiënt. Verder blyk dit uit die resultate dat die konsentrasies of beskikbaarheid van ko-faktore soos tiamienpirofosfaat 'n belangrike rol by Maple Syrup-uriendefek-pasiënte kan speel.

Hoofstuk 1

Inleiding

1.1. Inleiding

Sedert die eerste metaboliese defek in 1908 deur Garrod (1908:73) bespreek is, is in die daaropvolgende jare 'n paar honderd ander metaboliese defekte beskryf. Die gevolg is dat daar tans verskeie defekte bekend is waarvan sommige defekte 'n hoë voorkoms het en sommige kan met groot sukses behandel word. Verskeie van hierdie defekte is egter steeds nie suksesvol behandelbaar nie en kan meestal net verligting van die simptome verkry word ten spyte van die feit dat selfs die spesifieke mutasies bepaal kan word. Hierdie leernte kan grootliks toegeskryf word aan onvoldoende inligting aangaande die sekondêre effek van die metaboliese defek. Die primêre effek van die defek is 'n onvermoë om 'n sekere ensiemgekataliseerde reaksie uit te voer. Die sekondêre effekte is egter 'n kaskade van gevolge van invloede op die metabolisme deur 'n verskeidenheid sekondêr geïnduseerde metaboliete wat gevorm kan word. Hoewel 'n groot getal van die metaboliete reeds geïdentifiseer is, is veral die metaboliete wat in lae konsentrasies voorkom steeds ongeïdentifiseer. Dit is dus moontlik dat die bestaande behandeling by hierdie metaboliese defekte groot tekortkominge het en moontlik oneffektief is omrede die werklike metaboliete wat die simptome veroorsaak nog onbekend is.

Die Departement Biochemie aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys is al 'n geruime tyd betrokke by die sifting vir aangebore metaboliese afwykings (Mienie, 1994:1). Die program was aanvanklik gemik op die voorkoms van metaboliese afwykings by verstandelik gestremdes. Dié teikengroep het egter verskuif na babas met die kliniese beeld van 'n metaboliese afwyking. Dié verskuiwing het tot

gevolg gehad dat meer metaboliese afwykings in hierdie teikengroep opgespoor is as by die aanvanklike teikengroep van verstandelik gestremdes. Hierdie verskuiwing het ook tot gevolg gehad dat die afwykings op 'n vroeër ouderdom opgespoor is. Behandeling was dus altyd ter sprake.

Die eerste Maple Syrup-Uriendefek (MSUD) is in 1954 deur Menkes en kollegas beskryf (Menkes *et al.*, 1954:462 - 467). Hoewel verskeie fenotipes van die defek bespreek is en die oorsaak van die defek grootliks opgeklaar is, bestaan daar ook geen effektiewe behandeling vir hierdie defek nie. Die bestaande behandeling is grootliks op 'n dieet wat laag is in vertakteketting-aminosure (valien, leusien en isoleusien) gebaseer. Selfs met dié dieet is dit egter uiters moeilik om 'n optimistiese prognose te maak selfs in die geval van MSUD-pasiënte met 'n matige vorm van MSUD en in die ernstige gevalle (klassieke MSUD) is 'n prognose feitlik onmoontlik.

Dit is dan ook die doelstelling van hierdie studie om meer lig te werp op die metabolisme deur spesifiek geïnduseerde metaboliete wat as gevolg van die defek gevorm word, te identifiseer. As motivering hiervoor word aangevoer dat 'n geheelkennis van die abnormale metabolisme nie net tot 'n verbeterde klinies-biochemiese korrelasie sal lei nie, maar ook tot verbeterde behandeling van die pasiënte. Hoewel dit nie die doel van hierdie studie is om hierdie moontlikheid te ondersoek nie, sal metaboliete wat potensieel tot die kliniese beeld van MSUD en moontlike behandelingswyses kan bydra, in hierdie studie ondersoek en bespreek word. Indien die vertakteketting-aminosuurmetsolisme beter verstaan kan word, kan dit moontlik daartoe lei dat die oorsprong van alle of sommige van die ernstige kliniese simptome by MSUD-pasiënte meer effektief behandel kan word. Die uiteindelijke doel is dus om MSUD-pasiënte en moontlik ook ander pasiënte met ander metaboliese afwykings so 'n normal moontlik lewe te kan bied.

Hoofstuk 2

Literatuuroorsig en doelstelling

2.1. Inleiding

Die titel van hierdie proefskrif, naamlik “ ‘n Studie van geïnduseerde metaboliese weë weens ‘n aangebore defek van die vertakketting- α -ketosuur dehidrogenase-kompleks” toon ‘n duidelike terreinafbakening. Die stelling van Duran *et al.*, (1982:1): “...*The continuing search for ‘new’ metabolites may eventually lead to a better understanding of the relation between clinical conditions and the biochemical abnormalities...*”, is kortliks die motivering vir die ondersoek na die voorkoms van metaboliete wat tans nog ongeïdentifiseerd is.

Sedert 1982 is groot vordering op die molekulêre gebied van aangebore metaboliese afwykings gemaak, in so ‘n mate dat daar in sommige metaboliese afwykings ‘n verband tussen die mutasie en die ernstigheidsgraad van die siektetoestand opgemerk kan word (Robinson *et al.*, 1984:283). Hierdie kennis van die metaboliese defek verklaar egter steeds nie die geïnduseerde fisiologiese abnormaliteite en kliniese simptome nie. ‘n Volledige beeld van die abnormale metaboliete gevorm tydens metaboliese afwykings en die effek wat hierdie metaboliete op die verloop en regulering van die metabolisme het, mag moontlik verklarings vir die fisiologiese abnormaliteite en kliniese simptome bied.

Die kennis van die invloed wat eksterne faktore op die vorming van die metaboliete het, mag uiteindelik bydra tot ‘n verbeterde behandeling en prognose van pasiënte met metaboliese defekte. Die moontlikheid dat die tans onverklaarbare individuele variasie van kliniese en biochemiese kenmerke van pasiënte met metaboliese defekte aan ‘n

vermoë of onvermoë om sekere van die abnormale metaboliëte te vorm te wye is, is ook nie uitgesluit nie.

Om die doelwit van hierdie studie te bereik, is 'n ondersoek uitgevoer na reeds geïdentifiseerde meganismes wat tot die vorming van geïnduseerde metaboliëte by metaboliese afwykings kan lei. Met behulp van hierdie meganismes is gepoog om te voorspel watter metaboliëte weens defekte van die vertakketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks gevorm kan word.

Die meeste van die reeds bekende geïnduseerde metaboliëte is toevallig waargeneem en hoofsaaklik vir diagnostiese doeleindes geïdentifiseer (Duran *et al.*, 1982:1). Omdat die identifisering van geïnduseerde metaboliëte primêr op diagnostiese doelwitte gerig was, was die werklike oorsprong van die metaboliëte van minder belang. Weinig studies met die uitsluitlike doel om ongeïdentifiseerde metaboliëte wat gevorm word as gevolg van 'n aangebore metaboliese defek op te spoor en die oorsprong van die metaboliëte vas te stel, is in die literatuur bekend. Dit was dus nodig om 'n benaderingswyse vir die studie te definieer. Die benadering wat in hierdie studie gebruik is, word as vertrekpunt aangevoer.

2.1.1. Benaderingswyse vir die studie van geïnduseerde metaboliese weë

Voorstellings van geïnduseerde metaboliese weë is afhanklik van die studie van geïnduseerde metaboliëte. Hierdie metaboliëte is ook indikatore van die diagnose van aangebore metaboliese siektetoestande. Daar word dus in die meeste gevalle na nuwe metaboliëte gesoek om 'n verbeterde diagnose te maak. Daar is tans dus nog nie 'n algemeen aanvaarde wetenskaplike benaderingswyse vir die studie van geïnduseerde metaboliese weë gedefinieer nie, maar daar word nogtans deur Mienie (1994:1) twee hoofrigtings onderskei. In die eerste plek die klinies-biochemiese benadering, wat gebruik word deur navorsers waar die diagnose en behandeling van pasiënte die primêre doel is (Divry *et al.*, 1981:139; Duran *et al.*, 1987:197; Greter *et al.*, 1980:103; Kuhara *et al.*, 1982:225; Kuhara *et al.*, 1983:629; Lehnert & Junker, 1980:47). 'n Hipotese aangaande die oorsprong van die metaboliëte op grond van

vergelijkbare bestaande metaboliese weë volg dikwels die identifisering van 'n (nuwe) geïnduseerde metaboliet. Slegs in enkele gevalle word pogings aangewend om die werklike oorsprong eksperimenteel te bewys.

Indien 'n verbinding wat nie voorheen in die urine van pasiënte met 'n metaboliese defek beskryf is nie, opgemerk word, volg die identifisering van die verbinding, wat deur vier stappe gekenmerk word:

- i) 'n Aanduiding van die identiteit van die verbinding word deur middel van die bestudering van die massaspektrometrie-fragmentasiepatroon verkry (Kuhara *et al.*, 1983:629; Pollitt, 1983:253). Met die doel om die konsentrasies van die onbekende verbindings te verhoog en sodoende identifisering te vergemaklik, kan 'n belading, hetsy met 'n voorganger van die bepaalde ensiemdefek (Ando *et al.*, 1972:2200; Przyrembel *et al.*, 1979:1) of 'n algemene belading deur middel van byvoorbeeld proteïne, gedoen word (Erasmus *et al.*, 1985:105).
- ii) Die voorlopig geïdentifiseerde metaboliet word deur middel van organiese sintesemetodes gesintetiseer en die struktuur word met behulp van tegnieke soos kernmagnetieseresonans geverifieer (Duran *et al.*, 1982:1).
- iii) 'n Massaspektrum van die gesintetiseerde verbinding word verkry, wat dan met die spektrum van die urineverbinding vergelyk word (Kuhara *et al.*, 1983:629; Pollitt, 1983:253; Duran *et al.*, 1987:197). Van die verbindings is soms in die handel verkrygbaar en is 'n sintese dus nie nodig nie.
- iv) Die belangrikheid dat die voorkoms van die geïdentifiseerde verbinding in die urine van 'n normale persoon nagegaan moet word, spreek vanself.

Alvorens tot 'n voorstel van die oorsprong van die geïdentifiseerde verbindings gekom kan word, is kennis van die metabolisme noodsaaklik. Hier word dikwels van bekende metaboliese reaksies met 'n alternatiewe substraat (Ando *et al.*, 1972:2200; Duran *et al.*, 1982:1; Jakobs *et al.*, 1984:1185) of selfs beskryfde metaboliese weë in byvoorbeeld rotte, bakterieë, giste en plante gebruik gemaak (Ando *et al.*, 1972:2200; Pollitt *et al.*, 1987:151; Greter *et al.*, 1980:103). Soms word daar gepoog om die voorgestelde oorsprong van die metaboliet deur middel van beladingstoetse te bevestig. 'n Verhoging in die konsentrasie van die metaboliet se belading waarin

belang gestel word, kan as 'n bevestiging van die voorgestelde oorsprong gesien word (Ando *et al.*, 1972a:2807). Beladingstoetse met radioaktiewe of swaar gemerkte verbindings lewer in hierdie geval meer betroubare resultate (Ando *et al.*, 1972:2200; Ando *et al.*, 1972a:2807). In enkele gevalle is *in vitro*-studies gebruik om nie net die oorsprong van die bestudeerde metaboliet te bevestig nie, maar ook om toestande wat 'n invloed op die vorming van die metaboliete kan hê, te bestudeer (Brandänge *et al.*, 1984:695).

'n Tweede benadering is die analities-biochemiese benadering. Dié benadering kan vir verdere navorsing, nadat 'n aangebore metaboliese defek reeds beskryf is, aangewend word. Die primêre doel van hierdie benadering is detailkennis van die oorsprong en gevolge van die ensiemdefek op die metabolisme onder variërende toestande (Pollitt, 1983:253; Duran *et al.*, 1978:93). Die Departement Biochemie aan die Potchefstroomse Universiteit het die afgelope vyf jaar met sukses van die benadering gebruik gemaak.

Die analities-biochemiese benadering verskil van die klinies-biochemiese benadering in die opsig dat 'n voorstelling vir die bestaan van 'n bepaalde metaboliet analises voorafgaan. Hierdie voorstelling word op grond van die kennis van die metabolisme gemaak. Die verbinding word dan, hetsy deur sintese of via die handel, verkry. 'n Massaspektrum-fragmentasiepatroon word bepaal en met behulp van die bekende fragmentasiepatroon word dan na die voorkoms van die verbinding in die urine van pasiënte gesoek (Pollitt, 1983:253). Ook in hierdie benadering kan beladingstoetse gebruik word, hetsy om die identifisering te vergemaklik, of ter bevestiging van die oorsprong van die metaboliet. Die analities-biochemiese benadering bied die voordeel dat van hoër sensitiwiteit-analises gebruik gemaak kan word om sodoende verbindings in veel laer konsentrasies op te spoor. Die klinies-biochemiese benadering vereis betreklik hoë konsentrasies vir die aanvanklike identifisering. Verbindings wat in lae konsentrasies voorkom, is moeiliker identifiseerbaar, aangesien die massaspektra van die verbindings dikwels met die fragmente van verbindings wat in hoër konsentrasies voorkom, gekontamineer word.

By die meeste metaboliëte wat reeds by pasiënte met 'n defek van die vertakketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks opgespoor en beskryf is, is van die klinies-biochemiese benadering gebruik gemaak. Die verbindings word dan ook aan die hoë konsentrasies waarin dit in die urine van die pasiënte voorkom, gekenmerk. Die identifisering van verbindings in hoë konsentrasies het egter 'n belangrike bydrae gelewer tot die daarstel van 'n metaboliëtpatroon wat kenmerkend is van 'n spesifieke metaboliese afwyking. Die metaboliëtpatroon is op sy beurt belangrik vir korrekte diagnose.

Die vraag is egter of dit enige doel dien om verbindings wat in baie lae konsentrasies voorkom, te identifiseer, of om selfs te bewys dat verwagte verbindings in die urine van persone met 'n spesifieke metaboliese afwykings afwesig is. Indien die metaboliëtpatroon slegs vir diagnostiese doeleindes aangewend word, het die verbindings in baie lae konsentrasies geen of baie min waarde. Die voorkoms van die verbindings lewer egter 'n uiters belangrike bydrae op ander gebiede, naamlik:

- i) Eerstens die begrip en verkryging van 'n volledige beeld van die geïnduseerde metaboliese weë.
- ii) Tweedens is dit opvallend dat kliniese en biochemiese eienskappe van 'n spesifieke metaboliese defek slegs in uitsonderlike gevalle aan die voorkoms van 'n spesifieke metaboliëte toegeskryf kan word. Hoewel verskeie voorstelle van abnormale verbindings wat belangrike ensiemreaksies sou inhibeer en tot 'n spesifieke kliniese en biochemiese beeld sou kon lei, gemaak is, is daar bykans vir elke voorstel 'n alternatiewe voorstel (Beach *et al.*, 1977:2702; Cheema-Dhadli *et al.*, 1975:905; Glasgow & Chase, 1976:301; Coude *et al.*, 1979:1544). Aangesien daar min of geen biochemiese parameters wat 'n aanduiding van die metaboliese toestand van 'n pasiënt weergee nie, word die behandeling van metaboliese afwykings uiters moeilik.

Meer kennis oor verwagte verbindings wat in lae konsentrasies voorkom, of selfs totaal afwesig is, kan 'n belangrike bydrae tot die korrelasie van die kliniese en biochemiese eienskappe en die metaboliëtpatroon van 'n siektetoestand lewer. Die

waarde van hierdie verwagte verbindings is dat dit 'n aanduiding kan gee van die ensiemsuubstraatbindings.

Om die opspoorbaarheid van die verbindings in lae konsentrasies te verhoog, is in die literatuur van beladings gebruik gemaak. Belading van 'n pasiënt met 'n metaboliese defek het egter verskeie nadele. Eerstens word die pasiënt se lewe in gevaar gestel en is dit daarom nie eties regvaardigbaar nie. Tweedens lei beladings in sommige gevalle tot ketose en asidose, wat weer aanleiding gee tot 'n verandere metabolietpatroon. Die verandering kan sodanig wees dat metaboliete wat gewoonlik in hoë konsentrasies in die urine van die pasiënt voorkom, totaal afwesig kan wees (Duran *et al.*, 1978:93). Persone wat 'n kliniese beeld soos ketoasidose vertoon, ongeag die rede vir die toestand, vertoon gewoonlik ook 'n abnormale metabolietpatroon in die urine (Landaas & Jakobs, 1977:489; Landaas, 1975:143). Die probleem kan tot onnodige kompleksiteit lei, wat liefs vermy moet word.

Met die doel om geïnduseerde metaboliete, selfs in lae konsentrasies in die urine van MSUD-pasiënte op te spoor is vanselfsprekend op die analities-biochemiese benaderingswyse vir hierdie studie besluit. 'n Alternatief vir beladingstoetse moes egter gevind word. Daar is besluit op die gebruik van aangebore en verworwe metaboliese defekte, waarvan die aangetaste metaboliese weë, metabolietpatrone en kliniese beelde ooreenstem met die van Maple Syrup-uriendefek. Die alternatief bied die voordeel van hoë konsentrasies van die metaboliete waarvan die metabolisme bestudeer word, wat selfs nie deur 'n belading bereik kan word nie. Die effek van die kliniese en biochemiese eienskappe soos die genoemde ketose en asidose kan uitgeskakel word en selfs bestudeer word. Die moontlikheid van alternatiewe weë as die oorsprong vir 'n metaboliet by verskillende defekte, moet egter deurgaans in gedagte gehou word.

2.2. Historiese oorsig van Maple Syrup-uriendefek

Menkes *et al.*, (1954:462 - 467) beskryf in 1954 vier pasiënte waar die eerste kliniese simptome binne die eerste lewensweek begin. Die siekte is dan ook van so 'n aard dat die pasiënte binne die eerste drie maande sterf. Een van die waarneming wat Menkes *et al.*, (1954:462 - 467) maak, is dat die urine van hierdie pasiënte 'n soet reuk, soortgelyk aan esdoringstroop, het (Peinemann & Danner, 1994:3 - 15). Hierna bestudeer Westall en medewerkers in 1957 'n ander pasiënt met soortgelyke simptome en vind dat die vertakteketting-aminosure (valien, leusien en isoleusien) in liggaamsvloeistowwe baie verhoog voorkom (Westall *et al.*, 1957: 571). As gevolg van die kenmerkende reuk van die pasiënte en veral die urine van die pasiënte word na die siekte verwys as Maple Syrup-uriendefek (MSUD) (Chuang & Shih, 1995:1250).

Verdere studie word gedoen en die organiese sure in die urine van MSUD-pasiënte word bepaal. Hierdie analyses lei tot die bevinding dat die vertakteketting-2-ketosure (2-keto-isovaleriaansuur, 2-keto-isokaproësuur en 2-keto-3-metielvaleriaansuur), wat hul oorsprong vanaf die vertakteketting-aminosure het, ook verhoog is (Menkes, 1959:348 - 353). Hierna word ook die 2-hidroksisure geïdentifiseer en die defek kry dan ook sy alternatiewe naam, vertakteketting-ketonurie (Dancis *et al.*, 1967:84 - 89) of vertakteketting-ketosuururie (Dancis *et al.*, 1960:72 - 79). Dancis *et al.*, (1960:72 - 79) stel ook voor dat die defek op die vertakteketting-aminosuurkatabolisme is en meer spesifiek moontlik op die oksidatiewe dekarboksileringsstap van die vertakteketting-ketosure.

Verdere variasies van MSUD word beskryf in die daaropvolgende jare. Sommige van hierdie variasies het matiger kliniese simptome getoon as die oorspronklike MSUD-pasiënte (Dancis *et al.*, 1967:84 - 89; Morris *et al.*, 1961:918 - 923). Pogings word aangewend om die pasiënte te behandel deur middel van dieet en in 1964 behandel Snyderman *et al.*, (1964:454 - 472) 'n pasiënt suksesvol met 'n dieet wat geen vertakteketting-aminosure bevat nie. In 1971 beskryf Schriver *et al.*, (1971:310 - 312) 'n tiamienafhanklike vorm van MSUD. Hierdie pasiënt word dan ook suksesvol behandel met tiamien.

Met die voortdurende navorsing wat oor hierdie defek gedoen word, word dan ook verskeie ander geïnduseerde metaboliëte geïdentifiseer. Van hierdie metaboliëte sluit in *N*-geasetileerde-vertakteketting-aminosure (*N*-asetielleusien, *N*-asetielisoleusien en *N*-asetielvalien) beskryf deur Jellum *et al.*, (1986:21) en deur Lenhert en Werle (1988:123) en *N*-laktiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate (*N*-laktielvalien, *N*-laktielleusien en *N*-laktielisoleusien) bespreek deur Mienie (1994:151 - 157). Die konjugering van 2-hidroksi-isovaleriaansuur met die vertakteketting-aminosure is ook reeds bespreek deur Hagenfeld en Naglo (1987:77). Meeste van hierdie verbindings is egter geïdentifiseer vir diagnostiese doeleindes en die oorsprong of meganisme van vorming word nie bespreek nie.

2.3. Normale vertakteketting-aminosuurkatabolisme

2.3.1. Inleiding

Die drie vertakteketting-aminosure (valien, leusien en isoleusien) is neutrale essensiële aminosure en kry hul gemeenskaplike naam deurdat daar 'n vertakte metielgroep op hul sykettings voorkom. Anders as die meeste ander aminosure, vind die eerste reaksie van die katabolisme van die aminosure, naamlik 'n transaminasereaksie, hoofsaaklik in spiere plaas. Die res van die kataboliese prosesse kan in verskeie weefsel uitgevoer word. Die rede vir die uitsondering kan waarskynlik in die glukose-alaniensiklus gevind word. Hierdie glukoseherwinningsweg, soortgelyk aan die Cori-siklus, is afhanklik van die aminogroepe vanaf vertakteketting-aminosure. Alanien, gevorm vanaf pirovaat deur 'n transaminase stap, word via die bloed na die lewer vervoer en as substraat in glukoneogese gebruik. Alanien word dus ook in verlaagde konsentrasies by MSUD-pasiënte gevind (Bremer *et al.*, 1981: 3) en dit kan moontlik bydra tot die verhoogde melksuurkonsentrasies wat dikwels by dié pasiënte waargeneem word (Bremer *et al.*, 1981:3).

Die vertakteketting-aminosure speel dus 'n rol in energieverkaffing in spierweefsel (Odessey & Goldberg, 1972:1376 - 1383; Hudson *et al.*, 1978:8126 - 8133) maar

lewer ook 'n bydrae in ander weefsel soos die hart (Buse *et al.*, 1972:8085 - 8096; Sans *et al.*, 1980:1 - 16), brein (Chaplin *et al.*, 1976:701 - 707), vetweefsel (Goodman, 1977:E97 - E103) en lewer (Crabb & Harris, 1978:1481 - 1487).

Behalwe die betrokkenheid van die aminosure in die energiemetabolisme, kan die aminosure ook potensieel 'n bydrae lewer in die anabolisme van cholesterol in spiere en vetweefsel via 3-hidroksi-3-metielglutariel-KoA en heemsintese via suksiniel-KoA. (Rosenthal *et al.*, 1974:411 - 418). Die moontlikheid dat die aminosure 'n belangrike rol in ketogenese speel, as gevolg van die produksie van suksiniel-KoA, kan ook nie uitgesluit word nie (Mienie, 1994:87 - 90) Verder het leusien moontlik 'n stimulerende effek op proteïensintese (Odessey *et al.*, 1974:7623 - 7629; Chua *et al.*, 1979:8358 - 8362) en 'n inhiberende effek op proteïenafbraak (Buse & Reid, 1975:1250 - 1261). Leusien stimuleer ook insulien afskeiding (Panten *et al.*, 1972:225 - 228; Lenzen, 1978:1321 - 1324; Hutton *et al.*, 1980:203 - 219). Die gebruik van vertaktekettering-aminosure in die behandeling van sepsis, lewersversaking, trauma en brandwonde is ook reeds beskryf (Mizock, 1985:1284 - 1288; Rosen *et al.*, 1977:483 - 487; Fischer *et al.*, 1976:77 - 91; Sax *et al.*, 1986:358 - 366).

2.3.2. Normale katabolisme van vertaktekettering-aminosure

Die eerste twee reaksies in die katabolisme van die vertaktekettering-aminosure word deur gemeenskaplike ensieme gekataliseer. Die proses begin by die transporterings van die aminosure oor die selwand deur die L-transportstelsel in die plasmamembraan (Oxender & Christensen, 1963:3686 - 3699; Le Cam & Freychet, 1977:148 - 156; Prentki & Renold, 1983:14239 - 14244). Hier vind die eerste van die twee gemeenskaplike reaksies plaas, naamlik deaminasie deur middel van 'n transaminase-ensiem. Die ensiem betrokke by hierdie reaksie is vertaktekettering-aminosuur aminotransferase (E.C. 2.6.1.42). 2-Keto-isovaleriaansuur, 2-keto-3-metielvaleriaansuur en 2-keto-isokaproësuur is onderskeidelik die getransamineerde produkte van valien, isoleusien en leusien. Daar bestaan tans onsekerheid of die transaminering van die vertaktekettering-aminosure deur 'n enkele ensiem uitgevoer word en of daar ensieme bestaan waarvan die substraatspesifisiteit verskil. Die

opsparing van 'n pasiënt met hipervalienemie (Wada *et al.*, 1963:46) en pasiënte met hiperleusien/iso-leusienemie (Chuang & Shih, 1995:1250) dui op die moontlikheid dat nog ensieme mag voorkom. Hoe dit ook al sy, dit is duidelik dat valien teen die hoogste tempo deur die ensiem of ensieme getransamineer word. Die vertakteketting-2-ketosure word oor die mitochondriale wand getranspoteer deur die vertakteketting-2-ketosuur transportsisteam (Hutson & Rannels, 1985:14189 - 14193). Daar word steeds bespiegel oor die bestaan van verskillende iso-ensieme, wat spesifiek vir valien en leusien/iso-leusien is. Die volgende stap in die oksidering van die vertakteketting-aminosure is die dekarboksilering van die aminosure deur die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks (E.C. 1.2.4.4) (Pettit *et al.*, 1978:4881 - 4885; Danner *et al.*, 1979:5522 - 5526). In hierdie stap word die 2-keto-isovaleriaansuur omgeskakel na isobutiriel-KoA, 2-keto-isokaproësuur na isovaleriel-KoA en 2-keto-3-metielvaleriaansuur na 2-metielbutiriel-KoA.

Na hierdie gemeenskaplike twee stappe word elk van die drie produkte afkomstig van die ooreenstemmende vertakteketting-aminosuur verder deur afsonderlike ensieme gekataboliseer. In die geval van die valienkatabolisme behels die volgende stap die dehidrogenering van isobutiriel-KoA deur die ensiem isobutiriel-KoA dehidrogenase om metielakreliel-KoA te vorm. In die twee daaropvolgende reaksies word 'n molekule water in elk verbruik om in die eerste reaksie β -hidroksie-isobutiriel-KoA, en in die tweede reaksie β -hidroksie-isobottersuur te vorm. β -Hidroksie-isobottersuur word verder geoksideer om metielmalonielsemialdehyd te vorm, wat op sy beurt propioniel-KoA in die daaropvolgende stap vorm (Horton *et al.*, 1993:18-40 - 18-41; Chuang & Shih, 1995:1241). Die volledige katabolisme van valien word skematies in Diagram 2-1 weergegee.

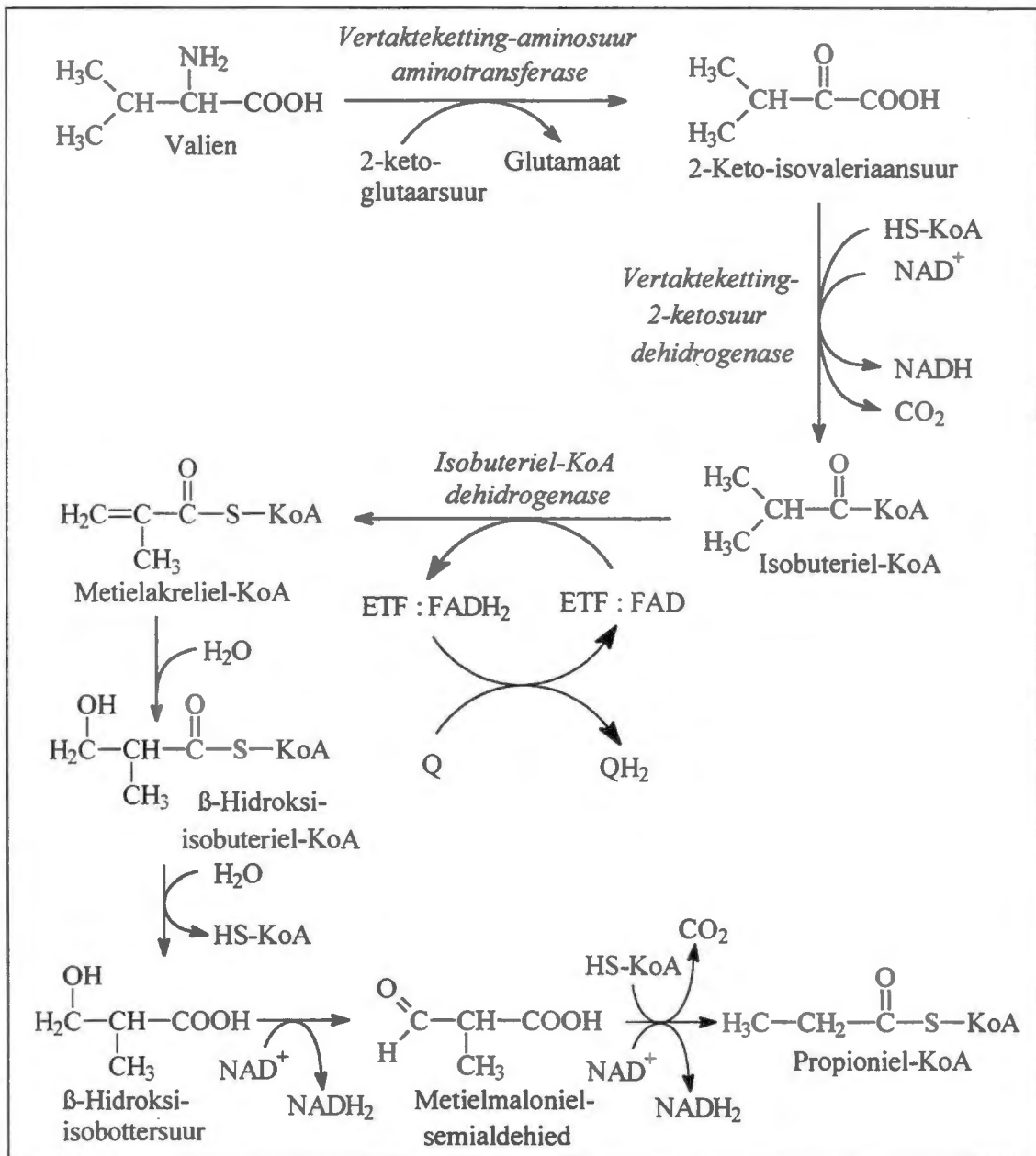


Diagram 2-1 Skematiese voorstelling van die kataboliese weg vir valien

Die derde reaksie in die kataboliese weg vir leusien is analoog aan die derde reaksie in die valien kataboliese weg. In die geval van die leusien kataboliese weg word β -metielkrotoniel-KoA egter in die stap gevorm. Die reaksie word gekataliseer deur die ensiem isovaleriel-KoA dehidrogenase. β -Mietielkrotoniel-KoA word dan gekarboksileer om β -metielglutakoniel-KoA te vorm. Die volgende stap in die katabolisme van leusien is die hidrering van β -metielglutakoniel-KoA om β -hidroksie- β -metielglutariel-KoA (HMG-KoA) te vorm. Die finale stap is die omskakeling van β -hidroksi- β -metielglutariel-KoA na asetoasynsuur en asetiel-KoA.

Die katabolisme van leusien word in Diagram 2-2 skematies weergegee (Horton *et al.*, 1993:18-40 - 18-41; Chuang & Shih, 1995:1241).

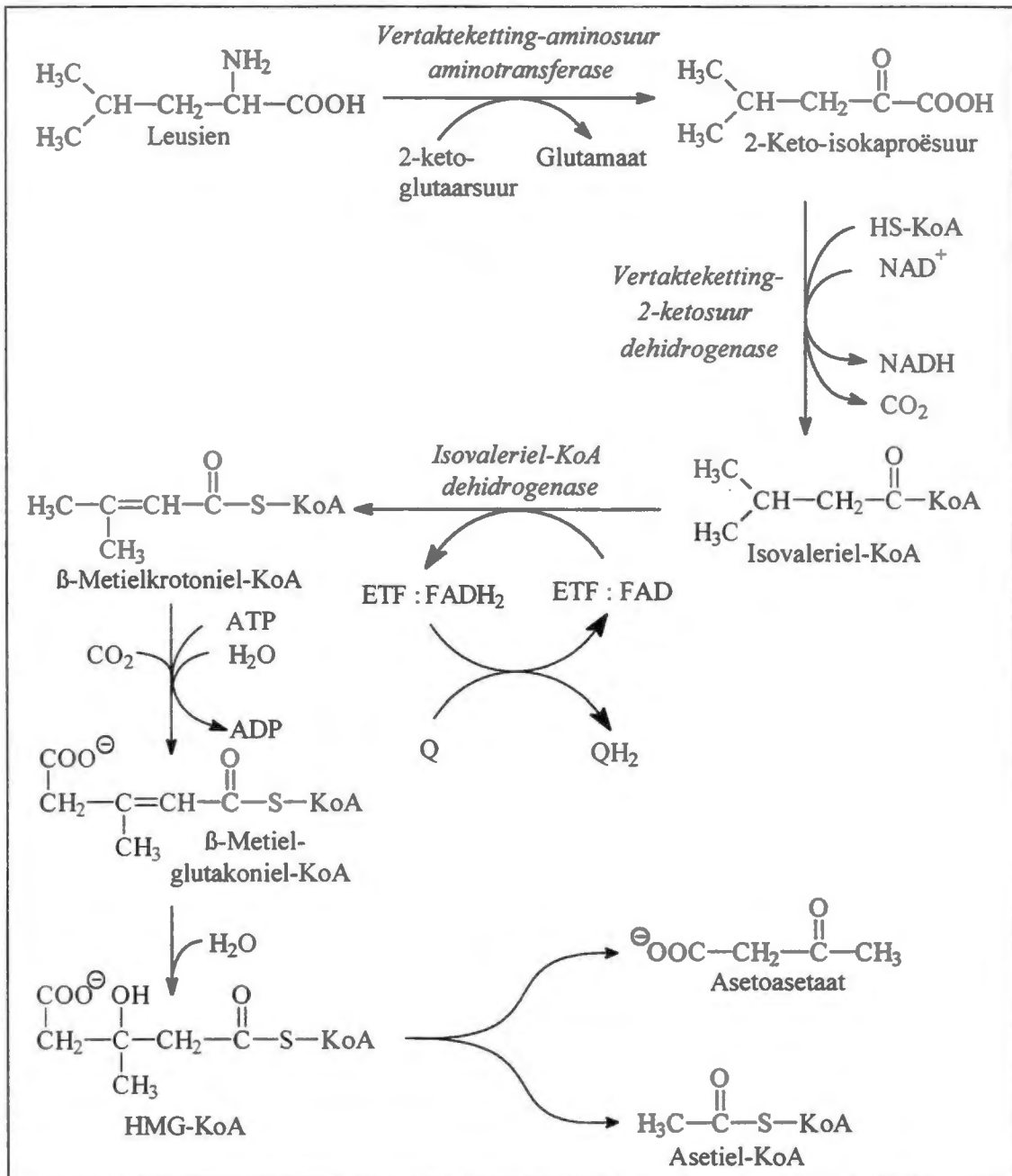


Diagram 2-2 Skematiese voorstelling van die leusien kataboliese weg

Soos reeds beskryf, is die eerste stap in die katabolisme van isoleusien die deaminasie van isoleusien na 2-keto-3-metielvaleriaansuur deur die ensiem vertakteketting-aminosuur aminotransferase. Die tweede reaksie is die dekarboksilering van die 2-ketosuur om 2-metielbutiriel-KoA te vorm. 2-Metielbutiriel-KoA word gekataboliseer

na tigiel-KoA, wat op sy beurt omgeskakel word na α -metiel- β -hidroksibutiriel-KoA deur die toevoeging van water. Tydens die volgende stap word die α -metiel- β -hidroksibutiriel-KoA verder geoksideer na α -metielasetoasetiel-KoA. 'n KoA-SH is nodig vir die laaste stap wanneer asetiel-KoA en propioniel-KoA gevorm word vanuit α -metielasetoasetiel-KoA (Horton *et al.*, 1993:18-40 - 18-41; Chuang & Shih, 1995:1241). Die volledige kataboliese weg word skematies in Diagram 2-3 weergegee.

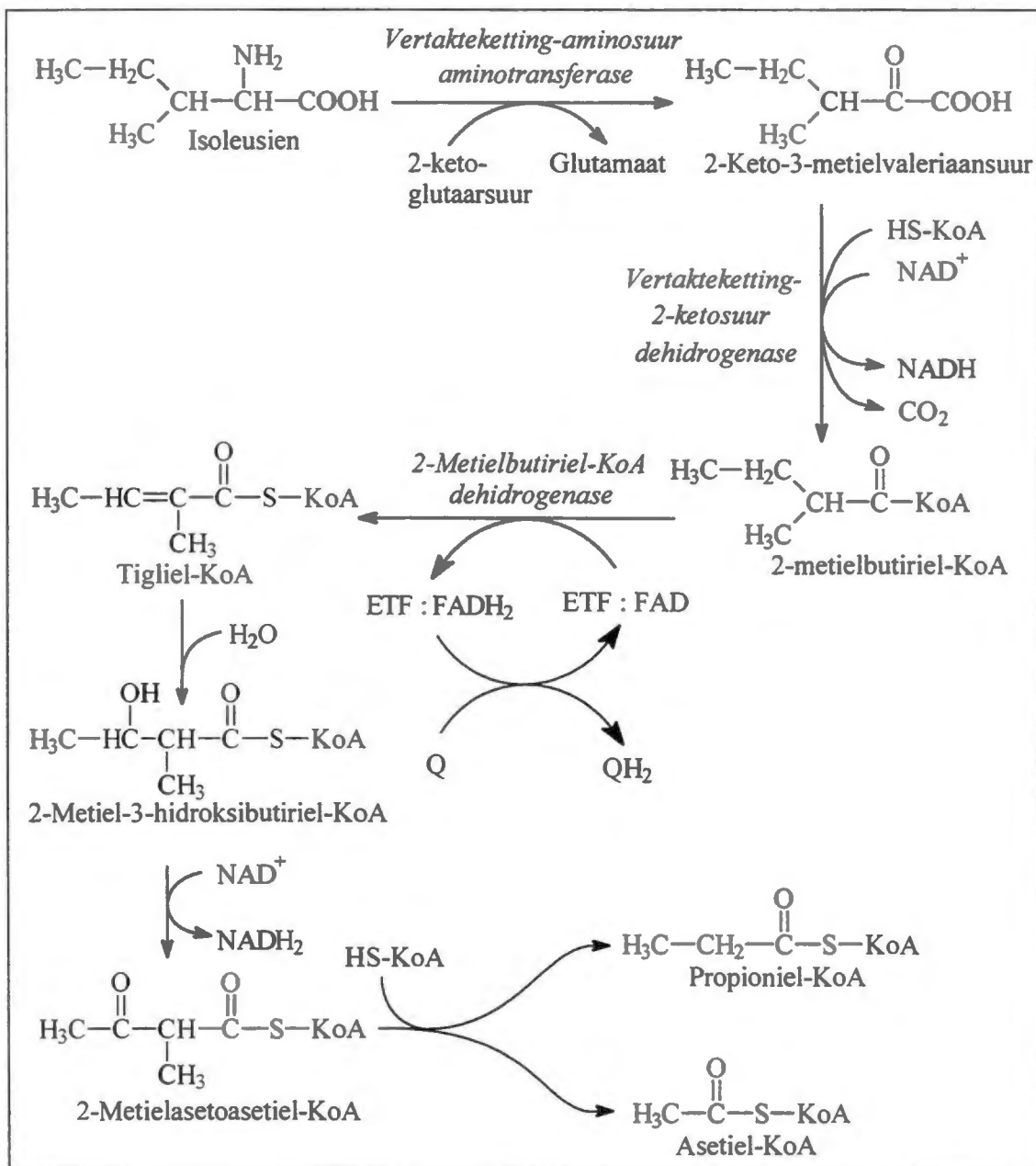


Diagram 2-3 Skematiese voorstelling van die isoleusien kataboliese weg

2.3.3. Die vertakteketting-aminotransferase

Die vertakteketting-aminotransferase (E.C. 2.6.1.42) is die eerste keer in 1966 beskryf (Ichihara, 1985:430; Taylor & Jenkins, 1966:4396 - 4405). In hierdie studies is aangetoon dat 'n enkele ensiem die transaminase van al drie die vertakteketting-aminosure kataliseer. Die ensiem was ook hoogs spesifiek vir sy substrate valien, leusien en isoleusien. Die ensiem is uit varkhartweefsel geïsoleer en die sitoplasmiese ensiem het α -ketoglutaarsuur as aminoreseptor gebruik wat nie deur piroviensuur of oksaloasetaat vervang kan word nie (Taylor & Jenkins, 1966:4396 - 4405). Die reaksie is egter omkeerbaar en enige van die drie vertakteketting-aminosure sowel as glutamaat kan as donor van 'n amiengroep optree. Die ensiem kom wydverspreid voor in die meeste weefsel, waarvan die hoogste aktiwiteit in die niere, hart, diafragma en spierweefsel is.

'n Belangrike aspek van die aminotransferase is die voorkoms van drie isovorme van die ensiem in beide die sitosol sowel as die mitochondria (Ichihara, 1985: 434). Isovorm I kom in meeste weefsel en organe voor en kom ook net in die sitosol voor. Isovorm II maak gebruik van leusien en metionien as substrate en kom in lae hoeveelhede net in die mitochondria van lewerweefsel voor. Hierdie isovorm kom egter nie in menslike weefsel voor nie. Isovorm III word meestal in brein- en plasentaweefsel aangetref, maar die subsellulêre verspreiding van die ensiem is nie duidelik nie (Danner & Elsas, 1989:671 - 692). Hierdie isovorm (Isovorm III) kan volgens die outeurs moontlik die fetale weergawe van die ensiem wees (Kadowaki & Knox, 1982:777 - 783).

2.3.4. Die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks

Menkes *et al.*, (1954:462 - 467) het reeds in 1954 bespiegel oor die moonlike komplekse aard van die ensieme wat die dekarboksilering van die vertakteketting-aminosure kataliseer. In die daaropvolgende tydperk na die diagnose van die eerste MSUD-pasiënt het die bespiegeling oor die moontlikheid van 'n enkele kompleks wat die reaksie van al drie die 2-ketosure kataliseer, verder uitgebrei. Die teorie is in 1970

deur Wohlhueter en Harper gestaaft (1970:2391 - 2401). Die ensiem kon egter eers in 1978 (Pettit *et al.*, 1978:4881 - 4885) uit mitochondria in nierweefsel gesuiwer word. Daar kon aangetoon word dat die kompleks 2-keto-isovaleriaansuur, 2-keto-isokaproësuur en 2-keto-3-metielvaleriaansuur as substraat kan gebruik. Pettit *et al.*, (1978:4881 - 4885) het ook aangetoon dat die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks soortgelyk is aan die pirovaat dehidrogenase en α -ketogluteraat dehidrogenase-komplekse.

Die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks bestaan uit drie katalitiese eenhede, naamlik E_1 (vertakteketting-2-ketosuurdekarboksilase), E_2 (dihidrolipoël transasilase) en E_3 (dihidrolipoël dehidrogenase) (Chuang & Shih, 1995:1243). Die E_1 -eenheid kataliseer die dekarboksilering van die 2-ketosuur. Tiamienpirofosfaat (funksionele vorm van vitamien B_1) is 'n ko-faktor vir die reaksie. Die E_2 -eenheid kataliseer die binding van die asielgroep aan 'n ko-ensiem-A om die asiel-KoA te vorm en die E_3 -eenheid heroksideer die lipoëleenheid van E_2 met NAD^+ as die finale elektronontvanger (Chuang & Shih, 1995:1243). Die netto reaksie het dus 'n vertakteketting-asiel-KoA, CO_2 en $NADH$ tot gevolg. Die reaksies van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks word skematies in Diagram 2-4 weergegee.

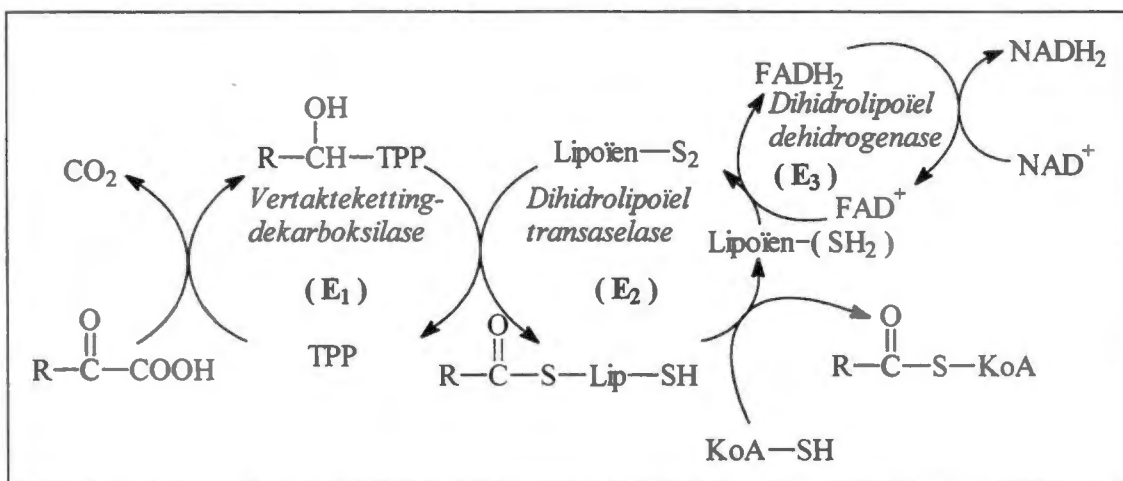


Diagram 2-4 Skematiese voorstelling van die werking van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks

Van die eenhede bestaan egter ook uit subeenhede. Die E_1 -eenheid bestaan byvoorbeeld uit 'n α - en 'n β -eenheid, terwyl die E_2 - en E_3 -eenhede elk slegs een subeenheid het. Die E_2 -eenheid maak die kern van die kompleks uit waarom die E_1 - en E_3 -subeenhede versprei is. In vertakketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks van soogdiere kom 24 E_2 -eenhede in die sentrale kern voor, gerangskik in 'n oktahedriese struktuur. Aan hierdie kern word dan die E_1 - en E_3 -eenhede gebind (Yeaman, 1989:625 - 632). Die kompleks maak ook gebruik van drie ko-faktore, naamlik tiamienpirofosfaat, lipoïensuur en FAD^+ (Chuang & Shih, 1995:1245).

Die voorkoms van tiamienpirofosfaatafhanklike ensieme is reeds in 1911 bepaal en sedertdien is verskeie ander tiamienpirofosfaatafhanklike ensieme beskryf. Daaronder is die vertakketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks, pirovaat dehidrogenase-kompleks, 2-ketoglutaat dehidrogenase-kompleks (Morey & Juni, 1970:238 - 240) en transketolase-ensiem (Brin, 1970:125). Die basiese reaksie van hierdie tiamienpirofosfaatafhanklike ensieme is die splyting van koolstof-koolstofbindings met 'n basiese struktuur van $R_1-CO-CO-R_2$ en/of $R_3-CO-CH(OH)-R_4$ (Morey & Juni, 1970:238 - 240). In die geval van die vertakketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks beteken dit dat daar 'n verlies van CO_2 is. Hierdie tiamienpirofosfaat-ko-faktor is dissosieerbaar van die E_1 -eenheid van die kompleks, wat die reaksie tussen die E_2 -eenheid en die gesubstitueerde tiamienpirofosfaatkongugaat moontlik maak (Morey & Juni, 1970: 238 - 240). 'n Skematiese voorstelling van die vorming van hierdie intermediêre word in Diagram 2-5 weergegee.

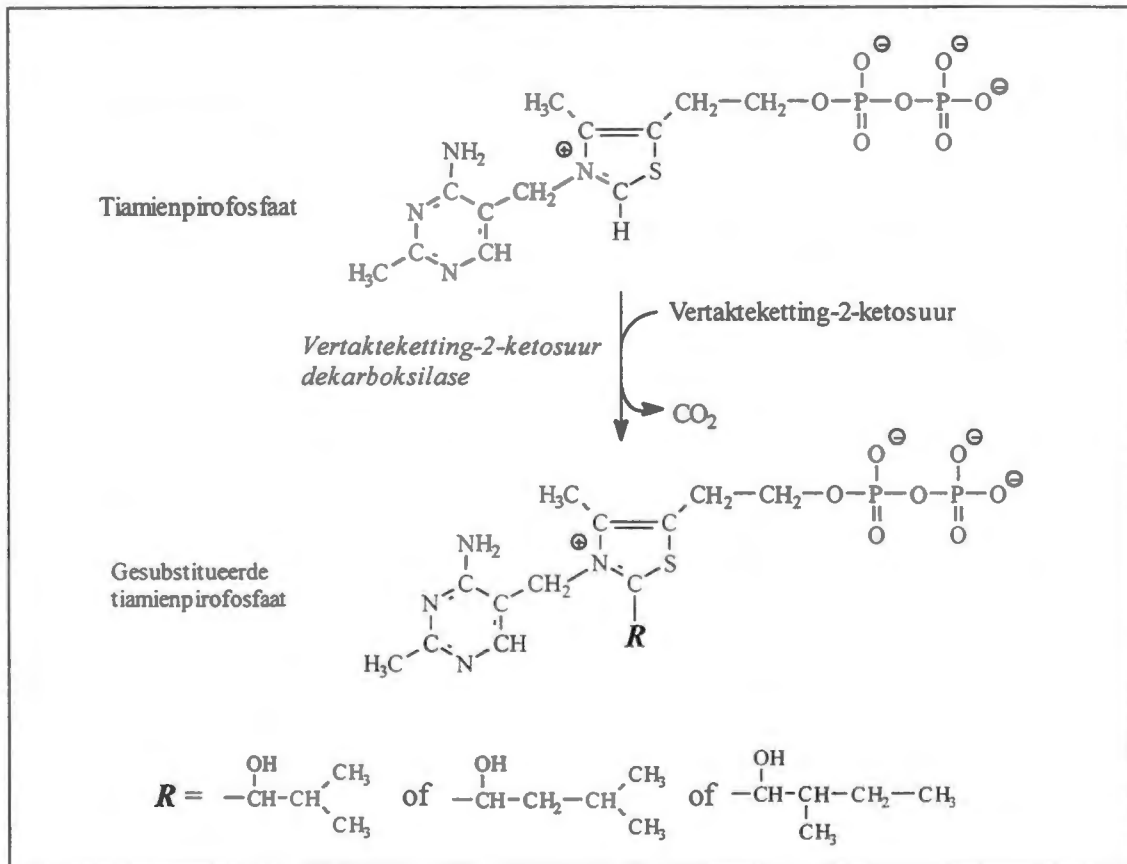


Diagram 2-5 Skematiese voorstelling van die vorming van die gesubstitueerde tiamienpirofosfaat-derivaat verbinding tydens die eerste stap in die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks

2.4. Maple Syrup-uriendefek (MSUD)

2.4.1. Inleiding

Hoewel daar reeds vroeg na die identifisering van MSUD bewys is dat dié siekte deur 'n defek van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenasekompleks veroorsaak word, is die defek eers in die laat tagtigerjare op 'n molekulêre vlak opgeklaar toe cDNA vir die E_{1α}-, E_{1β}- en E₂-eenhede gekloneer is (Crabb *et al.*, 1989:40 - 41; Fekete *et al.*, 1989:236 - 237; Mitsubuchi *et al.*, 1991:14686 - 14690). Defekte wat geïdentifiseer is, kom onder meer op E_{1α}-, E_{1β}- en E₂-eenhede voor.

2.4.2. Kliniese fenotipes

Vyf kliniese fenotipes kom by MSUD voor. Die mees algemene en ook die ernstigste van die fenotipes is klassieke MSUD. MSUD word as klassiek beskou indien die simptome reeds in die neonatale tyd begin. Die vlakke van die vertakteketting-aminosure (veral leusien) is erg verhoog, in die bloed, serebrospinale vog en urine. *Allo*-isoleusien kom ook by hierdie fenotipe voor en is diagnosties vir MSUD. Die aktiwiteit van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks is laer as 2% in vergelyking met normale aktiwiteit in fibroblaste. Geaffekteerde babas vertoon gewoonlik geen simptome by geboorte nie en die simptome begin gewoonlik tussen die eerste 4 tot 7 dae. Ongewilligheid om te drink is gewoonlik die eerste simptome, gevolg deur gewigsverlies en progressiewe neurologiese afwykings. Die reuk van esdoringstroop (maple stroop) is in hierdie stadium waarneembaar (Treacy *et al.*, 1992:121 - 135). Die prognose vir 'n onbehandelde pasiënt is swak en die pasiënte sterf dan ook gewoonlik binne die eerste paar maande. Indien die pasiënte oorleef, ly hulle aan erge neurologiese skade, spastisiteit of hipotonia. Selfs met behandeling, wat die pasiënte se kans op oorlewing baie vergroot, kan daar komplikasies wees (Chuang & Shih, 1995: 1252). Daar is gevalle in die literatuur beskryf waar pasiënte onder behandeling gesterf het as gevolg van onbeheerbare breinedema (Treacy *et al.*, 1992:121 - 135; Riviello *et al.*, 1991:42 - 45).

'n Tweede kliniese fenotipe is die matige MSUD. Hierdie fenotipe word gekenmerk deur die deurentydse verhoogde vertakteketting-aminosure en vertakteketting-2-ketosure met geen of min ernstige kliniese periodes tydens die neonatale tydperk. Ander simptome sluit in vertraagde verstandelike ontwikkeling, hiperurisemia en matige asidosis. In teenstelling met die klassieke fenotipe het hierdie pasiënte gewoonlik nie voedings- of groeiprobleme nie (Weiss *et al.*, 1975:93A). Ensiemaktiwiteit in hierdie fenotipe is ook gewoonlik hoër as by klassieke MSUD en wissel tussen 3 tot 30% aktiwiteit in vergelyking met normale aktiwiteit (Fischer & Gerritson, 1971:795 - 801). Daar is tans sowat twintig gevalle van matige MSUD bekend (Chuang & Shih, 1995:1252; Weiss *et al.*, 1975:93A).

Afwisselende of onderbroke MSUD is 'n derde kliniese fenotipe. Hierdie pasiënte is gewoonlik asimptomaties met die konsentrasies van vertakteketting-aminosure en vertakteketting-2-ketosure binne die normaalgrense. Groei en verstandelike ontwikkeling in hierdie pasiënte is normaal. Daar kan egter akute fases voorkom en daar is gevalle gepubliseer waar pasiënte gesterf het tydens sulke fases (Dancis *et al.*, 1967:84 - 89; Zipf *et al.*, 1979:286 - 294). Die akute fases kom gewoonlik tydens infeksies voor. Die aktiwiteit van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks is ongeveer 5 - 20% van normale aktiwiteit (Chuang & Shih, 1995:1252).

Die eerste MSUD-pasiënt wat op tiamienbehandeling reageer is in 1971 deur Scriver *et al.*, (1971:310 - 312) bespreek. Hierdie is dan ook die eerste aanduiding van die vierde kliniese fenotipe vir MSUD. Hierdie pasiënte het soortgelyke simptome as die matige MSUD-variasie. Tot nou is daar ongeveer nege pasiënte met hierdie fenotipe beskryf (Fernhoff *et al.*, 1985:1011 - 1016; Duran & Wadman, 1985:70 - 75). Al die pasiënte het verbetering getoon op tiamienbehandeling, hoewel die behandeling baie van pasiënt tot pasiënt wissel. Hoewel die defek met tiamien behandel kan word, is al die pasiënte met beide tiamien en 'n dieet program behandel (Scriver *et al.*, 1971:310 - 312; Scriver *et al.*, 1985:763 - 765). Uit die literatuur is dit ook duidelik dat al die tiamien-responsiewe MSUD-pasiënte 'n defek op die E₂-eenheid het (Chuang & Shih, 1995:1254). Die bevinding dat die tiamien-responsiewe MSUD-pasiënte 'n defek van die E₂-eenheid het, veroorsaak egter groot onduidelikheid ten opsigte van die presiese meganisme wat betrokke is by die fenotipe, soos duidelik is uit die aanhaling.

"...The finding that the E₂ subunit is deficient in WG-34's cells is unexpected, since the E_{1α} subunit contains the TPP-binding site. The type II deficiency in WG-34 fibroblasts was confirmed by the identification of a putative frameshift mutation and the F215C substitution in this subunit. The functional significance of the F215C mutation was studied by transfection into E₂-deficient host lymphoblasts (GM1366) with a vector carrying this mutation. The expression of F215C cDNA restored the decarboxylation of BCKA to 30 to 40 percent of normal. Transfection of normal cDNA into GM1366 lymphoblasts resulted in complete correction of the mutant phenotype. The partial restoration of enzyme activity by mutant E₂ subunit carrying

the F215C substitution, is consistent with the level of residual BCKAD complex in WG-34 cells. The question arises as to how the mutation at the E₂ locus confers a requirement for high levels of thiamine supplementation. It has been proposed that the F215C mutation in E₂ impairs the interactions between E₁ and E₂ that are required for efficient binding of TPP. In this context, it was shown in vitro with the chicken glycine cleavage system that the addition of lipoate-bearing H protein caused a conformational change in the B₆-containing P protein, and increased the affinity of the latter for glycine. Further evidence for the involvement of the E₂ subunit in thiamine-responsiveness is provided by a report in which an E₂-deficient patient also responded to pharmacologic amounts of thiamine. The exact mechanism for thiamine-mediated response in MSUD patient remains to be established....”(Chuang & Shih, 1995:1257).

Dihidrolipoïel-dehidrogenase (E₃) -defekte MSUD is die vyfde fenotipe wat beskryf is. Hierdie variasie kom egter nie baie voor nie en slegs ongeveer ses pasiënte met hierdie vorm van MSUD is al beskryf (Matalon *et al.*, 1984:65 - 69; Robinson *et al.*, 1981:35 - 39; Munnich *et al.*, 1982:167 - 171). Die kliniese beeld is soortgelyk aan die matige MSUD-fenotipe. Hierdie pasiënte het egter ook ernstige laktaatasidose. By hierdie pasiënte is melksuur, piroviensuur, 2-ketoglutaarsuur, 2-hidroksi-isovaleriaansuur en 2-hidroksi-glutaarsuur verhoog. Die vertakketting-aminosure is matig tot redelik verhoog in vergelyking met die klassieke fenotipe. Hierdie pasiënte is gewoonlik asimptomaties in die vroeë stadium van hul lewens maar ontwikkel aanhoudende laktaatasidose tussen die tydperk agt weke tot ses maande. Hierna volg neurologiese agteruitgang, insluitende hipotonia, groeivertraging en motoriese afwykings. Miëlienverlies kom ook algemeen voor. Behandeling met tiamien, biotien, lipoïensuur en dieetbeperkings was meestal onsuksesvol (Chuang & Shih, 1995:1253).

2.4.3. Diagnose van MSUD

Die identifisering van MSUD behels die kwantifisering van die vertakteketting-aminosure en vertakteketting-2-ketosure en hul 2-hidroksi-analoë in bloed. Leusienkonsentrasies in bloed hoër as 305 μM in die eerste 24 uur na geboorte word as abnormaal beskou (Chuang & Shih, 1995:1258) en die voorkoms van *allo*-isoleusien is diagnosties van MSUD. Gewoonlik word egter slegs die klassieke, matige en E_3 -defekte fenotipes van MSUD met die sifting opgespoor. Dit sal egter moeilik wees om die afwisselende of onderbroke fenotipe op te spoor, aangesien die vertakteketting-aminosuurkonsentrasies binne normaalgrense val wanneer die pasiënte asimptomaties is. Geen tiamienafhanklike MSUD is nog opgespoor met 'n roetine siftingsprogram nie (Chuang & Shih, 1995:1258).

Verskeie tegnieke kan gebruik word vir die diagnose van MSUD indien daar tydens die sifting abnormaliteite opgespoor is (en MSUD vermoed word). Dit sluit in aminosuur- en organiesesuurbevestigings met behulp van hoë-druk-vloeistofchromatografie (HPLC), vloeistofchromatografie-massaspektrometrie-massaspektrometrie (LC-MS-MS) en gaschromatografie-massaspektrometrie (GC-MS). Die α -gehidroksileerde analoog van 2-keto-isovaleriaansuur is ook diagnosties vir MSUD, hoewel die α -hidroksie-analoë van al die vertakteketting-2-ketosure egter by MSUD-pasiënte kan voorkom (Shigematsu *et al.*, 1983:183 - 189; Lancaster *et al.*, 1974:257 - 265; Snyderman *et al.*, 1984:851 - 853). Tabel 2-1 gee 'n aanduiding van die normaalkonsentrasies van die vertakteketting-aminosure, -2-ketosure en -2-hidroksisure in serum.

Die finale diagnose moet egter met ensiemstudies bevestig word. Dit kan gedoen word deur ensiem studies in limfosiete en fibroblaste (Chuang & Shih, 1995:1259). Die gebruik van leukosiete en *post mortem* materiaal word nie aanbeveel nie, aangesien die selle 'n groot variasie vertoon, met die gevolg dat die dekarboksilerings tempo van die vertakteketting-2-ketosuur dekarboksilase-kompleks nie akkuraat bepaal kan word nie (Dancis *et al.*, 1963:234 - 238). Die kompleks is ook nie baie stabiel nie en daarom word die gebruik van *post mortem*-materiaal nie

aanbeveel nie (Dancis *et al.*, 1960:72 - 79). Voorgeboortelike diagnoses kan met gekweekte amnionsiete gemaak word (Kleijer *et al.*, 1985:1608).

Tabel 2-1 Normale serumwaardes van die vertakteketting-aminosure, vertakteketting-2-ketosure en hul ooreenstemmende 2-hidroksisure (Wendel *et al.*, 1980:57 - 63; Shigematsu *et al.*, 1983:183 - 189; Lancaster *et al.*, 1974:257 - 265; Snyderman *et al.*, 1984:851 - 853)

Metaboliet	Konsentrasie ($\mu\text{M/L}$)
Leusien	1 - 77
Isoleusien	0,5 - 39
Valien	1,7 - 161
2-Keto-isovaleriaansuur	3 - 11,0
2-Keto-isokaproësuur	6 - 64,7
2-Keto-3-metielvaleriaansuur	8 - 31,3
2-Hidroksi-isovaleriaansuur	13,7
2-Hidroksi-isokaproësuur	< 0,7
2-Hidroksi-3-metielvaleriaansuur	< 0,7

2.4.4. Vorming van *allo*-isoleusien

Daar is reeds verwys na die voorkoms van *allo*-isoleusien en dat die metaboliet diagnosties vir MSUD is. Die vorming van hierdie metaboliet is egter ietwat meer kompleks en daar is aanvanklik gemeen dat die *allo*-isoleusienpiek wel die piek van metionien is (Dancis *et al.*, 1959:91 - 93). In 1962 toon Norton *et al.*, (1962:26 -27) egter aan dat die metaboliet wat vroër as metionien beskryf is, inderdaad *allo*-isoleusien is. In 1980 word 'n moontlike verklaring vir die vorming van hierdie metaboliet deur Matthews *et al.*, (1980:854 - 857) gegee. Dié outeurs het voorgestel dat die *allo*-isoleusien deur spontane keto-enoltautomerisasie van 2-keto-3-metielvaleriaansuur afkomstig vanaf isoleusien gevorm word. Omdat die eerste reaksie (deaminering) omkeerbaar is, is dit dus moontlik dat *allo*-isoleusien weer gevorm kan word nadat die tautomerisasie van die 2-ketosuur plaasgevind het.

Wendel *et al.*, (1989:11 - 14) en Schadewaldt *et al.*, (1990:137 - 150) steun ook hierdie meganisme. Mamer en Reimer (1992:22141 - 22147) stel egter voor dat die spontane keto-enoltautomerisasie van 2-keto-3-metielvaleriaansuur nie vinnig genoeg *in vivo* (en selfs *in vitro* onder ekstreme pH) kan plaasvind om die vlakke van *allo*-isoleusien te verklaar nie en stel voor dat die tautomerisasie plaasvind tydens die deaminering van isoleusien. *Allo*-isoleusien is dus volgens Mamer en Reimer (1992:22141 - 22147) 'n normale produk van die deaminasiereaksie en kom by beide normale en MSUD-pasiënte voor. By normale persone is die konsentrasie van *allo*-isoleusien egter te laag om waar te neem.

2.4.5. Behandeling van MSUD

Die enigste behandeling vir MSUD is tans 'n langtermyn dieetprogram wat verseker dat die vertakteketting-aminosuurinname beperk word. Die dieet kan ook tiamien insluit. In 1964 het Snyderman *et al.*, (1964:454 - 472) 'n sintetiese formule voorgestel wat tans gebruik word in die voorbereiding van 'n dieetprogram. Die totale weglating van die vertakteketting-aminosure moet egter vermy word. Elke pasiënt se dieet moet dus individueel uitgewerk word. 'n Verlaging van die seleniuminname kan byvoorbeeld 'n invloed hê op die glutatioonmetabolisme, terwyl 'n verandering in die leusien- tot isoleusien-verhouding in die plasma tot dermatologiese probleme kan lei. 'n Ander probleem wat kan ontwikkel, is megaloblastiese anemie as gevolg van 'n verlaagde foliensuurinname (Chuang & Shih, 1995:1262).

Tydens akute fases word 'n meer drastiese behandeling egter benodig. Die verwydering van toksiese metaboliëte is egter nie die enigste behandeling wat moet plaasvind nie en dit is belangrik dat die anabolisme ook gestimuleer word. Tans bestaan daar effektiewe dialisebehandelings vir hierdie akute fases om die verhoogde metaboliëte te verwyder (Gortner *et al.*, 1989: 706 - 711). Die anaboliese fase in MSUD-pasiënte kan gestimuleer word deur die gebruik van insulien en groeihormoon (Wendel *et al.*, 1982: 172 - 175). 'n Meer drastiese behandeling van MSUD is 'n

leweroorplanting. Daar is reeds gevalle gepubliseer waar hierdié vorm van behandeling suksesvol uitgevoer was (Chuang & Shih, 1995:1263).

2.5. Doelstelling

Uit die literatuur is dit duidelik dat MSUD 'n ernstige metaboliese afwyking is. Selfs al is 'n pasiënt vroeg gediagnoseer en die behandeling noukeurig uitgevoer, verseker dit geensins 'n goeie prognose nie. Dit wil voorkom of een akute fase vir 'n MSUD-pasiënt fataal kan wees. Soos met baie ander metaboliese defekte, word slegs die simptome behandel, soms sonder dat die volle metabolisme wat by so 'n defek betrokke is, bekend is, soos die geval by MSUD. Dit is tans egter nog nie moontlik nie. Die bepaling van die volledige metabolisme in sulke pasiënte is dus van groot belang en kan lei tot beter behandeling met behulp van die verbeterde kennis van die metabolisme. Dit is egter nie net van belang vir die MSUD-pasiënte nie. Die studie van hierdie abnormale metabolisme lei ook daartoe dat die kennis oor die normale metabolisme uitbrei.

Dit is dan ook die doelstelling van hierdie studie om meer lig te werp op die metabolisme deur spesifiek geïnduseerde metaboliete wat as gevolg van die defek gevorm word, te identifiseer. Indien die vertakteketting-aminosuurmetabolisme beter verstaan kan word, kan dit moontlik daartoe lei dat die oorsprong van alle of sommige van die ernstige kliniese simptome by MSUD-pasiënte meer effektief behandel kan word. Die uiteindelijke doel is dus om MSUD-pasiënte en moontlik ook ander pasiënte met ander metaboliese afwykings so 'n normaal moontlik lewe te kan bied.

Hoofstuk 3

Materiaal, instrumentasie en metodes

3.1. Inleiding

Sedert die begin van die siftingsprogram vir aangebore metaboliese afwykings in 1983 by die Departement Biochemie van die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys, is verskeie metaboliese afwykings reeds gediagnoseer. Een van hierdie afwykings kom voor as gevolg van die defek van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks en staan, soos reeds genoem, bekend as Maple Syrup-uriendefek (MSUD). Die ernstige aard van die siekte asook die gebrek aan 'n ten volle suksesvolle behandeling noodsaak dat meer kennis oor hierdie afwyking ingewin moet word. Om egter 'n beter behandeling daar te stel, is dit noodsaaklik dat die biochemiese-kliniese beeld uitgeklaar word. Soos reeds uiteengesit, word daar met hierdie studie gepoog om 'n beter begrip te verkry van die biochemiese-kliniese korrelasie deur die geïnduseerde metaboliete te identifiseer. Identifisering van die geïnduseerde metaboliete is egter nie voldoende nie, en daar sal dus verder gepoog word om ook die oorsprong van hierdie geïnduseerde metaboliete, soos uitgeskei in die urine van MSUD-pasiënte, te bewys of te verklaar. Verder word daar ook gepoog om die faktore wat die uitskeiding en/of vorming van hierdie metaboliete beïnvloed, te bepaal.

In hierdie hoofstuk word die algemene metodes asook instrumentasie en materiaal bespreek wat gebruik is gedurende die verloop van hierdie studie. Die hoofstuk word verder ingedeel in drie afdelings, naamlik:

- i) Materiaal, waar die pasiënt besprekings, kliniese sowel as biochemiese beeld uiteengesit word;

- ii) instrumentasie, waar die instrumentasie wat tydens die studie gebruik is, beskryf word; en
- iii) metodes, waar die algemene metodes wat in die studie gebruik is, bespreek word.

Laasgenoemde sal net handel oor die metodes wat roetinematig gebruik is, terwyl spesifieke metodes in latere hoofstukke bespreek sal word.

3.2. Materiaal

3.2.1. Pasiënt MM

Pasiënt MM was die eersgeborene van nie-verwante Xhosa ouers op 34 weke van swangerskap. Op die ouderdom van een maand het neurologiese abnormaliteite begin intree. Dié abnormaliteite het gepaard gegaan met 'n vinnige groei van die skedel en splyting van die skedelnaat. Tydens hierdie stadium het die spiertonus verhoog en is 'n abnormale liggaamsreuk waargeneem. As gevolg van swak voeding moes die pasiënt met behulp van 'n buis gevoed word. Gedurende die daaropvolgende maand het die spastisiteit van die ledemate vererger. Die pasiënt het ook in hierdie stadium swak liggaams- en nekbeheer getoon en het swak op klank en visuele stimulering gereageer. Die pasiënt is met behulp van urinêre analyses met MSUD gediagnoseer en 'n behandeling bestaande uit 'n MSUD-melkformule, tiamien en L-karnitien is begin. Kort na behandeling het die kliniese beeld van die pasiënt verbeter maar was dit volgens die pediater duidelik dat neurologiese skade reeds plaasgevind het. Die pasiënt is na die kliniese verbetering uit die hospitaal ontslaan. Die behandeling is egter kort na ontslag gestaak, met die gevolg dat die pasiënt kort daarna oorlede is. Die urinêre vertaktekettering-aminosuur-, -2-ketosuur- en -2-hidroksisuurkonsentrasies is kwantitatief oor 'n tydperk van vier maande bepaal. As gevolg van geloofsoortuiging kon bloed nie verkry word nie. Die eerste twee urienmonsters is verkry voor enige behandeling begin is, terwyl die laaste drie monsters geneem is terwyl die pasiënt onder behandeling was. Die aminosure van die eerste urienmonster

is kwantitatief bepaal met behulp van HPLC. Die kwantitatiewe waardes van die urinêre aminosure en organiese sure word in Tabel 3-1 en Tabel 3-2 weergegee. Omrede die aminosuuranalises van monsters 2 tot 5 met behulp van 'n LC-ES-MS-MS bepaal is, word by hierdie monsters slegs 'n gekombineerde kwantitatiewe waarde vir leusien en isoleusien gegee.

Tabel 3-1 Urinêre vertakteketting-aminosuurkonsentrasies soos bepaal in die urine van pasiënt MM. Monsters 2 - 5 is bepaal met 'n tandem massaspektrometer

Metaboliëte	Pasiënt MM (mmol/mol kreat.)					Normaal
	Monster 1	Monster 2	Monster 3	Monster 4	Monster 5	
Leusien	2323					
Isoleusien	633	386	370	449	138	4 - 160
Valien	1350	313	367	584	138	6 - 19

Tabel 3-2 Konsentrasies van die vertakteketting-2-ketosure en -2-hidroksisure in die urine van pasiënt MM soos bepaal in opeenvolgende urienmonsters oor 'n tydperk van vier maande

Metaboliëte	Pasiënt MM (mmol/mol kreat.)				
	Monster 1	Monster 2	Monster 3	Monster 4	Monster 5
2-KIV	spoor	22,6	spoor	14,9	9,5
2-KMV	spoor	47,2	33,4	spoor	12,5
2-KIC	spoor	310,0	702,0	46,3	108,4
2-HIV	467,4	2927,3	1574,0	624,5	473,2
2-HMV	146,8	223,4	162,4	97,7	80,2
2-HIC	36,1	1,0	35,1	22,5	28,0

2-KIV: 2-Keto-isovaleriaansuur; 2-KMV: 2-Keto-3-metielvaleriaansuur; 2-KIC: 2-Keto-isokaproësuur; 2-HIV: 2-Hidroksi-isovaleriaansuur; 2-HMV: 2-Hidroksi-3-metielvaleriaansuur; 2-HIC: 2-Hidroksi-isokaproësuur. Hierdie verbindings is afwesig in normaal uriene.

Ensiemanalises is op fibroblaste van pasiënt MM gedoen. Geen vertakteketting-2-ketosuur dekarboksilase-ensiemaktiwiteit kon gevind word nie. Die metodes en resultate van hierdie bepaling word in Hoofstuk 5, afdeling 5.2.1 volledig bespreek.

3.2.2. Pasiënte EM en BM

Pasiënt EM was die eerste kind van nie-verwante ouers van Xhosa-oorsprong. EM het met geboorte normaal voorgekom en is uit die hospitaal ontslaan. 'n Week na geboorte is EM in 'n akademiese hospitaal opgeneem. Simptome wat die pasiënt vertoon het, was braking en dehidrasie. 'n Abnormale reuk het die personeel van die hospitaal opgeval en die vermoede het ontstaan dat EM moontlik 'n MSUD-pasiënt kon wees. 'n Aminosuur- en organiese suuranalise is aangevra.

Pasiënt BM, die broer van EM, is ongeveer 'n jaar na BM gebore. Soortgelyke kliniese simptome is by pasiënt BM waargeneem as wat kort na geboorte by EM voorgekom het. 'n Metaboliese sifting is ook in hierdie geval aangevra.

Die resultate van die serum-aminosuuranalises van pasiënte EM en BM en die urinêre organiese suuranalises van EM en BM het wel Maple Syrup-uriendefek aangetoon. Die resultate van hierdie analises word in tabelle 3-3 en 3-4 weergegee.

Tabel 3-3 Serumkonsentrasies van die vertakteketting-aminosure by pasiënte EM en BM

Metaboliete	Pasiënte ($\mu\text{mol/ml}$)		Normaal (Riviello <i>et al.</i> , 1991: 42 - 45)
	EM	BM	
Leusien	4,1	3,5	0,078 - 0,142
Isoleusien	0,87	0,64	0,027 - 0,080
Valien	0,76	0,55	0,061 - 0,183

Tabel 3-4 Urinêre organiese sure in die urine van pasiënte EM en BM

Metaboliete	Pasiënte (mmol/mol kreat.)		Normaal
	EM	BM	
2-Keto-isovaleriaansuur	159	89	-
2-Keto-3-metielvaleriaansuur	892	359	-
2-Keto-isokaproësuur	1353	967	-
2-Hidroksi-isovaleriaansuur	1078	990	-
2-Hidroksi-3-metielvaleriaansuur	231	145	-
2-Hidroksi-isokaproësuur	123	60	-

Pasiënte EM en BM het nie op tiamienbehandeling gereageer nie. Hoewel hulle op 'n lae vertakteketting-aminosuurdieet geplaas is, het beide pasiënte ongeveer drie maande na geboorte gesterf.

3.2.3. Pasiënt OH

OH is die kind van onverwante ouers en het kort na geboorte simptome soos swak voeding en braking begin toon. Die pasiënt is gehospitaliseer vir verdere ondersoek. Tydens die ondersoek het dit aan die lig gekom dat die pasiënt 'n defek van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase ensiem het. Normale MSUD-behandeling is begin en het bestaan uit 'n lae vertakteketting-aminosuurdieet. Neurologiese agteruitgang het egter reeds plaasgevind met die diagnose en aanvang van behandeling van MSUD.

3.3. Instrumentasie

3.3.1. Kreatinienbepalings

Die kreatinienbepalings is geoutomatiseerd en is op 'n Technicon RA-100-instrument bepaal. Die beginsel van die chemiese bepaling waarop die instrument die kreatinienkonsentrasie bepaal, is die bekende pikriensuurmetode.

3.3.2. Gas-chromatografie

Vir die kwantifisering van organiese sure is van gas-chromatografie (GC) gebruik gemaak. 'n Gas-chromatograaf van Hewlett Packard (HP 5880A), toegerus met 'n SE 30 kapillêre kolom (Fused Silica Kapillarsäule permabond SE-30-DF-0, 25 (25 m x 0,32 mm) Macherey-Nagel), split/splitlose-inspuitstuk en vlamionisasiedetektor is gebruik. Stikstof is as draergas teen 1 ml/minuut deur die kolom gebruik. Die GC se oond is geprogrammeer om vir twee minute by 70°C te bly en dan te styg na 260°C teen 5°C/minuut. Die oond bly dan vir vyf minute by 260°C. Beide die inspuitstuk en detektor is konstant gehou by 280°C. Die gaschromatogram en die geïntegreerde oppervlakte van die pieke is met 'n Hewlett Packard integreerder verkry (HP 5880A terminal).

3.3.3. Gas-chromatografie-massaspektrometrie

Vir identifisering en in sommige gevalle kwantifisering, is egter van 'n gas-chromatograaf, toegerus met 'n massaspektrometer (GC-MS), gebruik gemaak. Die GC wat gebruik is, is 'n HP 5890 Series II gas-chromatograaf toegerus met 'n split/splitlose spuitstuk en 'n SE 30 kapillêre kolom (Fused Silica Kapillarsäule permabond SE-30-DF-0, 25 (25 m x 0,32 mm) Macherey-Nagel). Die aanvanklike temperatuur van die oond was 60°C vir twee minute, waarna die temperatuur verhoog is na 120°C teen 4°C/minuut. Dit het sewentien minute geneem. Die temperatuur is dan verhoog teen 10°C/minuut tot 300°C, waarna dit vir twaalf minute isotermies

geloop het. Die inspuitstuk is by 260°C gehou en as draergas is helium teen 1 ml/minuut gebruik.

Die massaspektrometer was ook van Hewlett Packard (HP 5988). Beide die GC en MS was onder beheer van 'n Hewlett Packard HP7673-rekenaar toegerus met 'n hardeskyf en skyfaandrywer (HP9000(300) en HP 9153C onderskeidelik). Die MS is in die elektronionisasietegniek gebruik teen 70 eV en die temperature vir die ioonbron en direkte GC-MS-koppeling was onderskeidelik 200°C en 260°C.

3.3.4. Kwantifisering van organiese sure

Beide die GC- en GC-MS tegnieke is gebruik vir die kwantifisering van die organiese sure. Die GC-tegniek is egter hoofsaaklik vir hierdie doel gebruik. Dit het soms voorgekom of ko-eluering tydens die GC-analises die kwantifisering van sommige verbindings bemoeilik of selfs ontmoontlik gemaak het. Om hierdie probleme te oorkom, is van GC-MS gebruik gemaak. Vir beide tegnieke is egter dieselfde benadering gevolg. In die geval van die GC-MS is die unieke ione van die verlangde verbinding asook die van die interne standaard (3-feniel-bottersuur) uitgesoek. Die intensiteit van die geselekteerde ioonchromatogram is dan vir die berekeninge geneem. Die GC-MS het egter 'n deteksielimiet van ongeveer 1 mmol/mol kreatinien, waaronder die kwantifisering nie meer moontlik was nie (Mienie, 1994:120 - 123). In gevalle waar die konsentrasies onder hierdie limiet van 1 mmol/mol kreatinien val, is daar na die konsentrasie verwys as spoorhoeveelhede. Omdat die konsentrasies van sommige van die metaboliete onder hierdie limiet geval het en daar by sommige metaboliete ko-eluering plaasvind, is daar van gefraksioneerde urienmonsters gebruik gemaak vir die identifikasie van hierdie metaboliete. Met hierdie fraksioneringstegniek is die kwantifisering van die metaboliete egter nie meer moontlik nie. Daar kan egter aanvaar word dat die konsentrasies van hierdie spesifieke metaboliete onder die limiet val en dus in spoorhoeveelhede voorkom.

Vir die bepaling van die responsfaktore is van die volgende vergelyking gebruik gemaak:

$$Rf = \frac{Area_{I.S.}}{Area_S} \times \frac{CC_S}{CC_{I.S.}}$$

Rf	=	Responsfaktorwaarde
$Area_{I.S.}$	=	Integrasiewaarde van die interne standaard
$Area_S$	=	Integrasiewaarde van standaard
CC_S	=	Konsentrasie van standaard
$CC_{I.S.}$	=	Konsentrasie van interne standaard

In die gevalle waar geen standaard beskikbaar was nie, is 'n responsfaktorwaarde van 1 aanvaar en word die konsentrasie van daardie metaboliet as 'n relatiewe konsentrasie aangedui.

3.3.5. Vloeistofchromatografie-massaspektrometrie

Massaspektroskopie (MS) is een van die beste tegnieke, tans beskikbaar vir die identifisering van metaboliete. Konvensionele massaspektroskopie vereis egter dat die molekules in die gasfase moet wees en maak gebruik van hoë temperature en 'n beperkte massagebied. As gevolg van hierdie beperkings is die gebruik van HPLC-skeiding en massaspektroskopie as 'n identifiseringsmetode nie moontlik nie. Hierdie probleem is oorkom met die bekendstelling van tegnieke soos elektrospoei-massaspektroskopie (ES-MS). Hierdie tegniek is dan ook reeds gebruik vir die bepaling van asiel-karnitien en aminosuur metaboliete (Millington *et al.*, 1990:321 - 324; Chace *et al.*, 1995:62 - 68).

Die elektrospoeibron is 'n oordragetegniek tussen 'n vloeistofinlaat, soos byvoorbeeld vanaf 'n HPLC, en die massaspektrometer. Hierdie tegniek is 'n sagte ionisasietegniek en maak die MS-analise van groot en klein nie-vlugtige verbindings moontlik. Tradisionele elektronimpak en chemiese ionisasie metodes kon in meeste gevalle nie genoeg inligting oor 'n molekule se molekulêre massa verskaf nie. Elektrospoei is egter 'n sagte ionisasie tegniek en vorm as gevolg hiervan sterk molekulêre ione wat wel inligting oor 'n molekule se molekulêre massa kan verskaf.

Hierdie tegniek het 'n verdere voordeel deurdat dit die massas van groter molekules ook kan gee omdat hierdie molekules meerdere ladings kan dra. Elektrosproei is ook baie meer sensitief in terme van molekulêre massabepalings, aangesien meeste molekules met hierdie tegniek geïoniseer word in vergelyking met die lae ionisasie van elektron impak (Dry, 1994:77 - 78).

Die elektrosproeibron is egter nie net verantwoordelik vir die ionisasie van molekules nie. Dit is ook verantwoordelik vir die vorming van 'n aerosol om sodoende die verwydering van die oormaat vloeistof te bewerkstellig. Die vorming van die aerosol, asook die ionisasie van die molekules, is die gevolg van 'n sterk elektriese veld terwyl die vloeistof verwyder word deur 'n inerte warm gas (stikstof). Hierdie proses vind plaas by atmosferiese druk. Na ionisasie vind 'n paar afpompstadiums plaas, waarna die ione die analiseerder binnedring. Die MS-metodologie is gebaseer op die mate van defleksie van 'n ioon in 'n magneetveld, terwyl die mate van defleksie afhanklik is van die lading, versnelling en massa van die ioon. In MS is die versnelling van al die molekules dieselfde en dus is die defleksie afhanklik van die massa en lading van die molekule (Freifelder, 1982:236).

Die massaspektrometer wat gebruik is tydens hierdie studie is die VG Quatro II triple kwadropool massaspektrometer gekoppel aan 'n Hewlett Packard HPLC (HP Series II 1090 liquid chromatograph). As loopmiddel is 'n 1-tot-1-verhouding van water (Merck Chemicals) en asetonitrile (BDH) gebruik. Geen kolom is gebruik nie, aangesien die monsters direk in die bron gespuit is. Die massaspektrometer het bestaan uit die elektrosproeibron en drie kwadropole. Die eerste kwadropool is slegs as 'n filter gebruik en is dus nie met 'n detektor toegerus nie. Die tweede en derde kwadropole is elk toegerus met 'n geseëde fosfor fotovermenigvuldiger. Die tweede en derde kwadropole is deur middel van 'n botsingsstel verbind. Hierdie botsingsstel is tydens die analyses met argon gas (Fedgas) gevul teen 'n druk van 1×10^{-3} mBar om fragmentasie te veroorsaak.

3.3.5.1. Kwantifisering van aminosure

Vir die kwantifisering van aminosure in die urine van pasiënte is die karboksielsuurbevattende verbindings eers gebutyleer. Dit is gedoen omdat die aminosuurderivate soortgelyk fragmenteer in die botsingsel onder vasgestelde toestande. Die toestande wat gebruik is tydens die kwantifisering van die aminosuurderivate sluit in 'n botsingsenergie van 12 V en 'n koniese lensspanning van 30 V vir die eerste funksie en 'n botsingsenergie van 25 V en 'n koniese lensspanning van 20 V vir die tweede funksie. Omrede die fragmentasie in die botsingsel onder hierdie toestande baie sag is, word slegs 'n paar fragmente gevorm.

Tydens die eerste funksie ontleed die eerste analiseerder oor 'n bepaalde massagebied. Die bepaalde massas word telkens toegelaat om na die botsingsel te beweeg waar die fragmentasie dan plaasvind. Die tweede analiseerder ontleed ook oor 'n vasgestelde massagebied. Meeste van die aminosure fragmenteer in die botsingsel onder bogenoemde toestande, sodanig dat 'n neutrale gedeelte van die molekule afsplyt. Die LC-ES-MS-MS is dan ook toegerus met sagteware wat hierdie verlies van 'n neutrale molekule kan bereken vanuit die data wat uit die twee analiseerders verkry is. Die beginsel is dus dat beide die analiseerders oor die gespesifiseerde massagebied analiseer en indien die massa wat in die eerste analiseerder verkry is 'n massa van 102 ame swaarder is as die massa wat in die tweede analiseerder waargeneem is, het die molekule 'n neutrale gedeelte van 102 ame verloor. Diagram 3-1 gee 'n skematiese voorstelling van die oorsprong van die neutrale gedeelte.

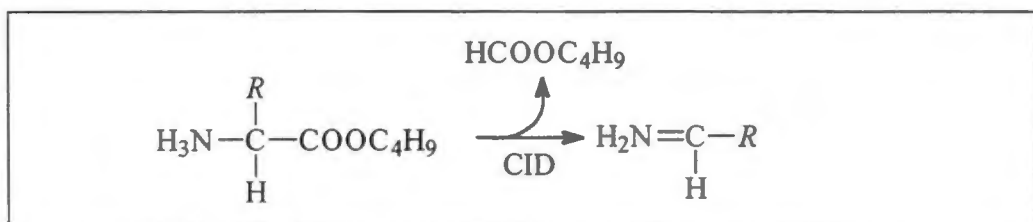


Diagram 3-1 Skematiese voorstelling van die oorsprong van die neutrale fragment van 102 ame soos voorgestel deur Chace *et al.*, (1995:65)

Sommige van die gebutyleerde aminosure het egter ook 'n tweede fragment met 'n massa van 119 ame gelewer. Hierdie eienskap is gebruik in die tweede funksie wat aangewend is vir die kwantifisering van die aminosuurderivate. Die beginsel van die funksie was dieselfde as vir die eerste funksie. Die tweede analiseerder is egter gestel om na 'n neutrale verlies van 119 te kyk. Indien die LC-ES-MS-MS hierdie verskil waarneem, is die neutrale verlies van 119 ame dan bepaal en is hierdie massa dan aangedui. Die 119 ame neutrale verlies word vermoedelik gevorm deur die verlies van die gebutyleerdekarboksielsuur sowel as die aminogroep van die aminosuur.

3.3.5.2. Kwantifisering van asiel-karnitienmetaboliete

Die asiel-karnitienderivate is met 'n ander funksie as bogenoemde bepaal. In hierdie funksie is daar na die ouer ione van 'n bepaalde fragment gesoek. Die eerste analiseerder bepaal die massa van 'n bepaalde ioon en laat die ioon deur na die botsingsel waar die ioon gefragmenteer word. Die tweede analiseerder is gestel om 'n enkele fragmentioon met 'n massa van 85 ame op te spoor. Indien 'n fragmentioon opgespoor word, bepaal die sagteware van watter ouerioon hierdie fragment afkomstig is. Die asiel-karnitien molekules verloor tydens die fragmentasie 'n ioon met 'n massa van 85 ame. Daar is dus 'n funksie geskryf wat die ouers van ioon 85 ame bepaal. Die toestand waaronder hierdie bepaalde fragmentasiepatroon plaasgevind het, verskil egter van dié van die aminosuurderivaatbepaling. In hierdie geval was die botsingsenergie 25 V en die koniese lensspanning 28 V. Die vrye karnitienderivaat is afsonderlik van die asiel-karnitienderivate bepaal, hoewel dieselfde toestande vir beide gebruik is.

Aangesien die monster direk in die bron van die LC-ES-MS-MS gespuit is en die instrument oor die vermoë beskik om meer as een funksie tydens een analise uit te voer, is beide die kwantifisering van die aminosuurderivate en die asiel-karnitienderivate gelyktydig gedoen. Die instrument het dus oor vier funksies beskik wat almal met behulp van positiewe elektrospoei uitgevoer is.

Omdat daar geen chromatografiese skeiding plaasgevind het gedurende die analise van bogenoemde metaboliëte nie, is onderskeid slegs getref op grond van hul onderskeie massas. Daar is dus sekere metaboliëte (byvoorbeeld die aminosure leusien, isoleusien en *allo*-isoleusien), wat nie van mekaar onderskei kan word met hierdie tegniek nie. In hierdie gevalle is 'n gesamentlike konsentrasie dus bepaal (vergelyk Tabel 3-1). In die geval van die asiel-karnitiene was dit egter noodsaaklik om die metaboliëte te hidroliseer sodat die asielgedeeltes van die metaboliëte met behulp van die tradisionele elektronimpak tegniek geïdentifiseer kon word.

3.4. Metodes

3.4.1. Inleiding

Verskeie metodes is deur die loop van die studie gebruik. Hierdie afdeling bespreek van die algemene metodes wat gebruik is. Met algemene metodes word daar verwys na metodes wat op 'n roetinebasis gebruik is. Spesifieke metodes wat gebruik is, word in die hieropvolgende hoofstukke bespreek by die afdelings waar dit vanpas is. Daar sal in hierdie hoofstukke slegs verwys word na die metodes wat hier beskryf is. Tydens die bespreking van die metodes in hierdie afdeling sal daar ook verwys word na die chemikalieë wat gebruik is asook van watter verskaffer die chemikalieë afkomstig is.

3.4.2. Organiese suurekstraksie

Die gebruik van 'n SE 30 kapilêre kolom tydens die GC-analises het tot gevolg dat daar sekere voorbereiding van die monsters gedoen moet word. 'n Metode waarmee organiese sure uit urine geëkstraheer word, is dus gebruik. Verder is die volumes urine wat vir die ekstraksies gebruik is, bepaal deur die kreatinienwaarde van daardie bepaalde monster. In die geval waar 'n standaard gesintetiseer is, is 'n konstante volume (1 ml) van die sintesemengsel geëkstraheer.

Indien die monster se kreatinienwaarde dus binne 5 mg% en 100 mg% val, is 1 ml urine geëkstraheer. Indien die kreatinienwaarde van 'n monster egter tussen 2 en 5 mg% is, is 2 ml urine gebruik en indien die waarde laer as 2 mg% was, is 3 ml urine geëkstraheer. 'n Waarde wat hoër as 'n 100 mg% was, het geïmpliseer dat slegs 0,5 ml urine tydens die ekstraksie gebruik is. 'n Interne standaard (3-feniel-bottersuur (3,2 mmol/l)) is dan by die urine gevoeg. Die volume van die interne standaard is ook afhanklik van die kreatinienwaarde en daar is dus 'n volume in mikroliters bygevoeg wat gelykstaande is aan die kreatinienwaarde vermenigvuldig met 5. Hierna is die pH ingestel met 5 N HCl (BDH) na 'n pH van 2. Ses milliliter (6 ml) koue etielasetaat (AnalaR) is bygevoeg, waarna die mengsel vir dertig minute geskud is. Die mengsel is dan gesentrifugeer in 'n banksentrifuge (RotoUni) vir ongeveer drie minute om die fases te skei. Die etielasetaatfraksie (supernatant) is afgetrek en in 'n tweede buis geplaas. By die waterfase is 3 ml diëtieleter (BDH) gevoeg en die mengsel is weer vir tien minute geskud. Voordat die supernatant weer afgetrek is en by die diëtielasetaatfase gevoeg word, is die mengsel eers weer vir ongeveer drie minute gesentrifugeer sodat faseskeiding kon plaasvind. Om te verseker dat die organiese fases nie enige water bevat nie, is ongeveer twee spatelpunte anhidriese natriumsulfaat (Merck Chemicals) by die organiese fases gevoeg. Die natriumsulfaat is dan vir ongeveer tien minute afgesentrifugeer. Die droë organiese fase is afgetrek en in 'n derde buis gegooi, waarna dit onder stikstof (Fedgas) afgedamp word om sodoende die organiese sure agter te laat. Al die organiese oplosmiddels wat tydens die proses gebruik is, is voor gebruik gehergedistilleer.

3.4.3. Derivatisering

Na die droging van die organiese suurekstrak is die organiese sure gederiviseer met 22,6 μL / mMol kreatinien BSTFA (bis(Trimetielsilil)-trifluoroasetamied) (Sigma Chemical Company) en 4,5 μL /mMol kreatinien TMCS (Trichlorometielsilaan) (Sigma Chemical Company). Die mengsel is vir 30 minute by 70°C in 'n oond geplaas. Die fraksies van die gefraksioneerde urienekstrakte (vergelyk afdeling 3.4.6) is met 'n konstante volume van 100 μL BSTFA en 20 μL TMCS gederiviseer. Vir die gesintetiseerde standaarde is ongeveer 10 μg van die sintese met 100 μL BSTFA

en 20 μL TMCS gederivatieer. Dieselfde toestande is gebruik tydens die derivatisering van die gefraksioneerde urienekstrakte en die gesintetiseerde standaarde as vir die urienekstrakte.

3.4.4. Aminosuur voorbereiding vir LC-ES-MS-MS-analise

Alhoewel geen kolomskeiding van metaboliëte plaasvind tydens LC-ES-MS-MS-analises nie en die urine onbehandeld op die massaspektrometer gespuit word, is dit egter noodsaaklik om sekere voorbereiding van 'n uriemonster te doen. Die voorbereiding behels die butilering van al die karboksielsuurbevattende molekules. In die geval van die meeste aminosure veroorsaak die butilering tesame met die α -aminogroep dat die molekules onder bepaalde toestande soortgelyk sal reageer in die bron van die MS-MS. Vir die butilering is 10 μL urine in 'n klein Kimax-buis geplaas. As interne standaard is 50 μL deteuriëringmerkte valien (d_3 -Valien) (200 $\mu\text{M/L}$) (CEA: Service des Molécules Marquées (France)) en 10 μL miristoël-karnitien (10 $\mu\text{M/L}$) (Sigma Chemical Company) by die urine gevoeg. (Die miristoël-karnitien is die interne standaard vir die kwantifisering van die asiel-karnitiene, maar omdat dieselfde monster vir beide bepalinge gebruik word, word dit hier beskryf). Die mengsel is dan onder stikstof gedroog. By die droë uriemonster is 50 μL butanoliese-HCl (10 N HCl (AnalaR) met butanol (AnalaR) verdun na 3 N HCl) gevoeg. Die buis is met 'n skroefprop geseël en toegelaat om vir 15 minute by 65°C te reageer. Die oortollige butanoliese-HCl is dan onder stikstof afgedamp. Die droë poeier is in 250 μL loopmiddel opgelos. Die loopmiddel was 'n samestelling van water (Merck Chemicals) en asetonitrile (BDH) wat vermeng is in 'n 1-tot-1-verhouding. By die loopmiddel is 0,1% mieresuur (BDH) gevoeg. Tien mikroliter (10 μL) van die monster is dan direk in die massaspektrometer gespuit.

3.4.5. Voorbereiding van die asiel-karnitiene vir LC-ES-MS-MS-analise

Die asiel-karnitiene is voorberei op 'n soortgelyke metode as vir die aminosure (vergelyk afdeling 3.4.4.). Dit het voorbereiding vergemaklik aangesien dieselfde

monster gebruik kon word vir beide die kwantifisering van urinêre aminosure sowel as die kwantifisering van die asiel-karnitiene. Die toestande waaronder die analyses in die massaspektrometer gedoen is het egter verskil en is bespreek in afdeling 3.3.4.

3.4.6. Fraksionering van organiese sure

Die kompleksiteit van die samestelling van die organiese sure in die urine het veroorsaak dat ko-eluering tydens 'n enkele GC-analise nie uitgeskakel kon word nie. Dié probleem het die identifisering van die organiese sure bemoeilik en in sommige gevalle dit onmoontlik gemaak. 'n Verdere probleem was dat sommige metaboliëte in baie lae konsentrasies voorkom. Hierdie probleme is oorkom deur die organiese suurekstrak vooraf te fraksioneer deur gebruik te maak van dunlaag chromatografie. Omdat 'n groter volume urine gebruik word, kon metaboliëte wat in lae konsentrasies voorkom, ook makliker geïdentifiseer word.

Die loopmiddel is saamgestel uit verskillende oplosmiddels wat sou verseker dat die skeiding wat verkry word van so 'n aard is dat, tesame met die SE-30-kolom wat in die GC-analise gebruik is, daar 'n optimale skeiding kan plaasvind. Die loopmiddel is saamgestel uit 20 ml tersiêre-amielalkohol (Merck Chemicals), 70 ml chloroform (SARchem), 10 ml miersuur (Merck Chemicals) en 5 ml hekasaan (BDH). Silikagel 60 dunlae (Merck Chemicals) is gebruik in die fraksionering van die organiese sure. Vyf standaard organiese suurekstraksies soos beskryf in afdeling 3.4.2. is op die urine gedoen. Meer urine kon dus op hierdie wyse gebruik word om sodoende die identifisering van onbekende metaboliëte moontlik te maak. Die organiese fases is egter nie individueel gedroog nie maar gepoel en toe gedroog. Daar is ook nie van 'n interne standaard gebruik gemaak nie. Die gedroogde organiese sure is weer opgelos in die minimum (ongeveer 20 - 50 μ L) metanol (BDH). Die organiese suur oplossing is dan met 'n Hamilton-spuit op die dunlaag aangewend. Die dunlaag is toegelaat om te ontwikkel tot ongeveer 1 cm vanaf die boonste sy van die dunlaag.

Na ontwikkeling is die dunlaagplaat gedroog, waarna dit in agt fraksies verdeel is. Die stasionêre fase is van die plaat afgekrap en verpoëier, waarna dit in kolomme

geplaas is. Die organiese sure is vervolgens vanaf die silikagel 60 stasionêre fase geëlueer deur gebruik te maak van 'n piridien-metanol-mengsel (SARchem en Merck Chemicals onderskeidelik). Die fraksies is hierna onder stikstof droog gedamp en gederivatiseer soos beskryf in afdeling 3.4.3.

3.4.7. Vorming van chloorsoute van organiese sure

Tydens die sinteses van sommige van die standarde waarmee die onbekende metaboliete in die urine vir identifikasie vergelyk kan word, is van die chloorsoute van die organiese sure gebruik gemaak. Die metode wat gebruik is, is 'n gewysigde metode van Furniss *et al.*, (1989:692 - 693).

Ongeveer 100 mg van die verlangde organiese suur is in 'n Kimax-buis geplaas en met 'n oormaat tionielchloried (Riedel-de Haën) behandel en vir ongeveer tien minute by 40°C laat staan nadat die buis met 'n skroefprop geseël is. Aangesien al die organiese sure wat tydens hierdie studie gebruik is net een karboksielsuur bevat het, was hierdie metode voldoende om 'n hoë opbrengs van die chloorsoute te lewer.

3.4.8. Konjugeringsreaksies

In al die konjugeringsreaksies is ten minste een verbinding met 'n karboksielsuur gebruik. Die verbinding waarvan die karboksielsuur aan die konjugeringsreaksie moes deelneem, is eers met tionielchloried behandel om die chloorsout van daardie verbinding te verkry (vergeelyk afdeling 3.4.7). Die tweede verbinding (waarmee die karboksiel-chloriedderivaat moet konjugeer) wat aan die reaksie moet deelneem, is opgelos in 1 ml 6 N NaOH-oplossing. Die NaOH is van SARchem aangekoop. Die chloorsout van die karboksielsuur is versigtig by die tweede verbinding gevoeg. Die pH is bepaal en indien dit laer as 7 gedaal het, is die mengsel se pH ingestel met 6 N NaOH. Die buis is dan geseël en vir 45 minute in 'n waterbad geplaas by 40°C. Al bogenoemde stappe is in 'n trekkas uitgevoer, aangesien die reaksie HCl-gas genereer

tydens die konjugering. Van hierdie sintese is dan 1 ml geneem en geëkstraheer soos in afdeling 3.4.2 beskryf.

3.4.8.1. Sintese van 5-hidroksihidantoïene

Die 5-hidroksihidantoïene is gesintetiseer deur middel van die konjugering van ureum en die onderskeie vertakteketting-2-ketosure (2-keto-isovaleriaansuur (Sigma Chemical Company), 2-keto-isokaproësuur (Sigma Chemical Company) en 2-keto-3-metielvaleriaansuur (Sigma Chemical Company)). Die chloriedsout van die vertakteketting-2-ketosure is gesintetiseer soos beskryf in afdeling 3.4.7. Die ureum (PAL Chemicals) is opgelos in die 6 N NaOH. Die konjugering is gedoen soos reeds beskryf (vergelyk afdeling 3.4.8.).

Anders as by meeste van die ander sinteses, het die sintese van die 5-hidroksihidantoïene vereis dat ringsluiting na die konjugering moet plaasvind. Die sintese is dus nie geëkstraheer na die konjugeringstap nie, maar eers na die aanvanklike 45 minute (konjugeringstap) aangesuur sodat die pH laer as 7 was. Die reaksie is dan weer vir 45 minute by 40°C gelaat sodat ringsluiting kon plaasvind. Na hierdie stap is die sintese geëkstraheer soos vroeër beskryf.

3.4.8.2. Sintese van die vertakteketting-2-hidroksisuurkonjugate

Tydens die studie is verskeie vertakteketting-2-hidroksisuurkonjugate gesintetiseer. Hierdie konjugate sluit in die konjugering met die vertakteketting-2-hidroksisure, vertakteketting-aminosure (valien (Merck Chemicals), leusien (Merck Chemicals) en isoleusien (Merck Chemicals)), glisien (SARchem), alanien (Merck Chemicals) en die vertakteketting-amiene (isobutielamien (Aldrich), isoamielamien (Aldrich) en 2-metielbutielamien (Aldrich)). Elk van die drie vertakteketting-2-hidroksisure is gebruik vir die vorming van die chloriedsout. Hierdie chloriedsoute is vervolgens gebruik in die konjugering met die vrye vertakteketting-2-hidroksisure, -aminosure en vertakteketting-amiene (opgelos in 6 N NaOH) soos reeds bespreek, waarna

1 ml van die sintese is op die standaard vloeistofekstraksie metode geëkstraheer.

3.4.8.3. Sintese van die vertakteketting-2-ketosuurkonjugate

Tydens die studie is daar gevind dat ook die vertakteketting-2-ketosure (2-keto-isovaleriaansuur (Sigma Chemical Company), 2-keto-isokaproësuur (Sigma Chemical Company) en 2-keto-3-metielvaleriaansuur (Sigma Chemical Company)) aan die konjugeringreaksies kan deelneem. Soortgelyk aan die sintese van die 2-hidroksisuurkonjugate is die 2-ketosure gebruik in die sintese van die chloriedsoute van hierdie verbindings. Hierdie chloriedsout derivate is dan gebruik in die konjugering met die vertakteketting-aminosure. Na die konjugering is 'n normale vloeistofekstraksie met 1 ml van die sintese gedoen.

3.4.8.4. Sintese van N-isobutiriel-, N-2-metielbutiriel- en N-isovalerielkonjugate

Uit die studie het dit duidelik geword dat konjugate gevorm word wat bestaan uit die vertakteketting-amiën of -aminosuur en die gedekarboksileerde derivaat van die vertakteketting-2-ketosure. Die sintese van hierdie metaboliete het eerstens behels dat die chloorsout van isobottersuur (Aldrich), 2-metielbottersuur (Aldrich) en isovaleriaansuur (Aldrich) berei moes word soos bespreek in afdeling 3.4.7, waarna die derivate in die konjugeringreaksies gebruik kon word. Die drie soute is gebruik in die konjugering met die vertakteketting-aminosure en vertakteketting-amiene soos reeds beskryf.

3.4.8.5. Sintese van die N-laktiel- en N-asetiel-konjugate

N-Laktiel-gekonjugeerde aminosure en N-asetiel-gekonjugeerde aminosure is berei volgens die metode beskryf in Mienie (1994: 124). Die laktielchloriedkonjugaat is gevorm vanuit (1 mmol) litiumlaktaat (Merck

Chemicals) en 1,2 mmol tionielchloried. Na afkoeling is die laktielchloried by 1 ml van 'n 4 mol/L-oplossing van die onderskeie vertakteketting-aminosure, glisien en alanien (in 'n 2 mol/L NaOH-oplossing) gevoeg en oornag by kamertemperatuur laat staan. Die *N*-laktiel-aminosuurkonjugate is daarna geëkstraheer soos reeds beskryf.

Vir die sintese van die *N*-asetiel-gekonjugeerde aminosure is een gram van die onderskeie vertakteketting-aminosure in 3 gram asynsuuranhidried (AnalaR) vir ongeveer 10 tot 15 minute gerefluks. Nadat die reaksiemengsel afgekoel is, is koue water bygevoeg. Die oormaat asynsuuranhidried is verwyder deur die mengsel te kook. Na afkoeling het sommige van die *N*-asetiel-aminosuurkonjugate gekristaliseer. Indien geen kristallisering plaasgevind het nie, is die mengsel geëkstraheer soos vroeër beskryf (vergelyk afdeling 3.4.2).

3.4.8.6. Sintese van 3-hidroksi-butiriel-alanien en 3-hidroksi-butirielglisien

Hierdie sintese is uitgevoer met 3-hidroksi-bottersuur (Aldrich), glisien en alanien. Die 3-hidroksi-butirielchloried is eers gesintetiseer met die gewysigde metode van Furniss *et al.*, (1989:692 - 693) soos beskryf in afdeling 3.4.7. Die 3-hidroksi-butirielchloried is vervolgens by die aminosuuropplossing in 6 N NaOH gevoeg en die pH is getoets en verstel indien dit laer as pH 7 gedaal het. Die reaksie is vir 45 minute by 40°C in 'n waterbad gehou. Van hierdie sinteses is 1 ml geneem en geëkstraheer volgens die vloeistofekstraksie metode soos reeds beskryf.

3.4.9. Hidrolisering van asiel-karnitiene

Vir die hidrolisering van die asiel-karnitiene is 500 µL urine en 500 µL van 'n 2 N KOH-oplossing (Merck Chemicals) in 'n Kimax-buis geplaas en met 'n skroefprop geseël. Die KOH-urienoplossing is vir 30 minute by 100°C geplaas sodat hidrolise kan plaasvind. Van die hidrolisaat is 100 µL onder stikstof gedroog waarna die droeë

hidrolisaat gebutyleer is soos beskryf in afdeling 3.4.5. As interne standaard is egter karnitien (Sigma Chemical Company) wat met deteuriumgemerke butanol (d_9 -butanol) (Aldrich) gederivatiseer is, gebruik. Die d_9 -butanolderivaat van karnitien is voorberei deur 1 ml van 'n 30 $\mu\text{M/L}$ karnitienoplossing onder stikstof te droog en dan die droë karnitien vir 15 minute te butyleer met 'n oormaat deteuriumgemerke butanol by 65°C. Na droging onder stikstof is die deteuriumgemerke butanolderivaat van karnitien opgelos in 250 μL loopmiddel (1:1; ddH₂O (Merck Chemicals):Asetonitriël (BDH)). Die gedroogde gebutyleerde hidrolisaat is opgelos met die 250 μL deteuriumgemerke butanol-karnitienderivaatoplossing. Die oorblywende 900 μL onbehandelde hidrolisaat is geëkstraheer met die metode soos beskryf in afdeling 3.4.2 en gederivatiseer soos beskryf in afdeling 3.4.3.

3.4.10. Sintese van 2-isopropielappelsuur

Die sintese van 2-isopropielappelsuur is uitgevoer volgens die metode van Yamashita (1959:833) en bestaan uit drie stappe. In die eerste stap word isobutiriëlasetonitriël gevorm, waarna 2-hidroksi-2-isopropiëlsuksienamiensuur gevorm word. In die derde stap word 2-isopropielappelsuur gevorm.

Sintese van isobutiriëlasetonitriël

By 'n reaksiemengsel bestaande uit 0,2 mol metielisobottersuur en 0,2 mol asetoniëltriël (BDH) is 0,2 mol natriumetoksied gevoeg waarna die reaksie toegelaat is om vir vier ure te reageer by 115 - 120°C. Tydens die verhitting is die mengsel voortdurend geroer terwyl die alkohol afgedistilleer is. Die gevormde produk is met koue ysasynsuur (Sigma Chemical Company) aangesuur tot ongeveer pH 2, waarna dit met diëtleter geëkstraheer (BDH) is. Die eterlaag is gewas met 'n 5% natriumbikarbonaatoplossing (BDH) en met anhidriese natriumsulfaat (BDH) gedroog. Die diëtleter is onder verlaagde druk afgedamp.

Sintese van 2-hidroksi-2-isopropiëlsuksienamiensuur

By die isobutiriëlasetonitriël is 6,5 ml gekonsentreerde soutsuur (BDH) en 0,08 mol natriumsianiedpoeier (Merck Chemicals) gevoeg en vir twee ure geroer, terwyl die mengsel by 0°C gehou is. Hierdie reaksiemengsel is dan met diëtleter geëkstraheer, waarna die diëtleter toegelaat is om te verdamp. By die oorblywende olielaag is twee volumes gekonsentreerde soutsuur gevoeg en vir 48 uur by kamertemperatuur laat staan. Twee volumes water is hierna by die mengsel gevoeg, waarna 'n 80 uur kontinue-ekstraksie van die produk uitgevoer is.

Sintese van 2-isopropiëllappelsuur

Die voorafgevormde produk is vir drie ure onder reflukskondisies verhit in die teenwoordigheid van 6 ml 1 N soutsuur. Hierna is 'n normale organiese suurekstraksie uitgevoer (vergelyk afdeling 3.4.2.) op die produk, waarna die geëkstraheerde 2-isopropiëllappelsuur gederivatiseer is soos reeds beskryf (vergelyk afdeling 3.4.3.).

3.4.11. Sintese van 2-isopropiëlfumaarsuur

2-Isopropiëlfumaarsuur is volgens die metode van Gawron en Mahajam (1966:2335) gesintetiseer. 'n Mengsel van etiel-2-keto-isovaleriaansuur, 0,18 mol etiëlsiano-asetaat (Aldrich Chemical Company), 2,25 ml droë piridien (Sigma Chemical Company), 1,6 ml ysasynsuur (Sigma Chemical Company) en 37,5 ml droë benseen (Sigma Chemical Company) is vir vyftien uur onder refluksstoestand verhit. Na afkoeling is 'n verdere 37,5 ml benseen bygevoeg, waarna die mengsel agtereenvolgens met 10 ml 0,5 N soutsuur (BDH), 10 ml 5% natriumbikarbonaat (BDH) en 10 ml water gewas is. Die benseenoplossing is met anhidriëse natriumsulfaat (Merck) gedroog en onder verminderde druk afgedamp. Die gevormde produk is saam met 5 volumes gekonsentreerde soutsuur vir 24 uur onder refluksstoestand verhit en na afkoeling met benseen gewas. Die 2-isopropiëlfumaarsuur is geëkstraheer met behulp van 'n normale organiese suurekstraksie (vergelyk afdeling 3.4.2.), waarna dit gederivatiseer is met die metode soos beskryf in afdeling 3.4.3.

Hoofstuk 4

Resultate

Geïnduseerde metaboliëte¹ uit die vertakketting- aminosure

4.1. Inleiding

In Diagram 4-1 word 'n voorstelling gebied van alle moontlike geïnduseerde metaboliëte wat vanaf leusien, isoleusien en valien gevorm kan word. Die voorgestelde metaboliëte is gegrond op die voorkoms en vormingsmeganismes van metaboliëte by MSUD sowel as ander metaboliese defekte. Die rede vir die voorstelling van 'n moontlike metaboliet sal telkens gemotiveer word voor die ondersoek na die bepaalde metaboliet uitgevoer word. Faktore wat 'n invloed op die oorsprong van die metaboliëte het, sal so ver moontlik ondersoek en bespreek word.

¹ Geïnduseerde metaboliëte verwys na normale en abnormale metaboliëte wat in abnormaal hoë konsentrasies gevorm en in die urine van pasiënte uitgeskei word as gevolg van 'n aangebore metaboliese defek.

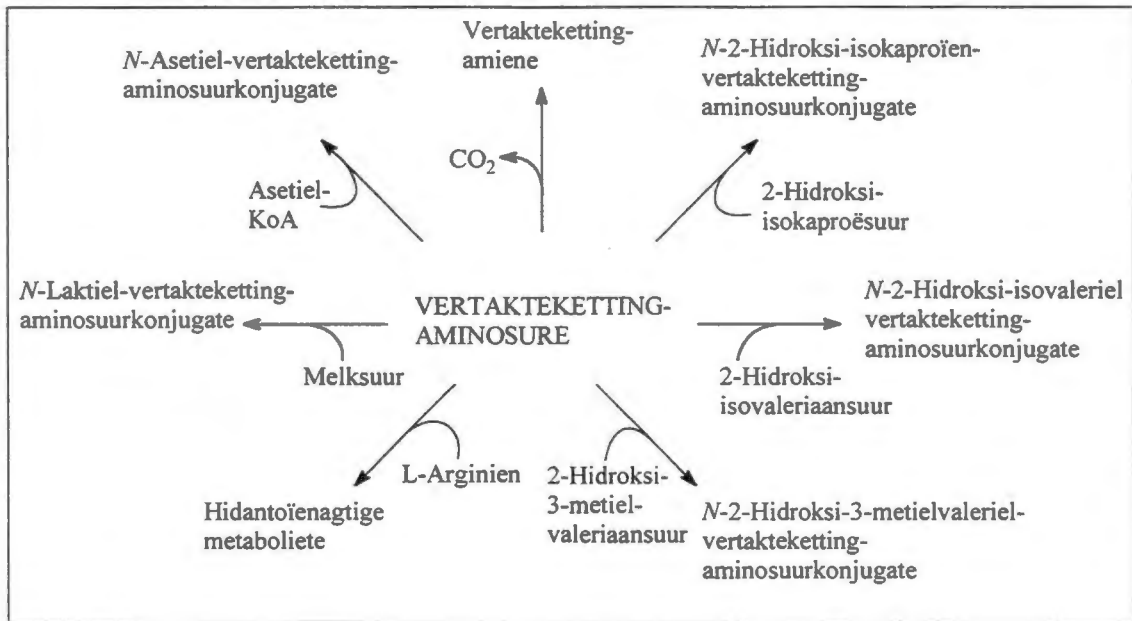


Diagram 4-1 Voorstelling van geïnduseerde metaboliete wat potensieel vanaf leusien, isoleusien en valien gevorm kan word

4.2. Metaboliete gevorm uit leusien, isoleusien en valien

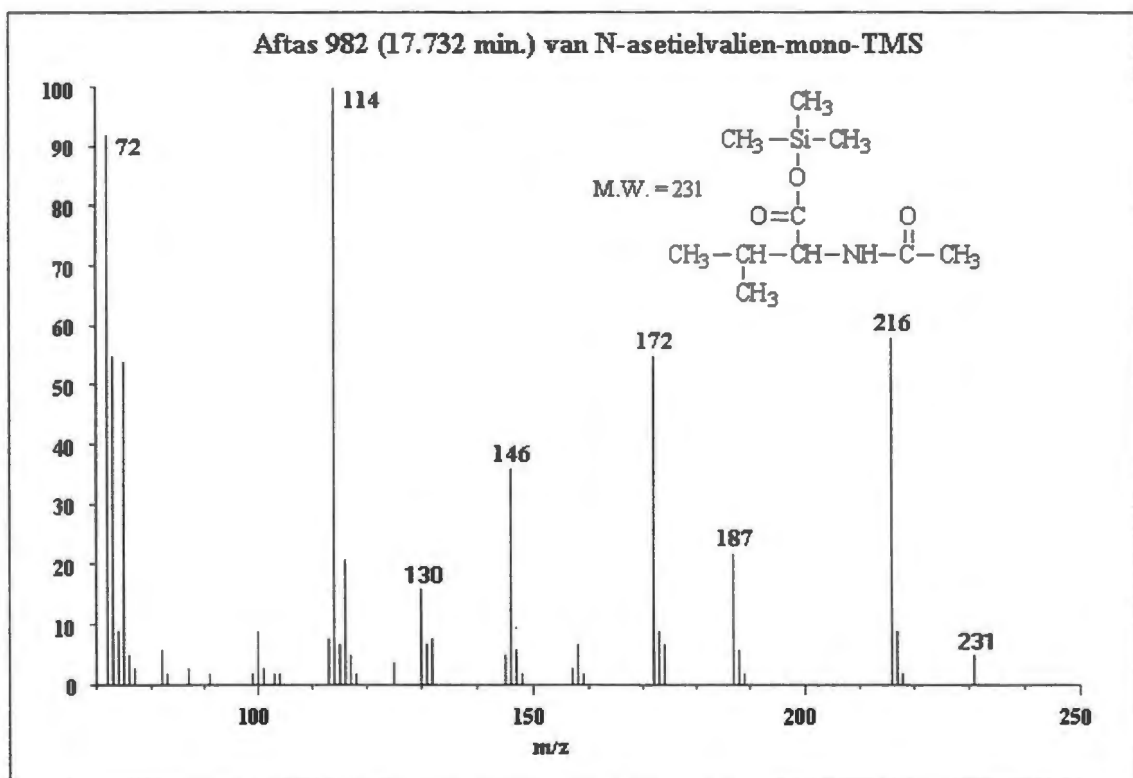
4.2.1. Asetillering

Die voorkoms van *N*-geasetileerde aminosure by aangebore afwykings van aminosuurmetabolisme is 'n algemene verskynsel. MSUD is in dié opsig ook nie 'n uitsondering nie, aangesien *N*-asetielleusien, *N*-asetielisoleusien en *N*-asetielvalien reeds voorheen beskryf is deur Jellum *et al.*, (1986: 21) en deur Lenhert en Werle (1988: 123). Geen konsentrasies is egter deur hierdie outeurs verskaf nie, hoewel hulle noem dat die konsentrasies laag was. Die meganisme van vorming of die ensieme betrokke by die konjugering van waarskynlik asetiel-KoA en die vertakteketting-aminosure is ook nie bekend nie.

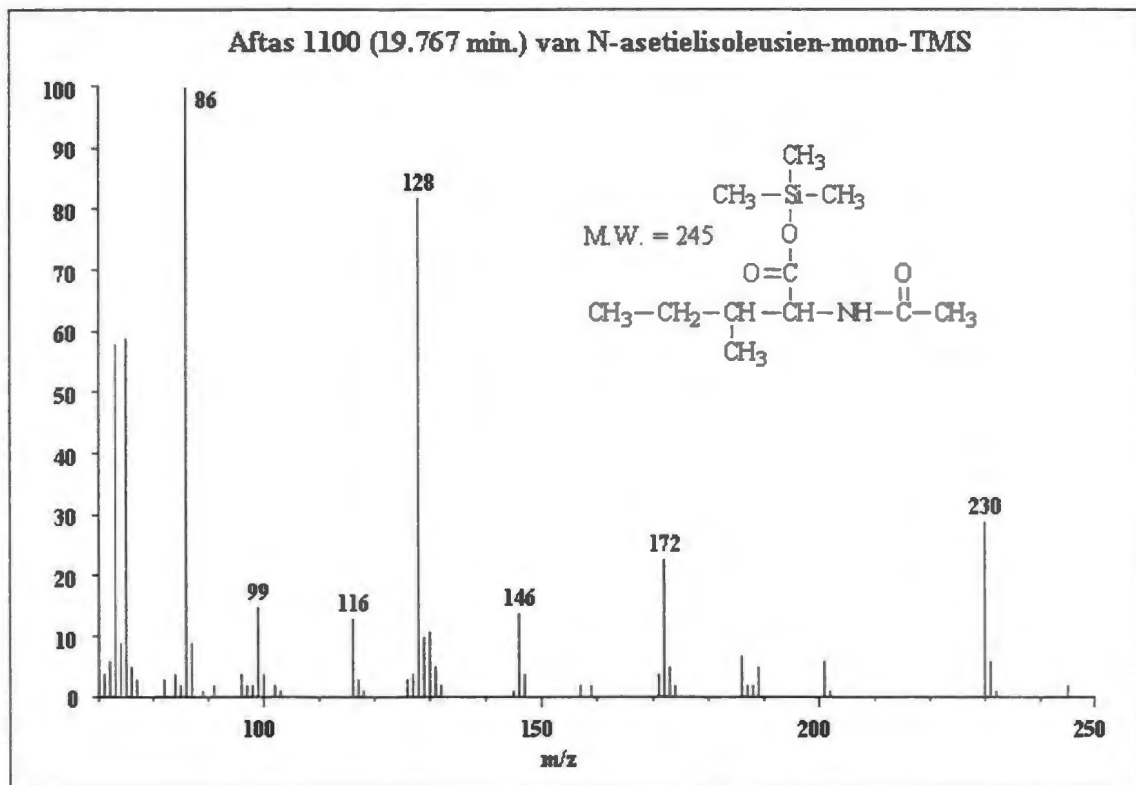
Die voorstelling van die bestaan van hierdie verbindings by MSUD-pasiënte is dus nie nuut nie, maar aangesien die genoemde outeurs nie na die konsentrasies van die verbindings verwys het nie, sal hulle ook in die studie betrek word. Hierdie verbindings is opgespoor in die urine van al die pasiënte wat gebruik is tydens hierdie

studie. Die massaspektrums van hierdie drie verbindings word in figure 4-1, 4-2 en 4-3 weergegee.

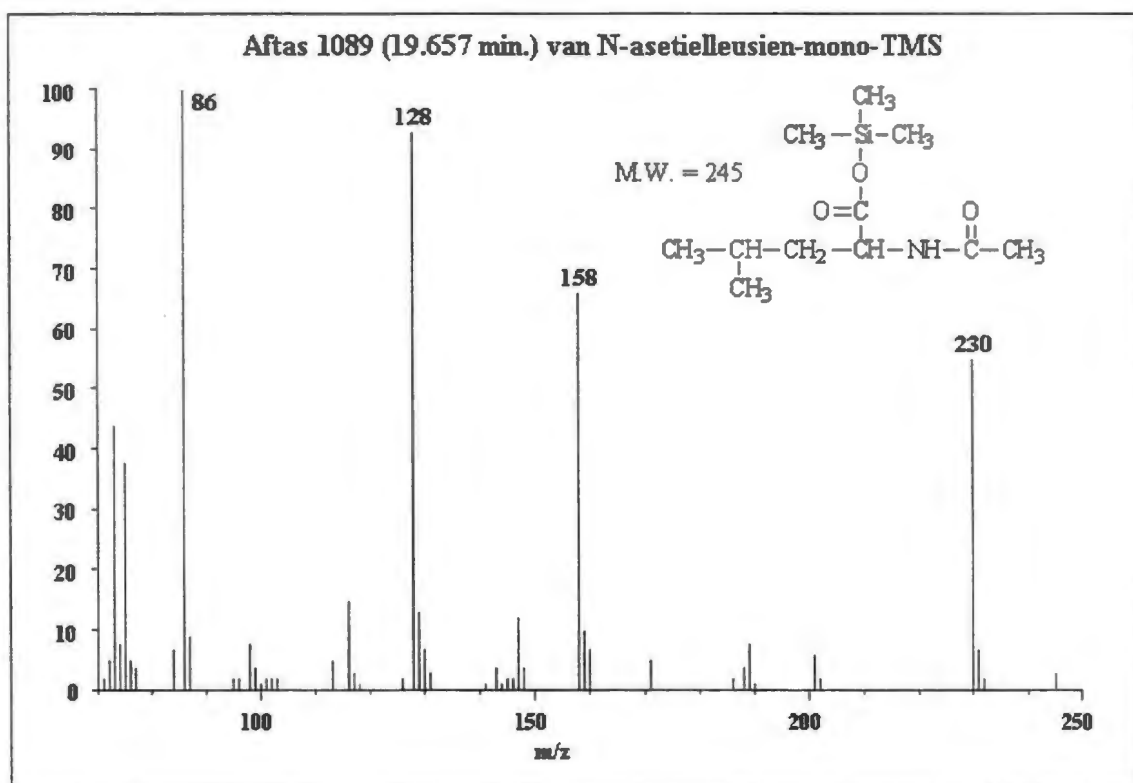
Al drie die verbindings fragmenteer op so 'n wyse dat 'n sterk massa - 15 ame ($M - 15$ ame) ioon waarneembaar is (230 ame vir die TMS-derivate van *N*-asetielleusien en *N*-asetielisoleusien en 216 ame vir die TMS-derivaat van *N*-asetielvalien). Die 86 ame-fragmente by *N*-asetielleusien-mono-TMS en *N*-asetielisoleusien-mono-TMS en die 72 ame-fragment by *N*-asetielvalien-mono-TMS is afkomstig van die aminosuur gedeelte van die konjugaat. Die sterk 128 ame-fragmente van *N*-asetielleusien-mono-TMS en *N*-asetielisoleusien-mono-TMS en die sterk 114 ame-fragment van *N*-asetielvalien-mono-TMS word gevorm deur die verlies van die karboksiesuur-mono-TMS-gedeelte van die onderskeie *N*-asetielkonjugate.



Figuur 4-1 Massaspektrum van *N*-asetielvalien-mono-TMS



Figuur 4-2 Massaspektrum van *N*-asetielisoleusien-mono-TMS



Figuur 4-3 Massaspektrum van *N*-asetielleusien-mono-TMS

Die konsentrasies van die *N*-asetielkonjugate in die urine van vier MSUD-pasiënte word in Tabel 4-1 weergegee. In die geval van al vier pasiënte was die urine die eerste monster wat vir 'n metaboliese ondersoek na die laboratorium verwys is.

Tabel 4-1 Urinêre konsentrasies van die *N*-asetiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate

Metaboliet (mmol/mol kreat.)	EM	BM	OH	MM
<i>N</i> -asetielleusien	2,44	20,6	8,02	484,0
<i>N</i> -asetielisoleusien	Spoor	1,4	0,8	42,5
<i>N</i> -asetielvalien	Spoor	1,07	Spoor	Spoor

Tabel 4-1 gee die konsentrasies van die urinêre *N*-asetielkonjugate van die drie relevante aminosure weer. Uit die tabel kom 'n aantal opvallende verskynsels na vore, waaronder:

- i) Pasiënt MM skei die *N*-asetielkonjugate teen ongeveer twintigvoudig hoër konsentrasies as die ander drie pasiënte uit.
- ii) *N*-asetielleusien word teen ongeveer tienvoudig die konsentrasies van *N*-asetielisoleusien in die urine van die MSUD-pasiënte aangetref.
- iii) *N*-asetielvalien was slegs in spoorhoeveelhede teenwoordig in die urine van al die MSUD-pasiënte.

Uitskeiding van N-asetielkonjugate deur pasiënt MM

Die hoë uitskeiding van *N*-asetielkonjugate by pasiënt MM kan aan verskeie moontlike faktore toegeskryf word, waaronder die feit dat:

- i) Die hoë uitskeiding moontlik net eenmalig was, wat deur middel van opvolgmonsters vasgestel kon word;
- ii) Dit 'n individuele variasie van die asetileringsproses van die pasiënt is; of
- iii) Die pasiënt twintigvoudig hoër aminosuurkonsentrasies vertoon het.

Vier verdere urienmonsters is verkry en die organiese suuranalises is daarop uitgevoer. Die resultate word in Tabel 4-2 aangetoon. Tydens die tydperk wat monster 2 verkry is, was die pasiënt nog nie onder behandeling nie. Tydens die verkryging van

monster 3 tot 5 het die pasiënt 'n lae vertakteketting-aminosuurdieet, aangevul met L-karnitien, ontvang.

Tabel 4-2 Konsentrasies van *N*-asetielleusien, -isoleusien en -valien in die urine van pasiënt MM

Metabooliet (mmol/mol kreat.)	Monster 2	Monster 3*	Monster 4*	Monster 5*
<i>N</i> -asetielleusien	506,5	199,7	35,0	27,3
<i>N</i> -asetielisoleusien	29,3	Spoor	15,4	19,5
<i>N</i> -asetielvalien	Spoor	Spoor	Spoor	Spoor

* *Urienmonster is verkry na die aanvang van 'n lae vertakteketting-aminosuurdieet- en karnitienbehandeling.*

Uit die resultate in Tabel 4-2 is dit duidelik dat pasiënt MM bykans deurgaans hoë konsentrasies van veral *N*-asetielleusien en -isoleusien uitskei. Die dieetbehandeling het tot die verlaging van die konjugate bygedra, wat veral in die konsentrasies van *N*-asetielleusien (20-voudig) waargeneem kan word. Die konsentrasies *N*-asetielisoleusien en -valien het nie so drasties afgeneem nie. Dit wil egter voorkom of pasiënt MM konstant hoër konsentrasies *N*-asetielgekonjugeerde aminosure uitskei, selfs tydens lae proteïen behandeling, as enige van die ander pasiënte wat vir die studie beskikbaar was.

Om die moontlikheid dat die hoë konsentrasie *N*-asetielaminosure by pasiënt MM deur baie hoë konsentrasies aminosure veroorsaak word is aminosuuranalises uitgevoer op die eerste urienmonster van pasiënt MM en pasiënte OH en EM. Die kwantitatiewe analise word in Tabel 4-3 weergegee.

Tabel 4-3 Urinêre aminosuur konsentrasies van pasiënte MM, EM en OH

Metabooliet (mmol/mol kreat.)	EM	OH	MM
Leusien	38,4	39,3	2323,0
Isoleusien	16,9	20,2	633,0
Valien	54,2	42,8	1350,0

Uit die resultate in Tabel 4-3 is dit duidelik dat pasiënt MM selfs meer as twintigvoudige vertakteketting-aminosuuruitskeiding in die urine vertoon het. Die bloedaminosuurkonsentrasies kon egter nie bepaal word nie. Verder is dit ook duidelik dat leusien die beste substraat vir die *N*-asetilleeringsreaksies is, gevolg deur isoleusien en valien.

Aminosuuranalises op die monsters van pasiënt MM wat tydens behandeling verkry is, toon ten spyte van die behandeling steeds hoë vertakteketting-aminosuurkonsentrasies. 'n Verklaring vir hierdie tendens kan moontlik gevind word in die totale organiese suuranalise van die urine. Anders as die ander MSUD-pasiënte, skei pasiënt MM laer konsentrasies 2-keto- en 2-hidroksi-analoë van die aminosure uit (Tabel 4-4).

Tabel 4-4 Konsentrasies van die vertakteketting-2-ketosure en -2-hidroksisure in die urine van MSUD-pasiënte

Metaboliete	EM	OH	BM	Pasiënt MM (mmol/mol kreat.)				
				1	2	3	4	5
2-KIV	159	204	89	spoor	22,6	spoor	14,9	9,5
2-KMV	892	615	359	spoor	47,2	33,4	spoor	12,5
2-KIC	1353	1482	967	spoor	310,0	702,0	46,3	108,4
2-HIV	1078	1210	990	467,4	2927,3	1574,0	624,5	473,2
2-HMV	231	289	145	146,8	223,4	162,4	97,7	80,2
2-HIC	123	151	60	36,1	1,0	35,1	22,5	28,0

(2-KIV = 2-keto-isovaleriaansuur; 2-KMV = 2-keto-3-metielvaleriaansuur; 2-KIC = 2-keto-isokaproësuur; 2-HIV = 2-hidroksi-isovaleriaansuur; 2-HMV = 2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur; 2-HIC = 2-hidroksi-isokaproësuur)

Hierdie data dui 'n duidelike laer uitskeiding van die 2-keto- en 2-hidroksi-analoë van die vertakteketting-aminosure by pasiënt MM. Daar kan slegs bespiegel word oor 'n verklaring vir hierdie beeld. Die moontlikheid van 'n vitamien-B₆-tekort kan dalk 'n verklaring bied. Die moontlikheid dat 'n vitamien-B₆-tekort bestaan het, word verder bevestig deur die teenwoordigheid van xantireniensuur in die urine van die pasiënt

(Murray *et al.*, 1996: 316 - 318). Natuurlike variasie van transaminase-aktiwiteit is ook 'n moontlike verklaring vir die ongewone beeld wat deur pasiënt MM vertoon word. Dit is opvallend dat met die aanvang van die behandeling, wat 'n multi-vitamienpreparaat ingesluit het, aanvanklik meer 2-ketosure gevorm is met 'n afname wat daarna gevolg het as gevolg van die dieetbehandeling.

4.2.2. *N*-Laktielkonjugate

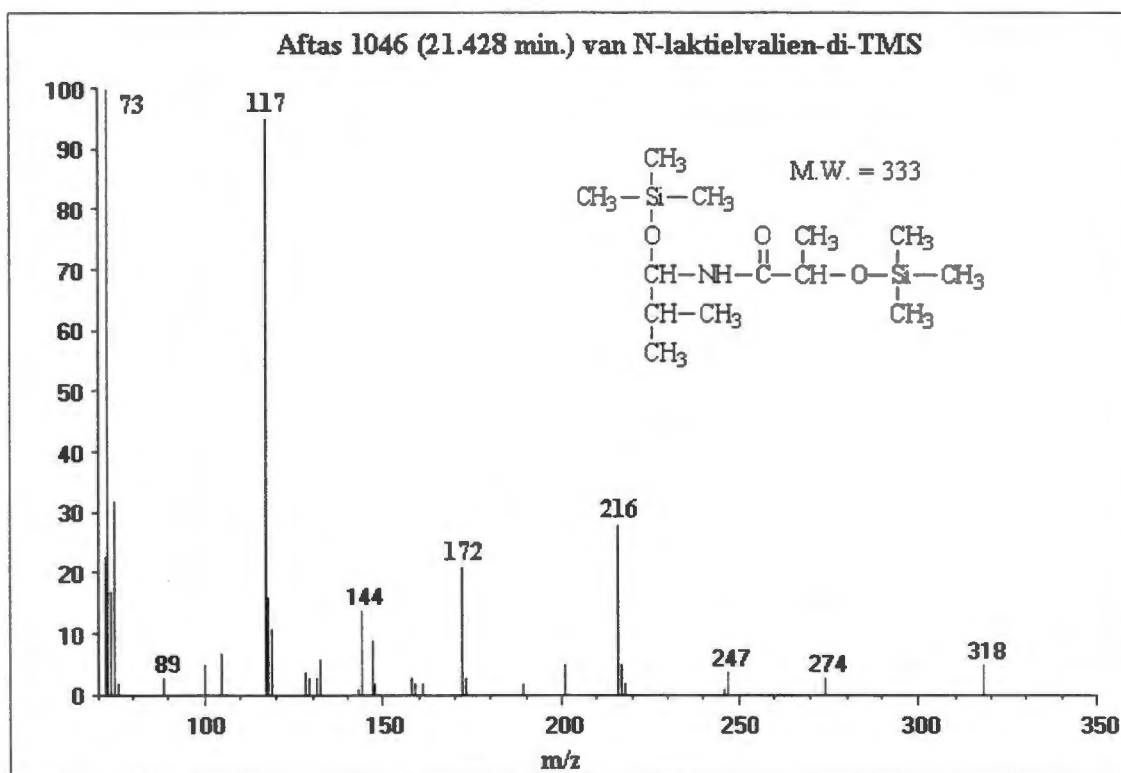
Die *N*-laktielkonjugate (*N*-laktielvalien, *N*-laktielleusien en *N*-laktielisoleusien) as sulks is ook nie nuwe metaboliete nie. Hierdie metaboliete is bespreek deur Mienie (1994: 151 - 157). Aangesien pasiënt MM egter hoë konsentrasies van hierdie metaboliete uitskei in vergelyking met die res van die pasiënte wat ondersoek is, word hierdie konjugate ook in hierdie studie bespreek. Die ensiem wat verantwoordelik is vir hierdie konjugate is egter nie bekend nie. Die konjugate kom wel by al die pasiënte voor wat ondersoek is. Hierdie konsentrasies word in Tabel 4-5 weergegee.

Tabel 4-5 Konsentrasies van die urinêre *N*-laktielkonjugate van die vertakteketting-aminosure in die urine van MSUD-pasiënte

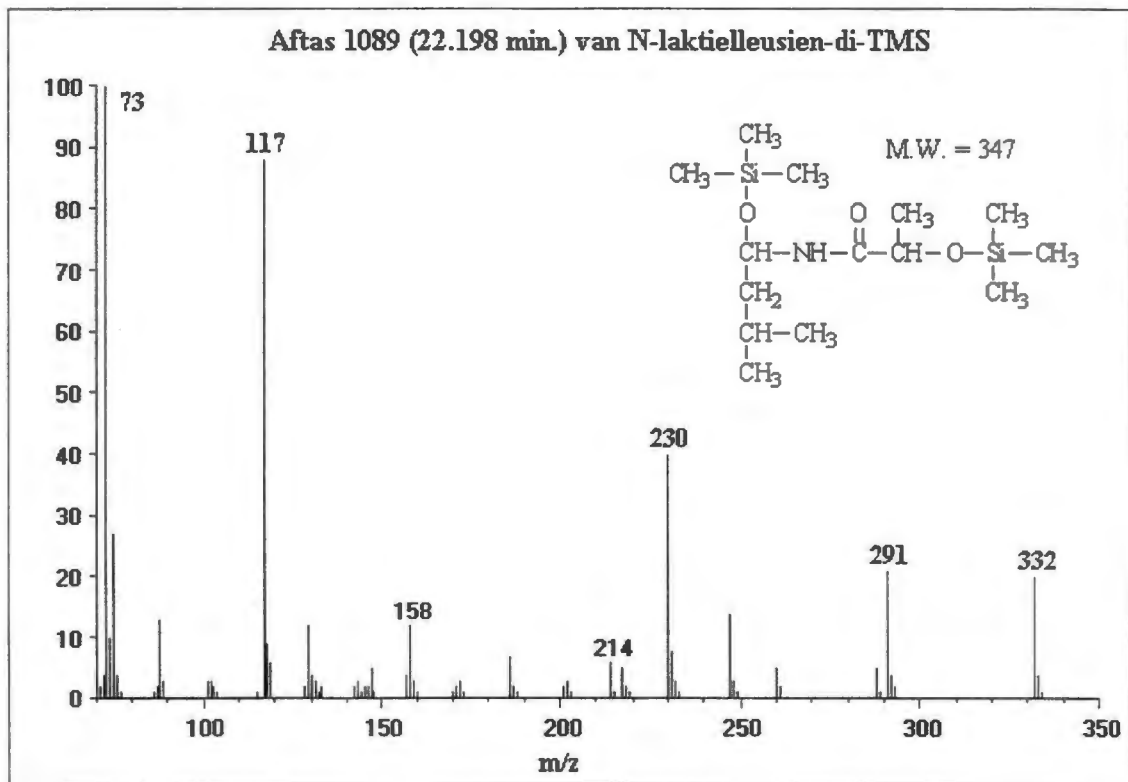
Metaboliete	EM	OH	BM	Pasiënt MM (mmol/mol kreat.)				
				1	2	3	4	5
<i>N</i> -Laktielleusien	4,23	4,80	3,31	40,6	38,2	66,0	22,9	19,2
<i>N</i> -Laktielisoleusien	1,02	1,25	spoor	13,8	spoor	11,6	6,7	7,7
<i>N</i> -Laktielvalien	spoor	spoor	spoor	spoor	spoor	spoor	spoor	spoor

Die uitskeidingspatroon van die *N*-laktielkonjugate van die vertakteketting-aminosure by die onderskeie MSUD-pasiënte is bykans identies aan dié van die *N*-asetielkonjugate van die vertakteketting-aminosure, hoewel die konsentrasies by veral pasiënt MM veel laer is. Weer eens het pasiënt MM ongeveer 'n tienvoudige hoër konsentrasie *N*-laktielkonjugate uitgeskei en soos in die geval van *N*-asetielkonjugate was leusien die beste en valien die swakste substraat. Die moontlikheid dat dieselfde ensiem beide die asetilering en laktieleringsreaksies kataliseer, kan nie uitgesluit word nie.

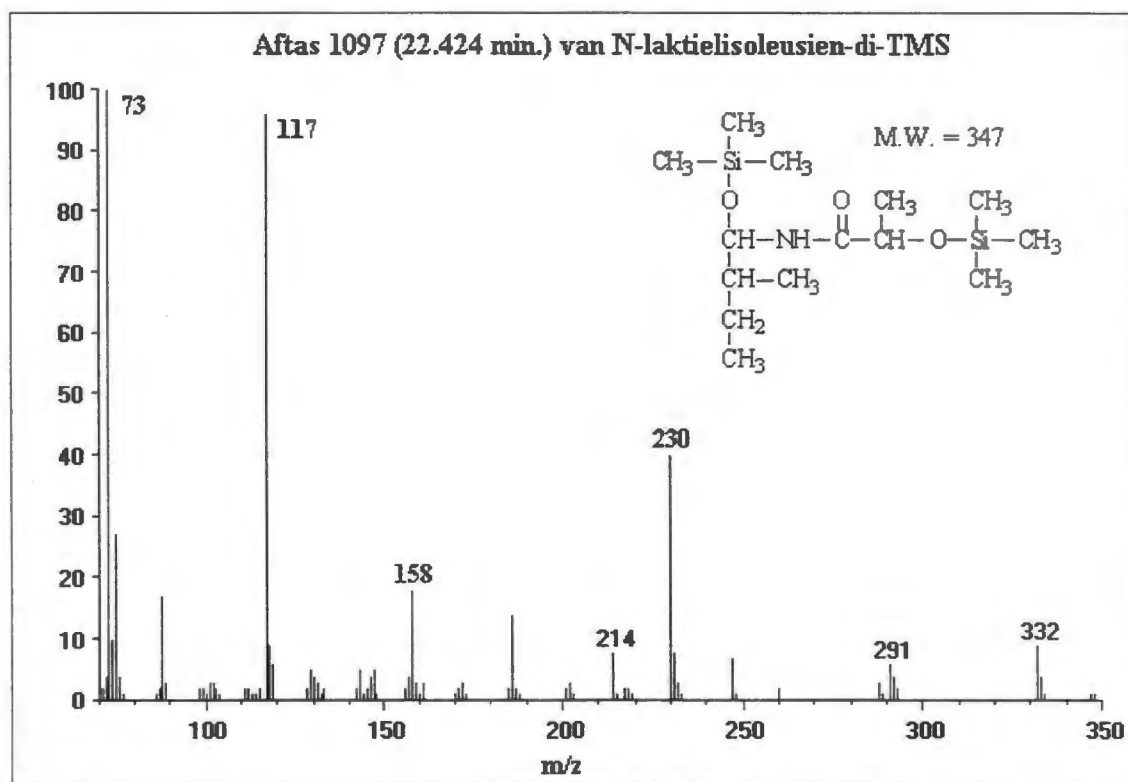
Die massaspektrums van hierdie verbindings word in figure 4-4, 4-5 en 4-6 weergegee. Al die *N*-laktiel-vertakteketting-aminosuur-di-TMS-derivate word gekenmerk deur die sterk 117 ame-fragment. Hierdie 117 ame-fragment is afkomstig vanaf die laktielgedeelte van die onderskeie aminosuurkonjugate. Al die konjugate lewer ook M - 15 ame-fragment (318 ame-fragment in die geval van *N*-laktielvalien en 332 ame in die geval van *N*-laktielleusien en -isoleusien). Die M - 117 ame-fragment (M - COOTMS) kom ook voor in die spektrums van al drie die verbindings. In die geval van *N*-laktielvalien-di-TMS word 'n 144 ame-fragment gevorm. In die geval van *N*-laktielleusien en -isoleusien word die ooreenstemmende fragment van 158 ame gevorm.



Figuur 4-4 Massaspektrum van *N*-laktielvalien-di-TMS



Figuur 4-5 Massaspektrum van *N*-laktielleusien-di-TMS



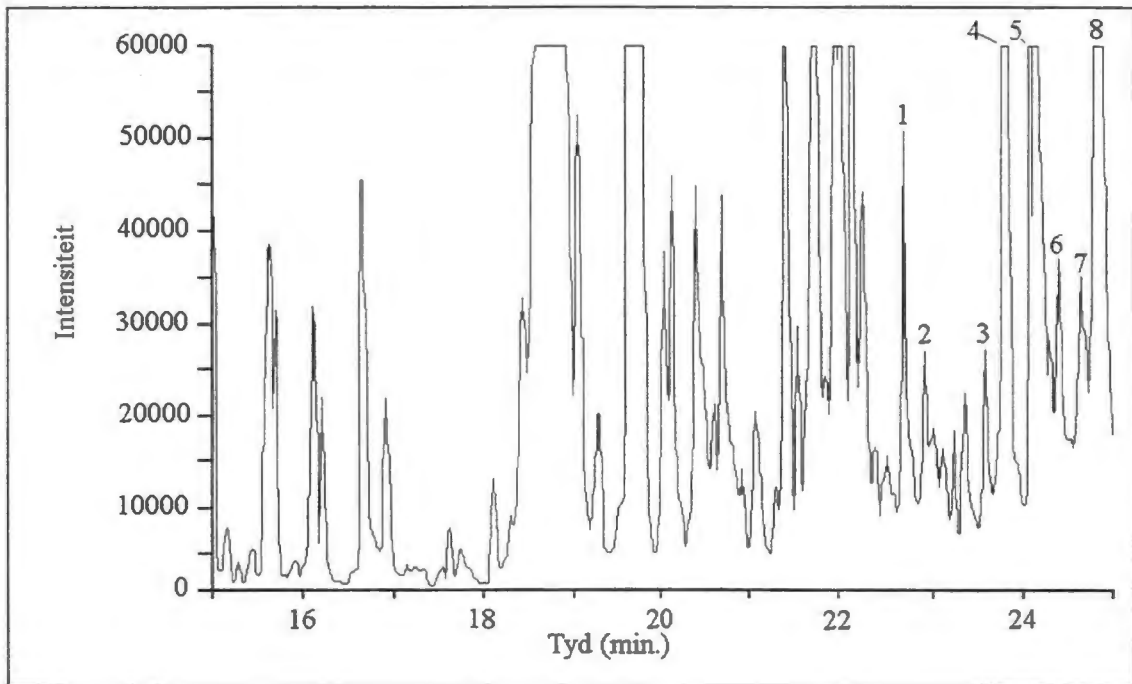
Figuur 4-6 Massaspektrum van *N*-laktielisoleusien-di-TMS

4.2.3. Konjugate van die vertakteketting-aminosure met 2-hidroksi-isovaleriaansuur

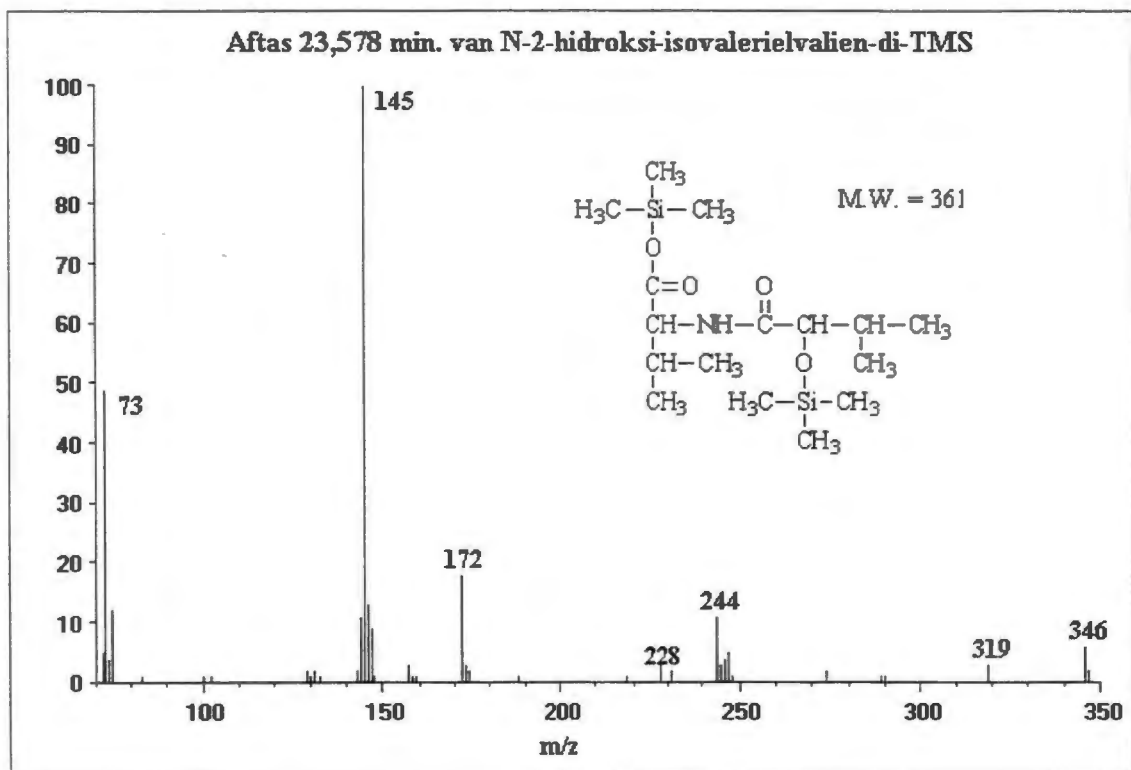
Die konjugering van 2-hidroksi-isovaleriaansuur met die vertakteketting-aminosure is reeds bespreek deur Hagenfeld en Naglo (1987: 77). Aangesien die konjugering van 2-hidroksi-isokaproësuur en 2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur met die vertakteketting-aminosure ook opgespoor is en later bespreek word, word hierdie *N*-2-hidroksi-isovaleriel-vertakteketting-aminosuurkonjugate verder bespreek.

Die ensieme verantwoordelik vir die vorming van hierdie konjugate is nie bekend nie, hoewel dieselfde ensieme wat vir die vorming van die laktielkonjugate verantwoordelik is, waarskynlik ook die vorming van die 2-hidroksi-isovaleriaansuurkonjugate kan kataliseer.

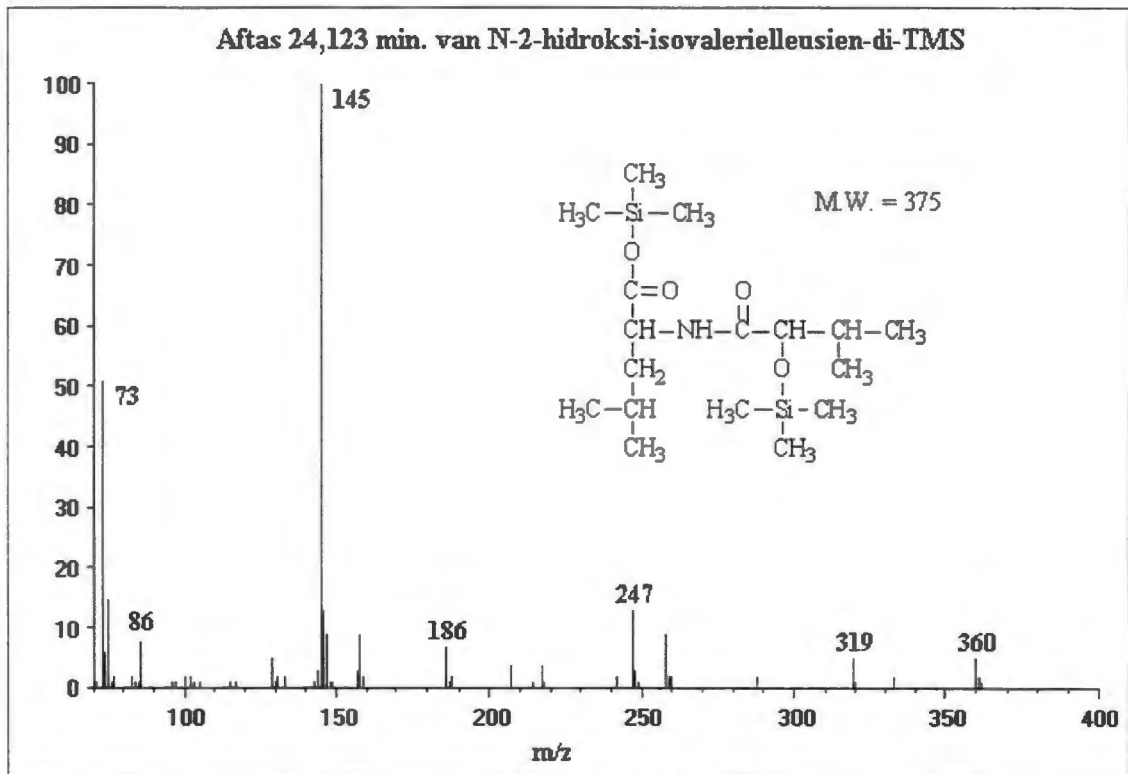
Van hierdie konjugate is opgespoor in die urine van al die pasiënte wat ondersoek is tydens hierdie studie. Die eerste drie konjugate wat bespreek word, is die konjugate wat gevorm word uit 2-hidroksi-isovaleriaansuur met valien, leusien en isoleusien. Van die 2-hidroksi-isovaleriaansuur-vertakteketting-aminosuurkonjugate kon al drie konjugate, naamlik *N*-2-hidroksi-isovalerielvalien, *N*-2-hidroksi-isovalerielleusien en *N*-2-hidroksi-isovalerielisoleusien, opgespoor word. Die spektrums van hierdie verbindings soos verkry met 'n massaspektrometer word in figure 4-8, 4-9 en 4-10 weergegee. Figuur 4-7 dui die elueringsposisies van *N*-2-hidroksi-isovalerielvalien, -leusien en -isoleusien op die totale ionchromatogram aan.



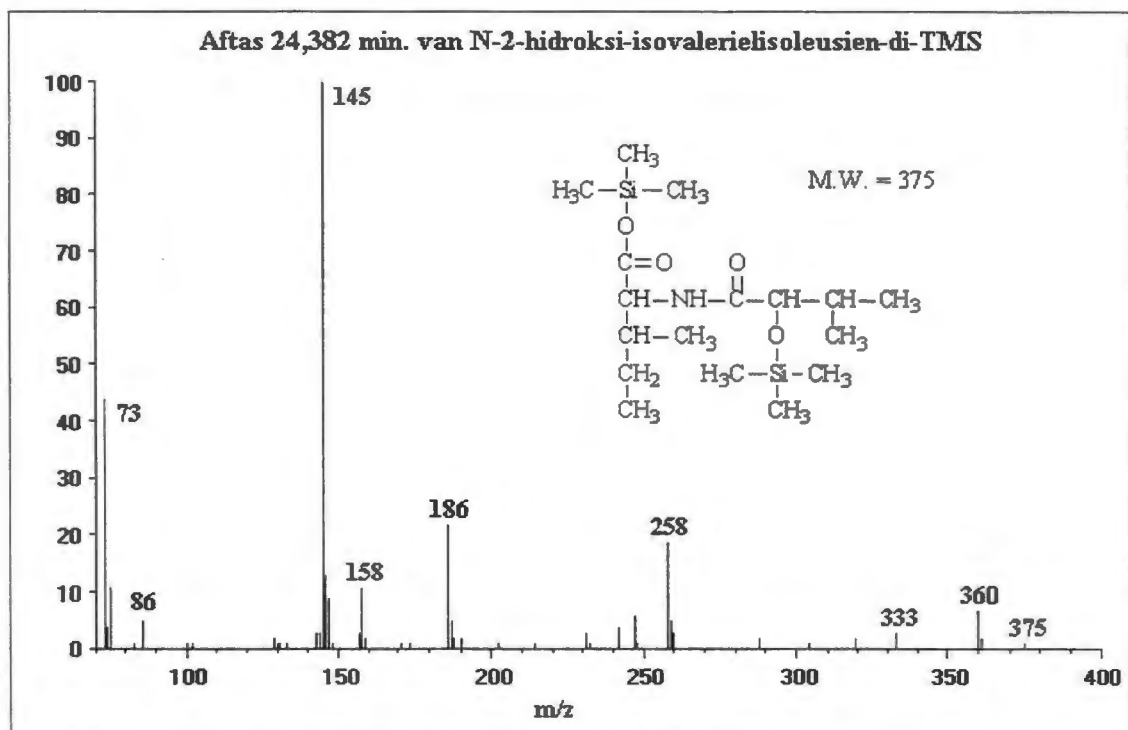
Figuur 4-7 Totale ion chromatogram vanaf 15 tot 25 minute om die elueringstyd van die onderskeie TMS-derivate van die *N*-2-hidroksi-isovaleriël-vertakteketting-aminosuurkonjugate aan te dui. 1: *N*-Laktielleusien; 2: *N*-Laktielisoleusien; 3: *N*-2-Hidroksi-isovaleriëlvalien; 4: Akoniensuur; 5: *N*-2-Hidroksi-isovaleriëlleusien; 6: *N*-2-Hidroksi-isovaleriëlisoleusien; 7: Hipuursuur; 8: Sitroensuur



Figuur 4-8 Massaspektrum van *N*-2-hidroksi-isovaleriëlvalien-di-TMS



Figuur 4-9 Massaspektrum van N-2-hidroksi-isovalerielleusien-di-TMS



Figuur 4-10 Massaspektrum van N-2-hidroksi-isovalerielisoleusien-di-TMS

Soos uit figure 4-7, 4-8 en 4-9 waargeneem kan word, lewer die fragmentasie van al drie die TMS-derivate van die konjugate 'n sterk fragment by 'n massa van 145 ame. Hierdie fragment is afkomstig van die 2-hidroksi-isovaleriële gedeelte van die konjugaat ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCHOSi}(\text{CH}_3)_3$). By al drie die konjugate kan ook 'n M -15 ame-fragment waargeneem word.

Die konsentrasies van hierdie drie konjugate word in Tabel 4-6 aangedui.

Tabel 4-6 Urinêre konsentrasies van die *N*-2-hidroksi-isovaleriële-vertakteketting-aminosuurkonjugate. Pasiënt MM is gemonitor oor 'n tydperk van vier maande en hierdie resultate is aangedui as monster 1 tot 5

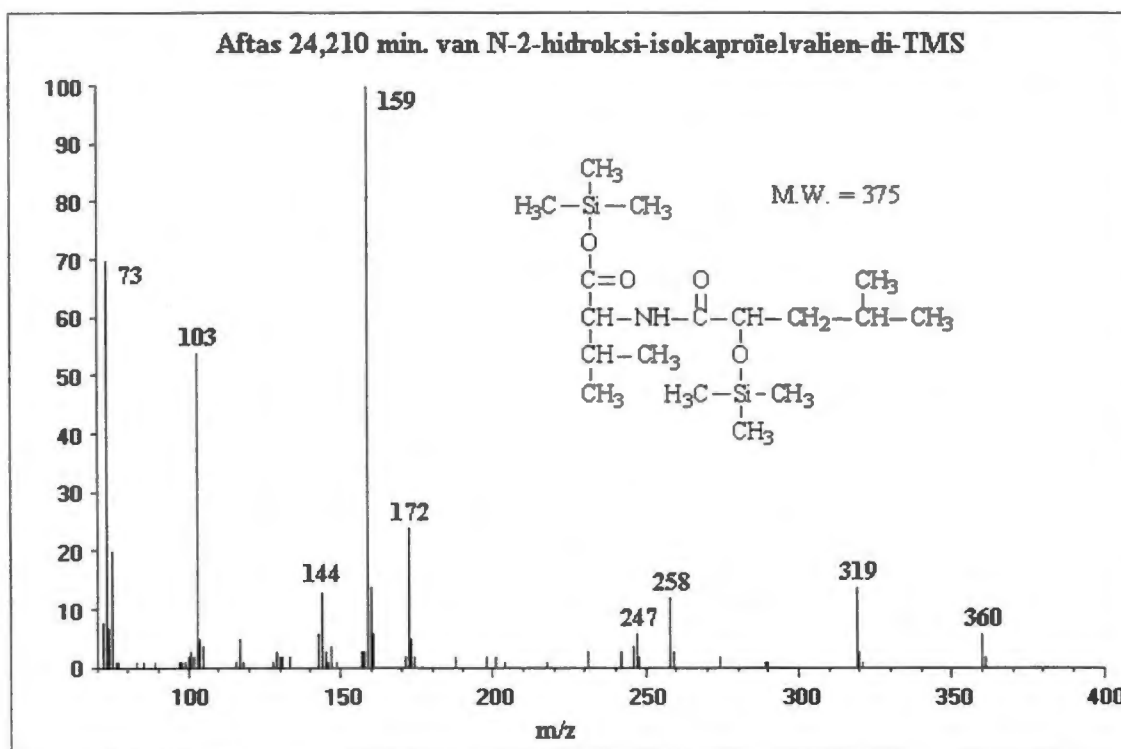
Metaboliete (mmol/mol kreat.)	EM	OH	BM	Pasiënt MM (mmol/mol kreat.)				
				1	2	3	4	5
<i>N</i> -2-HIVLEU	1,26	1,28	1,27	89,6	145,5	136,5	39,6	49,0
<i>N</i> -2-HIVISOLEU	Spoor	Spoor	Spoor	19,9	60,2	28,1	8,3	10,7
<i>N</i> -2-HIVVAL	Spoor	Spoor	Spoor	24,0	41,5	37,2	8,9	10,0

(*N*-2-HIVLEU = *N*-2-Hidroksi-isovaleriëleusien; *N*-2-HIVISOLEU = *N*-2-Hidroksi-isovaleriëleisoleusien; *N*-2-HIVVAL = *N*-2-Hidroksi-isovaleriëlevalien)

Uit die resultate is dit duidelik dat die 2-hidroksi-isovaleriële-vertakteketting-aminosuurkonjugate in hoër konsentrasies uitgeskei word as die *N*-laktiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate. 'n Moontlike verklaring hiervoor is dat die 2-hidroksi-isovaleriëleaansuur by hierdie MSUD-pasiënte in hoër konsentrasies voorkom as melksuur. Verder is dit ook duidelik dat die konsentrasies van die *N*-2-hidroksi-isovaleriële-vertakteketting-aminosuurkonjugate by pasiënt MM afhanklik is van die 2-hidroksi-isovaleriëleaansuurkonsentrasie. Uit die resultate wil dit ook voorkom of valien in hierdie konjureringsreaksies 'n beter substraat vorm as in die *N*-asetiel- en *N*-laktielkonjureringsreaksies. Leusien bly egter die beste substraat vir die reaksie, gevolg in hierdie geval deur valien en dan isoleusien.

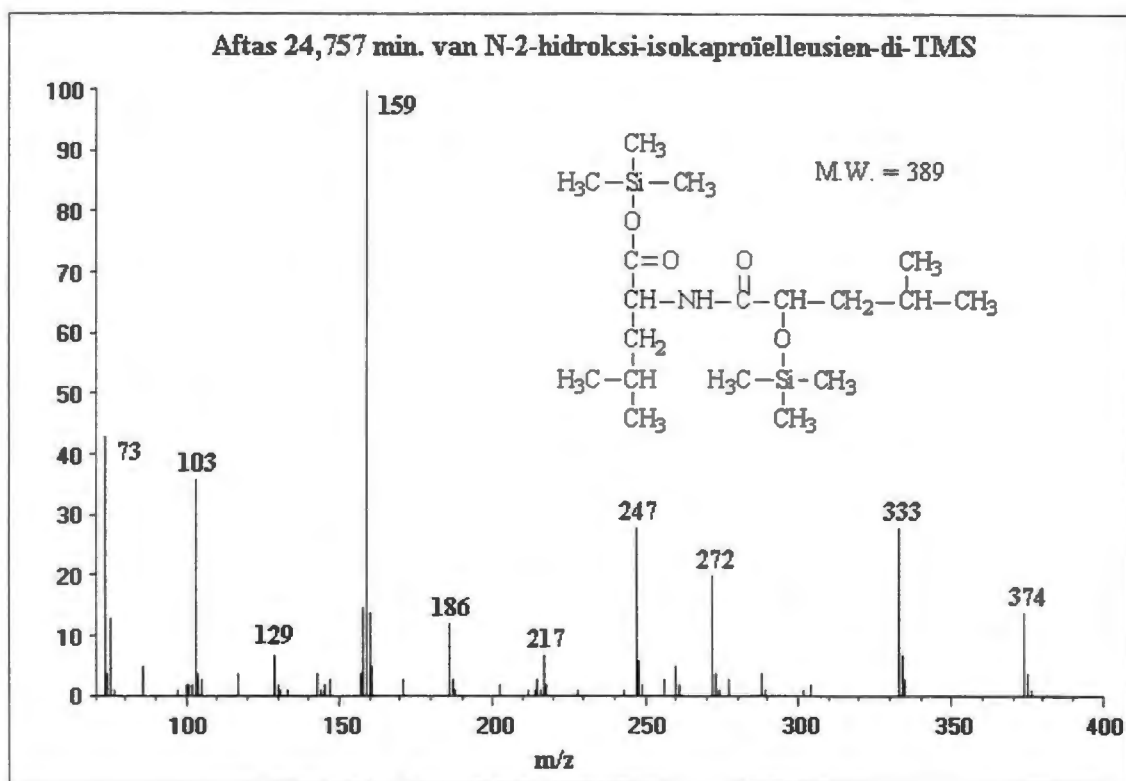
4.2.4. Konjugate van die vertakteketting-aminosure met 2-hidroksi-isokaproësuur

Soortgelyk aan die konjugering van 2-hidroksi-isovaleriaansuur met die vertakteketting-aminosure, soos bespreek deur Hagenfeldt en Naglo (1987: 77), kan verwag word dat 2-hidroksi-isokaproësuur ook aan die konjugeringsreaksies met die vertakteketting-aminosure kan deelneem. Hierdie drie konjugate is ook opgespoor in die urine van die MSUD-pasiënte wat ondersoek is. In hierdie geval het ko-eluering en baie lae konsentrasies van die metaboliete egter die gebruik van die vooraf gefraksioneerde urienmonsters noodsaaklik gemaak². Die massaspektrums van die TMS-derivate van *N*-2-hidroksi-isokaproëilvalien, *N*-2-hidroksi-isokaproëilleusien en *N*-2-hidroksi-isokaproëilsoleusien word onderskeidelik in figure 4-11, 4-12 en 4-13 weergegee. Hierdie verbindings elueer ongeveer 'n minuut later as die *N*-2-hidroksi-isovaleriel-vertakteketting-aminosuurkonjugate op die totale ionchromatogram. Die sinteses is uitgevoer soos bespreek in Hoofstuk 3, afdeling 3.4.8.2.

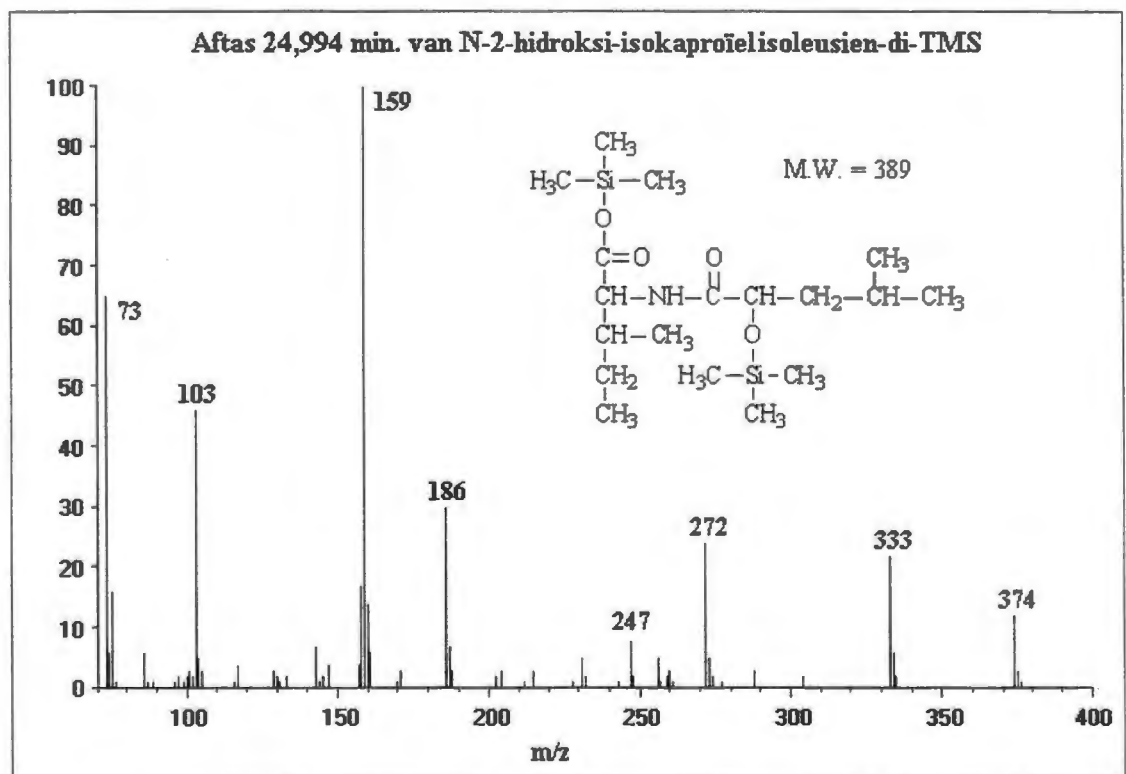


Figuur 4-11 Massaspektrum van *N*-2-hidroksi-isokaproëilvalien-di-TMS

² Hierdie metaboliete is nie kwantifiseerbaar nie.



Figuur 4-12 Massaspektrum van *N*-2-hidroksi-isokaproïelleusien-di-TMS



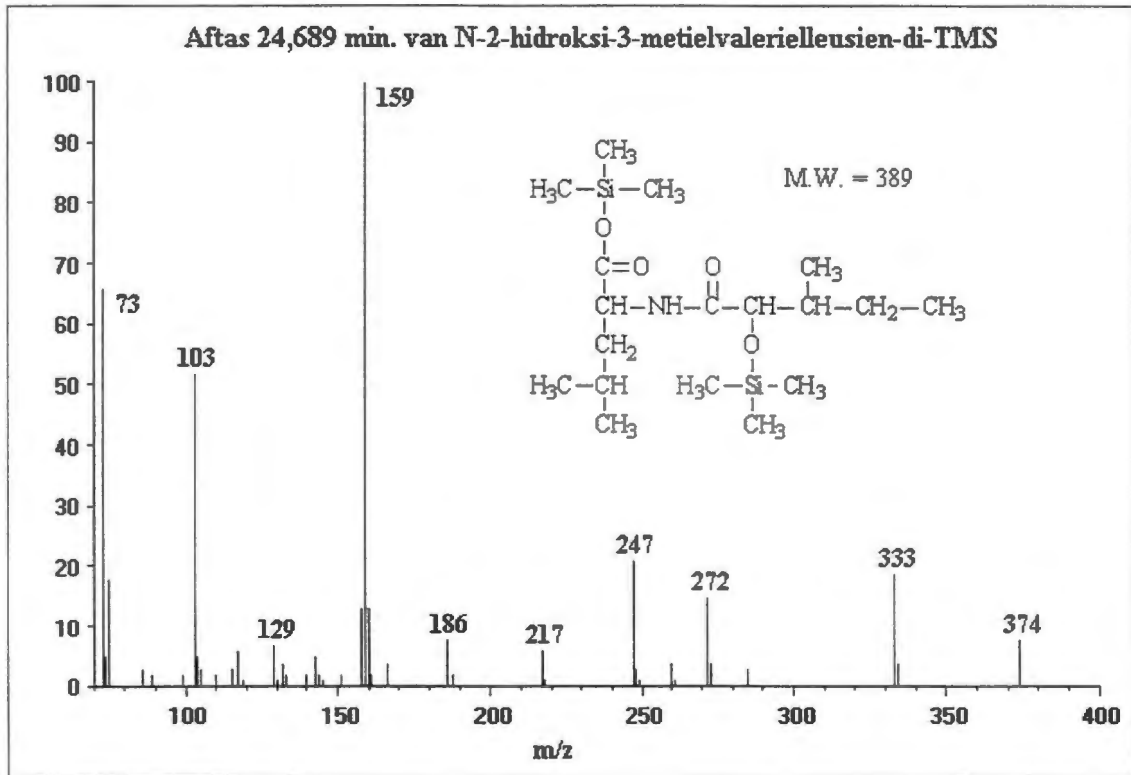
Figuur 4-13 Massaspektrum van *N*-2-hidroksi-isokaproïelisoleusien-di-TMS

Hierdie TMS-derivate van die *N*-2-hidroksi-isokaproïel-vertakteketting-aminosuurkonjugate lewer 'n sterk unieke piek by 'n massa van 159 ame. Soortgelyk as in die geval van die *N*-2-hidroksi-isovaleriel-vertakteketting-aminosuurkonjugate, is hierdie fragment afkomstig van die 2-hidroksi-isokaproïelgedeelte $((\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3)$ van die konjugaat. Hierdie konjugate lewer ook 'n *M* - 15 ame-fragment asook 'n fragment met 'n massa van 103 ame van onbekende oorsprong. Ander prominente fragmente wat gevorm word, is 'n *M* - 56 ame en 'n *M* - 117 ame-fragment.

4.2.5. Konjugate van die vertakteketting-aminosure en 2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur

Na verwagting behoort die vorming van die 2-hidroksi-3-metielvaleriel-vertakteketting-aminosuurkonjugate ook plaas te vind. Die voorkoms van twee van die drie moontlike konjugate kon egter nie met sekerheid bepaal word nie. Die rede hiervoor is dat die konsentrasies, indien enige, so laag is dat 'n sterk spektrum nie verkry kon word nie. Slegs *N*-2-hidroksi-3-metielvalerielleusien kon opgespoor word, moontlik as gevolg van die hoër konsentrasie waarin leusien gewoonlik voorkom by MSUD-pasiënte in vergelyking met die valien en isoleusien. Die spektrum van die TMS-derivaat van hierdie konjugaat word in Figuur 4-14 weergegee. Hierdie metaboliet het ongeveer 1,2 minute na *N*-2-hidroksi-isovalerielvalien geëlueer op die totale ionchromatogram soos aangedui in Figuur 4-7.

Soortgelyk aan die spektrums van die *N*-2-hidroksi-isokaproïel-vertakteketting-aminosuurkojugate lewer hierdie konjugaat ook 'n sterk fragment by 'n massa van 159 ame. Die *M* - 15 ame, *M* - 56 ame, *M* - 117 ame en 103 ame-fragmente kom ook by hierdie konjugaat voor.



Figuur 4-14 Massaspektrum van *N*-2-hidroksi-3-metielvalerielleusien-di-TMS

N-2-Hidroksi-3-metielvalerielleusien kon slegs in spoorhoeveelhede opgespoor word en was dit nie moontlik nie moontlik om die verbindings te kwantifiseer nie³. Soos reeds genoem, kan die afwesigheid van twee van die drie *N*-2-hidroksi-3-metielvaleriel-vertakteketting-aminosuurkonjugate moontlik toegeskryf word aan die relatief lae konsentrasies 2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, isoleusien en valien in vergelyking met die konsentrasies 2-hidroksi-isovaleriaansuur en leusien. 'n Ander moontlikheid is dat 2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur nie 'n goeie substraat is vir die ensiem of ensieme verantwoordelik vir die konjugering nie.

4.2.6. Opsomming en bespreking van konjugeringsreaksies

Soos in die inleiding (vergelyk Hoofstuk 4, afdeling 4.1) bespreek is, kan verskeie konjugeringsreaksies plaasvind waarby die vertakteketting-aminosure betrokke is. Sommige van hierdie metaboliete is reeds bekend, terwyl ander metaboliete nie bekend is nie. Diagramme 4-2, 4-3 en 4-4 toon die metaboliete wat onderskeidelik uit

³ Nie kwantifiseerbaar

valien, leusien en isoleusien gevorm kan word. In elk van die figure word die metaboliete wat wel opgespoor is, uitgewys deur dié metaboliete donker te druk. Die metaboliete wat nie opgespoor kon word nie, word kursief gedruk.

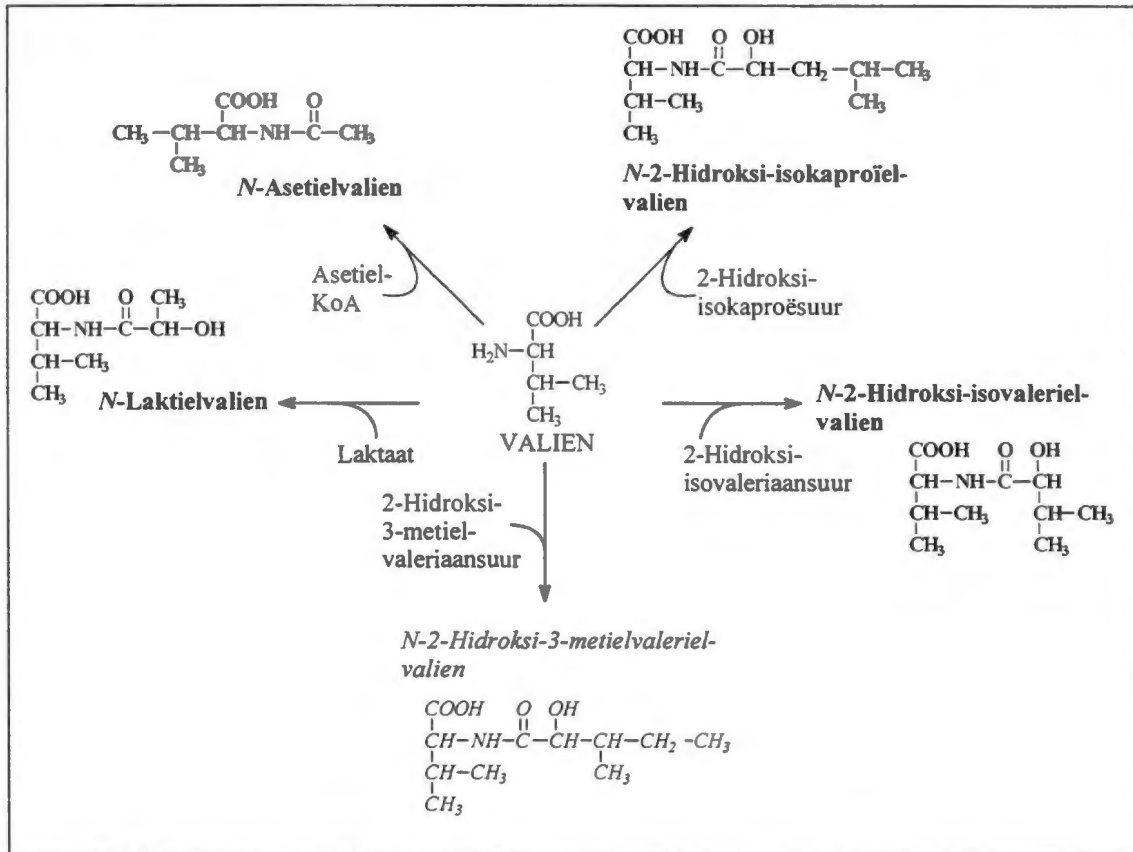


Diagram 4-2 Metaboliete wat gevorm word (donker) en moontlik gevorm kan word (kursief) vanuit die konjugering van valien

Soos gesien kan word uit Diagram 4-2, word meeste van die voorgestelde metaboliete wel gevorm. Die metaboliete wat nie opgespoor kon word in die urine van die MSUD-pasiënte wat ondersoek is nie, is *N-2-hidroksi-3-metielvalerielvalien*.

Uit diagramme 4-3 en 4-4 kan gesien word dat die meeste metaboliete ook in hierdie geval gevorm word. Die enigste metaboliet wat nie opgespoor kon word nie, is *N-2-hidroksi-3-metielvalerielisoleusien*.

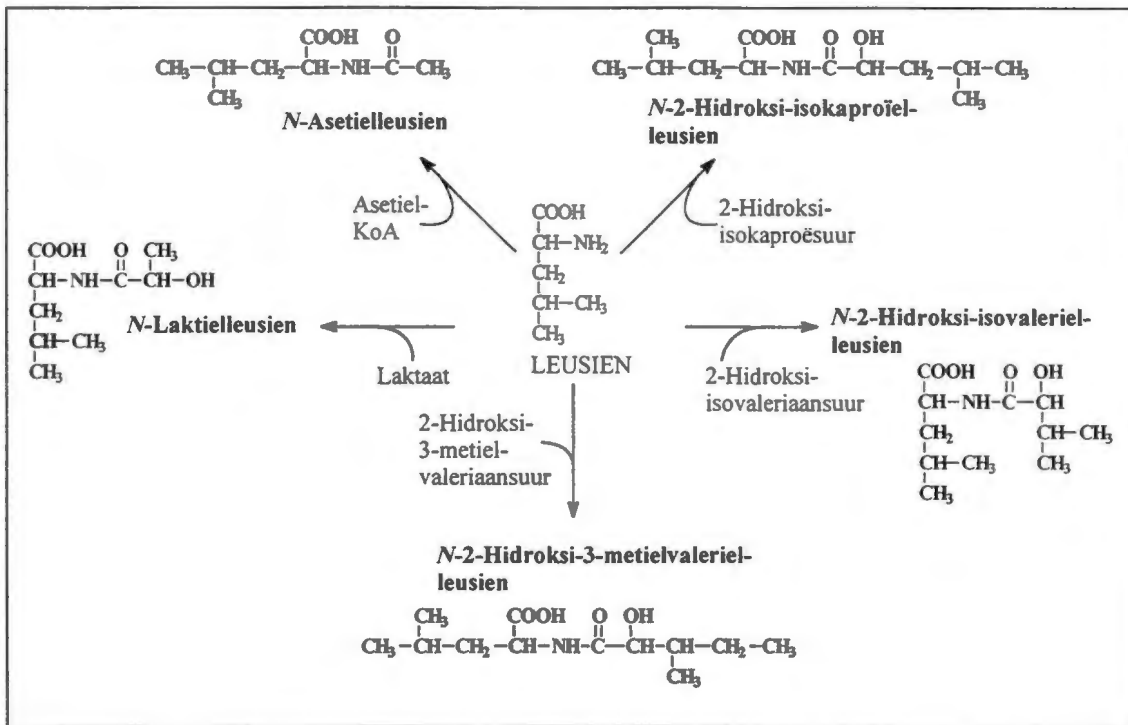


Diagram 4-3 Metaboliete wat gevorm word (donker) en moontlik gevorm kan word (kursief) vanuit die konjugering van leusien

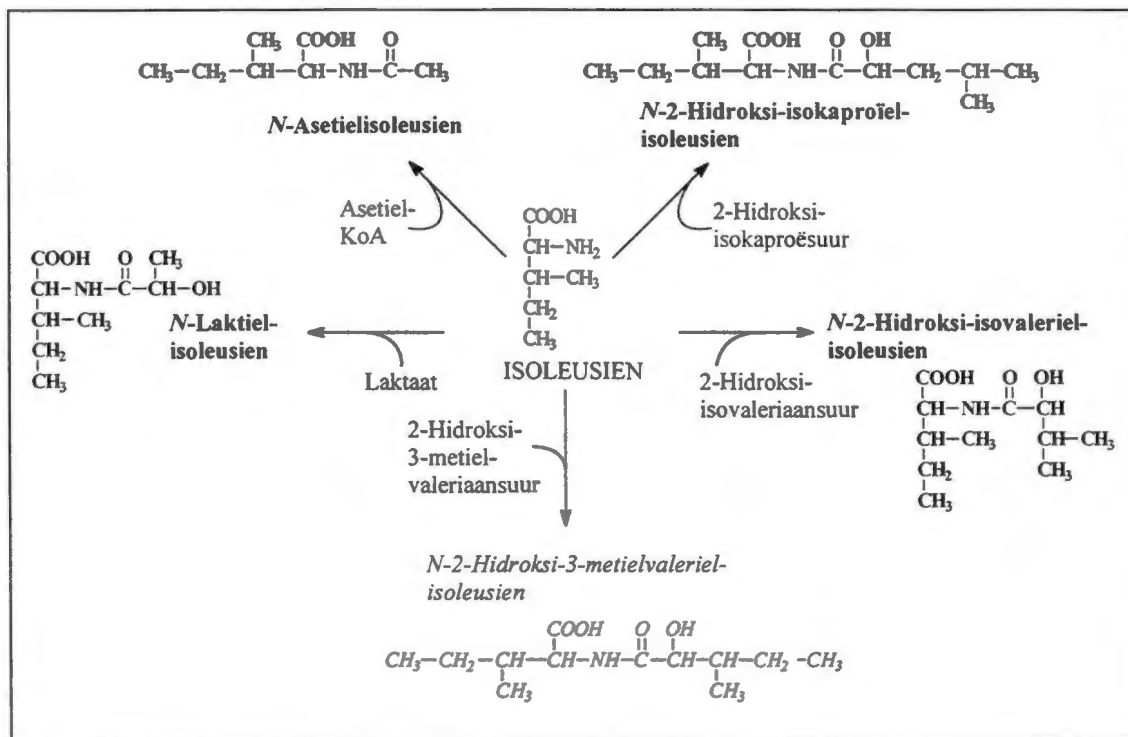


Diagram 4-4 Metaboliete wat gevorm word (donker) en moontlik gevorm kan word (kursief) vanuit die konjugering van isoleusien

Die konsentrasies van meeste metaboliëte kon ook bepaal word. Slegs enkele metaboliëte kom net in spoorhoeveelhede voor. Dit het voorgekom asof die *N*-asetiel- en *N*-laktielkonjugate in ongeveer gelyke konsentrasies voorkom. By pasiënt MM is dit egter nie die geval nie. By hierdie pasiënt kom die *N*-asetielkonjugate in hoër konsentrasies voor as die *N*-laktielkonjugate. Hierdie verskynsel kan nie toegeskryf word aan ketose en dus verhoogde asetiel-KoA konsentrasies nie, aangesien pasiënt MM nie ketoties was nie. Hoewel pasiënt MM ongeveer tienvoudig hoër konsentrasies *N*-laktielkonjugate as die ander pasiënte uitskei, is hierdie *N*-laktielkonjugate se konsentrasies in die urine ongeveer tienvoudig laer as die *N*-asetielkonjugate se konsentrasies by pasiënt MM. Soos reeds genoem, is die konsentrasies *N*-laktiel- en *N*-asetielkonjugate in die urine van die ander pasiënte ongeveer dieselfde.

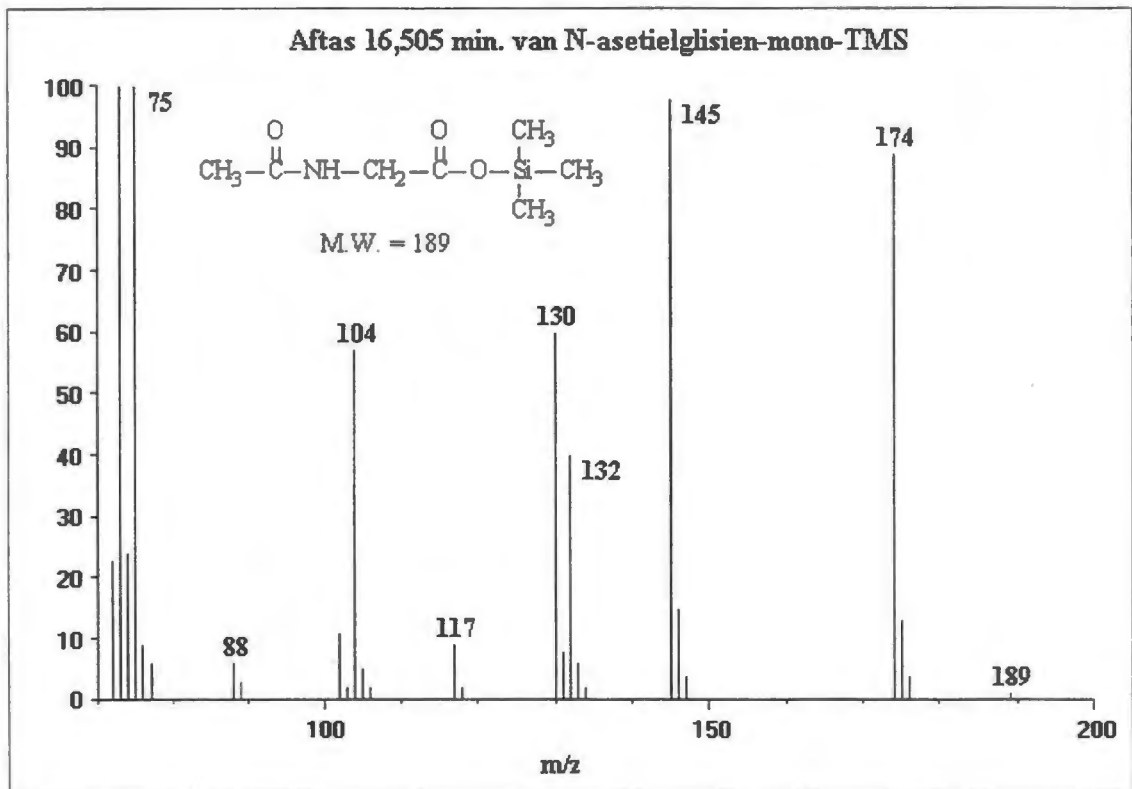
In die geval van die *N*-laktiel- en *N*-asetielkonjugate is melksuur en asetiel-KoA (as gevolg van ketose) nie by enige van die pasiënte verhoog nie. Pasiënt MM skei egter baie hoër konsentrasies vertakteketting-aminosure in sy urine uit, wat moontlik die verhoogde konsentrasies *N*-laktiel- en *N*-asetielkonjugate by hierdie pasiënt kan verklaar. Die *N*-2-hidroksi-isovalerieelkonjugaatkonsentrasies in die urine van pasiënt MM is ongeveer drie keer hoër as die konsentrasies van die *N*-laktielkonjugate in sy urine, wat moontlik toegeskryf kan word aan die verhoogde konsentrasie 2-hidroksi-isovaleriaansuur. By al die pasiënte is die konsentrasies *N*-2-hidroksi-isovalerieelkonjugate egter in dieselfde orde. Hierdie data dui dus daarop dat daar wel twee verskillende ensieme is wat die konjureringsreaksies (*N*-laktiel- en *N*-asetielkonjugate met een ensiem en *N*-2-hidroksi-isovalerieelkonjugate met 'n tweede ensiem) kataliseer.

Die meeste konjureringsreaksies is afhanklik van die KoA-voorganger vir die vorming van die konjugate. Daar is geen metaboliese weg bekend wat verbindings soos 2-hidroksi-isovalerieel-KoA of 2-hidroksi-isokaproïel-KoA kan vorm nie. In die geval van die *N*-geasetileerde- en *N*-laktielkonjugate, kan asetiel-KoA en laktiel-KoA (Mienie, 1994:163) wel gevorm word wat as substrate in die reaksies kan optree. Uit

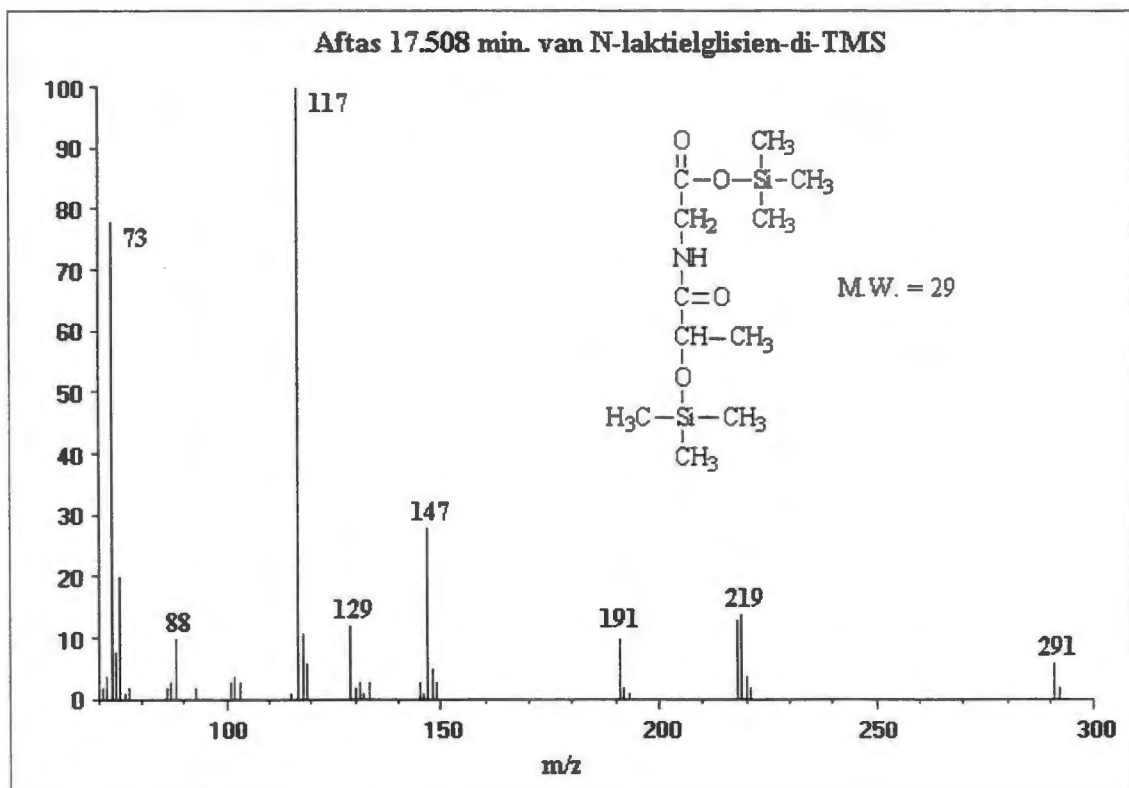
hierdie inligting kan slegs voorgestel word dat die konjugate gevind in hierdie studie deur twee verskillende ensieme gekataliseer word.

N-Asetielkonjugate kom bykans in alle metaboliese afwykings voor (Bremer *et al.*, 1981:3) en is beskryf vir bykans alle moontlike aminosure, terwyl *N*-laktielkonjugate, sover bekend, slegs in MSUD-pasiënte beskryf is en 2-hidroksi-isovalerielkonjugate sowel as die ander vertakteketting-2-hidroksisuur-analoë vanselfsprekend net by MSUD voorkom. Daarom is in hierdie studie dan ook aandag gegee aan ander *N*-laktiel- en *N*-2-hidroksi-isovalerielkonjugate van aminosure wat nie tradisioneel by MSUD-pasiënte verhoog is nie maar wat van nature in hoë konsentrasies voorkom, byvoorbeeld glisien.

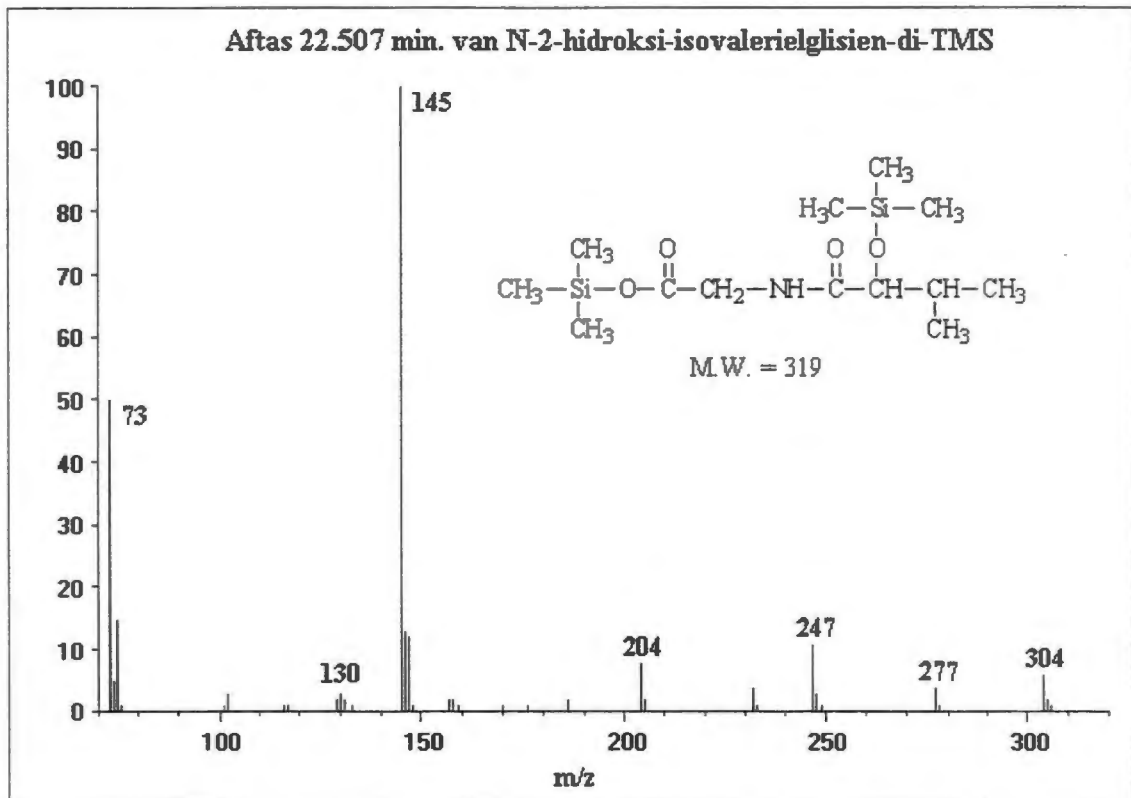
Die teenwoordigheid van *N*-asetielglisien en -alanien en *N*-laktielglisien en -alanien asook *N*-2-hidroksi-isovalerielglisien en -alanien is ondersoek. Die glisienkonjugate van *N*-asetiel-, *N*-laktiel- en *N*-2-hidroksi-isovaleriel was wel teenwoordig in maklik opspoorbare konsentrasies in die urine van die MSUD-pasiënte, terwyl geen alanienkonjugate opgespoor kon word nie. Dit is egter bekend dat alanien gewoonlik in lae konsentrasies by MSUD-pasiënte voorkom (Haymond *et al.*, 1973:500; Haymond *et al.*, 1978:398). Die massaspektrums van TMS-derivate van *N*-asetiel-, *N*-laktiel- en *N*-2-hidroksi-isovalerielglisien word in figure 4-15, 4-16 en 4-17 weergegee.



Figuur 4-15 Massaspektrum van *N*-asetielglisien-mono-TMS



Figuur 4-16 Massaspektrum van *N*-laktielglisien-mono-TMS



Figuur 4-17 Massaspektrum van *N*-2-hidroksi-isovalerielglisien-di-TMS

Die massaspektrum van *N*-asetielglisien lewer sterk fragmente by 174 ame ($M - 15$ ame), 145 ame ($M - 44$ ame) en 75 ame van onbekende oorsprong. Ander fragmente sluit in 'n 132 ame-fragment wat van onbekende oorsprong is, 'n 130 ame wat gevorm word deur die verlies van die CH_3CONH -gedeelte van die molekule en 'n 104 ame-fragment van onbekende oorsprong. Die massaspektrum van *N*-laktielglisien lewer 'n sterk 117 ame-fragment wat afkomstig is vanaf die laktielgedeelte van die molekule. Hierdie verbinding lewer ook 'n M^+ -fragment. Die massaspektrum van *N*-2-hidroksi-isovalerielglisien lewer 'n sterk 145 ame-fragment wat afkomstig is vanaf die 2-hidroksi-isovalerielgedeelte van die verbinding. Die verbinding lewer ook 'n $M - 15$ ame-fragment. Ander fragmente wat gevorm word, is fragmente van 247 ame, 204 ame en 'n swakker 232 ame-fragment.

Indirek is die konjugeringsensieme ook ondersoek deur ondersoek in te stel na die vorming van 3-hidroksi-butirielkonjugate. 3-Hidroksi-butiriel-KoA is 'n bekende intermediêr in die ketogeneseweg wat uitsluitlik in die mitochondria voorkom. Daar kon egter geen spoor van enige 3-hidroksi-butirielkonjugate in die urine van die

MSUD-pasiënte opgespoor word nie, wat daarop dui dat die ensiem verantwoordelik is vir die konjugering van melksuur en 2-hidroksi-isovaleriaansuur spesifiek is vir die 2-hidroksisuur en dat die KoA-esters nie noodwendig noodsaaklik is of die konjugering verbeter nie. Dit is ook nie onmoontlik dat die konjugeringsensiem 'n sitoplasmiese ensiem kan wees nie, aangesien 3-hidroksi-butiriel-KoA hoofsaaklik in hoë konsentrasies binne die mitochondria aangetref word.

Die moontlikheid van spontane vorming van die *N*-asielkonjugate tydens berging van die urine of tydens die ekstraksieproses is uitgeskakel deur die aminosuur met die relevante organiese sure te inkubeer by verskeie toestande van variërende temperatuur en pH. Die inkubasie is ook uitgevoer in 'n urine-omgewing by verskillende pH en temperatuur. Die inkubasie het geensins tot die vorming van enige van die bespreekte *N*-asielkonjugate gelei nie. Dit wil dus voorkom of die spontane vorming geen bydrae lewer tot die vorming van hierdie konjugate nie.

Dit wil dus voorkom asof die vorming van *N*-asielkonjugate moontlik van ensiematiese oorsprong kan wees. Hierdie hipotese is op glisien-*N*-asilase getoets deur die relevante organiese sure en aminosuur as substrate te gebruik. Die bepaling is uitgevoer soos bespreek deur Mawal en Qureshi (1994:1373 - 1379). 'n Reaksiemengsel is saamgestel wat bestaan het uit 'n TRIS-HCl buffer (pH 8), bees glisien-*N*-asilase, 500mM organiese suur en 500mM vertakketting-aminosuur. In een kontrole is een substraat uit die mengsel weggelaat en in 'n tweede kontrole is die ensiem uit die reaksiemengsel weggelaat. Na inkubasie is 'n normale organiese suurekstraksie op elk van die reaksiemengsels uitgevoer en geanaliseer met behulp van GC-MS soos bespreek is in Hoofstuk 3, afdeling 3.4.2 en afdeling 3.4.3. Geen van die bogenoemde reaksiemengsels het enige produk gevorm nie. Dit wil dus voorkom asof glisien-*N*-asilase nie die vorming van die *N*-asielkonjugate gekataliseer het nie.

4.2.7. Anaboliese weë wat geïnduseerde metaboliëte vanaf vertakteketting-aminosure kan vorm

Mienie (1994:40) het aangetoon dat die vertakteketting-aminosure as substrate kan optree vir reaksies wat tradisioneel van glisien as substraat gebruik maak. Hierdie tendens kan moontlik toegeskryf word aan die gemeenskaplike neutrale aard van die aminosure. Hoewel Mienie (1994:40) hoofsaaklik na glisien-*N*-asilase verwys, kan die vertakteketting-aminosure moontlik glisien ook in ander anaboliese reaksies vervang. Reaksies soos kreatiensintese en heemsintese maak ondermeer van glisien as substraat gebruik. As glisien in hierdie reaksies moontlik deur leusien, isoleusien of valien vervang word, mag dit nie net tot 'n groot verskeidenheid geïnduseerde metaboliëte lei nie, maar ook bydra tot die kliniese beeld van MSUD.

4.2.7.1. Kreatiensinteseweg

Normale kreatiensintese begin in die ureumsiklus waartydens glisien aan arginien gebind word om guanidinoasetaat en ornitien te vorm (Diagram 4-5). Die ensiem verantwoordelik vir hierdie stap is L-arginien:glisien amidinotransferase (EC. 2.1.4.1). Guanidinoasetaat word dan in die kreatiensinteseweg gebruik om kreatien te vorm soos uiteengesit is in Diagram 4-5 (Zubay, 1988:802; Murray *et al.*, 1996:341).

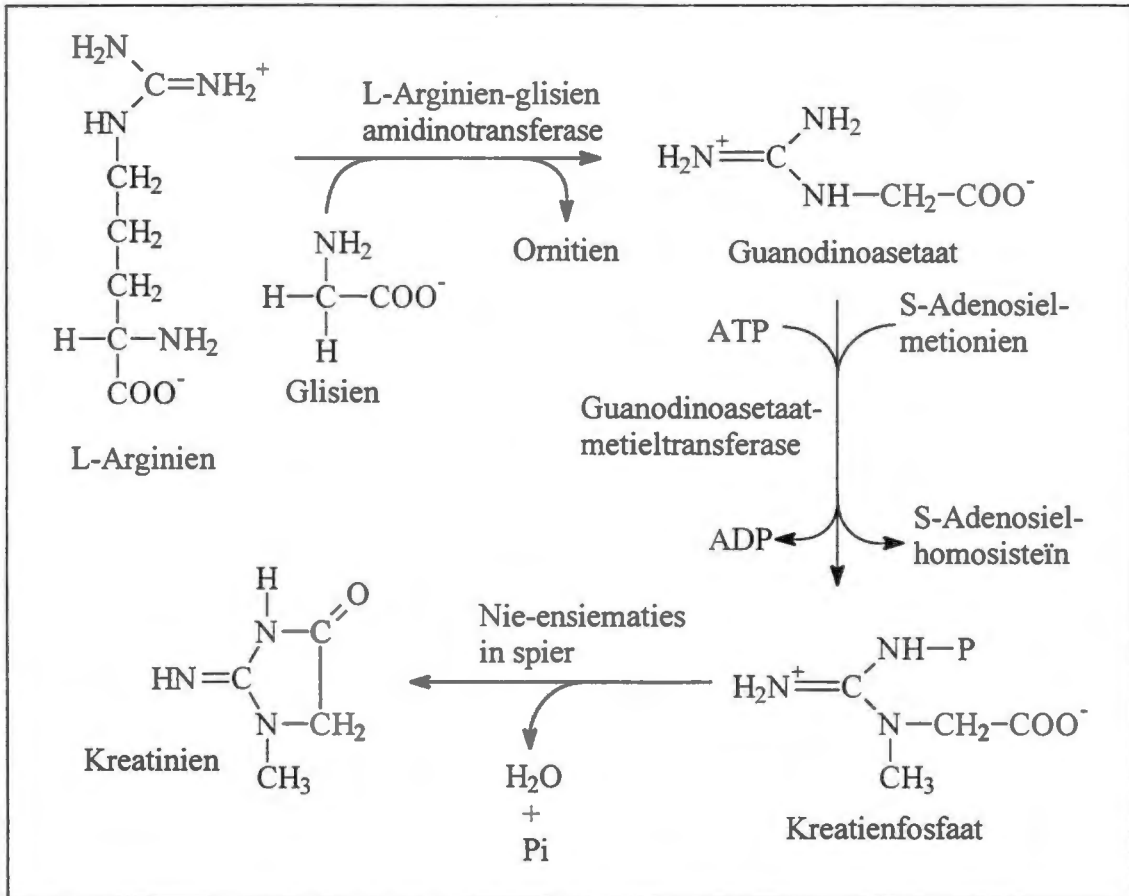


Diagram 4-5 Skematiese voorstelling van die normale kreatiensinteseweg

Die voorkoms van kreatien- en kreatinienanaloeë wat deur bogenoemde weg gevorm sal word indien die vertakteketting-aminosure glisien vervang, is in die urine van MSUD-pasiënte ondersoek. Hoewel die verbindings nie opgespoor word nie, is verbindings met bykans soortgelyke strukture wel in die urine van die pasiënte teen betreklik hoë konsentrasies geïdentifiseer. Hierdie verbindings is as 5-hidroksi-5-isopropielhidantoëin, 5-hidroksi-5-metielpropielhidantoëin en 5-hidroksi-5-isobutirielhidantoëin geïdentifiseer. Aangesien die struktuur van 5-hidroksi-5-isopropielhidantoëin, 5-hidroksi-5-metielpropielhidantoëin en 5-hidroksi-5-isobutirielhidantoëin soortgelyk is aan dié van kreatinien, word daar voorgestel dat hierdie metaboliëte gevorm word vanuit 'n analoeë kreatinienmetabolismeweg. Hierdie weg verskil van die normale kreatinienmetabolismeweg in die opsig dat die leusien, isoleusien en valienafgeleide van guanidinoasetaat egter nie soos in die normale kreatiensinteseweg gemetileer word nie. Die verbindings word waarskynlik eerder gefosforileer en ondergaan dan ringsluiting. Die moontlikheid bestaan ook dat die

metaboliëte direk ringsluiting kan ondergaan met die verlies van 'n molekule water. 'n Voorstelling van die gewysigde kreatinienmetabolismeweg, waar glisien met valien, leusien of isoleusien vervang word, word in Diagram 4-6 weergegee.

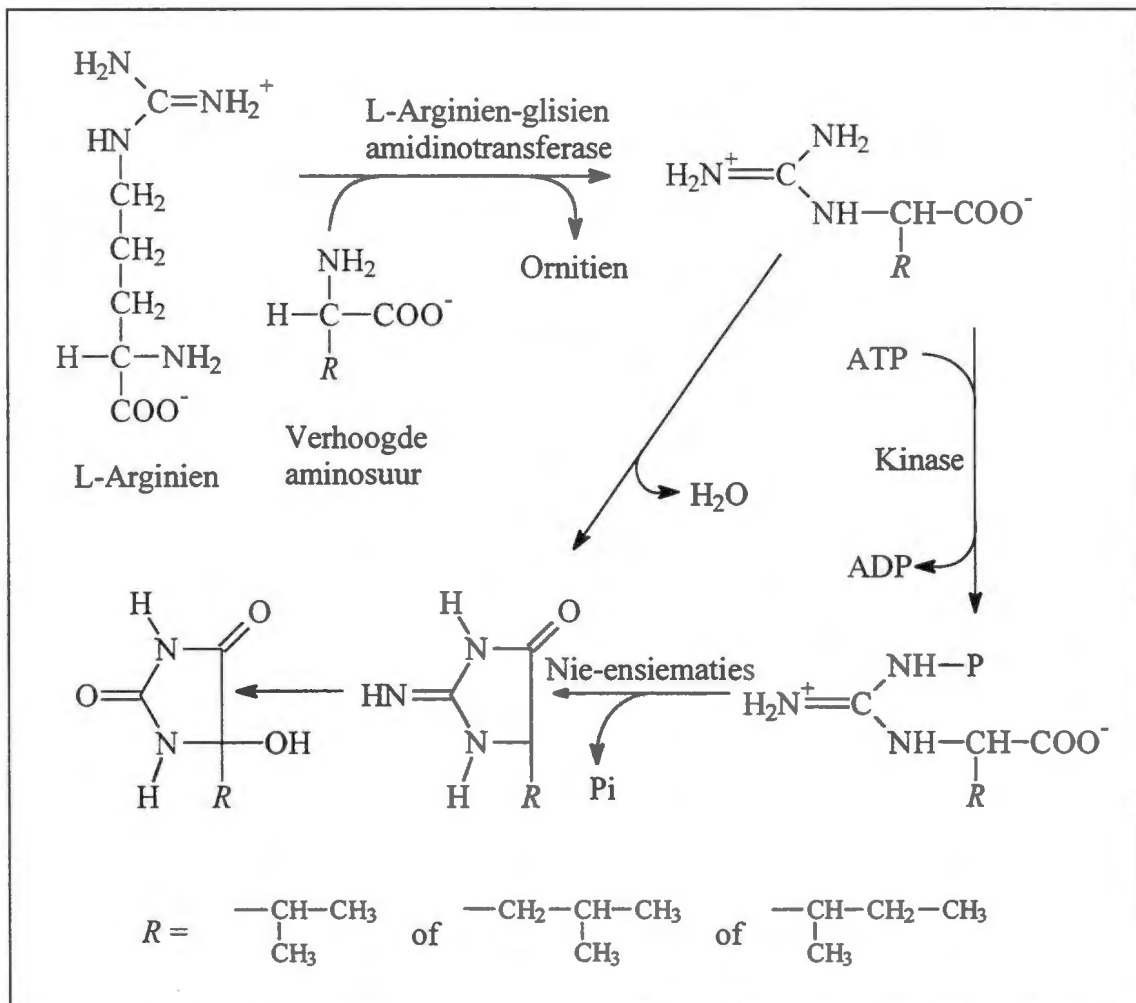


Diagram 4-6 Skematiese voorstelling van die gewysigde kreatiensintese-weg indien glisien met die vertakteketting-aminosure vervang word. Soos aangedui in bogenoemde diagram, kan die syketting (aangedui met R) enige van die syketting van die vertakteketting-aminosure voorstel

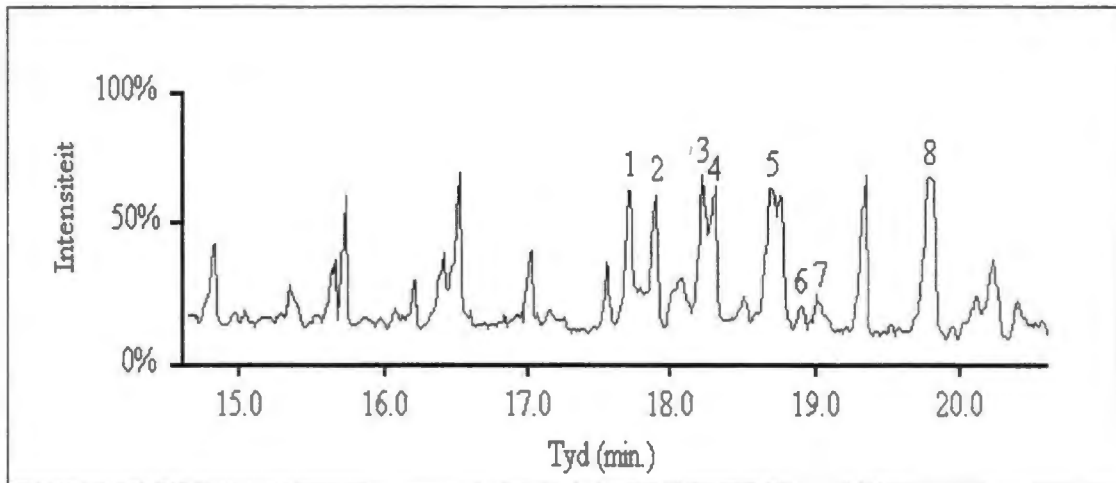
Indien hierdie meganisme wel verantwoordelik is vir die vorming van hierdie hidantoïenagtige verbindings, sou verwag kon word dat sommige van die intermediêre metaboliëte ook waargeneem kan word in die urine van MSUD-pasiënte. Geen intermediêre metaboliëte van die voorgestelde weg kon egter opgespoor word nie. Die moontlikheid dat die intermediêre nie uitgeskei word nie of dat die verbindings in baie lae konsentrasies voorkom, kan nie uitgesluit word nie. Daarom is die vorming van die produk *in vitro* in 'n volgende eksperiment nagegaan. L-Arginien:glisien

amidinotransferase is egter nie in die handel beskikbaar nie en dit moes dus eers uit beesnierweefsel geïsoleer word. 'n Gewysigde metode van Gross *et al.*, (1986:747 - 755) is gebruik om hierdie isolasie te doen. Vir die isolasie is van vars beesnierweefsel gebruik gemaak. Alle stappe is by 0 - 4°C uitgevoer. In die eerste stap is 'n homogenaat van die nierweefsel gemaak. Hierdie homogenaat is gesentrifugeer om die heel selreste te verwyder. Die tweede stap het die skeiding van die proteïene in die homogenaat behels deur gebruik te maak van 'n DEAE-kolom. Die metode van Gross *et al.*, (1986:747 - 755) het verdere suiweringsstappe aangedui wat vir die doel van hierdie eksperiment nie uitgevoer is nie.

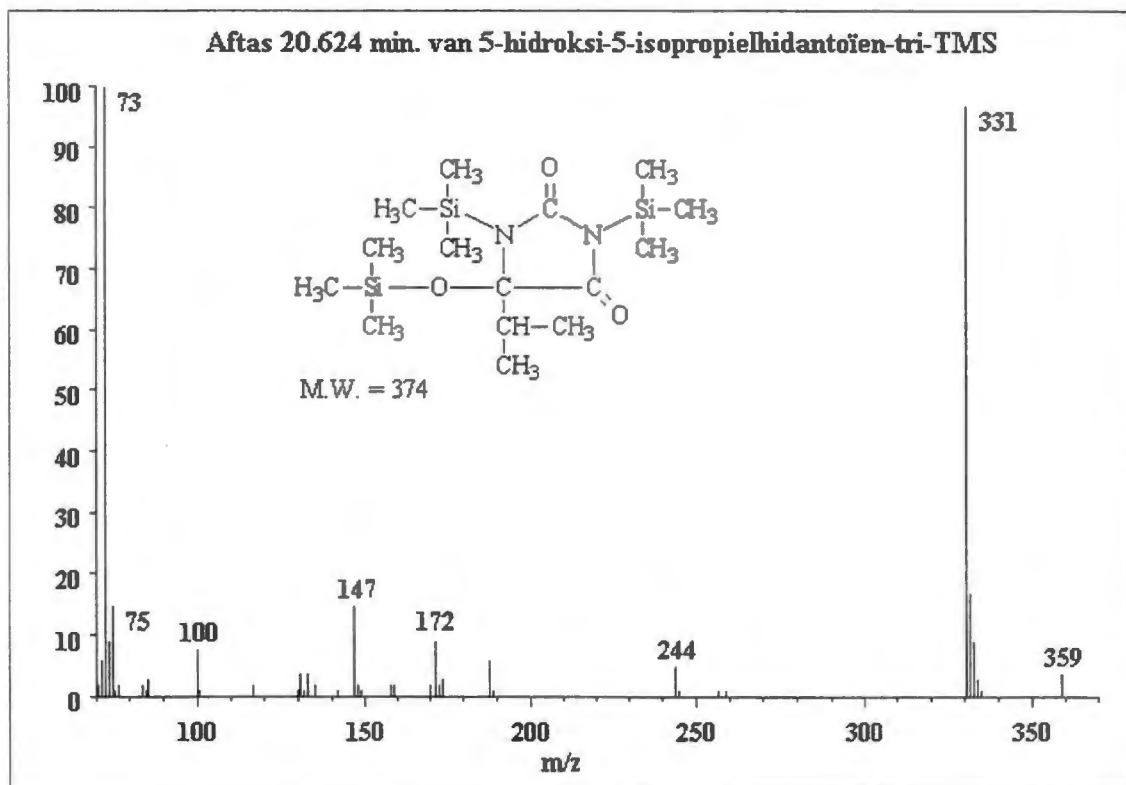
Reaksiemengsels is saamgestel om te toets of die ensiem wel valien, leusien en isoleusien as substraat kon gebruik. Die reaksies is gevolg deur die vorming van ornitien te monitor, volgens die metode van Van Pilsom *et al.*, (1970:277 - 286). Hierdie metode maak gebruik van die ninhidrienkleurreaksie. Vir 'n kontrole is die vorming van ornitien gevolg indien glisien (die normale substraat) gebruik word. Op hierdie wyse kon vasgestel word dat dié ensiem nie die geïnduseerde reaksie kataliseer nie. Dit wil dus voorkom asof die kreatiniensintese nie verantwoordelik is vir die vorming van hierdie hidantoïenagtige verbindings nie.

Tydens bogenoemde eksperiment is daar is egter van beesweefsel gebruik gemaak. Omdat die menslike ensiem nie getoets is nie, is dit moontlik dat hierdie verbindings wel op hierdie wyse in die mens gevorm kan word. Die moontlikheid dat die verbindings van ingewandsbakteriële hul oorsprong het, kan ook nie uitgesluit nie. Die metaboliete is wel geïdentifiseer deur die onderskeie verbindings chemies te sintetiseer. Hul onderskeie massaspektrums word in figure 4-19, 4-20 en 4-21 weergegee. Die massaspektrum in Figuur 4-22 kom ook in die urine van die MSUD-pasiënte voor. Hierdie verbinding word moontlik uit *allo*-isoleusien gevorm. Figuur 4-18 is 'n voorstelling van die totale ioonchromatogram vanaf 15 tot 20 minute van 'n organiese suurekstrak van urine van 'n MSUD-pasiënt om die elueringsposisie van 5-hidroksi-5-isopropielhidantoïen aan te toon.

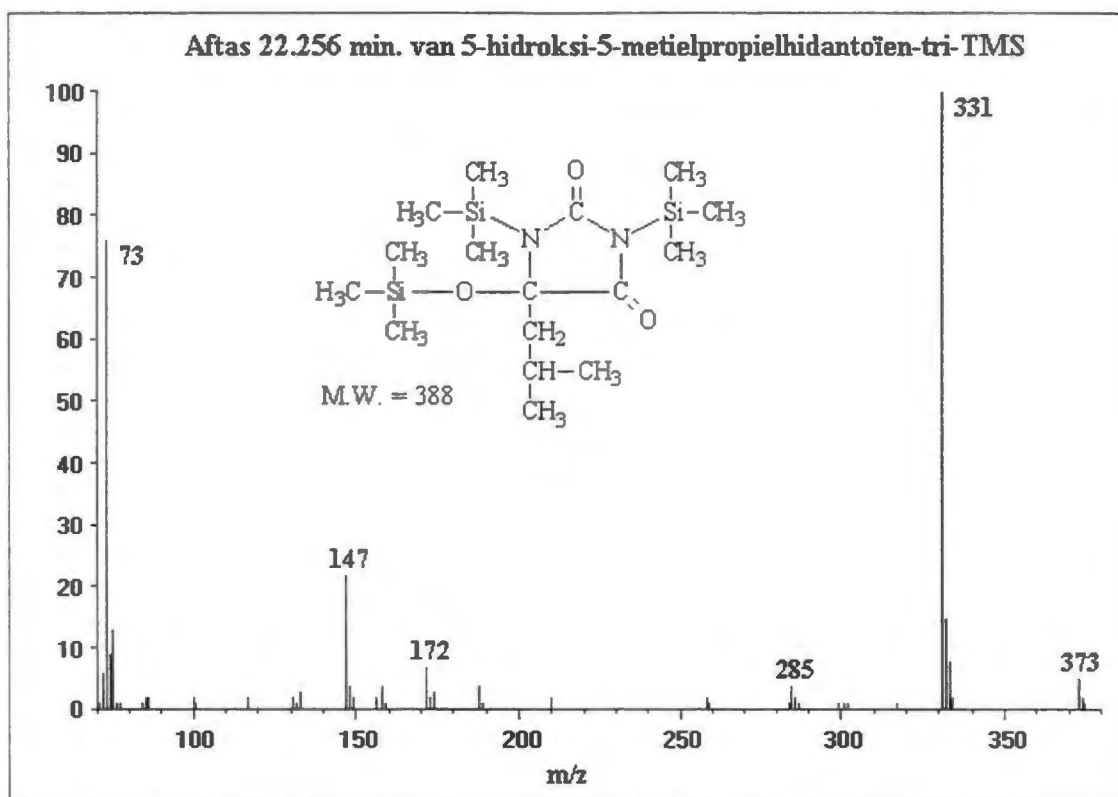
Die moontlikheid van spontane vorming word in Hoofstuk 5, afdeling 5.2.3 ondersoek.



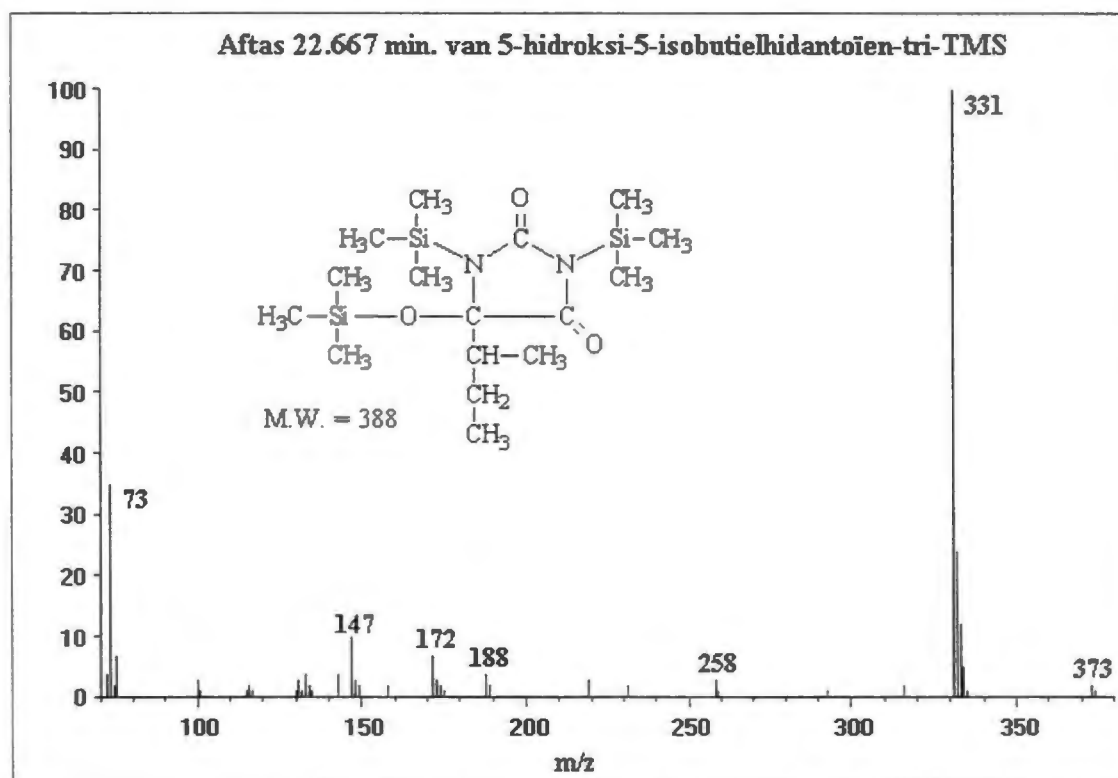
Figuur 4-18 Totale ion chromatogram om die elueeringsposisie van die 5-hidroksi-5-isopropielhidantoïen aan te toon. Die pieke is geïdentifiseer as 1: 2-hidroksi-glutaarsuur; 2: 5-hidroksi-5-isopropielhidantoïen; 3: *p*-hidroksi-fenielasynsuur; 4: onbekend; 5: onbekend; 6: *N*-laktielisoleusien; 7: onbekend; 8: akonitiensuur



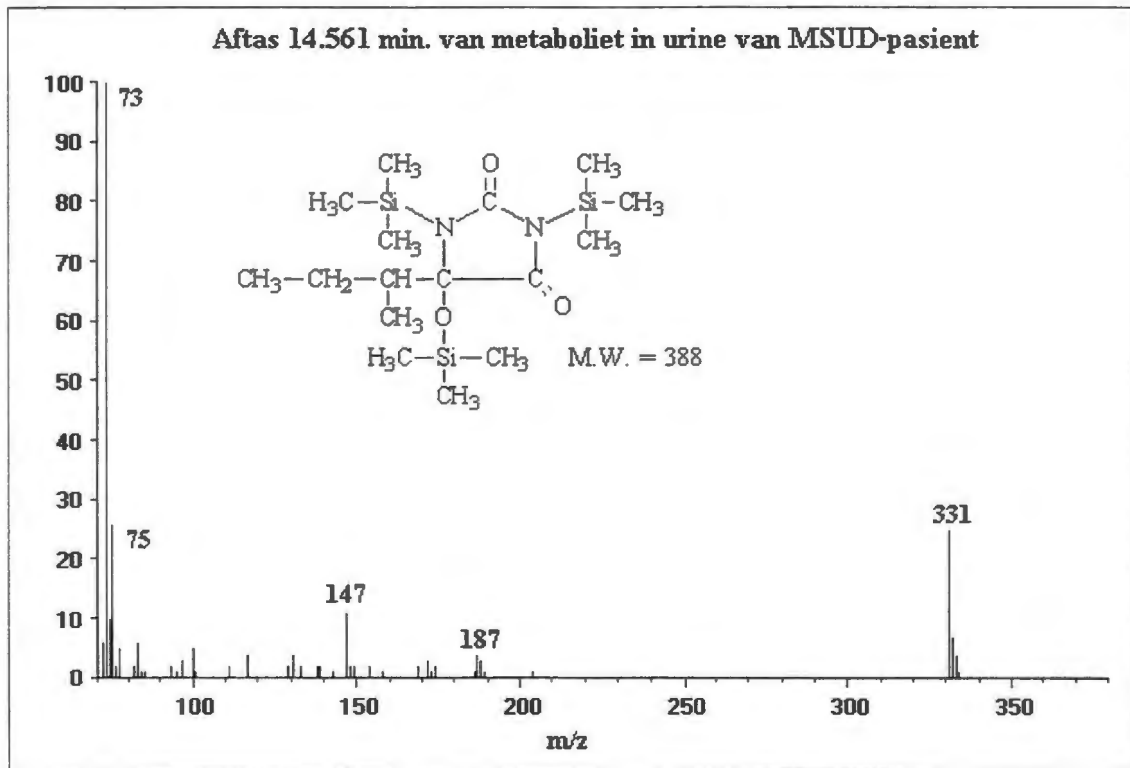
Figuur 4-19 Massaspektrum van 5-hidroksi-5-isopropielhidantoïen-tri-TMS



Figuur 4-20 Massaspektrum van 5-hidroksi-5-metielpropielhidantoïen-tri-TMS



Figuur 4-21 Massaspektrum van 5-hidroksi-5-isobutielhidantoïen-tri-TMS



Figuur 4-22 Massaspektrum van die metaboliet in die urine van 'n MSUD-pasiënt wat vermoedelik die hidantoïen-tri-TMS derivaat is wat vanaf *allo*-isoleusien gevorm word

Die konsentrasies van 5-hidroksi-5-isopropielhidantoïen, 5-hidroksi-5-metielpropielhidantoïen en 5-hidroksi-5-isobutirielhidantoïen word in Tabel 4-7 weergegee.

Tabel 4-7 Urinêre konsentrasies van 5-hidroksi-5-isopropielhidantoïen, 5-hidroksi-5-metielpropielhidantoïen en 5-hidroksi-5-isobutirielhidantoïen. (N/O = Nie opspoorbaar)

Metaboliete (mmol/mol kreat.)	EM	OH	BM	Pasiënt MM (mmol/mol kreat.)				
				1	2	3	4	5
5-Hidroksi-5-isopropielhidantoïen	15,3	126,4	41,6	N/O	N/O	1,6	1,1	N/O
5-Hidroksi-5-metielpropielhidantoïen	62,0	182,9	242,4	N/O	N/O	12,5	8,9	N/O
5-Hidroksi-5-isobutirielhidantoïen	72,2	683,8	277,5	N/O	N/O	2,6	1,3	N/O

Pasiënt BM en OH het 'n vierde hidantoïen, teen onderskeidelik 2,53 mmol/mol kreatinien en 14,44 mmol/mol kreatinien, uitgeskei

Uit bogenoemde resultate is dit duidelik dat pasiënt MM baie min en soms glad nie van die hidantoïenagtige metaboliete vorm nie, terwyl die ander pasiënte baie hoër konsentrasies in die urine uitskei. Pasiënt MM het hoër konsentrasies vertakteketting-aminosure uitgeskei as die ander pasiënte. Eersgenoemde het egter hoër konsentrasies vertakteketting-2-ketosure in hul urine uitgeskei in teenstelling met pasiënt MM, wat betreklik lae konsentrasies vertakteketting-2-ketosure uitgeskei het.

Om die meganisme waarop hierdie hidantoïenagtige metaboliete gevorm word, moontlik te verklaar, is voorgestel dat glisien deur die vertakteketting-aminosure in die kreatiensinteseveg vervang word. Nie een van die voorgestelde intermediëre kon opgespoor word nie. Verder is die ensiem wat moontlik hierdie reaksie kan kataliseer (L-arginien:glisien amidinotransferase) uit beesnierweefsel geïsoleer en getoets en is daar bevind dat dié ensiem ook nie die reaksie kataliseer nie. Indien hierdie weg moontlik was, kon verder verwag word dat die konsentrasies hidantoïenagtige metaboliete ook 'n verband behoort te toon met die konsentrasies vertakteketting-aminosure wat uitgeskei word in die urine van MSUD-pasiënte. Dit is egter nie die geval nie, aangesien by pasiënt MM hoër konsentrasies leusien, isoleusien en valien voorkom en die hidantoïenagtige metaboliete in lae konsentrasies voorkom of selfs afwesig kan wees. Dit wil dus uit die resultate voorkom of hierdie voorgestelde metaboliese weg nie verantwoordelik is vir die vorming van 5-hidroksi-5-isopropielhidantoïen, 5-hidroksi-5-metielpropielhidantoïen en 5-hidroksi-5-isobutirielhidantoïen nie. Die konsentrasies van die vertakteketting-2-ketosure wat in die urine van die MSUD-pasiënte voorkom, wat in hierdie studie gebruik is en die konsentrasies hidantoïenagtige metaboliete toon egter 'n korrelasie. Die moontlikheid dat die metaboliete dus vanaf die vertakteketting-2-ketosure gevorm kan word, word in Hoofstuk 5 verder ondersoek.

4.2.7.2. Heemsinteseveg

Geen geïnduseerde verbindings wat aan hierdie metaboliese weg toegeskryf kan word, kon opgespoor word nie.

4.2.8. Dekarboksilering van valien, leusien en isoleusien

Verbindings soos fenietielamien en tiramien kom onderskeidelik by PKU- en tirosinemie-pasiënte voor. Hierdie twee amiene word toegeskryf aan die dekarboksilering van hul aminosuuranaloë deur middel van 'n aminosuurdokarboksilase ensiem (White *et al.*, 1978:719 - 724) waarvan die aromatiese aminosuurdokarboksilase-ensiem die bekendste is. γ -Aminobottersuur word ook deur middel van 'n dekarboksilase-ensiem vanaf glutamiensuur gevorm. Die moontlike vorming van die amienanaloë van die vertakteketting-aminosure veral tydens defekte met hoë konsentrasies, is dus moontlik en is daarom ondersoek. Die vorming van hierdie amiene word skematies in Diagram 4-7 voorgestel.

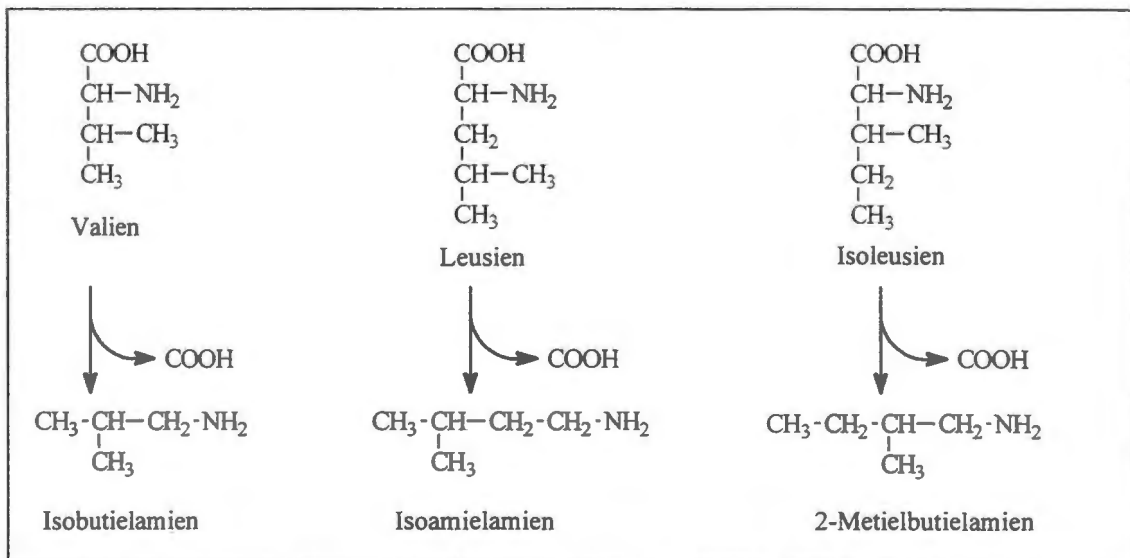
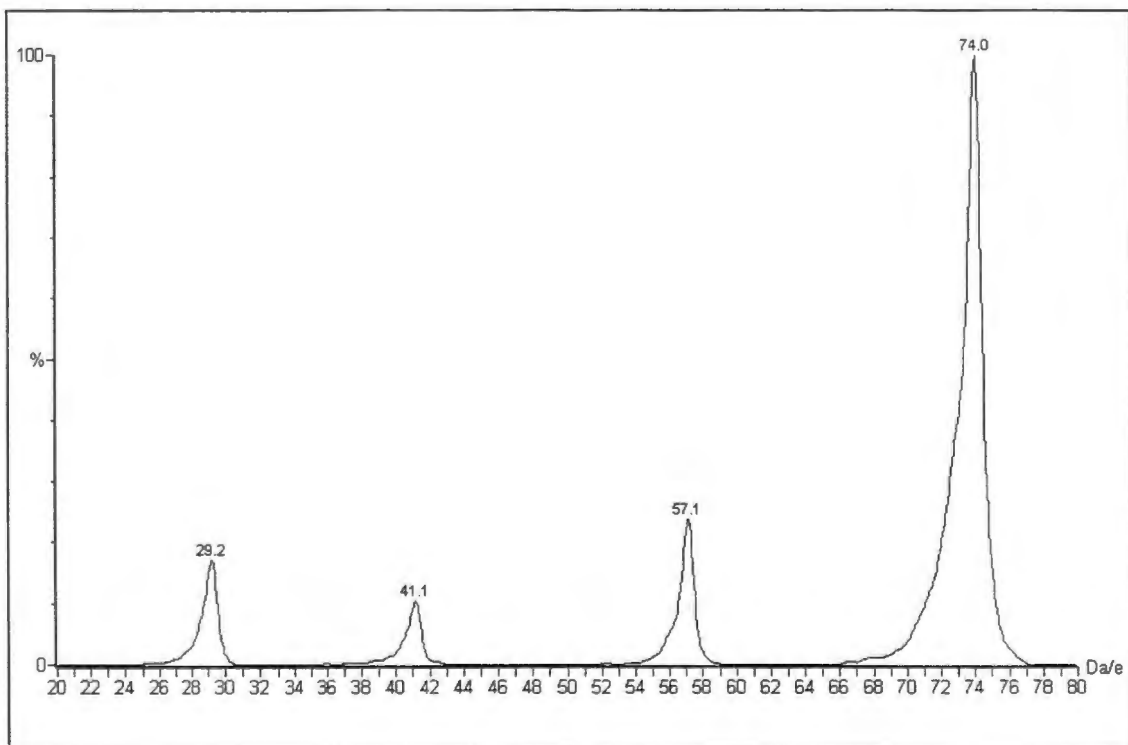


Diagram 4-7 Skematiese voorstelling van die vorming van die vertakteketting-amiene vanaf die ooreenstemende aminosure

Die amiene kon egter nie op die normale organiese suurekstraksie en GC-MS-metodes bepaal word nie. Deur gebruik te maak van 'n elektrosprei tandemmassaspektrometer (ES-MS-MS) -tegniek kon die amiene wel in spoorhoeveelhede opgespoor word. Die tegniek laat toe dat 'n urienmonster sonder enige voorbereiding of voorafbehandeling ontleed kan word omdat die monster direk in die bron van die analiseerder ingespuut word. Standaard van die amiene (isobutielamien, isoamielamien en 2-metielbutielamien) is met hierdie tegniek ontleed. Deur die eerste analiseerder van die ES-MS-MS in 'n selektiewe ionfase te gebruik en dan hierdie ione in die botsingsel

te fragmenteer (met behulp van argongas), kon die botsinggeïnduseerde fragmentspektrum (CID-spektrum) van molekules in die tweede analiseerder waargeneem word. Op hierdie wyse kon isobutielamien positief geïdentifiseer word in die urine van die MSUD-pasiënte wat in hierdie studie gebruik is. Isoamielamien en 2-metielpropielamien (afkomstig vanaf leusien en isoleusien onderskeidelik) kon nie positief geïdentifiseer word nie. Hierdie twee verbindings het dieselfde massa maar is 14 atoommassa-eenhede swaarder as isobutielamien. Omdat die ES-MS-MS die molekules op grond van hul massas onderskei, kan hierdie twee metaboliete se spektrums nie van mekaar onderskei word nie. Die spektrum van isobutielamien (afkomstig vanaf valien) soos bepaal met die standaard, word in Figuur 4-23 weergegee. Omdat die toestande wat met die ES-MS-MS tegniek gebruik word, nie standaard is vir alle molekules nie, word die waardes vir hierdie toestande wat gebruik is tydens die analise van die amiene in Tabel 4-8 weergegee.



Figuur 4-23 Massaspektrum van isobutielamienstandaard soos verkry met behulp van ES-MS-MS

Tabel 4-8 Die waardes soos gebruik met die ES-MS-MS vir die bepaling van isobutielamien

Funksie	Waarde
Konieselensspanning	15 Volt
Botsingsenergie	20 Volt
Kapilêre buisspanning	3,5 kVolt
Brontemperatuur	120°C

4.2.9. Opsomming en bespreking van geïnduseerde anaboliese weë met leusien, isoleusien en valien as uitgangstowwe

Soos in die inleiding bespreek is, kan verskeie metaboliete vanuit leusien, isoleusien en valien gevorm word. Diagram 4-8 gee 'n opsomming van die metaboliete wat voorgestel is as metaboliete wat moontlik gevorm kan word. Die metaboliete wat donker gedruk is in Diagram 4-8, verwys na die metaboliete wat wel opgespoor en geïdentifiseer is, terwyl die kursiefgedrukte metaboliete aantoon watter moontlike metaboliete nie opgespoor kon word nie.

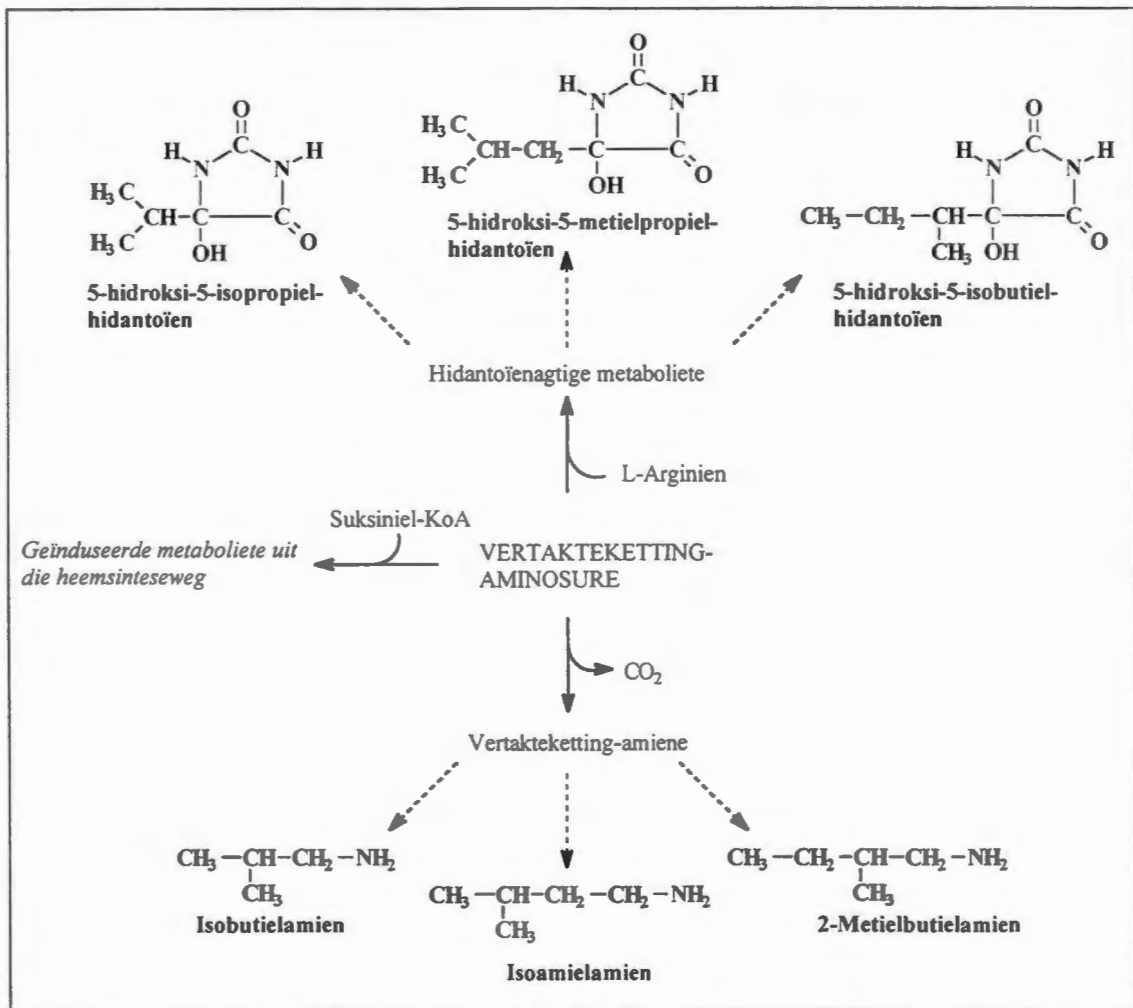


Diagram 4-8 Opsomming van metaboliëte wat moontlik gevorm kan word uit moontlike geïnduseerde anaboliese weë. Die donker-gedrukte metaboliëte is wel opgespoor, terwyl die kursiefgedrukte metaboliëte nie opgespoor kon word nie

Hoewel die bestaan van die hidantoïenagtige metaboliëte bevestig kon word, kon nie met sekerheid vasgestel word hoe dit gevorm word nie. Aangesien die konsentrasies van die hidantoïenagtige metaboliëte geen direkte korrelasie met die vertaktekettering-aminosure toon nie maar wel met die vertaktekettering-2-ketosure korroleer bestaan die moontlikheid dat 5-hidroksi-5-isopropielhidantoïen, 5-hidroksi-5-metiëpropielhidantoïen en 5-hidroksi-5-isobutiëriëhidantoïen gevorm kan word vanaf die vertaktekettering-2-ketosure. Hierdie moontlikheid word in Hoofstuk 5 verder ondersoek, terwyl die moontlike kliniese implikasies van hierdie metaboliëte in Hoofstuk 7 verder bespreek sal word.

Die vorming van die vertakteketting-amiene kon wel aangetoon word, hoewel die konsentrasies van isobutielamien, isoamielamien en 2-metielpropielamien in die urine van die MSUD-pasiënte so laag is dat hierdie metaboliete waarskynlik geen of weinig bydrae lewer tot die kliniese beeld van die pasiënte.

Hoofstuk 5

Resultate

Primêre geïnduseerde metaboliëte uit die vertakteketting-2-ketosure

5.1. Inleiding

In Diagram 5-1 word 'n soortgelyke voorstelling as in Hoofstuk 4 gebied van alle moontlike geïnduseerde metaboliëte wat in hierdie geval vanaf 2-keto-isovaleriaansuur, 2-keto-isokaproësuur en 2-keto-3-metielvaleriaansuur gevorm kan word. Die voorgestelde metaboliëte is gegrond op die voorkoms en vormingsmeganismes van metaboliëte by MSUD sowel as ander metaboliese defekte. Die rede vir die voorstelling van 'n moontlike metaboliet sal ook in hierdie hoofstuk telkens gemotiveer word voor die ondersoek na die bepaalde metaboliet uitgevoer sal word. Faktore wat 'n invloed op die oorsprong van die metaboliëte het, sal so ver moontlik ondersoek en bespreek word.

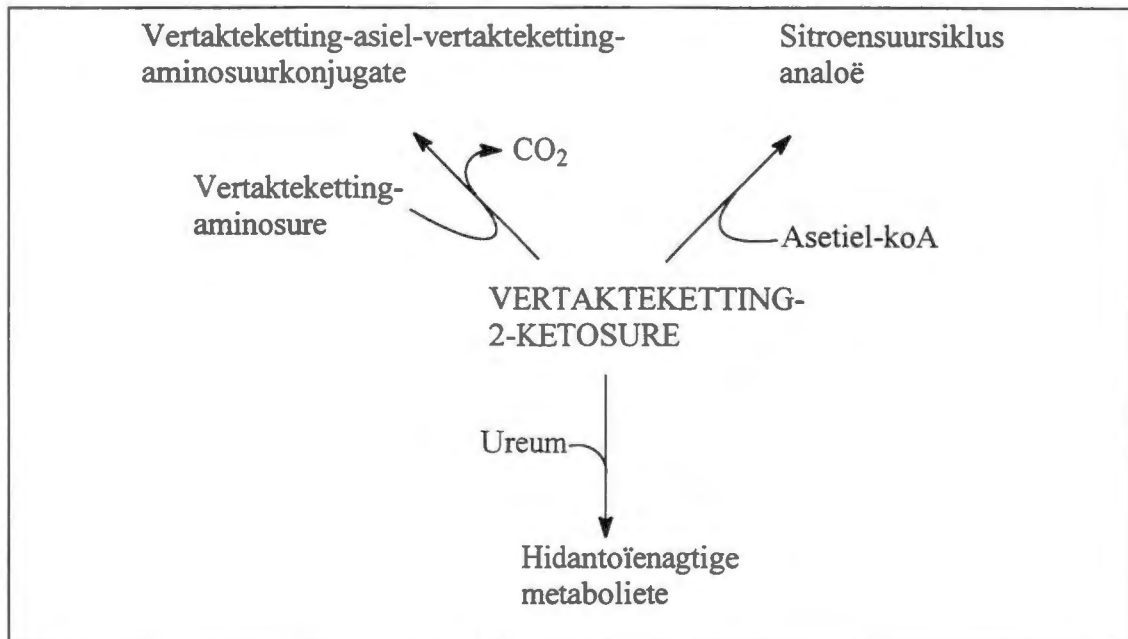


Diagram 5-1 Voorstelling van geïnduseerde metaboliete wat potensieel vanaf 2-keto-isovaleriaansuur, 2-keto-isokaproësuur en 2-keto-3-metielvaleriaansuur gevorm kan word

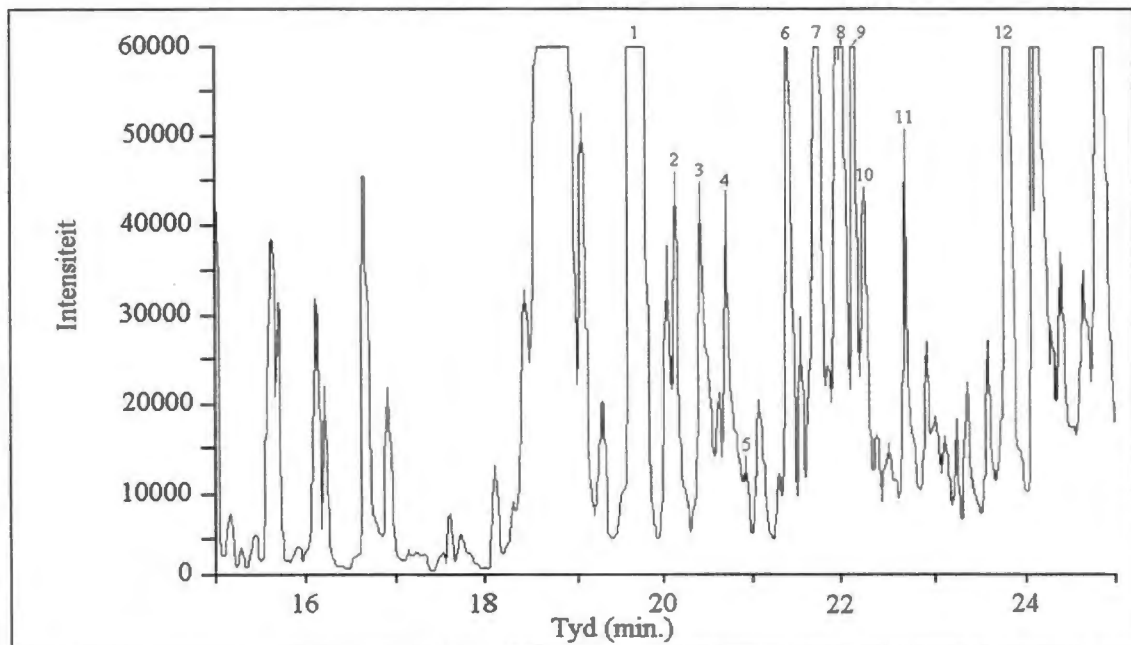
5.2. Primêre geïnduseerde metaboliete gevorm uit die vertakte-ketting-2-ketosure

5.2.1. Konjugering van die 2-ketosure met die vertakteketting-aminosure

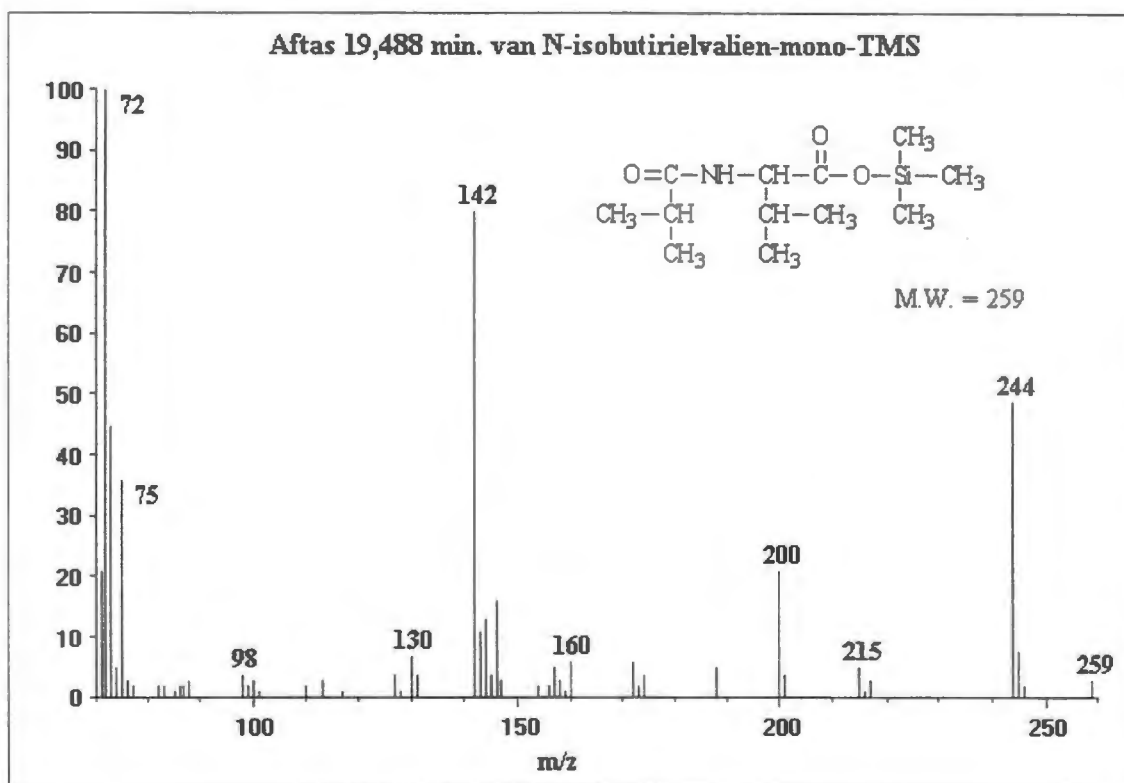
Soos in Hoofstuk 4 bespreek, is die *N*-2-hidroksisuur-vertakteketting-aminosuurkonjugate by die MSUD-pasiënte wat in hierdie studie gebruik is gevorm. Op grond van die bestaan van hierdie konjugate is daar voorgestel dat die vertakteketting-2-ketosure ook moontlik kan konjugeer met die vertakteketting-aminosure. Dit is selfs moontlik dat die *N*-2-hidroksisuur-vertakteketting-aminosuurkonjugate wat in Hoofstuk 4 geïdentifiseer is, afkomstig kan wees vanaf die *N*-2-ketosuur-analoë konjugate deurdat die 2-ketosuurgedeelte gehidrogeneer word om die ooreenstemmende 2-hidroksisuuranaloog te vorm. Hierdie moontlikheid regverdig die voorstel dat die moontlike bestaan van die *N*-2-ketosuur-vertakteketting-aminosuurkonjugate ondersoek moet word. Hierdie metaboliete kon egter nie in die urine van enige van die MSUD-pasiënte opgespoor word nie. Massaspektrums van verbindings wat moontlike aminosuurkonjugate bevat het is wel opgespoor, maar

hierdie verbindings was telkens 28 amu ligter as die verwagte *N*-2-ketosuur-vertakteketting-aminosuurkonjugaat se teoretiese molekulêre massas. Die identiteit van hierdie verbindings is verder ondersoek en daar is gevind dat dit die konjugate van die onderskeie vertakteketting-aminosure en gede-karboksileerde vertakteketting-2-ketosuur-analoë is.

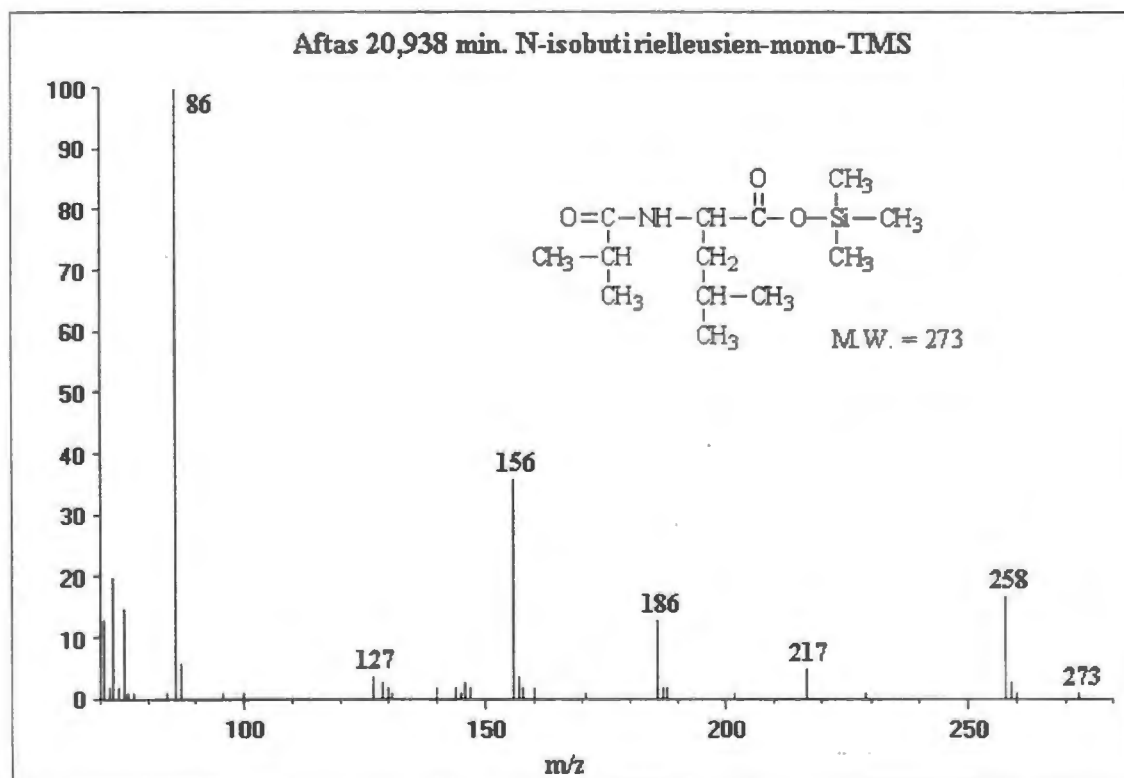
Van die metaboliete wat in die urine van die MSUD-pasiënte opgespoor is, was *N*-isobutiriëvalien, *N*-isobutiriëlleusien en *N*-isobutiriëlisoleusien. Die isobottersuur is afkomstig vanaf die dekarboksilering van valien. Die elueringsposisie van sommige van hierdie verbindings op die totale ionchromatogram van 'n organiese suurekstrak van die urine van 'n MSUD-pasiënt word in Figuur 5-1 weergegee terwyl die massaspektrums van hierdie drie metaboliete in figure 5-2, 5-3 en 5-4 weergegee word. Die di-TMS-derivate van al hierdie *N*-asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate word ook gevorm en elueer tussen 25 tot 28 minute op die totale ionchromatogram (na sitroensuur en in die omgewing van *p*-hidroksi-feniellaktaat).



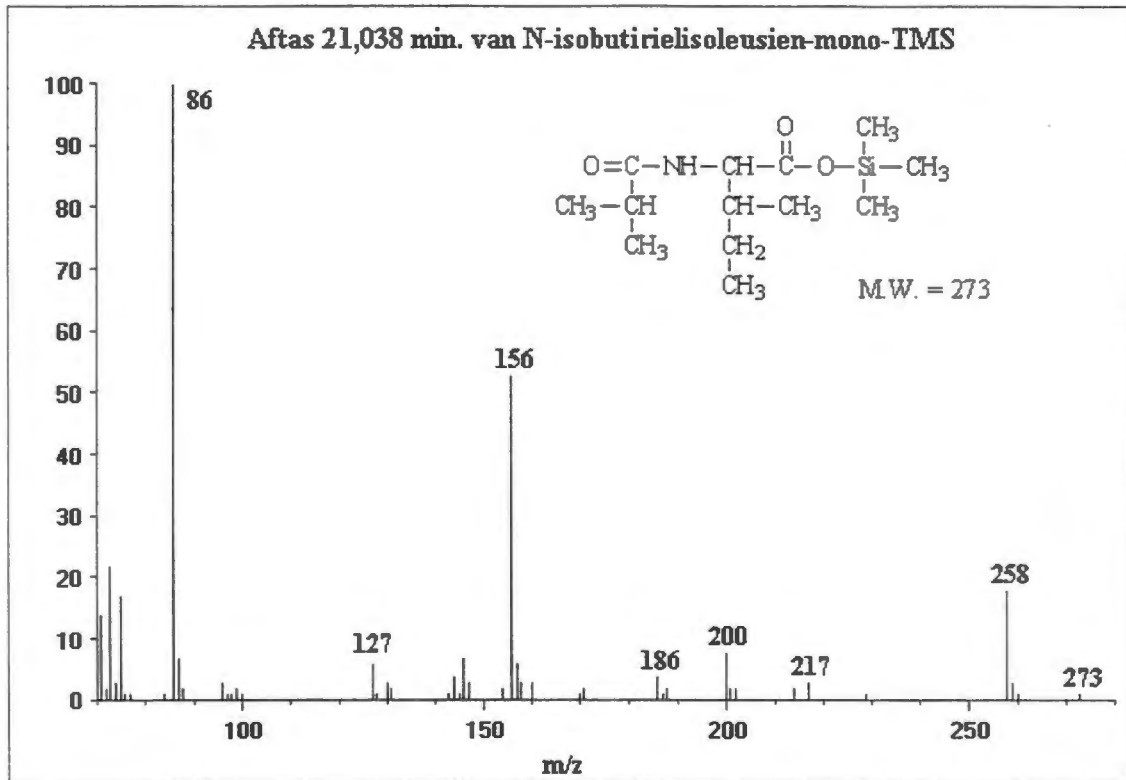
Figuur 5-1 Totale ion chromatogram van 'n organiese suurekstrak van die urine van 'n MSUD-pasiënt om die elueringsposisie van die *N*-isobutirië-vertakteketting-aminosuurkonjugate aan te toon. 1: Interne standaard (3-feniëlbottersuur); 2: Appelsuur; 3: *N*-Isobutiriëlleusien; 4: *N*-Isobutiriëlisoleusien; 5: *N*-2-Metielbutiriëvalien; 6: *N*-Isovaleriëlleusien; 7: *N*-Isovaleriëlisoleusien; 8: *N*-2-Metielbutiriëlleusien; 9: *p*-Hidroksi-feniëlasynsuur; 10: *N*-2-Metielbutiriëlisoleusien; 11: *N*-Laktiëlleusien; 12: Akonitiensuur



Figuur 5-2 Massaspektrum van *N*-isobutiriëlvalien-mono-TMS



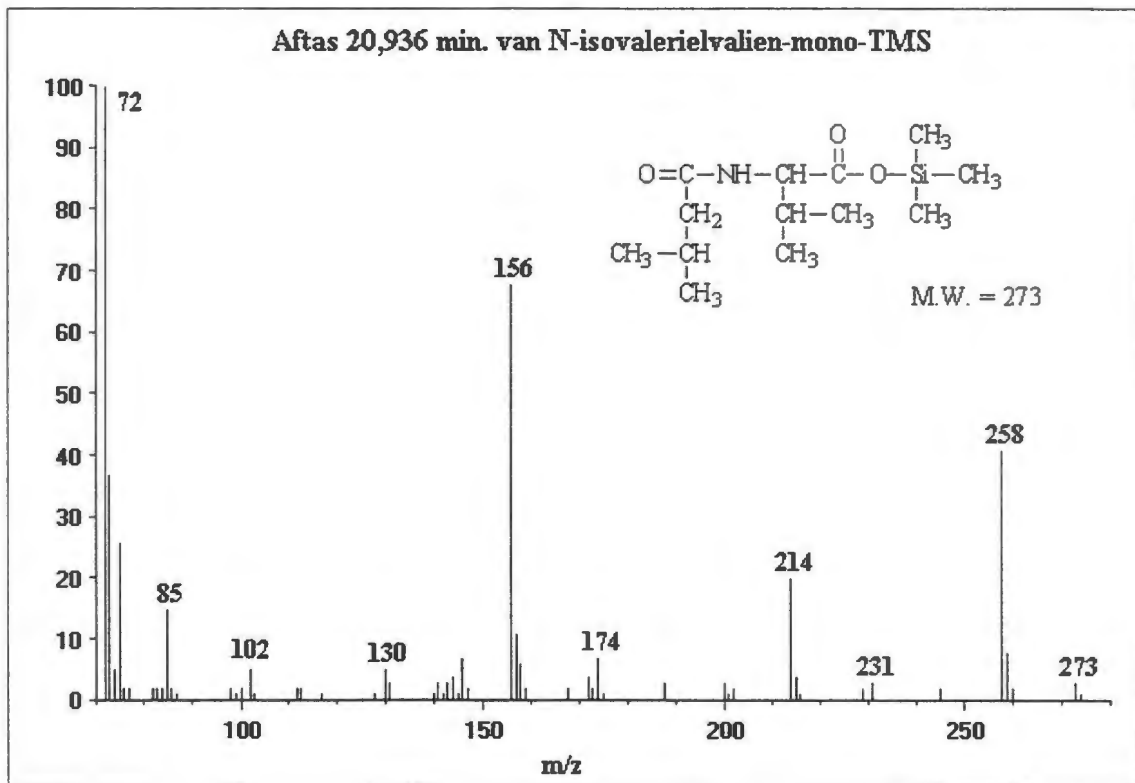
Figuur 5-3 Massaspektrum van *N*-isobutirielleusien-mono-TMS



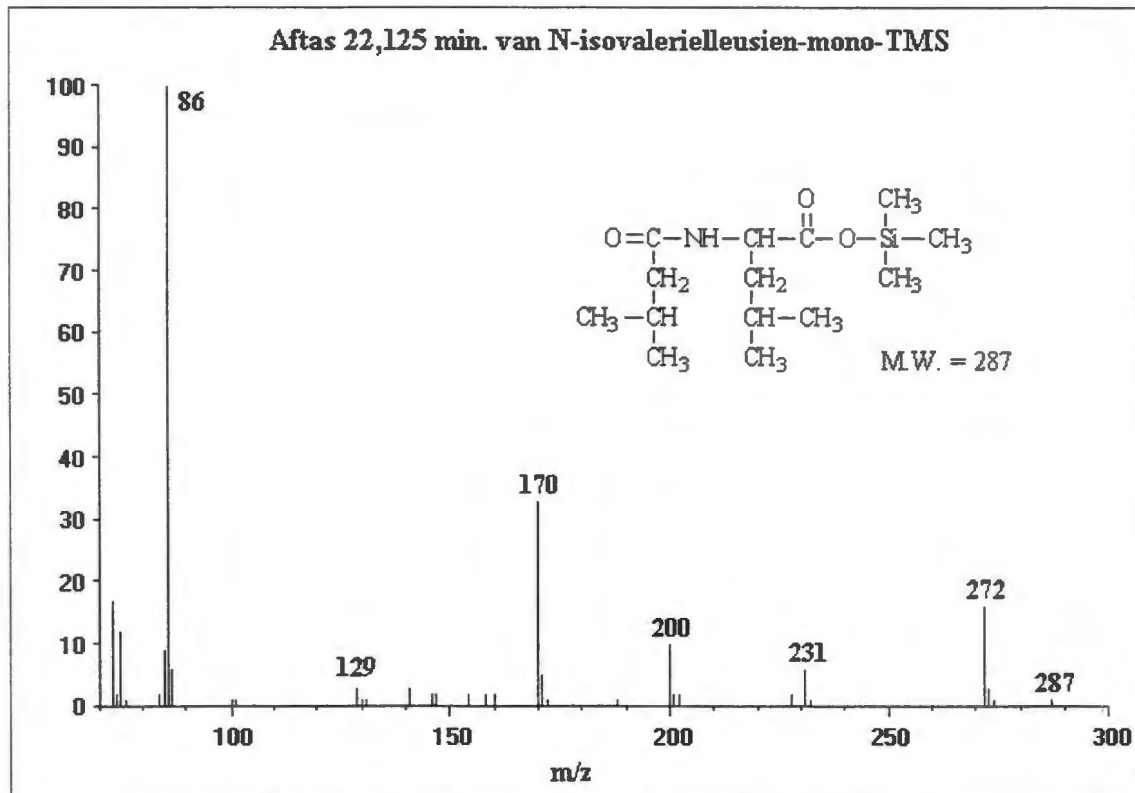
Figuur 5-4 Massaspektrum van *N*-isobutirielleusien-mono-TMS

N-Isobutirielleusien-mono-TMS lewer 'n sterk fragment by 72 ame, terwyl *N*-isobutirielleusien-mono-TMS en -isoleusien-mono-TMS sterk fragmente by 86 ame lewer. Hierdie fragment is moontlik afkomstig vanaf die aminosuurgedeelte van die konjugaat met die verlies van 'n karboksiesuur-mono-TMS. 'n Sterk M - 15 ame-fragment word ook telkens waargeneem. Verder lewer *N*-isobutirielleusien-mono-TMS 'n 142 ame-fragment en die *N*-isobutirielleusien-mono-TMS en -isoleusien-mono-TMS 'n 156 ame-fragment. Hierdie fragment word gevorm deur die verlies van die karboksiesuur-mono-TMS-gedeelte van die konjugaat.

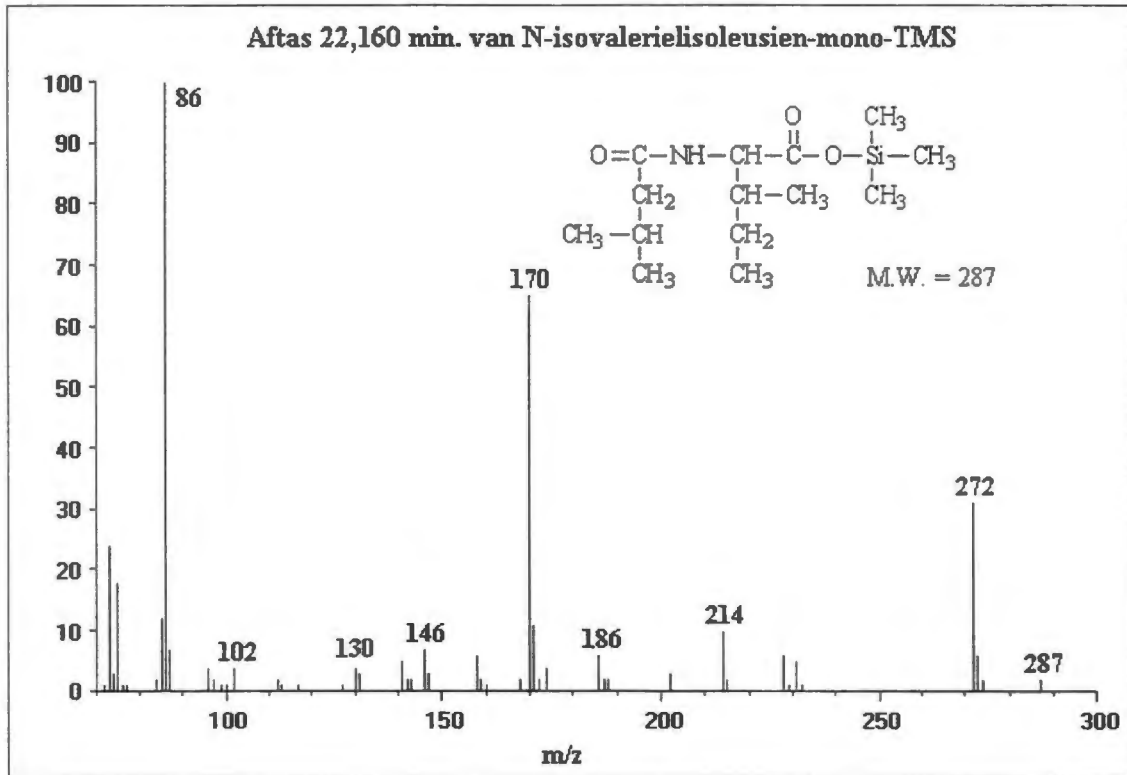
Verdere metaboliete wat geïdentifiseer is in die urine van die MSUD-pasiënte is *N*-isovalerielleusien, *N*-isovalerielleusien en *N*-isovalerielleusien. Hierdie verbindings se TMS-derivate word in figure 5-5, 5-6 en 5-7 weergegee. Die elueringsposisies op die totale ionchromatogram van sommige van hierdie drie verbindings word in Figuur 5-1 aangedui.



Figuur 5-5 Massaspektrum van *N*-isovalerielvalien-mono-TMS



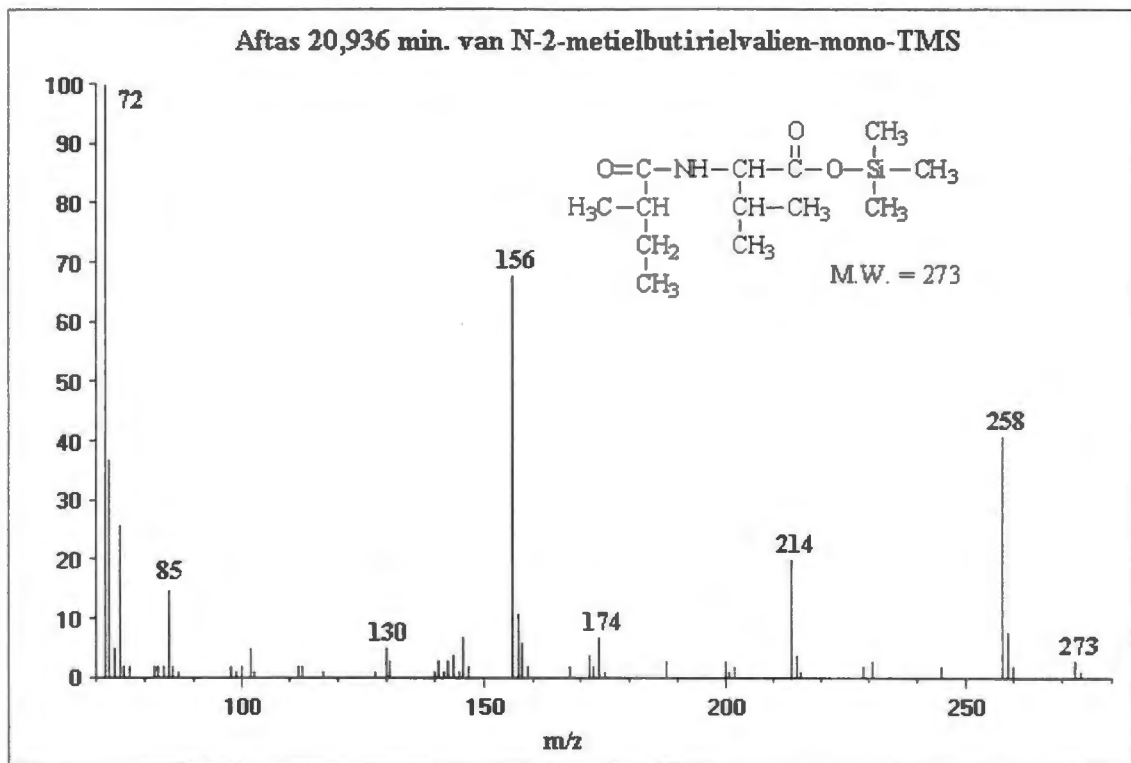
Figuur 5-6 Massaspektrum van *N*-isovalerielleusien-mono-TMS



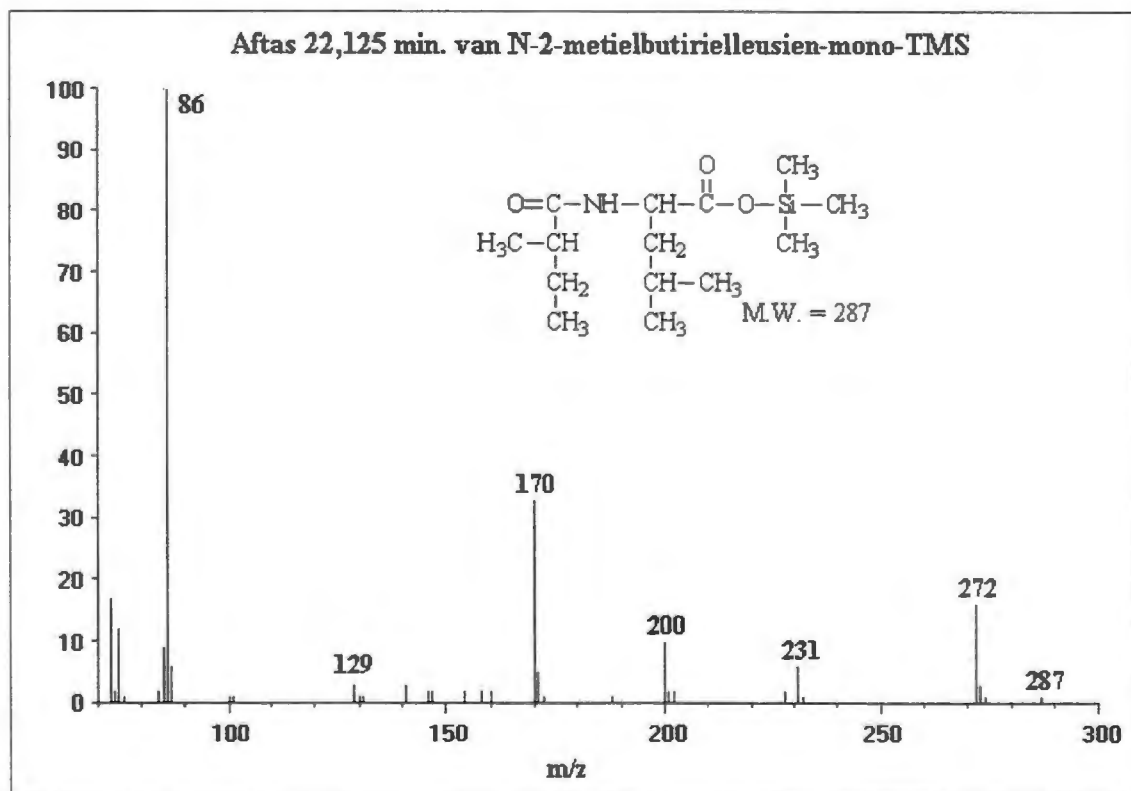
Figuur 5-7 Massaspektrum van *N*-isovalerielisoleusien-mono-TMS

N-Isovalerielvalien-mono-TMS toon 'n sterk fragment by 'n massa van 72 ame, 156 ame en 258 ame. Die 72 ame-fragment is moontlik afkomstig vanaf die aminosuurgedeelte van die konjugaat met die verlies van die karboksiesuur-mono-TMS. By *N*-isovalerielisoleusien-mono-TMS en -isoleusien-mono-TMS word hierdie fragment waargeneem by 'n massa van 86 ame. Die 156 ame-fragment by *N*-isovalerielvalien-mono-TMS en 170 ame-fragment by die ander twee konjugate word gevorm deur die verlies van die karboksiesuur-mono-TMS-gedeelte. Die 258 ame-fragment by *N*-isovalerielvalien-mono-TMS en die 272 ame-fragment by die ander twee konjugate word gevorm deur die verlies van 'n metiel-groep ($M - 15$ ame-fragment).

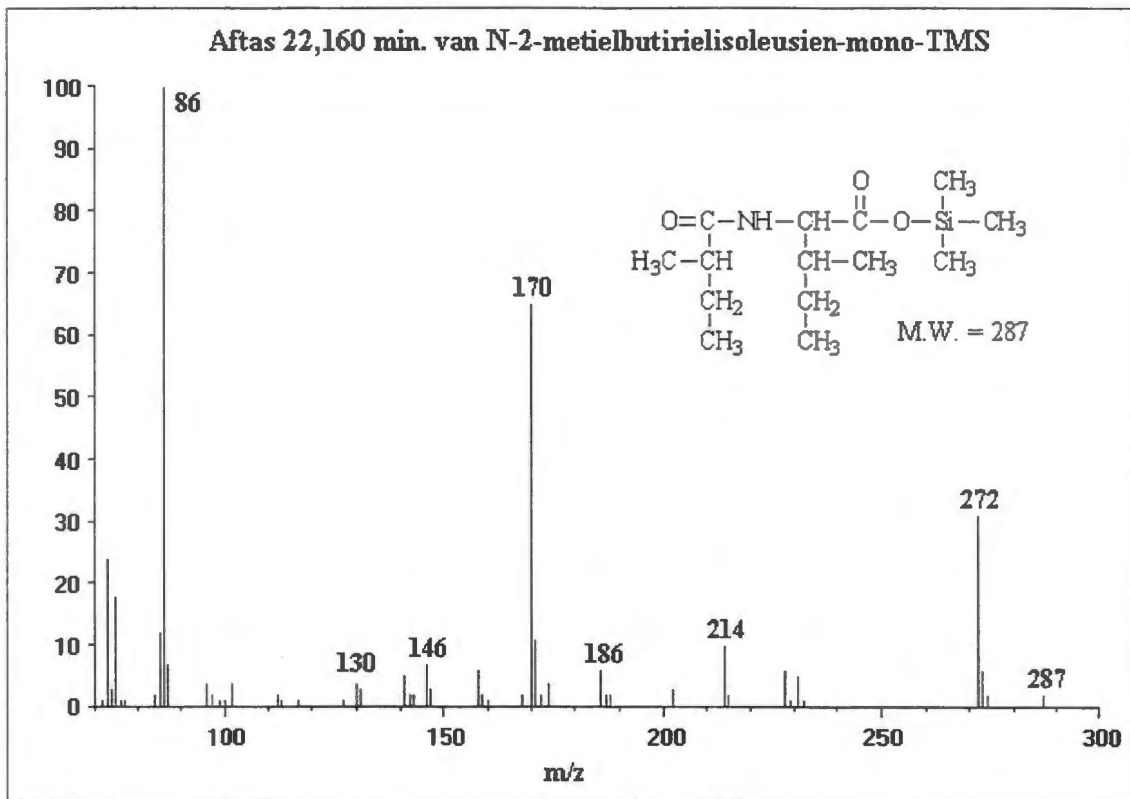
Die oorblywende drie konjugate wat geïdentifiseer is, is *N*-2-metielbutirielvalien, *N*-2-metielbutirielisoleusien en *N*-2-metielbutirielisoleusien. Ook hierdie verbindings is chemies gesintetiseer, soos beskryf in Hoofstuk 3, afdeling 3.4. Die verbindings is soortgelyk aan bogenoemde konjugate geanaliseer met behulp van GC-MS (vergelyk Hoofstuk 3, afdeling 3.3.3). Die resultate van hierdie analyses word in figure 5-8, 5-9 en 5-10 weergegee. Die elueringsposisies van al drie hierdie verbindings op die totale ioon chromatogram word in Figuur 5-1 aangedui.



Figuur 5-8 Massaspektrum van *N*-2-metielbutirielvalien-mono-TMS



Figuur 5-9 Massaspektrum van *N*-2-metielbutirielleusien-mono-TMS



Figuur 5-10 Massaspektrum van *N*-2-metielbutirieliroleusien-mono-TMS

Die fragmentasiepatroon van hierdie drie verbindings is soortgelyk aan die van *N*-isovalerielvalien-mono-TMS, -leusien-mono-TMS en -isoleusien-mono-TMS. Die verbindings word onderskei op grond van die swakker fragmente en verhoudings van fragmente ten opsigte van mekaar. Die konsentrasies van al die *N*-asielkonjugate word in Tabel 5-1 weergegee.

Uit die resultate in Tabel 5-1 is dit duidelik dat die verskillende *N*-asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate in variërende konsentrasies voorkom, wat wissel van spoorhoevelhede tot soveel as 348,3 mmol/mol kreatinien vir *N*-2-metielbutirielleusien. Wat egter ook voorkom, is dat die som van elk van die *N*-asielkonjugate (byvoorbeeld die som van *N*-isobutirieliroleusien, *N*-isobutirielleusien en *N*-isobutirieliroleusien) ongeveer dieselfde is (ongeveer 380 mmol/mol kreatinien), hoewel die individuele *N*-asiel-aminosuurkonjugate kan verskil.

Tabel 5-1 Urinêre konsentrasies van die *N*-asielkonjugate soos gevind by die MSUD-pasiënte wat in hierdie studie gebruik is

Metaboliete	Minimum kons. (mmol/mol kreat.)	Maksimum kons. (mmol/mol kreat.)
<i>N</i> -Isobutirielvalien	Spoor	27,4
<i>N</i> -Isobutirielleusien	Spoor	245,1
<i>N</i> -Isobutirielisoleusien	Spoor	109,3
<i>N</i> -2-Metielbutirielvalien	Spoor	Spoor
<i>N</i> -2-Metielbutirielleusien	Spoor	348,3
<i>N</i> -2-Metielbutirielisoleusien	Spoor	57,7
<i>N</i> -Isovalerielvalien	Spoor	Spoor
<i>N</i> -Isovalerielleusien	Spoor	243,4
<i>N</i> -Isovalerielisoleusien	Spoor	133,4

Hierdie konjugering kan op verskeie maniere plaasvind. Die eerste teorie is dat die 2-ketosure deur α -oksidase gedekarboksileer kan word om sodoende die ooreenstemmende aldehyd te vorm. Hierdie meganisme word in Diagram 5-2 uiteengesit. Een moontlikheid is dat die aldehyd weer omgesit kan word in 'n karboksielsuur. Deur die toevoeging van 'n KoA tot die karboksielsuur word die ooreenstemmende asiel-KoA gevorm. Hierdie meganisme sal egter dieselfde produk lewer as wat gevorm sal word indien die vertakteketting-2-ketosure op die normale wyse gekataboliseer word. Dit wil dus voorkom asof hierdie meganisme nie relevant is nie. Indien dit moontlik is en veral aangesien α -oksidase in die sitoplasma voorkom, sal die produkte soos isovaleriaansuur beskikbaar wees vir ω -oksidase, wat tot die vorming van 3-hidroksi-isovaleriaansuur kan lei. 3-Hidroksi-isovaleriaansuur kom in hoë konsentrasies in MSUD-pasiënte voor, wat nie verklaarbaar is nie, veral in die lig van die defek by MSUD-pasiënte. Volgens die voorgestelde meganisme in die studie word die isovaleriaansuur dus in die sitoplasma gevorm en deur ω -oksidase na 3-hidroksi-isovaleriaansuur omvorm, wat voorkom dat die normale kataboliese weg sal kan voortgaan.

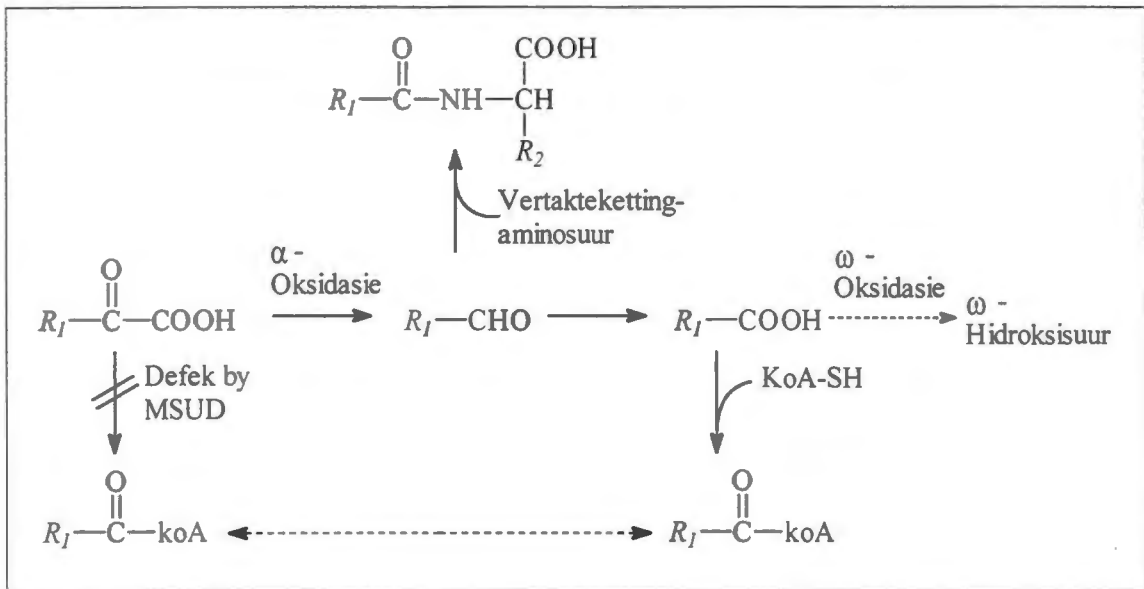


Diagram 5-2 Skematiese voorstelling van die moontlike meganisme van vorming van die vertaktekettin-aldehyd en ander metaboliëte vanaf die ooreenstemende 2-ketosuur. Die moontlike meganisme van vorming van ω -hidroksisuur deur ω -oksidase word ook aangetoon

Indien hierdie meganisme egter gedeeltelik voorkom en die aldehyd wel gevorm word, kan die konjugasie tussen die aldehyd en die aminosuur dalk spontaan geskied. Hierdie meganisme kan die bestaan van die konjugate verduidelik.

Hierdie teorie is slegs 'n bespiegeling en geen bewyse kon in die literatuur gevind word ter bevestiging van hierdie meganisme nie. Dié moontlikheid is ondersoek deur isobottersuur, 2-metielbottersuur, isovaleriaansuur sowel as die aldehyde van die kortkettin-vetsure met die vertaktekettin-aminosure te inkubeer by variërende pH en temperatuur. Die inkubasie is herhaal deur bogenoemde sure en aldehyde in 'n urienmonster op te los. Die inkubasie het egter tot geen vorming van die konjugate gelei nie.

Indien die konjugate via aldehydvorming plaasvind, kan verwag word dat van hierdie relevante aldehyde in die urine van die MSUD-pasiënte gevind behoort te word. Daarom is 'n aldehydanalise met behulp van dihidrofenielhidrasien soos beskryf deur Shara *et al.*, (1992:221 - 233) uitgevoer. Behalwe die teenwoordigheid van die normale konsentrasies asetaldehyd en aseton was daar geen ander aldehyde in die urine van die pasiënte opgespoor nie.

‘n Tweede meganisme vir die moontlike vorming van die onverwagte *N*-asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate is dus ondersoek. Soos in die literatuur bespreek, (vergelyk Hoofstuk 2, afdeling 2.2.5), bestaan die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks uit drie katalitiese eenhede. Hierdie kompleks stem ooreen met die piroviensuur dehidrogenase- en 2-ketoglutaarsuur dehidrogenase-komplekse. In teenstelling met laasgenoemde twee komplekse is die substraatspesifisiteit van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks nie so hoog nie (Yeaman, 1989:625 - 632; Jones & Yeaman, 1986:621 - 623). ‘n Verdere ooreenkoms tussen hierdie drie ensiem komplekse is dat een van die katalitiese eenhede (E_3 -eenheid) gemeenskaplik is aan al drie die komplekse. Die meganisme van werking van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks is ook soortgelyk aan die van die ander twee komplekse (Yeaman, 1989:625 - 632).

Die katalitiese eenhede van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks bestaan uit ‘n E_1 -eenheid (vertakteketting-2-ketosuur dekarboksilase), E_2 -eenheid (dihidrolipoëltransasilase) en E_3 -eenheid (dihidrolipoël dehidrogenase) (Chuang & Shih, 1995:1243). Hierdie eenhede is nie-kovalent aan mekaar gebind nie (Pettit *et al.*, 1978:4881 - 4885). Die E_1 -eenheid kataliseer die dekarboksilering van die 2-ketosuur. Tiamienpirofosfaat (TPP) is ‘n ko-ensiem vir die reaksie. Die E_2 -eenheid kataliseer die binding van die asielgroep aan ‘n ko-ensiem A om die asiel-KoA te vorm en die E_3 -eenheid heroksideer die lipoëleenheid van E_2 met NAD^+ as die finale elektronontvanger (Chuang & Shih, 1995:1243). Die ensiem kompleks se reaksies word skematies in Diagram 5-3 voorgestel.

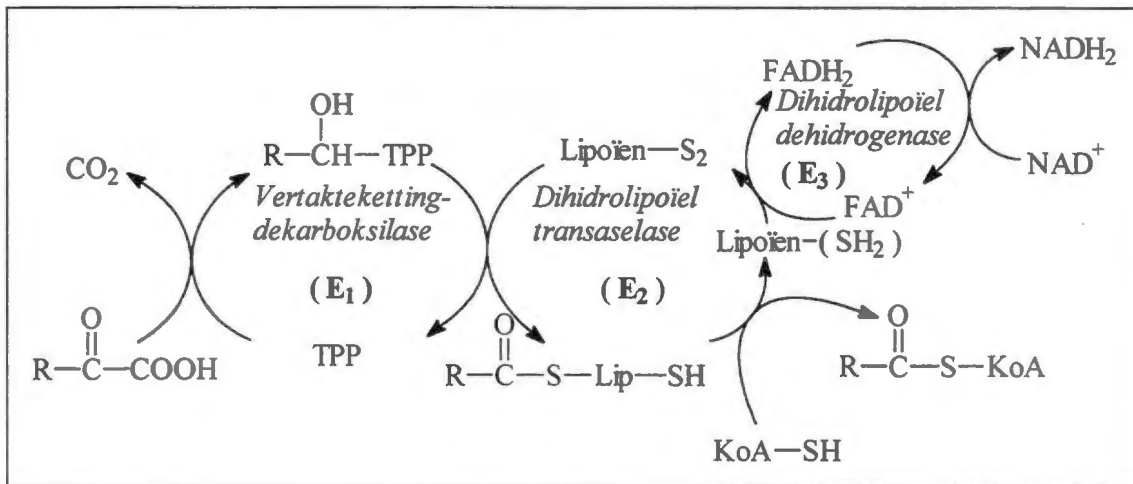


Diagram 5-3 Skematiese voorstelling van die reaksies van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks

Die E₁-eenheid is, soos reeds bespreek, verantwoordelik vir die dekarboksilering van die 2-ketosuur deur die 2-ketosuur aan tiamienpirofosfaat (TPP) te bind met die verlies van CO₂. Indien die defek wat verantwoordelik is vir MSUD op die E₂-eenheid is, kan aangeneem word dat die reaksie van die E₁-eenheid nog sal plaasvind, aangesien elk van die ensieme afsonderlik aktiwiteit toon (Chuang & Shih, 1995:1244).

Gegronde op bestaande literatuur, kan daar dus voorgestel word dat die asiel-TPP-konjugaat wat gevorm word in die E₁-eenheid (en wat sal ophoop indien die E₂-eenheid defek is), moontlik kan konjugeer met die vertakteketting-aminosure. 'n Spesifieke voorbeeld van sodanige konjugering bestaan nie, hoewel die leusien, isoleusien en valien anaboliese weg by *E. coli* van TPP-konjugate gebruik maak in konjureringsreaksies (Voet & Voet, 1990:721). Om hierdie teorie te toets, is daar besluit om te bepaal op watter eenheid die defek by pasiënt MM geleë is. Geen weefsel is egter beskikbaar van die ander MSUD-pasiënte wat in hierdie studie gebruik is nie en 'n soortgelyke bepaling kon dus nie gedoen word by hierdie pasiënte nie. Hierdie bepaling is ook nie voorheen op hierdie pasiënte gedoen nie. Die aktiwiteit van die E₂-eenheid van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks is bepaal volgens die metode van Chuang (1988:146-154) wat aangepas is om die E₂-eenheid en die E₃-eenheid van die kompleks se aktiwiteite te bepaal. Volgens die metode word die omgekeerde reaksie van die E₂-eenheid gebruik om C¹⁴-

isobottersuur aan dihidrolipoamied te bind. Die asioldihidrolipoamied word dan met benseen geëkstraheer en die aktiwiteit bepaal. In die studie is egter nie C^{14} -isobutiriel-KoA gebruik nie, maar isobutiriel-KoA. Die analyses is met behulp van ES-MS-MS uitgevoer en om dié rede kon die isobutiriöldihidrolipoamied sowel as die lipoamied bepaal word soos dit voorgestel word in Diagram 5-4.

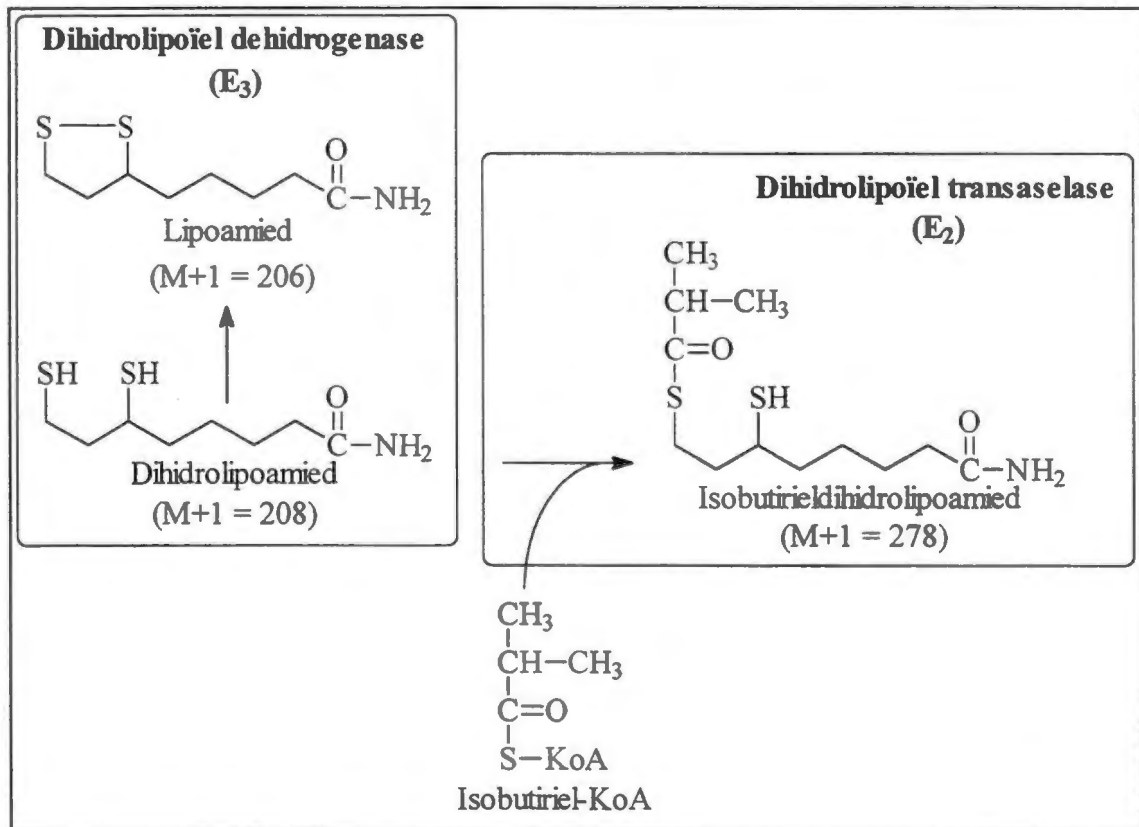


Diagram 5-4 Skematiese voorstelling van die vorming van isobutiriöldihidrolipoamied en lipoamied

Dihidrolipoamied is berei vanaf lipoamied met behulp van van natriumborohidried. 'n Suspensie van 200 mg lipoamied, 4 ml metanol en 1 ml water is afgekoel na 0°C . Die oplossing is geroer terwyl 200 mg natriumborohidried in 1 ml water stadig bygevoeg is. Die reaksiemengsel is geroer totdat dit helder en kleurloos geword het. Die oplossing is aangesuur met verdunde HCl en die produk is met chloroform geëkstraheer. Die chloroform is afgedamp en die dihidrolipoamied is gekristalliseer vanaf benseen-Skellysolve B (2,5:1).

Fibroblaste van die pasiënt en kontroles is geoes en gehomogeniseer in Krebsbuffer (pH 7,4). Van die materiaal is 0,3 mg proteien gebruik om die reaksie uit te voer. Die reaksiemengsel het 0,37 ml MOPS (50 mM, pH 7,4), 2 mM dihidrolipoamied, 0,4 mM isobutiriel-KoA, 12,5 μ M leupeptien en 1,4% fetale kalfserum bevat. Die reaksiemengsel is vir 20 minute by 37 °C geïnkubeer. In die geval van die eerste blanko is geen inkubasie uitgevoer nie, terwyl 'n tweede blanko geen substrate bevat het nie. 'n Positiewe kontrole is verkry deur 1,5 mM arseniet by een van die reaksiemengsels te voeg. Twee blanko's is ingesluit. Die reaksie is getermineer deur 0,75 ml benseen by te voeg en vir 10 sekondes te vorteks. Die boonste benseenlaag is verwyder, gedroog en opgelos in water:asetonitriël (50:50) vir ES-MS-MS analises.

Die teenwoordigheid van isobutiereldihidrolipoamied ($M+1 = 278$), dihidrolipoamied ($M+1 = 208$) en lipoamied ($M+1 = 206$) is met behulp van ES-MS-MS bepaal. Vir hierdie analises is 'n konieselensspanning van 25 volt, 'n botsingsenergie van 30 volt, 'n kapilêre buisspanning van 3,5 kilovolt en 'n brontemperatuur van 80 °C gebruik. Die produk substraat verhouding is gebruik om 'n aanduiding van die aktiwiteit te verkry. Die resultate word in Tabel 5-2 weergegee.

Tabel 5-2 Resultate van die ensiem-bepaling van die E₂- en E₃-eenhede van pasiënt MM soos verkry is met behulp van ES-MS-MS

Beskrywing	Areas van pieke by onderskeie massas (ame)			Verhoudings van areas	
	Area 206	Area 208	Area 278	278/208	206/208
Blanko (geen inkubasie)	1509590528	448008928	469841	0,001	3,37
Blanko (geen substrate)	62058862	22884353	220212	0,010	2,71
Kontrole 1	2905981952	672416256	610203392	0,907	4,32
Kontrole 2	3455499520	807295360	786807104	0,975	4,28
Kontrole 3	4577168896	988866752	842649728	0,852	4,63
Kontrole 4	2203245568	493572576	446220832	0,904	4,46
Kontrole 5	2132389760	481821088	471331104	0,978	4,43
Pasiënt MM	5175944704	1144790656	622957376	0,544	4,52
Pasiënt MM (met arseniet)	3950555648	1217434112	464433568	0,381	3,24

Die isobutiriöldihidrolipoamied/dihidrolipoamied verhouding van die pasiënt is ongeveer 50% van dié van die kontroles. Arsiniet inhibeer die E₂-eenheid van die ensiem, maar nogtans is 'n verhouding van 0,381 verkry wat baie na die verhouding is wat by die pasiënt verkry is in die afwesigheid van arsiniet. Die lipoamied/dihidrolipoamied verhouding van die pasiënt en die kontroles is bykans identies. Hoewel hierdie resultaat nie 'n klinkklare antwoord gee nie dui dit daarop dat die E₂-eenheid van die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks by pasiënt MM defek is.

Aangesien die E₂-eenheid by hierdie pasiënt (pasiënt MM) waarskynlik defek is, kan verwag word dat die asiel-TPP-konjugate sal ophoop en dus beskikbaar sal wees vir konjureringsreaksies met aminosure. Aangesien TPP as 'n los geassosieerde ko-ensiem vir die E₁-eenheid van die ensiem optree (Danner *et al.*, 1979:5522 - 5526) bestaan die moontlikheid dat TPP-asielkonjugate in pasiënte met 'n E₂-eenheiddefek uitgeskei kan word. Hierdie moontlikheid is ondersoek deur na die voorkoms van hidroksi-isobutiriel-, hidroksi-isovaleriel-, en hidroksi-2-metielbutiriel-11-hidrotiochroom in die urine van die pasiënte te kyk. Die voorkoms van asiel-11-hidrotiochroomkonjugate is in die geval ondersoek omdat tiamien deur alkaliese omgewing spontaan na die verbinding omvorm word (White *et al.*, 1978:1334 - 1335) soos voorgestel in Diagram 5-5.

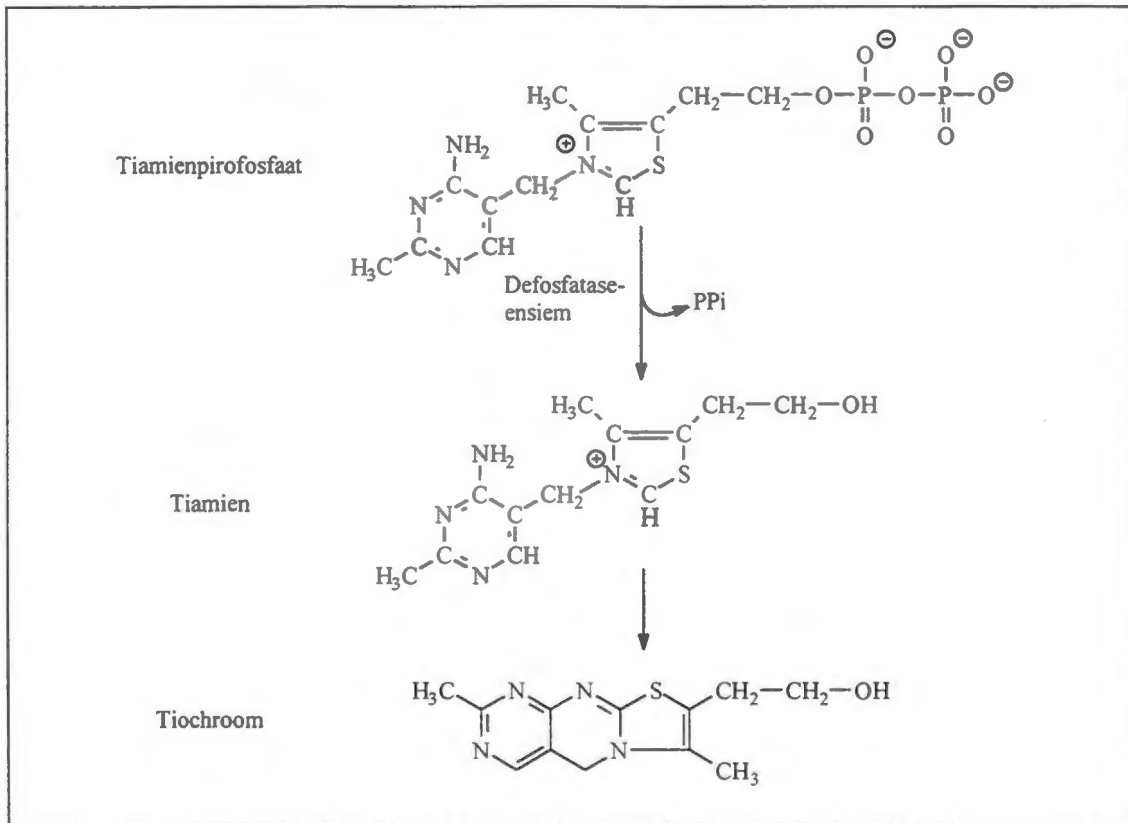


Diagram 5-5 Skematiese voorstelling van die normale kataboliese weg van tiamienpirofosfaat

Diagram 5-6 gee 'n skematiese voorstelling van die moontlike meganisme van vorming van hidroksi-isobutiriel-, hidroksi-isovaleriel- en hidroksi-2-metielbutiriel-11-hidrotiochroom. Soortgelyk aan die normale vorming van tiochroom, word hidroksi-isobutiriel-, hidroksi-isovaleriel- en hidroksi-2-metielbutirieltiamienpirofosfaat eers gedefosforileer deur 'n defosfatase-ensiem. Hierdie asiel-tiamienkonjugate kan dan op soortgelyke wyse as tiamien spontaan ringsluiting ondergaan om die ooreenstemmende gesubstitueerde 11-hidrotiochroom te vorm.

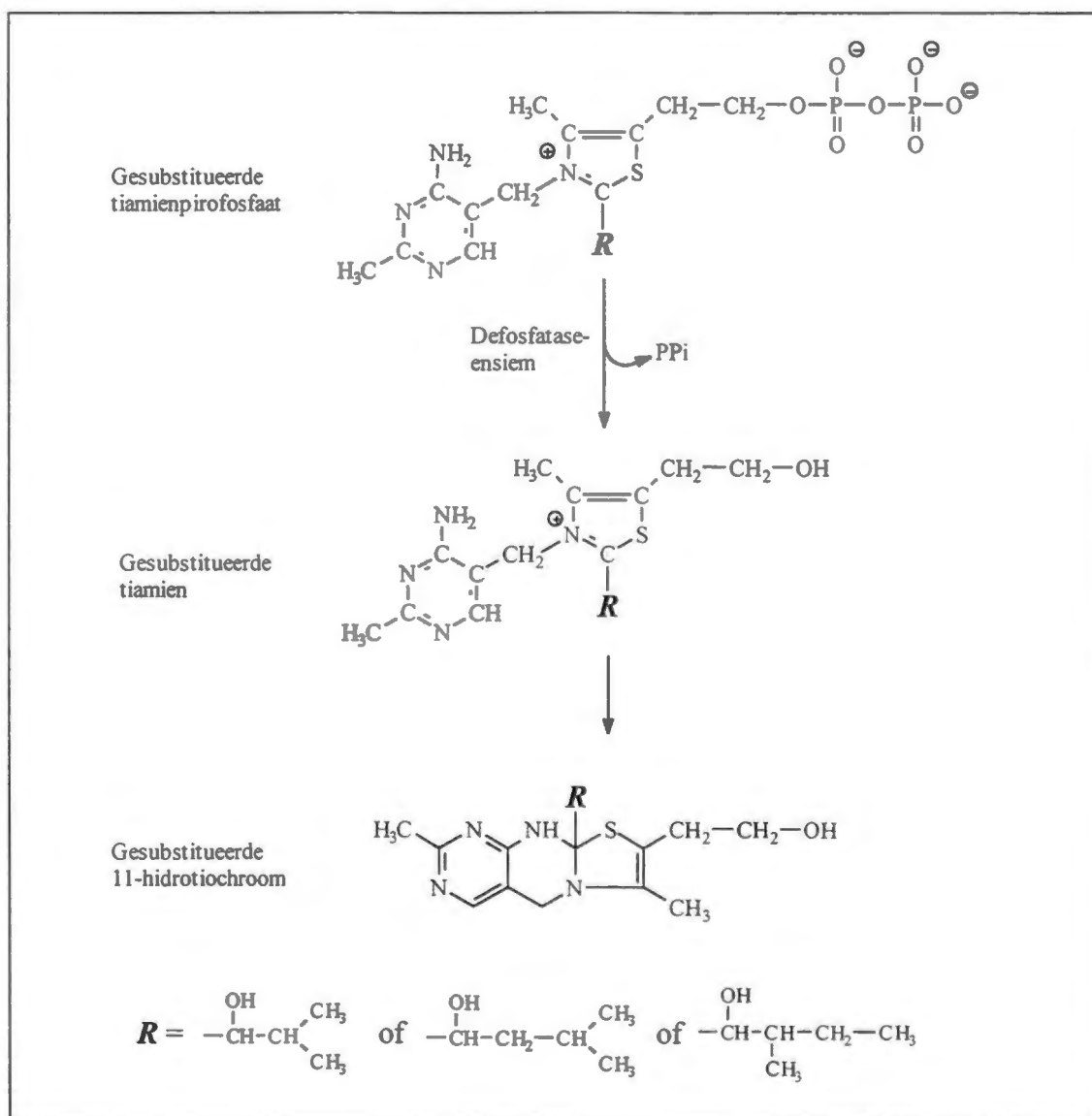


Diagram 5-6 Skematiese voorstelling van die vorming van moontlike gesubstitueerde 11-hidrotiochroom verbindings

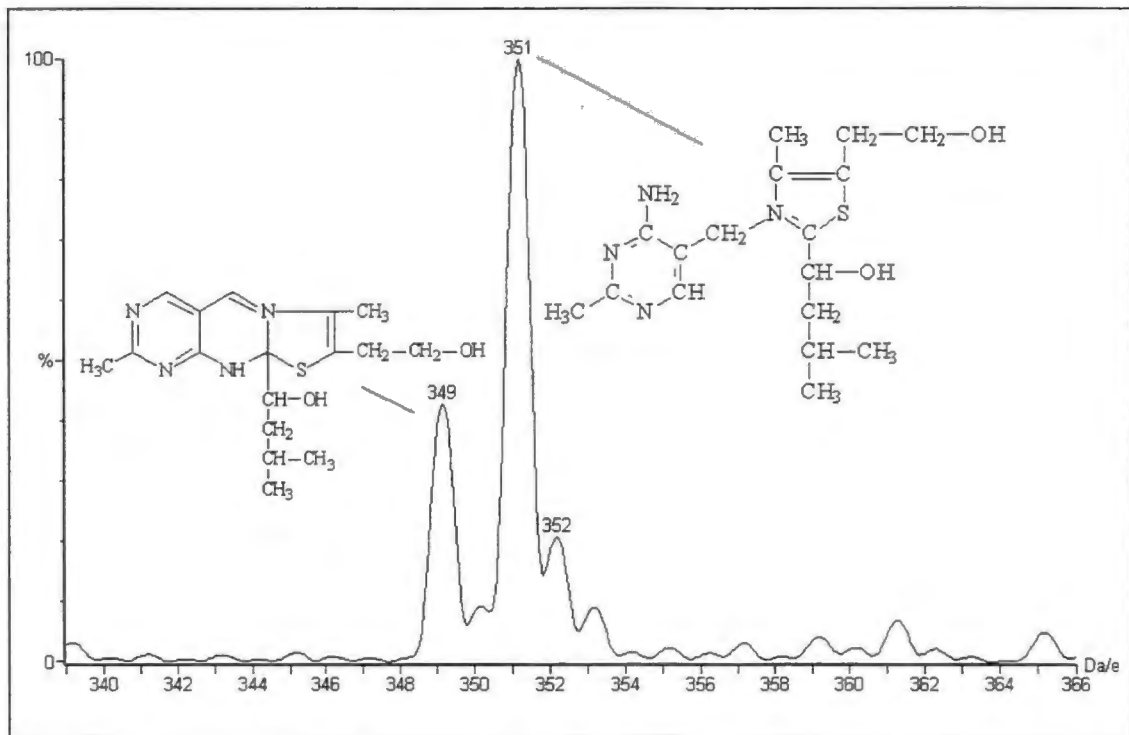
Die moontlike voorkoms van die gesubstitueerde tiamien is ondersoek deur een van die konjugate (hidroksi-isovaleriel-11-hidrotiochroom) te sintetiseer volgens die metode van Matsukawa *et al.*, (1970:152 - 154). Vir die doel van hierdie sintese is 1,1g tiamien-HCl in 5 ml water opgelos. Die oplossing is met 6,2 ml isovalerielaldehyd gemeng. Die pH is vervolgens ingestel na pH 8,6 en die oplossing is vir vyf ure by 50°C verwarm. Twee milliliter (2 ml) van die oplossing is behandel met kaliumferrisianied ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) volgens die metode beskryf deur Airth en Foerster (1970:81 - 86). Hierdie stap was nodig om te verseker dat tiamien in die tiochroomvorm voorkom. Vir die metode is 0,65 ml $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0,059 mol) met 10 ml 7,5 mol NaOH gemeng. Twee milliliter (2 ml) van die gesintetiseerde

tiamienoplossing is met 0,2 ml alkaliese ferrisianied gemeng. Die oplossing is vir vyf minute by kamertemperatuur gelaat en is daarna met 10 ml iso-amielalkohol geëkstraheer. Twee milliliter (2 ml) urine van pasient MM is deur middel van dieselfde metode met kaliumferrisianied behandel en geëkstraheer. Die iso-amielalkohol is afgedamp onder stikstof en die droë produk is opgelos in 'n mengsel van water en asetonitriël (1:1 v:v), aangesuur met miersuur (tot 0,1%). Die oplossings is vervolgens geanaliseer deur gebruik te maak van 'n LC-ES-MS-MS. Die toestande soos gebruik is tydens die analyses, word in Tabel 5-3 aangedui.

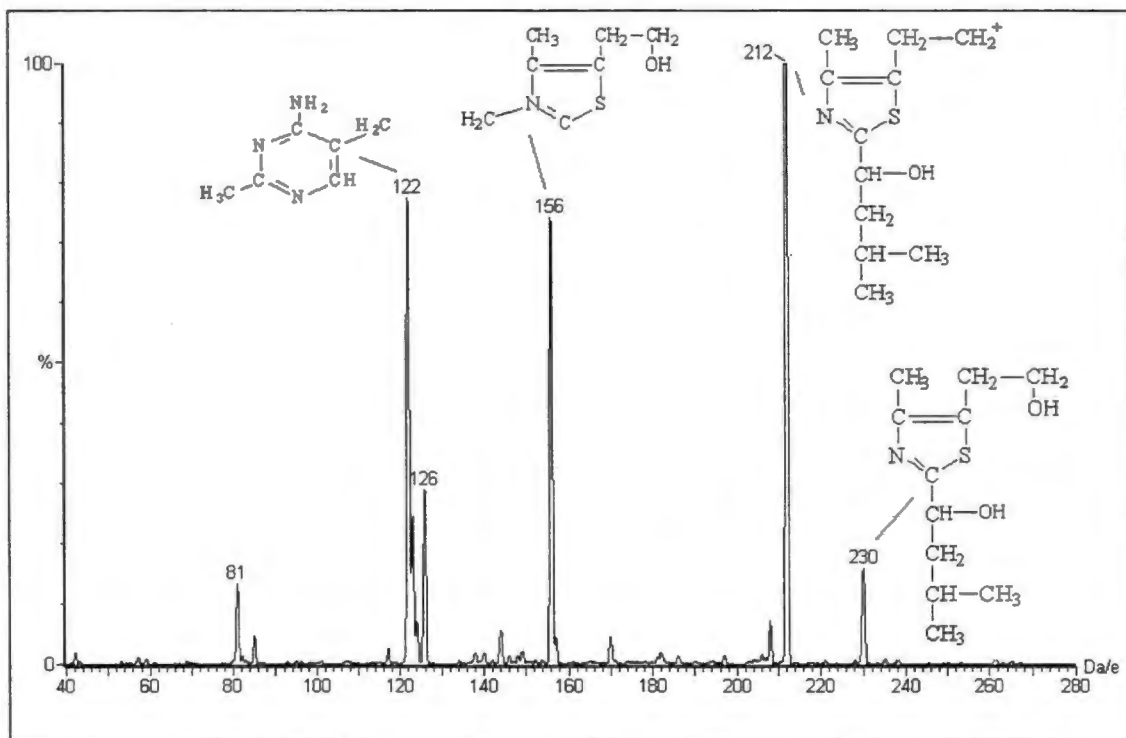
Tabel 5-3 Toestande wat gebruik is tydens die LC-ES-MS-MS-analises (dogter-ione van 349 ame en 351 ame asook ouer-ione van 122 ame) van die gesintetiseerde tiamien- en tiochroomderivate

Funksie	Waarde
Konieselensspanning	25 Volt
Botsingsenergie	30 Volt
Kapilêre buisspanning	3,5 kVolt
Brontemperatuur	80°C

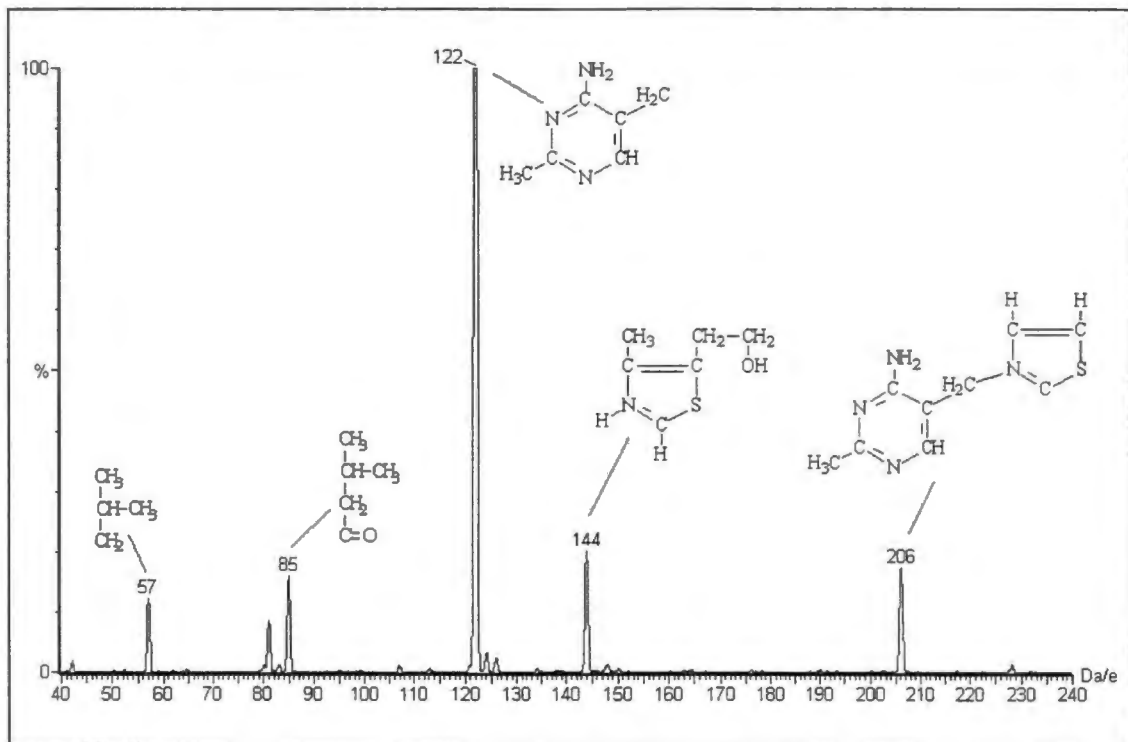
Die gesintetiseerde standaard het die teenwoordigheid van drie verbindings aangetoon soos voorgestel in Figuur 5-11. Die drie verbindings het onderskeidelik massas van 349 ame, 351 ame en 353 ame vertoon, wat toegeskryf kan word aan die 11-hidrotiochroom van 2-ketoisovaleriel (349 ame), 2-hidroksi-isovaleriel-11-hidrotiochroom (351 ame) en 'n onbekende hidroksi-tetrahydrothiochroom of hidroksi-hidrotiamien (353 ame). Die dogter-ione van die 351 ame en 349 ame is bepaal en word in figure 5-12 en 5-13 weergegee. 'n Moontlike fragmentasiepatroon word in die figure aangetoon.



Figuur 5-11 Massaspektrum van die gesintetiseerde gesubstitueerde tiamien- en 11-hidrotyochroomstandaard

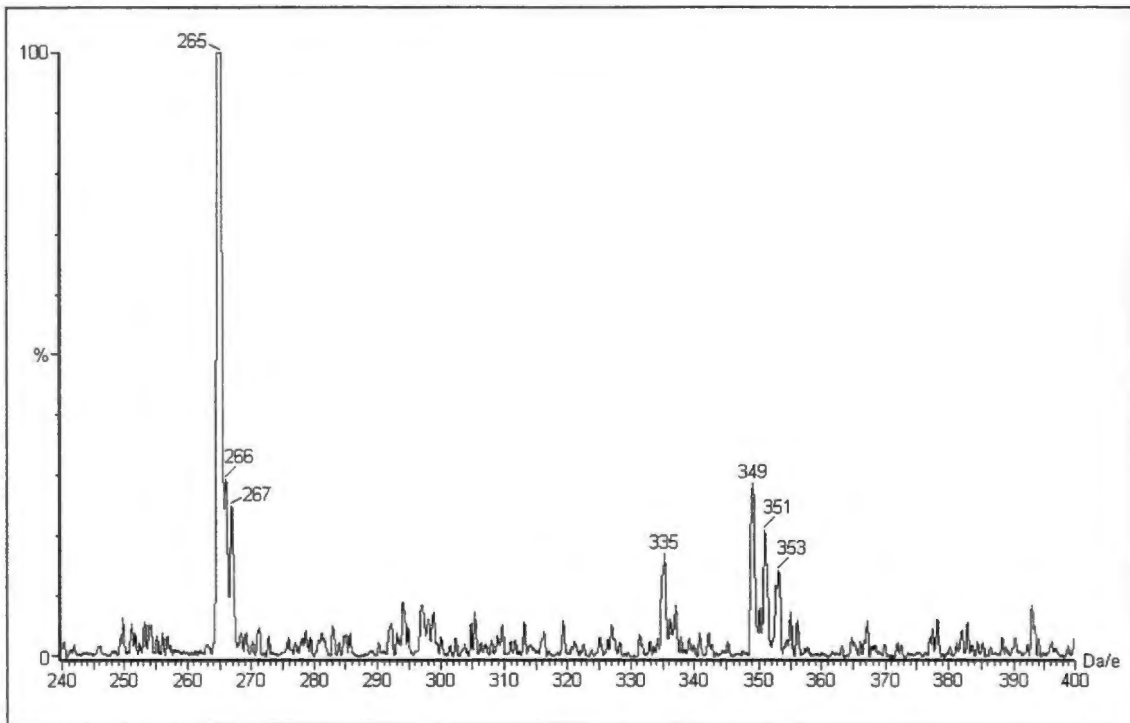


Figuur 5-12 Massaspektrum om die dogter-ione van die gesintetiseerde standaard (hidroksiisovalerietiamien) met 'n molekulêre massa van 351 amee aan te toon



Figuur 5-13 Massaspektrum om die dogter-ione van die gesintetiseerde standaard (hidroksi-isovaleriel-11-hidrotiochroom) met 'n molekulêre massa van 349 ame aan te toon

Dit is duidelik dat die 122 ame-fragment wat afkomstig is van die pirimidienring van tiamien, gemeenskaplik waarneembaar is by al die vorme van die gesubstidueerde tiamien en 11-hidrotiochroomprodukte. Hierdie fragment is gebruik om 'n ES-MS-MS-oueranalise op die geëkstraheerde urine uit te voer (Figuur 5-14).



Figuur 5-14 Ouer-ione van fragment 122 ame soos gevorm word tydens die analise van 'n urienmonster van pasient MM

Die analise toon 'n duidelike ioon met 265 ame. Hierdie ioon is waarskynlik afkomstig van vrye tiamien. Ione met atoommassa-eenhede van 349, 351 en 353 is onderskeidelik toe te skryf aan die hidroksi-isovaleriel- en hidroksi-2-metielbutirielanaloe van tiamien en 11-hidrotiochroom, terwyl die 335 ame en 337 ame-ione waarskynlik afkomstig is van die hidroksi-isobutirielkonjugaat van tiochroom en tiamien. Hierdie verbindings was afwesig in die urine van kontrolepasiënte. Analises van opvolgmonsters van pasiënt MM (en voor behandeling) het 'n verlaging in die vrye tiamien aangetoon, terwyl die gekonjugeerde tiamien- en tiochroomprodukte teen konstante konsentrasies uitgeskei is. As gevolg van die klein hoeveelheid uriene van BM en EM wat beskikbaar was met die aanvang van die navorsing kon geen thiamien analises op dié pasiënte uitgevoer word nie.

Die bestaan van die tiamienkonjugate van die E_1 -subeenheid van die 2-ketosuur dehidrogenase-kompleks kon in die urine van die pasiënt aangetoon word. Daar word dus voorgestel dat hierdie verbindings as substraat vir konjuseringsreaksies met aminosure kan optree. Dit kan ook die teenwoordigheid van die nege *N*-asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate wat geïdentifiseer is, verklaar. Die meganisme

waarvolgens hierdie konjugasie plaasvind en die ensiem wat daarvoor verantwoordelik is, is egter onbekend. Soortgelyke konjugasie word gekataliseer deur glisien-*N*-asilase, 'n mitochondriale ensiem, wat 'n asiel-KoA as substraat vereis.

Isovaleriaanglisien word in geweldige hoë konsentrasies in die urine van isovaleriaanasidemie-pasiënte aangetref (Sweetman & Williams, 1995:1394). Hierdie hoë konsentrasies kan toegeskryf word aan die feit dat isovaleriel-KoA uiters geskik is as substraat vir glisien-*N*-asilase. Glisien-*N*-asilase maak hoofsaaklik van glisien as 'n tweede substraat gebruik, hoewel verbindings soos leusien, isoleusien en valien ook soms aan die reaksie deelneem (Sweetman & Williams, 1995:1394). Verbindings soos isovalerielleusien, -isoleusien en -valien word dus in die urine van isovaleriaanasidemie-pasiënte aangetref. Indien hierdie ensiem verantwoordelik is vir die vorming van die nege *N*-asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate by MSUD-pasiënte, kan verwag word dat verbindings soos isovaleriaanglisien selfs teen hoër konsentrasies teenwoordig behoort te wees. Hierdie moontlikheid is ondersoek en geen spoor van isovaleriaanglisien was in die urine van die pasiënte teenwoordig nie. Hierdie data dui dus op die volgende:

- i) Dat die nege *N*-asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate waarskynlik nie deur glisien-*N*-asilase gevorm word nie (glisien is in hoër konsentrasies teenwoordig as die vertakteketting-aminosure in urine van MSUD-pasiënte); en
- ii) die konjugering wat verantwoordelik is vir die vorming van die nege verbindings, vind nie in lewermitochondria plaas nie, aangesien glisien-*N*-asilase byna uitsluitlik in die organel in die weefsel voorkom.

Dit wil dus voorkom of 'n verdere konjugeringsensiem mag voorkom wat vir die vorming van hierdie konjugate verantwoordelik is. Sodanige ensiem sal dus net soos in die geval glisien-*N*-asilase aangewend kan word in die besparing van 'n ko-faktor, in hierdie geval dus tiamienpirofosfaat.

Soos reeds bespreek is Hoofstuk 2, afdeling 2.3, kom 'n verskeidenheid defekte in die vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks voor. Onder die fenotipes wat

beskryf is, kom daar defekte op die E_1 -, E_2 - en E_3 -eenhede voor. Aangesien 'n defek op die E_3 -eenheid ook 'n defek van die piroviensuur- en α -ketoglutaarsuur dehidrogenase-komplekse tot gevolg het, word daar 'n ander kliniese beeld en metaboliëpatroon waargeneem by persone met hierdie fenotipe as by pasiënte met defekte op die E_1 - of E_2 -eenheid. Waar MSUD-pasiënte met defekte op die E_1 - of E_2 -eenhede geïnduseerde metaboliëte vorm wat normaalweg by MSUD-pasiënte opgespoor word, kom ander geïnduseerde metaboliëte soos melksuur, pirodruiwesuur, 2-ketoglutaarsuur, 2-hidroksi-isovaleraansuur en 2-hidroksi-glutaarsuur in verhoogde konsentrasies voor by pasiënte met 'n defek van die E_3 -eenheid (Munnich *et al.*, 1982:167 - 171; Matalon *et al.*, 1984:65 - 69; Robinson *et al.*, 1981: 35 - 39; Haworth *et al.*, 1976:564 - 572). 'n Pasiënt met 'n defek op die E_3 -eenheid kan dus op grond van die metaboliëpatroon wat uitgeskei word in die urine duidelik onderskei word van MSUD-pasiënte met defekte van die E_1 - of E_2 -eenhede.

Daar kon egter tot nou nie slegs uit die metaboliëpatroon van 'n MSUD-pasiënt onderskei word tussen 'n defek op die E_1 -eenheid of 'n defek van die E_2 -eenheid nie. Met die identifisering en die moontlike verklaring van die meganisme van vorming van hierdie *N*-2-asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate kan daar nou moontlik bepaal word op watter eenheid die defek by die verskillende MSUD-fenotipes voorkom deur die metaboliëpatroon soos uitgeskei in die urine van die pasiënt te ondersoek. Na verwagting behoort MSUD-pasiënte met 'n defek op die E_1 -eenheid nie hierdie *N*-2-asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate uit te skei nie in teenstelling met MSUD-pasiënte met 'n defek op die E_2 -eenheid.

5.2.2. Vertakteketting-2-ketosure en asetiel-KoA

Mienie (1994:45 - 47) het aangetoon dat sitraatsintase verskeie ketosure as substraat kan gebruik. 2-Ketosure soos 2-ketoglutaarsuur en 3-metiel-oksaalasynsuur kan die normale oksaalasynsuur as substraat vervang in 'n konjugasie met asetiel-KoA en propioniel-KoA. Die struktuur van die vertakteketting-2-ketosure is in sekere opsigte analoog aan die struktuur van oksaloasynsuur, hoewel dit 'n monokarboksielsuur is (Horton *et al.*, 1993: 13.6 - 13.7, Zubay, 1988: 486).

Omdat die vertakteketting-2-ketosure by MSUD-pasiënte verhoog voorkom, kan die vraag gevra word of 'n 2-ketosuur-asetiel-KoA-konjugasie soortgelyk aan die reaksie gekataliseer deur sitraatsintase, kan plaasvind. Soos uiteengesit in Diagram 5-7, kan verskeie metaboliete gevorm word wat nie net analoog aan sitroensuur is nie, maar wat ook verder geoksideer kan word na verdere analoë van die sitroensuursiklus.

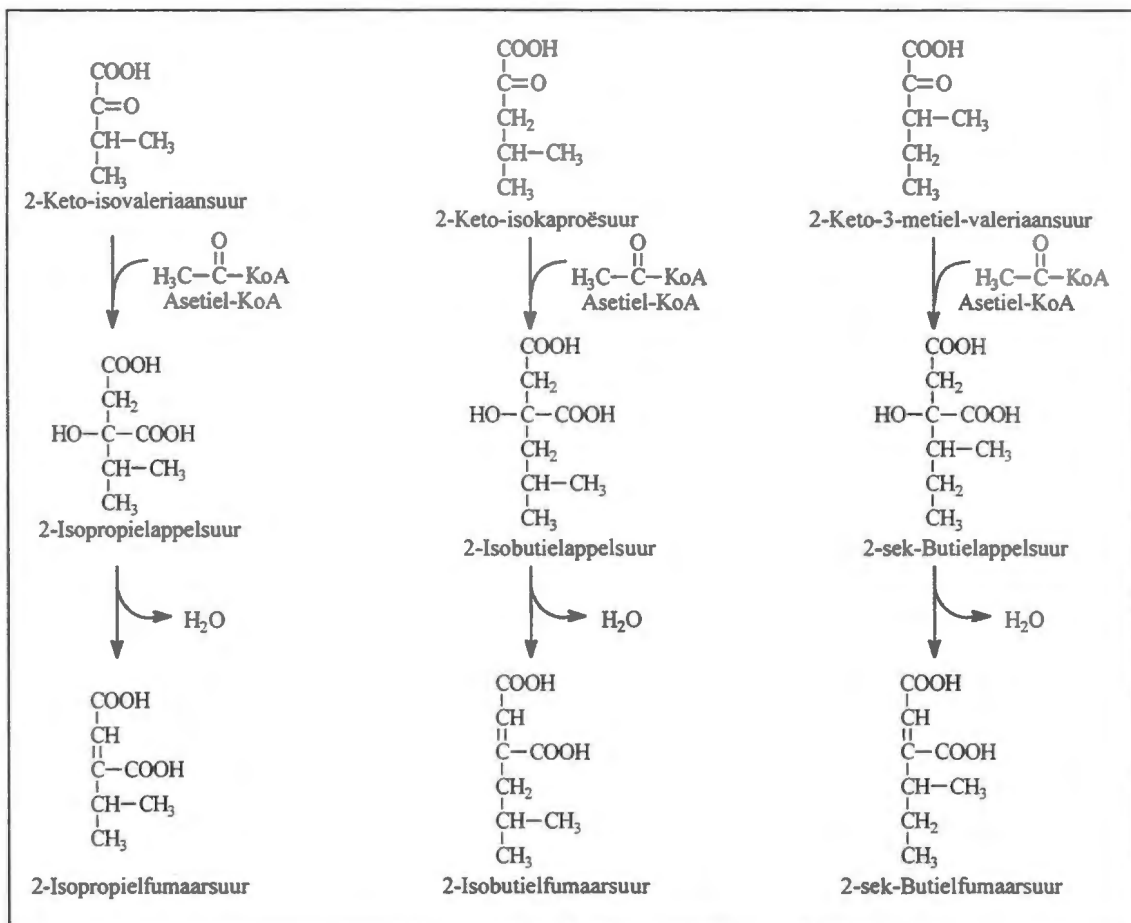
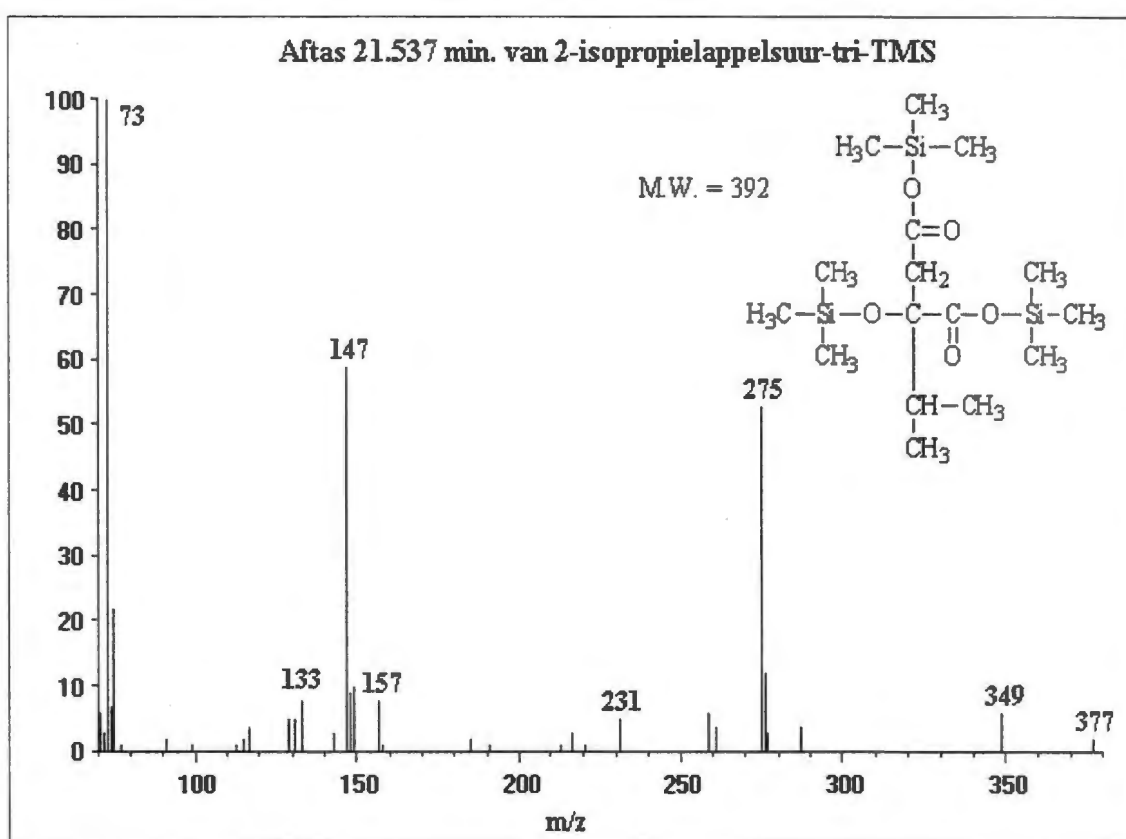


Diagram 5-7 Skematiese voorstelling van die konjugasie van asetiel-KoA en die vertakteketting-2-ketosure

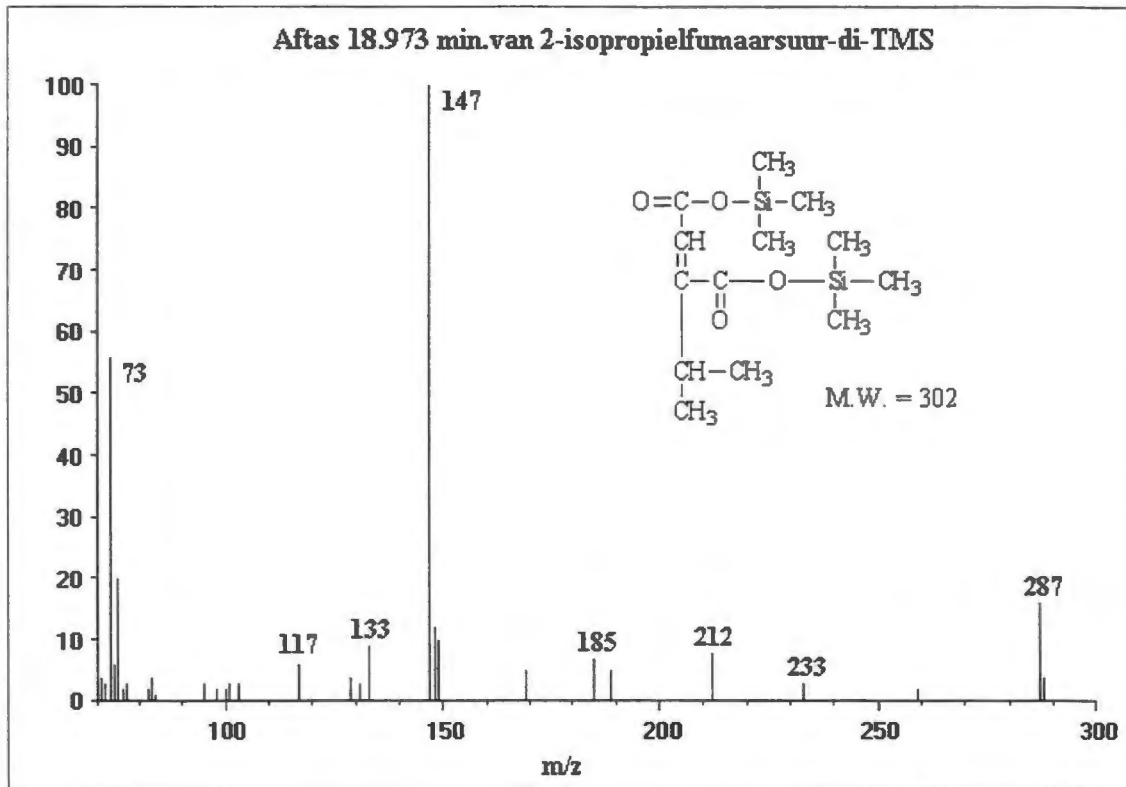
Die voorkoms van die metaboliete is in die urine van MSUD-pasiënte ondersoek na die sintese (vergelyk Hoofstuk 3, afdeling 3.4.10 en afdeling 3.4.11) en die verkryging van massaspektrums van die onderskeie verbindings. Aangesien slegs 2-isopropielappelsuur en spoorhoeveelhede 2-isopropielfumaarsuur gevind kan word sal slegs die massaspektrums van die twee verbindings weergegee word (figure 5-15 en 5-16). Hierdie verbindings kon ook slegs opgespoor word in die gefraksioneerde urienmonsters. Die TMS-derivaat van 2-isopropielappelsuur lewer nie 'n sterk M - 15

ame-fragment soos wat by meeste van die voorafgaande metaboliete in hierdie studie die geval is nie. Die metaboliet lewer egter 'n sterk 275 ame-fragment wat gevorm word deur die verlies van 'n karboksielsuur-mono-TMS gedeelte van die molekule.

Die TMS-derivaat van 2-isopropielfumaarsuur lewer wel 'n sterk M - 15 ame-fragment in teenstelling met 2-isopropielappelsuur-tri-TMS. Verder lewer 2-isopropielfumaarsuur-di-TMS ook 'n 259 ame-fragment wat moontlik gevorm word deur die verlies van die syketting ((CH₃)₂CH-) van die verbinding.



Figuur 5-15 Massaspektrum van 2-isopropielappelsuur-tri-TMS



Figuur 5-16 Massaspektrum van 2-isopropielfumaarsuur-di-TMS

Hierdie metaboliëte kom slegs in lae konsentrasies voor in die urine van MSUD-pasiënte. Die metaboliëte kon egter ook opgespoor word in die urine van drie ander pasiënte by wie die metaboliëse defek tot nou nog onbekend is.

Aangesien die reaksie soortgelyk is aan die eerste reaksie van die sitroensuursiklus, is voorgestel dat die ensiem sitraatsintase moontlik hierdie reaksie kan kataliseer. Hierdie ensiemreaksie is herhaaldelik getoets met 2-keto-isovaleriaansuur en asetiel-KoA as substrate. 2-Keto-isovaleriaansuur (of oksaalasynsuur in die geval van die kontrole) is by 'n reaksiemengsel gevoeg wat 'n buffer, asetiel-KoA en sitraatsintase bevat het. Hierdie reaksiemengsel is vir 24 uur by 37°C geïnkubeer, waarna 'n normale organiese suurekstraksie (vergelyk Hoofstuk 3, afdeling 3.4.2.) op die mengsel uitgevoer is. Hierdie inkubasie het egter nie tot opspoorbare hoeveelhede van die voorgestelde produk gelei nie, terwyl groot hoeveelhede sitroensuur in die kontrole-inkubasie met oksaalasynsuur en asetiel-KoA teenwoordig was.

Aangesien sitraatsintase nie die reaksie kataliseer nie, is daar ander moontlike meganismes van vorming ondersoek. Een moontlikheid is dat die verbinding spontaan gevorm kan word. Hierdie hipotese is getoets deur die uitgangstowwe by urine te voeg en onder variërende toestande, wat insluit pH, temperatuur en tyd, te inkubeer. Telkens is 'n organiese suurekstraksie van die reaksiemengsel uit gevoer en met behulp van gas-chromatografie-massaspektrometrie geanaliseer. Geen verbinding kon op hierdie wyse gesintetiseer word nie.

'n Verdere moontlikheid wat ondersoek is, het voorgestel dat die metaboliete van bakteriese oorsprong kon wees. Sommige eensellige organismes wat in die ingewande van mense voorkom, beskik oor die vermoë om leusien te sintetiseer deur gebruik te maak van 2-keto-isovaleriaansuur (Zubay, 1988:779). Hierdie metaboliese weg word in Diagram 5-8 aangetoon.

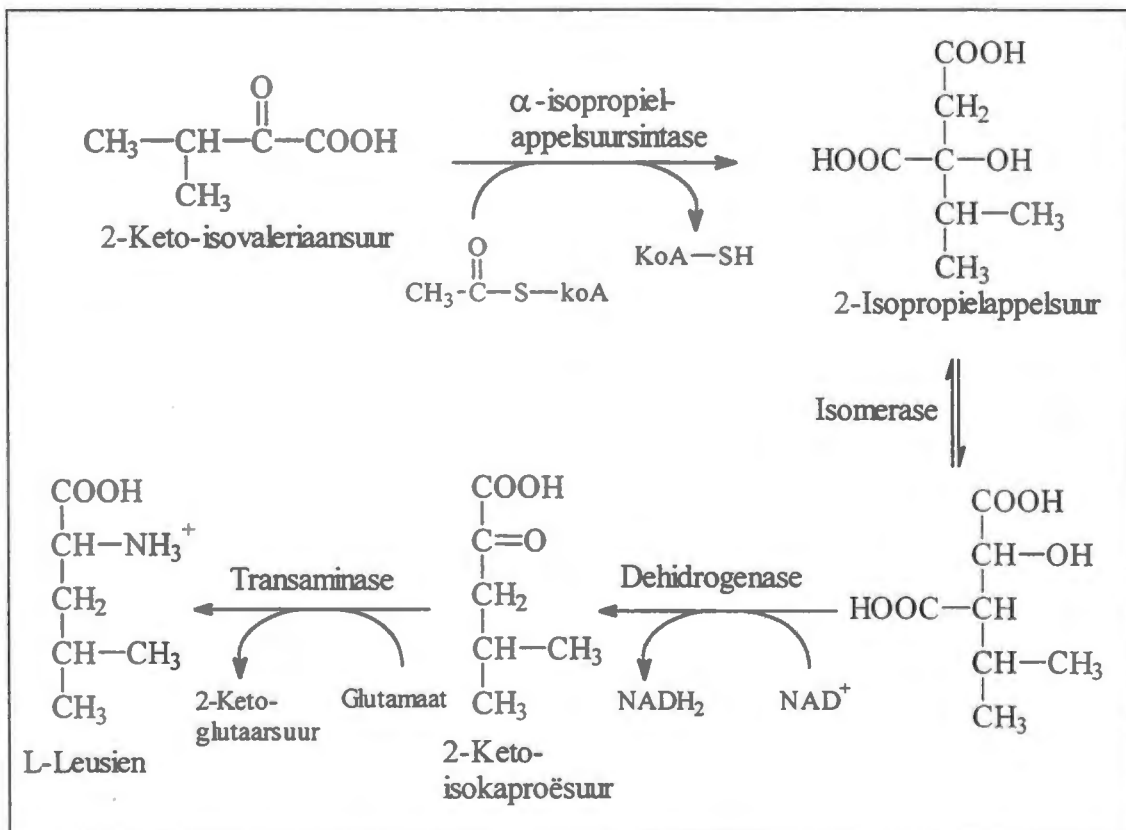


Diagram 5-8 Skematiese voorstelling van die anaboliese weg van leusien soos gevind in eensellige organismes (Gottschalk, 1986:48)

Hierdie hipotese is getoets deur *E.coli* te inkubeer met slegs 2-keto-isovaleriaansuur as voedingsbron. Daar is op gereelde stadiums van die groeimedium onttrek en 'n ekstraksie is dan op hierdie monster uitgevoer. 2-Isopropielappelsuur en 2-isopropielfumaarsuur kon op hierdie wyse opgespoor word. Indien die organisme egter met onderskeidelik 2-keto-isokaproësuur en 2-keto-3-metielvaleriaansuur as enigste voedingsbron geïnkubeer word, is geen produkte (2-isobutiellappelsuur en 2-isobutielfumaarsuur vanaf 2-keto-isokaproësuur en 2-sekondêre-butiellappelsuur en 2-sekondêre-butielfumaarsuur vanaf 2-keto-3-metielvaleriaansuur) gevorm nie. Aangesien geen 2-isobutiellappelsuur, 2-isobutielfumaarsuur, 2-sekondêre-butiellappelsuur of 2-sekondêre-butielfumaarsuur opgespoor kon word in die urine van die MSUD-pasiënte nie, word daar bespiegel oor die moontlikheid dat die 2-isopropielappelsuur en 2-isopropielfumaarsuur afkomstig is vanaf ingewandsbakterieë. Hierdie teorie bied ook 'n verklaring vir die hoë leusienkonsentrasie, in vergelyking met die valien- en isoleusienkonsentrasie, by MSUD-pasiënte.

5.2.3. 2-Ketosure en ureum

Die vorming en identifikasie van die hidantoïenagtige verbindings wat in die urine van die MSUD-pasiënte opgespoor is, is reeds in Hoofstuk 4 beskryf (vergelyk Hoofstuk 4, afdeling 4.2.6). Geen definitiewe meganisme van vorming kon aangedui word vir die vorming van hierdie metaboliete nie. Hoewel daar voorgestel is dat die metaboliete gevorm kan word deur die kreatiensintese-weg, kon geen konkrete bewyse hiervoor gevind word nie. Dit is egter ook moontlik dat die vorming van hierdie hidantoïenverbinding plaasvind deur die konjugering van die onderskeie vertakteketting-2-ketosure met ureum. Hierdie moontlike meganisme word in Diagram 5-9 uiteengesit.

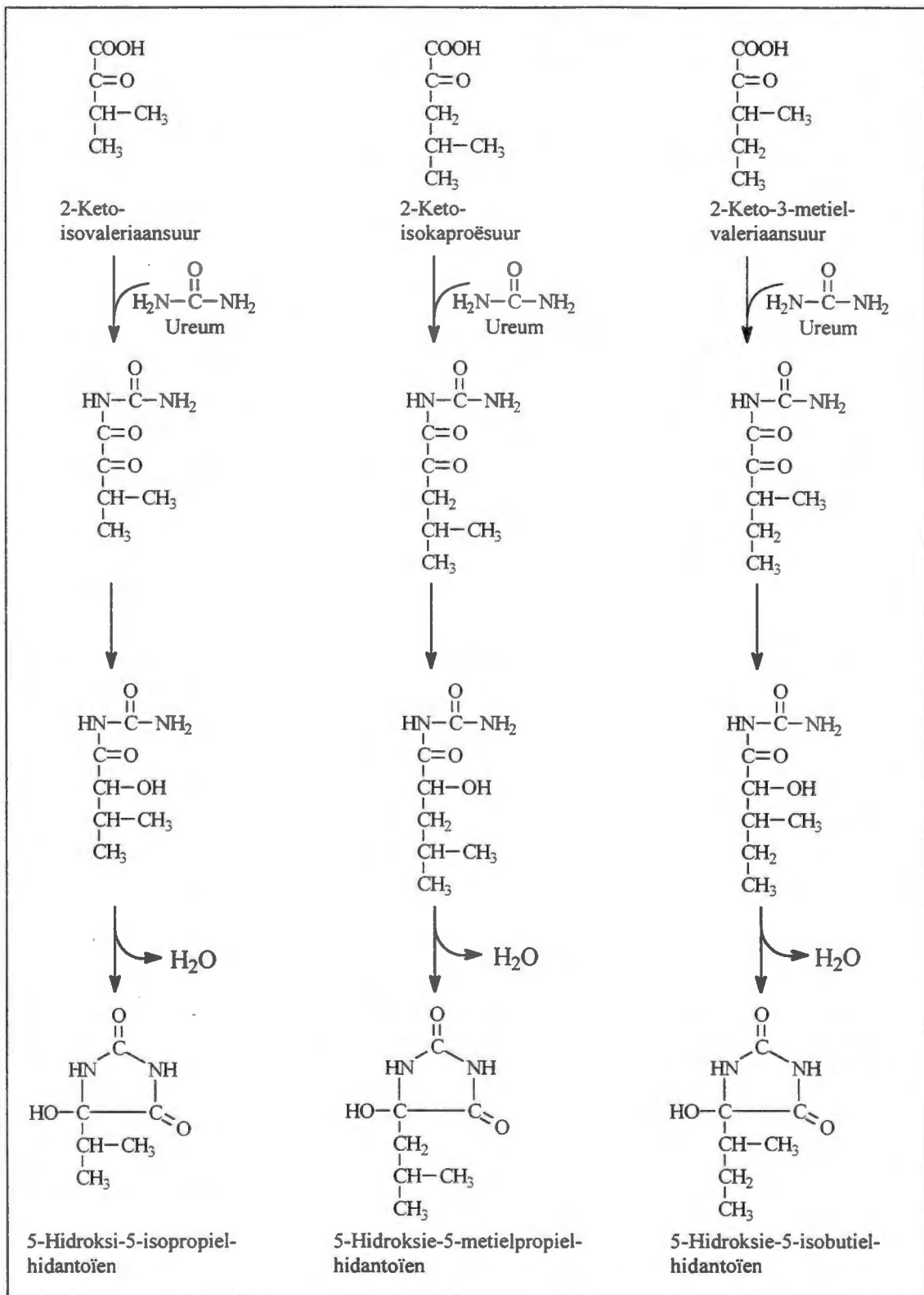


Diagram 5-9 Skematiese voorstelling van die moontlike meganisme van vorming van hidantoïene uit die vertakteketting-2-ketosure en ureum

Hierdie meganisme van vorming kan beteken dat die metaboliete spontaan kan vorm of dat die metaboliete ensiematies gevorm word. Die vertakteketting-2-ketosure en ureum is in fraksies van dieselfde urienmonster (pH 7) opgelos en dan by 37°C vir 24 uur geïnkubeer. Elk van die bepalings is herhaal by 'n pH van 4 en 9. Telkens is 'n organiese suurekstraksie van die reaksiemengsel uitgevoer waarna die ekstrak met behulp van gas-chromatografie-massaspektrometrie geanaliseer is. Hierdeur is vasgestel dat die metaboliete waarskynlik nie spontaan gevorm word nie.

5.3. Opsomming van metaboliete gevorm uit die vertakteketting-2-ketosure

In diagramme 5-10, 5-11 en 5-12 word aangedui watter moontlike metaboliete voorgestel is en watter van die metaboliete wel in die urine van MSUD-pasiënte opgespoor is. Uit die diagramme blyk dit dat al nege *N*-asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate opgespoor is, terwyl slegs twee van die sitroensuursiklus-analoë (2-isopropielappelsuur en 2-isopropielfumaarsuur) opgespoor kon word.

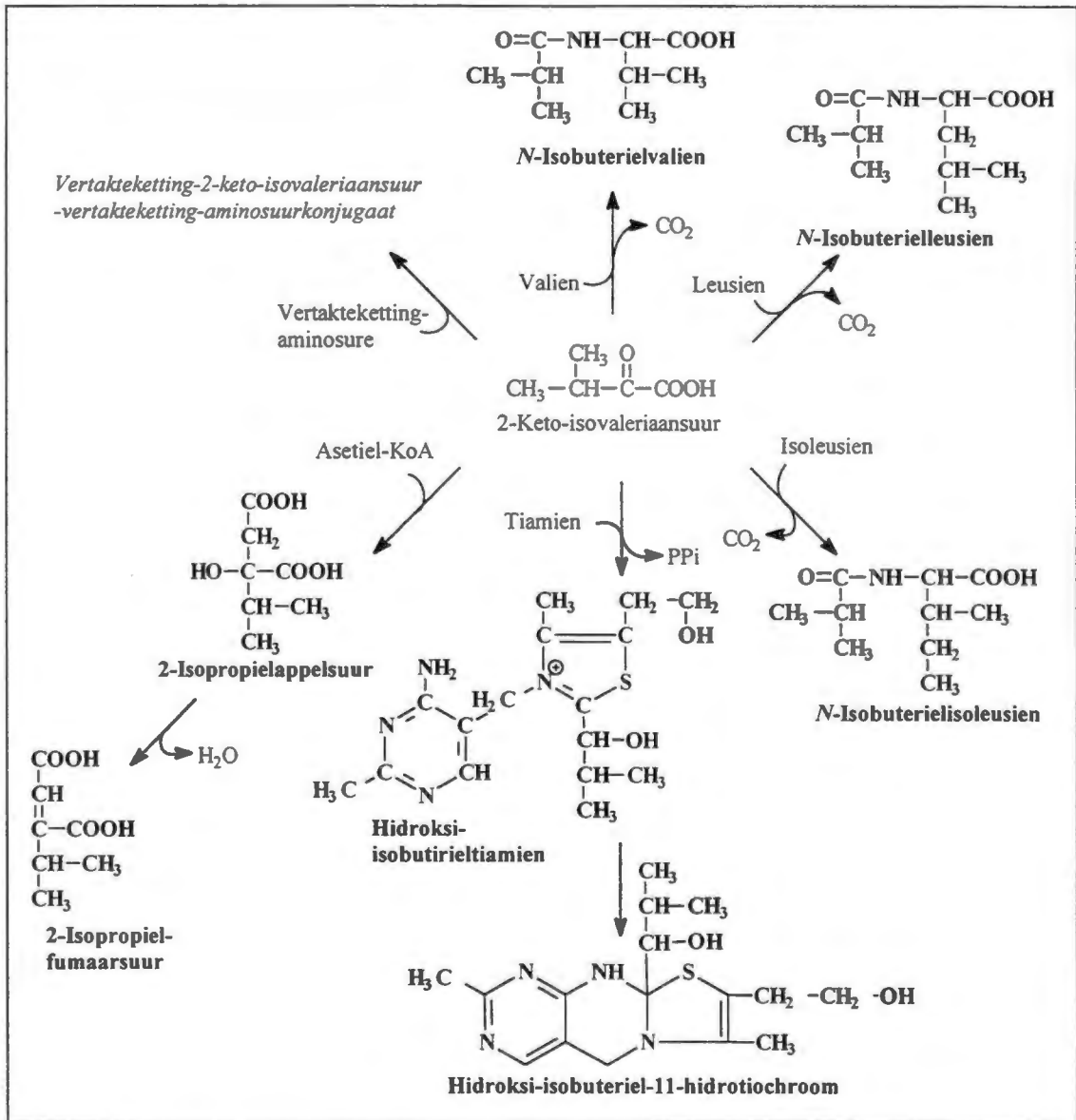


Diagram 5-10 Opsomming van die voorgestelde metaboliete wat moontlik gevorm kan word uit 2-keto-isovalerianaansuur. Die metaboliete wat geïdentifiseer kon word, word donker aangedui, terwyl die kursief-gedrukte verbindings nie opgespoor is in die urine van MSUD-pasiënte nie

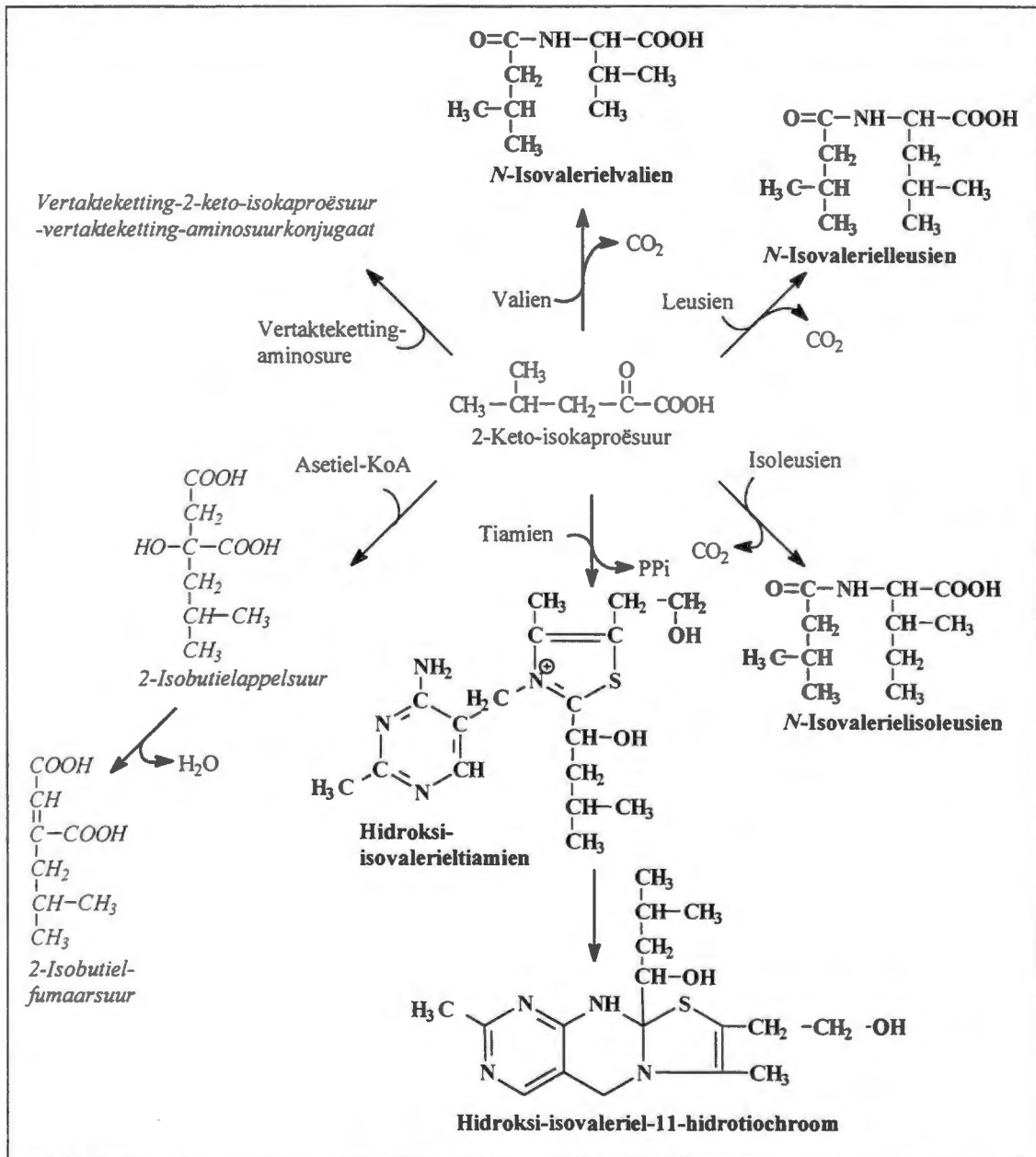


Diagram 5-11 Opsomming van die voorgestelde metaboliete wat moontlik gevorm kan word uit 2-keto-isokaproësuur. Die metaboliete wat geïdentifiseer kon word, word donker aangedui, terwyl die kursief-gedrukte verbindings nie opgespoor is in die urine van MSUD-pasiënte nie

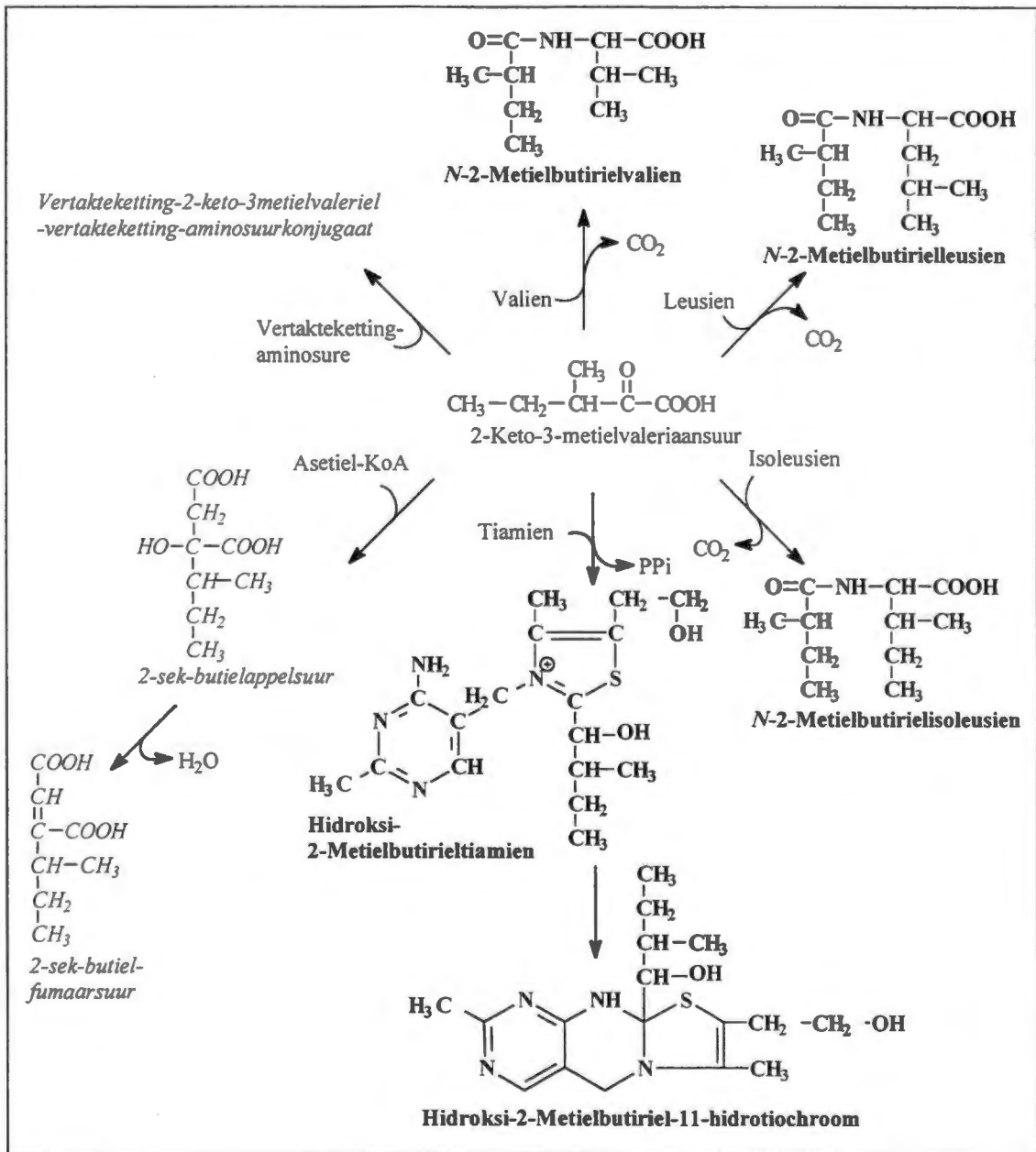


Diagram 5-12 Opsomming van die voorgestelde metaboliete wat moontlik gevorm kan word uit 2-keto-3-metielvaleriaansuur. Die metaboliete wat geïdentifiseer kon word, word donker aangedui, terwyl die kursief-gedrukte verbindings nie opgespoor is in die urine van MSUD-pasiënte nie

In die geval van die *N*-asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate is vasgestel dat die meganisme van vorming moontlik van die asiel-TPP-konjugaat gebruik maak vir die konjugeringsreaksie. Om hierdie teorie te staaf, is verbindings opgespoor wat moontlik die gesubstitueerde tiochroom en tiamienverbindinge kan wees. Die ensiem wat moontlik verantwoordelik is vir die konjugering van die asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate wat hierdie reaksie kataliseer, kon nie geïdentifiseer word nie.

Met die konjugering van asetiel-KoA en die vertakketting-2-ketosure is bevind dat die oorsprong van hierdie verbindings moontlik van ingewandsbakterieë afkomstig kon wees omdat ingewandsbakterieë van 2-keto-isovaleriaansuur gebruik kan maak om leusien te sintetiseer. Hierdie teorie kan moontlik verklaar waarom die konsentrasies van leusien soms so verhoog en valien soms so verlaag voorkom in vergelyking met die konsentrasie van isoleusien in die urine van MSUD-pasiënte.

In die geval van die konjugasie van die vertakketting-2-ketosure met ureum, kon vasgestel word dat die konjugasie nie spontaan plaasvind nie. Die ensiem of ensieme wat hierdie konjugasie kataliseer, is egter nie bekend nie. Uit die resultate van beide hierdie hoofstuk en Hoofstuk 4 (vergelyk Hoofstuk 4, afdeling 4.2.6), kon die meganisme van vorming nie vasgestel word nie.

Hoofstuk 6

Resultate

Geïnduseerde metaboliëte uit die vertakteketting-2- hidroksisuur

6.1. Inleiding

In Diagram 6-1 word 'n soortgelyke voorstelling as in hoofstukke 4 en 5 gemaak van alle moontlike geïnduseerde metaboliëte wat in hierdie geval vanaf 2-hidroksi-isovaleriaansuur, 2-hidroksi-isokaproësuur en 2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur gevorm kan word. Die voorgestelde metaboliëte is gegrond op die voorkoms en vormingsmeganismes van metaboliëte by MSUD sowel as ander metaboliese defekte. Die rede vir die voorstelling van 'n moontlike metaboliëte sal in hierdie hoofstuk ook telkens gemotiveer word voor die ondersoek na die bepaalde metaboliëte uitgevoer sal word. Faktore wat 'n invloed op die oorsprong van die metaboliëte het, sal so ver moontlik ondersoek en bespreek word. 'n Verdere afdeling van hierdie hoofstuk sal handel oor geïnduseerde metaboliëte wat nie direk verband hou met die ensiem wat defek is nie, maar eerder as 'n gevolg van die defek ontstaan.



Diagram 6-1 Voorstelling van geïnduseerde metaboliete wat potensieel vanaf 2-hidroksi-isovaleriaansuur, 2-hidroksi-isokaproësuur en 2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur gevorm kan word

6.2. Geïnduseerde metaboliete

6.2.1. Dikarboksielsuur- en laktoonvorming

2-Hidroksisure is nie bekend om as 'n substraat vir die mikrosomale oksigenase-ensiemstelsel op te tree nie (Gerr & James, 1980:79 - 80). Dit is egter nie heeltemaal onwaarskynlik dat ω -oksidase en ($\omega-1$)-oksidase wel sal plaasvind met substrate soos 2-hidroksi-isovaleriaansuur en van die ander vertakteketting-2-hidroksisure nie. Soos in die geval van isovaleriaansuur wat aanleiding gee tot die vorming van γ -hidroksi-isovaleriaansuur om deur middel van spontane laktoonvorming oorsprong te gee aan γ -hidroksi-isovaleriaanlaktoon, sal die produkte van ω -oksidase met vertakteketting-2-hidroksisure as substrate ook uiteindelik in die laktoonvorm in die urine teenwoordig wees. 'n Skematiese voorstelling word in Diagram 6-2 gegee. Dit is egter ook moontlik dat die γ -gehidroksileerde-2-hidroksisure omgeskakel kan word na die ooreenstemmende dikarboksielsuur soos uiteengesit in Diagram 6-2.

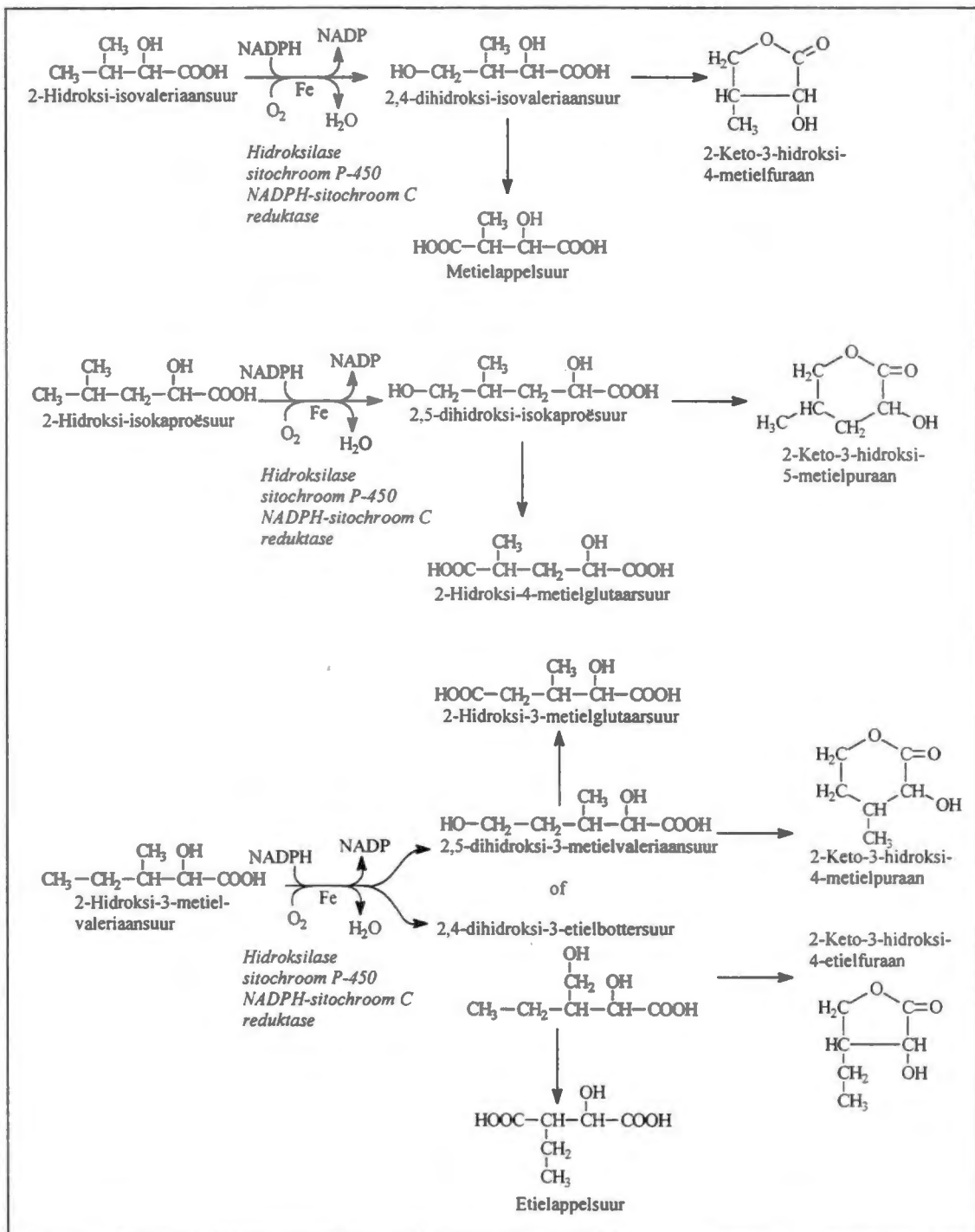
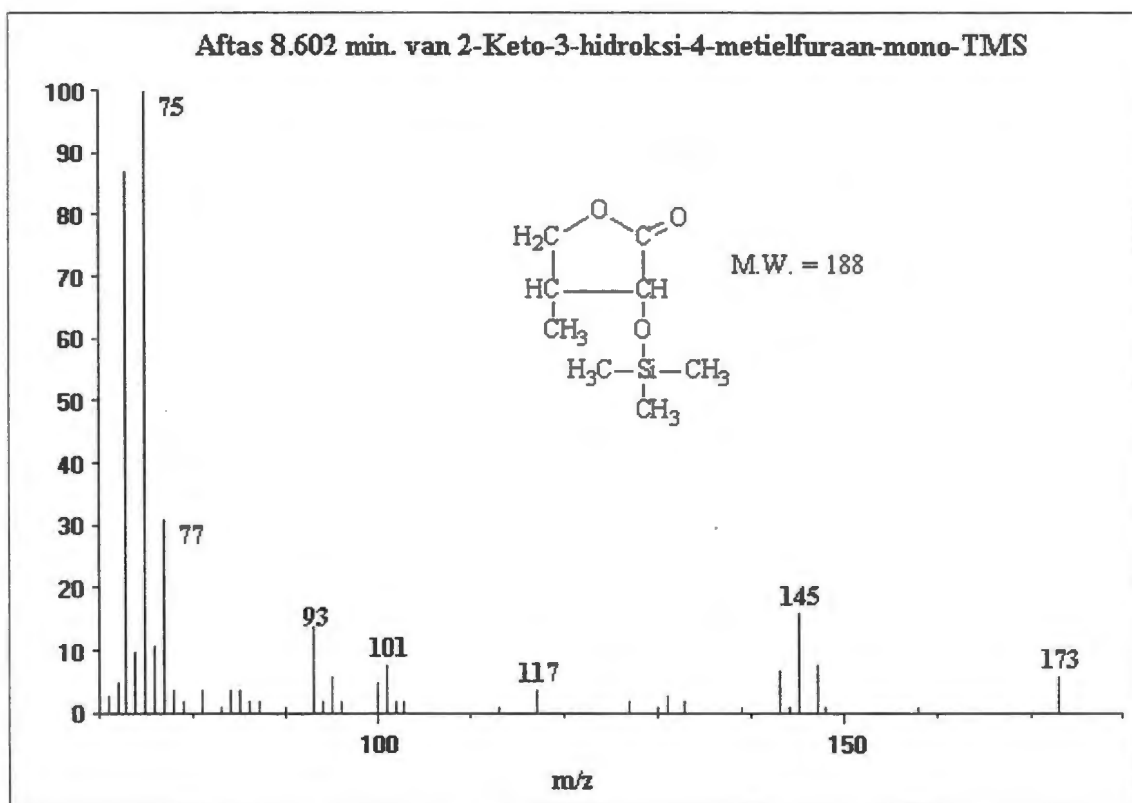


Diagram 6-2 Skematiese voorstelling van die moontlike vorming van die laktone en dikarboksielsure. Die moontlike produkte wat gevorm kan word van 2-hidroksi-isovaleriaansuur, 2-hidroksi-isokaproësuur en 2-hidroksi-3-metiellvaleriaansuur word in die diagram aangetoon

Die α,γ -dihidroksisure kon nie in die urine opgespoor word nie. Die ooreenstemmende laktoonagtige verbindings is egter wel opgespoor, hoewel die spektrums nie geverifieer kon word nie. Die α,γ -dihidroksisure word nie waargeneem nie omdat hierdie verbindings moontlik spontaan na die laktoonagtige verbinding

omgesit word. Die dikarboksielsure word ook nie gevorm by die MSUD-pasiënte wat ondersoek is nie. Indien hierdie meganisme van vorming egter waar is, kan verwag word dat 2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur op enige van die metielgroepe van die syketting kan hidroksileer. Mienie (1994:88) toon aan dat ω -oksidase nie stereospesifiek plaasvind nie, wat dus daartoe aanleiding gee dat 2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur twee laktoonverbindings kan oplewer (vergelyk Diagram 6-2). Spektrums wat beide hierdie metaboliete kan verteenwoordig, is dan ook in die urine van MSUD-pasiënte opgespoor. Die metaboliete wat gevorm kan word, is 2-keto-3-hidroksi-4-metielfuraan, 2-keto-3-hidroksi-5-metielpuraan, 2-keto-3-hidroksi-4-metielpuraan en 2-keto-3-hidroksi-4-etielfuraan.

Die massaspektrum van die TMS-derivaat van 2-keto-3-hidroksi-4-metielfuraan word in Figuur 6-1 weergegee.



Figuur 6-1 Massaspektrum van 2-keto-3-hidroksi-4-metielfuraan-mono-TMS

Bogenoemde spektrum is vergelyk met die spektrums in die NIST-biblioteek. Die verbinding kom egter nie in die biblioteek voor nie hoewel dit goed ooreenstem met soortgelyke laktoonverbindings.

6.2.2. Vertakteketting-2-hidroksisuurdimere

Laktiellaktaat word dikwels in urine van pasiënte met hoë laktaatbloedvlakke aangetref (Ketting *et al.*, 1985:29). Die oorsprong van hierdie dimere is nie bekend nie, maar aangesien veral 2-hidroksi-isovaleriaansuur in baie hoë konsentrasies in MSUD-pasiënte voorkom, is die moontlikheid dat soortgelyke dimere in die pasiënte gevorm kan word, ondersoek. 'n Algemene voorstelling van die konjugeringsreaksie word in Diagram 6-3 uiteengesit.

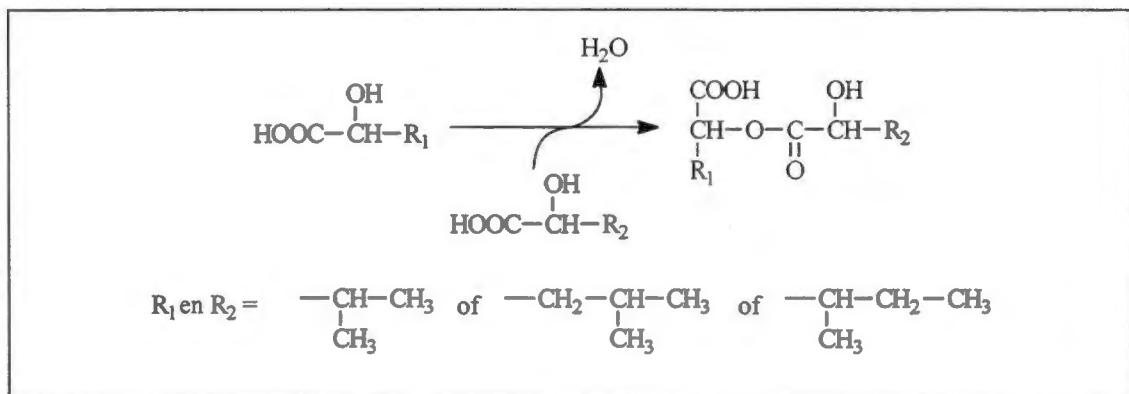
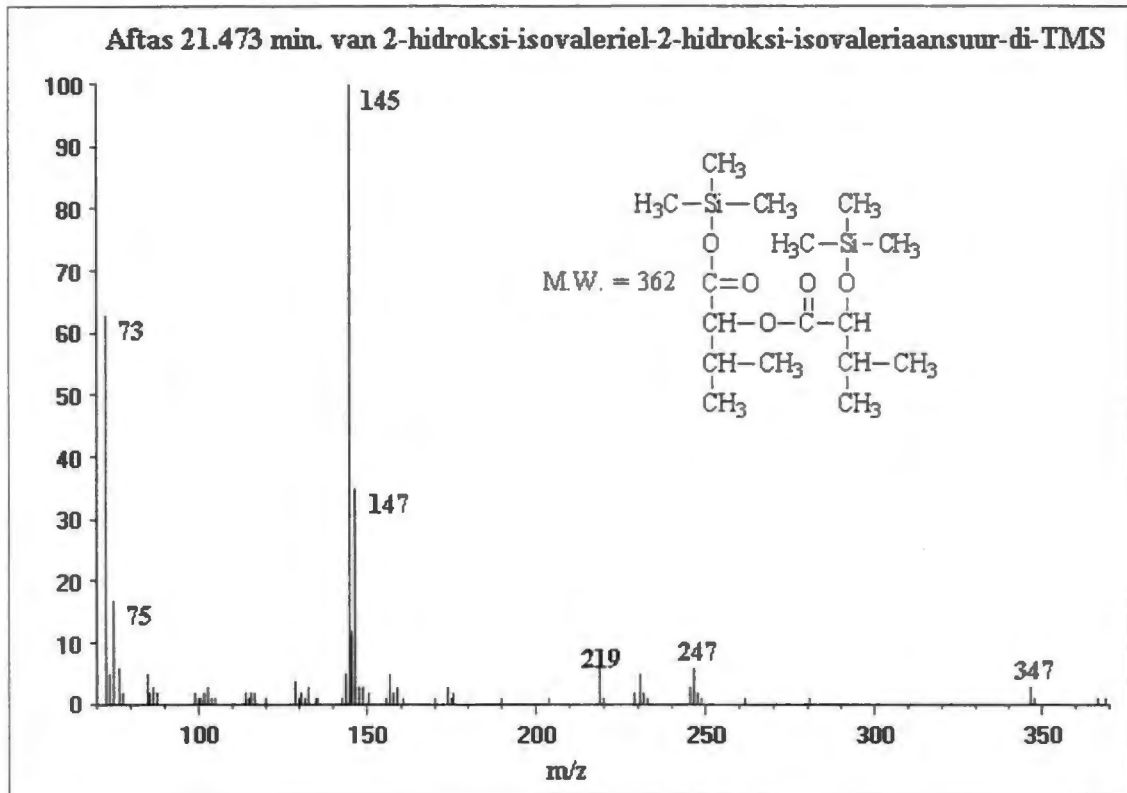
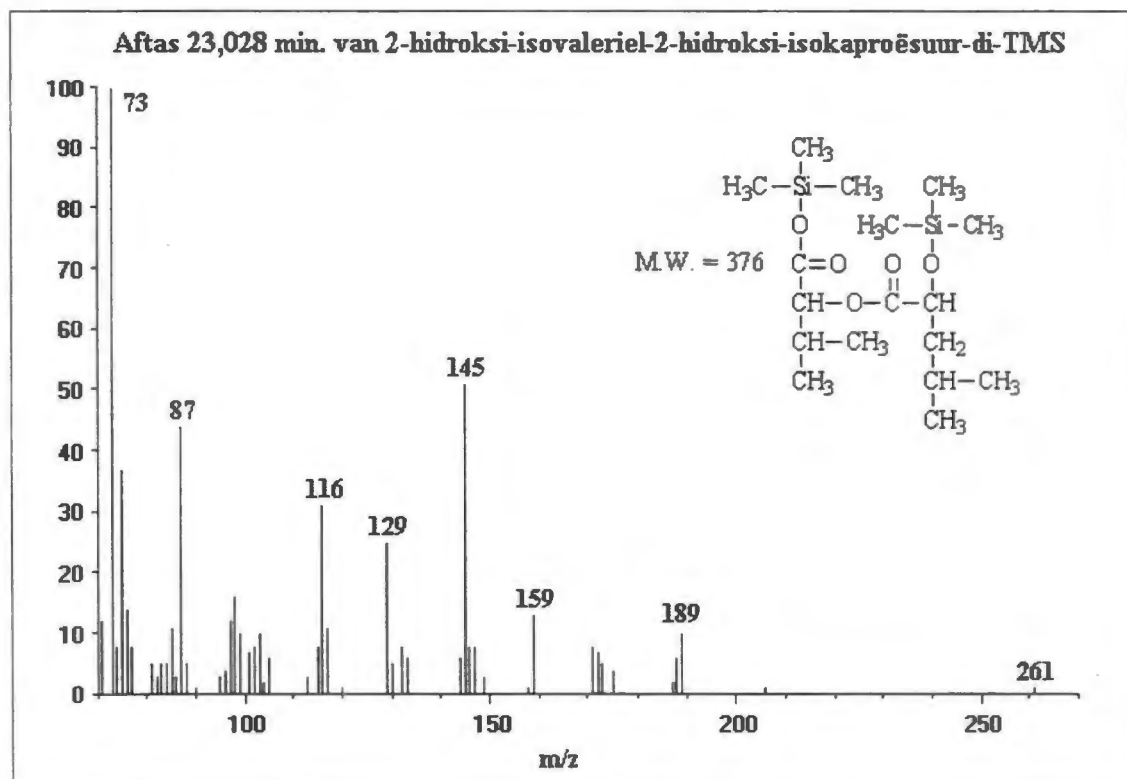


Diagram 6-3 Skematiese voorstelling van die konjugering van die vertakteketting-2-hidroksisure

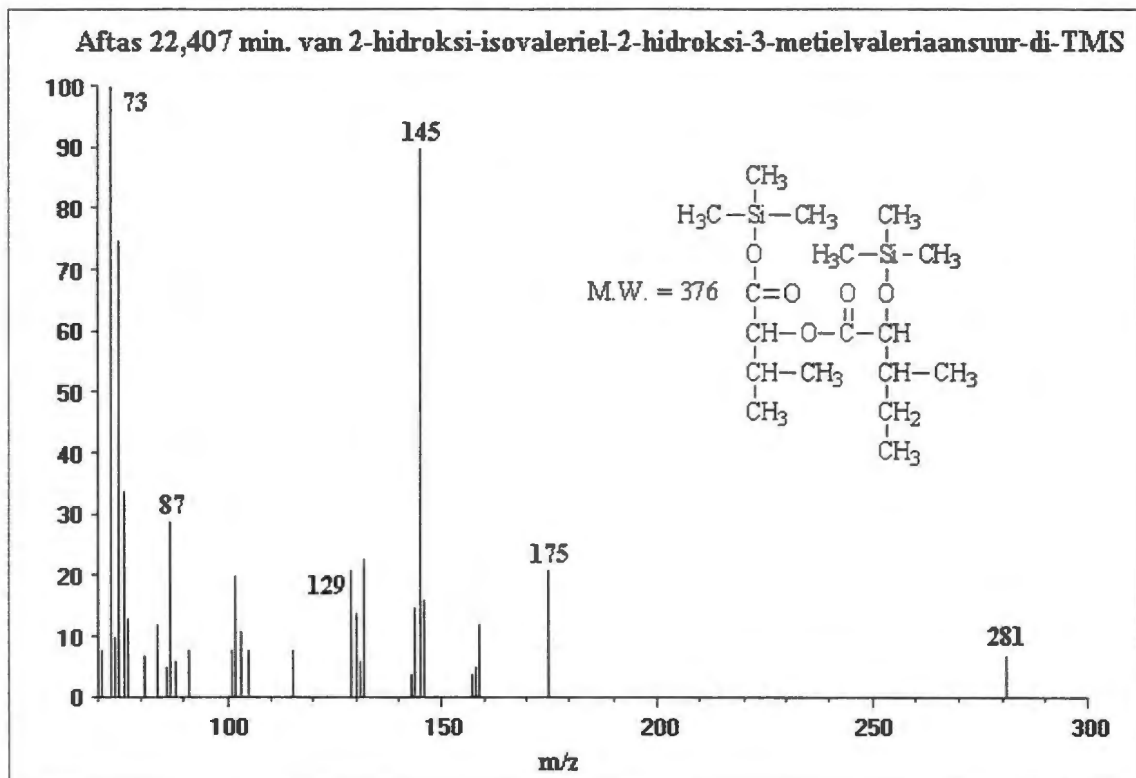
Die eerste drie dimere wat potensieel by MSUD-pasiënte gevorm kan word, is die konjugate van 2-hidroksi-isovaleriaansuur met 2-hidroksi-isovaleriaansuur, 2-hidroksi-isokaproësuur en 2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur. Hierdie verbinding is gesintetiseer soos bespreek in Hoofstuk 3, afdeling 3.4.8.2. Die massaspektrums van die TMS-derivate van 2-hidroksi-isovaleriël-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 2-hidroksi-isovaleriël-2-hidroksi-isokaproësuur en 2-hidroksi-isovaleriël-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur word in figure 6-2, 6-3 en 6-4 weergegee.



Figuur 6-2 Massaspektrum van 2-hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-isovaleriaansuur-di-TMS



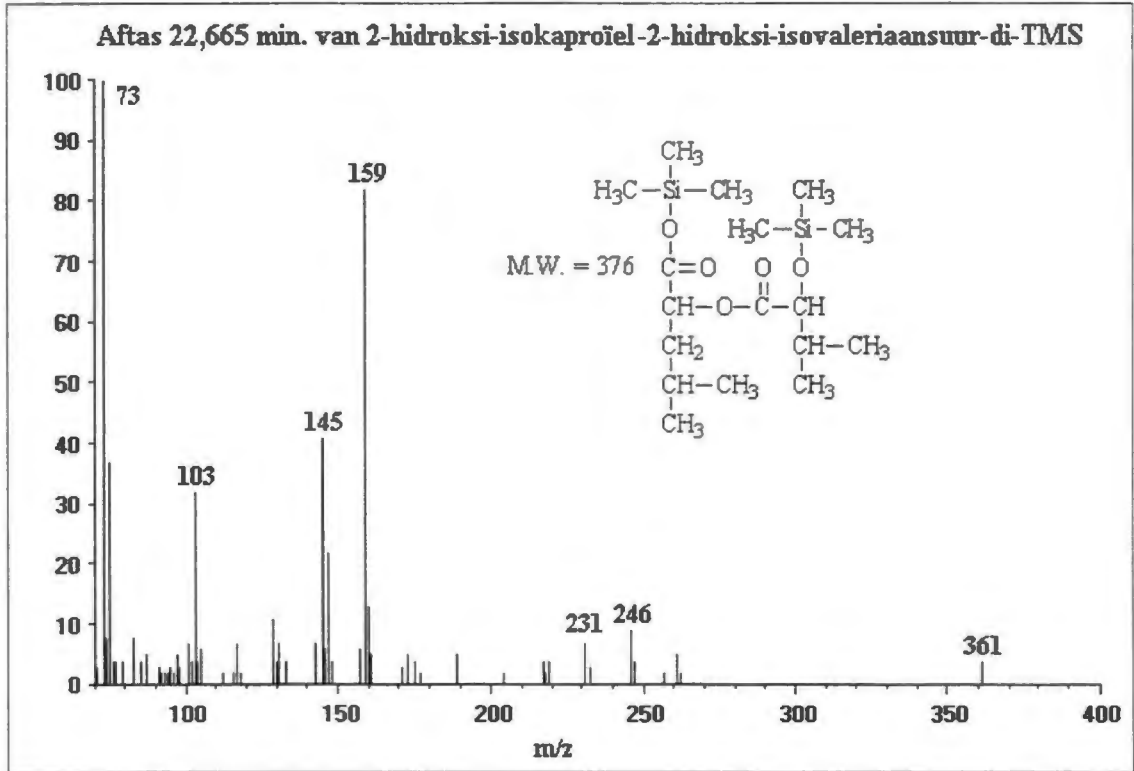
Figuur 6-3 Massaspektrum van 2-hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-isokaproësuur-di-TMS



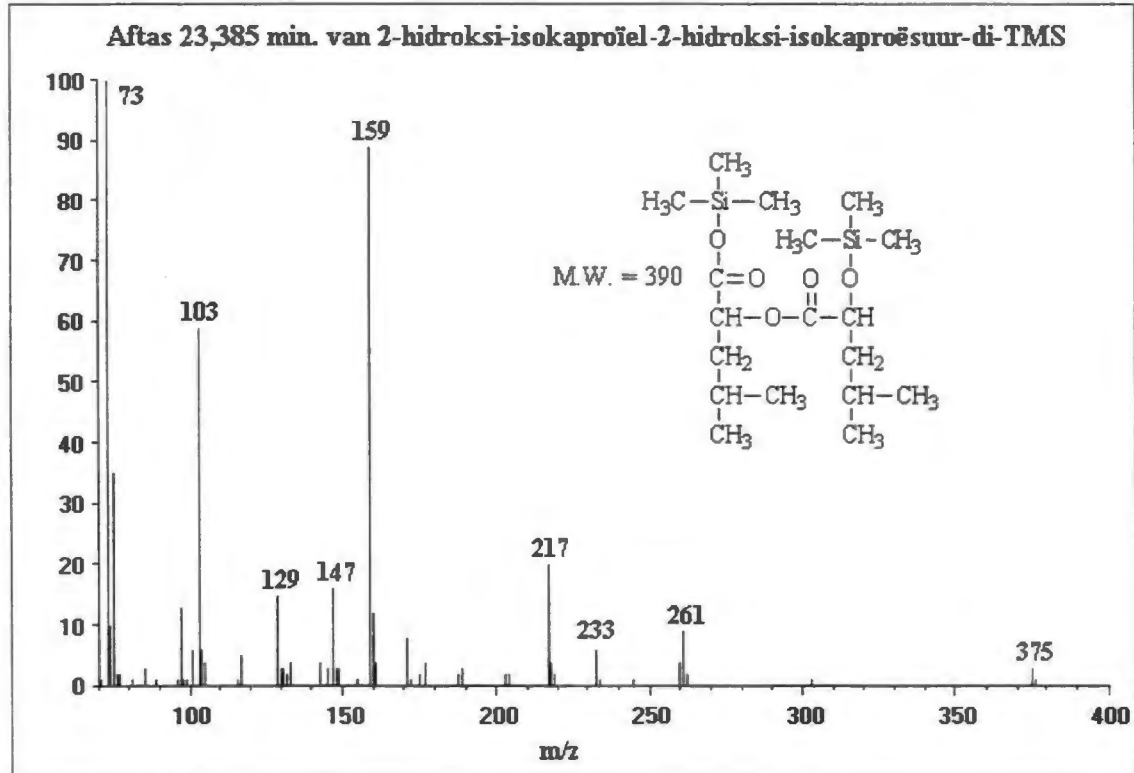
Figuur 6-4 Massaspektrum van 2-hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur-di-TMS

Hierdie spektrums lewer soos verwag kan word 'n sterk fragment van 145 amu. Hierdie fragment is afkomstig vanaf die 2-hidroksi-isovalerielgedeelte van die konjugaat. In die geval van die 2-hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-isokaproësuur-di-TMS en -2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur-di-TMS-konjugate word 'n swakker 159 amu-fragment ook gevorm.

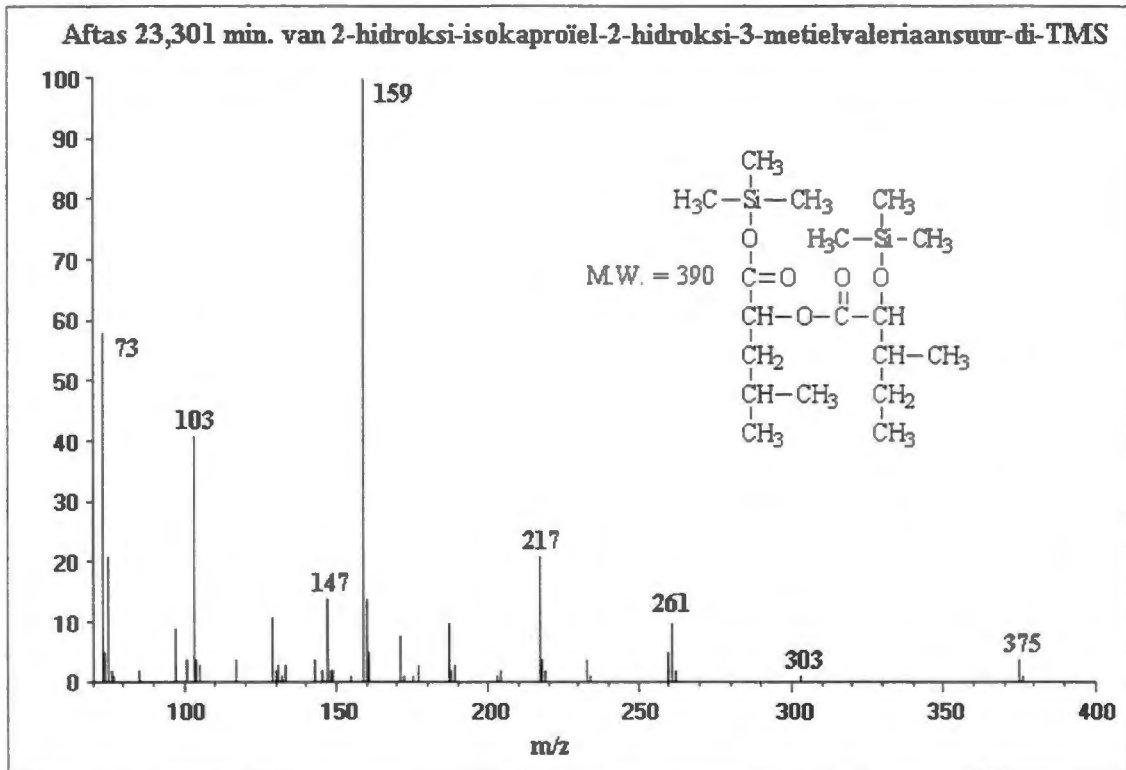
Aangesien die 2-hidroksi-isovaleriaansuur en vertakteketting-2-hidroksisuurkonjugate gevorm is, is dit vanselfsprekend dat die 2-hidroksi-isovaleriaansuur in bogenoemde reaksie vervang kan word met 2-hidroksi-isokaproësuur. Hierdie konjugering sal dus 2-hidroksi-isokaproëiel-2-hidroksi-isovaleriaansuur, -2-hidroksi-isokaproësuur en -2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur oplewer. Hierdie verbindings is gesintetiseer op soortgelyke wyse as die 2-hidroksi-isovalerielkonjugate (vergelyk Hoofstuk 3, afdeling 3.4.8.2). Die fragmentasiepatroon van hierdie drie verbindings word in figure 6-5, 6-6 en 6-7 voorgestel.



Figuur 6-5 Massaspektrum van 2-hidroksi-isokaproïel-2-hidroksi-isovaleriaansuur-di-TMS



Figuur 6-6 Massaspektrum van 2-hidroksi-isokaproïel-2-hidroksi-isokaproësuur-di-TMS

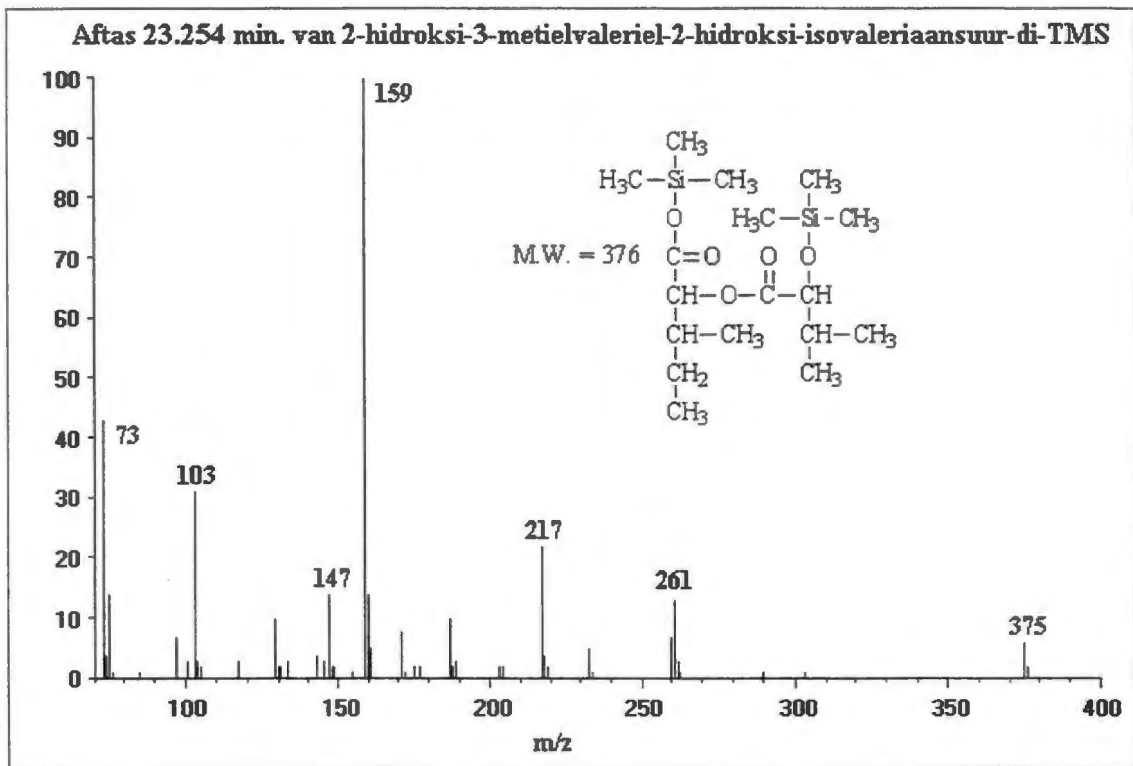


Figuur 6-7 Massaspektrum van en 2-hidroksi-isokaproïel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur-di-TMS

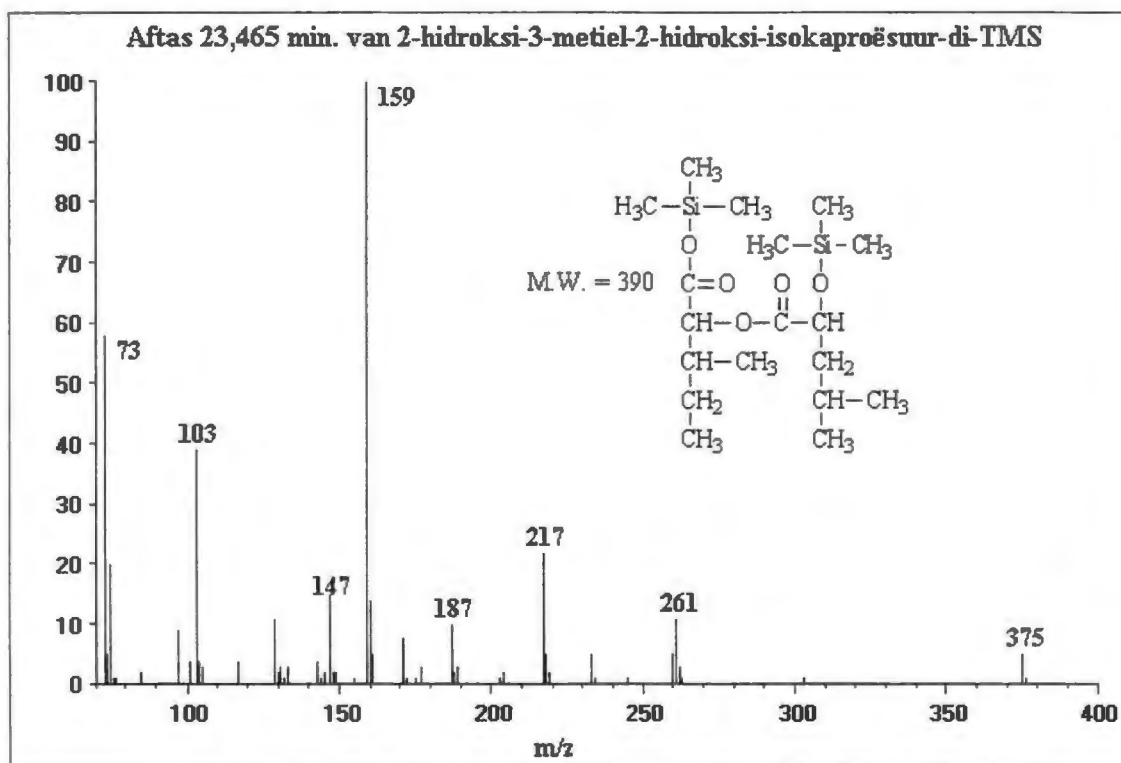
Hierdie verbinding toon 'n soortgelyke fragmentasiepatroon as die 2-hidroksi-isovaleriel-2-hidroksisuurkonjugate. In hierdie geval word daar egter 'n sterk 159 amu-fragment gevorm wat 14 amu swaarder is as die 145 amu-fragment wat by die 2-hidroksi-isovaleriel-2-hidroksisuurkonjugate opgespoor is. 'n Verklaring vir hierdie fragment is dat dit afkomstig is vanaf die 2-hidroksi-isokaproïelgedeelte van die metaboliet. In dié geval van 2-hidroksi-isokaproïel-2-hidroksi-isovaleriaansuur word daar ook 'n 145 amu-fragment gevorm, wat moontlik afkomstig is vanaf die 2-hidroksi-isovaleriaansuurgedeelte van die molekule.

Soos reeds vermeld, is hierdie verbinding ook in spoorhoeveelhede opgespoor in die urine van die MSUD-pasiënte. Om die metaboliete te identifiseer, moes egter van die gefraksioneerde urienmonsters gebruik gemaak word, aangesien ko-eluering van hierdie metaboliete met die normale organiese suuranalise plaasvind.

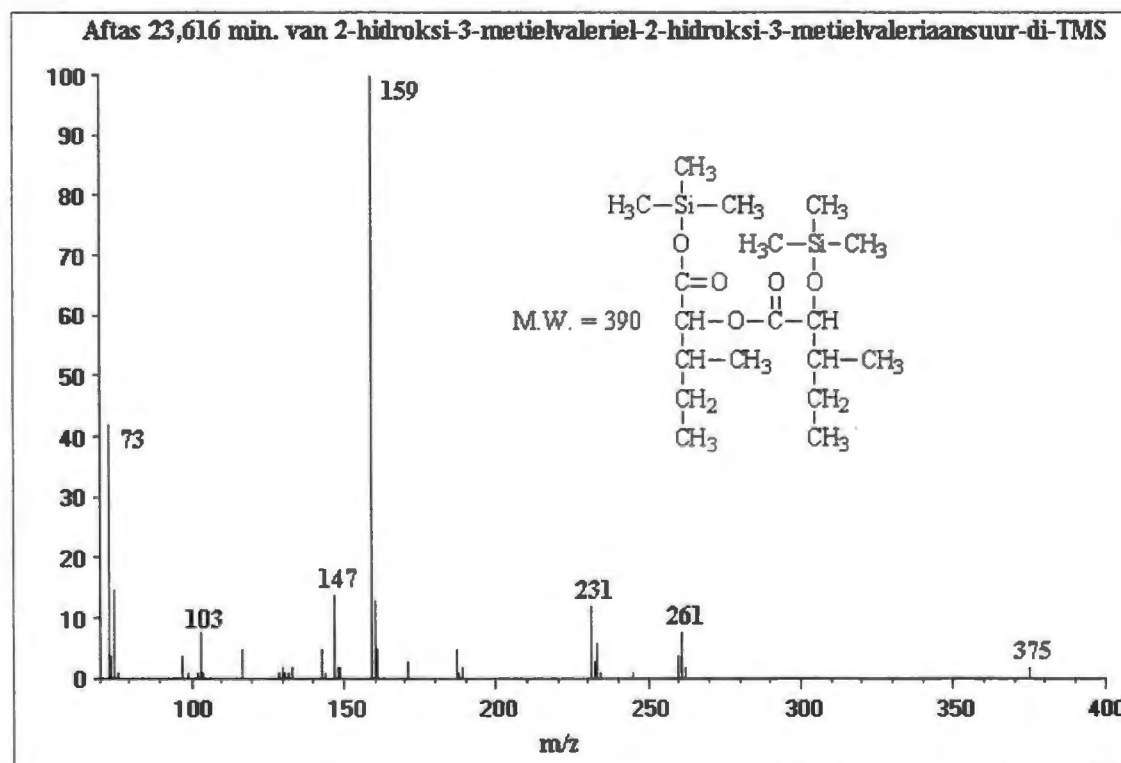
Tot dusver is die 2-hidroksi-isovaleriël-2-hidroksisuurkonjugate en die 2-hidroksi-isokaproël-2-hidroksisuurkonjugate bespreek. Aangesien hierdie verbindinge in die urine van MSUD-pasiënte voorkom, is dit dus ook moontlik dat die 2-hidroksi-3-metielvaleriël-2-hidroksisuurkonjugate gevorm kan word. Hierdie verbinding is ook opgespoor in die urine van MSUD-pasiënte, hoewel by laer konsentrasies as die vorige ses metaboliete. Die sintese van hierdie verbindinge is uitgevoer op soortgelyke wyse as dié van die vorige 2-hidroksisuur-2-hidroksisuurkonjugate. Die fragmentasiepatroon van die TMS-derivate van 2-hidroksi-3-metielvaleriël-2-hidroksi-isovaleriaansuur, -2-hidroksi-isokaproësuur en -2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur word in figure 6-8, 6-9 en 6-10 weergegee.



Figuur 6-8 Massaspektrum van 2-hidroksi-3-metielvaleriël-2-hidroksi-isovaleriaansuur-di-TMS



Figuur 6-9 Massaspektrum van 2-hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-isokaproësuur-di-TMS



Figuur 6-10 Massaspektrum van 2-hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur-di-TMS

Die fragmentasiepatrone van hierdie verbindings is soortgelyk aan die fragmentasiepatrone van die 2-hidroksi-isokaproïel-2-hidroksisuur-di-TMS-derivate.

Die moontlikheid dat hierdie metaboliëte spontaan kan konjugeer, is ondersoek deur die 2-hidroksisuur in 'n urienmonster (pH 7) vir 24 uur by 37°C te inkubeer. Die eksperiment is herhaal met dieselfde urienmonster by 'n pH van 4 en 9. Telkens is 'n organiese suurekstraksie uitgevoer op elk van die reaksiemengsels waarna die ekstrakte met behulp van gas-chromatografie-massaspektrometrie geanaliseer is. Geen konjugate kon opgespoor word nie. Die konjugate word waarskynlik nie spontaan gevorm nie en die meganisme van vorming is ook nie bekend nie.

6.3. Metaboliëte met nie-direkte MSUD-oorsprong

6.3.1. Mediumketting-vertakteketting-2-hidroksisuur

In die studie is die teenwoordigheid van mediumketting-2-hidroksisuur in die urine van MSUD-pasiënte opgemerk. Die lengte van die vetsure het gewissel van 7 tot 12 koolstowwe, maar was meestal vetsure met ongelyke koolstofgetalle. Die fragmentasiepatroon van mediumketting-2-hidroksisuur is vergelyk met die van standaard van 2-hidroksi-steariensuur-di-TMS, 2-hidroksi-dekanoësuur-di-TMS en 2-hidroksi-oktanoësuur-di-TMS. Hoewel daar groot ooreenkomste was tussen die massaspektra van die standaard en die van die metaboliëte wat in die urine van die MSUD-pasiënte voorkom, was daar nogtans ook duidelik verskille en kon die metaboliëte nie positief geïdentifiseer word nie. Hierdie verskille kan moontlik toegeskryf word aan 'n verskil in fragmentasie as gevolg van vertakkings in die hidroksi-vetsuur.

As gevolg van hierdie resultate is voorgestel dat die moontlike vetsuurmetaboliëte moontlik vertakte mediumketting-vetsure is. Die voorkoms van hierdie vetsure in die urine van MSUD-pasiënte kan moontlik toegeskryf word aan 'n inhibisie van α -oksidase soos voorgestel in Diagram 6-4.

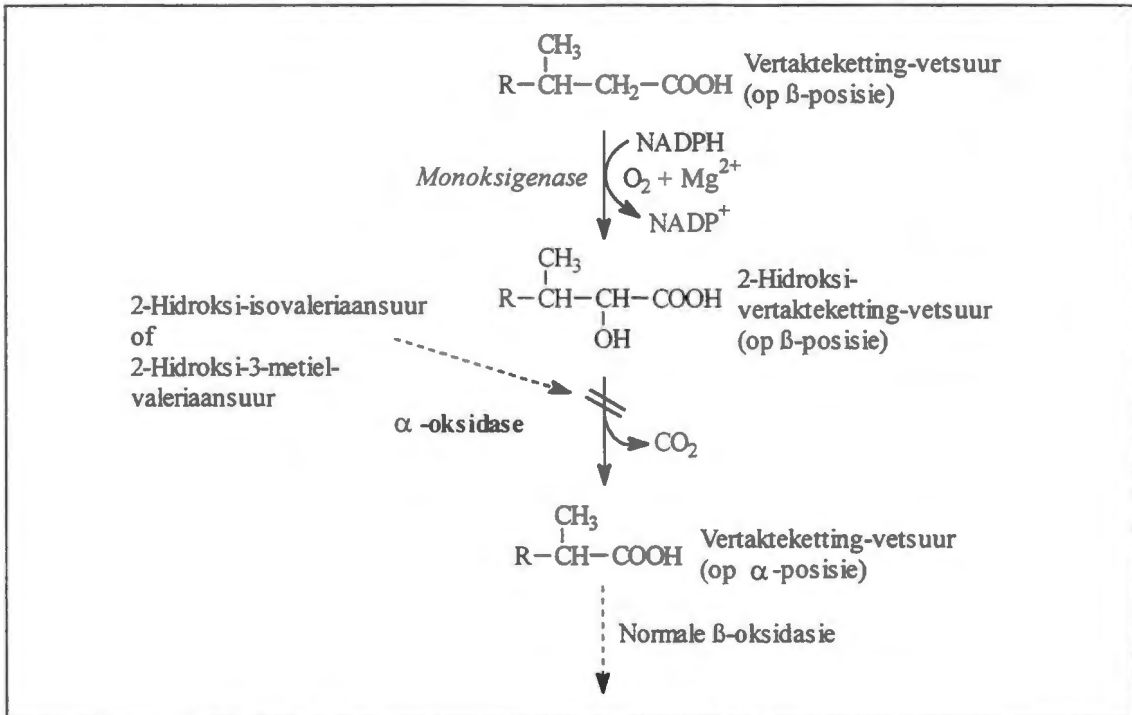
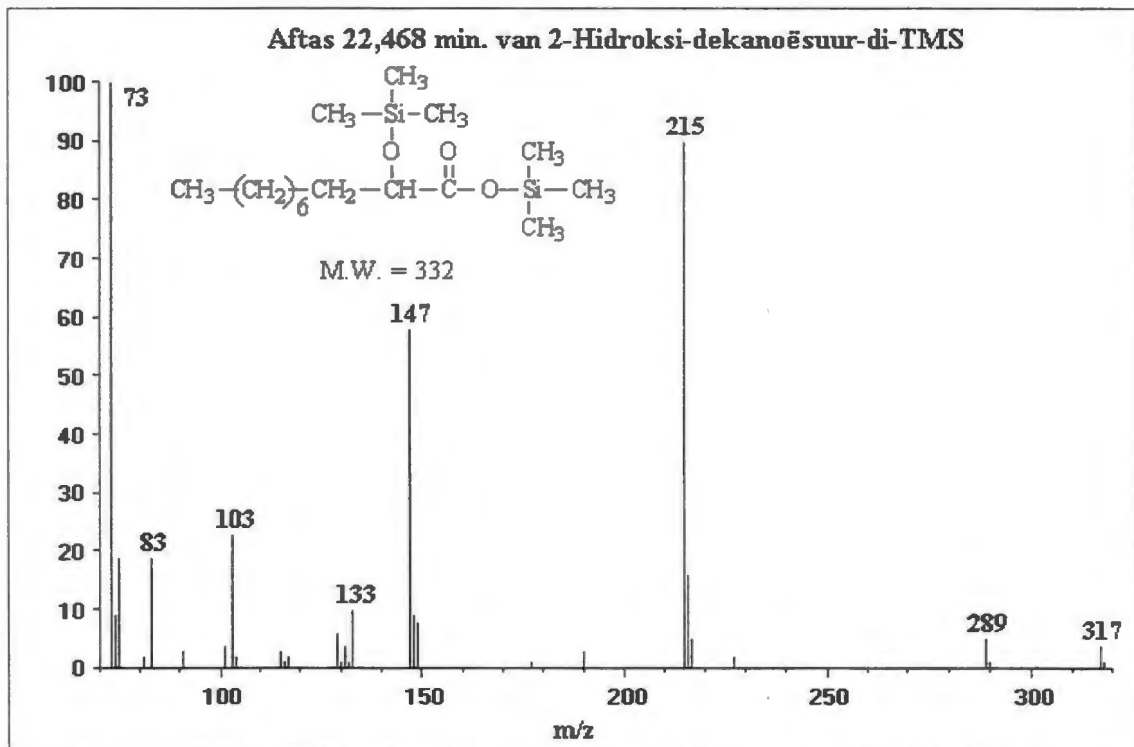


Diagram 6-4 Skematiese voorstelling van normale α -oksidasie waar die geïnduseerde vertakteketting-2-hidroksisuur moontlik hierdie weg inhibeer (White *et al.*, 1978:581 - 583)

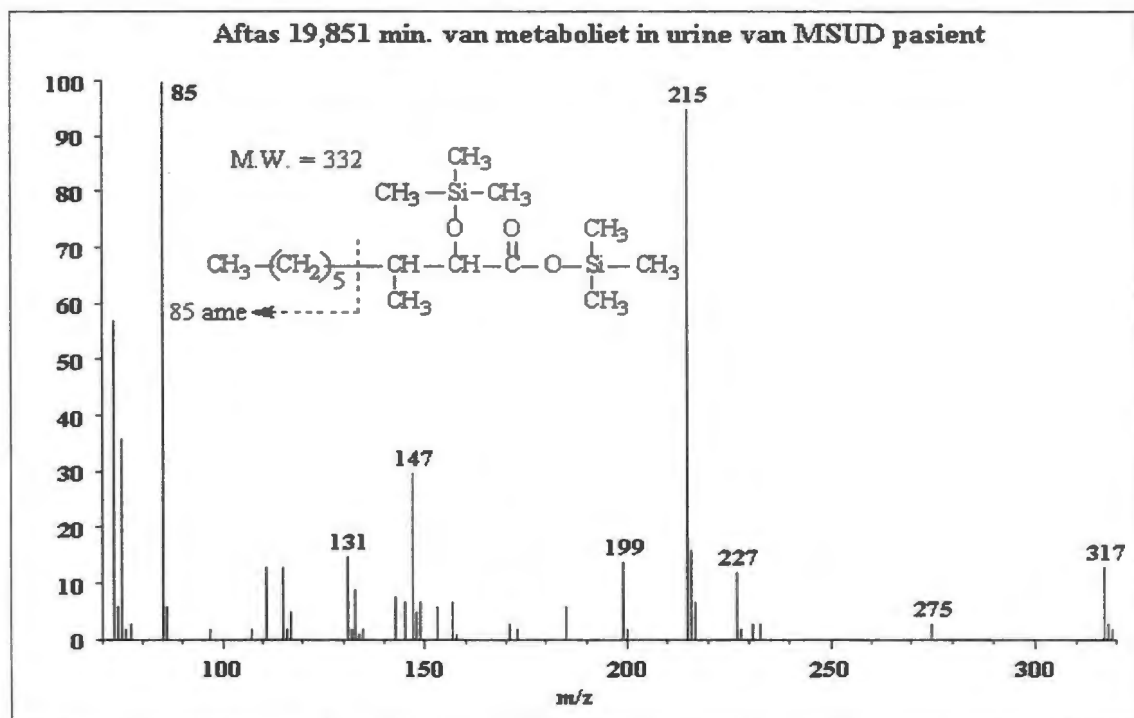
Indien die vertakteketting-2-hidroksisuur wat gevorm word uit die vertakteketting-aminosuurmetabolisme egter verhoog voorkom, soos wat die geval is by MSUD, kan kompetisie moontlik bestaan tussen die normale medium vertakteketting-2-hidroksisuur en die 2-hidroksisuur afkomstig vanaf die vertakteketting-aminosuur. Hierdie kompetisie of moontlike inhibisie van α -oksidasie sal die teenwoordigheid van hierdie vertakte mediumketting-2-hidroksisuur verklaar.

As gevolg van die gebrek aan 'n standaard of 'n sintesemethode om die standaard te sintetiseer, word die massaspektrum van 2-hidroksi-dekanoësuur-di-TMS met die massaspektrum van moontlik 2-hidroksi-3-metielnonanoësuur-di-TMS wat in die urine van MSUD-pasiënte voorkom, in figure 6-11 en 6-12 vergelyk. Die ooreenkomstige tussen die twee spektra is opvallend, met die uitsondering van die 85 amu ionfragment wat in die urinêre verbinding se spektrum teenwoordig is. Hierdie fragment is waarskynlik afkomstig van die fragmentasie soos aangedui in Figuur 6-12. Koolstof 7, 9 en 11 2-hidroksi-vetsure was ook teenwoordig in die urine van die pasiënte. Hierdie 2-hidroksi-vetsure is waarskynlik ook vertak. Langer vertakteketting-2-hidroksi-vetsure kan ook

moontlik teenwoordig wees, maar kon nie geïdentifiseer word nie as gevolg van hul hoë kookpunt.



Figuur 6-11 Massaspektrum van 2-hidroksi-dekanoësuur-di-TMS



Figuur 6-12 Massaspektrum van vermoedelik 2-hidroksi-3-metielnonanoësuur-di-TMS

Hoofstuk 7

Gevolgtrekking en bespreking

7.1. Inleiding

Die doel van hierdie studie was om 'n totale beeld van die geïnduseerde metaboliete by MSUD-pasiënte te verkry. As motivering hiervoor is aangevoer dat 'n geheelkennis van die abnormale metabolisme nie net tot 'n verbeterde klinies-biochemiese korrelasie sal lei nie, maar ook tot verbeterde behandeling van die pasiënte. Hoewel dit nie die doel van hierdie studie was om hierdie moontlikheid te ondersoek nie, sal metaboliete wat potensieel tot die kliniese beeld van MSUD en moontlike behandelingswyses kan bydra, in hierdie hoofstuk ondersoek en bespreek word.

7.2. Geïnduseerde metaboliete uit die vertakteketting-aminosure

N-Asetielgekonjugeerde vertakteketting-aminosure is die belangrikste metaboliet wat uit die vertakteketting-aminosure gevorm kan word. Tussen 10% en 20% van die totale vrye vertakteketting-aminosure word in hierdie vorm uitgeskei. Die ensiem verantwoordelik vir hierdie konjugering is nog nie geïsoleer of beskryf nie. Dit is egter duidelik dat β -metielgroepe van die vertakteketting-aminosuursubstraat tot verlaagde aktiwiteit van die ensiem lei. Gevolglik is leusien 'n beter substraat as die ander twee vertakteketting-aminosure. Met hierdie moontlikheid in gedagte, sal *allo*-isoleusien waarskynlik glad nie óf 'n baie swak substraat vir die ensiem wees. Dit wil egter voorkom of die ensiem 'n merkbare bydrae kan lewer in die verlaging van die

vertakteketting-aminosuur konsentrasies by MSUD-pasiënte. 'n Studie van die ensiem kan dus bydra tot verbeterde behandeling van MSUD-pasiënte. Laktiel- en ander 2-hidroksisuur-vertakteketting-aminosuurkonjugate word ook gevorm en ongeveer 5% van die totale vrye vertakteketting-aminosure word in dié vorm in die urine uitgeskei. Dit wil egter voorkom of die konsentrasie vertakteketting-2-hidroksisuur in dié geval bepalend is van die totale hoeveelheid konjugate wat gevorm word. Soos in die geval van die *N*-asetielkonjugate, vorm leusien ook die hoogste konsentrasie 2-hidroksisuurkonjugate. Die totale bydrae van hierdie konjugate in die verlaging van die vertakteketting-aminosuur konsentrasies is egter weglaatbaar. Waarskynlik lewer dit wynig bydrae in die normalisering van die abnormale vertakteketting-aminosuur konsentrasies.

7.3. Hidantoïenanaloe in die urine van MSUD-pasiënte

Die teenwoordigheid van 5-hidroksi-hidantoïenanaloe kon nie met sekerheid verklaar word nie. Die kreatiniensinteseveg sou potensieel tot die vorming van hierdie metaboliete aanleiding kan gee. Hierdie moontlikheid is egter breedvoerig ondersoek en die resultate dui daarop dat dit nie deur middel van hierdie meganisme geskied nie. Spontane vorming vanaf die vertakteketting-2-ketosuuranaloe van die drie vertakteketting-aminosure en ureum sou potensieel ook tot hierdie metaboliete kon lei. Hoewel hierdie meganisme duidelik nie spontaan plaasvind nie, is daar 'n aantal aanduidings dat die oorsprong afhanklik is van hoë konsentrasies vertakteketting-2-ketosure. Bogenoemde is duidelik uit die resultate in Tabel 4-7 (Hoofstuk 4) in vergelyking met die resultate in Tabel 4-4 (Hoofstuk 4). Pasiënte OH, EM en BM skei konstant hoë konsentrasies vertakteketting-2-ketosure uit. Hierdie pasiënte skei dan ook die hoogste konsentrasies 5-hidroksi-hidantoïene uit. 2-Keto-isokaproësuur word deurgaans deur bogenoemde drie pasiënte teen die hoogste konsentrasie uitgeskei, gevolg deur 2-keto-3-metielvaleriaansuur en 2-keto-isovaleriaansuur. Dieselfde verhouding word ook waargeneem in die urinekonsentrasies van die 5-hidroksi-hidantoïene wat van die betrokke vertakteketting-2-ketosure afgelei is. Pasiënt MM het tydens die verkryging van monsters 1 en 2 'n baie lae konsentrasie

vertakteketting-2-ketosure (soos aangedui as gevolg van 'n vitamien-B₆-gebrek) en dertigvoudig hoër konsentrasies van die vertakteketting-aminosure as die ander drie pasiënte. Geen 5-hidroksi-hidantoïene was egter teenwoordig in die twee betrokke urienmonsters nie, maar wel in latere monsters wat vergesel word van hoër konsentrasies vertakteketting-2-ketosure.

Ongeag die meganisme van vorming, is die teenwoordigheid van hierdie verbindings nog nooit voorheen by MSUD-pasiënte beskryf nie. Die potensiële bydrae wat hierdie verbindings tot die kliniese beeld kan lewer, moet egter nie onderskat word nie. Verbindings soos difeniel-hidantoïen is bekend om teratogenies (fetale hidantoïensindroom) te wees, wat onder meer insluit verstandelike vertraging (Beuhler *et al.*, 1994:741 - 748). Die moontlikheid dat die 5-hidroksi-hidantoïene teenwoordig in die urine van die MSUD-pasiënte 'n bydrae kan lewer tot die bekende kliniese beeld van die pasiënte, sal dus werklik die moeite loon. Hierdie verbindings word waarskynlik nie voorgeboortelik gevorm nie, aangesien hoë konsentrasies vertakteketting-2-ketosure 'n vereiste is vir die vorming van die 5-hidroksi-hidantoïenverbindings. Met hoë konsentrasies kan dit egter selfs na geboorte die ontwikkeling van die brein strem. As gevolg van die strukturele ooreenoms van die 5-hidroksi-hidantoïen met kreatinien en die moontlikheid dat die kreatiensinteseveg 'n rol kan speel by die sintese van die 5-hidroksi-hidantoïene, kom die vraag onwillekeurig op of die verbinding 'n uitwerking sal hê op die tradisionele rol van kreatienfosfaat. In hierdie studie is wel aangetoon dat die verbindings positief kleur met pikriensuur. Hoewel hierdie metode nie meer algemeen gebruik word vir die kreatinienbepaling nie, kan dit en het dit waarskynlik bygedra tot foutiewe konsentrasies uitgedruk in mmol/mol kreatinien.

7.4. Vorming van amiene

Die teenwoordigheid van isobutielamien, isoamielamien en 2-metielbutielamien is met behulp van ES-MS-MS in die urine van die MSUD-pasiënte aangetoon. Sover vasgestel kan word is dit die eerste keer dat dié spesifieke verbindings in die urine van

mense beskryf word en ook die eerste keer dat hierdie tegniek gebruik word om die teenwoordigheid van hierdie verbindings aan te toon. Laasgenoemde is egter nie verrassend nie, aangesien dekarboksilering van aminosure 'n reaksie is wat algemeen by aangebore metaboliese afwykings bydra tot geïnduseerde metaboliete. Die ensiem verantwoordelik vir die dekarboksilering van die vertakteketting-aminosure, is nie bekend nie, maar die moontlikheid dat glutamaat dekarboksilase daarvoor verantwoordelik kan wees, lyk potensieel moontlik.

Die rol en funksie van amiene en poli-amiene is in hierdie stadium nog nie duidelik nie. Dit is wel duidelik dat die tipe verbindings by lae konsentrasies reeds groot effekte kan hê. Hierdie effekte kom na vore in die vorm van neurologiese afwykings sowel as vaskulêre afwykings (Hodgson & Levi, 1994:566). Poli-amiene, soos spermidien en spermien, word vanuit 'n eenvoudige amien, soos putressien, gevorm. Laasgenoemde is struktureel verwand aan die drie amiene wat in die urine van MSUD-pasiënte gevind is. Die poli-amiene se rol in die metabolisme is tans nog onduidelik, maar speel waarskynlik 'n rol in seldeling en die vertakteketting-amiene kan via hierdie meganisme 'n bydrae tot die kliniese beeld van MSUD-pasiënte lewer.

7.5. Konjugering van die 2-ketosure met die vertakteketting-aminosure

Nege onverwagte *N*-asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate is in die urine van pasiënt MM opgespoor. Die teenwoordigheid van hierdie nege konjugate is met die eerste oogopslag onverklaarbaar om die volgende redes:

- i. Die konjugate dui op die teenwoordigheid van verbindings soos isovaleriaansuur, isobottersuur en 2-metielbottersuur wat konjugeer met die drie vertakteketting-aminosure. Vir hierdie tipe konjugering word 'n ko-ensiem A-ester van die genoemde organiese sure vereis. Die aangebore defek wat tot MSUD bydra verhoed juis die vorming van die ko-ensiem A-esters vanaf vertakteketting-2-ketosure.
- ii. Verbindings soos isovaleriel-KoA is 'n uitstekende substraat vir die ensiem glisien-*N*-asilase. Konjugate soos isovalerielglisien kom ook in hoë

konsentrasies voor in die urine van sommige metaboliese defekte soos isovaleriaansuururie. Nogtans kon geen isovaleriaanglisien by die MSUD-pasiënte opgespoor word nie, maar wel isovaleriaanleusien, -isoleusien en -valien. Aangesien glisien in hoë konsentrasies verteenwoordig is selfs by normale pasiënte, kan die afwesigheid van glisien nie as 'n rede aangevoer word vir die afwesigheid van isovaleriaanglisien nie.

Om al die moontlike verklarings vir hierdie ongewone bevinding te ondersoek, is aangetoon dat die *N*-asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate by al die MSUD-pasiënte tot die navorsers se beskikking teenwoordig was. Dit kan dus nie aan 'n individuele pasiënt toegeskryf word nie. Die enigste moontlike verklaring wat gevind kan word, is die moontlikheid dat die E₂-subeenheid (dihidrolipoëel-asieltransferase-ensiem) by die pasiënte defek was en dat die gesubstitueerde TPP-konjugaat dus sal ophoop en die verbinding aan konjugeringsreaksies sal kan deelneem. Om hierdie moontlikheid te ondersoek, is die teenwoordigheid van bogenoemde gesubstitueerde tiamienverbinding geïsoleer. Met behulp van ES-MS-MS en die gesintetiseerde hidroksi-isovalerieltiamien en hidroksi-isovaleriël-11-hidrotiochroom, kon aangetoon word dat die verbinding sonder twyfel in die urine van pasiënt MM aangetref word. Soos reeds bespreek is het al die pasiënte wat in hierdie studie gebruik is *N*-asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate uitgeskei. Pasiënte EM en BM kom ook uit dieselfde stamgroep en omgewing as pasiënt MM, wat die vermoede daar stel dat daar 'n familieverband bestaan tussen hierdie pasiënte. Op grond van hierdie inligting is dit dus onwaarskynlik dat pasiënte BM en EM in hierdie studie 'n E₁-defek kan hê. Hoewel pasiënt OH nie uit dieselfde stamgroep of van dieselfde omgewing afkomstig is nie (en dus nie 'n familieverband met die ander pasiënte het nie), word dieselfde metaboliëtpatroon by hierdie pasiënt waargeneem. Aangesien E₃-defekte tot baie spesifieke metaboliëtpatrone lei, kan die toestand van pasiënte in hierdie studie dus waarskynlik toegeskryf word aan 'n E₂-defek. Die teenwoordigheid van hierdie metaboliëte kan gevolglik aangewend word om te onderskei watter proteïene aanleiding gegee het tot MSUD. Aangesien tiamien-responsiewe MSUD-pasiënte tot die verbasing van meeste navorsers 'n defek op die E₂-subeenheid het, kan hierdie metaboliëte dus gebruik word om te bepaal of 'n spesifieke pasiënt tiamien-responsief

kan wees. Hierdie resultate gee ook 'n aanduiding waarom E_2 -subeenheiddefekte bo verwagting tot tiamien-responsiwiteit lei. Dié onverwagte tendens hang waarskynlik saam met die vorming van die vertakteketting-aminosuurkonjugate wat in die urine van die MSUD-pasiënte opgespoor is. Konjugering van die gesubstitueerde TPP-verbinding met die vertakteketting-aminosure sal bydra tot herwinning van TPP. 'n Onvermoë tot die konjugering sal onvermydelik tot 'n tiamientekort lei. Tiamien-responsiewe MSUD-pasiënte kan dus toegeskryf word aan 'n tiamientekort wat veroorsaak word deur 'n E_2 -defek en 'n verhoogde gesubstitueerde tiamien uitskeiding.

Die vorming van spesifiek konjugate met die drie vertakteketting-aminosure en nie met glisien nie, dui daarop dat hierdie konjugeringsreaksie nie lewergebonde is nie. Glisien-*N*-asilase word bykans uitsluitlik in die lewer aangetref en as die betrokke ensiem verantwoordelik was vir die vorming van die konjugate, sou isovalerielglisien sonder twyfel teenwoordig gewees het. Die moontlikheid dat 'n spesifieke konjugeringsensiem met die uitsluitlike doel om TPP-verlies te voorkom in spiere voorkom, kan nie uitgesluit word nie. Verhoogde tiamienafhanklikheid wat beskryf word by die Wernicke-Korsakoffsindroom dui daarop dat bogenoemde hipotese moontlik kan bestaan, aangesien 'n defek van sodanige konjugeringsensiem tot verhoogde tiamienafhanklikheid sal bydra.

Die vraag ontstaan egter waarom tiamien-responsiewe MSUD-pasiënte op tiamienbehandeling reageer. In meeste van hierdie gevalle het die pasiënte 'n residusiële ensiemaktiwiteit. Indien die pasiënte se TPP egter uitgeput raak sal hierdie residusiële ensiemaktiwiteit verder verlaag word weens die tekort aan hierdie ko-faktor. Met toediening van tiamien verhoog hierdie verlaagde ensiemaktiwiteit weer tot die vlakke van die residusiële ensiemaktiwiteit. Indien pasiënte egter hul TPP voldoende kan herwin of as die residusiële ensiemaktiwiteit so laag is dat die uitputting van hul TPP geen of min invloed het op die ensiemaktiwiteit, sal geen verbetering waargeneem word tydens tiamienbehandeling nie. Hierdie moontlike verklaring sal ook verklaar waarom daar van beide 'n tiamien- en dieetbehandeling gebruik gemaak moet word in tiamien-responsiewe MSUD-pasiënte.

Die moontlikheid dat pasiënte met 'n defek van pirovaat dehidrogenase-ensiem verhoogde *N*-asetielkonjugate van aminosure, byvoorbeeld *N*-asetielalanien, sal uitskei, kan bydra tot 'n vereenvoudige metaboliettoets om te onderskei tussen pirovaat dehidrogenase (E_2) en ander defekte wat tot verhoogde melksuurvlakke lei. Die onderskeid van hierdie pasiënte is tans baie moeilik en sodanige onderskeid kan van groot waarde wees (Robinson *et al.*, 1980:956 - 962).

7.6. Konjugering van asetiel-KoA met 2-keto-isovaleriaansuur

In hierdie studie is ook aangetoon dat 2-keto-isovaleriaansuur met asetiel-KoA konjugeer om 2-isopropielappelsuur as produk te vorm. Hierdie tipe konjugeringsreaksie kan vergelyk word met die reaksie gekataliseer deur die ensiem sitraatsintase. 'n Ondersoek na die moontlike vorming van 2-isopropielappelsuur deur sitraatsintase is *in vitro* ondersoek maar geen produk kon gevind word na langdurige inkubasie van asetiel-KoA en 2-keto-isovaleriaansuur in die teenwoordigheid van sitraatsintase nie. Dit is ook opvallend dat ander verwagte produkte soos 2-isobutielappelsuur en 2-sek-butielappelsuur nie in die urine van die MSUD-pasiënte gevind kon word nie. Die konjugeringsreaksie van asetiel-KoA met 2-keto-isovaleriaansuur is die eerste stap van die leusien biosintese-weg wat in *E. coli* voorkom. Die moontlikheid dat 2-isopropielappelsuur bakterieel van oorsprong kan wees, as gevolg van die verhoogde bloedkonsentrasies van die vertakteketting-aminosure en gevolglike verlaagde absorpsie van die vertakteketting-aminosure, lyk baie moontlik as 'n verklaring vir die oorsprong van die metaboliet. Indien valien bakterieel getransamineer kan word na 2-keto-isovaleriaansuur in die ingewande, wat dan as 'n substraat kan dien om via 2-isopropielappelsuur oorsprong te gee aan leusien, kan dit moontlik ook verklaar waarom leusien in hoër konsentrasies as te wagte is by MSUD-pasiënte aangetref word. Die afwesigheid van 2-iso- en 2-sek-butielappelsuur dui daarop dat hierdie metaboliese weë nie as enige normale metaboliese weë in ingewandsbakterieë aangetref word nie, wat wel dan ook die geval is.

7.7. Geïnduseerde metaboliëte uit 2-hidroksisüre

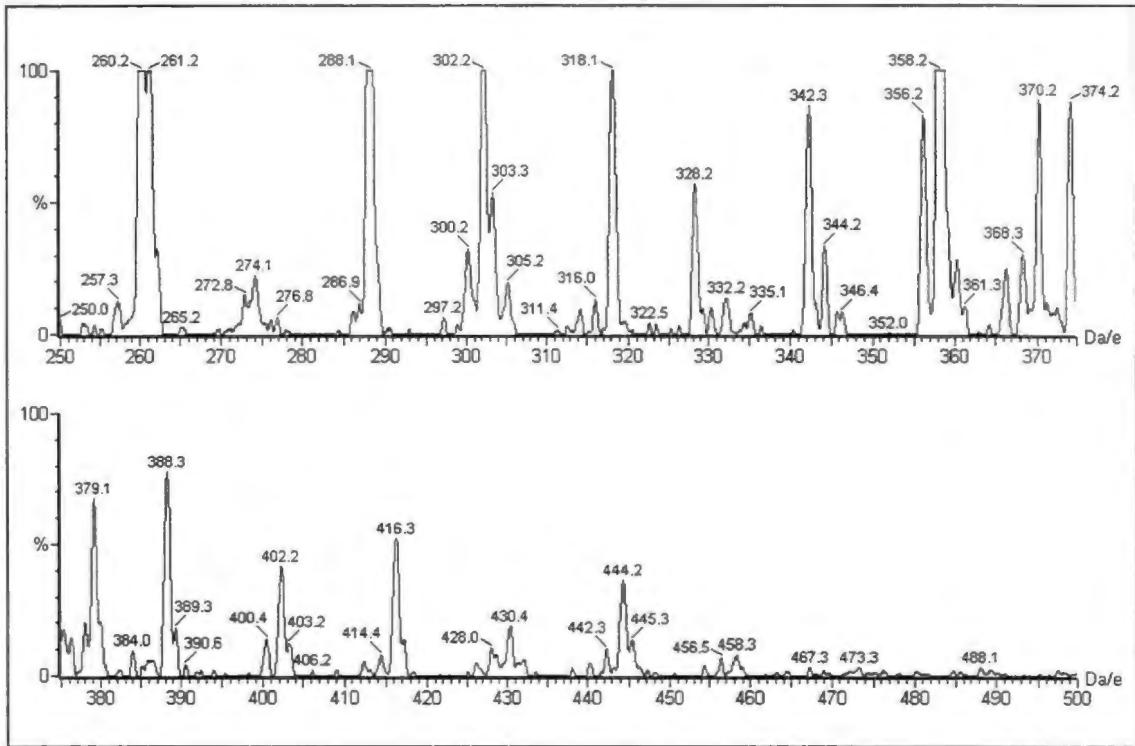
Weinig geïnduseerde metaboliëte met vertakteketting-2-hidroksisüre as oorsprong wat van belang kan wees, is in die urine van die MSUD-pasiënte opgespoor. Soos in die geval van melksuur, word dimere van die sure in lae konsentrasies in die urine aangetref. Die belang van die tipe verbindings is egter nie bekend nie. Die vertakteketting-2-hidroksisüre gee egter indirek oorsprong tot mediumketting-2-hidroksisüre waarvan die oorsprong aan twee moontlike weë toegeskryf kan word. α -Oksidasie van β -vertakteketting-vetsure vind via α -hidroksilering van die vetsuur plaas. Die verhoogde teenwoordigheid van die vertakteketting-2-hidroksisüre kan moontlik tot inhibisie van die α -oksidasieproses lei en gevolglik die uitskeiding van mediumketting-2-hidroksisüre.

Kishimoto *et al.* (1979:93 - 105) bespreek die belang van α -hidroksilering van vetsure tydens die miëlinering van die brein. Die verhoogde teenwoordigheid van vertakteketting-2-hidroksisüre kan met hierdie proses inmeng en lei tot die verhoogde uitskeiding van die mediumketting-2-hidroksisüre. Dit kan moontlik as verklaring dien vir die vertraagde miëlinering wat karakteristiek is by MSUD-pasiënte. Dieselfde proses mag moontlik ook 'n rol speel in die neurologiese agteruitgang van pasiënte met langdurige verhoogde melksuurvlakke (Van Biervliet *et al.*, 1979:15 - 18).

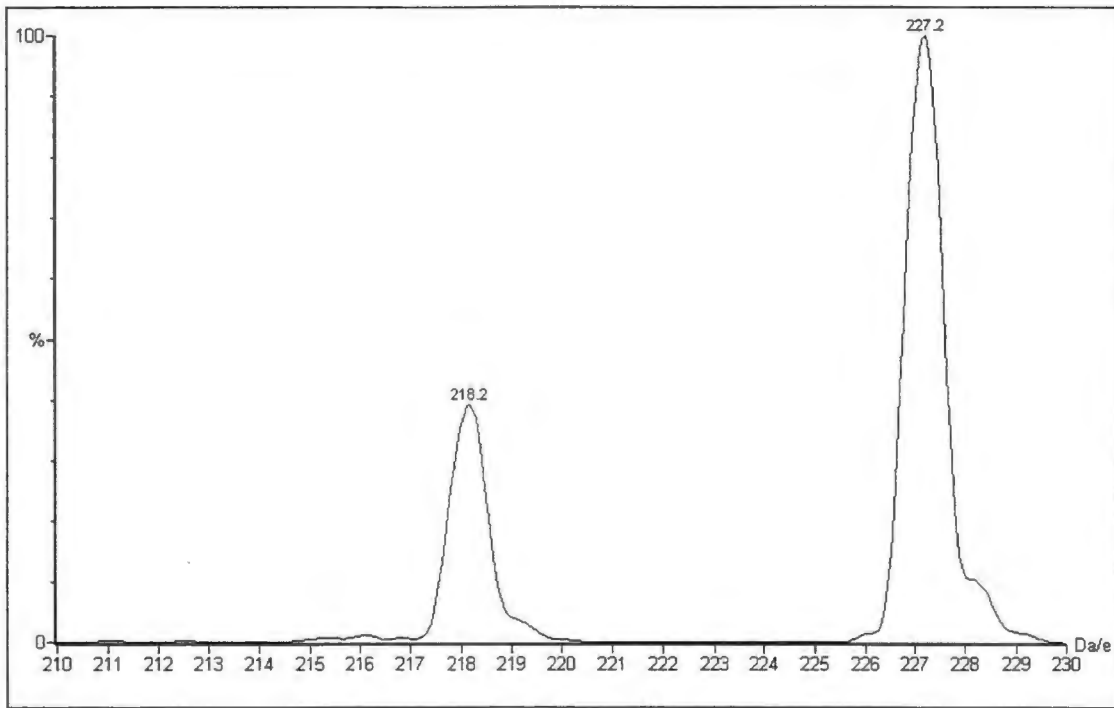
7.8. Voorgestelde behandeling

In hierdie studie is veral drie faktore wat tot die bekende kliniese beeld van MSUD-pasiënte kan bydra, waargeneem. Die produksie van 5-hidroksi-hidantoiëne, die uitputting van tiamienpirofosfaat en moontlike inhibisie van die miëlineringsproses deur die vertakteketting-2-hidroksisüre kan moontlik grootliks bydra tot die neurologiese agteruitgang van die pasiënte. Met die uitsondering van tiamienaanvulling, is die ander faktore moeilik reguleerbaar en dus is ondersoek ingestel na die moontlikheid om karnitien ook as behandelingsmetode by MSUD-pasiënte te gebruik. Asiel-karnitienanalises is op die urine van die MSUD-pasiënte

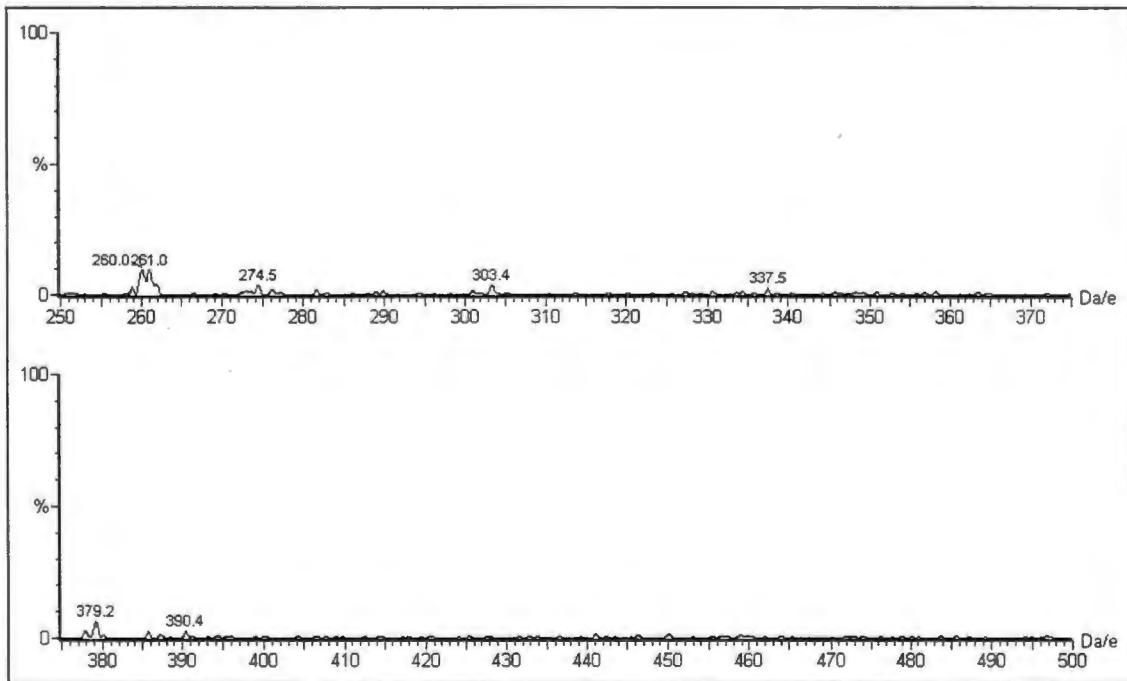
uitgevoer en die resultate word in figure 7-1 en 7-2 weergegee. Om vas te stel of die verkrygte resultaat wel aan asiel-karnitiene toegeskryf kan word, is 'n alkaliese hidrolise uitgevoer, waarna die asiel-karnitienanalise herhaal is. Die resultate word in figure 7-3 en 7-4 weergegee.



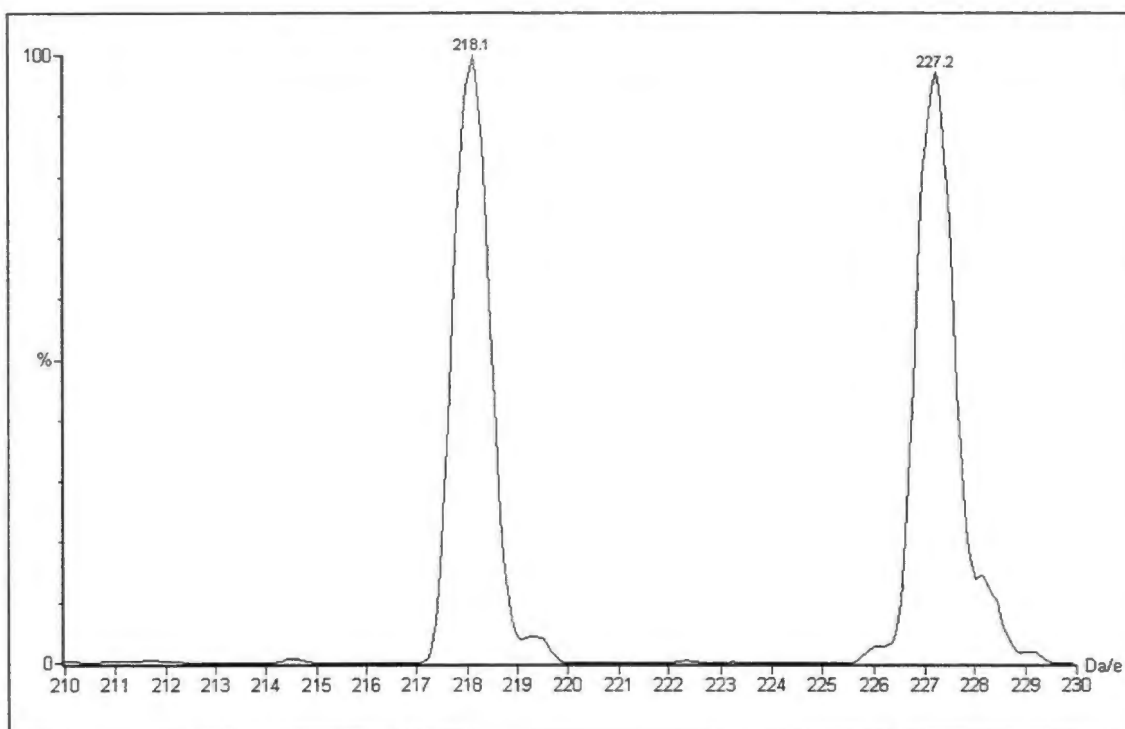
Figuur 7-1 Asiel-karnitienkonjugate soos gevind in die urine van 'n MSUD-pasiënt



Figuur 7-2 Profiel van die vrye karnitien voor alkaliese hidrolise



Figuur 7-3 Asiel-karnitienprofiel van dieselfde urine van 'n MSUD-pasiënt na 'n alkaliese hidrolise



Figuur 7-4 Profiel van die vrye karnities na die alkaliese hidrolise

Benewens asetiëlkarnities (M.W. = 260) wat ook in normale urine teenwoordig is, is hoë konsentrasies butiërië-/isobutiëriëlkarnities (M.W. = 288), isovaleriërië-/2-metiëliëbutiëriëlkarnities (M.W. = 302) en 3-hidroksi-isovaleriërië-/2-hidroksi-isovaleriëriëlkarnities (M.W. = 318) in die urine van dié pasiënte opgespoor. Die teenwoordigheid van verbindings soos isovaleriëriëlkarnities en isobutiëriëlkarnities dui op die moontlikheid dat die gesubstitueerde TPP-konjugate moontlik ook met karnities kan konjugeer. In die opsig sal karnities 'n belangrike bydrae kan lewer. Hoë konsentrasies 2-hidroksi-/3-hidroksi-isovaleriëriëlkarnities is belangrik, aangesien hierdie studie aangetoon het dat die 2-hidroksisure potensieel kan inmeng met miëlinering. 3-Hidroksi-isovaleriëriëlkarnities word by verskeie defekte in verhoogde konsentrasies gevind (Shigematsu *et al.*, 1994:678 - 690). Daar kan dus nie met sekerheid voorgestel word dat die 318 amë karnitieskonjugaat toegeskryf kan word aan 2-hidroksi-isovaleriëriëlkarnities nie.

'n Volledige reeks karnitieskonjugate, beginnende by 'n atoommassa van 374 tot 444 amë, het in die urine van die pasiënte voorgekom. Hierdie reeks het telkens met 14 amë toegeneem. Die molekulêre massa van hierdie verbindings stem ooreen met karnitieskonjugate van die mediumkettig-2-hidroksisure wat in die urine van die

MSUD-pasiënte gevind is. Volgens Millington *et al.*, (1994:559 - 579) word hierdie karnitienkonjugate nie in normale urine aangetref nie.

Hoewel karnitien dus nie 'n direkte rol in die behandeling van MSUD-pasiënte speel nie, word voorgestel dat 'n aanvulling deel van die behandeling behoort te wees. Benewens die tradisionele dieetbehandeling behoort tiamien selfs indien die pasiënte nie tiamien-responsief is nie, ook konstant aangevul te word. Omdat tiamien uitgeput kan raak, mag 'n pasiënt tydens evaluasie nie tiamien-responsief blyk te wees nie, maar indien evaluasie in 'n latere stadium gedoen word, kan hierdie toestand drasties verander.

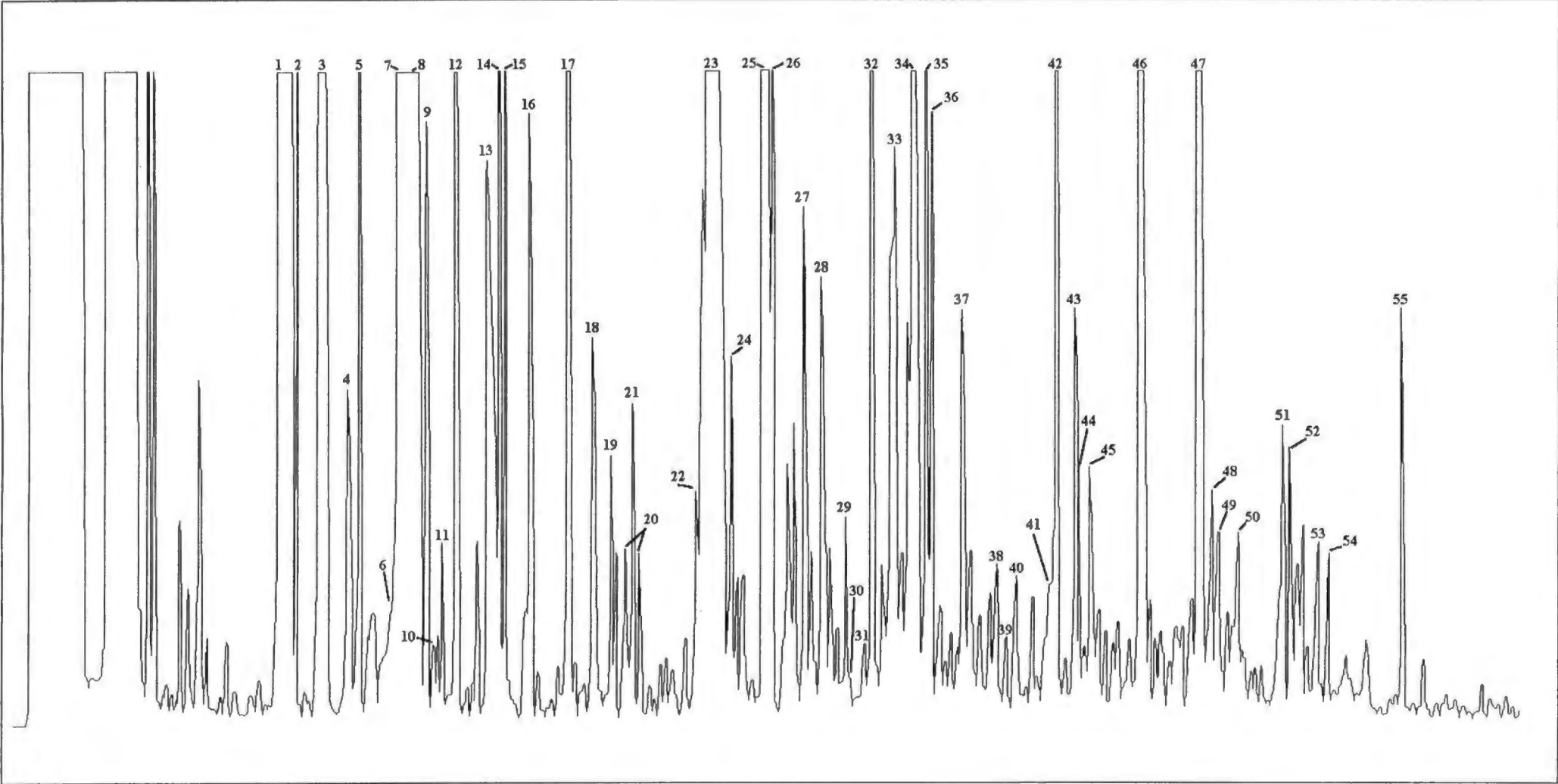
'n Totaal van ongeveer sewentig nuwe verbindings is in hierdie studie by MSUD-pasiënte beskryf. Van die verbindings het waarskynlik geen of min kliniese of diagnostiese implikasies. In hierdie studie is egter daarin geslaag om 'n belangrike bydrae te lewer deur aan te toon dat subtypes van die MSUD-defek om metabolietvlak geklassifiseer kan word. Hierdie bydrae kan ook van toepassing wees by ander defekte soos pirovaat dehidrogenase-ensiemdefekte, en aangesien defekte wat tot verhoogde melksuur lei moeilik diagnoseerbaar is, kan hierdie studie dus bydra tot 'n vereenvoudigde diagnoseprosedure van die groep pasiënte. 'n Belangrike bydrae is veral gelever op die klinies-biochemiese korrelasie van MSUD deur aan te toon dat mediumketting-2-hidroksisure deur hierdie pasiënte veral tydens die neonatale periode uitgeskei word. Hierdie verbindings het waarskynlik 'n rol te speel tydens die vroeë miëlinering van die brein en die uitskeiding van die sure dui op 'n inhibisie van die proses. Hoewel geen direkte bewyse gelever is nie, bestaan die vermoede dat die vertakketting-2-hidroksisure, karakteristiek van MSUD, vir die abnormaliteit verantwoordelik is. Dieselfde proses mag ook by verhoogde melksuur geassosieerde Leigh se Siekte 'n rol speel.

Bylaag A

GC-profiel van TMS-derivate van metaboliete in die urine van 'n MSUD-pasiënt

Sleutel:

1:	Melksuur	29:	<i>N</i> -Isobutirielleusien
2:	Glikoolsuur	30:	<i>N</i> -2-Metielbutiriëvalien
3:	Oksaalsuur	31:	2-Hidroksi-glutaarsuur
4:	2-Hidroksi-bottersuur	32:	<i>N</i> -isovalerielleusien
5:	ρ -Kresol	33:	<i>N</i> -isovalerielleusien
6:	3-Hidroksi-propioonsuur	34:	<i>N</i> -2-Metielbutirielleusien
7:	3-Hidroksi-bottersuur	35:	ρ -Hidroksi-bensoësuur
8:	2-Hidroksi-isovaleriaansuur	36:	ρ -Hidroksi-feniëlasynsuur
9:	3-Hidroksi-isovaleriaansuur	37:	<i>N</i> -Laktiëlleusien
10:	3-Hidroksi-2-metielbottersuur	38:	<i>N</i> -Laktiëlisoleusien
11:	2-Hidroksi-isokaproësuur	39:	Suberiënsuur
12:	Bensoësuur	40:	<i>N</i> -Asetiëlaspartiënsuur
13:	Onbekend	41:	<i>N</i> -2-Hidroksi-isovaleriëvalien
14:	Onbekend	42:	Akonitiënsuur
15:	Onbekend	43:	<i>N</i> -2-Hidroksi-isovaleriëlleusien
16:	Fosforsuur	44:	<i>N</i> -2-Hidroksi-isovaleriëlisoleusien
17:	Suksiënsuur	45:	Hipuursuur
18:	2-Keto-isokaproësuur	46:	Sitroënsuur
19:	2-Keto-3-metielvaleriaansuur	47:	ρ -Hidroksi-feniëllaktaat
20:	2,3-Dihidroksi-bottersuur & 3,4-Dihidroksi-bottersuur	48:	<i>N</i> -isobutiriëvalien (di-TMS)
21:	<i>N</i> -Laktiëglisien	49:	<i>N</i> -isobutiriëlleusien (di-TMS)
22:	<i>N</i> -Asetiëvalien	50:	<i>N</i> -isobutiriëlisoleusien (di-TMS)
23:	<i>N</i> -Asetiëlleusien	51:	<i>N</i> -isovaleriëlleusien (di-TMS)
24:	<i>N</i> -Asetiëlisoleusien	52:	<i>N</i> -isovaleriëlisoleusien (di-TMS)
25:	Onbekend	53:	<i>N</i> -2-Metielbutiriëlleusien (di-TMS)
26:	3-Fenië-bottersuur (Interne standaard)	54:	<i>N</i> -2-Metielbutiriëlisoleusien (di-TMS)
27:	Appelsuur	55:	Onbekend
28:	<i>N</i> -Isobutiriëlleusien		

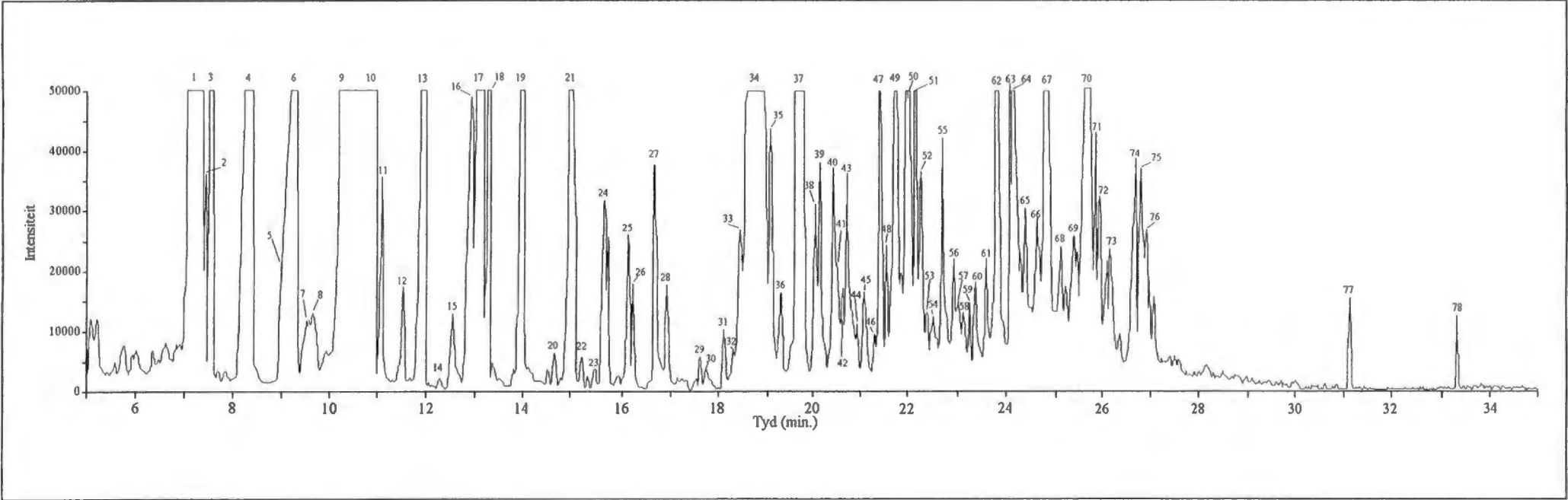


Bylaag B

Totale ioon chromatogram van die TMS-derivate van metaboliete in die urine van 'n MSUD-pasiënt

Sleutel:

1:	Melksuur	40:	<i>N</i> -Isobutirielleusien
2:	2-Hidroksi-isobottersuur	41:	<i>N</i> -Isobutiriel- <i>allo</i> -isoleusien
3:	Glikool	42:	Onbekend
4:	2-Keto-isokaproësuur (mono-TMS)	43:	<i>N</i> -Isobutirielisoleusien
5:	Oksaalsuur	44:	<i>N</i> -2-Metielbutirielvalien
6:	2-Hidroksi-bottersuur	45:	Onbekend
7:	2-Hidroksi-2-metielbottersuur	46:	2-Hidroksi-glutaarsuur
8:	3-Hidroksi-propioonsuur	47:	<i>N</i> -Isovalerielleusien
9:	3-Hidroksi-bottersuur	48:	<i>N</i> -Isovaleriel- <i>allo</i> -isoleusien
10:	2-Hidroksi-isovaleriaansuur	49:	<i>N</i> -Isovalerielisoleusien
11:	2-Keto-3-hidroksi-5-metielpuraan	50:	<i>N</i> -2-Metielbutirielleusien
12:	2-Metiel-3-hidroksibottersuur	51:	ρ -Hidroksi-fenielasynsuur
13:	3-Hidroksi-isovaleriaansuur	52:	<i>N</i> -2-Metielbutirielisoleusien
14:	Onbekend	53:	Onbekend
15:	Etielhidrakrielsuur	54:	Onbekend
16:	2-Hidroksi-isokaproësuur	55:	<i>N</i> -Laktielleusien
17:	2-Hidroksi-3-metielvaleriaansuur	56:	<i>N</i> -Laktielisoleusien
18:	2-Keto-3-metielvaleriaansuur (di-TMS)	57:	Suberiensuur
19:	Fosforsuur	58:	<i>N</i> -Asetielaspartiënsuur (piek 1)
20:	Onbekend	59:	<i>N</i> -Asetielaspartiënsuur (piek 2)
21:	Suksiensuur	60:	Onbekend
22:	3-Hidroksi-isokaproësuur	61:	<i>N</i> -2-Hidroksi-isovalerielvalien
23:	Onbekend	62:	Akonitiensuur
24:	Onbekend	63:	<i>N</i> -2-Hidroksi-isovalerielleusien
25:	Onbekend	64:	Onbekend
26:	Fumaarsuur	65:	<i>N</i> -2-Hidroksi-isovalerielisoleusien
27:	2,3-Dihidroksi-bottersuur (piek 1)	66:	Hippuursuur
28:	2,3-Dihidroksi-bottersuur (piek 2)	67:	Sitroensuur
29:	<i>N</i> -Laktielglisien	68:	<i>N</i> -Isobutirielleusien (di-TMS)
30:	Onbekend	69:	<i>N</i> -Isobutirielisoleusien (di-TMS)
31:	3,4-Dihidroksibottersuur	70:	ρ -Hidroksi-feniellaktaat
32:	Onbekend	71:	<i>N</i> -Isovalerielleusien (di-TMS)
33:	<i>N</i> -Asetielvalien	72:	<i>N</i> -Isovalerielisoleusien (di-TMS)
34:	<i>N</i> -Asetielleusien	73:	Onbekend
35:	<i>N</i> -Asetielisoleusien	74:	<i>N</i> -2-Metielbutirielleusien (di-TMS)
36:	Onbekend	75:	<i>N</i> -2-Metielbutirielisoleusien (di-TMS)
37:	3-Feniël-bottersuur (Interne standaard)	76:	<i>N</i> -2-Metielbutirielvalien (di-TMS)
38:	Onbekend	77:	Onbekend
39:	Appelsuur	78:	Onbekend



Bibliografie:

- Airth, R.L., Foerster, G.E., 1970. Simultaneous determination of thiamine and pyritthiamine. (*In* McCormick, D.B., Wright, L.D., *ed.* Methods in enzymology, vol XVIII. Vitamins and Coenzymes. Part A.) New York: Academic Press, p 81 - 86.
- Ando, T., Rasmussen, K., Nyhan, W.L., Hull, D., 1972a. 3-Hydroxypropionate: Significance of β -oxidation of propionate in patients with propionic acidemia and methylmalonic acidemia. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 69: 2807.
- Ando, T., Rasmussen, K., Wright, J.M., Nyhan, W., 1972. Isolation and identification of methylcitrate, a major metabolic product of propionate in patients with propionic acidemia. *The Journal of Biological Chemistry*, 217: 2200.
- Beach, R.L., Aogaichi, T., Plaut, W.E., 1977. Identification of D-threo- α -methylisocitrate as stereochemically specific substrate for bovine heart aconitase and inhibitor of TPN-linked isocitrate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 252: 2702.
- Buehler, B.A., Rao, V., Finnell, R.H., 1994. Biochemical and molecular teratology of fetal hydantoin syndrome. *Acta Neurological Clinica*, Nov,12(4):741 - 748.
- Brandänge, S., Josephson, S., Mahlen, A., Mörch, L., 1984. Characterisation of the citrate synthase reaction with propionyl-CoA. *Acta Chemica Scandinavica B*, 38: 695.
- Bremer, H.J., Duran, M., Kamerling, J.P., Przyrembel, H., Wadman, S.K., 1981. Disturbances of amino acid metabolism: Clinical chemistry and diagnoses. Munich: Urban and Schwarzenberg Baltimore. p 3.
- Brin, M., 1970. Transketolase (Sedoheptulose-7-phosphate: D-Glyceraldehyde-3-phosphate dihydroxyacetone transferase, EC 2.2.1.1) and the TPP effect in assessing thiamine adequacy. (*In* McCormick, D.B., Wright, L.D., *ed.* Methods in enzymology. Volume XVIII: Vitamins and coenzymes, Part A) New York: Academic Press. p 125.
- Buse, M.G., Biggers, J.F., Friderici, K.H., Buse, J.F., 1972. Oxidation of branched chain amino acids by isolated hearts and diaphragms of the rat. The effect of fatty acids, glucose, and pyruvate respiration. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(24): 8085 - 8096.
- Buse, M.G., Reid, S.S., 1975. Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *The Journal of Clinical Investigation*, 56: 1250 - 1261.

Chace, D.H., Hillman, S.L., Millington, D.S., Kahler, S.G., Roe, C.R., Naylor, E.W., 1995. Rapid diagnosis of maple syrup urine disease in blood spots from newborns by tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 41(1): 62 - 68.

Chaplin, E.R., Goldberg, A.L., Diamond, I., 1976. Leucine oxidation in brain slices and nerve endings. *Journal of Neurochemistry*, 26: 701 - 707.

Cheema-Dhadli, S., Leznoff, C.C., Halperin, M.L., 1975. Effect of 2-methylcitrate on citrate metabolism: Implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic aciduria. *Pediatric Research*, 9: 905.

Chua, B., Siehl, D.L., Morgan, H.E., 1979. Effect of leucine and metabolites of branched chain amino acids on protein turnover in heart. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(17): 8358 - 8362.

Chuang, D.T., 1988. Assays for E1 and E2 components of the branched-chain keto acid dehydrogenase complexes (In McCormick, D.B., Wright, L.D., ed. *Methods in enzymology*, vol 166) New York: Academic Press, p 146 - 154.

Chuang, D.T., Shih, V.E., 1995. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism (In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., ed. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*.) New York: McGraw-Hill, Inc., p1241 - 1263.

Coude, F.X., Sweetman, L., Nyhan, W.L., 1979. Inhibition by propionyl-Coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. A possible explanation for hyperammonemia in propionic and methylmalonic acidemia. *Journal of Clinical Investigation*, 64: 1544.

Crabb, D.W., Deaven, L.L., Leudemann, M., Zang, B., Harris, R.A., 1989. Assignment of the gene for the E1 α subunit of branched chain α -ketoacid dehydrogenase to chromosome 19. *Cytogenetica Cell Genetics*, 50: 40 - 41.

Crabb, D.W., Harris, R.A., 1978. Studies on the regulation of leucine catabolism in the liver. Stimulation by pyruvate and dichloroacetate. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(5): 1481 - 1487.

Dancis, J., Hutzler, J., Levitz, M., 1963. The diagnosis of maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria) by the in vitro study of the peripheral leukocyte. *Pediatrics*, 32: 234 - 238.

Dancis, J., Hutzler, J., Rokkones, T., 1967. Intermittent branched-chain ketonuria. Variant of Maple-Syrup-Urine Disease. *The New England Journal of Medicine*, 276(2): 84 - 89.

Dancis, J., Levitz, M., Miller, S., Westall, R.G., 1959. Maple syrup urine disease. *British Medical Journal*, 1: 91 - 93.

Dancis, J., Levitz, M., Westall, R.G., 1960. Maple syrup urine disease: branched-chain keto-aciduria. *Pediatrics*, 25: 72 - 79.

Danner, D.J., Elsas, L.J. II., 1989. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., ed. The metabolic basis of inherited disease. 6th edition.) New York: McGraw-Hill, p 671 - 692.

Danner, D.J., Lemmon, S.K., Besharse, J.C., Elsas, L.J., 1979. Purification and characterization of branched chain α -ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(12): 5522 - 5526.

Divry, P., Bouliou, R., Cotte, J., Desage, M., Cuilluy, R., 1981. Biochemical study of four cases of propionic acidemia: GC/MS study of four urinary metabolites. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 4: 139.

Dry, J., 1994. Methods for the detection and diagnosis of inborn errors in the purine and pyrimidine metabolism. Potchefstroom: PU vir CHO. (Verhandeling: M.Sc): 77 - 78.

Duran, M., Bruinvis, L., Ketting, D., Kamerling, J.P., Wadman, S.K., Schutgens, R.B.H., 1982. The identification of E-2-methylglutaconic acid, a new isoleucine metabolite, in the urine of patients with β -ketothiolase deficiency, propionic acidemia and methylmalonic acidemia. *Biochemical Mass Spectrometry*, 9: 1.

Duran, M., Gompertz, D., Bruinvis, L., Ketting, D., Wadman, S.K., 1978. The variability of metabolite excretion in propionic acidemia. *Clinica Chimica Acta*, 82: 93.

Duran, M., Ketting, D., Bruinvis, L., Dorland, L., Wadman, S.K., Bakkeren, J.A.J.M., 1987. Urinary excretion of 2-methyl-2,3-butanediol and 2,3-pentenediol in patients with disorders of propionate and methylmalonate metabolism. *Clinica Chimica Acta*, 165: 197.

Duran, M., Wadman, S.K., 1985. Thiamine-responsive inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 8 (Supplement 1): 70 - 75.

Erasmus, E., Mienie, L.J., Reinecke, C.J., Wadman, S.K., 1985. Organic aciduria in late-onset biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 8: 105.

Fekete, G., Plattner, R., Crabb, D.W., Zang, B., Harris, R.A., Heerema, N., Palmer, C.G., 1989. Localization of the human gene for the E1 α subunit of branched chain keto acid dehydrogenase (BCKDHA) to chromosome 19q13.1 \rightarrow q13.2. *Cytogenetica Cell Genetics*, 50: 236 - 237.

Fernhoff, P.M., Lubitz, D., Danner, D.J., Dembure, P.P., Schwartz, H.P., Hillman, R., Bier, D.M., Elsas, L.J., 1985. Thiamine response in maple syrup urine disease. *Pediatric Research*, 19(10): 1011 - 1016.

Furniss, B.S., Hannaford, A.J., Smith, P.W.G., Tatchell, A.R., Vogel's textbook of practical organic chemistry, fifth edition., New York, Longman Scientific & Technical, 1989, p692 - 693.

Fischer, J.E., Rosen, H.M., Ebeid, A.M., James, J.H., Keane, J.M., Soeters, P.B., 1976. The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man. *Surgery*, 80(1): 77 - 91.

Fischer, M.H., Gerritsen, T., 1971. Biochemical studies on a variant of branched chain ketoaciduria in a 19-year-old female. *Pediatrics*, 48(5): 795 - 801.

Freifelder, D., 1982. Physical biochemistry: applications to biochemistry and molecular biology. Second edition. New York, W.H. Freeman and Company: 236, 255 - 257.

Garrod, A.E., 1908. Inborn errors of metabolism (Croonian Lectures). *Lancet*, 2: 73.

Gawron, Q., Mahajan, K.P., 1966. Alpha-methyl-cis-aconitic acid, cis-aconitase substrate 1 synthesis. *Biochemistry*, 5: 2335.

Glasgow, A.M., Chase, H.P., 1976. Effect of pent-4-enoic acid, propionic acid and other short-chain fatty acids on citrulline synthesis in rat liver mitochondria. *Biochemical Journal*, 156: 301.

Goodman, H.M., 1977. Site of action of insulin in promoting leucine utilization in adipose tissue. *American Journal of Physiology*, 233(2): E97 - E103.

Gortner, L., Leupold, D., Pohlandt, F., Bartmann, P., 1989. Peritoneal dialysis in the treatment of metabolic crises caused by inherited disorders of organic and amino acid metabolism. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 78: 706 - 711.

Gottschalk, G., 1986. Bacterial Metabolism. Second edition. New York: Springer-Verlag. p 48.

Greter, J., Lindstedt, S., Seeman, H., Steen, G., 1980. 2-Hydroxy-2-methylsuccinic acid-A urinary metabolite in propionyl-CoA carboxylase deficiency. *Clinica Chimica Acta*, 106: 103.

Gross, M.D., Eggen, M.A., Simon, A.M., Van Pilsum, J.F., 1986. The purification and characterization of human kidney L-arginine:glycine amidinotransferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251(2): 747 - 755.

Gurr, M.I., James, A.T., 1980. Lipid biochemistry: an introduction. London: Chapman and Hall. p 79 - 80.

Haworth, J.C., Perry, T.L., Blass, J.P., Hansen, S., Urquhart, N., 1976. Lactic acidosis in three sibs due to defects in both pyruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase complexes. *Pediatrics*, 58(4): 564 - 572.

Hageneldt, L., en Naglo, A.S., 1987. New conjugated urinary metabolites in intermediate type male syrup urine disease. *Clinica Chimica Acta*, 169: 77.

Hodgson, E., Levi, P.E., 1994. Introduction to biochemical toxicology. Second edition. Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange, p 566.

Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D., Scrimgeour, K.G., 1993. Principles of biochemistry. New Jersey: Neil Patterson Publishers, Prentice Hall, p 13.6 - 13.7, 18.40 - 18.41.

Haymond, M.W., Ben-Galim, E., Strobel, K.E., 1978. Glucose and alanine metabolism in children with maple syrup urine disease. *Journal Clinical Investigation*, 62: 398.

Haymond, M.W., Karl, I.E., Feigin, R.D., DeVivo, D., Pagliara, A.S., 1973. Hypoglycemia and maple syrup urine disease: defective gluconeogenesis. *Pediatric Research*, 7: 500.

Hudson, S.M., Cree, T.C., Harper, A.E., 1978. Regulation of leucine and α -ketoisocaproate metabolism in skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(22): 8126 - 8133.

Hutson, S.M., Rannels, S.L., 1985. Characterization of a mitochondrial transport system for branched chain α -keto acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(26): 14189 - 14193.

Hutton, J.C., Sener, A., Herchuelz, A., Atwater, I., Kawazu, S., Boschero, A.C., Somers, G., Devis, G., Malaisse, W.J., 1980. Similarities in the stimulus-secretion coupling mechanisms of glucose- and 2-keto acid-induced insulin release. *Endocrinology*, 106(1): 203 - 219.

Ichihara, A., 1985. Aminotransferases of branched-chain amino acids. (In Christen, P., Metzler, D.E., ed. Biochemistry. A series of monographs, vol. 2, Transaminases.) New York: John Wiley & Sons, p 430 - 439.

Jakobs, C., Dorland, L., Sweetman, L., Duran, M., Nyhan, W.L., Wadman, S.K., 1984. Identification of methylbranched chain dicarboxylic acids in amniotic fluid and urine in propionic and methylmalonic acidemia. *Pediatric Research*, 18: 1185.

Jellum, E., Horn, L., Thoresen, O., Kvittingen, E.A., Stokke, O., 1986. Urinary excretion of N-acetyl-amino acids in patients with some inborn errors of amino acid metabolism. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 46: 31.

Jones, S.M.A., Yeaman, S.J., 1986. Oxidative decarboxylation of 4-methylthio-2-oxobutyrate by branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex. *Biochemical Journal*, 237: 621 - 623.

Kadowaki, H., Knox, W.E., 1982. Cytosolic and mitochondrial isoenzymes of branched-chain amino acid aminotransferase during development of the rat. *Biochemical Journal*, 202: 777 - 783.

Ketting, D., Wadman, S.K., Bruinvis, L., Sweetman, L., 1985. The occurrence of lactyl lactate and succinyl lactate in the urine of patients screened for inherited metabolic disease. *Clinica Chimica Acta*, 146: 29.

Kishimoto, Y., Akanuma, H., Singh, I., 1979. Fatty acid α -hydroxylation and its relation to myelination. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 28(1-3): 93 - 105.

- Kleijer, W.J., Horsman, D., Mancini, G.M.S., Fois, A., Boue, J., 1985. First-trimester diagnosis of maple syrup urine disease on intact chorionic villi. *New England Journal of Medicine*, 313: 1608.
- Kuhara, T., Inoue, Y., Shinka, T., Matsumoto, I., Matsuo, M., 1983. Identification of 3-hydroxy-3-ethylglutaric acid in urine of patients with propionic acidemia. *Biochemical Mass Spectroscopy*, 10: 629.
- Kuhara, T., Shinka, T., Matsumoto, I., Matsuo, M., 1982. Increased excretion of four acetyl-CoA precursors during clinical episode of propionic acidemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 5: 225.
- Lancaster, G., Mamer, O.A., Scriver, C.R., 1974. Branched-chain alpha-keto acids isolated as oxime derivatives: relationship to the corresponding hydroxy acids and amino acids in maple syrup urine disease. *Metabolism*, 23(3): 257 - 265.
- Landaas, S., 1975. Accumulation of 3-hydroxyisobutyric acid, 2-methyl-3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyisovaleric acid in ketonacidosis. *Clinica Chimica Acta*, 64: 143.
- Landaas, S., Jakobs, C., 1977. The occurrence of 2-hydroxyisovaleric acid in patients with lactic acidosis and ketoacidosis. *Clinica Chimica Acta*, 79: 489.
- Le Cam, A., Freychet, P., 1977. Neutral amino acid transport. Characterization of the A and L systems in isolated rat hepaocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(1): 148 - 156.
- Lehnert, W., Werle, W., 1988. Elevated excretion of N-acetylated branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *Clinica Chimica Acta*, 172: 123.
- Lehnert, W., Junker, A., 1980. 2-Methyl-3-oxovaleriansaure: Ein charakteristischer metabolit bei propionacidamie. *Clinica Chimica Acta*, 104: 47.
- Lenzen, S., 1978. Effects of α -ketocarboxylic acids and 4-pentenoic acid on insulin secretion from the perfused rat pancreas. *Biochemical Pharmacology*, 27: 1321 - 1324.
- Mamer, O.A., Reimer, M.L.J., 1992. On the mechanisms of the formation of L-alloisoleucine and the 2-hydroxy-3-methylvaleric acid stereoisomers from L-isoleucine in maple syrup urine disease patients and in normal humans. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(31): 22141 - 22147.
- Matalon, R., Stumpf, A., Michals, K., Hart, R.D., Parks, J.K., Goodman, S.I., 1984. Lipoamide dehydrogenase deficiency with primary lactic acidosis: favorable response to treatment with oral lipoic acid. *The Journal of Pediatrics*, 104(1): 65 - 69.
- Matsukawa, T., Hirano, H., Yurugi, S., 1970. Preparation of thiamine derivatives and analogs (*In* McCormick, D.B., Wright, L.D., ed. *Methods in enzymology*, vol XVIII. *Vitamins and Coenzymes. Part A.*) New York: Academic Press, p 152 - 154.

- Matthews, D.E., Ben-Galim, E., Haymond, M.W., Bier, D.M., 1980. Alloisoleucine formation in maple syrup urine disease: Isotopic evidence for the mechanism. *Pediatric research*, 14: 854 - 857.
- Mawal, Y.R., Qureshi, I.A., 1994. Purification to homogeneity of mitochondrial acyl-CoA:glycine N-acyltransferase from human liver. *Biochemical and Biophysical Research communications*, 205(2): 1373 - 1379.
- Menkes, J.H., 1959. Isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics*, 23: 348 - 353.
- Menkes, J.H., Hurst, P.L., Craig, J.M., 1954. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics*, 14: 462 - 467.
- Mienie, L.J., 1994. 'n Studie van geïnduseerde metaboliese weë weens 'n aangebore defek in propioniel-KoA-karboksilase. Potchefstroom: PU vir CHO. (Thesis - Ph.D): 1, 40, 45 - 47, 87 - 90, 120 - 124, 151 - 157, 163.
- Millington, D.S., Chace, D.H., Hillman, S.L., Kodo, N., Terada, N., 1994. Diagnosis of metabolic disease. (in *Biological Mass Spectrometry: Present and future*. ed. Matsuo, R.M., Caprioli, R.M., Gross, M.L., Seyama, Y.) John Wiley & Sons Ltd. p 559 - 579.
- Millington, D.S., Kodo, N., Norwood, D.L., Roe, C.R., 1990. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 13: 321 - 324.
- Mitsubuchi, H., Nobukuni, Y., Endo, F., Matsuda, I., 1991. Structural organization and chromosomal localization of the gene for the E1 β subunit of human branched chain α -keto acid dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(22): 14686 - 14690.
- Mizock, B.A., 1985. Branched-chain amino acids in sepsis and hepatic failure. *Archives of Internal Medicine*, 145: 1284 - 1288.
- Morey, A.V., Juni, E., 1970. Resolution, reconstitution, and other methods for the study of binding of thiamine pyrophosphate to enzymes. (In McCormick, D.B., Wright, L.D., ed. *Methods in enzymology*. Volume XVIII: Vitamins and coenzymes, Part A) New York: Academic Press. p 238 - 240.
- Morris, M.D., Lewis, B.D., Doolan, P.D., Harper, H.A., 1961. Clinical and biochemical observations on an apparently nonfatal variant of branched-chain ketoaciduria (Maple syrup urine disease). *Pediatrics*, 28: 918 - 923.
- Munnich, A., Saudubray, J.M., Taylor, J., Charpentier, C., Marsac, C., Rocchiccioli, F., Amedee-Manesme, O., Coude, F.X., Frezal, J., Robinson, B.H., 1982. Congenital lactic acidosis, α -ketoglutaric aciduria and variant form of maple syrup urine disease due to a single enzyme defect: dihidrolipoyl dehydrogenase deficiency. *Acta Paediatrica Scandinavia*, 71: 167 - 171.

- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 1996. Harper's Biochemistry. Twenty-fourth edition. London: Prentice-Hall International, p 316 - 318, 341.
- Norton, P.M., Roitman, E., Snyderman, S.E., Holt, L.E., 1962. A new finding in maple-syrup-urine disease. *The Lancet*, Jan: 26 - 27.
- Odessey, R., Goldberg, A.L., 1972. Oxidation of leucine by rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 223(6): 1376 - 1383.
- Odessey, R., Khairallah, E.A., Goldberg, A.L., 1974. Origin and possible significance of alanine production by skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(23): 7623 - 7629.
- Oxender, D.L., Christensen, H.N., 1963. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *The Journal of Biological Chemistry*, 238(11): 3686 - 3699.
- Pettit, F.H., Yeaman, S.J., Reed, L.J., 1978. Purification and characterization of branched chain α -keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney. *Proceedures of the National Academy of Science, USA*, 75(10): 4881 - 4885.
- Panten, U., Kriegstein, E.V., Poser, W., Schönborn, J., Hasselblatt, A., 1972. Effects of L-leucine and α -ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islet. *FEBS Letters*, 20(2): 255 - 228.
- Peinemann, F., Danner, D.J., 1994. Maple Syrup Urine Disease 1954 to 1993. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 17: 3 - 15.
- Pollitt, R.J., 1983. The occurrence of substituted 3-methyl-3-hydroxyglutaric acids in urine in propionic acidemia and in β -ketothiolase deficiency. *Biomedical Mass Spectroscopy*, 10: 253.
- Pollitt, R.J., Fowler, B., Sardharwalla, I.B., Edwards, M.A., Gray, R.G., F., 1987. Increased excretion of propan-1,3-diol and 3-hydroxypropionic acid apparently caused by abnormal bacterial metabolism in the gut. *Clinica Chimica Acta*, 169: 151.
- Prentki, M., Renold, A.E., 1983. Neutral amino acid transport in isolated rat pancreatic islets. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(23): 14239 - 14244.
- Przyrembel, J., Bremer, H.J., Duran, M.M., Bruinvis, L., Ketting, D., Wadman, S.K., Baumgartner, R., Irle, U., Bachmann, C., 1979. Propionyl-CoA carboxylase deficiency with overflow of metabolites of isoleucine catabolism at all levels. *European Journal of Pediatrics*, 130: 1.
- Riviello, J.J., Rezvani, I., DiGeorge, M., Foley, C.M., 1991. Cerebral edema causing death in children with maple syrup urine disease. *The Journal of Pediatrics*, 119(1): 42 - 45.
- Robinson, B.H., Oei, J., Sherwood, W.G., Applegarth, D., Wong, L., Haworth, J., Goodyer, P., Casey, R., Zaleski, A., 1984. The molecular basis for the two different

clinical presentations of classical pyruvate carboxylase deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 36: 283.

Robinson, B.H., Taylor, J., Kahler, S.G., Kirkman, H.N., 1981. Lactic acidemia, neurologic deterioration and carbohydrate dependence in a girl with dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency. *European Journal of Pediatrics*, 136: 35 - 39.

Robinson, B.H., Taylor, J., Sherwood, W.G., 1980. The genetic heterogeneity of lactic acidosis: occurrence of recognizable inborn errors of metabolism in a pediatric population with lactic acidosis. *Pediatric Research*, 14: 956 - 962.

Rosen, H.M., Yoshimura, N., Hodgman, J.M., Fischer, J.E., 1977. Plasma amino acid patterns in hepatic encephalopathy of differing etiology. *Gastroenterology*, 72: 483 - 487.

Rosenthal, J., Angel, A., Farkas, J., 1974. Metabolic fate of leucine: a significant sterol precursor in adipose tissue and muscle. *American Journal of Physiology*, 226(2): 411 - 418.

Sans, R.M., Jolly, W.W., Harris, R.A., 1980. Studies on the regulation of leucine catabolism III. Effect of dichloroacetate and 2-chloropropionate on leucine oxidation by the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 12: 1 - 16.

Sax, H.C., Talamini, M.A., Fischer, J.E., 1986. Clinical use of branched-chain amino acids in liver disease, sepsis, trauma, and burns. *Archives of Surgery*, 121: 358 - 366.

Schadewaldt, P., Hammen, H.W., Dalle-Feste, C., Wendel, U., 1990. On the mechanism of L-alloisoleucine formation: studies on a healthy subject and in fibroblasts from normals and patients with maple syrup urine disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 13: 137 - 150.

Scriver, C.R., Clow, C.L., George, H., 1985. So-called thiamin-responsive maple syrup urine disease: 15-year follow-up of the original patient. *Clinical and Laboratory Observations*, 107(5): 763 - 765.

Scriver, C.R., Clow, C.L., Mackenzie, S., Delvin, E., 1971. Thiamine-responsive maple-syrup-urine disease. *The Lancet*, 13: 310 - 312.

Shara, M.A., Dickson, P.H., Bagchi, D., Stohs, S.J., 1992. Excretion of formaldehyde, acetaldehyde and acetone in the urine of rats in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, paraquat, endrin and carbon tetrachloride. *Journal of Chromatography*, 576: 221 - 233.

Shigematsu, Y., Bykov, I.L., Liu, Y.Y., Nakai, A., Kikawa, Y., Sudo, M., Fujioka, M., 1994. Acylcarnitine profile in tissues and body fluids of biotin-deficient rats with and without L-carnitine supplementation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 17: 678 - 690.

Shigematsu, Y., Kikuchi, K., Momoi, T., Sudo, M., Kikawa, Y., Nosaka, K., Kuriyama, M., Haruki, S., Sanada, K., Hamano, N., Suzuki, Y., 1983. Organic acids and branched-chain amino acids in body fluids before and after multiple exchange

transfusions in maple syrup urine disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 6: 183 - 189.

Snyderman, S.E., Goldstein, F., Sansaricq, C., Norton, P.N., 1984. The relationship between the branched chain amino acids and their α -ketoacids in maple syrup urine disease. *Pediatric Research*, 18(9): 851 - 853.

Snyderman, S.E., Norton, P.M., Roitman, E., Holt, L.E., 1964. Maple syrup urine disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics*, 34: 454 - 472.

Sweetman, L., Williams, J.C., 1995. Branched chain organic acidurias. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., ed. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*.) New York: McGraw-Hill, Inc. p 1394.

Taylor, R.T., Jenkins, W.T., 1966. Leucine aminotransferase II. purification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 241(19): 4396 - 4405.

Treacy, E., Clow, C.L., Reade, T.R., Chitayat, D., Mamer, O.A., Scriver, C.R., 1992. Maple syrup urine disease: interrelations between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; Implications for treatment; Associations with CNS dysmyelination. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 15: 121 - 135.

Van Biervliet, J.P.G.M., Duran, M., Wadman, K., Koster, J.F., Van Rossum, A., 1979. Leigh's disease with decreased activities of pyruvate carboxylase and pyruvate decarboxylase. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2: 15 - 18.

Van Pilsum, J.F., Taylor, D., Zakis, B., McCormick, P., 1970. Simplified assay for transaminidase activities of rat kidney homogenates. *Analytical Biochemistry*, 35: 277 - 286.

Verdu, A., Lopez-Herce, J., Pascual-Castroviejo, I., Martinez-Bermejo, A., Ugarte, M., Garcia, M.J., 1985. Maple syrup urine disease variant form: Presentation with psychomotor retardation and CT scan abnormalities. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 74: 815 - 818.

Voet, D., Voet, J.G., 1990. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons, p 271.

Wada, Y., Tada, K., Minagawa, A., Yoshida, T., Morikawa, T., Okamura, T., 1963. Idiopathic hypervalinemia probably a new entity of inborn error of valine metabolism. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 81: 46.

Weiss, L., Noonan, S.N., Hyde, T., 1975. An unusual variant of maple syrup urine disease. *American Journal of Human Genetics*, 27: 93A.

Wendel, U., Becker, K., Przyrembel, H., Bulla, M., Manegold, C., Mench-Hoinowski, A., Langenbeck, U., 1980. Peritoneal dialysis in maple syrup urine disease: studies on branched-chain amino and keto acid. *European Journal of Pediatrics*, 134: 57 - 63.

Wendel, U., Langenbeck, U., Lombeck, I., Bremer, H.J., 1982. Maple syrup urine disease - therapeutic use of insulin in catabolic states. *European Journal of Pediatrics*, 139: 172 - 175.

Wendel, U., Langenbeck, U., Seakins, W.T., 1989. Interrelation between the metabolism of L-isoleucine and L-allo-isoleucine in patients with maple syrup urine disease. *Pediatric Research*, 25(1): 11 - 14.

Westall, R.G., Dancis, J., Miller, S., 1957. Maple syrup urine disease. *American Journal of Diseased Children*, 94: 571

White, A., Handler, P., Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R., 1978. Principles of biochemistry. Sixth edition. Tokyo: McGraw-Hill Kogakusha, p 581 - 583, 719 - 724, 1334 - 1335.

Wohlhueter, R.M., Harper, A.E., 1970. Coinduction of rat liver branched chain α -keto acid dehydrogenase activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(9): 2391 - 2401.

Yamashita, M., 1959. Synthesis of certain hydroxycarboxylic acids related to isocitric acid. *Journal of Organic Chemistry*, 23: 833.

Yeaman, S.J., 1989. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochemical Journal*, 257: 625-632.

Zipf, W.B., Hieber, V.C., Allen, R.J., 1979. Valine-toxic intermittent maple syrup urine disease: a previously unrecognized variant. *Pediatrics*, 63(2): 286 - 294.

Zubay, G., 1988. Biochemistry. New York: MacMillan Publishing Company, Collier MacMillan Publishers, p 486, 779, 802.

Bedankings:

Graag wil ek die volgende persone dank vir hul bydra:

- Prof J. Mienie - vir sy bydra beide in kennis en tyd.
- E. Erasmus - vir sy hulp met die LC-ES-MS-MS analyses
- Vriende en kollegas - vir hulle voltydse ondersteuning
- My familie - vir hul ondersteuning en aanmoediging

Index:

- A -

Akonitiensuur, 60, 78, 89, 148, 150

Alanien, 10, 43 - 45, 70

Aldehyd, 96 - 97

Allo-iso-leusien, 20, 23 - 25, 38, 77, 80, 136

Amiene, 43 - 44, 82 - 84, 86, 138 - 139

Fenieletielamien, 82

Isoamielamien, 43, 82 - 83, 86, 138

Isobutielamien, 43, 82 - 84, 86, 138

2-Metielbutielamien, 43, 82, 138

2-Metielpropielamien, 83, 86

γ -Aminobottersuur, 82

Aminosuurdekarboksilase, 82

Appelsuur, 89, 148, 150

Arginien, 74

L-Arginien:glisien amidinotransferase, 74, 76, 81

Asetaldehyd, 97

Asetiel-KoA, 13, 15, 50, 69, 110 - 111, 113, 121, 142

N-Asetiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate, 10, 50 - 54, 148, 150

N-Asetielisoleusien, 10, 50 - 54, 148, 150

N-Asetielleusien, 10, 50 - 54, 148, 150

N-Asetielvalien, 10, 50, 53 - 54, 148, 150

N-Asetielalanien, 70, 142

N-Asetielaspartiensuur, 148, 150

N-Asetielgekonjugeerde aminosure, 10, 50 - 54, 70 - 72, 142, 148, 150

N-Asetielalanien, 70, 142

N-Asetielglisien, 70 - 72

N-Asetielisoleusien, 10, 50 - 54, 148, 150

N-Asetielleusien, 10, 50 - 54, 148, 150

- N*-Asetielvalien, 10, 50, 53 - 54, 148, 150
- N*-Asetielglisien**, 70 - 72
- N*-Asetielisoleusien**, 10, 50 - 54, 148, 150
- Asetielkarnitien**, 146
- N*-Asetielkonjugate**, 10, 50 - 54, 56, 69 - 71, 137, 142, 148, 150
- N*-Asetielalanien, 70, 142
- N*-Asetielglisien, 70 - 72
- N*-Asetielisoleusien, 10, 50 - 54, 148, 150
- N*-Asetielleusien, 10, 50 - 54, 148, 150
- N*-Asetielvalien, 10, 50, 53 - 54, 148, 150
- Asetielkarnitien, 146
- N*-Asetielkonjureringsreaksies**, 50, 55
- Asetillering, 50, 55
- N*-Asetilleringreaksies, 55
- N*-Asetielleusien**, 10, 50 - 54, 148, 150
- N*-Asetielvalien**, 10, 50, 53 - 54, 148, 150
- Asetillering**, 50, 55
- N*-Asetilleringreaksies**, 55
- Asetonitrieli**, 46 - 47, 101, 105
- Asetoon**, 97
- N*-Asetiel-aminosuurkonjugate**, 9, 49 - 53, 55 - 66, 69 - 71, 87 - 91, 93 - 94, 104, 134, 136, 142, 146
- N*-Asetielalanien, 70, 142
- N*-Asetielglisien, 70 - 72
- N*-Asetielisoleusien, 10, 50 - 54, 148, 150
- N*-Asetielleusien, 10, 50 - 54, 148, 150
- N*-Asetielvalien, 10, 50, 53 - 54, 148, 150
- N*-2-Hidroksi-3-metielvalerielisoleusien, 67
- N*-2-Hidroksi-3-metielvalerielleusien, 65 - 66
- N*-2-Hidroksi-3-metielvalerielvalien, 67
- N*-2-Hidroksi-isokaproielisoleusien, 63 - 64
- N*-2-Hidroksi-isokaproielleusien, 63 - 64
- N*-2-Hidroksi-isokaproielvalien, 63
- N*-2-Hidroksi-isovalerielalanien, 70

- N*-2-Hidroksi-isovalerielglisien, 70, 72
- N*-2-Hidroksi-isovalerielisoleusien, 59 - 62, 148, 150
- N*-2-Hidroksi-isovaleriellesusien, 59 - 62, 148, 150
- N*-2-Hidroksi-isovalerielvalien, 59 - 60, 62, 65, 148, 150
- N*-Isobutiriel-allo-isoleusien, 150
- N*-Isobutirielisoleusien, 89, 91, 95 - 96, 148, 150
- N*-Isobutiriellesusien, 89 - 91, 95 - 96, 148, 150
- N*-Isobutirielvalien, 89 - 91, 95 - 96, 148
- N*-Isovaleriel-allo-isoleusien, 150
- N*-Isovalerielisoleusien, 89, 91, 93, 96, 148, 150
- N*-Isovaleriellesusien, 89, 91 - 93, 96, 148, 150
- N*-Isovalerielvalien, 91 - 93, 95 - 96
- N*-Laktielalanien, 70
- N*-Laktielglisien, 70 - 72, 148, 150
- N*-Laktielisoleusien, 10, 56, 58, 60, 78, 148, 150
- N*-Laktiellesusien, 10, 56 - 58, 60, 89, 148, 150
- N*-Laktielvalien, 10, 56 - 57
- N*-2-Metielbutirielisoleusien, 89, 93, 95 - 96, 148, 150
- N*-2-Metielbutiriellesusien, 89, 93 - 96, 148, 150
- N*-2-Metielbutirielvalien, 89, 93 - 94, 96, 148, 150
- Asiel-karnitien**, 34, 37 - 38, 40 - 41, 46, 143 - 145
- Asiel-karnitienanalises**, 143
- Asiel-karnitienderivate**, 37 - 38, 140
 - Butirielkarnitien, 146
 - 2-Hidroksi-isovalerielkarnitien, 146
 - 3-Hidroksi-isovalerielkarnitien, 146
 - Isobutirielkarnitien, 146
 - 2-Metielbutirielkarnitien, 146
- Asiel-karnitienkonjugate**, 144, 146
 - Butirielkarnitien, 146
 - 2-Hidroksi-isovalerielkarnitien, 146
 - 3-Hidroksi-isovalerielkarnitien, 146
 - Isobutirielkarnitien, 146
 - 2-Metielbutirielkarnitien, 146

Asiel-karnitienprofiel, 145**Asiel-KoA, 10 - 15, 17, 69, 72 - 73, 96, 98, 100 - 101, 109 - 110, 139**

3-Hidroksi-3-metielglutariel-KoA, 11

3-Hidroksi-butiriel-KoA, 72 - 73

2-Hidroksi-isokaproïel-KoA, 69

2-Hidroksi-isovaleriel-KoA, 69

 β -Hidroksie- β -metielglutariel-KoA, 13 β -Hidroksie-isobutiriel-KoA, 12

Isobutiriel-KoA, 12, 100 - 101

Isovaleriel-KoA, 12 - 13, 109, 139

Laktiel-KoA, 69

 α -Metiel- β -hidroksibutiriel-KoA, 15

Metielakreliel-KoA, 12

 α -Metielasetoasetiel-KoA, 15

2-Metielbutiriel-KoA, 12, 14

 β -Metielglutakoniel-KoA, 13 β -Metielkrotoniel-KoA, 13

Propioniel-KoA, 12, 15, 110

Suksiniel-KoA, 11

Tigliel-KoA, 15

N*-Asiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate, 10, 50 - 54, 56 - 65, 89 - 91, 95 - 96, 148, 150N*-Asetielisoleusien, 10, 50 - 54, 148, 150*N*-Asetielleusien, 10, 50 - 54, 148, 150*N*-Asetielvalien, 10, 50, 53 - 54, 148, 150*N*-2-Hidroksi-3-metielvalerielisoleusien, 67*N*-2-Hidroksi-3-metielvaleriellesusien, 65 - 66*N*-2-Hidroksi-3-metielvalerielvalien, 67*N*-2-Hidroksi-isokaproïelisoleusien, 63 - 64*N*-2-Hidroksi-isokaproïellesusien, 63 - 64*N*-2-Hidroksi-isokaproïelvalien, 63*N*-2-Hidroksi-isovalerielisoleusien, 59 - 62, 148, 150*N*-2-Hidroksi-isovaleriellesusien, 59 - 62, 148, 150*N*-2-Hidroksi-isovalerielvalien, 59 - 60, 62, 65, 148, 150

N-Isobutiriel-allo-iso-leusien, 150
N-Isobutirielisoleusien, 89, 91, 95 - 96, 148, 150
N-Isobutirielleusien, 89 - 91, 95 - 96, 148, 150
N-Isobutirielvalien, 89 - 91, 95 - 96, 148
N-Isovaleriel-allo-iso-leusien, 150
N-Isovalerielisoleusien, 89, 91, 93, 96, 148, 150
N-Isovalerielleusien, 89, 91 - 93, 96, 148, 150
N-Isovalerielvalien, 91 - 93, 95 - 96
N-Laktielisoleusien, 10, 56, 58, 60, 78, 148, 150
N-Laktielleusien, 10, 56 - 58, 60, 89, 148, 150
N-Laktielvalien, 10, 56 - 57
N-2-Metielbutirielisoleusien, 89, 93, 95 - 96, 148, 150
N-2-Metielbutirielleusien, 89, 93 - 96, 148, 150
N-2-Metielbutirielvalien, 89, 93 - 94, 96, 148, 150

- B -

Bensoësuur, 148
Bis(Trimetielsiliel)-trifluoroasetamied, 39
Botsinggeïnduseerde fragmentspektrum, 83
BSTFA sien bis(Trimetielsiliel)-trifluoroasetamied
Butirielkarnitien, 146
Butilering, 40

- C -

Chemiese ionisasie, 34
Cholesterol, 11
CID-spektrum sien botsinggeïnduseerde fragmentspektrum

- D -

Dekarboksilase, 82
Dekarboksilering, 9, 12, 14, 16 - 17, 23, 82, 89, 98 - 99, 139
Derivatisering, 39 - 40
Diëtleter, 39, 46 - 47
Difeniel-hidantoïen, 138
Dihydrofenielhidrasien, 97
2,3-Dihidroksi-bottersuur, 148, 150
3,4-Dihidroksi-bottersuur, 148, 150
 α,γ -Dihidroksisure, 124
Dihidrolipoïel dehidrogenase, 17, 98
Dihidrolipoïel-asieltransferase, 140
Dihidrolipoïeltransasilase, 98
Dikarboksielsuur, 123

- E -

E. coli, 99, 142
E₁-eenheid, 17 - 18, 98 - 99, 102, 110
E₂-eenheid, 17 - 18, 22, 98 - 100, 102, 110
E₃-eenheid, 17, 98 - 99, 110
Elektronimpak, 34, 38
Elektrosproei, 34 - 35, 38
Elektrosproei-massaspektroskopie, 34
ES-MS-MS sien Vloeistofchromatografie-elektrosproei tandemmassaspektrometer
Etielasetaat, 39
Etielhidrakrielsuur, 150

- F -

3-Feniel-bottersuur, 33, 39, 148, 150

Fenieletielamien, 82

Fosforsuur, 148, 150

Fumaarsuur, 150

- G -

Gas-chromatografie, 32, 114, 117, 133

Gas-chromatografie-massaspektrometrie, 32, 34, 38, 114, 117, 133

Elektronimpak, 34, 38

Chemiese ionisasie, 34

GC-MS sien Gas-chromatografie-massaspektrometrie

N-Geasetileerde aminosure, 10, 50 - 54, 70 - 72, 148, 150

N-Asetielalanien, 70, 142

N-Asetielglisien, 70 - 72

N-Asetielisoleusien, 10, 50 - 54, 148, 150

N-Asetielleusien, 10, 50 - 54, 148, 150

N-Asetielvalien, 10, 50, 53 - 54, 148, 150

γ-Gehidroksileerde-2-hidroksisure, 123

Gemetilleer sien metilering

Gesubstitueerde tiamienpirofosfaat, 18 - 19, 103

Hidroksi-isobutirieltiamienpirofosfaat, 103

Hidroksi-isovalerieltiamienpirofosfaat, 103

Hidroksi-2-metielbutirieltiamienpirofosfaat, 103

Gesubstitueerde 11-hidrotiochroom, 98, 100, 135

Hidroksi-isovaleriel-11-hidrotiochroom, 104 - 105, 107, 140

Hidroksi-isobutiriel-11-hidrotiochroom, 102 - 103

Hidroksi-2-metielbutiriel-11-hidrotiochroom, 102 - 103

Glikool, 150

Glikoolsuur, 148

Glisien, 43 - 45, 70, 74 - 77, 81, 109, 140 - 141

Glisien-N-asilase, 73 - 74, 109, 139 - 141

Glutamaat dekarboksilase, 139

Glutamaat, 16

Glutamiensuur, 82

Guanidinoasetaat, 74 - 75

- H -

Heemsinteseveg, 81

Hidantoïene *sien Hidantoïenverbindings*

Hidantoïenverbindings, 75, 79 - 81, 85

5-Hidroksi-5-isobutirielhidantoïen, 75, 79 - 81, 85

5-Hidroksi-5-isopropielhidantoïen, 75, 77 - 78, 80 - 81, 85

5-Hidroksi-5-metielpropielhidantoïen, 75, 79 - 81, 85

2-Hidroksi-2-metielbottersuur, 150

3-Hidroksi-2-metielbottersuur, 148

3-Hidroksi-3-metielglutariel-KoA, 11

2-Hidroksi-3-metielnonanoësuur, 134 - 135

2-Hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 24, 29 - 31, 55, 59, 65 - 66, 122 - 126, 150

2-Hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 132

2-Hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-isokaproësuur, 132

2-Hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 131

2-Hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksisuurkonjugate, 65 - 67, 131 - 132

2-Hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 132

2-Hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-isokaproësuur, 132

2-Hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 131

N-2-Hidroksi-3-metielvalerielisoleusien, 67

N-2-Hidroksi-3-metielvaleriellesien, 65 - 66

N-2-Hidroksi-3-metielvalerielvalien, 67

***N*-2-Hidroksi-3-metielvaleriel-vertakteketting-aminosuurkonjugate**, 65 - 67

N-2-Hidroksi-3-metielvalerielisoleusien, 67

N-2-Hidroksi-3-metielvaleriellesien, 65 - 66

N-2-Hidroksi-3-metielvalerielvalien, 67

- N-2-Hidroksi-3-metielvalerielisoleusien**, 67
- N-2-Hidroksi-3-metielvaleriellesien**, 65 - 66
- N-2-Hidroksi-3-metielvalerielvalien**, 67
- 5-Hidroksi-5-isobutirielhidantoïen**, 75, 79 - 81, 85
- 5-Hidroksi-5-isopropielhidantoïen**, 75, 77 - 78, 80 - 81, 85
- 5-Hidroksi-5-metielpropielhidantoïen**, 75, 79 - 81, 85
- ρ -Hidroksi-bensoësuur**, 148
- 2-Hidroksi-bottersuur**, 148, 150
- 3-Hidroksi-bottersuur**, 45, 148, 150
- 3-Hidroksi-butiriel-alanien**, 45
- 3-Hidroksi-butiriel-KoA**, 72 - 73
- 3-Hidroksi-butirielglisien**, 45
- 3-Hidroksi-butirielkonjugate**, 45, 72
- 3-Hidroksi-butiriel-alanien, 45
- 3-Hidroksi-butirielglisien, 45
- 2-Hidroksi-dekanoësuur**, 133 - 135
- ρ -Hidroksi-fenielasynsuur**, 78, 89, 148, 150
- ρ -Hidroksi-feniellaktaat**, 89, 148, 150
- 2-Hidroksi-glutaarsuur**, 22, 78, 110, 148, 150
- 5-Hidroksi-hidantoïenanaloe sien Hidantoïenverbindings**
- 5-Hidroksi-hidantoïene sien Hidantoïenverbindings**
- 2-Hidroksi-isobottersuur**, 150
- Hidroksi-isobutirieltiamienpirofosfaat**, 103
- Hidroksi-isobutiriel-11-hidrotiochroom**, 102 - 103
- 2-Hidroksi-isokaproësuur**, 24, 29, 31, 55, 59, 63, 122 - 124, 126, 128, 148, 150
- 3-Hidroksi-isokaproësuur**, 150
- 2-Hidroksi-isokaproïel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur**, 130
- 2-Hidroksi-isokaproïel-2-hidroksi-isokaproësuur**, 129
- 2-Hidroksi-isokaproïel-2-hidroksi-isovaleriaansuur**, 128 - 130
- 2-Hidroksi-isokaproïel-2-hidroksisuurkonjugate**, 128 - 130
- 2-Hidroksi-isokaproïel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 130
- 2-Hidroksi-isokaproïel-2-hidroksi-isokaproësuur, 129
- 2-Hidroksi-isokaproïel-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 128 - 130
- 2-Hidroksi-isokaproïel-KoA**, 69

- N*-2-Hidroksi-isokaproïel-vertakteketting-aminosuurkonjugate**, 63 - 64
- N*-2-Hidroksi-isokaproïel isoleusien, 63 - 64
 - N*-2-Hidroksi-isokaproïelleusien, 63 - 64
 - N*-2-Hidroksi-isokaproïelvalien, 63
- N*-2-Hidroksi-isokaproïel isoleusien**, 63 - 64
- N*-2-Hidroksi-isokaproïelleusien**, 63 - 64
- N*-2-Hidroksi-isokaproïelvalien**, 63
- γ -Hidroksi-isovaleriaanlaktoon**, 123
- γ -Hidroksi-isovaleriaansuur**, 123
- 2-Hidroksi-isovaleriaansuur**, 10, 22, 24, 29, 31, 55, 59, 62 - 63, 66, 69, 73, 122 - 124, 128, 148, 150
- 3-Hidroksi-isovaleriaansuur**, 96, 148, 150
- 2-Hidroksi-isovaleriaansuurkonjugate**, 58, 121 - 123
- 2-Hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 126, 128
 - 2-Hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-isokaproësuur, 126 - 128
 - 2-Hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 126 - 127
- 2-Hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur**, 126, 128
- 2-Hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-isokaproësuur**, 126 - 128
- 2-Hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-isovaleriaansuur**, 126 - 127
- 2-Hidroksi-isovaleriel-2-hidroksisuurkonjugate**, 126 - 128
- 2-Hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 126, 128
 - 2-Hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-isokaproësuur, 126 - 128
 - 2-Hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 126 - 127
- 2-Hidroksi-isovaleriel-KoA**, 69
- N*-2-Hidroksi-isovaleriel-vertakteketting-aminosuurkonjugate**, 59 - 62, 65, 148, 150
- N*-2-Hidroksi-isovaleriel isoleusien, 59 - 62, 148, 150
 - N*-2-Hidroksi-isovaleriel leusien, 59 - 62, 148, 150
 - N*-2-Hidroksi-isovalerielvalien, 59 - 60, 62, 65, 148, 150
- N*-2-Hidroksi-isovalerielalanien**, 70
- N*-2-Hidroksi-isovalerielglisien**, 70, 72
- Hidroksi-isovaleriel-11-hidrotiochroom**, 104 - 105, 107, 140
- N*-2-Hidroksi-isovaleriel isoleusien**, 59 - 62, 148, 150
- 2-Hidroksi-isovalerielkarnitien**, 146

- 3-Hidroksi-isovaleriëlkarnitien**, 146
- 2-Hidroksi-isovaleriëlkonjugate**, 59 - 62, 65, 70, 72, 105, 148, 150
- N*-2-Hidroksi-isovaleriëllalanien, 70
 - N*-2-Hidroksi-isovaleriëllisien, 70, 72
 - N*-2-Hidroksi-isovaleriëllisoleusien, 59 - 62, 148, 150
 - 2-Hidroksi-isovaleriëlkarnitien, 146
 - 3-Hidroksi-isovaleriëlkarnitien, 146
 - N*-2-Hidroksi-isovaleriëlleusien, 59 - 62, 148, 150
 - 2-Hidroksi-isovaleriëll-11-hidrotiochroom, 105
 - N*-2-Hidroksi-isovaleriëllvalien, 59 - 60, 62, 65, 148, 150
- N*-2-Hidroksi-isovaleriëlleusien**, 59 - 62, 148, 150
- N*-2-Hidroksi-isovaleriëllvalien**, 59 - 60, 62, 65, 148, 150
- Hidroksi-isovaleriëltiamienpirofosfaat**, 103
- Hidroksi-isovaleriëll-TPP sien isovaleriëltiamienpirofosfaat**
- α -Hidroksilering**, 143
- 2-Hidroksisuur-2-hidroksisuurkonjugate**, 126 - 132
- 2-Hidroksi-3-metielvaleriëll-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 132
 - 2-Hidroksi-3-metielvaleriëll-2-hidroksi-isokaproësuur, 132
 - 2-Hidroksi-3-metielvaleriëll-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 131
 - 2-Hidroksi-isokaproëll-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 130
 - 2-Hidroksi-isokaproëll-2-hidroksi-isokaproësuur, 129
 - 2-Hidroksi-isokaproëll-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 128 - 130
 - 2-Hidroksi-isovaleriëll-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 126, 128
 - 2-Hidroksi-isovaleriëll-2-hidroksi-isokaproësuur, 126 - 128
 - 2-Hidroksi-isovaleriëll-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 126 - 127
- Hidroksi-2-metielbutiriëll-11-hidrotiochroom**, 102 - 103
- Hidroksi-2-metielbutiriëltiamienpirofosfaat**, 103
- 2-Hidroksi-oktanoësuur**, 133
- 3-Hidroksi-propioonsuur**, 148, 150
- 2-Hidroksi-steariensuur**, 133
- 2-Hidroksisuur-vertakteketting-aminosuurkonjugate**, 59 - 67, 148, 150
- N*-2-Hidroksi-3-metielvaleriëllisoleusien, 67
 - N*-2-Hidroksi-3-metielvaleriëlleusien, 65 - 66
 - N*-2-Hidroksi-3-metielvaleriëllvalien, 67

N-2-Hidroksi-isokaproïelisoëusien, 63 - 64
N-2-Hidroksi-isokaproïelleusien, 63 - 64
N-2-Hidroksi-isokaproïelvalien, 63
N-2-Hidroksi-isovalerielisoëusien, 59 - 62, 148, 150
N-2-Hidroksi-isovaleriellesien, 59 - 62, 148, 150
N-2-Hidroksi-isovalerielvalien, 59 - 60, 62, 65, 148, 150

2-Hidroksi-vetsure, 134

β-Hidroksi-β-metielglutariel-KoA, 13

Hiperleusien/isoëusienemie, 12

Hipervalienemie, 12

Hipuursuur, 60, 148, 150

Hoëdruk-vloeistofchromatografie, 34 - 35

HPLC sien Hoëdruk-vloeistofchromatografie

- I -

Ingewandsbakterieë, 77, 115, 121, 142

Iso-amielalkohol, 105

Isoamielamien, 43, 82 - 83, 86, 138

Isobottersuur, 44, 89, 97, 100, 139

***N*-Isobutiriel-allo-isoëusien**, 150

Isobutiriel-KoA, 12, 100 - 101

***N*-Isobutiriel-vertakteketting-aminosuurkonjugate**, 89 - 91, 95 - 96, 148, 150

N-Isobutiriel-allo-isoëusien, 150

N-Isobutirielisoëusien, 89, 91, 95 - 96, 148, 150

N-Isobutiriellesien, 89 - 91, 95 - 96, 148, 150

N-Isobutirielvalien, 89 - 91, 95 - 96, 148

***N*-Isobutirielisoëusien**, 89, 91, 95 - 96, 148, 150

Isobutirielkarnitien, 146

***N*-Isobutirielisoëusien**, 89, 91, 95 - 96, 148, 150

***N*-Isobutiriellesien**, 89 - 91, 95 - 96, 148, 150

***N*-Isobutirielvalien**, 89 - 91, 95 - 96, 148

Isobutielamien, 43, 82 - 84, 86, 138

- 2-Isobutiellappelsuur**, 115, 142
- 2-Isobutielfumaarsuur**, 115
- Isoleusien**, 2, 9 - 12, 14 - 16, 20, 23 - 25, 29 - 30, 38, 43, 49 - 50, 54 - 55, 59, 62, 65 - 68, 74 - 77, 81 - 84, 99, 109, 115, 121, 136
- 2-Isopropiellappelsuur**, 46 - 47, 111 - 112, 115, 117, 142
- 2-Isopropielfumaarsuur**, 47 - 48, 111 - 115, 117
- Isovaleriaanasidemie**, 109
- Isovaleriaansuur**, 44, 96 - 97, 123, 139
- Isovaleriaansuururie**, 140
- N-Isovaleriel-allo-isoleusien**, 150
- Isovalerielaldehyd**, 104
- N-Isovalerielisoleusien**, 89, 91, 93, 96, 148, 150
- Isovalerielkarnitien**, 146
- Isovaleriel-KoA**, 12 - 13, 109, 139
- N-Isovaleriellesien**, 89, 91 - 93, 96, 148, 150
- N-Isovalerielvalien**, 91 - 93, 95 - 96

- K -

- Kaliumferrisianied**, 104 - 105
- Karboksielsuur**, 36 - 37, 40, 42 - 43, 51, 91, 93, 96, 110, 112, 123
- L-Karnitien**, 28, 54
- Karnitienbehandeling**, 54
- Karnitienkonjugate**, 146
 - Butirielkarnitien, 146
 - 2-Hidroksi-isovalerielkarnitien, 146
 - 3-Hidroksi-isovalerielkarnitien, 146
 - Isobutirielkarnitien, 146
 - 2-Metielbutirielkarnitien, 146
- Kernmagnetieseresonans**, 5
- 2-Keto-3-hidroksi-4-etielfuraan**, 125
- 2-Keto-3-hidroksi-4-metielfuraan**, 125
- 2-Keto-3-hidroksi-4-metielpuraan**, 125

- 2-Keto-3-hidroksi-5-metielpuraan**, 125, 150
- 2-Keto-3-metielvaleriaansuur**, 9, 11 - 12, 14, 17, 24 - 25, 29, 31, 43 - 44, 55, 87 - 88, 115, 120, 137, 148, 150
- 2-Keto-3-metielvaleriaansuur**, 9, 11 - 12, 14, 17, 29, 31, 43 - 44, 55, 87 - 88, 115, 119, 137, 148, 150
- 2-Keto-isovaleriaansuur**, 9, 11 - 12, 17, 23 - 24, 29, 31, 43 - 44, 55, 87 - 88, 114, 118, 121, 137, 142
- Ketogeneseweg**, 72
- α -Ketoglutaarsuur dehidrogenase-kompleks** *sien 2-Ketoglutaarsuur dehidrogenase-kompleks*
- 2-Ketoglutaarsuur dehidrogenase-kompleks**, 98
- 2-Ketoglutaarsuur**, 22, 98, 110
- α -Ketogluteraat dehidrogenase**, 17
- Ketose**, 8, 69
- 2-Ketosuur dehidrogenase-kompleks** *sien vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks*
- 2-Ketosuur-asetiel-KoA-konjugasie**, 110
- N-2-Ketosuur-vertakteketting-aminosuurkonjugate**, 88
- Ko-ensiem A**, 69, 73, 96, 98, 139
- KoA** *sien ko-ensiem A*
- Kortketting-vetsure**, 97
- Kreatien**, 31, 74 - 76, 81, 115, 138
- Kreatienfosfaat**, 138
- Kreatiensinteseweg**, 74 - 76, 81, 115, 138
- Kreatinien**, 32 - 33, 38 - 39, 75 - 77, 80, 95, 137 - 138
- Kreatiniensinteseweg**, 77, 137
- ρ -Kresol**, 148

- L -

- Laktiel-KoA**, 69
- N-Laktiel-vertakteketting-aminosuurkonjugate**, 10, 56 - 58, 60, 70 - 72, 78, 89, 148, 150
- N-Laktielalanien**, 70

N-Laktielglisien, 70 - 72, 148, 150

N-Laktielisoleusien, 10, 56, 58, 60, 78, 148, 150

N-Laktielleusien, 10, 56 - 58, 60, 89, 148, 150

N-Laktielvalien, 10, 56 - 57

***N*-Laktielalanien, 70**

***N*-Laktielglisien, 70 - 72, 148, 150**

***N*-Laktielisoleusien, 10, 56, 58, 60, 78, 148, 150**

***N*-Laktielkonjugate, 10, 56 - 60, 78, 89, 126, 148, 150**

N-Laktielalanien, 70

N-Laktielglisien, 70 - 72, 148, 150

N-Laktielisoleusien, 10, 56, 58, 60, 78, 148, 150

Laktiellaktaat, 126

N-Laktielleusien, 10, 56 - 58, 60, 89, 148, 150

N-Laktielvalien, 10, 56 - 57

***N*-Laktielkonjugeringsreaksies, 62**

Laktiellaktaat, 126

***N*-Laktielleusien, 10, 56 - 58, 60, 89, 148, 150**

***N*-Laktielvalien, 10, 56 - 57**

Laktoonverbindings, 123, 125, 150

γ -Hidroksi-isovaleriaanlaktoon, 123

2-Keto-3-hidroksi-4-etielfuraan, 125

2-Keto-3-hidroksi-4-metielfuraan, 125

2-Keto-3-hidroksi-4-metielpuraan, 125

2-Keto-3-hidroksi-5-metielpuraan, 125, 150

**LC-ES-MS-MS sien vloeistofchromatografie-elektrosproei
tandemmassaspektrometer**

Leigh se Siekte, 147

**Leusien, 2, 9 - 16, 20 - 25, 29 - 30, 38, 43, 49 - 50, 54 - 55, 59, 62, 65 - 68, 74 - 77,
81 - 84, 99, 109, 114 - 115, 121, 136 - 137, 142**

Lipoëleenheid, 17, 98

- M -

- Maple Syrup-uriendefek**, 1 - 4, 7 - 11, 17, 20 - 28, 30 - 31, 54 - 56, 74, 86, 98 - 99, 104 - 105, 136 - 139, 141 - 143, 146 - 147
- Behandeling, 1 - 4, 7, 11, 20 - 22, 25 - 28, 31, 53 - 56, 108, 136 - 137, 143, 147
 - Diagnose, 4, 7, 16, 23 - 28, 31, 147
 - Dieetbehandeling, 54, 56, 141, 147
 - Fenotipes, 2, 20 - 23, 104 - 105
 - Afwisselende*, 21, 23
 - E3-eenheid*, 17, 98 - 99, 110
 - Klassieke*, 2, 20, 22 - 23
 - Matige*, 2, 20 - 23
 - Tiamien-responsiewe*, 21, 140, 141
 - Karnitienbehandeling, 54
 - Kliniese beeld, 1, 8, 22, 27 - 28, 74, 86, 110, 136, 138 - 139, 143
 - Miëlinering, 143, 146 - 147
 - Simptome, 1 - 3, 9, 20 - 21, 26, 30 - 31
- Massaspektrometer**, 29, 32 - 35, 40 - 41, 59
- Massaspektrometrie**, 5, 23, 32 - 40, 80 - 83, 91, 100, 102, 133, 135
- Bis(Trimetielsiliel)-trifluoroasetamied, 39
 - Botsinggeïnduseerde fragmentspektrum, 83
 - Chemiese ionisasie, 34
 - CID-spektrum *sien botsinggeïnduseerde fragmentspektrum*
 - Derivatisering, 39 - 40
 - Elektronimpak, 34, 38
 - Elektrosproei, 34 - 35, 38
 - Elektrosproei-massaspektroskopie, 34
 - ES-MS-MS *sien Vloeistofchromatografie-elektrosproei tandemmassaspektrometer*
 - Gas-chromatografie-massaspektrometrie, 32, 34, 38, 91
 - LC-ES-MS-MS *sien vloeistofchromatografie-elektrosproei tandemmassaspektrometer*
 - Responsfaktore, 33

- Trichlorometielsilaan, 39
- Selektiewe ioonfase, 82
- Vloeistofchromatografie-elektrosproei tandemmassaspektrometer, 36 - 37, 40, 80 - 82, 100, 102, 133, 135
- Medium vertakteketting-2-hidroksisure** *sien mediumketting-vertakteketting-2-hidroksisure*
- Mediumketting-2-hidroksisure** *sien mediumketting-vertakteketting-2-hidroksisure*
- Mediumketting-vertakteketting-2-hidroksisure**, 133
- Melksuur**, 10, 22, 62, 69, 73, 110, 142 - 143, 147 - 148, 150
- α -Metiel- β -hidroksibutiriel-KoA**, 15
- 2-Metiel-3-hidroksibottersuur**, 150
- 3-Metiel-oksaalasynsuur**, 110
- Metielakreliel-KoA**, 12
- α -Metielasetoasetiel-KoA**, 15
- 2-Metielbottersuur**, 44, 97, 139
- 2-Metielbutiriel-KoA**, 12, 14
- N-2-Metielbutirielisoleusien**, 89, 93, 95 - 96, 148, 150
- 2-Metielbutirielkarnitien**, 146
- N-2-Metielbutirielleusien**, 89, 93 - 96, 148, 150
- N-2-Metielbutirielvalien**, 89, 93 - 94, 96, 148, 150
- 2-Metielbutielamien**, 43, 82, 138
- β -Metielglutakoniël-KoA**, 13
- β -Metielkrotoniël-KoA**, 13
- Metielmalonielsemialdehyd**, 12
- 2-Metielpropielamien**, 83, 86
- Metilering**, 74
- Miëlinering**, 143, 146 - 147
- Mieresuur**, 40 - 41, 105
- Mikrosomale oksigenase-ensiemsisteem**, 123
- Miristoïel-karnitien**, 40
- Monokarboksielsuur**, 110
- MSUD** *sien Maple Syrup-uriendefek*

- N -

NAD⁺, 17, 98

Natriumsulfaat, 39, 47

Ninhidrienkleurreaksie, 77

- O -

Oksaalasynsuur, 110, 113

Oksaalsuur, 148, 150

Oksaloasynsuur, 110

(ω -1)-Oksidasie, 123

α -Oksidasie, 96, 133 – 134, 143

ω -Oksidasie, 96 – 98, 123, 125

Organiese suurekstraksie, 38, 41, 47 – 48, 73, 82, 113 – 114, 117, 133

Ornitien, 74, 77

- P -

Pikriensuur, 32, 138

Pirimidienring, 107

Pirodruiwesuur, 110

Pirovaat dehidrogenase, 17 - 18, 142, 147

Piroviensuur dehidrogenase sien *Pirovaat dehidrogenase*

Piroviensuur dehidrogenase-kompleks, 109

Piroviensuur, 16, 22, 98, 110

PKU, 82

Poli-amiene, 139

Propioniel-KoA, 12, 15, 110

Putressien, 139

- R -

Responsfaktore, 33

- S -

2-Sekondêre-butilappelsuur, 115

2-Sekondêre-butielfumaarsuur, 115

Selektiewe ioonfase, 82

Sitraatsintase, 110 - 111, 113 - 114, 142

Sitroensuur, 60, 89, 111, 113, 148, 150

Sitroensuursiklus, 11, 13, 15, 46 - 48, 50, 69, 89, 110 - 115, 117, 121, 142, 148, 150

Appelsuur, 89, 148, 150

Asetiel-KoA, 13, 15, 50, 69, 110 - 111, 113, 121, 142

Fumaarsuur, 150

2-Isobutilappelsuur, 115, 142

2-Isobutielfumaarsuur, 115

2-Isopropielappelsuur, 46 - 47, 111 - 112, 115, 117, 142

2-Isopropielfumaarsuur, 47 - 48, 111 - 115, 117

2-Sekondêre-butilappelsuur, 115

2-Sekondêre-butielfumaarsuur, 115

Sitraatsintase, 110 - 111, 113 - 114, 142

Sitroensuur, 60, 89, 111, 113, 148, 150

Suksiensuur, 148, 150

Suksiniel-KoA, 11

Sitroensuursiklus-analoë, 46 - 48, 111 - 115, 117, 142

2-Isobutilappelsuur, 115, 142

2-Isobutielfumaarsuur, 115

2-Isopropielappelsuur, 46 - 47, 111 - 112, 115, 117, 142

2-Isopropielfumaarsuur, 47 - 48, 111 - 115, 117

2-Sekondêre-butilappelsuur, 115

2-Sekondêre-butielfumaarsuur, 115

Spermidien, 139
Spermien, 139
Suberiensuur, 148, 150
Suksiensuur, 148, 150
Suksiniel-KoA, 11

- T -

Teratogenies, 138
Tiamien, 21, 25, 28, 102 - 104, 107 - 108, 140 - 141, 147
Tiamien-HCl, 104
Tiamienaanvulling, 143
Tiamienpirofosfaat, 17 - 18, 21 - 22, 98 - 99, 102, 109, 140 - 141, 143, 146
Tiamientekort, 141
Tigiel-KoA, 15
Tiochroom, 108
Tiochroomderivate, 98 - 100, 102, 135
 Hidroksi-isovaleriel-11-hidrotiochroom, 104 - 105, 107, 140
 Hidroksi-isobutiriel-11-hidrotiochroom, 102 - 103
Tionielchloried, 42, 45
Tiramien, 82
Tirosinemie, 82
TMCS *sien trichlorometielsilaan*
TPP *sien tiamienpirofosfaat*
Transaminase, 10 - 11, 16, 56
Trichlorometielsilaan, 39

- U -

Ureum, 43, 115 - 117, 121, 137
Ureumsiklus, 74

- Valien**, 12 - 13, 40, 49 - 50, 56, 62, 65 - 66, 74, 81, 84, 99, 109, 121, 142
- Vertakte mediumketting-2-hidroksisure** *sien Mediumketting-vertakteketting-2-hidroksisure*
- Vertakte mediumketting-vetsure**, 134 - 135
 2-Hidroksi-3-metielnonanoësuur, 134 - 135
- Vertakteketting- α -ketosuur dehidrogenase-kompleks** *sien Vertakteketting-2-ketosuur dehidrogenase-kompleks*
- Vertakteketting-2-hidroksisure**, 10, 22, 24, 29 - 31, 55, 59 - 67, 69 - 73, 123 - 132, 148, 150
 2-Hidroksi-2-metielbottersuur, 150
 2-Hidroksi-3-metielnonanoësuur, 134 - 135
 2-Hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 24, 29 - 31, 55, 59, 65 - 66, 122 - 126, 150
 2-Hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 132
 2-Hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-isokaproësuur, 132
 2-Hidroksi-3-metielvaleriel-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 131
N-2-Hidroksi-3-metielvalerielisoleusien, 67
N-2-Hidroksi-3-metielvaleriellesusien, 65 - 66
N-2-Hidroksi-3-metielvalerielvalien, 67
 2-Hidroksi-isobottersuur, 150
 2-Hidroksi-isokaproësuur, 24, 29, 31, 55, 59, 63, 122 - 124, 126, 128, 148, 150
 2-Hidroksi-isokaproëiel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 130
 2-Hidroksi-isokaproëiel-2-hidroksi-isokaproësuur, 129
 2-Hidroksi-isokaproëiel-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 128 - 130
N-2-Hidroksi-isokaproëielisoleusien, 63 - 64
N-2-Hidroksi-isokaproëiellesusien, 63 - 64
N-2-Hidroksi-isokaproëielvalien, 63
 2-Hidroksi-isovaleriaansuur, 10, 22, 24, 29, 31, 55, 59, 62 - 63, 66, 69, 73, 122 - 124, 128, 148, 150
 2-Hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 126, 128
 2-Hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-isokaproësuur, 126 - 128
 2-Hidroksi-isovaleriel-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 126 - 127
N-2-Hidroksi-isovalerielalanien, 70

N-2-Hidroksi-isovaleriëlgliësen, 70, 72

N-2-Hidroksi-isovaleriëlisoleusien, 59 - 62, 148, 150

N-2-Hidroksi-isovaleriëlleusien, 59 - 62, 148, 150

N-2-Hidroksi-isovaleriëlvalien, 59 - 60, 62, 65, 148, 150

Vertakteketting-2-hidroksisuurdimere, 126 - 132

2-Hidroksi-3-metielvalerië-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 132

2-Hidroksi-3-metielvalerië-2-hidroksi-isokaproësuur, 132

2-Hidroksi-3-metielvalerië-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 131

2-Hidroksi-isokaproë-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 130

2-Hidroksi-isokaproë-2-hidroksi-isokaproësuur, 129

2-Hidroksi-isokaproë-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 128 - 130

2-Hidroksi-isovalerië-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 126, 128

2-Hidroksi-isovalerië-2-hidroksi-isokaproësuur, 126 - 128

2-Hidroksi-isovalerië-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 126 - 127

Vertakteketting-2-hidroksisuurkonjugate, 59 - 67, 69 - 70, 72, 100, 104 - 105, 107, 126 - 132, 146, 148, 150

2-Hidroksi-3-metielvalerië-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 132

2-Hidroksi-3-metielvalerië-2-hidroksi-isokaproësuur, 132

2-Hidroksi-3-metielvalerië-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 131

N-2-Hidroksi-3-metielvaleriëlisoleusien, 67

N-2-Hidroksi-3-metielvaleriëlleusien, 65 - 66

N-2-Hidroksi-3-metielvaleriëlvalien, 67

2-Hidroksi-isokaproë-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 130

2-Hidroksi-isokaproë-2-hidroksi-isokaproësuur, 129

2-Hidroksi-isokaproë-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 128 - 130

2-Hidroksi-isokaproë-KoA, 69

N-2-Hidroksi-isokaproëlisoleusien, 63 - 64

N-2-Hidroksi-isokaproëlleusien, 63 - 64

N-2-Hidroksi-isokaproëlvalien, 63

2-Hidroksi-isovalerië-2-hidroksi-3-metielvaleriaansuur, 126, 128

2-Hidroksi-isovalerië-2-hidroksi-isokaproësuur, 126 - 128

2-Hidroksi-isovalerië-2-hidroksi-isovaleriaansuur, 126 - 127

2-Hidroksi-isovalerië-KoA, 69

N-2-Hidroksi-isovaleriëlalanien, 70

- N*-2-Hidroksi-isovalerielglisien, 70, 72
- Hidroksi-isovaleriel-11-hidrotiochroom, 104 - 105, 107, 140
- N*-2-Hidroksi-isovalerielisoleusien, 59 - 62, 148, 150
- 2-Hidroksi-isovalerielkarnitien, 146
- N*-2-Hidroksi-isovaleriellesien, 59 - 62, 148, 150
- Hidroksi-isovalerielthiamien, 100
- N*-2-Hidroksi-isovalerielvalien, 59 - 60, 62, 65, 148, 150
- Vertakteketting-2-ketosure**, 9, 11 - 12, 14, 17, 24 - 25, 29, 31, 43 - 44, 55, 87 - 88, 115, 120, 137, 148, 150
- 2-Keto-3-metielvaleriaansuur, 9, 11 - 12, 14, 17, 24 - 25, 29, 31, 43 - 44, 55, 87 - 88, 115, 120, 137, 148, 150
- 2-Keto-3-metielvaleriaansuur, 9, 11 - 12, 14, 17, 29, 31, 43 - 44, 55, 87 - 88, 115, 119, 137, 148, 150
- 2-Keto-isovaleriaansuur, 9, 11 - 12, 17, 23 - 24, 29, 31, 43 - 44, 55, 87 - 88, 114, 118, 121, 137, 142
- Vertakteketting-2-ketosuur dehydrogenase-kompleks**, 3 - 4, 6, 12, 16 - 21, 27, 98 - 99, 109
- Vertakteketting-2-ketosuur dekarboksilase**, 29, 98
- Vertakteketting-aldehyd**, 97
- Vertakteketting-amiene**, 43, 82 - 83, 138
- Isoamielamien, 43, 82 - 83, 86, 138
- Isobutielamien, 43, 82 - 84, 86, 138
- 2-Metielbutielamien, 43, 82, 138
- 2-Metielpropielamien, 83, 86
- Vertakteketting-aminosure**, 2, 9 - 16, 20 - 25, 29 - 30, 38, 43, 49 - 50, 54 - 55, 59, 62, 65 - 68, 74 - 77, 81 - 84, 99, 109, 114 - 115, 121, 136 - 137, 142
- Allo*-isoleusien, 23 - 24, 38, 75, 78, 131
- Isoleusien, 2, 9 - 12, 14 - 16, 20, 23 - 25, 29 - 30, 38, 43, 49 - 50, 54 - 55, 59, 62, 65 - 68, 74 - 77, 81 - 84, 99, 109, 115, 121, 136
- Leusien, 2, 9 - 16, 20 - 25, 29 - 30, 38, 43, 49 - 50, 54 - 55, 59, 62, 65 - 68, 74 - 77, 81 - 84, 99, 109, 114 - 115, 121, 136 - 137, 142
- Valien, 12 - 13, 40, 49 - 50, 56, 62, 65 - 66, 74, 81, 84, 99, 109, 121, 142
- β-Vertakteketting-vetsure**, 143
- Vetsure**, 133, 143

Vetsuurmetaboliete, 133

Vitamiën-B₆, 55, 138

Vitamiënpreparaat, 56

Vloeistofchromatografie-elektrosproei tandemmassaspektrometer, 34 - 35, 38, 82

Botsinggeïnduseerde fragmentspektrum, 83

CID-spektrum *sien botsinggeïnduseerde fragmentspektrum*

Elektrosproei, 34 - 35, 38

Elektrosproei-massaspektroskopie, 34

ES-MS-MS *sien Vloeistofchromatografie-elektrosproei*

tandemmassaspektrometer

LC-ES-MS-MS *sien vloeistofchromatografie-elektrosproei*

tandemmassaspektrometer

Selektiewe ionfase, 82

- W -

Wernicke-Korsakoffsindroom, 141

- X -

Xantireniensuur, 55