

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein

**X-Inaktivierung bei heterozygoten Patientinnen
bezüglich X-chromosomal vererbtem Morbus Fabry**

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

vorgelegt von
Stephanie Barbara Schatz geb. Osterrieder
aus Bad Reichenhall

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Ania C. Muntau

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Elke Holinski-Feder
Prof. Dr. Uwe Wintergerst

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. E. M. Maier

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2012

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN		iii
1. EINLEITUNG		
1.1. Morbus Fabry		1
1.1.1 Definition und Häufigkeit		1
1.1.2 Vererbung und genetische Charakteristika		1
1.1.3 Pathogenese		2
1.1.4 Klassische und atypische Krankheitsverläufe bei männlichen Patienten		3
1.1.5 Klinisches Erscheinungsbild des Morbus Fabry bei Frauen		6
1.1.6 Diagnostik		7
1.1.7 Therapie		9
1.2. X-Inaktivierung		13
1.2.1 Grundlagen		13
1.2.2 Charakteristika des inaktivierten X-Chromosoms		14
1.2.3 Gene, die der X-Inaktivierung nicht unterliegen		15
1.2.4 <i>Random</i> X-Inaktivierung und Verschiebung der X-Inaktivierung		16
1.2.5 Methoden zur Untersuchung von X-Inaktivierungsmustern und ihre Bedeutung in der Diagnostik		18
1.2.6 X-Inaktivierung bei heterozygoten Mutationsträgerinnen von Morbus Fabry		20
1.3. Zielsetzung der Arbeit		21
2. MATERIAL UND METHODEN		22
2.1 Extraktion genomischer DNA aus Vollblut		22
2.1.1 Puffer-Lösungen		22
2.1.2 Durchführung		23
2.2 Untersuchung der X-Inaktivierung		24
2.2.1 Prinzip des HUMARA-Assays		24
2.2.2 Durchführung des HUMARA-Assays		26
2.2.2.1 Restriktionsverdau genomischer DNA		26
2.2.2.2 Amplifikation des polymorphen CAG-Repeats im Androgenrezeptor		27
2.2.2.3 Fragmentanalyse		28
2.2.2.4 Berechnung des X-Inaktivierungsverhältnisses		28
2.3 Standard-Labormethoden		29
2.4 Untersuchung der Krankheitsmanifestation bei Fabry-Patientinnen		32
2.4.1 Klinische Charakterisierung der Fabry-Patientinnen mittels MSSI		32
2.4.2 Biochemische Evaluation		32
2.5 Statistische Methoden		35
2.6 Patienten- und Kontrollkollektiv		35

3.	ERGEBNISSE	37
3.1	Untersuchung der X-Inaktivierung bei Fabry-Patientinnen und Kontrollen	37
3.2	Korrelation der X-Inaktivierung mit der klinischen Manifestation bei Fabry-Patientinnen	40
3.3	Korrelation der X-Inaktivierung mit der α-Galaktosidase A-Enzymaktivität	41
3.4	Korrelation klinischer Manifestationen mit der α-Galaktosidase A-Aktivität	42
3.5	Korrelation von klinischer Manifestation und X-Inaktivierung mit dem Alter	42
3.6	Aktivitätszustand des mutierten Fabry-Allels bei Frauen mit Verschiebung der X-Inaktivierung	44
3.7	Mutationen der Patientinnen	46
4.	DISKUSSION	47
5.	ZUSAMMENFASSUNG	59
	LITERATURVERZEICHNIS	61
	DANKSAGUNG	72
	LEBENS LAUF	73
	PUBLIKATIONEN	74

ABKÜRZUNGEN**A**

A	Adenin
ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzym Hemmer
AR	Androgen-Rezeptor

B

Bp	Basenpaare
----	------------

C

C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CpG-Inseln	Cytosin-Phosphat-Guanosin-Inseln

D

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat

E

EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm

F

FAD	<i>Fabry-Anderson Disease</i>
FAM	5-carboxy-fluorescein
FOS	<i>Fabry Outcome Survey</i>
FMRP	<i>Fragile X Mental Retardation Protein</i>

G

G	Guanin
Gb ₃	Globotriaosylceramid
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLA	Galaktosidase A

H

HCl	Salzsäure
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HUMARA	<i>Human Androgen Receptor Gene-Assay</i>

K

Kb	Kilobasen
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat

L

LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LVM	linksventrikuläre Masse
LINE	<i>Long Interspersed Element</i>

M	
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MI	Myokardinfarkt
MRT	Magnetresonanztomographie
MSSI	<i>Mainz Severity Score Index</i>
N	
NaCl	Natriumchlorid
Na-EDTA	Natrium – Ethylendiaminotetraacetat
Na-OH	Natronlauge
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
Nm	Nanometer
P	
PAR	Pseudoautosomale Region
PCR	Polymerasekettenreaktion
R	
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	6-carboxy-X-rhodamin
RT-PCR	Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion
S	
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	
T	Thymin
TE	Tris-EDTA
TIA	Transitorische ischämische Attacke
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tsix	Antisense RNA zu <i>Xist</i>
V	
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeat</i>
W	
WAS	Wiskott-Aldrich-Syndrom
X	
X-ALD	X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie
XIC	X-Inaktivierungszentrum
<i>Xist</i>	<i>X inactivation specific transcript</i>
Xp	kurzer Arm des X-Chromosoms
Z	
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Morbus Fabry

1.1.1 Definition und Häufigkeit

Morbus Fabry (OMIM 301500) ist eine X-chromosomal vererbte Erkrankung, die auf einem Defekt des lysosomalen Enzyms α -Galaktosidase A beruht und zu einer Störung im Glykosphingolipid-Katabolismus führt. Der Enzymdefekt bewirkt eine progressive systemische Akkumulation von neutralen Glykosphingolipiden in Lysosomen und Körperflüssigkeiten. Durch zunehmende endotheliale Ablagerung dieser Stoffe kommt es durch Ischämie- und Infarktereignisse zu den klinischen Hauptmanifestationen der Erkrankung in Herz, Niere und ZNS.

Während frühere Schätzungen zur Häufigkeit der Erkrankung von einer Inzidenz von 1:40.000 bei männlichen Neugeborenen ausgingen, zeigte eine Screeninguntersuchung männlicher Neugeborener in Italien eine weitaus höhere Inzidenz von 1:3.100 (Spada et al. 2006). Screeninguntersuchungen in Risikokollektiven bei Patienten mit Gefäßerkrankungen wie Kardiomyopathie, dialysepflichtiger Niereninsuffizienz und Schlaganfall deckten zahlreiche bisher undiagnostizierte Fälle von Morbus Fabry auf (Sachdev et al. 2002; Kotanko et al. 2004; Rolfs et al. 2005; Spada et al. 2006; Brouns et al. 2010; Gaspar et al. 2010). Morbus Fabry tritt bei Patienten aus verschiedensten ethnischen Gruppen auf.

1.1.2 Vererbung und genetische Charakteristika

Morbus Fabry wird X-chromosomal vererbt (Opitz et al. 1965). Das α -Galaktosidase A-Gen (*GLA*-Gen), lokalisiert in der Region Xq22.1, ist ein 12-kb langes Gen mit sieben Exons (Bishop et al. 1988). Basierend auf der Datenbank *Human Gene Mutation Database* des Instituts für Medizinische Genetik in Cardiff (HGMD[®]-Datenbank, www.hgmd.cf.ac.uk) wurden bisher mehr als 500 Mutationen, die Morbus Fabry verursachen, identifiziert. Es fanden sich verschiedene Mutationsarten, überwiegend jedoch Missense- und Nonsensemutationen (siehe Tabelle 1). Beinahe jede betroffene Familie trägt ihre eigene Mutation. Mutationen, die in mehreren Familien auftraten, fanden sich meist in *hot spots* im Bereich von CpG Dinukleotiden (Eng et al. 1993; Eng et al. 1994).

Mutationsart	Anzahl der Mutationen
Missense / Nonsense	352 (68,7 %)
Splicing-Mutationen	28 (5,4 %)
Kleine Deletionen	74 (14,4 %)
Kleine Insertionen	29 (5,6 %)
Kombination von Insertionen und Deletionen	8 (1,6 %)
Große Deletionen	16 (3,1 %)
Große Insertionen	1 (0,2 %)
Regulatorische Mutationen	1 (0,2 %)
Komplexe Rearrangements	3 (0,6 %)
<i>Insgesamt publiziert</i>	<i>512</i>

Tabelle 1: Mutationen des α -Galaktosidase A-Gens (www.hgmd.cf.ac.uk), Stand: 28.02.2012

1.1.3 Pathogenese

Glykosphingolipide sind weit verbreitete Bestandteile von Zellmembranen und intrazellulären Membranen verschiedener Kompartimente. Die fehlende Aktivität der lysosomalen α -Galaktosidase A führt zur fortschreitenden Akkumulation von neutralen Glykosphingolipiden in Körperflüssigkeiten und vielen Geweben (Desnick 2001). In Lysosomen und später frei im Zytoplasma wird bei Morbus Fabry vor allem Globotriaosylceramid (Gb₃) angereichert, das identisch mit dem seltenen Blutgruppenantigen p^k auf menschlichen Erythrozyten ist. Die Ablagerung der Glykosphingolipide in den Geweben führt letztlich zu einer Funktionsstörung der einzelnen Organe und damit zu Morbus Fabry als Multisystemerkrankung.

Es wird vermutet, dass die abgelagerten Substrate zum einen aus der Endozytose oder Diffusion dieser Stoffe aus der Zirkulation, zum anderen aber auch aus der endogenen Synthese der Zellen stammen. Einzigartig im Vergleich zu anderen Glykosphingolipidosen ist bei Morbus Fabry die Verteilung der Lipidablagerungen mit einer Bevorzugung von Endothel- und glatten Muskelzellen. Eine Folge dieser Ablagerung ist eine zelluläre Dysfunktion oder Degeneration. Vaskuläre Endothelzellen schwellen an und schränken das Lumen der Gefäße ein. Fokal steigt der intraluminale Druck an und führt sekundär zu Dilatation, Angiektasien, peripherer Ischämie und Infarkten in verschiedenen Geweben. Besonders stark betroffene Organe bei Morbus Fabry sind die Nieren und das Herz. Die beobachtete Nierenfunktionsstörung wird anfangs vor allem durch eine Läsion des Nephrons verursacht, im weiteren Verlauf der Erkrankung spielen dann hauptsächlich vaskuläre Läsionen und der systemische Hochdruck eine Rolle. Die kontinuierliche Ablagerung der Glykosphingolipide in Myokardzellen, valvulären Fibroblasten und Koronararterien ist die Ursache für eine Beteiligung des Herzens. Sowohl große Hirnarterien wie auch kleine Gefäße können bei ischämischen Insulten bei Morbus Fabry betroffen sein.

1.1.4 Klassische und atypische Krankheitsverläufe bei männlichen Patienten

Klinische Symptome treten meist erstmals im Kindes- und Jugendalter auf (Mehta et al. 2004). Im Allgemeinen schreitet die Erkrankung während des gesamten Lebens langsam fort, das Spektrum der Symptomatik ist abhängig vom Lebensalter (Desnick 2001).

Die klinischen Leitsymptome des Morbus Fabry sind Schmerzen, Angiokeratome sowie eine Cornea verticillata. Erste Anzeichen sind häufig Schmerzen (Burlina et al. 2011). Diese können sich zum einen äußern als episodische Schmerz-Krisen, getriggert durch Faktoren wie Fieber, körperliche Anstrengung, emotionalen Stress oder Temperaturwechsel. Zum anderen manifestieren sich die Beschwerden auch als chronischer Schmerz, empfunden als brennende Missempfindung der Extremitäten. Zusätzlich kann eine Anhidrose oder häufiger eine Hypohidrose auftreten, die zu Hitzeunverträglichkeit führt. Ein weiteres, häufig zur Diagnosestellung führendes typisches Merkmal sind Angiokeratome (Orteu et al. 2007), kleinfleckige, erhabene, dunkelrote Effloreszenzen (Abbildung 1). Diese befinden sich vornehmlich auf den Oberschenkeln, den Gesäßbacken, im unteren Abdominalbereich und in der Genitalregion. Bei sorgfältiger Untersuchung der Haut können sie zumindest als isolierte Veränderungen nahezu immer beobachtet werden. Okuläre Beteiligungen bei Morbus Fabry umfassen die relativ frühzeitig auftretende Cornea verticillata (Sodi et al. 2007), eine cremefarbene spiralige Hornhauttrübung, hervorgerufen durch Einlagerung von Glykosphingolipiden in den basalen Epithelzellen (Abbildung 2). Seltener treten subkapsuläre Katarakte der Vorder- und Rückseite der Linse auf. Das Auftreten einer Cornea verticillata ist zwar charakteristisch für den Morbus Fabry, jedoch nicht beweisend. Auch Medikamente wie Chloroquin oder Amiodaron können ähnliche Veränderungen der Cornea bewirken (Seiler et al. 1977; Chew et al. 1982).



Abbildung 1: Typische, meist in Gruppen auftretende Angiokeratome der Haut bei einem Patienten mit Morbus Fabry: (a) Gesäßbacken und Oberschenkel (typische „Badehosen“-Verteilung) (b) Nabelbereich. (c) Lippenrot (d) Handinnenflächen. Nach Beck (Beck 2007).

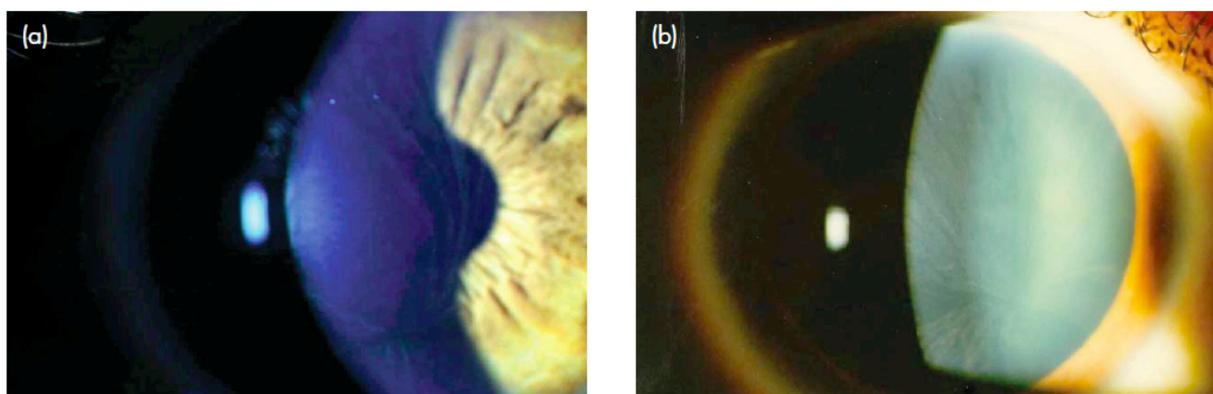


Abbildung 2: Cornea verticillata: In der Spaltlampenuntersuchung wird die spiralförmige cremefarbene Trübung der Cornea sichtbar, (a) bei eng gestellter Pupille (b) nach Anwendung eines Mydriatikums. Nach Beck (Beck 2007).

Mit zunehmendem Alter resultiert die mit der Erkrankung assoziierte Morbidität aus der progressiven Glykosphingolipid-Deposition im kardiovaskulären und renalen System. Alle Strukturen des Herzens können bei Morbus Fabry betroffen sein. So kann es zu verschiedensten Reizleitungsstörungen, linksventrikulärer Hypertrophie, Angina pectoris, Myokardinfarkten oder dekompensierter Herzinsuffizienz kommen (Weidemann et al. 2008). Zu den von der Erkrankung besonders schwer betroffenen Organen zählen die Nieren. Diese

können bereits während der Kindheit eine Schädigung aufweisen (Ramaswami et al. 2010). Mit zunehmendem Alter treten Proteinurie, Isostenurie und Störungen der tubulären Funktion bis hin zu terminaler Niereninsuffizienz auf (Breunig et al. 2008). Zerebrovaskuläre Läsionen durch einen multifokalen Befall kleiner Blutgefäße des Gehirns können sich bei Fabry-Patienten in Form von TIA und ischämischen Insulten sowie psychiatrischen Auffälligkeiten äußern (Schiffmann et al. 2006). Des Weiteren können die Patienten Störungen des Gastrointestinaltrakts mit unspezifischen Symptomen wie Diarrhö, Übelkeit oder Erbrechen zeigen (Hoffmann et al. 2007). Auch Erkrankungen des Respirationstrakts mit obstruktiven Atemwegsbeschwerden (Magage et al. 2007) und eine Beteiligung des muskuloskelettalen Systems kommen vor. Mit zunehmendem Lebensalter kommt es zu einer Progression der Erkrankung (Tabelle 2).

Alter	Symptome
Kindheit	Schmerz und Akroparästhesien Angiokeratome Oberlid-Ödeme Periphere Gefäßspasmen Ophthalmologische Anomalien
Frühes Erwachsenenalter	Ausgedehnte Angiokeratome Proteinurie, Lipidurie, Hämaturie Ödeme Fieber, Hitzekollaps, Anhidrose Lymphadenopathie Isothermie Abdominalschmerz
30–40 Jahre	Herzerkrankungen Linksventrikuläre Hypertrophie Herzklappendysfunktionen Rhythmusstörungen Koronare Gefäßerkrankung Niereninsuffizienz Zerebrovaskuläre Insulte Neurologische Symptome

Tabelle 2: Fortschreiten der Symptomatik von Morbus Fabry. Nach Beck (Beck 2002).

Verschiedene atypische Krankheitsverläufe bei männlichen Fabry-Patienten wurden berichtet. Diese Patienten zeigten häufig meist nur milde Symptome unter Beteiligung nur eines Organsystems in einem Alter, in dem Patienten mit klassischer Fabry-Erkrankung in der Regel schwer betroffen sind. Eine zufällige Diagnosestellung erfolgte z.B. im Rahmen von Familienuntersuchungen, bei anderen wurde erst nach langjährigem asymptomatischen Verlauf mit dem Auftreten kardiovaskulärer Symptome die Diagnose gestellt. Diese Form des

Morbus Fabry wurde als „kardiale Variante“ der Erkrankung klassifiziert (Romeo et al. 1975; Bach et al. 1982; Elleder et al. 1990; Ogawa et al. 1990; Nagao et al. 1991; von Scheidt et al. 1991; Nakao et al. 1995). Bei diesen Patienten fand sich im Gegensatz zu Patienten mit den klassischen Verlaufsformen in der Regel eine nachweisbare Restaktivität der α -Galaktosidase A, ebenso wie bei anderen Patienten, die vorwiegend renale Krankheitsmanifestationen (Nakao et al. 2003; Rosenthal et al. 2004) oder Akroparästhesien (Kobayashi et al. 1985) zeigten.

1.1.5 Klinisches Erscheinungsbild des Morbus Fabry bei Frauen

Heterozygote Frauen galten lange Zeit als reine „Überträgerinnen“, die selbst keine oder nur sehr milde Krankheitsmanifestationen wie korneale Trübungen aufweisen. Schwere Manifestationen mit Beteiligung von Herz, ZNS oder Niere galten als sehr selten (Desnick 2001). In letzter Zeit wurde die Morbidität bei weiblichen Patientinnen in verschiedenen Studien näher untersucht, wobei Häufigkeit und Schwere der Symptome deutlich ausgeprägter waren als zuvor angenommen. Fragebogen-Erhebungen bei australischen und britischen Patientinnen zeigten, dass Frauen tatsächlich an Morbus Fabry erkranken und eine schwere Organbeteiligung zeigen können (MacDermot et al. 2001; Galanos et al. 2002). In verschiedenen Studien zeigte sich bei weiblichen, bisher als asymptomatisch betrachteten Mutationsträgerinnen das Ausmaß der Beteiligung des gesamten Organismus - von Schmerzkrisen bis zur Beteiligung lebenswichtiger Organe (Tabelle 3). In einem Kollektiv weiblicher Fabry-Patientinnen wurde eine Beteiligung mindestens eines Organsystems bei allen Frauen gefunden. Schwere Schmerzkrisen traten bei 90% der Frauen als erstes und häufigstes Symptom auf. Eine reduzierte GFR als Ausdruck einer renalen Schädigung und eine Kardiomyopathie zeigten 55% (Whybra et al. 2001). Lediglich 23,6% der von Kampmann und Kollegen untersuchten Mutationsträgerinnen zeigten keine echokardiographisch feststellbare Schädigung des Herzens. Mit steigendem Alter der Frauen wurde eine Zunahme der linksventrikulären Masse (LVM) mit daraus resultierender Abnahme der Pumpfunktion des Herzens beobachtet, so dass letztlich alle Patientinnen mit einem Alter von über 45 Jahren eine linksventrikuläre Hypertrophie aufwiesen (Kampmann et al. 2002). Klinische Daten zu einer großen Anzahl von Fabry-Patientinnen sind seit der Einrichtung von Patienten-Registern verfügbar. 2001 wurde die sogenannte Fabry Outcome Survey (FOS), eine klinische Ergebnisdatenbank, initiiert. In dieses Register werden seitdem an Morbus Fabry erkrankte Patienten (Männer, Frauen und Kinder) eingeschlossen, mit dem Ziel, den wissenschaftlichen Kenntnisstand zu Morbus Fabry zu erweitern und die Versorgung der

Patienten, die an dieser Erkrankung leiden, zu verbessern. Erste Ergebnisse aus diesem Register wurden 2004 veröffentlicht. 79% der registrierten Frauen haben neurologische, 50% dermatologische, 50% renale und 65% kardiologische Symptome. Die Häufigkeit zerebrovaskulärer Ereignisse war mit 27% sogar höher als bei männlichen Patienten (12%) (Mehta et al. 2004). Aufgrund der Häufigkeit und Schwere von Symptomen und Krankheitsmanifestationen können heterozygote Fabry-Mutationsträgerinnen nicht länger als asymptomatische Überträgerinnen betrachtet werden, sondern müssen als Patientinnen gelten. Frauen können das volle Ausmaß der Manifestationen zeigen, wenn auch die Symptome variabler als bei Männern sind, und die Krankheit bei ihnen in der Regel langsamer fortschreitet (Mehta et al. 2004). Daten des sogenannten Fabry Registry, eines weiteren internationalen klinischen Beobachtungsregisters zum natürlichen Verlauf von Morbus Fabry, initialisiert wie die FOS im Jahr 2001, zeigen, dass die Lebenserwartung von an Morbus Fabry erkrankten Frauen um 5 Jahre im Vergleich zur Normalbevölkerung reduziert ist (Waldek et al. 2009).

	Inzidenz (%)		
	Kobayashi <i>et al.</i> (2008) (n=36)	MacDermot <i>et al.</i> (2001) (n=60)	Deegan <i>et al.</i> (2006) (n=303)
Akroparästhesien	50.0	70.0	77
Hypohydrose	16.7	32.8	nicht untersucht
Angiokeratome	5.6	35.0	40
Korneale Trübungen	50.0	nicht untersucht	50
Proteinurie	38.9	35.0	35
Nierenversagen	5.6	3.3	1
Linksventrikuläre Hypertrophie	38.9	19.0	26
Zerebrale Infarkte	8.3	6.7	7
Insgesamt	86.1	keine Angabe	keine Angabe

Tabelle 3: Inzidenz von erkrankungsspezifischen Symptomen bei heterozygoten Fabry-Patientinnen (Kobayashi et al. 2008).

1.1.6 Diagnostik

Wesentliche Hinweise auf das Vorliegen der Erkrankung liefern die Anamnese des Patienten (insbesondere Schmerzkrisen), die Familienanamnese, die Beobachtung der charakteristischen Hautläsionen sowie die korneale Dystrophie. Die Diagnosestellung wird erschwert durch die Vielzahl möglicher betroffener Organe und die geringe Spezifität der einzelnen Symptome, wie z.B. Schmerzen und gastrointestinale Beschwerden.

Die Diagnosestellung erfolgt bei männlichen Patienten durch den biochemischen Nachweis des α -Galaktosidase A-Mangels in Plasma, Serum, Leukozyten, Tränenflüssigkeit, Gewebeproben oder kultivierten Haut-Fibroblasten (Beutler et al. 1972; Desnick et al. 1973; Johnson et al. 1975; Mayes et al. 1981). Diagnostischer „Gold-Standard“ ist dabei die Bestimmung der α -Galaktosidase A-Aktivität in Leukozyten (Gal et al. 2011). Der klassische Phänotyp geht ohne Enzymrestaktivität einher (Mayes et al. 1981), sogenannte „atypische Varianten“ können eine Restaktivität aufweisen.

Bei heterozygoten Fabry-Patientinnen kann die α -Galaktosidase A-Aktivität zwischen nicht nachweisbaren und normalen Werten liegen, so dass hier die biochemischen Untersuchungen zur zuverlässigen Diagnosestellung nicht geeignet sind. Molekulargenetische Verfahren ermöglichen heute eine sichere Diagnosestellung, wie z.B. die Mutationsanalyse des *GLA*-Gens (Desnick et al. 1987) oder Kopplungsanalysen mit X-chromosomalen Markern (Caggana et al. 1997; Ashton-Prolla et al. 1999) und sind unabdingbar bei Fragestellungen im Rahmen der genetischen Beratung von Familienmitgliedern.

In den vergangenen Jahren geraten zunehmend auch die akkumulierenden Substrate vor dem defekten Enzym in den Fokus der Diagnostik. Gb₃, deacetyliertes Gb₃ (lysoGb₃) und dessen Isoformen akkumulieren als Substrate der α -Galaktosidase A bei einem Mangel des Enzyms. So kann die Gb₃ Konzentration im Plasma oder Urin bestimmt werden, die neben der diagnostischen Funktion auch im Rahmen des therapeutischen Monitorings, z.B. bei der Enzyersatztherapie Anwendung findet (Fuller et al. 2005). Eine erhöhte Konzentration von Gb₃ im 24 Stunden-Sammelurin kann insbesondere bei Frauen auch zur Diagnosestellung beitragen. Bisherige Studien zeigten erhöhte Werte bei allen Frauen (Cable et al. 1982; Gupta et al. 2005). Bei Verwendung von Spontanurinproben kann es jedoch in etwa 40% der Fälle zu falsch negativen Ergebnissen kommen (Schiffmann 2009). Bei der Verdachtsdiagnose eines Morbus Fabry bei Frauen kann auch bei Vorliegen von Genveränderungen mit unklarer funktioneller oder pathologischer Bedeutung eine Bestimmung von Gb₃-Metaboliten und Isoformen sinnvoll sein, ebenso wenn kein männlicher Indexpatient zur Mutationsanalyse vorliegt (Gal et al. 2011).

Zusätzlich wurden auch Methoden zur Bestimmung der α -Galaktosidase A-Aktivität aus getrockneten Blutproben aus Filterpapierkarten entwickelt (Fuller et al. 2004; Poepl et al. 2005). Diese Verfahren können auch beim Neugeborenenenscreening eingesetzt werden (Spada et al. 2006; Lin et al. 2009) und stellen somit eine vielversprechende Methode dar. Eine frühzeitige Diagnosestellung im Rahmen des erweiterten Neugeborenenenscreenings würde eine Therapie der Erkrankung vor dem Auftreten schwerwiegender Organschäden ermöglichen.

1.1.7 Therapie

Lange Zeit war die Prognose des Morbus Fabry infaust, eine Therapie war nur symptomatisch möglich. Die agonisierenden Schmerzen waren, abgesehen von zentral wirksamen Opioiden, wie Morphin, kaum mit konventionellen Analgetika beherrschbar. Membranstabilisatoren wie Carbamazepin, Diphenylhydantoin und Gabapentin bringen Linderung, ebenso das Antidepressivum Amitryptilin bei Fabry-Krisen. Angiokeratome werden durch Argon-Laser-Behandlung entfernt. Renale Funktionsstörungen wie die Proteinurie werden antihypertensiv mit ACE-Hemmern therapiert. Eine terminale Niereninsuffizienz als späte Komplikation bedingt gegebenenfalls die Hämodialyse und/oder die Nierentransplantation. Die Therapie kardialer, pulmonaler, gastrointestinaler und zentralnervöser Manifestationen war ebenfalls lange Zeit unspezifisch und rein symptomatisch (Desnick RJ 2001).

Die Entwicklung der Enzymersatztherapie stellt einen Meilenstein der Behandlung dar, da nun eine kausale Therapie und nicht mehr ausschließlich palliative Maßnahmen zur Verfügung standen. Neben in-vitro Experimenten (Dawson et al. 1973; Mayes et al. 1982) wiesen in den 1970er und 1980er Jahren erstmals verschiedene Versuche an wenigen Patienten, denen aus humaner Plazenta, Niere oder Plasma isolierte und aufgereinigte Formen der α -Galaktosidase A verabreicht wurden, bereits auf diese potentiell hocheffektive Therapie hin (Brady et al. 1973; Desnick et al. 1979; Desnick et al. 1980). Ein großes Problem war ursprünglich die Produktion ausreichender Mengen an Enzym, das für medizinische Zwecke gereinigt und aufbereitet werden musste. Dies gelingt mittlerweile mit Hilfe von gentechnisch veränderten humanen Fibroblasten (Agalsidase alfa, Replagal[®], Shire) und Chinesischen Hamster-Ovarzellen (Agalsidase beta, Fabrazyme[®], Genzyme). Für beide Präparationen konnten in klinischen Studien Anwendbarkeit, Effizienz und Sicherheit der Behandlung belegt werden (Eng et al. 2001; Schiffmann et al. 2001). 2001 wurde in Europa die Enzymersatztherapie zugelassen. Die Jahrestherapiekosten belaufen sich bei beiden Präparaten pro Patient auf ca. 250.000 Euro, die Kosten werden, da es die einzige kausale Therapieform ist, von den Krankenkassen übernommen. Diese Therapie stellt eine entscheidende prognostische Verbesserung für die Patienten dar. Diverse klinische Studien zeigten eine Reduktion der Lipidablagerungen in verschiedenen Organen und Geweben (Eng et al. 2001; Germain et al. 2007; Hughes et al. 2008). Beide Enzympräparationen reduzieren neuropathische Schmerzen (Eng et al. 2001; Schiffmann et al. 2001). Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) als Ausdruck der Nierenfunktion bleibt unter Enzymersatztherapie stabil (Wilcox et al. 2004; Banikazemi et al. 2007; Germain et al. 2007), eine randomisiert kontrollierte Studie zeigte sogar eine Verbesserung der Kreatininclearance (Schiffmann et al.

2001). Unter Therapie kommt es zu einer Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie, einer Verbesserung der regionalen Myokardfunktion und gesteigerter kardiorespiratorischer Belastbarkeit (Weidemann et al. 2009). Die Enzyersatztherapie bei Patienten mit langjähriger Fabry-Erkrankung kann das Fortschreiten der Erkrankung in Bezug auf renale, kardiale oder zerebrovaskuläre Ereignisse, die bei Morbus Fabry auftreten, verlangsamen (Banikazemi et al. 2007). Auch Studien zur Enzyersatztherapie bei Frauen und Kindern wurden durchgeführt und zeigten, dass auch diese Patientengruppen von der neuen Therapieform stark profitieren (Pintos-Morell et al. 2009; Whybra et al. 2009). Leitlinien und Ziele der Evaluation und Behandlung der Multi-Systembeteiligung bei Morbus Fabry wurden mittlerweile veröffentlicht (Eng et al. 2006; Mehta et al. 2010).

Tabelle 4 fasst die Ergebnisse verschiedener randomisierter klinischer Studien zur Enzyersatztherapie bei Morbus Fabry zusammen (Rohrbach et al. 2007).

Tabelle 4: Zusammenfassung randomisierter klinischer Studien zur Enzyersatztherapie bei Morbus Fabry

Studie (Jahr)	Studiendesign	Patienten (Anzahl)	Dauer (Wochen)	Endpunkt	Ergebnis
(Scheiffmann et al. 2001)	Randomisierte, doppelblinde, placebo-kontrollierte, single-center Studie mit Agalsidase- α^c	26	24	Veränderungen von Inulin und Kreatinin-Clearance, Veränderungen von Plasma Gb ₃ -Level, Veränderungen des NPS Scores, Veränderungen von PRQOL	Signifikante Abnahme der Plasma Gb ₃ -Level (p=0.005); verbesserte NPS Scores (p=0.05). Zunahme von Inulin und Kreatinin-Clearance statistisch nicht signifikant
(Eng et al. 2001)	Offene, single-center Dosisfindungsstudie mit Agalsidase- β	15	10	Veränderungen von Plasma Gb ₃ -Konzentration, prozentuale Reduktion von Gb ₃ -Konzentration in Leber, Herz und Niere	Dosis-abhängige Abnahme der Plasma Gb ₃ -Level; Abnahme der Gb ₃ -Konzentration in der Leber (84%), deutliche Abnahme in der Niere, moderate im Herzen
(Eng et al. 2001)	Randomisierte, doppelblinde, placebo-kontrollierte multizentrische Studie mit Agalsidase- β	58	20	Veränderungen in Plasma Gb ₃ -Level, Veränderungen der intrazellulären lysosomalen GSL-Einschlüsse in kapillären Endothelzellen	Signifikante Abnahme von Gb ₃ -Konzentrationen (p<0.001), 20 von 29 Patienten aus der behandelten Gruppe hatten keine mikrovaskulären Endothelablagerungen von Gb ₃ vs. 0 von 29 der Placebo-Gruppe (p<0.001)
(Thurberg et al. 2004)	Offene, multizentrische Erweiterung der Studie von Eng et al. zu Agalsidase- β	58	52	Veränderungen der Glycosphingolipidverteilung in der Niere	Komplette Entfernung der Glycolipide aus dem Endothel aller Gefäße sowie aus den Mesangiumzellen des Glomerulus (p<0.001); Veränderung in den Zellen des Cortex statistisch nicht signifikant (p=0.284)
(Wilcox et al. 2004)	Offene, multizentrische Erweiterung der Studie von Eng et al. zu Agalsidase- β	58	128	Veränderungen in Plasma-Gb ₃ Konzentrationen, Veränderungen in den intrazellulären Gb ₃ -Einschlüssen in kapillären Endothelzellen	Plasma Gb ₃ Konzentrationen verringert zu normalen Werten bei 94% der Patienten; anhaltende Gb ₃ Entfernung aus dem kapillären Endothel bei 98%
(Banikazemi et al. 2007)	Randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Multicenter-Studie (2:1 Präparat vs. Placebo) zur Behandlung mit Agalsidase- β^b bei Patienten mit gestörter Nierenfunktion	82	148	Signifikante klinische Ereignisse: Abnahme der Nierenfunktion, zerebrovaskuläre Ereignisse (TIA oder Insult), kardiale Ereignisse (MI, Angina pectoris oder Arrhythmie) oder Tod	Klinisches Ereignis bei 27% der Patienten vs. 42% in der Placebo-Gruppe; Behandlung verzögerte die Zeit zum ersten Ereignis in der Studiengruppe

a Humane agalsidase hergestellt in menschlichen Zellen

b Rekombinante humane Agalsidase produziert in Zellkulturen aus Chinesischen Hamster Ovarialzellen

Gb₃ = Globotriaosylceramid; **GSL** = Glycosphingolipid; **MI** = Myokardinfarkt; **NPS** = Neuropathische Schmerz Stärke; **PRQOL** = Schmerzbezogene Lebensqualität; **TIA** = Transitorisch ischämische Attacke.

Die Entwicklung weiterer Therapiestrategien wie die Substrat-Depletion oder die Substrat-Deprivation befindet sich derzeit noch im experimentellen Stadium. Das zirkulierende Substrat wird dabei vor der Ablagerung durch chronische Plasmapherese entfernt (Moser et al. 1980), oder die Substratmenge durch eine Verminderung der Gb₃-Synthese durch Enzym-Inhibitoren reduziert (Abe et al. 2000; Abe et al. 2000). Bei Restaktivität der α -Galaktosidase A, z.B. bei instabilen fehlgefalteten Enzymvarianten, deren lysosomales Targeting gestört ist, scheint ein Einsatz von *active site-specific chemical chaperones* möglich, d.h. kleinen Molekülen, die im katalytischen Zentrum des Enzyms binden und die Konformation des mutierten Enzyms stabilisieren. Diese scheinen den Transport und die Maturation des mutierten Enzyms *in vitro* und am Mausmodell zu beschleunigen (Fan et al. 1999; Frustaci et al. 2001; Ishii et al. 2004; Yam et al. 2006). Das als *chaperone* wirkende oral verabreichte Medikament Migalastat-Hydrochlorid (AmigalTM, Amicus Therapeutics Inc.) wird aktuell in einer Phase-3-Studie getestet, Ergebnisse sind ab dem Jahr 2012 zu erwarten. Zudem wurde beim amerikanischen *National Institutes of Health* eine Studie zur Wirksamkeit und Sicherheit dieses Medikaments im Vergleich zur Enzymersatztherapie registriert. Seit Dezember 2010 können Fabry-Patienten in diese Studie eingeschlossen werden.

Neben den bisherigen Therapieansätzen könnte auch die Gentherapie eine Option in der Zukunft sein - wie Experimente an Fabry-Mäusen zeigen (Jung et al. 2001; Park et al. 2003; Ziegler et al. 2004; Yoshimitsu et al. 2006).

Zusammenfassend sind die Aussichten für eine effektive Therapie des Morbus Fabry viel versprechend. Die therapeutischen Optionen haben sich im Laufe der vergangenen Jahre dramatisch gebessert. Eine rasche Diagnosestellung erlangt mehr und mehr an Bedeutung, um möglichst frühzeitig mit der Behandlung beginnen zu können und damit Langzeitkomplikationen verhindern zu können.

1.2 X-Inaktivierung

1.2.1 Grundlagen

Männliche und weibliche Individuen unterscheiden sich genetisch durch ihre Geschlechtschromosomen, das X- und das Y-Chromosom. Während das Y-Chromosom normalerweise nur bei Männern vorhanden ist, findet sich das X-Chromosom bei Männern in einer und bei Frauen in zwei Kopien. X- und Y-Chromosom unterscheiden sich signifikant bezüglich ihres Gehalts an Genen: Während das menschliche X-Chromosom ca. 1100 Gene enthält, liegen auf dem Y-Chromosom lediglich ca. 100 Gene (Heard et al. 2006). Dieser Unterschied X-gebundener Gene erfordert eine Anpassung der Gen-Expression. In der Natur existieren hierfür verschiedene Wege. Einige Spezies hypertranskribieren das einzelne männliche X-Chromosom, andere reduzieren die Transkription jedes der beiden X-Chromosomen in weiblichen Individuen. Bei Säugetieren werden alle X-Chromosomen bis auf ein einziges in einer Zelle inaktiviert. Mary Lyon beschrieb 1961 dieses Phänomen der X-Inaktivierung erstmals. Die Lyon-Hypothese besagt, dass bei Frauen lediglich eines der beiden X-Chromosomen genetisch aktiv ist, während das andere noch in der frühen Embryonalentwicklung inaktiviert wird (Lyon 1961). Diese Inaktivierung geschieht im Stadium der Blastozyste nach dem Zufallsprinzip in jeder somatischen Zelle und ist irreversibel. Zytogenetisch ist das inaktivierte X-Chromosom in vielen Zellkernen als Barr-Körperchen sichtbar (Barr et al. 1962).

Die X-Inaktivierung ist ein komplexer mehrstufiger Prozess, der das X-Chromosom als ganzes betrifft, wobei folgende essentielle Hauptschritte unterschieden werden: 1) Erkennen der Anzahl der X-Chromosomen (*counting*), 2) Initialisierung des *silencing*, 3) Ausbreitung des *silencing*-Signals über das Chromosom und 4) Aufrechterhaltung des Inaktivierungszustandes während der Replikation. Eine genetische Schlüsselrolle im Inaktivierungsprozess spielt eine multifunktionale Domäne, das X-Inaktivierungszentrum (*XIC*), welches lokalisiert ist auf Xq13 (Brown et al. 1991). Im *XIC* liegt ein einzigartiges Gen, das *Xist*-Gen (*X-inactivation-specific-transcript*) welches zur *cis*-limitierten Inaktivierung fähig ist, d.h. es legt das Chromosom still, auf dem es liegt (Brown et al. 1991). Das RNA-Transkript des *Xist*-Gens, das nur vom inaktiven X-Chromosom transkribiert wird, scheint kein Protein zu kodieren, sondern wird im Zellkern assoziiert mit dem Barr-Körperchen gefunden (Brown et al. 1992; Clemson et al. 1996). Jedoch ist *Xist* nicht alleine für die Funktion des *XIC* verantwortlich. *Tsix*, ein Antisense *Xist*-Transkript, kodiert ebenso wie *Xist* kein Protein, scheint positiv die Auswahl des aktiven X-Chromosoms zu

beeinflussen, und bewirkt über eine negative Regulation von *Xist* die Auswahl des Chromosoms (Plath et al. 2002). Der X-Inaktivierungsprozess kann durch *Xist* nicht zu einer beliebigen Zeit induziert werden, sondern ist beschränkt auf ein spezifisches Zeitfenster in der Entwicklung der frühen Stammzeldifferenzierung. Eine alleinige *Xist* Expression reicht nicht aus, um die X-Inaktivierung zu verursachen. Diese benötigt einen geeigneten zellulären Kontext, in dem kritische epigenetische Regulatoren präsent sind und das Chromatin des X-Chromosoms empfänglich für die Inaktivierung ist. Eine Schlüsselrolle spielt dabei die Gruppe der sogenannten Polycomb-Proteine, eine Proteinfamilie, welche über Histonmodifikationen eine Chromatinveränderung (Methylierung, Ubiquitinierung) bewirkt (Payer et al. 2008).

Eine Hypothese zur Ausbreitung des Inaktivierungssignals über das Chromosom hinweg geht davon aus, dass spezielle Elemente des Genoms, sogenannte *Long Interspersed Elements* (LINEs), als Verstärker (*booster elements*) im Stilllegungsprozess fungieren (Lyon 2003), da das X-Chromosom sowohl bei Menschen als auch bei zahlreichen anderen Säugetierspezies eine Anreicherung dieser Elemente zeigt (Wichman et al. 1992; Bailey et al. 2000).

1.2.2 Charakteristika des inaktivierten X-Chromosoms

Wenn ein X-Chromosom inaktiviert ist, nimmt es eine Reihe außergewöhnlicher Eigenschaften an, welche es vom aktiven X-Chromosom unterscheiden. Die Replikation des inaktivierten X-Chromosoms findet spät in der Synthesephase des Zellzyklus statt (Taylor 1960), was über eine zeitliche Trennung der X-Chromosomen eine Verminderung der Exposition des inaktivierten X-Chromosoms gegenüber Transkriptionsfaktoren bewirken könnte. Während der Interphase ist das Heterochromatin des inaktiven X-Chromosoms stark kondensiert und als Barr-Körperchen darstellbar. Als Korrelat des genetisch supprimierten Status des inaktiven X-Chromosoms findet man Unterschiede zwischen aktivem und inaktivem X-Chromosom in den mit der DNA assoziierten Histonen. Das Chromatin des inaktiven X-Chromosoms befindet sich in Komplexen mit stark hypoacetylierten Histonmolekülen (H3 und H4) (Jeppesen et al. 1993; Boggs et al. 1996) oder in ihrem Methylierungsmuster veränderten Histonen. Zudem ist das inaktive X-Chromosom durch ein lediglich dort anzutreffendes Histon-Protein, benannt als macroH2A1, charakterisiert (Costanzi et al. 1998). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die unterschiedliche Methylierung von CpG-Inseln auf dem aktiven und dem inaktiven X-Chromosom. CpG-Inseln sind Regionen im Genom von etwa 1-2 Kb Länge, die reich an CG-Dinukleotiden sind. CpG-Inseln sind beteiligt an der Regulation der Expression der Gene und damit Elemente der

epigenetischen Genregulation. Viele menschliche Gene haben CpG-Inseln in ihrem Promotorbereich. Die CpG-Inseln der meisten X-gebundenen Gene sind auf dem inaktiven, aber nicht auf dem aktiven X-Chromosom stark methyliert (Ke et al. 2003). Die Methylierung der CpG-Insel eines Gens bedeutet somit, dass es nicht transkribiert werden kann. DNA-Methylierung und Histonhypoacetylierung sind Phänomene des inaktiven X-Chromosoms, die letztlich wahrscheinlich redundante Mechanismen der Modifikation des Chromatins und der Inaktivierung von Genen darstellen.

1.2.3 Gene, die der X-Inaktivierung nicht unterliegen

Die meisten Gene auf einem der beiden X-Chromosomen werden inaktiviert, aber einige entgehen der X-Inaktivierung und werden von beiden X-Chromosomen exprimiert. Carrel und Willard konnten in umfangreichen Untersuchungen zeigen, dass etwa 15% der Gene der Inaktivierung entgehen. Zusätzlich weisen 10% der Gene variable Muster der X-Inaktivierung auf und werden in unterschiedlichem Ausmaß von inaktiven X-Chromosomen verschiedener Individuen exprimiert (Carrel et al. 2005). Gene, die der X-Inaktivierung entgehen, sind nicht zufällig über das Chromosom verteilt, sondern finden sich konzentriert in Clustern, vor allem im distalen Bereich des kurzen Arms (Xp) des X-Chromosoms. Die Verteilung dieser Gene wird bisher noch nicht genau verstanden. Eine Hypothese besagt, dass die Evolution eine Rolle bei dieser Verteilung der Gene spielt, was sowohl die Geschlechtschromosomen wie auch die pseudoautosomale Region betrifft. Der X-Inaktivierungsstatus der Gene entlang des menschlichen X-Chromosoms spiegelt möglicherweise den Ablauf der Ereignisse der Degeneration des Y-Chromosoms im Rahmen der Entstehung der Geschlechtschromosomen aus einem identischen Vorläufer-Chromosomenpaar wider. Der älteste evolutionäre Bereich des X-Chromosoms zeigt dabei die vollständigste Inaktivierung der dort lokalisierten Gene, die jüngsten Bereiche entgehen nahezu vollständig der X-Inaktivierung. Auch alle Gene der pseudoautosomalen Region (PAR) 1 in der distalen Xp Region entkommen der Inaktivierung. Solche *escapees* stellen eine Momentaufnahme des evolutionären Prozesses dar und reflektieren in gewissem Umfang die Retention funktioneller autosomaler Homologe des Y-Chromosoms. Eine X-Inaktivierung ist hier nicht notwendig zur Aufrechterhaltung einer gleichen Gen-Dosis zwischen Männern und Frauen. Da jedoch manche Y-homologen Gene, die der X-Inaktivierung entgehen, außerhalb der PAR sowohl auf dem langen wie auch auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms liegen, können *escapees* nicht alleine durch ihre evolutionäre Geschichte erklärt werden. Auch Gene, die keine funktionellen Y-Homologe haben, können der X-Inaktivierung entgehen, wobei gegenwärtig aber nicht geklärt ist, warum

oder wie diese Gene der X-Inaktivierung in einer größeren inaktivierten Umgebung entgehen können (Chow et al. 2005). Theorien über das Auftreten von Genen, die der X-Inaktivierung entkommen, gehen von zwei Möglichkeiten aus. Die Ursache kann in einer Störung der Initiierung des Stilllegungsprozesses liegen, möglicherweise durch eine geringere Dichte an *LINE-Booster-Elements*, die postulierte Verstärkerelemente bei der Ausbreitung der X-Inaktivierung darstellen. Das Auftreten von nicht inaktivierten Genen kann aber auch ein Unvermögen, die Inaktivierung aufrechtzuerhalten widerspiegeln (Brown et al. 2003).

Die biologische Bedeutung von Genen, die der X-Inaktivierung entgehen, liegt darin, dass sie möglicherweise stark in der Ausprägung der Phänotypen involviert sind, wie sie bei Individuen mit X-Aneuploidien, wie z.B. beim Ullrich-Turner Syndrom, beobachtet werden. Es wird angenommen, dass Gene, die vom inaktiven X-Chromosom exprimiert werden, Effekte bei karyotypisch normalen Frauen haben, welche neben hormonalen Einflüssen für die Unterschiede zwischen Männern und Frauen in der Empfänglichkeit für Krankheiten oder im Verhalten verantwortlich ist (Brown et al. 2003).

1.2.4 *Random X-Inaktivierung und Verschiebung der X-Inaktivierung*

Der Prozess der X-Inaktivierung ist ein stochastisches Ereignis, welches bei weiblichen Zellen im frühen Embryonalstadium auftritt. In jeder Zelle wird unabhängig von anderen Zellen und mit der gleichen Wahrscheinlichkeit (*random* = zufällig) das maternal oder das paternal vererbte X-Chromosom inaktiviert, welches dann in allen Abkömmlingen dieser Zelle inaktiviert bleibt. Die meisten Frauen stellen somit ein Mosaik aus zwei unterschiedlichen somatischen Zellpopulationen dar, bei denen gleich starke Populationen des einen oder des anderen X-Chromosoms exprimiert werden. Allerdings gibt es auch Fälle, bei denen ein X-Inaktivierungsmuster vorliegt mit einer zugunsten eines der beiden X-Chromosomen verschobenen (*skewed* = verschoben) X-Inaktivierung (Abbildung 3).

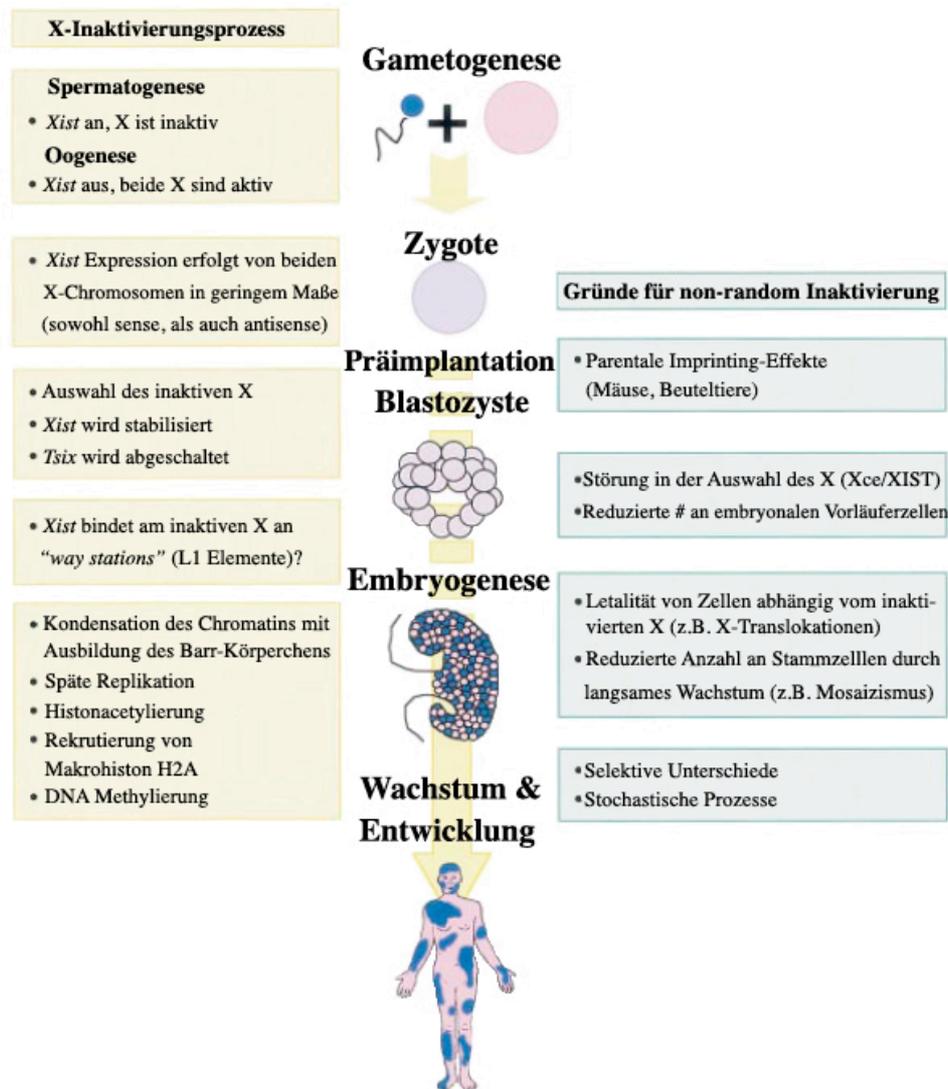


Abbildung 3: Der Prozess der X-Inaktivierung und Gründe für eine verschobene Inaktivierung (nach Brown, 2000).

Für eine verschobene X-Inaktivierung gibt es eine Reihe von Ursachen. Das Verhältnis der beiden X-Chromosomen zueinander kann als Normvariante im Rahmen des Zufallsprozesses, den die X-Inaktivierung letztlich darstellt, vom Mittel sehr stark abweichen. Ereignisse, die zu einer Verringerung der Anzahl an embryonalen Stammzellen des sich entwickelnden weiblichen Embryos führen, können zudem zu einer größeren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines verschobenen X-Inaktivierungsmusters führen (Brown et al. 2000).

Zum anderen kann eine Störung im X-Inaktivierungsprozess selbst, z.B. durch eine Mutation im *XIST*-Gen, zu einer nicht zufälligen X-Inaktivierung führen (Brown et al. 2000). Es wurden auch Hinweise auf eine familiär gehäuft auftretende Verschiebung der X-Inaktivierung gefunden, die Veränderungen des X-Inaktivierungszentrums zeigten (Naumova et al. 1996; Plenge et al. 1997; Naumova et al. 1998).

Ein sehr bedeutender zu einer Verschiebung des X-Inaktivierungsmusters führender Mechanismus ist die Selektion. Mutationen in X-chromosomalen Genen beeinflussen Differenzierung und Proliferation negativ und führen somit zu einem Selektionsnachteil für Zellen, die dieses X-Chromosom im aktiven Zustand aufweisen. Diese Zellen wachsen dann zum Beispiel langsamer oder sterben früher. Es kommt somit zu einer Verschiebung der X-Inaktivierung im Laufe der Zeit. Beispiele für Erkrankungen, deren Mutationsträgerinnen eine extreme Verschiebung der X-Inaktivierung zeigen, sind Zell-Linien von B-Zellen bei weiblichen Mutationsträgerinnen von X-gebundener Agammaglobulinämie und Lymphozyten bei weiblichen Patientinnen mit schwerem kombinierten Immundefekt (Puck et al. 1992; Allen et al. 1994). Hier findet man nur das gesunde Wildtyp-Allel, die betroffenen Frauen sind asymptomatisch. Die Selektion schützt die Überträgerinnen vor dem Auftreten von Symptomen. In seltenen Fällen besitzen Zellen mit dem mutierten Allel einen Überlebensvorteil, d.h. es findet dann eine Selektion zu Gunsten des mutierten Allels statt. Bei X-chromosomal rezessiv vererbter Adrenoleukodystrophie wurde dies beispielsweise nachgewiesen (Migeon et al. 1981; Maier et al. 2002). Regelmäßig findet sich eine Verschiebung der X-Inaktivierung bei Individuen mit strukturellen Chromosomenaberrationen, z.B. bei Deletionen, Isochromosomen oder Ringchromosomen.

1.2.5 Methoden zur Untersuchung von X-Inaktivierungsmustern und ihre Bedeutung in der Diagnostik

X-Inaktivierungsmuster können mit verschiedenen methodischen Ansätzen untersucht werden. Zwei Voraussetzungen sind dafür notwendig: Die Unterscheidung zwischen maternalem und paternalem X-Chromosom und die Unterscheidung zwischen aktivem und inaktivem Chromosom. Die Unterscheidung zwischen maternalem und paternalem X-Chromosom kann mit Hilfe verschiedener X-gebundener Polymorphismen, z.B. Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) oder *Variable Number Tandem Repeats* (VNTR) erfolgen, für die ein hoher Prozentsatz weiblicher Individuen heterozygot ist. Eine Unterscheidung bezüglich des Aktivitätszustands des X-Chromosoms erlaubt eine charakteristische Eigenschaft inaktiver DNA: CpG-Dinukleotide sind in CpG-Inseln auf dem inaktiven X-Chromosom stark methyliert, während diese auf dem aktiven X-Chromosom nicht methyliert werden. In einer Gruppe von Assays zur Untersuchung der X-Inaktivierung werden methylierungssensitive Restriktionsenzyme eingesetzt. Diese können lediglich nicht methylierte DNA schneiden. Nach Inkubation der genomischen DNA mit diesen Enzymen werden nur noch die durch die Methylierung vor dem Verdau geschützten, inaktivierten

Allele per Southern Blot, oder häufiger per PCR, nachgewiesen. Eine Quantifizierung der erhaltenen PCR-Produkte wird meist durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer erleichtert. Neben den Markern DXS255 (M27B) (Boyd et al. 1990; Brown et al. 1990), FMR1 (Carrel et al. 1996; Leithner et al. 2005; Bocklandt et al. 2006), MAOA (Hendriks et al. 1992; Xue et al. 2002) und Promotoren des Phosphoglycerat-Kinase-Gens (PGK1) (Vogelstein et al. 1987; Azofeifa et al. 1995; Gong et al. 2008) wird vor allem ein Polymorphismus im humanen Androgenrezeptor-Gen (HUMARA) (Allen et al. 1992; Allen et al. 1994; Lavin et al. 2008; Busque et al. 2009; Desai et al. 2011) eingesetzt. Eine andere Methode zum Nachweis von Methylierungsunterschieden beruht auf dem Prinzip der methylierungsspezifischen PCR, welche den Methylierungszustand von CpG-Inseln unabhängig von einem Verdau mit Restriktionsenzymen bestimmen kann. Hier werden durch eine Modifikation der DNA mit Natriumbisulfit ausschließlich unmethylierte Cytosine in Uracil überführt, so dass in der folgenden PCR-Amplifikation durch Verwendung spezifischer Primer eine Unterscheidung zwischen methylierter und unmethylierter DNA möglich ist (Kubota et al. 1999; Kubota 2001).

Andere Methoden zur Analyse von X-Inaktivierungsmustern nutzen nicht die DNA und deren Methylierungsunterschiede sondern RNA zum Nachweis der X-Inaktivierung. Hierbei werden die transkribierten Allele des aktiven X-Chromosoms nachgewiesen, die von dem jeweils untersuchten Gewebe exprimiert werden (el-Kassar et al. 1997; Carrel et al. 1999; Kutsche et al. 2000; Carrel et al. 2005). Bei diesen Verfahren werden Polymorphismen der in einer RT-PCR erhaltenen cDNA mit Hilfe allelspezifischer Primer amplifiziert, so dass hier ebenfalls das Verhältnis der detektierbaren Allele zueinander und somit das X-Inaktivierungsmuster bestimmt werden kann.

Die Untersuchung des X-Inaktivierungsstatus findet auf verschiedenen Gebieten Anwendung: In der Überträgerdiagnostik bei X-gebundenen Erkrankungen, bei Klonalitätsanalysen von Tumoren und Lokalisationsanalysen von X-chromosomalen krankheitsrelevanten Genen bedient man sich der verschiedensten Verfahren zur Analyse der X-Inaktivierung.

Bei Mutationsträgerinnen bekannter X-chromosomaler Erkrankungen, insbesondere zur Identifikation des Mutationsträgerstatus und der genetischen Beratung betroffener Frauen, ist eine Kenntnis des X-Inaktivierungszustands nützlich. Heterozygote beschwerdefreie Mutationsträgerinnen zeigen bei verschiedenen Erkrankungen eine verschobene X-Inaktivierung, während Frauen, die diese Mutation nicht tragen, eine *random* X-Inaktivierung zeigen. Eine Untersuchung des Mutationsträgerinnen-Status ist somit über das X-Inaktivierungsmuster möglich. Beispiele hierfür sind der schwere kombinierte Immundefekt

(SCID), das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) oder der Morbus Bruton (X-gekoppelte Agammaglobulinämie Typ Bruton) (Puck et al. 1987; Allen et al. 1994; Schmucker et al. 1995; Wengler et al. 1997; Li et al. 1998; Moschese et al. 2000). In der onkologischen Grundlagenforschung werden X-Inaktivierungsuntersuchungen häufig zum Nachweis der Monoklonalität von Zellen eingesetzt, sowohl bei soliden Tumoren (Going et al. 2001; Indsto et al. 2001; Shulman et al. 2006; Hodges et al. 2010), als auch bei Erkrankungen des hämatopoetischen Systems (Hotta 1997; Schroeder et al. 2010). X-Inaktivierungsuntersuchungen können wichtige Hinweise auf eine X-gebundene Vererbung von neu beschriebenen Syndromen geben (Zhang et al. 2000). Zhang und Kollegen beschreiben eine Familie mit 10 Frauen, deren weibliche Familienmitglieder ausnahmslos ossäre Dysplasien aufwiesen. Bei Männern der Familie fanden sich diese Dysplasien nicht. Durch X-Inaktivierungsuntersuchung mittels HUMARA-Assay wurde nachgewiesen, dass alle untersuchten Frauen eine verschobene X-Inaktivierung zeigten. Die Lokalisation des noch unbekanntes Gens wurde in weiteren Untersuchungen eingegrenzt auf Xq27.3-Xq28, das Gen ist aber bisher nicht identifiziert.

1.2.6 X-Inaktivierung bei heterozygoten Mutationsträgerinnen von Morbus Fabry

Im Gegensatz zu den Überträgerinnen anderer X-chromosomaler Erkrankungen entwickeln heterozygote Mutationsträgerinnen für Morbus Fabry in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle Symptome (MacDermot et al. 2001; Whybra et al. 2001; Mehta et al. 2004). Als ursächlich wurde lange Zeit eine Verschiebung der X-Inaktivierung in Zellen betroffener Frauen zugunsten des mutierten Allels vermutet (Davies et al. 1993; Eng et al. 1994; Ashton-Prolla et al. 1999; Desnick 2001; Whybra et al. 2001; Rodriguez-Mari et al. 2003; Hauser et al. 2004; Masson et al. 2004; Mehta et al. 2004; Stromberger et al. 2004). Zu Beginn unserer experimentellen Untersuchungen lagen zwei Arbeiten zur X-Inaktivierung bei Morbus Fabry vor: Bei einem weiblichen eineiigen Zwillingpaar mit einem diskordantem Phänotyp mit einer *de novo* Mutation im *GAL*-Gen konnte gezeigt werden, dass die asymptotische Mutationsträgerin eine Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten des Wildtyp-Allels in Fibroblasten zeigte, während bei der symptomatischen Schwester bevorzugt das mutierte Allel aktiv war (Redonnet-Vernhet et al. 1996). In einer weiteren Familie mit zwei symptomatischen und zwei asymptotischen Fabry-Mutationsträgerinnen wurde ebenfalls eine Verschiebung der X-Inaktivierung in unterschiedliche Richtungen beobachtet (Morrone et al. 2003). Auch hier zeigten symptomatische Frauen eine X-Inaktivierung zugunsten des

mutierten Fabry-Allels, während die gesunden Frauen eine X-Inaktivierung zugunsten des Wildtyp-Allels zeigten.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollte an einem großen, klinisch und molekulargenetisch beschriebenen Kollektiv heterozygoter Morbus Fabry-Patientinnen die Hypothese überprüft werden, ob hier eine Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels erfolgt. Eine solche Verschiebung der X-Inaktivierung könnte dazu beitragen, das Auftreten klinischer Symptome bei Mutationsträgerinnen von Morbus Fabry zu erklären, und bei der genetischen Beratung betroffener Familien oder bei der Indikationsstellung zu einer Enzymersatztherapie bei Frauen hilfreich sein.

Zur Überprüfung der Hypothese wurden folgende Teilziele verfolgt:

- Analyse der X-Inaktivierungsmuster weiblicher Morbus Fabry-Patientinnen
- Untersuchung des parental Ursprungs des bevorzugt inaktivierten Fabry-Allels
- Korrelation der X-Inaktivierungsmuster heterozygoter Fabry-Patientinnen mit der Enzymaktivität der α -Galaktosidase A
- Korrelation der X-Inaktivierung mit dem Auftreten und Schweregrad der klinischen Symptomatik
- Vergleich der X-Inaktivierungsmuster mit einem altersentsprechenden Kontroll-Kollektiv
- Untersuchung der Altersabhängigkeit von X-Inaktivierung und klinischer Manifestation der Erkrankung

2. Material und Methoden

2.1 Extraktion genomischer DNA aus Vollblut

Genomische DNA aus Leukozyten wurde mit Hilfe der Aussalz-Methode aus EDTA-Blut extrahiert (Miller et al. 1988).

2.1.1 Puffer-Lösungen

Erythrozyten-Lysepuffer

Stoff	Menge	Produkt
NH ₄ Cl	41,45 g	Sigma A-4514
KHCO ₃	5 g	Merck 4854
Na-EDTA	0,17 g	Sigma E-5134

Ad 5000 ml bidestilliertes Wasser

pH-Wert 7,4 einstellen mit 1 M HCl bzw. 2 M NaOH

Proteinase K-Puffer

Stoff	Konzentration	Eingesetztes Volumen	Produkt
Tris/Cl pH 7,5	1 M	5 ml	Sigma T-6666
Na-EDTA pH 8,0	0,5 M	2 ml	Sigma E-7889
NaCl	5 M	3 ml	Sigma S-5150

Ad 1000 ml bidestilliertes Wasser

TE-Puffer

Stoff	Menge	Produkt
Tris	1,21 g	Sigma T-6666
Na-EDTA	0,37 g	Sigma E-5134

Ad 1000 ml bidestilliertes Wasser

pH 8,0 einstellen mit 1 M HCl bzw. 2 M NaOH

SDS-Lösung (20%): 20 g SDS (Serva 20763) ad 100 ml bidestilliertes Wasser.

Ethanol (70%): 70 ml 100% Ethanol, unvergällt (Fa. T.J. Baker, Griesheim) ad 100 ml bidestilliertes Wasser.

Erythrozyten-Lysepuffer, Proteinase K-Puffer und TE-Puffer wurden nach der Herstellung autoklaviert.

2.1.1 Durchführung

Lyse der Erythrozyten

Pro Patient waren 2-5 ml EDTA-Vollblut für die DNA-Extraktion verfügbar. Nach der Überführung des Blutes in Zentrifugenröhrchen (Firma Sarstedt, Nümbrecht) wurde der Inhalt mit Erythrozyten-Lysepuffer auf 15 ml aufgefüllt und durch Schwenken gemischt. Etwa 10 Minuten später war eine Lyse der Erythrozyten an der Lackfarbe des Blutes erkennbar und die Leukozyten wurden aus dem Zell-Lysat bei 1500 U/min abzentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstands wurde das Zell-Pellet im verbliebenen Volumen resuspendiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde erneut mit Lysepuffer auf 15 ml aufgefüllt. Nach 10 Minuten wurden die Leukozyten abzentrifugiert und wieder nach Entfernung des Überstandes das Pellet resuspendiert.

Inkubation der Zell-Lysate mit Proteinase K

Die Leukozyten-Suspension wurde nun mit 1 ml Proteinase K-Puffer, 5 µl Proteinase K und 50 µl 20% SDS über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Das Ziel dieses Arbeitsschritts ist, die Zellmembranen der Leukozyten mittels SDS als Detergenz zu lysieren, und noch vorhandenes Protein durch Proteinase K zu spalten.

Aussalzen der Proteine

Am folgenden Tag wurden die durch Proteinase K gespaltenen Proteinfragmente mittels Zugabe von 300 µl 5 M NaCl gefällt und bei 4500 U/min abzentrifugiert.

Fällen, Waschen und Lösen der DNA

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und das Protein-Pellet verworfen. Zur Fällung der genomischen DNA wurden 4 ml 100% unvergälltes Ethanol (Fa. J.T. Baker, Griesheim) zugegeben. Die genomische DNA wurde durch mehrfaches Schwenken des Röhrchens gefällt. Sichtbar nun als Fädchen, konnte sie mit Hilfe einer Pipette aus der Lösung „herausgefischt“, in ein mit 350 µl 70% Ethanol gefülltes Schraubverschlußröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) überführt und gewaschen werden. Nach dem Abziehen des Alkohols mit der Pipette wurde die DNA etwa 1 Stunde bei Raumluft getrocknet und schließlich in TE-Puffer gelöst und bei 4°C gelagert.

2.2 Untersuchung der X-Inaktivierung

2.2.1 Prinzip des HUMARA-Assays

Die X-Inaktivierungsmuster der Fabry-Patientinnen wurden mit Hilfe des HUMARA-Assays analysiert. Diese Methode ermöglicht einerseits eine Unterscheidung zwischen maternalem und paternalem X-Chromosom mittels eines Polymorphismus, andererseits eine Unterscheidung zwischen aktivem und inaktivem X-Chromosom über Methylierungsunterschiede der DNA. Der Polymorphismus besteht aus einem hochpolymorphen Trinukleotid-Repeat im Exon 1 des humanen Androgen-Rezeptor-Gens (HUMARA; *Gene Bank Accession Number* M21748). Der CAG-Repeat codiert 11-31 Glutamin-Reste im Exon 1 des Androgen-Rezeptor-Gens (Edwards et al. 1992). Dieser Polymorphismus weist einen hohen Heterozygoten-Index von 0,9 auf, so dass der Test bei 90% der Frauen angewendet werden kann. Diese Frauen weisen eine unterschiedliche Anzahl von Repeats auf beiden X-Chromosomen auf, so dass eine Differenzierung der beiden X-Chromosomen möglich ist.

Eine Unterscheidung des Aktivitätszustands der X-Chromosomen ist über Unterschiede im Methylierungszustand zwischen aktiver und inaktiver DNA möglich. CpG-Inseln mit mehreren Schnittstellen für die methylierungssensitiven Restriktionsenzyme *HpaII* und *CfoI* befinden sich in einer Region von 80 Basenpaaren 5'-stromaufwärts des CAG-Repeats. Der Methylierungsstatus dieser CpG-Inseln korreliert mit der X-Inaktivierung, d.h. das methylierte Allel ist inaktiv. Durch die kurze Entfernung zwischen den Schnittstellen der Restriktionsenzyme und dem CAG-Polymorphismus wird eine PCR-Analyse ermöglicht. Die PCR-Primer beim HUMARA-Assay flankieren dabei sowohl den CAG-Repeat als auch die Schnittstellen oben genannter Restriktionsenzyme.

In der praktischen Anwendung des HUMARA-Assays wird die genomische DNA zunächst mit den methylierungssensitiven Restriktionsenzymen *HpaII* und *CfoI* inkubiert. Anschließend können in der folgenden PCR nur noch die inaktivierten Allele des Androgenrezeptors (AR) amplifiziert werden, da diese durch die Methylierung der Restriktionsschnittstellen vor dem Verdau durch die Restriktionsenzyme geschützt sind. Bei einer *random* X-Inaktivierung können beide Allele in der Fragmentanalyse in annähernd gleicher Menge nachgewiesen werden, da maternale und paternale X-Chromosomen zu gleichen Teilen inaktiviert (methyliert) sind. Liegt jedoch ein X-Chromosom bevorzugt inaktiviert vor, so wird dieses AR-Allel nach dem Restriktionsverdau in der PCR vermehrt amplifiziert. Im Extremfall einer verschobenen X-Inaktivierung ist nur noch eines der beiden

Allele nachweisbar. Der *forward*-Primer ist mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert, was eine automatisierte Fragmentanalyse ermöglicht. Die Methode des HUMARA-Assays wurde erstmals 1992 von Allen *et al.* beschrieben und von unserer Arbeitsgruppe modifiziert (Maier *et al.* 2002).

Bei Durchführung des HUMARA-Assays müssen bei jeder DNA-Probe vier verschiedene Ansätze mit Restriktionsenzymen analysiert werden: 1. *RsaI*, 2. *RsaI* + *HpaII*, 2. *RsaI* + *CfoI*, 4. *MspI*. *RsaI* schneidet nur außerhalb, nicht aber innerhalb des zu amplifizierenden Abschnitts. Ziel des Restriktionsverdau mit *RsaI* ist die Amplifikation sowohl des maternalen, wie auch des paternalen AR-Alles, um Korrekturfaktoren zu erhalten, die bei der Ermittlung der X-Inaktivierungsverhältnisse verwendet werden (siehe 2.2.2.4). Durch diese Fragmentierung der DNA wird die oft beschriebene bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels in der PCR reduziert. *RsaI* wird auch den Ansätzen mit den methylierungssensitiven Restriktionsenzymen *HpaII* und *CfoI* zugegeben. Lediglich unmethylierte DNA kann von *HpaII* und *CfoI* geschnitten werden, so dass nach der Inkubation der DNA mit diesen Enzymen nur noch die inaktiven AR-Allele in der PCR amplifiziert werden können; diese sind vor einem Verdau durch die Methylierung der Enzym-Schnittstellen geschützt. *HpaII* und *CfoI* werden getrennt voneinander in verschiedenen Ansätzen den Proben zugegeben. Proben, bei denen die X-Inaktivierungsratios von *HpaII* und *CfoI* weiter als 15% auseinander liegen, werden von der Gesamtauswertung ausgeschlossen. Dem letzten Ansatz dieses Tests wird das Restriktionsenzym *MspI* in gleicher Enzymaktivität wie *HpaII* oder *CfoI* zugefügt, wobei hier die Vollständigkeit des DNA-Verdau kontrolliert werden soll. *MspI* besitzt die gleichen Schnittstellen wie *HpaII*, schneidet aber im Unterschied zu *HpaII* nicht-methylierte ebenso wie methylierte DNA, so dass keines der beiden AR-Allele mehr in der PCR nachweisbar sein darf. Tabelle 5 fasst die Lage der Schnittstellen, die Methylierungssensitivität, den Aktivitätsstatus des nach dem Verdau amplifizierten AR-Allels und das Ziel der Verwendung des jeweiligen Restriktionsenzym zusammen.

Restriktions-Enzym	Schnittstellen-Lokalisation (in Bezug zum amplifizierenden Abschnitt)	Methylierungs-Sensitivität	Amplifiziertes AR-Allel	Ziel des Verdaus
<i>RsaI</i>	Außerhalb	-	Aktives und inaktives Allel	Angleichung der Amplifikationsrate beider Allele
<i>HpaII</i>	Innerhalb	+	Inaktives Allel	Diskrimination: aktives und inaktives Allel
<i>CfoI</i>	Innerhalb	+	Inaktives Allel	Diskrimination: aktives und inaktives Allel
<i>MspI</i>	Innerhalb	-	Keine Amplifikation	Kontrolle der Vollständigkeit des Verdaus

Tabelle 5: Restriktionsenzyme des Androgenrezeptor-Tests: Schnittstellen-Lokalisation, Methylierungssensitivität, Aktivitätsstatus des zu amplifizierenden Allels und Ziel des Restriktionsverdaus.

2.2.2 Durchführung des HUMARA-Assays

2.2.2.1 Restriktionsverdau genomischer DNA

Die Konzentration der genomischen DNA wurde mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Anschließend wurde eine 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -Verdünnung hergestellt.

Jeweils 0,5 μg DNA wurden dann in vier Ansätzen mit den Restriktionsenzymen *RsaI* und *MspI*, sowie im Doppelverdau mit *HpaII/RsaI* und *CfoI/RsaI* quantitativ verdaut (Restriktionsenzyme: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Einzelrestriktionsverdau mit <i>RsaI</i> bzw. <i>MspI</i>		Doppelrestriktionsverdau mit <i>HpaII/RsaI</i> bzw. <i>CfoI/RsaI</i>	
genomische DNA (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2,5 μl	genomische DNA (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2,5 μl
10 x-Puffer L	1,5 μl	10 x-Puffer L	1,5 μl
<i>RsaI</i> oder <i>MspI</i> (10 U/ μl)	2,0 μl	<i>HpaII</i> oder <i>CfoI</i> (10U/ μl)	2,0 μl
		<i>RsaI</i> (10U/ μl)	2,0 μl
Bidestilliertes Wasser	9,0 μl	Bidestilliertes Wasser	7,0 μl

Die Restriktionsansätze wurden über Nacht im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde erneut Restriktionsenzym zugefügt.

Zugabe zum Einzelrestriktionsverdau mit <i>RsaI</i> bzw. <i>MspI</i>		Zugabe zum Doppelrestriktionsverdau mit <i>HpaII/RsaI</i> bzw. <i>CfoI/RsaI</i>	
10 x-Puffer L	0,5 μl	10 x-Puffer L	0,5 μl
<i>RsaI</i> oder <i>MspI</i> (10 U/ μl)	2,0 μl	<i>HpaII</i> oder <i>CfoI</i> (10U/ μl)	2,0 μl
		<i>RsaI</i> (10U/ μl)	2,0 μl
Bidestilliertes Wasser	2,5 μl	Bidestilliertes Wasser	0,5 μl

Die Ansätze wurden weitere 7 Stunden inkubiert, so dass die Vollständigkeit des Restriktionsverdau sichergestellt war.

2.2.2.2 Amplifikation des polymorphen CAG-Repeats im Androgenrezeptor

Die Amplifikation des CAG-Repeats in der PCR erfolgte mit Goldstar DNA Polymerase (Fa. Eurogentec, Seraing, Belgien). Da bei diesem PCR-System kein $MgCl_2$ im 10x-Standardreaktionspuffer enthalten ist, sondern dies gesondert zugegeben werden muss, konnte die $MgCl_2$ -Menge berücksichtigt werden, die mit der Zugabe von DNA aus dem Puffersystem des Restriktionsverdau in den PCR-Ansatz gelangte. Puffer L beinhaltet 10 mM $MgCl_2$.

Eingesetzte Primer:

AR-1-FAM: FAM-5'-GCG CGA AGT GAT CCA GAA G-3' (*forward*)

AR3: 5'-GCC TCT ACG ATG GGC TTG-3' (*reverse*)

Die Markierung des Forward-Primers der PCR mit dem Fluoreszenz-Farbstoff FAM (5-Carboxy-Fluorescein) ermöglichte die Fragmentanalyse mittels eines automatischen Sequencers.

PCR-Ansatz

Eingesetzte Substanzen	Volumen
DNA, quantitativ verdaut (0,625 μ g)	2,5 μ l
Primer AR-1-FAM (10 pmol)	1,0 μ l
Primer AR-3 (10 pmol)	1,0 μ l
10 x-Puffer/2 mM dNTP	5,0 μ l
$MgCl_2$ (25 mM)	1,2 μ l
Goldstar <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l
Bidestilliertes Wasser	39,0 μ l

Vor Zugabe zum Reaktionsansatz wurde die DNA resuspendiert.

PCR-Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiation	95 °C	5 min	1 x
Amplifikation	Denaturierung	95 °C	30 x
	Annealing	53 °C	
	Elongation	72 °C	
Auffüllreaktion	72 °C	5 min	1 x

Zur Überprüfung des Ergebnisses der PCR wurden die PCR-Produkte auf ein 1%-iges Agarosegel (DNA Agarose, Biozym Diagnostics, Hessisch Oldendorf) aufgetragen und visualisiert. Die erwartete Fragmentlänge betrug 180 bis 250 bp.

2.2.2.3 Fragmentanalyse

Zur Fragmentanalyse wurden die mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markierten PCR-Produkte an die Firma Medigenomix in Martinsried versandt. Die Proben wurden vor dem Versand, mit Ausnahme der *CfoI*-Ansätze, im Verhältnis 1:5 mit H₂O verdünnt und mit dem internen Längenstandard ROX-350 (ABI Perkin Elmer, Weiterstadt) versetzt. Bei den Ansätzen mit *CfoI* erfolgte eine Verdünnung im Verhältnis 1:1, da die Produkte hier bei höherer Verdünnung schlechter nachweisbar waren.

Probenaufbereitung zur Fragmentanalyse:

Markiertes PCR-Produkt	1,5 μ l
ROX-350 Längenstandard	0,5 μ l
Formamid	0,5 μ l
EDTA/Dextran Blue Auftragspuffer	2,5 μ l

Die Fragmentanalyse erfolgte durch Medigenomix auf einem Acrylamidgel auf einem 377 DNA Sequencer mit einer Laufzeit von 2,2 Stunden (ABI Perkin Elmer, Weiterstadt).

Die Auswertung der von Medigenomix erhaltenen Rohdaten wurde mit der Software Genescan Analysis™ (ABI Perkin Elmer, Weiterstadt) durchgeführt. Die Länge der Fragmente wurde mit Hilfe des internen Längenstandards ermittelt. Zur Quantifizierung wurde die Peakfläche der Produktmenge der einzelnen Fragmente verwendet.

2.2.2.4 Berechnung des X-Inaktivierungsverhältnisses mit Hilfe eines Korrekturfaktors

PCR-bedingte Unterschiede in der Amplifikation der Allele wurden mit Hilfe des *RsaI*-Ansatzes ausgeglichen. Anhand der Fragmente aus diesen Ansätzen wurden Korrekturfaktoren für beide Allele errechnet, mit denen die in der Fragmentanalyse ermittelten Peakflächen aus dem *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Verdau multipliziert wurden. Die so korrigierten Werte wurden zur Berechnung der X-Inaktivierungsmuster verwendet. Die X-Inaktivierungsmuster wurden nach Harris *et al.* eingeteilt in *random* X-Inaktivierung (50:50-64:36%), milde Verschiebung der X-Inaktivierung (65:35-80:20%) und ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung (>80:20%) (Harris *et al.* 1992).

Berechnung der Korrekturfaktoren:

Korrekturfaktor für das kürzere Allel:	Korrekturfaktor für das längere Allel:
Peakfläche des kürzeren Allels/ Mittelwert aus den Peakflächen beider Allele	Peakfläche des längeren Allels/ Mittelwert aus den Peakflächen beider Allele

Berechnung des X-Inaktivierungsverhältnisses:

Korr. <i>HpaII/RsaI</i> bzw. <i>CfoI/RsaI</i> Allel 1 (kürzeres Allel)	Korr. <i>HpaII/RsaI</i> bzw. <i>CfoI/RsaI</i> Allel 2 (längeres Allel)
Peakfläche des kürzeren Allels x 100 / Summe der Peakflächen beider Allele	Peakfläche des längeren Allels x 100 / Summe der Peakflächen beider Allele

Proben mit einem Unterschied von mehr als 15 Prozentpunkten in den Ergebnissen nach *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Verdau wurden als nicht interpretierbar betrachtet und von der Beurteilung ausgeschlossen.

Eine schematische Darstellung des HUMARA-Assays am Beispiel einer *random* sowie einer verschobenen X-Inaktivierung zeigen Abbildung 4 und 5.

2.3 Standard-Labormethoden

Folgende Standardmethoden wurden zur Erstellung der vorliegenden Arbeit verwendet (Sambrook 2001):

- Konzentrationsbestimmung von DNA durch Absorptionsmessung bei 260 nm
- Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmente

Random X-Inaktivierung

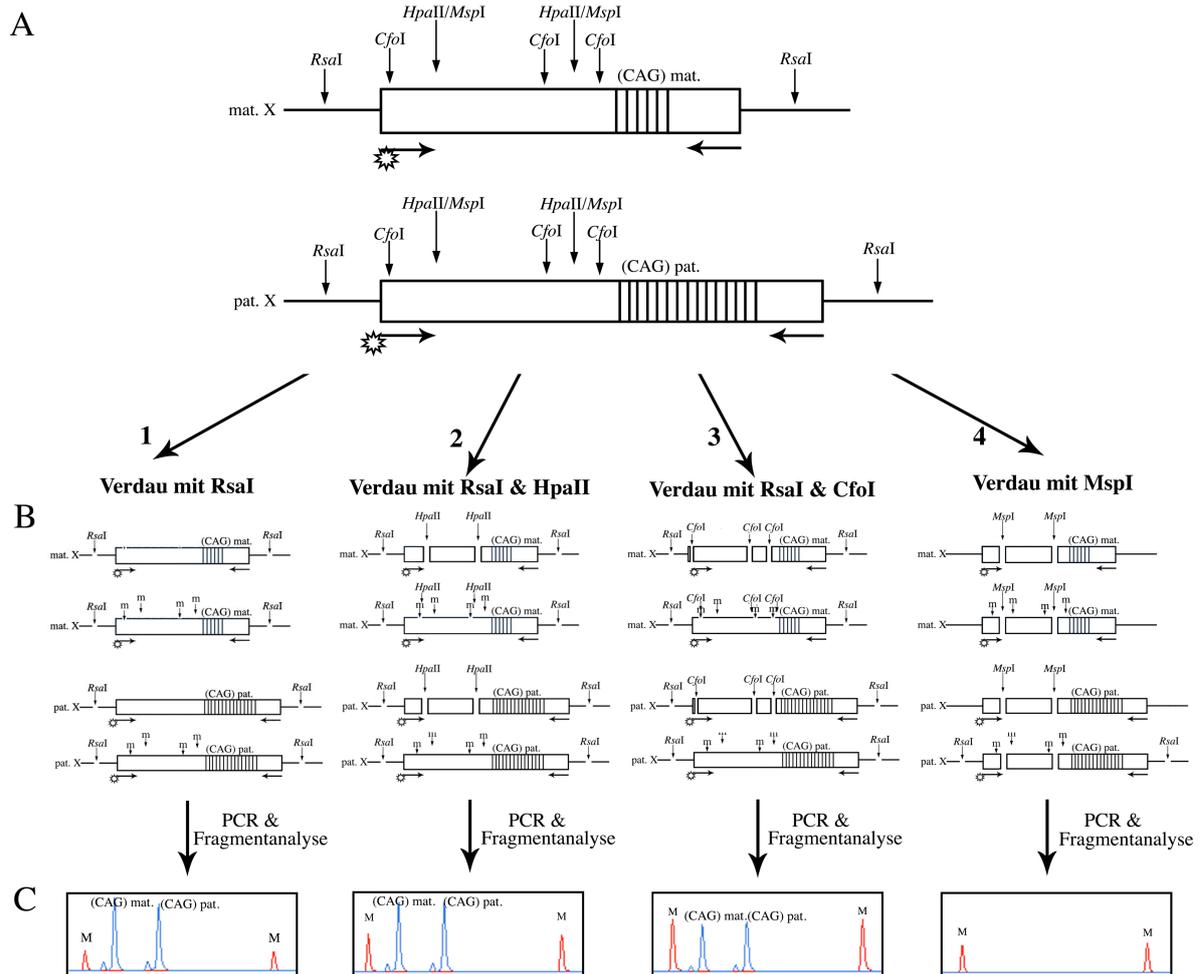


Abb. 4: Schematische Darstellung des Prinzips des HUMARA-Assays am Beispiel einer *random X-Inaktivierung*. (A) Dargestellt sind maternales (mat. X) und paternales Allel (pat. X) des Androgenrezeptors (AR). Beide Allele unterscheiden sich durch die Anzahl an CAG-Repeats (senkrechte Balken). Das paternale Allel besitzt hier mehr CAG-Repeats und entspricht dem längeren der beiden Allele. Waagrechte Pfeile unter den Allelen stellen die in der PCR verwendeten Primer dar, der *forward*-Primer ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Stern) markiert. Zusätzlich sind die Schnittstellen markiert, an denen die Restriktionsenzyme *RsaI*, *HpaII*, *CfoI* und *MspI* schneiden.

(B1) *RsaI* besitzt nur Schnittstellen außerhalb des zu amplifizierenden Abschnitts. (C1) Nach Inkubation mit *RsaI* werden maternales und paternales Allel in der Fragmentanalyse dargestellt. Über eine Fragmentierung der DNA durch *RsaI* kann die bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels in der PCR, welche bei unterschiedlich langen Fragmenten oft beobachtet wird, verringert werden. Die Länge der Fragmente wird mit einem Marker (M) bestimmt. (B2) *HpaII* schneidet als methylierungs-sensitives Restriktionsenzym nur aktive (unmethylierte) DNA. Das inaktivierte AR-Allel ist durch DNA-Methylierung (m) vor dem Abbau durch *HpaII* geschützt. *RsaI* wird auch diesem Ansatz beigesetzt, um die bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels zu minimieren. (C2) In der Fragmentanalyse werden nur inaktive Allele nachgewiesen, die durch Methylierung vor dem Abbau geschützt sind. Bei einer *random X-Inaktivierung* werden beide X-Chromosome zu gleichen Teilen inaktiviert, so dass beide AR-Allele annähernd gleich nachgewiesen werden. (B3) *CfoI* ist ebenfalls ein methylierungssensitives Restriktionsenzym, welches nur das aktive (unmethylierte) Allel schneidet. Auch hier dient die Zugabe von *RsaI* der Reduktion der bevorzugten Amplifikation des kürzeren Allels in der PCR. (C3) Nur durch Methylierung (m) geschützte, inaktivierte Allele können in der PCR amplifiziert werden. Die Resultate nach dem Restriktionsverdau mit *HpaII/RsaI* (C2) und *CfoI/RsaI* (C3) müssen übereinstimmen. (B4) *MspI* schneidet die Allele an gleicher Stelle wie *HpaII*, schneidet aber sowohl methylierte, wie auch unmethylierte DNA. (C4) Nach der PCR darf keines der beiden AR-Allele mehr nachzuweisen sein, der Restriktionsverdau mit *MspI* dient der Kontrolle der Vollständigkeit des Restriktionsverdaus.

Verschobene X-Inaktivierung

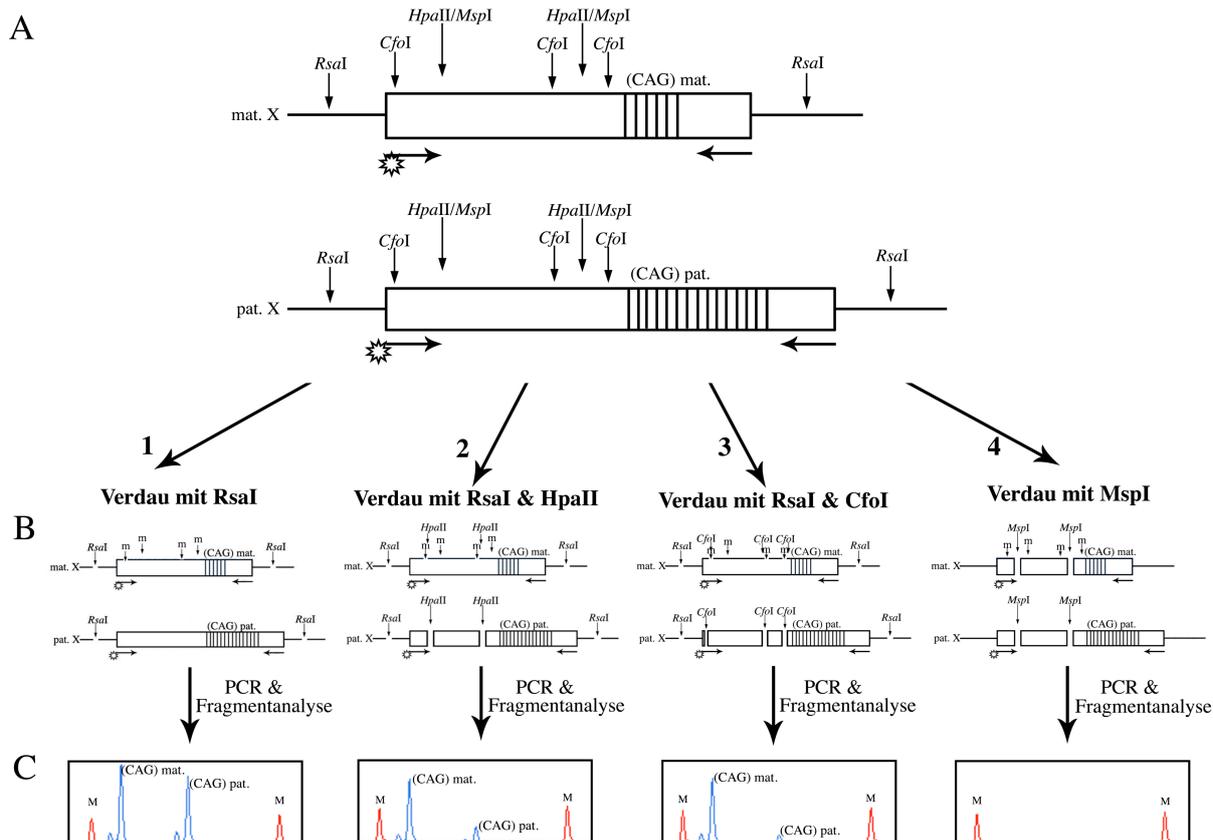


Abb. 5: Schematische Darstellung des Prinzips des HUMARA-Assays am Beispiel einer verschobenen X-Inaktivierung. (A) Dargestellt sind maternales (mat. X) und paternales Allel (pat. X) des Androgenrezeptors (AR). Beide Allele unterscheiden sich durch die Anzahl an CAG-Repeats (senkrechte Balken). Das paternale Allel besitzt hier mehr CAG-Repeats und entspricht dem längeren der beiden Allele. Waagrechte Pfeile unter den Allelen stellen die in der PCR verwendeten Primer dar, der *forward*-Primer ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Stern) markiert. Zusätzlich sind die Schnittstellen markiert, an denen die Restriktionsenzyme *RsaI*, *HpaII*, *CfoI* und *MspI* schneiden.

(B1) *RsaI* besitzt nur Schnittstellen außerhalb des zu amplifizierenden Abschnitts. (C1) Nach Inkubation mit *RsaI* werden maternales und paternales Allel in der Fragmentanalyse dargestellt. Über eine Fragmentierung der DNA durch *RsaI* kann die bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels in der PCR, welche bei unterschiedlich langen Fragmenten oft beobachtet wird, verringert werden. Die Länge der Fragmente wird mit einem Marker (M) bestimmt. (B2) *HpaII* schneidet als methylierungs-sensitives Restriktionsenzym nur aktive (unmethylierte) DNA. Das inaktivierte AR-Allel ist durch DNA-Methylierung (m) vor dem Abbau durch *HpaII* geschützt. *RsaI* wird auch diesem Ansatz beigegeben, um die bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels zu minimieren. (C2) In der Fragmentanalyse werden nur inaktive Allele nachgewiesen, die durch Methylierung vor dem Abbau geschützt sind. Bei einer verschobenen X-Inaktivierung werden beide X-Chromosome in unterschiedlichem Verhältnis inaktiviert, so dass ein AR-Allel vermehrt nachgewiesen wird (hier das maternale AR-Allel). (B3) *CfoI* ist ebenfalls ein methylierungssensitives Restriktionsenzym, welches nur das aktive (unmethylierte) Allel schneidet. Auch hier dient die Zugabe von *RsaI* der Reduktion der bevorzugten Amplifikation des kürzeren Allels in der PCR. (C3) Nur durch Methylierung (m) geschützte, inaktivierte Allele können in der PCR amplifiziert werden. Die Resultate nach dem Restriktionsverdau mit *HpaII/RsaI* (C2) und *CfoI/RsaI* (C3) müssen übereinstimmen. (B4) *MspI* schneidet die Allele an gleicher Stelle wie *HpaII*, schneidet aber sowohl methylierte, wie auch unmethylierte DNA. (C4) Nach der PCR darf keines der beiden AR-Allele mehr nachzuweisen sein, der Restriktionsverdau mit *MspI* dient der Kontrolle der Vollständigkeit des Restriktionsverdaus.

2.4 Untersuchung der Krankheitsmanifestation bei Fabry-Patientinnen

2.4.1 Klinische Charakterisierung der Fabry-Patientinnen mittels MSSI

Die klinische Symptomatik der Fabry-Patientinnen wurde mit Hilfe eines Scoring-Systems an der Kinderklinik der Johannes Gutenberg Universität in Mainz untersucht. Die diagnostischen Daten zur klinischen Krankheitsexpression wurden von Ärzten mit großer Erfahrung in Bezug auf Diagnostik und Therapie des Morbus Fabry erhoben. Das Scoring System, der MSSI (*Mainz Severity Score Index*), wurde eigens für Morbus Fabry entwickelt und dient zur Objektivierung des Schweregrades der Erkrankung sowie zur Darstellung des klinischen Verlaufs, z.B. während einer Enzyersatztherapie. Der MSSI besteht aus vier Teilbereichen, die allgemeine, neurologische, kardiologische und renale Krankheitszeichen oder Symptome abfragen (Tabelle 6). Den einzelnen Symptomen werden Punktwerte zugeordnet, wobei eine Gewichtung entsprechend dem Beitrag des Symptoms zur Morbidität der Erkrankung erfolgt. So wird zum Beispiel für das Vorliegen einer Cornea verticillata, die zwar richtungsweisend für die Diagnosestellung sein kann, jedoch nicht zu einer Beeinträchtigung des Sehvermögens führt, ein Punkt vergeben. Im Vergleich dazu wird die Niereninsuffizienz, welche die Morbidität sehr stark beeinflusst, mit 12 Punkten sehr viel höher bewertet. Die so erzielten Punktwerte werden summiert und ergeben einen Scorewert für den jeweiligen Teilbereich. Im allgemeinen und renalen Teilbereich sind maximal 18 Punkte erreichbar, im neurologischen und kardiovaskulären Teilbereich maximal 20 Punkte. Eine Addition der Punkte aus den vier Teilbereichen des MSSI ergibt den gesamten MSSI Score mit einem Wert von 0 bis 76. Der Schweregrad der Erkrankung wird anhand des gesamten MSSI Scores in mild (< 20 Punkte), moderat (20-40 Punkte) und schwer (> 40 Punkte) eingestuft (Whybra et al. 2004).

2.4.2 Biochemische Evaluation

Die Enzymaktivität der α -Galaktosidase A wurde im Rahmen einer Kooperation mit einem Standardverfahren (Mayes et al. 1981) in Mainz bestimmt. Hierzu wird 4-Methylumbelliferyl-alpha-D-galactopyranosid als Substrat und N-Acetylgalactosamin als Inhibitor der α -Galaktosidase B zur Differenzierung der beiden Enzymaktivitäten eingesetzt. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme wurde keine der Fabry-Patientinnen mit einer Enzyersatztherapie behandelt.

Tabelle 6: Der Mainz Severity Score Index (MSSI): Fortsetzung

Allgemeiner Teilbereich			Neurologischer Teilbereich			Kardiovaskulärer Teilbereich			Renaler Teilbereich		
Symptom	Bewertung	Punkte	Symptom	Bewertung	Punkte	Symptom	Bewertung	Punkte	Symptom	Bewertung	Punkte
Bauchschmerzen	Nein	0	Depression	Nein	0						
	Ja	2		Ja	1						
Durchfall/ Obstipation	Nein	0	Müdigkeit	Nein	0						
	Ja	1		Ja	1						
Hämorrhoiden	Nein	0	Verminderter Antrieb	Nein	0						
	Ja	1		Ja	1						
Pulmonale Symptome	Nein	0									
	Ja	2									
New York Heart Classification	Keine	0									
	Stadium I	1									
	Stadium II	2									
	Stadium III	3									
	Stadium IV	4									
	Maximale Punktzahl	18		Maximale Punktzahl	20		Maximale Punktzahl	20		Maximale Punktzahl	18

2.5 Statistische Methoden

Statistische Analysen wurden mit der Software SPSS 11 durchgeführt.

Mann-Whitney-Test

Die Fragestellung, ob sich das Patientenkollektiv und das Kontrollkollektiv hinsichtlich der X-Inaktivierungsmuster voneinander unterscheiden, wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test untersucht. Hier erfolgt die Berechnung basierend auf Rangunterschieden. Die Werte der beiden Gruppen werden zunächst in einer Gruppe zusammengefasst und in aufsteigender Folge geordnet, anschließend wird jedem Wert seiner Position in der Ordnung entsprechend ein Rang zugewiesen. Für die beiden Gruppen wird die Summe der Rangwerte getrennt berechnet und anhand der sich dabei ergebenden Werte wird getestet, ob sich diese unterscheiden.

Korrelationen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen folgenden Parametern gibt:

- Alter und X-Inaktivierungsmuster der Personen
- X-Inaktivierung und klinische Krankheitsausprägung (MSSI-Werte)
- X-Inaktivierung und α -Galaktosidase A-Enzymaktivität
- MSSI und Alter

Für einen ersten visuellen Eindruck über einen möglichen Zusammenhang zwischen zwei Variablen wurden zunächst Streudiagramme erstellt. Anschließend wurden die entsprechenden Korrelationen analysiert.

Die Stärke des Zusammenhangs zweier Variablen wird durch Berechnung eines Korrelationskoeffizienten untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman's Rho verwendet. Die Werte des Koeffizienten können im Bereich zwischen -1 und +1 liegen. Das Vorzeichen des Koeffizienten gibt die Richtung, der erzielte Wert die Stärke des Zusammenhangs zwischen den betrachteten Variablen an. Das Signifikanzniveau wurde bei $p=0,05$ angesetzt.

2.6 Patienten- und Kontrollkollektiv

Insgesamt wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 28 Frauen aus 19 verschiedenen Familien bezüglich des X-Inaktivierungsstatus untersucht. Die Arbeit entstand in Kooperation mit der Universitätsklinik Mainz, wo die Patientinnen betreut werden. Alle Patientinnen sind

molekulargenetisch bestätigte Trägerinnen von Mutationen im *GAL*-Gen. Bei allen Mutationsträgerinnen war die Enzymaktivität der α -Galaktosidase A in Leukozyten bestimmt worden (Mayes et al. 1981). Zu diesem Zeitpunkt war keine der Patientinnen unter Enzymersatztherapie. Zudem waren alle Frauen klinisch ausführlich in einem tertiären Referenzzentrum charakterisiert worden. Der Schweregrad der Erkrankung war mittels MSSI bestimmt worden (Whybra et al. 2004). Zur Analyse der X-Inaktivierungsmuster der heterozygoten Morbus Fabry-Patientinnen stand DNA (extrahiert aus EDTA-Blut) von 31 Frauen zur Verfügung, drei Proben wurden aufgrund deutlicher Unterschiede im X-Inaktivierungsmuster zwischen den verschiedenen Restriktionsverdau von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Zwei Patientinnen waren monozygote Zwillinge (H22 und H25). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme lag das Alter der Patientinnen zwischen 3 und 71 Jahren (mittleres Alter 36,3 Jahre).

Die X-Inaktivierung wurde über die Fabry-Patientinnen hinaus an einem nach Altersgruppen gematchten Kontroll-Kollektiv aus 56 Frauen untersucht. Ein Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU lag vor. Die Blutproben des Kontroll-Kollektivs stammten aus dem Zentrallabor des Klinikums Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität und wurden anonym gesammelt. Die Frauen des Kontroll-Kollektivs waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen 2 und 73 Jahre alt (mittleres Alter 36,7 Jahre).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der X-Inaktivierung bei Fabry-Patientinnen und Kontrollen

Die X-Inaktivierungsmuster der Frauen wurden mit Hilfe des HUMARA-Assays untersucht (siehe 2.2.1). Die Ergebnisse aus dem *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau wurden gemittelt. Die Einteilung der X-Inaktivierungsmuster erfolgte nach Harris *et al.* (Harris et al. 1992) entsprechend der prozentualen Verteilung der beiden X-Chromosome zueinander in *random* X-Inaktivierung (50:50-64:36%), milde Verschiebung der X-Inaktivierung (65:35-80:20%) und ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung (> 80:20%).

Bei drei Proben von Patientinnen fanden sich deutliche Unterschiede (> 15 Prozentpunkte) im X-Inaktivierungsmuster nach *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau, die sich in mehrfach wiederholten Untersuchungen reproduzieren ließen. Bei einer Probe zeigte sich eine deutlich zugunsten eines Allels verschobene (*skewed*) X-Inaktivierung im *HpaII/RsaI*-Restriktionsverdau und eine *random* X-Inaktivierung nach *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau. Eine zweite Probe wies eine milde Verschiebung der X-Inaktivierung nach *HpaII/RsaI*-Restriktionsverdau und eine *random* X-Inaktivierung nach *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau auf. Die dritte Probe zeigte in beiden Tests eine *random* X-Inaktivierung mit zu hoher Abweichung. Die betreffenden 3 Proben wurden als nicht interpretierbar von der Auswertung der Ergebnisse ausgeschlossen.

Bei den Fabry-Patientinnen wiesen 13 der 28 Frauen (46%) eine *random* X-Inaktivierung auf, 10 (36%) eine milde Verschiebung und 5 (18%) eine ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels. In der Kontrollgruppe zeigten 29 von insgesamt 56 Frauen (52%) eine *random* X-Inaktivierung, 16 (29%) eine milde Verschiebung, und 11 (20%) eine ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung. Die Verteilung der X-Inaktivierungsmuster gleicht bei beiden Gruppen einer Gauss'schen Verteilung. Zwischen Patienten- und Kontroll-Kollektiv zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-Test ($p=0,649$).

Abbildung 6 stellt die Verteilung der X-Inaktivierungsmuster in Leukozyten bei Patientinnen mit Morbus Fabry im Vergleich zu dem nicht-verwandten Kontroll-Kollektiv dar.

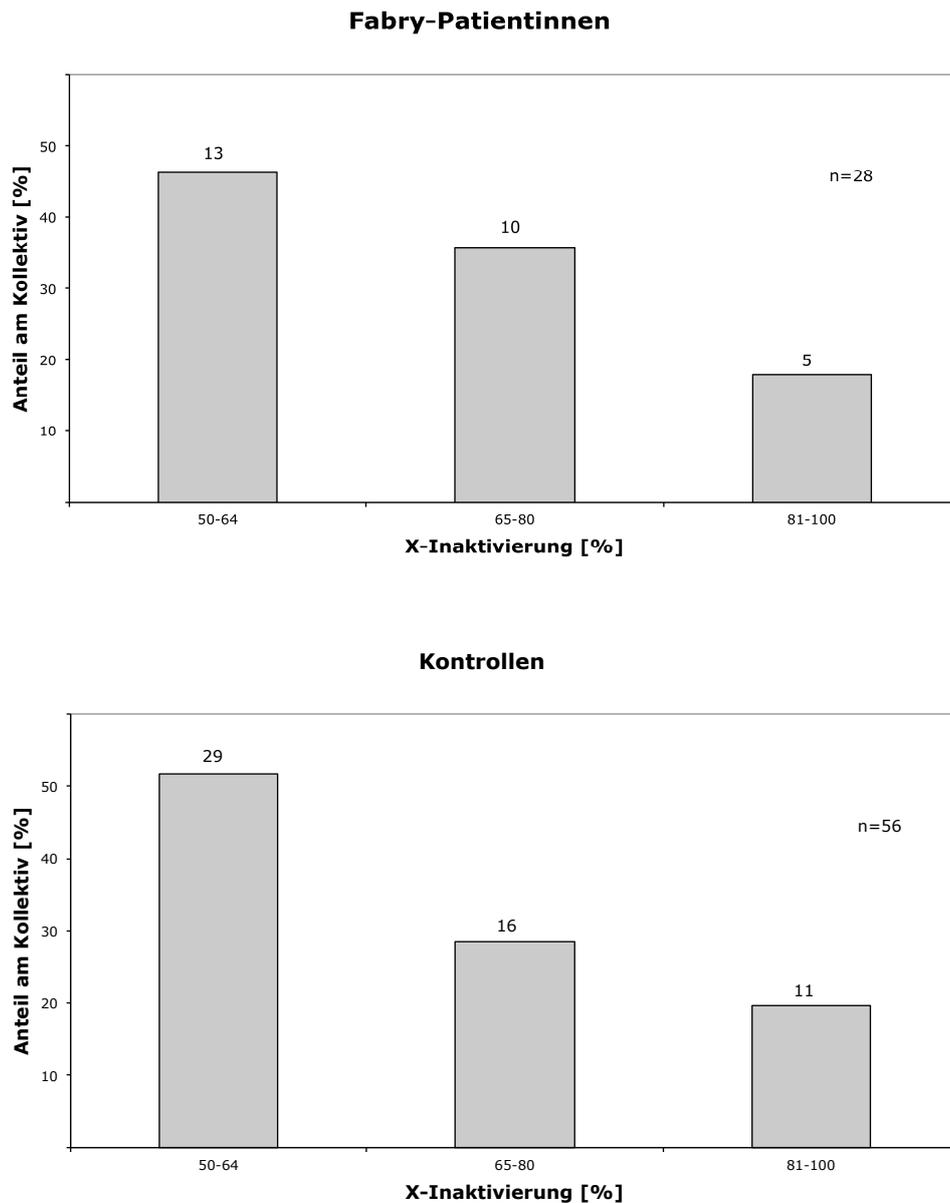


Abbildung 6: Verteilung der X-Inaktivierungsmuster in Leukozyten 28 heterozygoter Morbus Fabry-Patientinnen im Vergleich zu 56 weiblichen Kontrollpersonen.

Eine Einteilung der X-Inaktivierungsmuster erfolgte in *random* X-Inaktivierung (50-64%), milde Verschiebung der X-Inaktivierung (65-80%) und ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung (81-100%) (Harris et al. 1992).

Tabelle 7: Genotyp, X-Inaktivierungsmuster, Enzymaktivität und klinische Scores bei heterozygoten Fabry-Mutationsträgerinnen

Heterozygote	Alter	Genotyp			Phänotyp				
		Mutation	X-Inaktivierung ^a	α-Gal A Aktivität (mU/mg) ^b	Total (0-76) ^c	MSSI Score			
						Allgemein (0-18)	Neurologisch (0-20)	Kardiovaskulär (0-20)	Renal (0-18)
1	31	IVS2+1G>A	92:08	1.008	17	5	12	0	0
2	23	Q321X	84:16	0.176	11	5	6	0	0
3 ^(T12)	14	R220X	84:16	0.845	4	2	2	0	0
4	3	c.744delTA	84:16	0.736	1	1	0	0	0
5	67	R220X	83:17	0.105	38	7	13	10	8
6 ^(S13)	18	c.34del24	80:20	0.877	21	5	9	1	6
7	63	c.912delC	77:23	0.110	29	10	6	5	8
8 ^(M11)	68	W236C	76:24	0.830	44	11	9	16	8
9	17	R301X	76:24	1.031	8	1	5	2	0
10 ^(M24)	71	W340X	75:25	1.297	41	9	14	14	4
11 ^(T8)	37	W236C	74:26	0.500	18	7	7	0	4
12 ^(M3)	54	R220X	70:30	1.237	20	5	7	8	0
13 ^(S6)	17	c.34del24	69:31	0.361	21	7	10	0	4
14	62	A350P	67:33	0.498	36	9	5	14	8
15	20	H46R	67:33	0.355	16	2	8	2	4
16	38	A350P	63:37	0.732	26	3	7	12	4
17	34	N320I	63:37	0.190	22	6	12	0	4
18 ^(S20)	45	IVS5-2delCA	61:39	0.582	37	10	14	1	12
19	36	L129P	60:40	0.460	29	4	11	14	0
20 ^(S18)	31	IVS5-2delCA	60:40	0.190	29	10	15	0	4
21	8	c.1187delT	60:40	0.180	2	1	1	0	0
22 ^(MZZ25)	20	R112H	57:43	1.171	1	1	0	0	0
23	33	c.718delAA	56:44	0.725	17	5	7	1	4
24 ^(T10)	47	W340X	53:47	0.703	26	3	7	8	8
25 ^(MZZ22)	20	R112H	53:47	0.938	25	6	11	0	8
26	50	C52S	53:47	0.766	20	6	6	8	0
27	28	C63Y	51:49	0.338	21	8	13	0	0
28	62	L131P	51:49	0.663	32	9	7	8	8
p ^d				0.768	0.413	0.627	0.563	0.838	0.432

^a Random X-Inaktivierung: 50:50-64:34; milde Verschiebung der X-Inaktivierung: 65:35-80:20; ausgeprägtes Verschiebung der X-Inaktivierung: >80:20

^b AGAL Referenzbereich: 0.23-1.14 mU/mg Protein

^c Milde Erkrankung: MSSI < 20; moderate Erkrankung MSSI 20-40; schwere Erkrankung MSSI >40

^d Nonparametrische Korrelation nach Spearman's rho

MZZ = monozygoter Zwilling

α-Gal A = α-Galaktosidase A; MSSI = Mainz Severity Score Index; T = Tochter; S = Schwester; M = Mutter

3.2 Korrelation der X-Inaktivierung mit der klinischen Manifestation bei Fabry-Patientinnen

Klinische Daten zu in dieser Studie untersuchten Frauen wurden bereits in verschiedenen Publikationen veröffentlicht (Wendrich et al. 2001; Whybra et al. 2001; Kampmann et al. 2002; Baehner et al. 2003). Das Alter der Frauen und Mädchen lag zwischen 3 und 71 Jahren. Die 28 Frauen entstammten 19 verschiedenen Familien. Neben einem monozygoten Zwillingsspaar (H22 und H25) wurden in der Kohorte zwei Schwesternpaare (H6 und H13 sowie H18 und H20) und drei Mutter-Tochterpaare (H3 und H12, H11 und H8 sowie H24 und H10) untersucht. Keine der Frauen und Mädchen war frei von Symptomen; bei drei heterozygoten Mutationsträgerinnen (H4, H21, H22) zeigte sich eine sehr milde Ausprägung der Erkrankung, wie Hypohidrose, Tinnitus oder Akroparästhesien. Bei Ermittlung der Mediane für die klinischen Scores ergab sich ein Wert von 5,5 Punkten für den allgemeinen MSSI (Maximum 18 Punkte), 7,0 für den neurologischen (Maximum 20 Punkte), 1,5 für den kardiovaskulären (Maximum 20 Punkte), und 4,0 für den renalen Teilbereich des MSSI (Maximum 18 Punkte). Für den MSSI Gesamt-Score wurde ein Median von 21 (moderat) ermittelt bei einer maximal möglichen Punktzahl von 76. Entsprechend der Einteilung der Punktwerte des MSSI in verschiedene Schweregrade der Erkrankung waren zwei Patientinnen schwer (> 40), 16 moderat (20-40) und 10 milde (< 20) betroffen (Tabelle 7).

Geht man von einer Korrelation aus, würde man bei den Patientinnen mit den schwersten klinischen Symptomen eine ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung erwarten. Die Patientinnen (H8 und H10) mit einer klinisch schweren Erkrankungsmanifestation zeigten jedoch nur eine moderate Verschiebung der X-Inaktivierungsmuster. Auch wiesen die Patientinnen mit einer ausgeprägten Verschiebung der X-Inaktivierung (H1-H5) lediglich milde bis moderate klinische Beeinträchtigungen auf. Eine ähnlich milde bis moderate Krankheitsmanifestation zeigten auch jene Frauen, die ein *random* X-Inaktivierungsmuster besaßen. Bei dem monozygoten Zwillingsspaar fand sich eine *random* X-Inaktivierung trotz unterschiedlicher phänotypischer Expression, wobei Patientin H22 lediglich milde und Patientin H25 moderate Symptome zeigte.

Der fehlende „offensichtliche“ Zusammenhang konnte auch statistisch bestätigt werden. Zwischen X-Inaktivierung und dem Schweregrad der Erkrankung ergab sich keine signifikante Korrelation nach Spearman's Rho, weder für den MSSI Gesamt-Score ($p=0,413$), noch für den allgemeinen ($p=0,627$), den neurologischen ($p=0,563$), kardiologischen (0,838) oder renalen (0,432) Teilbereich des MSSI (siehe Tabelle 4). In Abbildung 7 wurde exemplarisch der Grad der X-Inaktivierung in Leukozyten gegen den

MSSI total Score der Fabry-Mutationsträgerinnen als Punktwolke aufgetragen, um die fehlende Korrelation zu verdeutlichen.

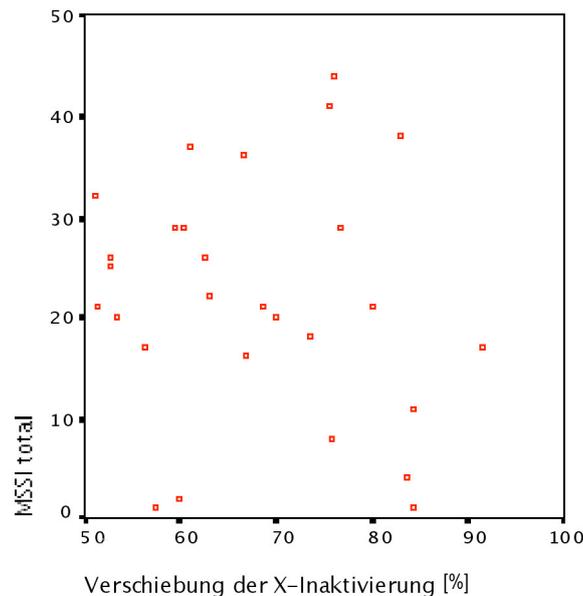


Abbildung 7: Streudiagramm zur Beziehung zwischen dem klinischen MSSI Gesamt-Score-Wert und dem X-Inaktivierungsmuster bei heterozygoten Fabry-Patientinnen.

3.3 Korrelation der X-Inaktivierung mit der α -Galaktosidase A-Enzymaktivität

Die Diagnose männlicher Fabry-Patienten wird durch den Nachweis der deutlich reduzierten bzw. nicht nachweisbaren Enzymaktivität der α -Galaktosidase A gesichert (Mayes et al. 1981). Auch bei heterozygoten weiblichen Trägerinnen des Fabry-Gens kann die Enzymaktivität bestimmt werden, die von nahezu null bis hin zu einer Aktivität entsprechend gesunder Individuen reichen kann (Desnick 2001). Im Unterschied zu Männern ist die α -Galaktosidase A-Aktivität bei Frauen somit diagnostisch nicht beweisend für einen Morbus Fabry. Bei allen 28 Fabry-Patientinnen war die α -Galaktosidase A-Aktivität in Leukozyten bestimmt worden, keine der Frauen war zu diesem Zeitpunkt unter Enzymersatztherapie. Lediglich bei sechs der an Morbus Fabry erkrankten Frauen (H2, H5, H7, H17, H20, H21) konnte eine reduzierte Enzymaktivität nachgewiesen werden. Von diesen Patientinnen zeigte die Hälfte eine ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung, die andere Hälfte eine *random* X-Inaktivierung.

Der Zusammenhang zwischen dem Grad der X-Inaktivierung in Leukozyten (Mittelwert aus dem *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau) und der α -Galaktosidase A-Aktivität in Leukozyten wurde mittels einer Spearman-Rangkorrelation untersucht. Hier konnte jedoch keine signifikante Beziehung zwischen den X-Inaktivierungsmustern der Patientinnen und deren Enzymaktivität nachgewiesen werden ($p=0,768$).

3.4 Korrelation klinischer Manifestationen mit der α -Galaktosidase A-Aktivität

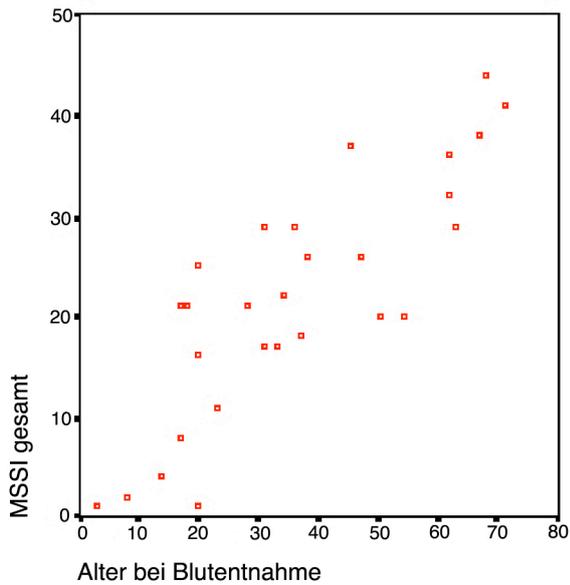
Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität der heterozygoten Fabry-Patientinnen und deren Krankheitsschweregrad zu untersuchen, wurden die Variablen α -Galaktosidase A-Aktivität und MSSI Scorewerte in Bezug zueinander gesetzt. Die Enzymaktivität der α -Galaktosidase A in Leukozyten und die klinischen MSSI Scores ergaben hier jedoch keine signifikante Korrelation nach Spearman's Rho: MSSI gesamt $p=0,382$, MSSI allgemein $p=0,179$, MSSI neurologisch $p=0,464$, MSSI kardiovaskulär $p=0,492$ und MSSI renal $p=0,304$.

3.5 Korrelation von klinischer Manifestation und X-Inaktivierung mit dem Alter

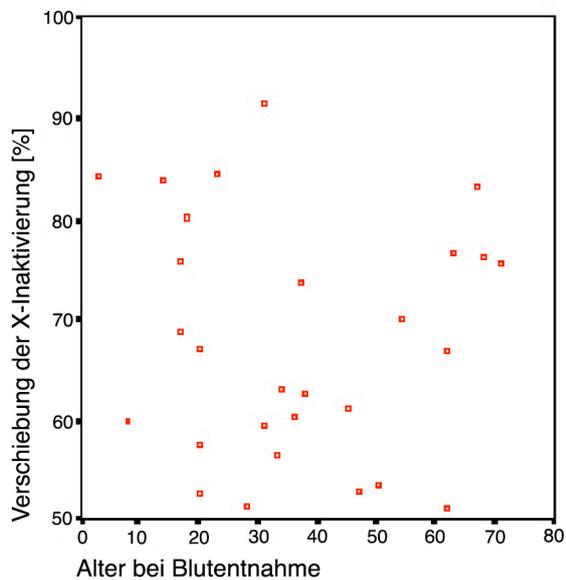
Der Schweregrad der Erkrankung an Morbus Fabry zeigt eine Altersabhängigkeit, der MSSI gesamt Score korrelierte stark mit dem Alter ($p<0,001$). Die Häufigkeit einer verschobenen X-Inaktivierung nimmt mit dem Alter auch bei gesunden Frauen zu. Um zu überprüfen, ob bei älteren Patientinnen mit schwereren Symptomen vermehrt eine Verschiebung der X-Inaktivierung zu finden ist, wurde auch im Patientenkollektiv die Altersabhängigkeit untersucht. Betrachtet man in der vorliegenden Kohorte Patientinnen mit einem Alter von über 40 Jahren und einem gesamten MSSI > 30 , so findet man bei diesen sechs Frauen variable X-Inaktivierungsmuster. Zwei Frauen (H18 und H28) besitzen eine *random* X-Inaktivierung, drei (H8, H10, H14) zeigen eine milde und nur eine Frau (H5) eine starke Verschiebung der X-Inaktivierung. Auch bei jüngeren Frauen konnte eine ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung gezeigt werden. Die vier Frauen mit der größten Verschiebung des X-Inaktivierungsverhältnisses waren 3 bis 31 Jahre alt (H1, H2, H3, H4) und gehörten somit zu den jüngeren Patientinnen. Die Krankheitsaktivität war bei ihnen lediglich milde.

Zwischen dem Alter der Fabry-Patientinnen und dem Ausmaß der X-Inaktivierung konnte in unserem Patientenkollektiv kein Zusammenhang gefunden werden ($p=0,634$). Auch das Alter der Frauen aus der Kontrollgruppe und die X-Inaktivierung korrelierte nicht ($p=0,277$). In Abbildung 8 wurden die Altersabhängigkeit des klinischen Scores (MSSI gesamt) und der fehlende Zusammenhang zwischen Alter und X-Inaktivierungsmustern bei Patientinnen und Kontrollen dargestellt.

a)



b)



c)

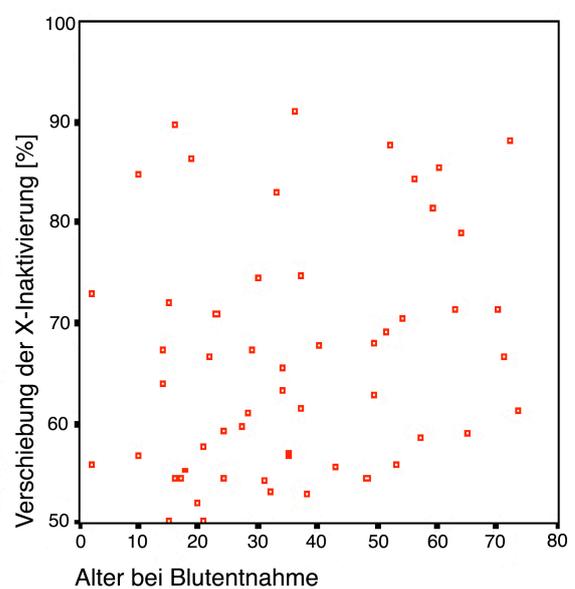


Abbildung 8: Streudiagramme zur Altersbeziehung des klinischen MSSI gesamt Scores der Patientinnen und der X-Inaktivierung bei Patientinnen und Kontrollen. (a) Lineare Zunahme des MSSI-Scores mit dem Alter der Patientinnen ($p < 0,001$) (b) Fehlende Korrelation der X-Inaktivierung der Patientinnen mit dem Alter ($p = 0,634$). (c) Fehlende Korrelation der X-Inaktivierung der Kontrollen mit dem Alter ($p = 0,277$).

3.6 Aktivitätszustand des mutierten Fabry-Allels bei Frauen mit Verschiebung der X-Inaktivierung

Um einen Zusammenhang zwischen der Krankheitsmanifestation heterozygoter Patientinnen und den verschiedenen X-Inaktivierungsmustern erkennen zu können, war es wichtig, zu wissen, ob bei jenen Frauen das Wildtyp-Fabry-Allel oder das mutierte Fabry-Allel inaktiviert war. Hierzu wurde bei den 15 Patientinnen mit einer milden oder ausgeprägten Verschiebung der X-Inaktivierung die parentale Herkunft der Androgen-Rezeptor-Allele untersucht. Fabry-Allel und Androgen-Rezeptor-Allel werden beide X-chromosomal vererbt. Ein Elternteil (Vater oder Mutter) der untersuchten Patientinnen ist jeweils bekannter Überträger von Morbus Fabry, somit war die Herkunft des Fabry-Allels (*GLA*-Allel) bekannt. Die Androgen-Rezeptor-Allele der Patientinnen werden mit den Androgen-Rezeptor-Allelen der Eltern verglichen. Wichtig war insbesondere das Vorliegen einer väterlichen DNA-Probe, da hier keine Rekombinationsereignisse erfolgen können. Von neun Vätern standen keine Proben für Analysen zur Verfügung (in sechs der neun Fälle aufgrund des bereits fortgeschrittenen Alters der Patientinnen). Die parentale Herkunft der Androgen-Rezeptor-Allele wurde bei den übrigen sechs heterozygoten Frauen, die eine Verschiebung der X-Inaktivierung aufwiesen, untersucht (Abbildung 9).

Während für die heterozygoten Mutationsträgerinnen H2, H3 und H9 beide Elternteile zur Verfügung standen, konnte bei den Mutationsträgerinnen H4, H6 und H13 nur der Vater zur Typisierung der Androgen-Rezeptor-Allele herangezogen werden. Das *GLA*-Allel wurde durch den Vater bei den Patientinnen H4, H6 und H13 vererbt, und war bevorzugt inaktiviert bei H4 und H6.

Bei den Patientinnen H2, H3 und H9 stammte das Wildtyp-Fabry-Allel vom Vater. Während bei H2 das Wildtyp-Fabry-Allel inaktiviert war, war das *GLA*-Allel bei H3 und H9 aktiviert. Bei diesen Heterozygoten (H2, H3, H9) wurde somit das Wildtyp-Allel vom Vater vererbt und war bei H2 bevorzugt inaktiviert. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass das Wildtyp-Allel und das Fabry-Allel gleichermaßen aktiviert vorliegen, was für eine zufällige X-Inaktivierung spricht.

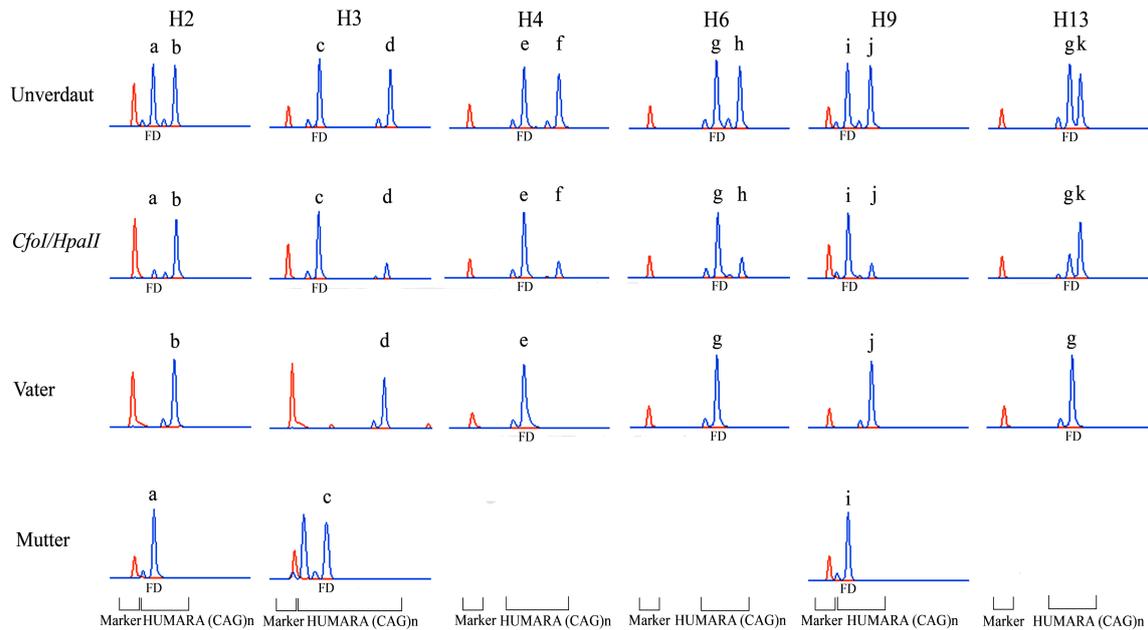


Abbildung 9: Aktivitätszustand des Fabry-Allels bei Fabry-Patientinnen mit stark oder mäßig verschobenen X-Inaktivierungsmustern.

Ziel der Untersuchung war, zu ermitteln, ob das mutierte Fabry-Allel bevorzugt aktiviert oder inaktiviert war. Die X-Inaktivierungsmuster wurden mit dem HUMARA-Assay untersucht, der auf einer Amplifikation eines polymorphen CAG-Repeats im Exon 1 des humanen Androgen-Rezeptor-Gens beruht. Fragmentanalysen der AR-Allele erlaubten so einen Vergleich der parentalen Allele mit den entsprechenden Allelen der Patientinnen, so dass bestimmt werden konnte, ob bei diesen das Wildtyp-Allel oder das mutierte *GLA*-Allel bevorzugt inaktiviert wurde. Patientin H2 zeigt zwei verschiedene AR-Allele (Allele a und b) und erwies sich als heterozygot bezüglich des AR-Repeats, wie die Amplifikation unverdauter genomischer DNA zeigte (Reihe 1, Unverdaut). Nach Verdau mit den methylierungssensitiven Restriktionsenzymen *CfoI* und *HpaII* ist eine Verschiebung der X-Inaktivierung mit bevorzugter Inaktivierung des Allels b (Reihe 2, *CfoI/HpaII*) zu erkennen. Dieses stammt vom gesunden Vater (Reihe 3, Vater). Das mutierte Fabry-Allel, assoziiert mit dem AR-Allel a, wurde von der Mutter der Patientin (Reihe 4, Mutter) übertragen. Folglich ergibt sich bei dieser Patientin eine Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten des mutierten Allels. Patientin H3 stellte sich ebenfalls als heterozygot bezüglich der AR-Allele c und d dar (Reihe 1). Sie zeigte eine Verschiebung der X-Inaktivierung, wobei hier das vom Vater vererbte AR-Allel d in den meisten ihrer Zellen aktiv war. Das von der Mutter stammende AR-Allel c (Reihe 4), welches mit dem mutierten Fabry-Allel assoziiert war, war hier bevorzugt inaktiviert (Reihe 3). Patientin H4 war heterozygot für die AR-Allele e und f. Bei ihr zeigte sich eine Verschiebung der X-Inaktivierung mit bevorzugter Inaktivierung des AR-Allels e (Reihe 2). Dieses Allel wurde zusammen mit dem mutierten Fabry-Allel des Vaters vererbt, was auf eine Verschiebung der X-Inaktivierung mit Favorisierung des Wildtyp-Allels als aktivem Allel hinweist. Patientin 6 (H6) war heterozygot für die AR-Allele g und h und zeigte eine Verschiebung mit bevorzugter Inaktivierung des väterlich vererbten AR-Allels g, welches mit dem mutierten *GLA*-Allel assoziiert war. Patientin 9 (H9) war heterozygot für die AR-Allele i und j und zeigte eine Verschiebung der X-Inaktivierung mit dem väterlich vererbten AR-Allel j als aktives Allel in den meisten ihrer Zellen. Das mütterlich vererbte AR-Allel i, welches assoziiert mit dem mutierten *GLA*-Allel war, wurde bevorzugt inaktiviert. Heterozygote 13 (H13, die Schwester von H6), war heterozygot hinsichtlich der AR-Allele g und k. Sie zeigte eine Verschiebung der Inaktivierung, wobei das väterlich vererbte AR-Allel g, assoziiert mit dem mutierten *GLA*-Allel, bevorzugt aktiv war.

Somit ist bei H2 und H13 das Fabry-Allel bevorzugt aktiviert, bei H3, H4, H6 und H9 das Wild-Typ-Allel.

3.7 Mutationen der Patientinnen

Bei den untersuchten Patientinnen wurden insgesamt 20 verschiedene Mutationen unterschiedlicher Art identifiziert (Tabelle 7): Nonsense, Missense, Splice site-Mutationen und Deletionen. Alle Mutationen bis auf die Mutation c.1187delT sind bereits in der Literatur beschrieben. Eine Mutation, die in einem Stop-Codon resultierte, lag bei 7 der 28 Frauen vor, wobei es sich hier um vier verschiedene Mutationen (R220X, R301X, Q321X, W340X) handelte. R220X wurde bei zwei verschiedenen Familien unseres Patientenkollektivs gefunden. Missense-Mutationen fanden sich bei 12 Frauen (H46R, C52S, C63Y, R112H, L129P, L131P, W236C, N320I, A350P). R112H ist eine Mutation, die häufiger bei Patienten gefunden wurde, wobei Patienten aus den USA und aus Österreich beschrieben worden sind (Schafer et al. 2005). Bei männlichen Patienten sind bei dieser Mutation sowohl die klassische Manifestationsform als auch atypische Varianten der Erkrankung beschrieben (Eng et al. 1994; Ashton-Prolla et al. 2000; Altarescu et al. 2001). R301X wird ebenso bei „klassischen“ Fabry-Patienten und oligosymptomatischen Patienten mit Nierenerkrankung bzw. Schmerzen als Krankheits-Manifestation gefunden (Eng et al. 1994; Blaydon et al. 2001; Germain et al. 2002). Mutationen im Sinne von Deletionen oder Insertionen, welche zu Frameshift-Veränderungen führen können, wiesen sechs der Patientinnen auf (c.34del24, c.718delAA, c.744delTA, c.912delC, c.1187delT). Drei Patientinnen zeigten Splicing-Mutationen (IVS2+1G>A, IVS5-2delCA). Eine eindeutige Genotyp-Phänotypkorrelation findet sich bezüglich der vorliegenden Mutationen weder in der Literatur noch in unserem Patientenkollektiv.

4. DISKUSSION

Morbus Fabry ist eine X-chromosomal vererbte genetisch bedingte Erkrankung. Das Gen, das für das Enzym α -Galaktosidase A kodiert, unterliegt der X-Inaktivierung, wie Untersuchungen an kultivierten Fibroblasten heterozygoter Mutationsträgerinnen zeigten (Romeo et al. 1970).

Von den klinischen Ausprägungen X-chromosomal gebundener Erkrankungen sind vorwiegend Männer betroffen, während weibliche Individuen im Allgemeinen symptomfrei bleiben (Puck et al. 1998). Beispiele hierfür sind neben zahlreichen weiteren Erkrankungen das Wiskott-Aldrich-Syndrom, die Agammaglobulinämie, das Severe Combined Immunodeficiency Syndrom, aber auch das Barth Syndrom und die Dyskeratosis congenita. Eine wichtige Rolle dabei spielt die X-Inaktivierung. In jeder weiblichen somatischen Zelle wird während der frühen Embryonalentwicklung eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert. Dieser Mechanismus führt zum Ausgleich der Gendosis im Vergleich zu männlichen Zellen, die nur über ein X-Chromosom verfügen (Lyon 1961). Nach dem Zufallsprinzip entscheidet sich in jeder einzelnen Zelle, ob das paternale oder das maternale X-Chromosom inaktiviert wird, so dass die Gewebe weiblicher Individuen aus einem Mosaik zweier Zellpopulationen bestehen, die jeweils Gene eines der beiden Chromosomen exprimieren. Da jede der beiden Zellpopulationen in der Regel annähernd den gleichen Beitrag zu diesem Mosaik leistet, und somit das Wildtyp-Allel in etwa 50% der Zellen aktiv ist, reicht das Genprodukt der gesunden Zellen gewöhnlich aus, um Frauen vor den klinischen Symptomen X-chromosomaler Krankheiten zu bewahren (Puck et al. 1998).

In den letzten Jahren jedoch zeigten detaillierte systematische Untersuchungen großer Kollektive, dass die Mehrzahl der heterozygoten Mutationsträgerinnen von Morbus Fabry die charakteristischen biochemischen und klinischen Symptome der Erkrankung aufweisen (MacDermot et al. 2001; Whybra et al. 2001; Kampmann et al. 2002). Analysen der Datenbank FOS (*Fabry Outcome Survey*) belegen, dass heterozygote Mutationsträgerinnen das gesamte Spektrum klinischer Symptome zeigen, wenn auch mit höherer Variabilität bezüglich des Alters bei Beginn der Organbeteiligung und mit langsamerer Progressionsgeschwindigkeit (Mehta et al. 2004). Die Auswirkungen der Erkrankung können bei Frauen und Männern zu einer vergleichbaren Beeinträchtigung der Lebensqualität im Alltag führen (Street et al. 2006; Wang et al. 2007; Wilcox et al. 2008). Die betroffenen Frauen sollten daher nicht länger als „symptomatische Überträgerinnen“, sondern als Patientinnen bezeichnet werden.

Das Auftreten von klinischen Symptomen bei fast allen heterozygoten Fabry-Patientinnen entspricht einer Krankheitspenetranz von nahezu 100% (Mehta et al. 2004). Dies ist eine sehr ungewöhnliche Beobachtung bei einer X-chromosomal vererbten Erkrankung (Dobyns et al. 2004). Als zugrunde liegender Pathomechanismus hierfür wurde in der Vergangenheit von verschiedenen Autoren eine Verschiebung der X-Inaktivierung postuliert (Davies et al. 1993; Eng et al. 1994; Ashton-Prolla et al. 1999; Whybra et al. 2001; Rodriguez-Mari et al. 2003; Hauser et al. 2004; Masson et al. 2004; Mehta et al. 2004; Stromberger et al. 2004), jedoch nur experimentell an einzelnen Patientinnen gezeigt (Redonnet-Vernhet et al. 1996; Morrone et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde nun die X-Inaktivierung in Leukozyten eines umfangreichen, eingehend klinisch, biochemisch sowie molekulargenetisch charakterisierten Patientinnen-Kollektives im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe untersucht.

Verschiebungen der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels finden sich 1) als Varianten eines zufälligen Prozesses, 2) bei Störungen des X-Inaktivierungsprozesses selbst, oder 3) im Rahmen von nach dem Inaktivierungsprozess auftretenden Selektionsfaktoren (Puck et al. 1998). Die beiden erst genannten Gründe finden sich beim Menschen selten (Lyon 2002) und treten unabhängig vom Vorhandensein eines mutierten Allels auf. Beide Mechanismen könnten so allenfalls die Existenz von Symptomen bei einer geringen Anzahl von Fabry-Mutationsträgerinnen erklären, nicht aber Krankheitsmanifestationen bei der überwiegenden Mehrzahl von Mutationsträgerinnen. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von klinischen Symptomen bei der Mehrzahl von Mutationsträgerinnen sind Selektionsmechanismen, welche zu einer Favorisierung des mutierten Allels führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die X-Inaktivierung in Leukozyten von 28 Fabry-Patientinnen im Vergleich zu einem altersentsprechenden Kontrollkollektiv untersucht. Es zeigte sich eine zufällige X-Inaktivierung (50:50 – 64:36) bei 46% der Patientinnen, eine milde Verschiebung (65:35 – 80:20) bei 36% und eine ausgeprägte Verschiebung ($> 81:19$) bei 18% der Mutationsträgerinnen. Eine ähnliche Verteilung der X-Inaktivierungsmuster fand sich in der Kontrollgruppe. 52% der Kontrollen zeigten eine zufällige X-Inaktivierung, 29% eine milde und 20% eine ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung. Zwischen den X-Inaktivierungsmustern der beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Patientinnen mit Morbus Fabry weisen somit eine zufällige X-Inaktivierung auf und zeigen im Vergleich zum Kontrollkollektiv nicht häufiger Verschiebungen der X-Inaktivierung. Der von uns beobachtete Anteil an Frauen mit einer verschobenen X-Inaktivierung innerhalb des Patienten- und Kontrollkollektivs war vergleichbar zu den Kontroll-Kollektiven ähnlicher Studien (Oostra et al. 1996; Kristiansen et al. 2003;

Kristiansen et al. 2003; Knudsen et al. 2007; Gong et al. 2008; Yoon et al. 2008; Siskind et al. 2011). Auch in diesen Studien fanden sich bei 11-30% der Frauen verschobene X-Inaktivierungsmuster. In anderen Untersuchungen lag der Anteil von Probandinnen mit Verschiebung der X-Inaktivierung etwas niedriger (Harris et al. 1992; Orstavik et al. 1998; Brix et al. 2005; Amos-Landgraf et al. 2006). Der Grund für diese Unterschiede mag neben stochastischen Gründen auch im durchschnittlichen Alter der untersuchten Individuen zu suchen sein, da ältere Frauen häufiger eine Verschiebung der X-Inaktivierung zeigen als jüngere Frauen (Sharp et al. 2000).

Postuliert man einen Zusammenhang zwischen X-Inaktivierung und klinischer Ausprägung von Krankheitssymptomen, würde man erwarten, dass diejenigen Patientinnen, die klinisch stark von der Erkrankung betroffen sind, auch eine ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung zeigen. Entsprechend sollten Patientinnen, die nur eine leichte Verschiebung der X-Inaktivierung aufweisen, eine nur milde Symptomatik bieten. In unserem Kollektiv fand sich jedoch bei den beiden Patientinnen (H8 und H10) mit einer schweren Krankheitsausprägung (Gesamt-MSSI > 40) nur eine moderate Verschiebung der X-Inaktivierung. Wenn man die Gruppe der zehn Patientinnen betrachtet, deren Krankheitsmanifestation nach dem MSSI als mild eingestuft wurde, waren diese Frauen hinsichtlich der X-Inaktivierungsmuster heterogen: es fanden sich drei Patientinnen mit milder, drei mit mäßiger und vier mit ausgeprägter Verschiebung der X-Inaktivierung. Umgekehrt zeigten in unserem Kollektiv die Frauen mit der am deutlichsten verschobenen X-Inaktivierung (H1 und H2) nur eine milde Krankheitsaktivität.

Diese Beobachtungen konnten auch durch statistische Berechnungen bestätigt werden. Der klinische Phänotyp der Patientinnen wurde mit Hilfe eines speziell für den Morbus Fabry entwickelten Scoring Systems, dem MSSI, bestimmt (Whybra et al. 2004). Ähnliche Scoring Systeme existieren bereits für andere Erkrankungen, wie z.B. für die X-chromosomal rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit Morbus Gaucher (Zimran et al. 1989; Zimran et al. 1992). Beim MSSI werden den krankheitstypischen Symptomen Punktwerte entsprechend ihres Beitrags zur Morbidität zugeordnet, um eine Abschätzung des Schweregrads der Erkrankung zu ermöglichen. Ob es, wie häufig postuliert, einen Zusammenhang zwischen X-Inaktivierung und klinischem Phänotyp innerhalb des gesamten Kollektivs gibt, wurde mittels einer Spearman Rangkorrelation untersucht. Es zeigte sich in unserer Studie jedoch keine signifikante Korrelation zwischen X-Inaktivierungsmuster und den von den Patientinnen im MSSI erzielten Werten, weder beim Gesamt-MSSI, noch bei den die verschiedenen Organsysteme repräsentierenden Teilbereichen des Scores.

Bei Anwendung des MSSI-Systems bestehen Limitationen. So wurde der MSSI bislang nicht unabhängig validiert. Er fasst jedoch die spezifischen Aspekte der Erkrankung in geeigneter Weise zusammen und stellt ein wertvolles Mittel dar, den Schweregrad der Erkrankung zu erfassen. Inzwischen wurde er darüber hinaus von einer Reihe anderer Arbeitsgruppen in ähnlichen Studien angewendet (Ries et al. 2003; Dobrovolny et al. 2005; Deegan et al. 2006; Parini et al. 2008).

Der MSSI-Score nimmt mit dem Alter zu und spiegelt somit den natürlichen progredienten Verlauf der Multisystemerkrankung Morbus Fabry wider. Mehta *et al.* konnten anhand der Daten der in der FOS-Datenbank registrierten Patienten zeigen, dass bei beiden Geschlechtern die Anzahl der von der Krankheit in Mitleidenschaft gezogenen Organe mit steigendem Alter zunimmt, wobei allerdings bei männlichen Patienten im Mittel mehr Organe betroffen sind (Mehta et al. 2004). Auch das von uns untersuchte Patientinnen-Kollektiv zeigte eine deutliche Korrelation zwischen Alter und Gesamt-MSSI als Ausdruck des Schweregrades der klinischen Symptomatik. X-Inaktivierungsmuster in Leukozyten zeigen mit zunehmendem Alter ebenso eine zunehmende Neigung zu verschobenen X-Inaktivierungsmustern. Dies wird mit dem hohen Selektionsdruck auf die sich rasch teilenden Blutzellen erklärt, der im Laufe der Zeit zu einem Verlust von Zell-Linien führt, welche eine für Wachstum und Proliferation nachteilige Mutation tragen. Dieser Effekt war überraschenderweise bei uns weder im Patientinnen- noch im Kontrollkollektiv nachweisbar. Sehr wahrscheinlich ist diese Beobachtung auf die geringe Stichprobengröße zurückzuführen. Während ein altersbedingter Effekt auf die X-Inaktivierung in einer Reihe von Publikationen beschrieben wird (Tonon et al. 1998; Kristiansen et al. 2003; Broen et al. 2010), ist dieser Effekt in anderen Kohorten ähnlich wie in unserer Untersuchung nicht zu beobachten (Knudsen et al. 2007; Yoon et al. 2008).

Neben klinischen Parametern der Patientinnen stand im Rahmen unserer Studie auch die Enzymaktivität der α -Galaktosidase A als biochemischer Parameter der Erkrankung zur Verfügung. Heterozygote Mutationsträgerinnen von Morbus Fabry können verminderte, aber auch normale Enzymaktivitäten aufweisen (Fensom et al. 1980; Mehta et al. 2004; Dajnoki et al. 2010). In dem von uns untersuchten Kollektiv wiesen sechs der Patientinnen verminderte Enzymaktivitäten auf. Diese Frauen zeigten sowohl *random* wie auch verschobene X-Inaktivierungsmuster. Auch statistisch konnte zwischen der Enzymaktivität der α -Galaktosidase A und der X-Inaktivierung kein Zusammenhang hergestellt werden. Betrachtet man die klinische Krankheitsausprägung der Patientinnen mit verminderter Enzymaktivität, so hatten vier dieser sechs Patientinnen entsprechend dem MSSI einen moderaten

Schweregrad der Erkrankung, zwei Patientinnen eine nur milde Manifestation. Somit bietet auch die residuale Enzymaktivität keine ausreichende Erklärung für das Auftreten der klinischen Symptomatik der von uns untersuchten Patientinnen. Dieser fehlende Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Krankheit bei Frauen und deren Plasma- oder Leukozytenaktivität der α -Galaktosidase A konnte anhand der Daten der FOS bestätigt werden (Deegan et al. 2006).

Unsere Daten zeigen, dass Fabry-Patientinnen keine vermehrte Neigung zu einer verschobenen X-Inaktivierung zeigen, sondern wie die meisten für X-chromosomale Erkrankungen heterozygote Frauen eine zufällige X-Inaktivierung aufweisen (Migeon 1998; Lyon 2002). Passend hierzu konnten wir durch unsere Untersuchung zeigen, dass bei den Frauen, die eine Verschiebung der X-Inaktivierung aufweisen, einmal das mutierte und einmal das Wildtypallel bevorzugt inaktiviert wurde. Auch diese Beobachtung zeigt, dass es sich bei der X-Inaktivierung von Patientinnen mit Morbus Fabry um einen zufälligen Prozess handelt. Sie widerlegt darüber hinaus die Hypothese des Auftretens von Selektionsmechanismen bei Morbus Fabry, da Selektionsmechanismen stets unidirektional zugunsten eines Allels wirken und somit alle Mutationsträgerinnen das gleiche Allel bevorzugt inaktivieren müssten. Unseren Daten zufolge kann weder das Auftreten noch die Schwere der Krankheitssymptome bei Fabry-Patientinnen mit dem Auftreten und dem Ausmaß einer Verschiebung der X-Inaktivierung korreliert werden.

Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Symptomen bei heterozygoten Mutationsträgerinnen von Morbus Fabry und der Lyon-Hypothese wurde zwar häufig postuliert, in der Literatur finden sich jedoch nur wenige, insgesamt drei Vorarbeiten zu diesem Thema, in denen die X-Inaktivierung von Fabry-Mutationsträgerinnen experimentell untersucht wurde (Redonnet-Vernhet et al. 1996; Morrone et al. 2003; Dobrovolny et al. 2005).

Eine 2005 veröffentlichte Studie untersuchte die X-Inaktivierungsmuster von 39 Patientinnen mit Morbus Fabry und setzte diese in Bezug zum Schweregrad der klinischen Krankheitsmanifestation (Dobrovolny et al. 2005). Zur Untersuchung der X-Inaktivierungsmuster wurde jedoch ein anderer Schwellenwert gewählt. Als signifikante Verschiebung der X-Inaktivierung wurde hier eine Ratio $> 75:25$ definiert. Bei Anwendung des von uns verwendeten Schwellenwerts zeigte sich aber auch in dieser Studie ein mit 29% vergleichbarer Anteil von Mutationsträgerinnen mit Verschiebung der X-Inaktivierung wie in unserer Studie mit 32% der Patientinnen. Somit zeigt sich auch in diesem Kollektiv von Fabry-Patientinnen eine zufällige Verteilung der X-Inaktivierungsmuster ohne ein gehäuftes

Auftreten von verschobenen X-Inaktivierungsmustern, da auch hier die X-Inaktivierungsmuster insgesamt vergleichbar mit Kontrollkollektiven sind (Kristiansen et al. 2003; Maier et al. 2006; Siskind et al. 2011).

In der tschechoslowakischen Studienpopulation fand sich entgegen unserer Beobachtungen bei 10 der 11 Frauen mit verschobener X-Inaktivierung eine bevorzugte Inaktivierung des Wildtyp-*GLA*-Allels. Diese unseren Daten scheinbar widersprechende Beobachtung ist sehr wahrscheinlich auf die geringe Anzahl an Probandinnen zurückzuführen, die für diese Analyse zur Verfügung standen. Interessanterweise zeigten die 10 Patientinnen mit der Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten des mutierten *GLA*-Allels den Autoren zufolge jedoch eine raschere Krankheitsprogression im Vergleich zu den übrigen symptomatischen Frauen mit einer zufälligen X-Inaktivierung und der Überträgerin mit der Verschiebung zugunsten des Wildtyp-*GLA*-Allels.

Obwohl eine Verschiebung der X-Inaktivierung mit vergleichbarer Häufigkeit zur Normalbevölkerung (30%) vorliegt, jedoch die überwiegende Mehrzahl der Fabry-Mutationsträgerinnen klinische Symptome entwickelt, schlussfolgerten Dobrovolny *et al.* dass X-Inaktivierung als entscheidender Faktor die Morbidität der Erkrankung bei Frauen mit Morbus Fabry determiniert. Diese Sichtweise wird durch die Ergebnisse unserer Studie nicht unterstützt. Da nur ein geringer Anteil der von uns untersuchten Patientinnen eine Verschiebung der X-Inaktivierung aufweist, ist diese nicht der Pathomechanismus, der dem Auftreten von Symptomen bei nahezu allen Fabry-Patientinnen zugrunde liegt.

Zwei weitere Fallberichte beschreiben die Assoziation zwischen einer ausgeprägten Verschiebung der X-Inaktivierung und dem klinischen Phänotyp bei einem monozygoten Zwillingsspaar und vier weiblichen Mutationsträgerinnen einer Familie (Redonnet-Vernhet et al. 1996; Morrone et al. 2003).

Redonnet-Vernhet *et al.* berichten von einem monozygoten weiblichen Zwillingsspaar mit unterschiedlicher phänotypischer Expression von Morbus Fabry. Die asymptotische Zwillingsschwester zeigte hierbei in Fibroblasten eine ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten des Wildtyp-Allels. Bei der klinisch an Morbus Fabry erkrankten Schwester hingegen wurde das mutierte Fabry-Allel in der Mehrzahl der Zellen bevorzugt exprimiert (Redonnet-Vernhet et al. 1996). Eine in verschiedene Richtungen ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung in Assoziation mit einer divergierenden phänotypischen Krankheits-Expression ist jedoch ein häufig beschriebenes Phänomen bei monozygoten weiblichen Zwillingen mit heterozygoten Mutationen X-chromosomaler Krankheitsgene. Ähnliche Fallberichte existieren für eine Vielzahl weiterer X-chromosomal vererbter

Erkrankungen wie der Hämophilie A, der Muskeldystrophie Duchenne (Burn et al. 1986; Richards et al. 1990; Lupski et al. 1991), Morbus Hunter (Winchester et al. 1992), Fragiles X-Syndrom (Willemsen et al. 2000), Retinitis Pigmentosa (Berghmans et al. 2011) und hypophosphatämischer Rachitis (Owen et al. 2009).

Divergierende X-Inaktivierungsmuster bei monozygoten Zwillingen, d.h. eine ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung in unterschiedliche Richtungen, wurden mehrfach beschrieben. Diese Beobachtung wird auf die zum Zeitpunkt der X-Inaktivierung bzw. der Entstehung der Zwillinge in der Embryonalzeit vorliegende niedrige Zellzahl und damit erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Verschiebung zurückgeführt (Monteiro et al. 1998; Puck 1998). Liegt zusätzlich zur ausgeprägten Verschiebung der X-Inaktivierung eine Heterozygotie bezüglich einer X-chromosomalen Erkrankung vor, kommt es so zur unterschiedlichen Ausprägung klinischer Symptome. Die beobachtete Verschiebung der X-Inaktivierung bei dem Zwillingenspaar mit Morbus Fabry (Redonnet-Vernhet et al. 1996) steht somit nicht in Zusammenhang mit dem mutierten Fabry-Allel und kann nicht als Kausalität für das Auftreten von Symptomen bei allen Fabry-Patientinnen herangezogen werden.

Auch im Rahmen unserer Studie wurde die X-Inaktivierung eines monozygoten Zwillingenspaars untersucht (H22 und H25). Beide Frauen zeigten eine zufällige X-Inaktivierung bei deutlich unterschiedlicher Krankheitsausprägung. Bei diesem Zwillingenspaar lässt sich die differierende Krankheitsexpression nicht durch Unterschiede in der X-Inaktivierung in Leukozyten erklären. Redonnet-Vernhet *et al.* fanden jedoch auch bei ihrem Zwillingenspaar in Leukozyten ähnliche α -Galaktosidase A-Werte und X-Inaktivierungsratios, während sich die Werte in Fibroblasten, entsprechend dem klinischen Phänotyp, deutlich unterschieden (Redonnet-Vernhet et al. 1996). Unterschiede der X-Inaktivierung in unterschiedlichen Geweben können bei dem von uns untersuchten Zwillingenspaar nicht ausgeschlossen werden und könnten eine Erklärung für die verschiedenartige Ausprägung von Krankheitssymptomen bei diesem Zwillingenspaar sein.

Ein weiterer Fallbericht beschreibt eine Assoziation zwischen X-Inaktivierung in Leukozyten und klinischem Phänotyp bei zwei symptomatischen und zwei asymptomatischen weiblichen Fabry-Mutationsträgerinnen einer Familie, die eine ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung in gegensätzliche Richtungen zeigen (Morrone et al. 2003). Auch die bei den Mutationsträgerinnen (zwei Schwestern und deren Töchter) dieser Arbeit beschriebene Verschiebung ist nicht sicher auf das mutierte Fabry-Allel zurückzuführen. Eine familiäre, genetisch bedingte Verschiebung der X-Inaktivierung ist in einer Reihe von Familien beschrieben und auf verschiedene Gen-Loci zurückgeführt worden (Naumova et al. 1996;

Pegoraro et al. 1997; Plenge et al. 1997; Naumova et al. 1998; Bicocchi et al. 2005; Cau et al. 2006) und kann auch gemeinsam mit genetischen Syndromen auftreten, ohne kausal durch diese bedingt zu sein (Kloska et al. 2010). Auch bei den von Morrone *et al.* beschriebenen Fabry-Mutationsträgerinnen wäre eine familiäre Verschiebung der X-Inaktivierung als Ursache der unterschiedlichen Ausprägung von Symptomen denkbar. Betrachtet man das den Frauen gemeinsame X-Chromosom mit dem Fabry-Allel, so findet man beim jeweiligen Mutter-Tochter-Paar die X-Inaktivierung in die gleiche Richtung verschoben, eine Beobachtung, die mit familiären Inaktivierungsmustern einhergehen kann. Rekombinationsereignisse in dieser Familie sind jedoch nicht sicher auszuschließen, da eine Untersuchung väterlicher Allele nicht erfolgt war. Ein familiäres X-Inaktivierungsmuster einer Großfamilie mit einer extremen Verschiebung der X-Inaktivierung in unterschiedliche Richtung kann z.B. auf Rekombinationsereignisse zurückgeführt werden (Naumova et al. 1996).

Zwei der von Morrone *et al.* untersuchten Fabry-Mutationsträgerinnen waren mit einem Alter von 6 bzw. 8 Jahren sehr jung. Die Erkrankung manifestiert sich oft früh, allerdings selten mit schweren Symptomen bereits im ersten Lebensjahrzehnt (Ries et al. 2003; Ries et al. 2005). Bei den in der FOS registrierten Fabry-Patientinnen traten erste Krankheitssymptome in der zweiten Dekade auf (Deegan et al. 2006). Symptome der Erkrankung sind oft erst in späterem Lebensalter zu erwarten und somit bei dem zum Zeitpunkt der Veröffentlichung als asymptomatisch bezeichneten Mädchen nicht ausgeschlossen.

Wir konnten anhand unserer Daten zeigen, dass obwohl die Mehrzahl der Fabry-Mutationsträgerinnen klinische Symptome zeigt, sich im Vergleich zur Normalbevölkerung kein gehäuftes Auftreten von verschobenen X-Inaktivierungsmustern findet. Eine Verschiebung der X-Inaktivierung kann somit nicht der hauptsächlich zugrunde liegende Pathomechanismus sein. Dennoch findet sich in Einzelfällen ein Zusammenhang zwischen X-Inaktivierung und klinischer Ausprägung. In diesen Fällen steht jedoch die Verschiebung der X-Inaktivierung nicht in Zusammenhang mit dem Vorhandensein des mutierten Fabry-Allels, wie z.B. bei zufälliger (stochastisch bedingter) Verschiebung der X-Inaktivierung, im Rahmen familiärer X-Inaktivierungsmuster oder bei monozygoten Zwillingspaaren.

Wie die Mehrzahl der Untersuchungen zur X-Inaktivierung bei heterozygoten Mutationsträgerinnen von X-chromosomalen Erkrankungen, haben auch wir die X-Inaktivierungsmuster in Leukozyten untersucht. Diese sind zum einen leicht zugänglich, zum anderen sind Selektionsmechanismen an diesem Gewebe aufgrund des hohen Selektionsdruckes am ehesten nachzuweisen (Migeon 1998; Lyon 2002).

Gewebespezifische Unterschiede der X-Inaktivierung werden inkonstant beobachtet. In verschiedenen Arbeiten werden diese wiederholt beschrieben, jedoch ist die Ausprägung unterschiedlich und nur in wenigen Proben untersucht (Gale et al. 1994; Sharp et al. 2000; Vickers et al. 2006). Die Übereinstimmung zwischen verschiedenen Gewebeproben nimmt mit dem Alter merklich ab, sodass auch hier eine Zunahme der Verschiebung der X-Inaktivierung aufgrund von unspezifischen Selektionsmechanismen in Geweben mit hoher Proliferationsrate rascher zu erwarten ist (Sharp et al. 2000). Ähnliche X-Inaktivierungsmuster finden sich in Geweben gleichen embryonalen Ursprungs (Vickers et al. 2006).

Bei heterozygoten Frauen mit Morbus Fabry wurde kein signifikanter Unterschied in den X-Inaktivierungsmustern von peripheren Blut-Leukozyten, Zellen des Urinsediments und Wangenschleimhautepithelien der einzelnen Individuen beschrieben (Dobrovolny et al. 2005). Herz- und Nierengewebe symptomatischer Fabry-Patientinnen besteht aus zwei Zellpopulationen, normalen Zellen und Zellen mit Lipidakkumulation (Gubler et al. 1978; Itoh et al. 1996; MacDermot et al. 2001). Letztlich kann, wenn es auch eher unwahrscheinlich erscheint, grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden, dass in anderen Geweben oder Organen, die bei Morbus Fabry betroffen sind, wie z.B. Niere, Gehirn, Herz oder Endothelzellen, dennoch ein Zusammenhang zwischen X-Inaktivierungsmuster und Fabry-Phänotyp zu beobachten wäre.

Wieso zeigen aber nun weibliche Fabry-Mutationsträgerinnen trotz *random* X-Inaktivierungsmustern klinische Symptome der Erkrankung? Im Allgemeinen sind weibliche Überträgerinnen X-gebundener Erkrankungen meist frei von Symptomen, da sie ein Mosaik aus zwei Zellpopulationen darstellen, bei denen im Durchschnitt die Hälfte der Zellen das mutierte Allel auf dem aktiven X-Chromosom trägt, während die andere Hälfte das Wildtyp-Allel exprimiert. Diese funktionell normalen Zellen produzieren ausreichend Genprodukt, um klinische Effekte der X-chromosomal vererbten Erkrankung zu verhindern. Andererseits kann aber auch ein Wachstumsunterschied zwischen diesen beiden Zellpopulationen bestehen, der dann aufgrund eines Selektionsnachteils zu einer Elimination von Zellen führen kann, welche das mutierte Gen exprimieren (Migeon 1998; Puck et al. 1998). Ein ausgeprägter Selektionsnachteil resultiert in einem frühen Verlust der benachteiligten Zellpopulation und in einer starken Verschiebung der X-Inaktivierung, während ein geringerer Selektionsdruck zu einem graduellen Verlust der benachteiligten Zellpopulation über das gesamte Leben und zu einer Verschiebung der X-Inaktivierung bei älteren heterozygoten Frauen führt (Migeon

1998). Tatsächlich zeigt sich in der Population gesunder Frauen mit dem Alter eine zunehmend verschobene X-Inaktivierung.

Aufgrund der beobachteten Altersabhängigkeit von ausgeprägter Verschiebung der X-Inaktivierung wurde in der vorliegenden Arbeit ein nach dem Alter gematchtes Kontrollkollektiv verwendet. Unterschiede in den X-Inaktivierungsratios zwischen den Fabry-Patientinnen und dem Kontrollkollektiv konnten nicht gezeigt werden. Eine altersbedingte Zunahme der Verschiebung der X-Inaktivierung konnte bei unseren Fabry-Patientinnen und bei den entsprechenden Kontrollen nicht nachgewiesen werden. Ursächlich kann zum Beispiel eine nicht ausreichende Größe der Stichprobe sein. Ähnliches wird auch in anderen Studien berichtet, z.B. bei X-chromosomaler hypohydrotischer ektodermaler Dysplasie (Lexner et al. 2008).

Betrachtet man die Morbidität bei Mutationsträgerinnen von Morbus Fabry über die Zeit, so findet sich ein starker Zusammenhang zwischen dem Alter der Patientinnen und dem Schweregrad der Krankheitsmanifestationen, repräsentiert durch den MSSI. Zwei der älteren Patientinnen aus unserem Kollektiv (H18 und H28) zeigten eine schwere Krankheitsmanifestation trotz *random* X-Inaktivierungsmustern. Die Krankheitsprogression scheint somit den natürlichen Verlauf der Erkrankung widerzuspiegeln. Eine zunehmende Krankheitsausprägung im Laufe der Zeit findet man auch bei männlichen Fabry-Patienten, wobei hier die Erkrankung jedoch schneller voranschreitet (Mehta et al. 2004; Whybra et al. 2004). Die klinische Symptomatik bei weiblichen Überträgerinnen von Morbus Fabry scheint aber nicht durch Zell-Selektion zugunsten des mutierten Fabry-Allels verursacht zu sein, sondern wahrscheinlich auf dem Schaden-bringenden Effekt des Fabry-Allels selbst zu beruhen. Zellen mit dem mutierten *GLA*-Allel können offenbar ähnlich wie Wildtyp-Zellen proliferieren, wobei die lysosomale Lipid-Akkumulation im Laufe der Zeit zunimmt, in deren Folge sich die verschiedenen Krankheitssymptome bei den Patientinnen ausbilden. Zwar können Zellen mit dem Wildtyp-Allel der α -Galaktosidase A, sofern es auf dem aktiven X-Chromosom liegt, ein völlig funktionsfähiges Enzymprodukt herstellen und einen Teil davon auch sezernieren, der dann von Zellen, die das defekte Fabry-Allel exprimieren, durch Endozytose aufgenommen werden kann. Offensichtlich haben diese Effekte jedoch eine limitierte Effizienz, so dass sie wohl nur die Lipid-Akkumulation, und damit die Manifestation der Erkrankung bei Frauen, verzögern, jedoch nicht gänzlich verhindern können. Dass eine Restaktivität der Enzymfunktion von klinischer Bedeutung ist, konnten Branton und Kollegen in einer retrospektiven Analyse der medizinischen Unterlagen männlicher Fabry-Patienten zeigen: bei diesen war die Progression der renalen Fabry-

Erkrankung verzögert, wenn eine Restaktivität der α -Galaktosidase A nachweisbar war (Branton et al. 2002).

Bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Frauen lässt sich kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Mutationstyp und klinischer Expression von Morbus Fabry ableiten. Eine finale Aussage hierzu ist jedoch auch in Anbetracht der begrenzten Größe der Kohorte und der Tatsache, dass die Patientinnen nicht nur über das bei Morbus Fabry defekte Allel verfügen, nur eingeschränkt möglich. Auffällig ist bei Betrachtung der Einzelfälle lediglich der Zusammenhang des Schweregrades der Erkrankung mit dem Alter, insofern vor allem ältere Frauen, auch unabhängig vom Mutationstyp, von der Erkrankung stärker gezeichnet sind als jüngere.

Möglicherweise tragen bei Morbus Fabry neben der zugrunde liegenden Mutation im *GLA*-Gen auch andere Faktoren zur Krankheitsexpression bei, z.B. modifizierende genetische Faktoren oder aber Umwelteinflüsse. Abgesehen von dem Glykosphingolipid Gb₃ können bei Morbus Fabry auch die Blutgruppenantigene B und P akkumulieren, so dass die Anhäufung dieser Substrate bei Trägern der entsprechenden Blutgruppe ebenfalls Einfluss auf die Schwere der Erkrankung nehmen könnte (Whybra et al. 2001). In einer Studie wurden verschiedene genetische Faktoren beschrieben, die das Auftreten zerebraler Läsionen bei Fabry-Patienten beeinflussen können (Altarescu et al. 2005). Polymorphismen von IL-6, eNOS, Faktor V und Protein Z erhöhen bei Fabry-Patienten die Wahrscheinlichkeit, verschiedene im MRT erkennbare vaskuläre Läsionen im Rahmen der Fabry-Erkrankung zu entwickeln. Diese die „Gefäßerkrankung Morbus Fabry“ modifizierenden Proteine sind assoziiert mit Entzündungsreaktionen, der Gefäßwandbiologie und den koagulatorischen Eigenschaften des Blutes. Weitere Studien legen eine Assoziation von Polymorphismen eines Interleukin-6-Promotors sowie Polymorphismen des Vitamin-D-Rezeptors mit der Ausprägung der Erkrankung nahe (Altarescu et al. 2008; Teitcher et al. 2008). Zusätzliche Modulatoren der Erkrankung werden vermutlich in den kommenden Jahren entdeckt und erforscht werden. Künftig kann die FOS-Datenbank mit der weiter steigenden Zahl registrierter Patienten zudem eine gute Basis bieten, um einen möglichen Zusammenhang zwischen den *GLA*-Mutationen, der Rest-Enzymaktivität, dem Ausmaß des abgelagerten Produkts Globotriaosylceramid, der klinischen Manifestation und dem Verlauf von Morbus Fabry bei Männern und Frauen weiter zu untersuchen.

In unserer Studie konnte letztlich gezeigt werden, dass heterozygote Fabry-Patientinnen *random* X-Inaktivierungsmuster ähnlich denen gesunder Frauen aufweisen. Es konnte nicht belegt werden, dass das Auftreten und der Schweregrad der Erkrankung bei der Mehrzahl der

heterozygoten Fabry-Überträgerinnen auf eine Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten des mutierten Allels als Pathomechanismus zurückzuführen ist. Bei einzelnen weiblichen Individuen kann jedoch eine zufällige ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung zu einer rascheren Progredienz der Erkrankung und einem schweren klinischen Phänotyp führen. X-Inaktivierungsstudien können dabei helfen, unter der Vielzahl der von Morbus Fabry betroffenen Frauen jene frühzeitig herauszufiltern, welche von einer Therapieeskalation wie der sehr teuren Enzymersatztherapie am meisten profitieren könnten.

ZUSAMMENFASSUNG

Morbus Fabry wird X-chromosomal vererbt und führt durch einen Defekt des lysosomalen Enzyms α -Galaktosidase A zu einer Störung im Glykosphingolipid-Katabolismus. Neutrale Glykosphingolipide, v.a. Gb₃ (Globotriaosylceramid), akkumulieren in Lysosomen verschiedenster Gewebe. Mit zunehmender Ablagerung dieser Stoffe im Gefäßendothel und in den Organen kommt es zur Ausprägung der Krankheitssymptome. In der Kindheit beginnt die Erkrankung häufig mit Akroparästhesien und Angiokeratomen. Im weiteren Verlauf treten dann die lebenslimitierenden Manifestationen dieser Erkrankung auf, wie terminale Niereninsuffizienz und, durch Ischämie- und Infarktereignisse, Myokardinfarkt und zerebrale Ischämie. Im Gegensatz zur überwiegenden Mehrzahl anderer X-gebundener Erkrankungen zeigen bei Morbus Fabry nahezu alle heterozygoten Mutationsträgerinnen im Laufe der Zeit klinische Manifestationen dieser Erkrankung, teils in gleich schwerer Form wie männliche Patienten. Da bisherige Hypothesen davon ausgingen, dass eine Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten des mutierten *GLA*-Allels am Auftreten von Symptomen bei heterozygoten Fabry-Mutationsträgerinnen beteiligt sei, wurden die X-Inaktivierungsmuster von durch Mutationsanalyse gesicherten Morbus Fabry-Patientinnen mit Hilfe des Androgenrezeptor-Tests untersucht.

Bei diesem Assay wird genomische DNA mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen inkubiert. Diese verdauen nur die unmethylierte DNA des aktiven X-Chromosoms, so dass in der anschließenden PCR-Amplifikation eines hochpolymorphen CAG-Repeats im Exon 1 des Androgenrezeptor-Gens lediglich Allele des inaktiven X-Chromosoms amplifiziert werden. Nach der automatisierten Auswertung mittels Fragmentanalyse, ermöglicht durch einen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten PCR-Primer, zeigt das Verhältnis der zwei Androgenrezeptor-Allele zueinander die relative Häufigkeit eines jeden Allels auf dem aktiven oder inaktiven X-Chromosom in den Zellen des untersuchten Materials.

Erstmals wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die X-Inaktivierungsmuster heterozygoter Mutationsträgerinnen von Morbus Fabry im Vergleich zu einem nichtverwandten Kontrollkollektiv untersucht. 13 (46%) der 28 Fabry-Mutationsträgerinnen zeigten eine *random* X-Inaktivierung, 10 (36%) eine moderate Verschiebung der X-Inaktivierung und 5 (18%) eine ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zu den Inaktivierungsmustern gleichaltriger Kontrollen ($p = 0,669$).

Segregationsanalysen konnten anhand der Familien von sechs Frauen mit ausgeprägter oder moderater Verschiebung der X-Inaktivierung durchgeführt werden. Hier zeigte sich bei vier

dieser Frauen eine Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten des Wildtyp *GLA*-Allels, während bei zwei weiteren eine Verschiebung zugunsten des mutierten Allels in Leukozyten erkennbar war.

Bei jeder der Fabry-Patientinnen war sowohl der klinische Schweregrad der Erkrankung mittels MSSI (*Mainz Severity Score Index*), einem detaillierten Scoring-System für Morbus Fabry, als auch die Enzymaktivität der α -Galaktosidase A bestimmt worden. Eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der X-Inaktivierung in Leukozyten heterozygoter Fabry-Mutationsträgerinnen und deren klinischen oder biochemischen Krankheitsparametern konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass heterozygote Fabry-Patientinnen *random* X-Inaktivierungsmuster ähnlich denen gesunder Frauen aufweisen. Anhand unserer Daten konnte nicht belegt werden, dass das Auftreten und der Schweregrad der Erkrankung bei der Mehrzahl der heterozygoten Fabry-Patientinnen auf eine Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten des mutierten Allels als Pathomechanismus zurückzuführen ist. X-Inaktivierungsstudien können jedoch dazu beitragen, jene Frauen frühzeitig herauszufiltern, welche aufgrund einer bei ihnen möglicherweise rascher progredient verlaufenden Erkrankung von einer sehr teuren Enzymersatztherapie am meisten profitieren könnten.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, A., L. J. Arend, et al. (2000). "Glycosphingolipid depletion in fabry disease lymphoblasts with potent inhibitors of glucosylceramide synthase." Kidney Int **57**(2): 446-454.
- Abe, A., S. Gregory, et al. (2000). "Reduction of globotriaosylceramide in Fabry disease mice by substrate deprivation." J Clin Invest **105**(11): 1563-1571.
- Allen, R. C., R. G. Nachtman, et al. (1994). "Application of carrier testing to genetic counseling for X-linked agammaglobulinemia." Am J Hum Genet **54**(1): 25-35.
- Allen, R. C., H. Y. Zoghbi, et al. (1992). "Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation." Am J Hum Genet **51**(6): 1229-1239.
- Altarescu, G., G. Chicco, et al. (2008). "Correlation between interleukin-6 promoter and C-reactive protein (CRP) polymorphisms and CRP levels with the Mainz Severity Score Index for Fabry disease." J Inherit Metab Dis **31**(1): 117-123.
- Altarescu, G., D. F. Moore, et al. (2005). "Effect of genetic modifiers on cerebral lesions in Fabry disease." Neurology **64**(12): 2148-2150.
- Altarescu, G. M., L. G. Goldfarb, et al. (2001). "Identification of fifteen novel mutations and genotype-phenotype relationship in Fabry disease." Clin Genet **60**(1): 46-51.
- Amos-Landgraf, J. M., A. Cottle, et al. (2006). "X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females." Am J Hum Genet **79**(3): 493-499.
- Ashton-Prolla, P., G. A. Ashley, et al. (1999). "Fabry disease: comparison of enzymatic, linkage, and mutation analysis for carrier detection in a family with a novel mutation (30delG)." Am J Med Genet **84**(5): 420-424.
- Ashton-Prolla, P., B. Tong, et al. (2000). "Fabry disease: twenty-two novel mutations in the alpha-galactosidase A gene and genotype/phenotype correlations in severely and mildly affected hemizygotes and heterozygotes." J Investig Med **48**(4): 227-235.
- Azofeifa, J., T. Voit, et al. (1995). "X-chromosome methylation in manifesting and healthy carriers of dystrophinopathies: concordance of activation ratios among first degree female relatives and skewed inactivation as cause of the affected phenotypes." Hum Genet **96**(2): 167-176.
- Bach, G., E. Rosenmann, et al. (1982). "Pseudodeficiency of alpha-galactosidase A." Clin Genet **21**(1): 59-64.
- Baehner, F., C. Kampmann, et al. (2003). "Enzyme replacement therapy in heterozygous females with Fabry disease: results of a phase IIIB study." J Inherit Metab Dis **26**(7): 617-627.
- Bailey, J. A., L. Carrel, et al. (2000). "Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: the Lyon repeat hypothesis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6634-6639.
- Banikazemi, M., J. Bultas, et al. (2007). "Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease: a randomized trial." Ann Intern Med **146**(2): 77-86.
- Barr, M. L. and D. H. Carr (1962). "Correlations between sex chromatin and sex chromosomes." Acta Cytol **6**: 34-45.
- Beck, M. (2007). Morbus Fabry. Klinische Manifestationen, Diagnostik und Therapie. Oxford, Oxford PharmaGenesis.
- Beck, M., Ries, M. (2002). Morbus Fabry. Klinische Manifestationen, Diagnostik und Therapie. London, OCC Europe Ltd.
- Berghmans, L. V., R. H. de Mendonca, et al. (2011). "Discordance for Retinitis Pigmentosa in Two Monozygotic Twin Pairs." Retina.

- Beutler, E. and W. Kuhl (1972). "Biochemical and electrophoretic studies of -galactosidase in normal man, in patients with Fabry's disease, and in Equidae." Am J Hum Genet **24**(3): 237-249.
- Bicocchi, M. P., B. R. Migeon, et al. (2005). "Familial nonrandom inactivation linked to the X inactivation centre in heterozygotes manifesting haemophilia A." Eur J Hum Genet **13**(5): 635-640.
- Bishop, D. F., R. Kornreich, et al. (1988). "Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(11): 3903-3907.
- Blaydon, D., J. Hill, et al. (2001). "Fabry disease: 20 novel GLA mutations in 35 families." Hum Mutat **18**(5): 459.
- Bocklandt, S., S. Horvath, et al. (2006). "Extreme skewing of X chromosome inactivation in mothers of homosexual men." Hum Genet **118**(6): 691-694.
- Boggs, B. A., B. Connors, et al. (1996). "Reduced levels of histone H3 acetylation on the inactive X chromosome in human females." Chromosoma **105**(5): 303-309.
- Boyd, Y. and N. J. Fraser (1990). "Methylation patterns at the hypervariable X-chromosome locus DXS255 (M27 beta): correlation with X-inactivation status." Genomics **7**(2): 182-187.
- Brady, R. O., J. F. Tallman, et al. (1973). "Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified ceramidetrihexosidase in Fabry's disease." N Engl J Med **289**(1): 9-14.
- Branton, M. H., R. Schiffmann, et al. (2002). "Natural history of Fabry renal disease: influence of alpha-galactosidase A activity and genetic mutations on clinical course." Medicine (Baltimore) **81**(2): 122-138.
- Breunig, F. and C. Wanner (2008). "Update on Fabry disease: kidney involvement, renal progression and enzyme replacement therapy." J Nephrol **21**(1): 32-37.
- Brix, T. H., G. P. Knudsen, et al. (2005). "High frequency of skewed X-chromosome inactivation in females with autoimmune thyroid disease: a possible explanation for the female predisposition to thyroid autoimmunity." J Clin Endocrinol Metab **90**(11): 5949-5953.
- Broen, J. C., I. L. Wolvers-Tettero, et al. (2010). "Skewed X chromosomal inactivation impacts T regulatory cell function in systemic sclerosis." Annals of the rheumatic diseases **69**(12): 2213-2216.
- Brouns, R., V. Thijs, et al. (2010). "Belgian Fabry study: prevalence of Fabry disease in a cohort of 1000 young patients with cerebrovascular disease." Stroke **41**(5): 863-868.
- Brown, C. J., A. Ballabio, et al. (1991). "A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome." Nature **349**(6304): 38-44.
- Brown, C. J. and J. M. Greally (2003). "A stain upon the silence: genes escaping X inactivation." Trends Genet **19**(8): 432-438.
- Brown, C. J., B. D. Hendrich, et al. (1992). "The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus." Cell **71**(3): 527-542.
- Brown, C. J., R. G. Lafreniere, et al. (1991). "Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13." Nature **349**(6304): 82-84.
- Brown, C. J. and W. P. Robinson (2000). "The causes and consequences of random and non-random X chromosome inactivation in humans." Clin Genet **58**(5): 353-363.
- Brown, R. M., N. J. Fraser, et al. (1990). "Differential methylation of the hypervariable locus DXS255 on active and inactive X chromosomes correlates with the expression of a human X-linked gene." Genomics **7**(2): 215-221.

- Burlina, A. P., K. B. Sims, et al. (2011). "Early diagnosis of peripheral nervous system involvement in Fabry disease and treatment of neuropathic pain: the report of an expert panel." *BMC Neurol* **11**: 61.
- Burn, J., S. Povey, et al. (1986). "Duchenne muscular dystrophy in one of monozygotic twin girls." *J Med Genet* **23**(6): 494-500.
- Busque, L., Y. Paquette, et al. (2009). "Skewing of X-inactivation ratios in blood cells of aging women is confirmed by independent methodologies." *Blood* **113**(15): 3472-3474.
- Cable, W. J., R. H. McCluer, et al. (1982). "Fabry disease: detection of heterozygotes by examination of glycolipids in urinary sediment." *Neurology* **32**(10): 1139-1145.
- Caggana, M., G. A. Ashley, et al. (1997). "Fabry disease: molecular carrier detection and prenatal diagnosis by analysis of closely linked polymorphisms at Xq22.1." *Am J Med Genet* **71**(3): 329-335.
- Carrel, L. and H. F. Willard (1996). "An assay for X inactivation based on differential methylation at the fragile X locus, FMR1." *Am J Med Genet* **64**(1): 27-30.
- Carrel, L. and H. F. Willard (1999). "Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7364-7369.
- Carrel, L. and H. F. Willard (2005). "X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females." *Nature* **434**(7031): 400-404.
- Cau, M., M. Addis, et al. (2006). "A locus for familial skewed X chromosome inactivation maps to chromosome Xq25 in a family with a female manifesting Lowe syndrome." *J Hum Genet*.
- Chew, E., M. Ghosh, et al. (1982). "Amiodarone-induced cornea verticillata." *Can J Ophthalmol* **17**(3): 96-99.
- Chow, J. C., Z. Yen, et al. (2005). "Silencing of the mammalian X chromosome." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**: 69-92.
- Clemson, C. M., J. A. McNeil, et al. (1996). "XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure." *J Cell Biol* **132**(3): 259-275.
- Costanzi, C. and J. R. Pehrson (1998). "Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals." *Nature* **393**(6685): 599-601.
- Dajnoki, A., G. Fekete, et al. (2010). "Newborn screening for Fabry disease by measuring GLA activity using tandem mass spectrometry." *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **411**(19-20): 1428-1431.
- Davies, J. P., B. G. Winchester, et al. (1993). "Mutation analysis in patients with the typical form of Anderson-Fabry disease." *Hum Mol Genet* **2**(7): 1051-1053.
- Dawson, G., R. Matalon, et al. (1973). "Enzyme replacement in Fabry disease: treatment of cultured skin fibroblasts with a purified alpha-galactosidase from ficin." *Birth Defects Orig Artic Ser* **9**(2): 97-101.
- Deegan, P. B., A. F. Baehner, et al. (2006). "Natural history of Fabry disease in females in the Fabry Outcome Survey." *J Med Genet* **43**(4): 347-352.
- Desai, V., A. Donsante, et al. (2011). "Favorably skewed X-inactivation accounts for neurological sparing in female carriers of Menkes disease." *Clin Genet* **79**(2): 176-182.
- Desnick, I. Y., Eng CM (2001). α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th edition. B. A. Scriver CR, Sly WS, Valle D. New York, Mc Graw-Hill: p. 3733-3774.
- Desnick, R. J., K. Y. Allen, et al. (1973). "Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes." *J Lab Clin Med* **81**(2): 157-171.

- Desnick, R. J., H. S. Bernstein, et al. (1987). "Fabry disease: molecular diagnosis of hemizygoten and heterozygoten." *Enzyme* **38**(1-4): 54-64.
- Desnick, R. J., K. J. Dean, et al. (1979). "Enzyme therapy in Fabry disease: differential in vivo plasma clearance and metabolic effectiveness of plasma and splenic alpha-galactosidase A isozymes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(10): 5326-5330.
- Desnick, R. J., K. J. Dean, et al. (1980). "Enzyme therapy XVII: metabolic and immunologic evaluation of alpha-galactosidase A replacement in Fabry disease." *Birth Defects Orig Artic Ser* **16**(1): 393-413.
- Desnick RJ, I. Y., Eng CM (2001). α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th edition. B. A. Scriver CR, Sly WS, Valle D. New York, Mc Graw-Hill: p. 3733-3774.
- Dobrovolny, R., L. Dvorakova, et al. (2005). "Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygoten. Eleven novel mutations in the alpha-galactosidase A gene in the Czech and Slovak population." *J Mol Med* **83**(8): 647-654.
- Dobrovolny, R., L. Dvorakova, et al. (2005). "Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygoten. Eleven novel mutations in the alpha-galactosidase A gene in the Czech and Slovak population." *Journal of molecular medicine* **83**(8): 647-654.
- Dobyns, W. B., A. Filauro, et al. (2004). "Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked." *Am J Med Genet A* **129**(2): 136-143.
- Edwards, A., H. A. Hammond, et al. (1992). "Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups." *Genomics* **12**(2): 241-253.
- el-Kassar, N., G. Hetet, et al. (1997). "Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: advantages of studying T lymphocytes and platelets." *Blood* **89**(1): 128-134.
- Elleder, M., V. Bradova, et al. (1990). "Cardiocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry's disease. Report on a case simulating hypertrophic non-obstructive cardiomyopathy." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **417**(5): 449-455.
- Eng, C. M., M. Banikazemi, et al. (2001). "A phase 1/2 clinical trial of enzyme replacement in fabry disease: pharmacokinetic, substrate clearance, and safety studies." *Am J Hum Genet* **68**(3): 711-722.
- Eng, C. M. and R. J. Desnick (1994). "Molecular basis of Fabry disease: mutations and polymorphisms in the human alpha-galactosidase A gene." *Hum Mutat* **3**(2): 103-111.
- Eng, C. M., D. P. Germain, et al. (2006). "Fabry disease: guidelines for the evaluation and management of multi-organ system involvement." *Genet Med* **8**(9): 539-548.
- Eng, C. M., N. Guffon, et al. (2001). "Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A--replacement therapy in Fabry's disease." *N Engl J Med* **345**(1): 9-16.
- Eng, C. M., D. J. Niehaus, et al. (1994). "Fabry disease: twenty-three mutations including sense and antisense CpG alterations and identification of a deletional hot-spot in the alpha-galactosidase A gene." *Hum Mol Genet* **3**(10): 1795-1799.
- Eng, C. M., L. A. Resnick-Silverman, et al. (1993). "Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease." *Am J Hum Genet* **53**(6): 1186-1197.
- Fan, J. Q., S. Ishii, et al. (1999). "Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor." *Nat Med* **5**(1): 112-115.
- Fensom, A. H., P. F. Benson, et al. (1980). "Fibroblast alpha-galactosidase A activity for identification of Fabry's disease heterozygoten." *J Inherit Metab Dis* **2**(1): 9-12.

- Frustaci, A., C. Chimenti, et al. (2001). "Improvement in cardiac function in the cardiac variant of Fabry's disease with galactose-infusion therapy." *N Engl J Med* **345**(1): 25-32.
- Fuller, M., M. Lovejoy, et al. (2004). "Immunoquantification of alpha-galactosidase: evaluation for the diagnosis of Fabry disease." *Clin Chem* **50**(11): 1979-1985.
- Fuller, M., P. C. Sharp, et al. (2005). "Urinary lipid profiling for the identification of fabry hemizygotes and heterozygotes." *Clin Chem* **51**(4): 688-694.
- Gal, A., D. A. Hughes, et al. (2011). "Toward a consensus in the laboratory diagnostics of Fabry disease - recommendations of a European expert group." *J Inherit Metab Dis.*
- Galanos, J., K. Nicholls, et al. (2002). "Clinical features of Fabry's disease in Australian patients." *Intern Med J* **32**(12): 575-584.
- Gale, R. E., H. Wheadon, et al. (1994). "Tissue specificity of X-chromosome inactivation patterns." *Blood* **83**(10): 2899-2905.
- Gaspar, P., J. Herrera, et al. (2010). "Frequency of Fabry disease in male and female haemodialysis patients in Spain." *BMC Med Genet* **11**: 19.
- Germain, D. P., J. Shabbeer, et al. (2002). "Fabry disease: twenty novel alpha-galactosidase A mutations and genotype-phenotype correlations in classical and variant phenotypes." *Mol Med* **8**(6): 306-312.
- Germain, D. P., S. Waldek, et al. (2007). "Sustained, long-term renal stabilization after 54 months of agalsidase beta therapy in patients with Fabry disease." *J Am Soc Nephrol* **18**(5): 1547-1557.
- Going, J. J., H. M. Abd El-Monem, et al. (2001). "Clonal origins of human breast cancer." *J Pathol* **194**(4): 406-412.
- Gong, L., W. Zhang, et al. (2008). "Clonal status of fibrous dysplasia." *Pathology* **40**(4): 392-395.
- Gong, X., E. Bacchelli, et al. (2008). "Analysis of X chromosome inactivation in autism spectrum disorders." *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* **147B**(6): 830-835.
- Gubler, M. C., G. Lenoir, et al. (1978). "Early renal changes in hemizygous and heterozygous patients with Fabry's disease." *Kidney Int* **13**(3): 223-235.
- Gupta, S., M. Ries, et al. (2005). "The relationship of vascular glycolipid storage to clinical manifestations of Fabry disease: a cross-sectional study of a large cohort of clinically affected heterozygous women." *Medicine (Baltimore)* **84**(5): 261-268.
- Harris, A., J. Collins, et al. (1992). "X inactivation as a mechanism of selection against lethal alleles: further investigation of incontinentia pigmenti and X linked lymphoproliferative disease." *J Med Genet* **29**(9): 608-614.
- Hauser, A. C., M. Lorenz, et al. (2004). "The expanding clinical spectrum of Anderson-Fabry disease: a challenge to diagnosis in the novel era of enzyme replacement therapy." *J Intern Med* **255**(6): 629-636.
- Heard, E. and C. M. Disteche (2006). "Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome." *Genes Dev* **20**(14): 1848-1867.
- Hendriks, R. W., Z. Y. Chen, et al. (1992). "An X chromosome inactivation assay based on differential methylation of a CpG island coupled to a VNTR polymorphism at the 5' end of the monoamine oxidase A gene." *Hum Mol Genet* **1**(3): 187-194.
- Hodges, K. B., O. W. Cummings, et al. (2010). "Clonal origin of multifocal hepatocellular carcinoma." *Cancer* **116**(17): 4078-4085.
- Hoffmann, B., M. Schwarz, et al. (2007). "Gastrointestinal symptoms in 342 patients with Fabry disease: prevalence and response to enzyme replacement therapy." *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**(12): 1447-1453.
- Hotta, T. (1997). "Clonality in hematopoietic disorders." *Int J Hematol* **66**(4): 403-412.

- Hughes, D. A., P. M. Elliott, et al. (2008). "Effects of enzyme replacement therapy on the cardiomyopathy of Anderson-Fabry disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial of agalsidase alfa." *Heart* **94**(2): 153-158.
- Indsto, J. O., A. R. Cachia, et al. (2001). "X inactivation, DNA deletion, and microsatellite instability in common acquired melanocytic nevi." *Clin Cancer Res* **7**(12): 4054-4059.
- Ishii, S., H. Yoshioka, et al. (2004). "Transgenic mouse expressing human mutant alpha-galactosidase A in an endogenous enzyme deficient background: a biochemical animal model for studying active-site specific chaperone therapy for Fabry disease." *Biochim Biophys Acta* **1690**(3): 250-257.
- Itoh, K., T. Takenaka, et al. (1996). "Immunofluorescence analysis of trihexosylceramide accumulated in the hearts of variant hemizygotes and heterozygotes with Fabry disease." *Am J Cardiol* **78**(1): 116-117.
- Jeppesen, P. and B. M. Turner (1993). "The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression." *Cell* **74**(2): 281-289.
- Johnson, D. L., M. A. Del Monte, et al. (1975). "Fabry disease: diagnosis by alpha-galactosidase activities in tears." *Clin Chim Acta* **63**(1): 81-90.
- Jung, S. C., I. P. Han, et al. (2001). "Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer results in long-term enzymatic and functional correction in multiple organs of Fabry mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2676-2681.
- Kampmann, C., F. Baehner, et al. (2002). "Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in heterozygous females." *J Am Coll Cardiol* **40**(9): 1668-1674.
- Ke, X. and A. Collins (2003). "CpG islands in human X-inactivation." *Ann Hum Genet* **67**(Pt 3): 242-249.
- Kloska, A., J. Jakobkiewicz-Banecka, et al. (2010). "Female Hunter syndrome caused by a single mutation and familial XCI skewing: implications for other X-linked disorders." *Clinical genetics*.
- Knudsen, G. P., H. F. Harbo, et al. (2007). "X chromosome inactivation in females with multiple sclerosis." *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* **14**(12): 1392-1396.
- Kobayashi, M., T. Ohashi, et al. (2008). "Clinical manifestations and natural history of Japanese heterozygous females with Fabry disease." *J Inherit Metab Dis*.
- Kobayashi, T., J. Kira, et al. (1985). "Fabry's disease with partially deficient hydrolysis of ceramide trihexoside." *J Neurol Sci* **67**(2): 179-185.
- Kotanko, P., R. Kramar, et al. (2004). "Results of a nationwide screening for Anderson-Fabry disease among dialysis patients." *J Am Soc Nephrol* **15**(5): 1323-1329.
- Kristiansen, M., A. Helland, et al. (2003). "X chromosome inactivation in cervical cancer patients." *Cancer Genet Cytogenet* **146**(1): 73-76.
- Kristiansen, M., G. P. Knudsen, et al. (2003). "X-inactivation patterns in carriers of X-linked myotubular myopathy." *Neuromuscul Disord* **13**(6): 468-471.
- Kubota, T. (2001). "A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation in carriers with an X-linked disease." *Brain Dev* **23 Suppl 1**: S177-181.
- Kubota, T., S. Nonoyama, et al. (1999). "A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR." *Hum Genet* **104**(1): 49-55.
- Kutsche, R. and C. J. Brown (2000). "Determination of X-chromosome inactivation status using X-linked expressed polymorphisms identified by database searching." *Genomics* **65**(1): 9-15.
- Lavin, V. A., R. Hamid, et al. (2008). "Use of human androgen receptor gene analysis to aid the diagnosis of JMML in female noonan syndrome patients." *Pediatr Blood Cancer* **51**(2): 298-302.

- Leithner, A., A. Weinhaeusel, et al. (2005). "Evidence of a polyclonal nature of myositis ossificans." *Virchows Arch* **446**(4): 438-441.
- Lexner, M. O., A. Bardow, et al. (2008). "X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. Genetic and dental findings in 67 Danish patients from 19 families." *Clin Genet* **74**(3): 252-259.
- Li, S. L., S. S. Ting, et al. (1998). "Carrier identification in X-linked immunodeficiency diseases." *J Paediatr Child Health* **34**(3): 273-279.
- Lin, H. Y., K. W. Chong, et al. (2009). "High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population." *Circ Cardiovasc Genet* **2**(5): 450-456.
- Lupski, J. R., C. A. Garcia, et al. (1991). "Discordance of muscular dystrophy in monozygotic female twins: evidence supporting asymmetric splitting of the inner cell mass in a manifesting carrier of Duchenne dystrophy." *Am J Med Genet* **40**(3): 354-364.
- Lyon, M. F. (1961). "Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.)." *Nature* **190**: 372-373.
- Lyon, M. F. (2002). "X-chromosome inactivation and human genetic disease." *Acta Paediatr Suppl* **91**(439): 107-112.
- Lyon, M. F. (2003). "The Lyon and the LINE hypothesis." *Semin Cell Dev Biol* **14**(6): 313-318.
- MacDermot, K. D., A. Holmes, et al. (2001). "Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females." *J Med Genet* **38**(11): 769-775.
- Magage, S., J. C. Lubanda, et al. (2007). "Natural history of the respiratory involvement in Anderson-Fabry disease." *J Inherit Metab Dis* **30**(5): 790-799.
- Maier, E. M., S. Kammerer, et al. (2002). "Symptoms in carriers of adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation." *Ann Neurol* **52**(5): 683-688.
- Maier, E. M., S. Osterrieder, et al. (2006). "Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease." *Acta Paediatr Suppl* **95**(451): 30-38.
- Masson, C., I. Cisse, et al. (2004). "Fabry disease: a review." *Joint Bone Spine* **71**(5): 381-383.
- Mayes, J. S., E. L. Cray, et al. (1982). "Endocytosis of lysosomal alpha-galactosidase A by cultured fibroblasts from patients with Fabry disease." *Am J Hum Genet* **34**(4): 602-610.
- Mayes, J. S., J. B. Scheerer, et al. (1981). "Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease." *Clin Chim Acta* **112**(2): 247-251.
- Mehta, A., R. Ricci, et al. (2004). "Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey." *Eur J Clin Invest* **34**(3): 236-242.
- Mehta, A., M. L. West, et al. (2010). "Therapeutic goals in the treatment of Fabry disease." *Genet Med* **12**(11): 713-720.
- Migeon, B. R. (1998). "Non-random X chromosome inactivation in mammalian cells." *Cytogenet Cell Genet* **80**(1-4): 142-148.
- Migeon, B. R., H. W. Moser, et al. (1981). "Adrenoleukodystrophy: evidence for X linkage, inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(8): 5066-5070.
- Miller, S. A., D. D. Dykes, et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." *Nucleic Acids Res* **16**(3): 1215.
- Monteiro, J., C. Derom, et al. (1998). "Commitment to X inactivation precedes the twinning event in monozygotic MZ twins." *Am J Hum Genet* **63**(2): 339-346.
- Morrone, A., C. Cavicchi, et al. (2003). "Fabry disease: molecular studies in Italian patients and X inactivation analysis in manifesting carriers." *J Med Genet* **40**(8): e103.

- Moschese, V., P. Orlandi, et al. (2000). "X-chromosome inactivation and mutation pattern in the Bruton's tyrosine kinase gene in patients with X-linked agammaglobulinemia. Italian XLA Collaborative Group." *Mol Med* **6**(2): 104-113.
- Moser, H. W., H. Braine, et al. (1980). "Therapeutic trial of plasmapheresis in Refsum disease and in Fabry disease." *Birth Defects Orig Artic Ser* **16**(1): 491-497.
- Nagao, Y., H. Nakashima, et al. (1991). "Hypertrophic cardiomyopathy in late-onset variant of Fabry disease with high residual activity of alpha-galactosidase A." *Clin Genet* **39**(3): 233-237.
- Nakao, S., C. Kodama, et al. (2003). "Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype." *Kidney Int* **64**(3): 801-807.
- Nakao, S., T. Takenaka, et al. (1995). "An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy." *N Engl J Med* **333**(5): 288-293.
- Naumova, A. K., L. Olien, et al. (1998). "Genetic mapping of X-linked loci involved in skewing of X chromosome inactivation in the human." *Eur J Hum Genet* **6**(6): 552-562.
- Naumova, A. K., R. M. Plenge, et al. (1996). "Heritability of X chromosome--inactivation phenotype in a large family." *Am J Hum Genet* **58**(6): 1111-1119.
- Ogawa, K., K. Sugamata, et al. (1990). "Restricted accumulation of globotriaosylceramide in the hearts of atypical cases of Fabry's disease." *Hum Pathol* **21**(10): 1067-1073.
- Oostra, R. J., S. Kemp, et al. (1996). "No evidence for 'skewed' inactivation of the X-chromosome as cause of Leber's hereditary optic neuropathy in female carriers." *Hum Genet* **97**(4): 500-505.
- Opitz, J. M., F. C. Stiles, et al. (1965). "The Genetics of Angiokeratoma Corporis Diffusum (Fabry's Disease) and Its Linkage Relations with the Xg Locus." *Am J Hum Genet* **17**(4): 325-342.
- Orstavik, K. H., R. E. Orstavik, et al. (1998). "X chromosome inactivation in carriers of Barth syndrome." *Am J Hum Genet* **63**(5): 1457-1463.
- Orteu, C. H., T. Jansen, et al. (2007). "Fabry disease and the skin: data from FOS, the Fabry outcome survey." *Br J Dermatol* **157**(2): 331-337.
- Owen, C. J., A. Habeb, et al. (2009). "Discordance for X-linked hypophosphataemic rickets in identical twin girls." *Hormone research* **71**(4): 237-244.
- Parini, R., M. Rigoldi, et al. (2008). "Enzyme replacement therapy with agalsidase alfa in a cohort of Italian patients with Anderson-Fabry disease: testing the effects with the Mainz Severity Score Index." *Clin Genet* **74**(3): 260-266.
- Park, J., G. J. Murray, et al. (2003). "Long-term correction of globotriaosylceramide storage in Fabry mice by recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3450-3454.
- Payer, B. and J. T. Lee (2008). "X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance." *Annu Rev Genet* **42**: 733-772.
- Pegoraro, E., J. Whitaker, et al. (1997). "Familial skewed X inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps to Xq28." *Am J Hum Genet* **61**(1): 160-170.
- Pintos-Morell, G. and M. Beck (2009). "Fabry disease in children and the effects of enzyme replacement treatment." *Eur J Pediatr* **168**(11): 1355-1363.
- Plath, K., S. Mlynarczyk-Evans, et al. (2002). "Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation." *Annu Rev Genet* **36**: 233-278.
- Plenge, R. M., B. D. Hendrich, et al. (1997). "A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation." *Nat Genet* **17**(3): 353-356.
- Poepl, A. G., G. J. Murray, et al. (2005). "Enhanced filter paper enzyme assay for high-throughput population screening for Fabry disease." *Anal Biochem* **337**(1): 161-163.

- Puck, J. M. (1998). "The timing of twinning: more insights from X inactivation." American journal of human genetics **63**(2): 327-328.
- Puck, J. M., R. L. Nussbaum, et al. (1987). "Carrier detection in X-linked severe combined immunodeficiency based on patterns of X chromosome inactivation." J Clin Invest **79**(5): 1395-1400.
- Puck, J. M., C. C. Stewart, et al. (1992). "Maximum-likelihood analysis of human T-cell X chromosome inactivation patterns: normal women versus carriers of X-linked severe combined immunodeficiency." Am J Hum Genet **50**(4): 742-748.
- Puck, J. M. and H. F. Willard (1998). "X inactivation in females with X-linked disease." N Engl J Med **338**(5): 325-328.
- Ramaswami, U., B. Najafian, et al. (2010). "Assessment of renal pathology and dysfunction in children with Fabry disease." Clin J Am Soc Nephrol **5**(2): 365-370.
- Redonnet-Vernhet, I., J. K. Ploos van Amstel, et al. (1996). "Uneven X inactivation in a female monozygotic twin pair with Fabry disease and discordant expression of a novel mutation in the alpha-galactosidase A gene." J Med Genet **33**(8): 682-688.
- Richards, C. S., S. C. Watkins, et al. (1990). "Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular dystrophy." Am J Hum Genet **46**(4): 672-681.
- Ries, M., S. Gupta, et al. (2005). "Pediatric Fabry disease." Pediatrics **115**(3): e344-355.
- Ries, M., U. Ramaswami, et al. (2003). "The early clinical phenotype of Fabry disease: a study on 35 European children and adolescents." Eur J Pediatr **162**(11): 767-772.
- Rodriguez-Mari, A., M. J. Coll, et al. (2003). "Molecular analysis in Fabry disease in Spain: fifteen novel GLA mutations and identification of a homozygous female." Hum Mutat **22**(3): 258.
- Rohrbach, M. and J. T. Clarke (2007). "Treatment of lysosomal storage disorders : progress with enzyme replacement therapy." Drugs **67**(18): 2697-2716.
- Rolfs, A., T. Bottcher, et al. (2005). "Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study." Lancet **366**(9499): 1794-1796.
- Romeo, G., M. D'Urso, et al. (1975). "Residual activity of alpha-galactosidase A in Fabry's disease." Biochem Genet **13**(9-10): 615-628.
- Romeo, G. and B. R. Migeon (1970). "Genetic inactivation of the alpha-galactosidase locus in carriers of Fabry's disease." Science **170**(954): 180-181.
- Rosenthal, D., Y. H. Lien, et al. (2004). "A novel alpha-galactosidase a mutant (M42L) identified in a renal variant of Fabry disease." Am J Kidney Dis **44**(5): e85-89.
- Sachdev, B., T. Takenaka, et al. (2002). "Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy." Circulation **105**(12): 1407-1411.
- Sambrook, J. (2001). Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schafer, E., K. Baron, et al. (2005). "Thirty-four novel mutations of the GLA gene in 121 patients with Fabry disease." Hum Mutat **25**(4): 412.
- Schiffmann, R. (2009). "Fabry disease." Pharmacol Ther **122**(1): 65-77.
- Schiffmann, R., J. B. Kopp, et al. (2001). "Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial." Jama **285**(21): 2743-2749.
- Schiffmann, R. and D. F. Moore (2006). Neurological manifestations of Fabry disease. Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. A. Mehta, M. Beck and G. Sunder-Plassmann. Oxford.
- Schmucker, B., A. Meindl, et al. (1995). "A PCR based X-chromosome inactivation assay for carrier detection in X-linked immunodeficiencies using differential methylation of the androgen receptor gene." Immunodeficiency **5**(3): 187-192.

- Schroeder, T., L. Ruf, et al. (2010). "Distinguishing myelodysplastic syndromes (MDS) from idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS): HUMARA unravels clonality in a subgroup of patients." *Ann Oncol* **21**(11): 2267-2271.
- Seiler, K. U., H. J. Thiel, et al. (1977). "[Chloroquine keratopathy as an example of drug-induced phospholipidosis (contribution to the pathogenesis of cornea verticillata) (author's transl)]." *Klin Monbl Augenheilkd* **170**(1): 64-73.
- Sharp, A., D. Robinson, et al. (2000). "Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women." *Hum Genet* **107**(4): 343-349.
- Shulman, O., Y. Laitman, et al. (2006). "Monoclonal origin of anatomically distinct basal cell carcinomas." *J Invest Dermatol* **126**(3): 676-679.
- Siskind, C. E., S. M. Murphy, et al. (2011). "Phenotype expression in women with CMT1X." *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* **16**(2): 102-107.
- Sodi, A., A. S. Ioannidis, et al. (2007). "Ocular manifestations of Fabry's disease: data from the Fabry Outcome Survey." *Br J Ophthalmol* **91**(2): 210-214.
- Spada, M., S. Pagliardini, et al. (2006). "High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening." *Am J Hum Genet* **79**(1): 31-40.
- Street, N. J., M. S. Yi, et al. (2006). "Comparison of health-related quality of life between heterozygous women with Fabry disease, a healthy control population, and patients with other chronic disease." *Genet Med* **8**(6): 346-353.
- Stromberger, C. and O. A. Bodamer (2004). "Fabry disease defined." *Eur J Clin Invest* **34**(6): 449; author reply 450.
- Taylor, J. H. (1960). "Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of Chinese hamster." *J Biophys Biochem Cytol* **7**: 455-464.
- Teitcher, M., S. Weinerman, et al. (2008). "Genetic polymorphisms of vitamin D receptor (VDR) in Fabry disease." *Genetica* **134**(3): 377-383.
- Thurberg, B. L., H. Randolph Byers, et al. (2004). "Monitoring the 3-year efficacy of enzyme replacement therapy in fabry disease by repeated skin biopsies." *J Invest Dermatol* **122**(4): 900-908.
- Tonon, L., G. Bergamaschi, et al. (1998). "Unbalanced X-chromosome inactivation in haemopoietic cells from normal women." *British journal of haematology* **102**(4): 996-1003.
- Vickers, M. A., S. J. Canning, et al. (2006). "X-inactivation patterns of closely, but not distantly, related cells are highly correlated: little evidence for stem cell plasticity in normal females." *Stem Cells*.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, et al. (1987). "Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome." *Cancer Res* **47**(18): 4806-4813.
- von Scheidt, W., C. M. Eng, et al. (1991). "An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium." *N Engl J Med* **324**(6): 395-399.
- Waldek, S., M. R. Patel, et al. (2009). "Life expectancy and cause of death in males and females with Fabry disease: findings from the Fabry Registry." *Genet Med* **11**(11): 790-796.
- Wang, R. Y., A. Lelis, et al. (2007). "Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life." *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* **9**(1): 34-45.
- Weidemann, F. and F. Breunig (2008). "[Cardiac involvement in Fabry's disease]." *Med Klin (Munich)* **103**(3): 161-165.
- Weidemann, F., M. Niemann, et al. (2009). "Long-term effects of enzyme replacement therapy on fabry cardiomyopathy: evidence for a better outcome with early treatment." *Circulation* **119**(4): 524-529.
- Wendrich, K., C. Whybra, et al. (2001). "Neurological manifestation of Fabry disease in females." *Contrib Nephrol*(136): 241-244.

- Wengler, G. S., O. Parolini, et al. (1997). "A PCR-based non-radioactive X-chromosome inactivation assay for genetic counseling in X-linked primary immunodeficiencies." *Life Sci* **61**(14): 1405-1411.
- Whybra, C., C. Kampmann, et al. (2004). "The Mainz Severity Score Index: a new instrument for quantifying the Anderson-Fabry disease phenotype, and the response of patients to enzyme replacement therapy." *Clin Genet* **65**(4): 299-307.
- Whybra, C., C. Kampmann, et al. (2001). "Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of disease in female heterozygotes." *J Inher Metab Dis* **24**(7): 715-724.
- Whybra, C., E. Miebach, et al. (2009). "A 4-year study of the efficacy and tolerability of enzyme replacement therapy with agalsidase alfa in 36 women with Fabry disease." *Genet Med* **11**(6): 441-449.
- Wichman, H. A., R. A. Van den Bussche, et al. (1992). "Transposable elements and the evolution of genome organization in mammals." *Genetica* **86**(1-3): 287-293.
- Wilcox, W. R., M. Banikazemi, et al. (2004). "Long-term safety and efficacy of enzyme replacement therapy for Fabry disease." *Am J Hum Genet* **75**(1): 65-74.
- Wilcox, W. R., J. P. Oliveira, et al. (2008). "Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry." *Mol Genet Metab* **93**(2): 112-128.
- Willemsen, R., R. Olmer, et al. (2000). "Twin sisters, monozygotic with the fragile X mutation, but with a different phenotype." *J Med Genet* **37**(8): 603-604.
- Winchester, B., E. Young, et al. (1992). "Female twin with Hunter disease due to nonrandom inactivation of the X-chromosome: a consequence of twinning." *Am J Med Genet* **44**(6): 834-838.
- Xue, F., X. C. Tian, et al. (2002). "Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones." *Nat Genet* **31**(2): 216-220.
- Yam, G. H., N. Bosshard, et al. (2006). "Pharmacological chaperone corrects lysosomal storage in Fabry disease caused by trafficking-incompetent variants." *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(4): C1076-1082.
- Yoon, S. H., Y. M. Choi, et al. (2008). "X chromosome inactivation patterns in patients with idiopathic premature ovarian failure." *Human reproduction* **23**(3): 688-692.
- Yoshimitsu, M., K. Higuchi, et al. (2006). "Efficient correction of Fabry mice and patient cells mediated by lentiviral transduction of hematopoietic stem/progenitor cells." *Gene Ther*.
- Zhang, W., R. Amir, et al. (2000). "Terminal osseous dysplasia with pigmentary defects maps to human chromosome Xq27.3-xqter." *Am J Hum Genet* **66**(4): 1461-1464.
- Ziegler, R. J., S. M. Lonning, et al. (2004). "AAV2 vector harboring a liver-restricted promoter facilitates sustained expression of therapeutic levels of alpha-galactosidase A and the induction of immune tolerance in Fabry mice." *Mol Ther* **9**(2): 231-240.
- Zimran, A., A. Kay, et al. (1992). "Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients." *Medicine (Baltimore)* **71**(6): 337-353.
- Zimran, A., J. Sorge, et al. (1989). "Prediction of severity of Gaucher's disease by identification of mutations at DNA level." *Lancet* **2**(8659): 349-352.

DANKSAGUNG

Bei meiner Doktormutter Frau Professor Dr. med. Ania Muntau bedanke ich mich sehr herzlich für die Überlassung dieses spannenden Themas aus dem Bereich der Stoffwechselmedizin und für die konstruktiven wissenschaftlichen Anregungen bei Anfertigung dieser Arbeit.

Frau PD Dr. Esther Maier danke ich sehr herzlich für die gute Betreuung und die stetige Bereitschaft zur Diskussion bei Durchführung der Experimente sowie Interpretation und Publikation der Ergebnisse.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die nette und angenehme Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank an alle Mit-Doktoranden und an Sylvia Heidenreich für ihre Unterstützung.

Bei den an Morbus Fabry erkrankten Studien-Patientinnen möchte ich mich sehr bedanken; ohne ihre Teilnahme an der Studie wäre diese Arbeit nicht möglich geworden. Ebenso danke ich den Kollegen der Kinderklinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für deren Engagement.

Ganz besonders danke ich auch meinem Ehemann Uli für die unermüdliche Hilfsbereitschaft. Er hat in mir nicht nur die Liebe zu Computern geweckt.

Und nicht zuletzt gilt mein großer Dank meiner Familie, meinem Bruder Florian und insbesondere meinen Eltern, die mir dieses Studium und die Promotion ermöglicht haben. Ihrem unerschütterlichen Glauben an mich kommt ein großer Anteil an meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung zu.

PUBLIKATIONEN

Publikation zum Thema der Dissertation

Maier EM, Osterrieder S, Whybra C, Ries M, Gal A, Beck M, Roscher AA, Muntau AC. Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. Acta Paediatrica Supplement. 2006, 95 (451): 30-38

Weitere Veröffentlichungen

Koletzko S, Osterrieder S.

Acute infectious diarrhea in children. Dtsch Arztebl Int. 2009, 106 (33): 539-47

Prell C, Osterrieder S, Lottspeich C, Schwarzer A, Rüssman H, Ossiander G, Koletzko S. Improved performance of a rapid office-based stool test for detection of Helicobacter pylori in children before and after therapy. J Clin Microbiol. 2009, 47 (12): 3980-4

Lacher M, Schroepf S, Helmbrecht J, von Schweinitz D, Ballauf A, Koch I, Lohse P, Osterrieder S, Kappler R, Koletzko S.

Association of the interleukin-23 receptor gene variant rs11209026 with Crohn's disease in German children. Acta Paediatrica. 2010, 99 (5): 727-33

Werkstetter KJ, Pozza SB, Filipiak-Pittroff B, Schatz SB, Prell C, Bufler P, Koletzko B, Koletzko S.

Long-term development of bone geometry and muscle in pediatric inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2011, 106 (5): 988-98

Werkstetter KJ, Ullrich J, Schatz SB, Prell C, Koletzko B, Koletzko S.

Lean body mass, physical activity and quality of life in paediatric patients with inflammatory bowel disease and in healthy controls. J Crohns Colitis Epub Jan 9 2012