

**Diagnostik des Morbus Niemann-Pick Typ A, B und C: Etablierung  
von Nachweismethoden eines saure Sphingomyelinase-Mangels in  
verschiedenen humanen Geweben und einer intrazellulären  
Cholesterintransportstörung in Fibroblasten**

**Nurcan Alpay**

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. vom Haunerschen Kinderspital  
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt

Diagnostik des Morbus Niemann-Pick Typ A, B und C: Etablierung von  
Nachweismethoden eines saure Sphingomyelinase-Mangels in verschiedenen humanen  
Geweben und einer intrazellulären Cholesterintransportstörung in Fibroblasten

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

vorgelegt von  
Nurcan Alpay  
aus  
München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Y. S. Shin

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. J. Herrmann  
Priv. Doz. Dr. M. Dichgans

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2005

---

Auszüge dieser Arbeit wurden 2002 als Vortrag auf dem 8th Annual-Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism (AEWIEM) in Wilna, Litauen, unter dem Titel „Niemann-Pick disease type A, B and C: Differential diagnosis by assay of sphingomyelinase, cholesteryl lipase and oleat incorporation“ vorgestellt.

---

*Gewidmet meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Mann*

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Lysosomale Speicherkrankheiten</b>	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Niemann-Pick Typ A und B</b>	<b>3</b>
1.2.1.	Sphingomyelin-Stoffwechsel	3
1.2.1.1.	Sphingomyelin-Synthese	3
1.2.1.2.	Sphingomyelin-Abbau	4
1.2.1.3.	Sphingomyelinase-Mangel	5
1.2.2.	Pathologie	5
1.2.3.	Klinik und Krankheitsverlauf	7
1.2.4.	Diagnostik	8
1.2.4.1.	Molekulargenetik	8
1.2.4.2.	Biochemische Untersuchung	9
1.2.4.3.	Pränatale Diagnostik	9
<b>1.3.</b>	<b>Niemann-Pick Typ C</b>	<b>9</b>
1.3.1.	Cholesterinstoffwechsel	9
1.3.1.1.	Cholesterin-Synthese	10
1.3.1.2.	Cholesterintransport	11
1.3.1.3.	LDL-rezeptorvermittelte Endozytose	13
1.3.1.4.	Intrazelluläre Cholesterintransportstörung	15
1.3.2.	Speichermuster	16
1.3.3.	Klinische Phänotypen	17
1.3.4.	Diagnostik	19
1.3.4.1.	Molekulargenetik	19
1.3.4.2.	Andere Untersuchungen	20
1.3.4.3.	Pränatale Diagnostik	20
<b>2.</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>22</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>23</b>
3.1.	Untersuchungsmaterial	23
3.2.	Geräte	23
3.3.	Chemikalien	23
<b>4.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>26</b>
<b>4.1.</b>	<b>Probenvorbereitung</b>	<b>26</b>
4.1.1.	Leukozytenpräparation	26
4.1.2.	Kultivierung der Fibroblasten	26
4.1.2.1.	Anlegen einer Primärkultur	27
4.1.2.2.	Subkultivierung	27
4.1.2.3.	Gewinnung der Fibroblasten-Pellets	28
<b>4.2.</b>	<b>Proteinbestimmung nach Lowry</b>	<b>28</b>

<b>4.3.</b>	<b>Nachweis einer verminderten ASMase-Aktivität</b>	29
4.3.1.	Spektrophotometrische Messung der ASMase-Aktivität	29
4.3.1.1.	Testansatz	29
4.3.1.2.	Berechnung der Enzymaktivität	30
4.3.2.	Radioisotopische Messung der ASMase-Aktivität	30
4.3.2.1.	Testansatz	30
4.3.2.2.	Berechnung der Enzymaktivität	31
<b>4.4.</b>	<b>Nachweis einer intrazellulären Cholesterintransportstörung</b>	31
4.4.1.	Filipin-Färbung	31
4.4.2.	Spektrophotometrische Bestimmung der ASMase-Aktivität nach Inkubation mit oder ohne FBS in lebenden Fibroblasten	33
4.4.2.1.	Subkultivierung der Fibroblasten	33
4.4.2.2.	Testansatz	33
4.4.2.3.	Berechnung der Enzymaktivität	34
4.4.3.	[ <sup>3</sup> H]-Oleat-Inkorporation in lebenden Fibroblasten	34
4.4.3.1.	Subkultivierung der Fibroblasten	34
4.4.3.2.	Testansatz	35
4.4.3.3.	Berechnung des [ <sup>3</sup> H]-Oleat-Wertes	35
4.4.4.	Radioisotopische Messung der zytoplasmatischen CEHase-Aktivität	35
4.4.4.1.	Testansatz	36
4.4.4.2.	Berechnung der Enzymaktivität	36
<b>5.</b>	<b>PATIENTEN</b>	37
5.1.	Niemann-Pick Typ A	37
5.2.	Niemann-Pick Typ B	37
5.3.	Niemann-Pick Typ C	38
<b>6.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	40
<b>6.1.</b>	<b>Spektrophotometrische Bestimmung der ASMase-Aktivität</b>	40
6.1.1.	Inkubationszeitabhängigkeit	40
6.1.2.	Proteinabhängigkeit	41
6.1.3.	Stabilitätsmessungen	42
6.1.4.	Enzymkinetik	43
6.1.5.	ASMase-Aktivitätsbereich	44
<b>6.2.</b>	<b>Radioisotopische Bestimmung der ASMase-Aktivität</b>	46
6.2.1.	Inkubationszeitabhängigkeit	46
6.2.2.	Proteinabhängigkeit	47
6.2.3.	Enzymkinetik	48
6.2.4.	ASMase-Aktivitätsbereich	49
<b>6.3.</b>	<b>Filipin-Färbung kultivierter Fibroblasten</b>	51
6.3.1.	Beurteilung der Färbung	51
6.3.2.	Färbeergebnisse	52
<b>6.4.</b>	<b>Spektrophotometrische Bestimmung der ASMase-Aktivität nach Inkubation mit oder ohne FBS in lebenden Fibroblasten</b>	53

<b>6.5.</b>	<b>[<sup>3</sup>H]-Oleat-Inkorporation in lebenden Fibroblasten</b>	55
6.5.1.	Inkubationszeitabhängigkeit	55
6.5.2.	Oleat-Inkorporation: [ <sup>3</sup> H]-Oleat-Werte in Patienten- und Kontrollfibroblasten	56
<b>6.6.</b>	<b>Radioisotopische Bestimmung der zytoplasmatischen CEHase-Aktivität</b>	57
<b>7.</b>	<b>DISKUSSION</b>	59
<b>7.1.</b>	<b>Methoden zur ASMase-Bestimmung</b>	59
7.1.1.	Spektrophotometrischer Test	59
7.1.2.	Radioisotopischer Test	60
7.1.3.	Patientenergebnisse	61
<b>7.2.</b>	<b>Methoden zum Nachweis einer intrazellulären Cholesterintransportstörung</b>	63
7.2.1.	Filipin-Färbung	63
7.2.2.	Spektrophotometrische Bestimmung der ASMase-Aktivität nach Inkubation mit oder ohne FBS in lebenden Fibroblasten	63
7.2.3.	[ <sup>3</sup> H]-Oleat-Inkorporation in lebenden Fibroblasten	64
7.2.4.	Radioisotopische Bestimmung der zytoplasmatischen CEHase-Aktivität	66
<b>7.3.</b>	<b>Darstellung der neu etablierten Methoden und der von uns entwickelten Methoden in der Diagnostik der NP-Erkrankungen</b>	68
<b>8.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	70
<b>9.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	72
<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	83
<b>11.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	84



**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1 a:	<i>Abbau von Sphingolipiden durch lysosomale Enzyme</i>	2
Abbildung 1 b:	<i>Erläuterung der verwendeten Symbole</i>	3
Abbildung 2:	<i>Sphingomyelin-Synthese</i>	4
Abbildung 3:	<i>Sphingomyelin-Abbau</i>	5
Abbildung 4:	<i>Cholesterin-Synthese</i>	10
Abbildung 5:	<i>Strukturformel des Cholesterins</i>	11
Abbildung 6:	<i>Physiologischer Ablauf der LDL-rezeptorvermittelten Endozytose</i>	14
Abbildung 7:	<i>LDL-rezeptorvermittelte Endozytose in Zellen mit NPC1- bzw. NPC2-Mutation</i>	16
Abbildung 8:	<i>Hydrolytischer Abbau des HNP durch die Sphingomyelinase</i>	29
Abbildung 9:	<i>Inkubationszeitabhängigkeit in a) Leukozyten, b) Fibroblasten und Chorionzotten</i>	40
Abbildung 10:	<i>Proteinabhängigkeit in a) Leukozyten, b) Fibroblasten und Chorionzotten</i>	41
Abbildung 11:	<i>Stabilitätsmessungen in Fibroblasten</i>	42
Abbildung 12:	<i>Enzymkinetik in a) Leukozyten, b) Fibroblasten, c) Chorionzotten</i>	43
Abbildung 13:	<i>Inkubationszeitabhängigkeit in a) Leukozyten, b) Fibroblasten, c) Chorionzotten</i>	46
Abbildung 14:	<i>Proteinabhängigkeit in a) Leukozyten, b) Fibroblasten, c) Chorionzotten</i>	47
Abbildung 15:	<i>Enzymkinetik in a) Leukozyten, b) Fibroblasten</i>	49
Abbildung 16:	<i>Typisches perinukleäres Fluoreszenzmuster in NP-C-Hautfibroblasten</i>	51
Abbildung 17:	<i>Darstellung der Cholesterin-Akkumulation in Lysosomen mittels Filipin-Färbung und Immunfluoreszenzmikroskopie in Hautfibroblasten nach Inkubation mit LDL</i>	52
Abbildung 18:	<i>Darstellung der nach Kultivierung in Normalmedium und <math>\pm</math> FBS-haltigem Medium bestimmten mittleren ASMase-Aktivitäten in Kontroll-, NP-A-, NP-B- und NP-C-Fibroblasten</i>	53
Abbildung 19:	<i>Zwei-Kompartimentenmodell des Cholesterinestermetabolismus in Makrophagen, das den zytoplasmatischen Cholesterinesterzyklus darstellt</i>	67
Abbildung 20:	<i>Flussdiagramm zum Nachweis einer NP-Erkrankung</i>	69

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1 a:	<i>Apolipoproteine der Plasmaproteine beim Menschen</i>	11
Tabelle 1 b:	<i>Einige Eigenschaften der Plasmalipoproteinklassen beim Menschen</i>	12
Tabelle 2:	<i>K<sub>M</sub>-Werte in a) Leukozyten, b) Fibroblasten, c) Chorionzotten</i>	43
Tabelle 3:	<i>Normwerte für saure Sphingomyelinase</i>	45
Tabelle 4:	<i>ASMase-Aktivität (nmol/h/mg) in Patientenfibroblasten</i>	45
Tabelle 5:	<i>Normwerte für saure Sphingomyelinase</i>	50
Tabelle 6:	<i>ASMase-Aktivität (nmol/h/mg) in Patientenfibroblasten</i>	50
Tabelle 7:	<i>Färbeergebnisse nach LDL-Inkubation in Niemann-Pick Patientenfibroblasten</i>	52
Tabelle 8:	<i>In Normalmedium (NM) und Medium ± FBS bestimmte ASMase-Aktivitäten in NPD-Patientenfibroblasten</i>	54
Tabelle 9:	<i>In Normalmedium (NM) und Medium ± FBS bestimmte mittlere ASMase-Aktivitäten in NPD-Patienten- und Kontrollfibroblasten</i>	54
Tabelle 10 a:	<i>[<sup>3</sup>H]-Oleat-Wert nach sechsständiger ± FBS-Inkubation in Fibroblasten der Kontrolle 1 und des Patienten 8</i>	55
Tabelle 10 b:	<i>[<sup>3</sup>H]-Oleat-Wert nach sechsständiger ± FBS-Inkubation in Fibroblasten der Kontrolle 2 und des Patienten 10</i>	55
Tabelle 11 a:	<i>[<sup>3</sup>H]-Oleat-Wert nach zwölfständiger ± FBS-Inkubation in Fibroblasten der Kontrolle 1 und des Patienten 8</i>	56
Tabelle 11 b:	<i>[<sup>3</sup>H]-Oleat-Wert nach zwölfständiger ± FBS-Inkubation in Fibroblasten der Kontrolle 2 und des Patienten 10</i>	56
Tabelle 12 a:	<i>[<sup>3</sup>H]-Oleat-Wert nach 24-stündiger ± FBS-Inkubation in Fibroblasten der Kontrolle 1 und des Patienten 8</i>	56
Tabelle 12 b:	<i>[<sup>3</sup>H]-Oleat-Wert nach 24-stündiger ± FBS-Inkubation in Fibroblasten der Kontrolle 2 und des Patienten 10</i>	56
Tabelle 13:	<i>[<sup>3</sup>H]-Oleat-Mittelwerte in NPD-Patienten- und Kontrollfibroblasten</i>	57
Tabelle 14:	<i>[<sup>3</sup>H]-Oleat-Werte in NPD-Patientenfibroblasten</i>	57
Tabelle 15:	<i>Normbereich der zytoplasmatischen CEHase-Aktivität in Kontrollfibroblasten</i>	58
Tabelle 16:	<i>Zytoplasmatische CEHase-Aktivität in Niemann-Pick Patientenfibroblasten</i>	58
Tabelle 17:	<i>Zusammenfassung der eigenen und Literatur-Normwerte</i>	61
Tabelle 18:	<i>Zusammenfassung aller Ergebnisse in Patientenfibroblasten</i>	62

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

**A**

Abb.	Abbildung
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
apo	Apolipoprotein
ASMase	saure Sphingomyelinase ( <i>engl. acid sphingomyelinase</i> )

**C**

C	Chorionzotten
CEHase	<u>Cholesterinesterhydrolase</u>
CESD	Cholesterinesterspeicherstörung ( <i>engl. Cholestery Ester Storage Disease</i> )
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CoA	Coenzym A
cpm	counts per minutes

**D**

d	Dezi
Δ	Delta

**E**

E	Extinktion
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat

**F**

F	Fibroblasten
FBS	Fetales Kälberserum ( <i>engl. Fetal bovine serum</i> )
FS	Fettsäure

**G**

g	Gramm
ges.	gesamt
gez.	gezählt
°C	Grad Celcius

**H**

h	Stunden
HDL	Lipoproteine mit hoher Dichte ( <i>engl. high-density lipoproteins</i> )
HMG-CoA	β-Hydroxyl-β-methylglutaryl-CoA
HNP	2N-Hexadecanoylamino-4-nitrophenyl-phosphorylcholin

**K**

kb	Kilobasen
----	-----------

**L**

l	Liter
L	Leukozyten

LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Lipoproteine geringer Dichte ( <i>engl. low-density lipoproteins</i> )
LPDS	<u>L</u> ipoprotein- <u>d</u> eficient <u>s</u> erum
LSO	<i>engl. lysosome-like storage organelle</i>
LW	Leerwert
<b>M</b>	
m	Milli
M	Molar
min	Minuten
μ	Mikro
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
<b>N</b>	
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NP	Niemann-Pick
NP-A	Niemann-Pick Typ A
NP-B	Niemann-Pick Typ B
NP-C	Niemann-Pick Typ C
NPD	Niemann-Pick Erkrankung ( <i>engl. Niemann-Pick disease</i> )
<b>P</b>	
p	Piko
P	Probe
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	<u>P</u> erkutane <u>e</u> ndoskopische <u>G</u> astrostomie
<b>R</b>	
RBC	Rote Blutkörperchen ( <i>engl. red blood cells</i> )
<b>S</b>	
SMase	<u>S</u> phingomyelinase
Substratgem.	Substratgemisch
<b>T</b>	
Tab.	Tabelle
<b>U</b>	
U	Umdrehung
<b>V</b>	
V	Volumen
VLDL	Lipoproteine sehr geringer Dichte ( <i>engl. very low-density lipoproteins</i> )
<b>Z</b>	
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. EINLEITUNG

Albert Niemann, ein deutscher Pädiater, beschrieb 1914 einen Patienten mit einem bis dahin unbekanntem Krankheitsbild [109]. Der Säugling jüdischer Abstammung litt an einer massiven Hepatosplenomegalie und einer rasch fortschreitenden neurodegenerativen Erkrankung, die im Alter von eineinhalb Jahren zu seinem Tod führte. Obwohl Niemann diese Erkrankung klar vom M. Gaucher differenzierte, wurden später viele Patienten mit früher neurologischer Manifestation als eine Variante des M. Gaucher klassifiziert. Erst 1927 stellte Ludwig Pick nach gründlicher Überprüfung der Krankenakten und morphologischer Studien fest, dass es sich bei diesen Patienten um ein eigenständiges Krankheitsbild handelte [124, 125]. Er nannte diese Erkrankung Morbus Niemann-Pick (NPD).

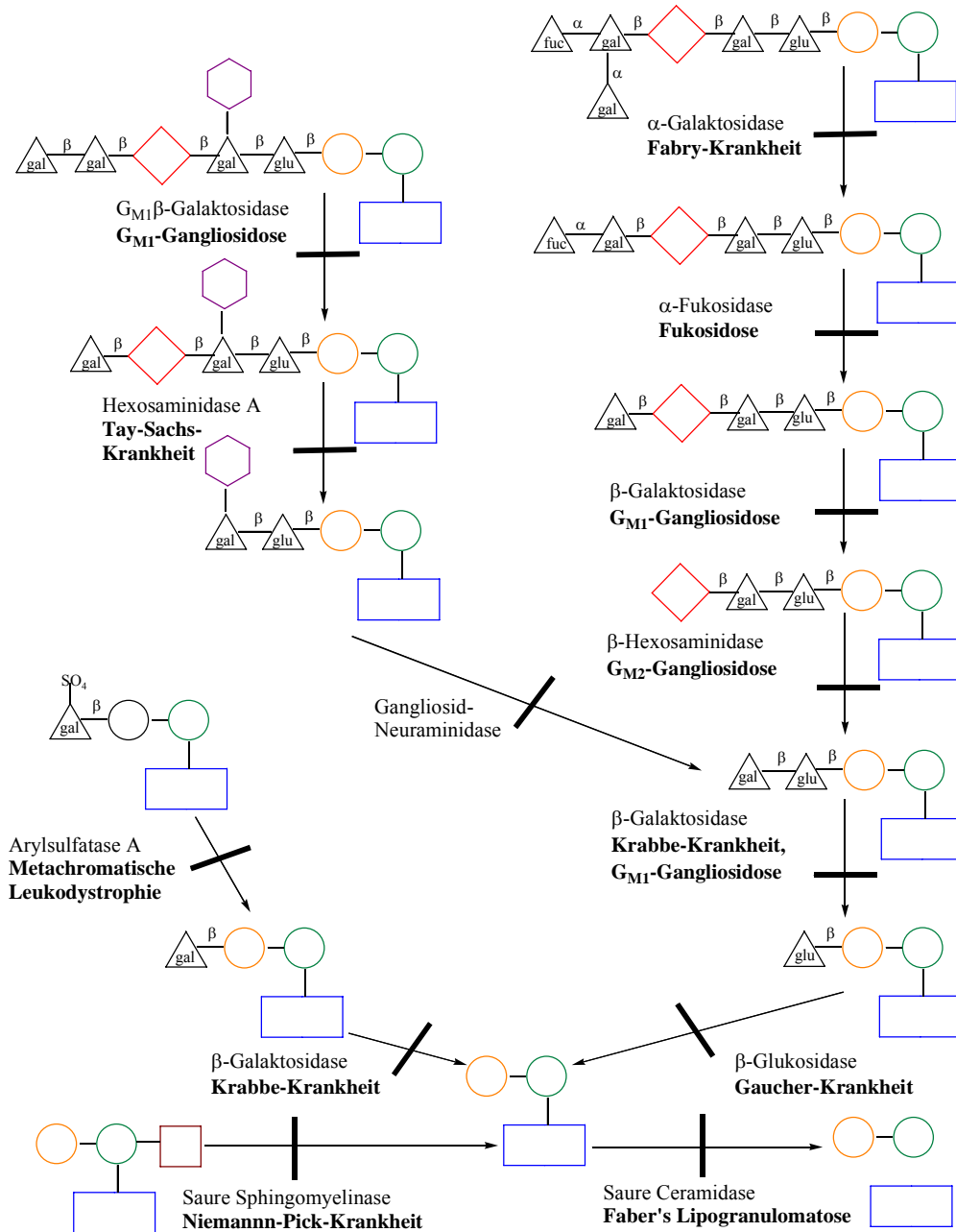
Die Einteilung der NPD erfolgt nach klinischen Phänotypen in vier Gruppen A–D [24], eine biochemische Differenzierung anhand der sauren Sphingomyelinase-Aktivität [29] konnte sich nicht durchsetzen. Beim klinischen Phänotyp A handelt es sich um eine schwer verlaufende neuroviszerale Erkrankung, die schon im Kindesalter tödlich endet. Der Typ B unterscheidet sich hiervon durch eine spätere Organmanifestation, das Fehlen neurologischer Symptome und das Erreichen des Erwachsenenalters. Bei Typ C NPD-Patienten findet man einen prolongierten Neonatalikterus, eine mild ausgeprägte Hepatosplenomegalie und eine langsam fortschreitende neurodegenerative Erkrankung. Die Typ-D-Erkrankung zeigt einen ähnlichen klinischen Verlauf wie der Typ C, wird aber aufgrund ihres regional begrenzten Vorkommens von diesem abgegrenzt.

### 1.1. Lysosomale Speicherkrankheiten

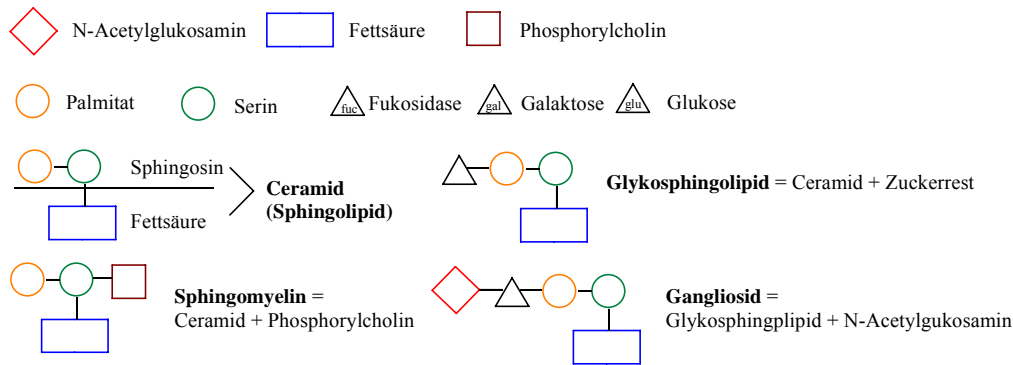
Sphingoglykolipide werden in den Lysosomen abgebaut, wo mehrere enzymkatalysierte Hydrolysereaktionen ablaufen (Abb. 1 a, b). Der autosomal rezessiv vererbte Mangel eines dieser Enzyme führt durch den verminderten Abbau zu einer Sphingolipid-Speicherkrankheit.

Eine Lipidspeicherung im ZNS verursacht neurologische Symptome, in der Retina den für lysosomale Speicherkrankheiten typischen kirschroten Fleck der Makula und in peripheren Organen, wie in Leber und Milz, eine zunehmende Hepatosplenomegalie. Der in der Regel schwere Krankheitsverlauf führt im frühen Kindesalter zum Tod [1].

Die Niemann-Pick-Erkrankung Typ-A und -B beruhen auf einem Defekt der sauren Sphingomyelinase. Die Typen C und D sind nicht durch einen primären Enzymmangel bedingt, sondern durch eine Mutation des NPC1- bzw. NPC2-Proteins, die zu einer intrazellulären Cholesterintransportstörung führt.



**Abb. 1 a:** Abbau von Sphingolipiden durch lysosomale Enzyme. Die Erbkrankheiten, die durch den Defekt eines dieser Enzyme verursacht werden, sind fett gedruckt [1, 174].



**Abb. 1 b:** Erläuterung der verwendeten Symbole

## 1.2. Niemann-Pick Typ A und B

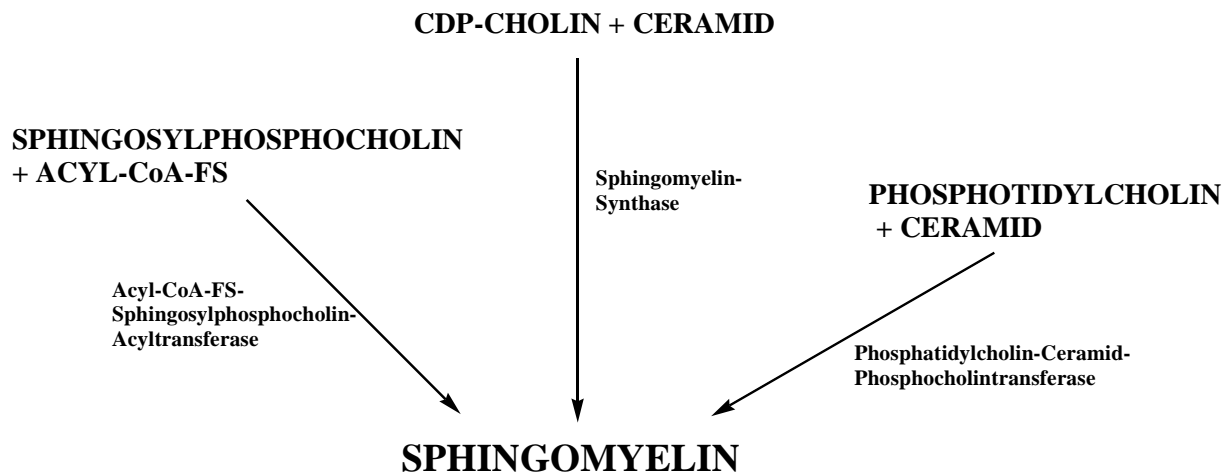
### 1.2.1. Sphingomyelin-Stoffwechsel

Das Sphingomyelin wird zu den Sphingolipiden, der nach den Glycerophospholipiden zweiten großen Gruppe der Membranlipide, gerechnet. Wegen seiner amphiphilen Eigenschaft stabilisiert das Sphingomyelin Membranen und ist daher ein wesentlicher Bestandteil subzellulärer Organellen, der Plasmamembran, Mitochondrien, Myelinscheiden, des endoplasmatischen Retikulums und Erythrozytenstromas [22]. Dieses Lipid kommt auch in Lipoproteinen (23 % in VLDL, 25 % in LDL und 13 % in HDL) des menschlichen Blutes vor [19].

#### 1.2.1.1. Sphingomyelin-Synthese

Das Sphingomyelin (N-Acylsphingosinphosphocholin) wird aus Ceramid (N-Acylsphingosin) und CDP-Cholin mit Hilfe der Sphingomyelin-Synthase hergestellt (Abb. 2). Außerdem kann es durch Übertragung der Phosphocholingrouppe von Phosphotidylcholin auf Ceramid oder der Fettsäure der Acyl-CoA-Fettsäure auf Sphingosylphosphocholin gebildet werden [142].

Sphingomyeline enthalten vorwiegend Palmitinsäure (16:0) und Stearinsäure (18:0) als Acylgruppen. Längerkettige Fettsäuren wie Nervonsäure (24:1) und Behensäure (22:0) kommen weniger häufig vor [142, 174].



**Abb. 2:** Sphingomyelin-Synthese; FS: Fettsäure [142]

### 1.2.1.2. Sphingomyelin-Abbau

Der Sphingomyelin-Katabolismus wurde intensiv untersucht. Bisher konnten drei Isoenzyme beschrieben werden:

#### 1) Neutrale Sphingomyelinase

Dieses membranständige  $Mg^{2+}$ -abhängige Enzym mit einem pH-Optimum bei 7,5 [146, 20, 95] kommt bei den meisten Säugetieren hauptsächlich in den Zellen des Gehirns vor.

#### 2) $Zn^{2+}$ -abhängige Sphingomyelinase

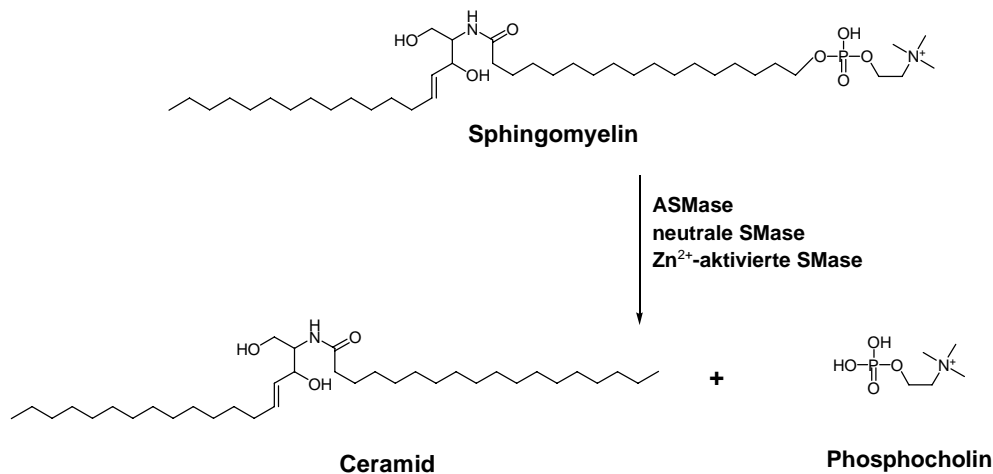
Dieses Enzym wurde im Serum von Mensch und Rind entdeckt, weiterführende Analysen stehen noch aus [148].

#### 3) Saure Sphingomyelinase (ASMase = acid sphingomyelinase)

Eine im Jahr 1940 veröffentlichte Arbeit von Thannhauser und Reichel [155] beschrieb erstmals die Existenz der ASMase. Es handelt sich hierbei um ein ubiquitär vorkommendes lysosomales Enzym, dessen Aktivität in verschiedenen Geweben, wie z. B. in der Leber [54], im Gehirn [28] und in den Nieren [135] nachgewiesen wurde.

Alle Isoenzyme katalysieren den Abbau des Sphingomyelins in Ceramid und Phosphocholin (Abb. 3).





**Abb. 3: Sphingomyelin-Abbau**

### 1.2.1.3. Sphingomyelinase-Mangel

Der Niemann-Pick-Erkrankung Typ-A und -B liegt eine verminderte Aktivität der sauren Sphingomyelinase zugrunde. Die in kultivierten Fibroblasten oder Lymphozyten bestimmte Aktivität beträgt bei Typ-A-Patienten höchstens 5 % des Normbereiches [38, 161, 66, 127]. Ähnliche Werte werden auch in Leber-, Nieren- und Hirngewebe gemessen [17, 40, 10]. Dagegen variiert die ASMase-Restaktivität in kultivierten Zellen bei Typ-B-Patienten zwischen 2 und 10 % des Normbereiches [17, 143, 10].

Die verminderte ASMase-Aktivität hat eine Anhäufung des Sphingomyelins in Lysosomen, sekundär des Cholesterins, der Bis(monoacylglycero)phosphate und Glykolipide, z. B. Glukozerebride, Ganglioside G<sub>M2</sub> und G<sub>M3</sub> [67], zur Folge.

### 1.2.2. Pathologie

Der Nachweis von Schaumzellen oder Niemann-Pick Zellen in betroffenen Geweben und Organen, besonders des retikuloendothelialen Systems, ist zwar für die Niemann-Pick Erkrankung charakteristisch, aber noch kein Beweis für sie, da histologisch ähnliche Zellen auch bei Patienten mit Wolman-Erkrankung, Cholesterinesterspeicherstörung (CESD), Lipoproteinlipase-Mangel und G<sub>M1</sub>-Gangliosidose, Typ 2 gefunden werden. Bei den Schaumzellen handelt es sich um Histiocyten, die mit nicht abgebautem Sphingomyelin, unverestertem Cholesterin, Bis(monoglycero)phosphat und anderen Lipiden gefüllt sind. Im Knochenmark er-

scheint das intrazelluläre Material der Histozyten stellenweise blau, weshalb sie auch seeblaue Histozyten genannt werden [42].

**ZNS:**

Bei Typ-A-Patienten ist das Kleinhirn von der Lipidablagerung stärker betroffen als das Großhirn. Es werden in beiden Organen geschwollene, blasse Ganglionzellen, deren Zytoplasma mit großen Vakuolen gefüllt ist, gefunden. Eine periphere Neuropathie wird ebenso beschrieben [74], die jedoch nicht so häufig und in dem Ausmaß wie die ZNS-Beteiligung vorkommt.

Beim Typ B ist in der Regel das ZNS nicht betroffen, da sich kaum Lipid abgelagert [147].

**Milz:**

Da Zellen des retikuloendothelialen Systems in der Lage sind sphingomyelinreiches Membranmaterial zu phagozytieren, ist die Milz in beiden Typen, eines der am stärksten betroffenen Organe. Sie kann um das Zehnfache vergrößert sein [123, 63] und führt daher beim schwer verlaufenden Typ A häufig in den ersten Lebensmonaten zur Diagnose. Beim Typ B können das Auftreten und Ausmaß der Vergrößerung stark variieren.

**Lymphknoten:**

Bei progredienter Erkrankung kann auch die Lymphknotengröße um das Drei- bis Fünffache zunehmen. Am häufigsten betroffen sind die Mesenteriallymphknoten und Hiluslymphknoten der Milz, Leber und Lunge. Periphere Lymphknoten sind nicht befallen.

**Knochenmark:**

Da Zellen des retikuloendothelialen Systems hauptsächlich im Knochenmark vorkommen, zählt es, wie die Milz, zu den bei beiden Typen am stärksten befallenen Organen. Es erscheint hyperplastisch und ist reich an Niemann-Pick-Zellen, die zur Verdrängung der normalen Hämatopoese führen.

**Lungen:**

Eine Lungenbeteiligung kommt normalerweise bei beiden Typen vor, wobei sie bei Typ-B-Patienten stärker ausgeprägt ist. Schaumzellen sind in der gesamten Lunge, in Lymphgefäßen, Pulmonalarterien und Alveolen zu finden [23].

**Leber:**

Bei Typ-A-Patienten kann die Leber um das Eineinhalb- bis Zweifache vergrößert sein [23, 137]. Es kann bis zu sechs Monaten dauern, bis die ersten histologischen Veränderungen gesehen werden. Die Leber ist von derber Konsistenz [124] und graugelber Farbe. Das Auftreten und Ausmaß der Vergrößerung unterliegt beim Typ B, wie die Milzvergrößerung, starken Variationen.

**Nieren:**

Die Nieren sind bei beiden Typen leicht verändert. Autopsie-Nieren der meisten Typ-A-Patienten sind kleiner und haben eine fettige, leicht gelbe Rinde [23]. Pick konnte in einer Arbeit zeigen [124], dass die Hälfte der von ihm untersuchten Nieren von Typ-A-Patienten Schaumzellen, die von Tubulusepithelien und glomerulären Endothelzellen stammen, gespeichert hatten.

**Augen:**

Es wurden lipidbeladene retinale Ganglienzellen, Vakuolen der inneren und äußeren Körnerschicht und der Choroidea beschrieben [134, 81, 175]. Augenveränderungen konnten schon in der 23. Schwangerschaftswoche eines Typ-A-Fetus beobachtet werden [60].

**1.2.3. Klinik und Krankheitsverlauf**

Bei NPD-Typ-A sind Klinik und Krankheitsverlauf relativ einheitlich. Nach einer normalen Geburt und Postnatalperiode zeigen sich nach vier bis sechs Monaten eine Hepatosplenomegalie, leichte Lymphadenopathie und psychomotorische Retardierung. Bei etwa 50 % der Patienten findet sich ophthalmologisch ein kirschroter Fleck in der Makula. Die meisten Patienten zeigen eine minimale Lungenbeteiligung. Jedoch konnten in Röntgenaufnahmen der Lunge ein diffus retikuläres oder fein noduläres Infiltrationsmuster beschrieben werden [50]. Der rasche progrediente Verlust der motorischen und intellektuellen Fähigkeiten sowie Fütterungsschwierigkeiten, die zu einer Mangelernährung führen, haben zur Folge, dass die Patienten im Alter von zwei bis drei Jahren sterben.

Im Gegensatz dazu ist das klinische Bild des NPD-Typ B sehr variabel. Bei den meisten Patienten wird inzidentuell in der Kindheit eine Vergrößerung von Leber und/oder Milz gefunden. Eine leichte pulmonale Mitbeteiligung in Form einer diffusen oder fein retikulären Infiltration

ist zu diesem Zeitpunkt in bildgebenden Untersuchungen des Thorax nachweisbar. Im ganzen Lungengewebe, in den Lymphgefäßen, den Pulmonalarterien und in den Alveolen sind Schaumzellen, die histopathologisch erfasst werden können, zu finden. Die pulmonale Infiltration ist bei den meisten Patienten progredient und wird im Alter von 15 bis 20 Jahren symptomatisch. Lebensbedrohende bronchopulmonale Infekte und eine pulmonalarterielle Hypertonie mit daraus resultierendem Cor pulmonale werden beschrieben [75]. Bei schwer erkrankten Patienten kommt es zu einem Befall der Leber, der zu einer lebensbedrohlichen Leberzirrhose, portalen Hypertension und Aszites führen kann [154]. Eine neurologische Manifestation tritt in der Regel beim Typ B nicht auf. Jedoch konnten bei manchen Patienten eine kirschrote Makula [83] oder psychische Retardierung [144] beobachtet werden. Patienten mit Typ B erreichen aufgrund des mildereren Krankheitsverlaufs das Kindes- bzw. Erwachsenenalter.

#### **1.2.4. Diagnostik**

##### **1.2.4.1. Molekulargenetik**

Typ-A und -B der Niemann-Pick Erkrankung treten familiär gehäuft auf und werden durch eine Mutation im ASM-Gen (engl. *acid sphingomyelinase*) verursacht, die zu einer verminderten Aktivität der ASMase führt [152]. Das ASM-Gen ist auf Chromosom 11p15.1-p15.4 lokalisiert, ist 5 kb lang und besitzt sechs Exone.

Obwohl es sich bei beiden Typen um eine panethnische Erkrankung handelt, treten sie häufiger bei Individuen aschkenazim-jüdischer Abstammung auf.

Bei jüdischen Patienten konnten bis heute drei häufige Mutationen, R496L, L302P und fsP330, die einen Typ A bedingen, identifiziert werden [76, 78, 79]. Bei den nicht jüdischen Patienten fand man sechs Mutationen, M382I, N383S, G577S, L261X, fsL178 und g2610c [151, 152, 33, 80]. Beim Typ B wurden insgesamt drei Mutationen entdeckt. Die häufigste Mutation bei jüdischen Patienten ist  $\Delta$ R608 [77], die auch bei nicht jüdischen Patienten [169] neben den Mutationen G242R und S436R [151, 152] vorkommt.

Die Größe des ASM-Gens und die bisher nur geringe Anzahl an bekannten Mutationen ermöglichen die Durchführung von Screening-Untersuchungen in von NPD-A und -B betroffenen Familien. Dennoch erfolgt die endgültige Diagnostik anhand biochemischer Untersuchungsmethoden.

#### **1.2.4.2. Biochemische Untersuchung**

Die Diagnose der NP-A- und -B- Erkrankung erfolgt in der Regel durch den radioisotopischen Nachweis einer verminderten ASMase-Aktivität in Leukozyten, Lymphozyten oder kultivierten Fibroblasten [172]. Die Restaktivität beträgt zwischen einem und zehn Prozent, wobei die Höhe der Restaktivität nicht mit dem phänotypischen Schweregrad korreliert.

Der biochemische Nachweis eines ASMase-Mangels nimmt zusammen mit dem klinischen Erscheinungsbild einen hohen Stellenwert in der Diagnostik der NPD ein. Die hohe Sensitivität und Spezifität dieser Methode erlauben eine schnelle Diagnose und einen Verzicht auf invasive, komplikationsreiche Knochenmark- oder Leberbiopsien.

#### **1.2.4.3. Pränatale Diagnostik**

Der zuverlässige Nachweis einer Niemann-Pick Erkrankung in utero gelingt durch die Bestimmung der ASMase-Aktivität in kultivierten Amnionzellen oder Chorionzotten [161, 160, 114, 96].

Bei Schwangeren mit einer bestätigten ASM-Mutation in der Familie kann allein die molekulargenetische Untersuchung fetaler Zellen die Diagnose liefern oder als Bestätigungstest des biochemischen Nachweises dienen.

### **1.3. Niemann-Pick Typ C**

#### **1.3.1. Cholesterinstoffwechsel**

Cholesterin ist für viele Tiere und auch für den Menschen ein essentielles Lipid, das in sämtlichen zellulären Membranen, ausgenommen der inneren Mitochondrienmembran, vorkommt. Es dient als Vorstufe zur Synthese von Steroidhormonen und Gallensäuren, die über die Gallenwege in das intestinale Lumen abgegeben werden.

Da die de-novo-Cholesterinsynthese, die in allen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten stattfindet, ein komplexer und viel Energie verbrauchender Prozess ist, wird die Synthese so reguliert, dass körpereigenes Cholesterin durch Nahrungscholesterin ergänzt wird.

### 1.3.1.1. Cholesterin-Synthese

Die Cholesterin-Synthese findet hauptsächlich in der Leber statt. Sie umfasst vier Stufen (Abb. 4):

#### Stufe 1:

Zwei Moleküle Acetyl-CoA kondensieren zu Acetoacetyl-CoA. Dieses nimmt ein weiteres Molekül Acyl-CoA auf, so dass  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) entsteht. Beide Reaktionen sind reversibel, die erste wird durch das Enzym Thiolase, die zweite durch die HMG-CoA-Synthase katalysiert. Die Umsetzung von HMG-CoA zu Mevalonat durch die HMG-CoA-Reduktase ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Cholesterin-Synthese. Die Regulierung der HMG-CoA-Reduktase erfolgt hormonell. Glucagon bewirkt eine Phosphorylierung und damit eine Inaktivierung des Enzyms. Insulin wirkt durch Dephosphorylierung aktivierend.

#### Stufe 2:

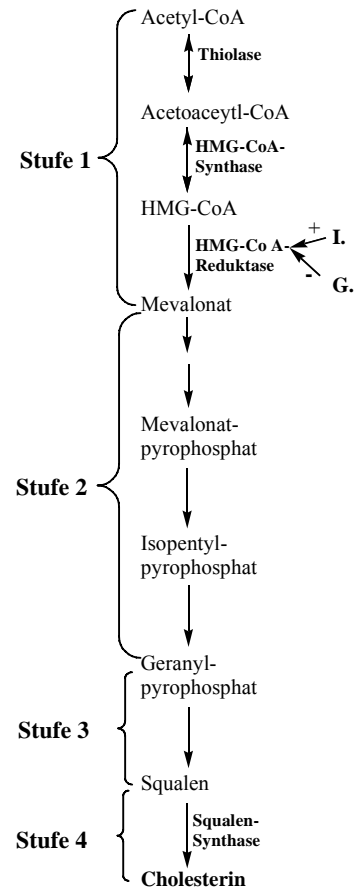
Das Mevalonat wird zu aktivierten Isopreneinheiten umgewandelt.

#### Stufe 3:

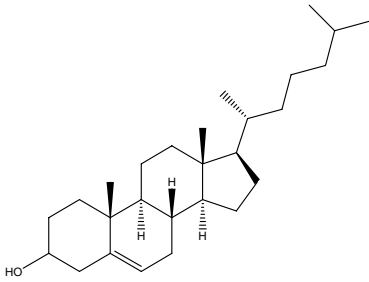
Durch Polymerisation von sechs  $C_5$ -Isopreneinheiten entsteht die lineare  $C_{30}$ -Struktur des Squalens.

#### Stufe 4:

Durch Zyklisierung des Squalenmoleküls entstehen die vier Ringe des Steroidgerüsts. Danach folgen Oxidationen, Entfernung oder Umlagerung von Methylgruppen, bis das Cholesterin (Abb. 5) entsteht.



**Abb. 4:** Cholesterin-Synthese; I.: Insulin, G.: Glucagon [174]



**Abb. 5:** Strukturformel des Cholesterins

### 1.3.1.2. Cholesterintransport

Da Cholesterin und Cholesterinester, aber auch andere Lipide wie Triacylglycerine und Phospholipide hydrophob sind, müssen sie zum Transport im Blutplasma eine nicht kovalente Verbindung mit bestimmten Proteinen, den Apolipoproteinen (Tab. 1 a) eingehen. Dabei entstehen Lipoproteine unterschiedlicher Dichte (Tab. 1 b).

<u>Apolipoprotein</u>	<u>Lipoprotein-Assoziation</u>
apo A-I	HDL
apo A-II	HDL
apo A-IV	Chylomikronen, HDL
apo B-48	Chylomikronen
apo B-100	VLDL, LDL
apo C-I	VLDL, HDL
apo C-II	Chylomikronen, VLDL, HDL
apo C-III	Chylomikronen, VLDL, HDL
apo D	HDL
apo E	Chylomikronen, VLDL, HDL

**Tab. 1 a:** Apolipoproteine der Plasmaproteine beim Menschen [106]

Lipoprotein	Dichte ( $\text{g mL}^{-1}$ )	Zusammensetzung (Gewichtsprozent)				
		Protein	Phospho- lipide	Freies Cholesterin	Cholesterin- ester	Triacyl- glycerine
Chylomikronen	<1,006	2	9	1	3	85
VLDL	0,95–1,006	10	18	7	12	50
LDL	1,006–1,063	23	20	8	37	10
HDL	1,063–1,210	55	24	2	15	4

**Tab. 1 b:** Einige Eigenschaften der Plasmalipoproteinklassen beim Menschen [106]

Chylomikronen und VLDL sind triacylglycerinreiche, aber cholesterinarme Lipoproteine. LDL und HDL dagegen bestehen aus cholesterinreichen und triacylglycerinarmen Lipoproteinen.

Die vier Hauptlipoproteinklassen (Tab. 1 b) sind [89]:

### 1) Chylomikronen:

Als die größten Lipoproteine mit der geringsten Dichte enthalten Chylomikronen einen hohen Anteil an aus der Nahrung stammenden Triacylglycerinen. Sie werden bei der Lipidresorption in den Mukosazellen der duodenalen Schleimhaut synthetisiert und gelangen über das Lymphsystem in den Blutkreislauf. Zu ihren Apolipoproteinen zählen apo B-48, apo E und apo C-II. Der Großteil ihrer Triacylglycerine wird durch die Lipoproteinlipase der Gewebe abgebaut. Die dabei entstehenden Restkörper (remnants) enthalten noch Cholesterin, apo E und apo B-48. Diese Restkörper erreichen über den Blutkreislauf die Leber, wo sie endozytisch aufgenommen und weiter metabolisiert werden.

### 2) Lipoproteine sehr geringer Dichte, VLDL (*engl. very low-density lipoproteins*):

Überschüssige Fettsäuren, aber auch Kohlenhydrate aus der Nahrung werden in der Leber zu Triacylglycerinen umgesetzt und verlassen die Leber in Form von VLDL. VLDL setzt sich aus Triacylglycerinen, Cholesterin und Cholesterinester, apo B-100, apo C-I, apo C-II, apo C-III und apo E zusammen. Über den Blutweg wird das VLDL zu extrahepatischen Geweben transportiert. Die Triacylglycerine der VLDL werden durch die Lipoproteinlipase zu IDL (*engl. intermediate density lipoproteins*) abgebaut. Das IDL durchläuft in der Leber weitere Metabolisierungsschritte bis zum Endprodukt LDL.

### 3) Lipoproteine geringer Dichte, LDL (*engl. low-density lipoproteins*):

Das aus VLDL-Restkörpern entstehende LDL enthält einen sehr hohen Cholesterin- und Cholesterinesteranteil sowie das Lipoprotein apo B-100. Die Aufgabe des LDLs ist der Transport



von Cholesterin zu extrahepatischen Geweben, die spezifische Plasmamembranrezeptoren aufweisen. Die rezeptorvermittelte Aufnahme von Cholesterin und Cholesterinestern wird unter 1.3.1.3. erläutert.

**4) Lipoproteine mit hoher Dichte, HDL (*engl. high-density lipoproteins*):**

Die HDL sind für den reversen Cholesterintransport von den extrahepatischen Geweben zur Leber als dem einzigen Ort der Cholesterinausscheidung bzw. -metabolisierung zu Gallensäuren zuständig. Die Synthese des HDL beginnt in der Leber und im Dünndarm in Form kleiner, proteinreicher Partikel, die relativ wenig Cholesterin und keine Cholesterinester enthalten. Ferner findet man apo A-I, apo C-I, apo C-II und andere Lipoproteine sowie die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT). Dieses Enzym sitzt an der Oberfläche neu entstehender HDL-Partikel und setzt das Cholesterin und Phosphatidylcholin von Chylomikronen und VLDL-Restkörpern zu Cholesterinestern und Lysophosphatidylcholin um. Die HDL reifen dadurch zu kernhaltigen, kugelförmigen, cholesterinreichen Partikeln. Sie werden von der Leber aufgenommen und dort dem endgültigen Abbau zugeführt.

**1.3.1.3. LDL-rezeptorvermittelte Endozytose**

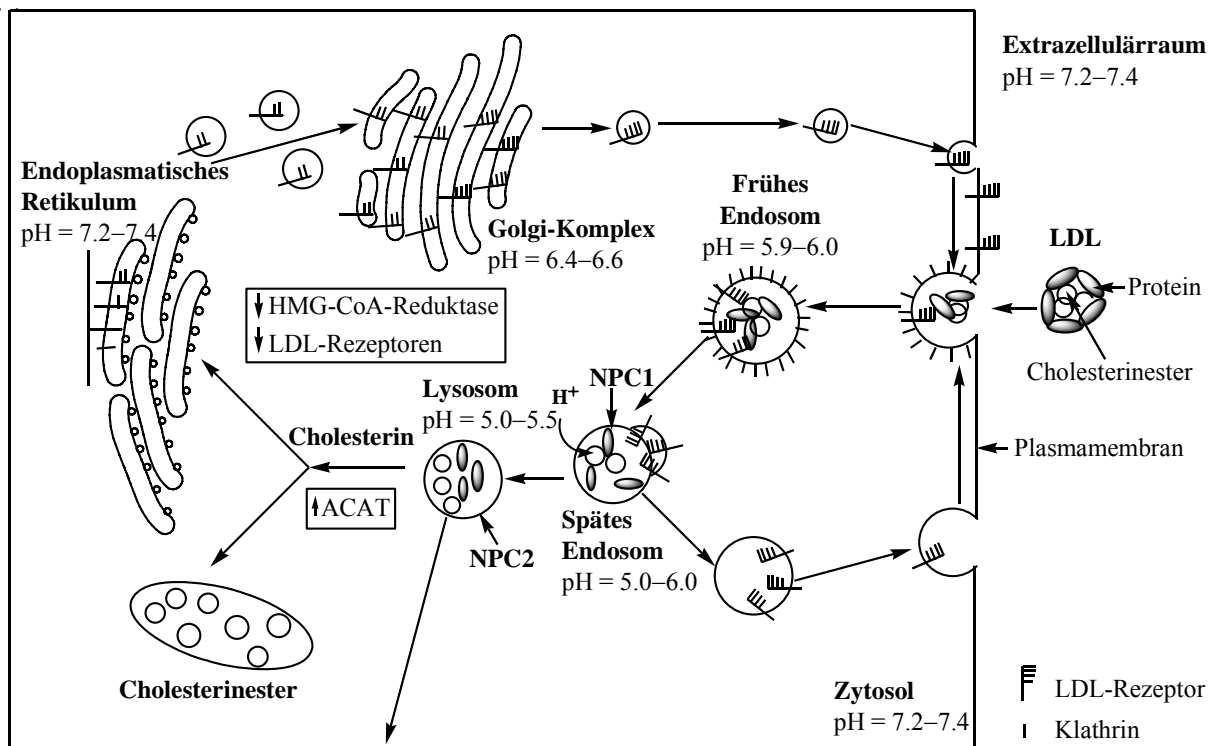
Der Transportweg des Cholesterins im Blut und die LDL-vermittelte Endozytose in Zielgeweben wurden von Michael Brown und Joseph Goldstein aufgeklärt (Abb. 6), [13].

Extrahepatische Gewebe, die auf Cholesterin angewiesen sind, exprimieren an ihrer Oberfläche LDL-Rezeptoren, die das apoB-100 des LDL-Partikels erkennen. Die Bindung von LDL an einen LDL-Rezeptor bewirkt eine Assoziation der LDL-Rezeptoren in der Plasmamembran zu „coated pits“, die auf der cytosolischen Seite mit Klathrin vernetzt sind, und eine Initiierung der Endozytose. So gelangen das LDL und dessen Rezeptor in einem Endosom in die Zelle. Besonders zwei Proteine, die in normalen Zellen gefunden werden können, sind für das Verständnis der NPC-Erkrankung interessant. Das in späten Endosomen vorkommende Niemann-Pick Typ C1 (NPC1)-Protein [56, 105] reguliert den Transport von cholesterinbeladenen Vesikeln zur Plasmamembran bzw. zum endoplasmatischen Retikulum in Anwesenheit des sterolbindenden Niemann-Pick Typ C2 (NPC2)-Proteins [113]. Die Hauptfunktion des in Lysosomen lokalisierten NPC2-Proteins [56, 105] im intrazellulären Cholesterin-Transportweg ist noch nicht bekannt [113]. Im späten Endosom erfolgt dann die Abspaltung des Rezeptors vom LDL. Die rezeptorbeladenen Vesikel werden zurück zur Plasmamembran transpor-

tiert. Schließlich fusioniert das späte Endosom mit einem Lysosom, in dem nun durch Einwirken des Enzyms saure Lipase (= saure Cholesterinesterhydrolase) [44, 132] aus Cholesterinestern Cholesterin freigesetzt wird. Das Cholesterin wird zum endoplasmatischen Retikulum oder zur Plasmamembran transportiert [87].

In normalen Zellen reichert sich das freie Cholesterin niemals in den späten Endosomen bzw. Lysosomen an, da im endoplasmatischen Retikulum bei Überschreiten eines bestimmten Cholesterinwertes eine Reihe regulatorischer Mechanismen aktiviert werden:

Das freigesetzte Cholesterin hemmt die HMG-CoA-Reduktase und damit die de-novo-Cholesterin-Synthese [11], aktiviert die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT), welche überschüssiges Cholesterin wieder verestert und im Zytoplasma als Cholesterinester-Tröpfchen speichert [43]. Zudem wird die Neusynthese von LDL-Rezeptoren im endoplasmatischem Retikulum supprimiert. Durch das Zusammenwirken dieser Mechanismen wird eine Cholesterin-Überladung der Zelle verhindert [12].



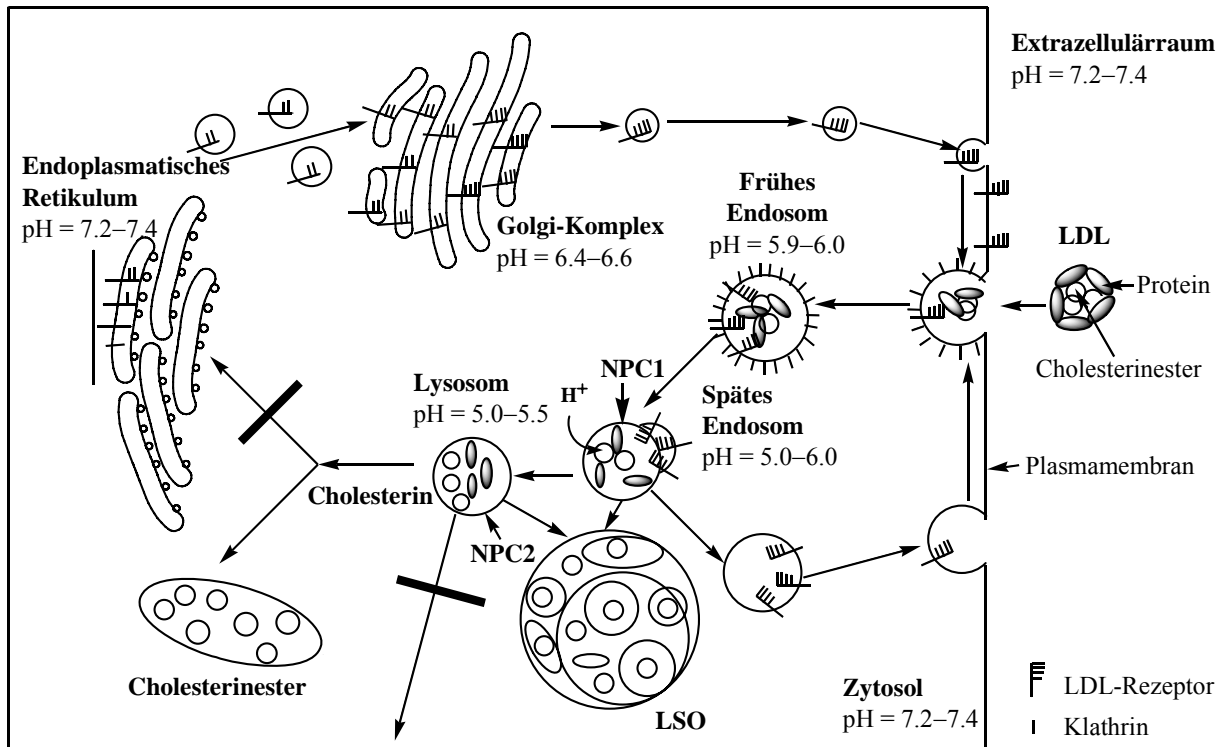
**Abb. 6:** Physiologischer Ablauf der LDL-rezeptorvermittelten Endozytose [15, 104, 113, 88]

#### 1.3.1.4. Intrazelluläre Cholesterintransportstörung

Beim Niemann-Pick Typ C wird die primäre Cholesterinakkumulation durch eine Mutation im NPC1- oder NPC2-Gen verursacht. Eine Mutation im ASM-Gen spielt keine Rolle. Die Aktivität der sauren Sphingomyelinase ist in Leukozyten, Leber-, Milz- und Hirngewebe normal oder sogar erhöht [35, 139, 130, 8, 162, 158]. In 60–70 % der Fälle kann in kultivierten Fibroblasten eine partiell verminderte ASMase-Aktivität *in vitro* gemessen [178, 158, 6] und ein verminderter Abbau exogen zugeführten Sphingomyelins in lebenden Fibroblasten nachgewiesen werden [97, 73, 161]. Eine exzessive Cholesterinzufuhr führt zu einer sekundären, reversiblen Abnahme der ASMase-Aktivität in lebenden Fibroblasten [156, 166].

NPC-Zellen zeigen eine primäre intrazelluläre Cholesterintransportstörung (Abb. 7). Das Cholesterin verlässt bei Abwesenheit des NPC1- bzw. NPC2-Proteins das späte Endosom/Lysosom nicht und akkumuliert dort in großen Mengen [113]. Diese Blockade des Cholesterintransports bewirkt eine Zunahme des Cholesteringehaltes der Zelle, die vom endoplasmatischen Retikulum unbemerkt bleibt, so dass keine gegenregulatorischen Mechanismen aktiviert werden. Neben der verzögerten Down-Regulation der *de-novo*-Cholesterin- und LDL-Rezeptorsynthese ist vor allem die Aktivierung der Cholesterinveresterung betroffen [84, 119]. Die zunehmende Cholesterinanhäufung führt zu einer morphologischen Veränderung des späten Endosoms/Lysosoms zu LSO (lysosome-like storage organelle), die Membranwindungen enthalten (120, 86). NPC-Zellen sind, da sie exogenes Cholesterin nicht verwerten können, stark von der *de-novo*-Cholesterin-Synthese abhängig [85, 111].

Die LDL-vermittelte Cholesterin-Aufnahme [84, 118], der Transport zu den späten Endosomen/Lysosomen und die Cholesterinesterhydrolyse [84] sind nicht beeinträchtigt. Auch *de-novo*-synthetisiertes und HDL-Cholesterin sind von der Störung nicht betroffen [116].



**Abb. 7:** LDL-rezeptorvermittelte Endozytose in Zellen mit NPC1- bzw. NPC2-Mutation [15, 104, 113, 88]

### 1.3.2. Speichermuster

NPC ist eine neuroviszerale Lipidspeichererkrankung, die durch das Vorhandensein von Schaumzellen und seeblauer Histozyten (siehe 1.2.2.) im Knochenmark [108, 90, 178] und in viszeralen Organen gekennzeichnet ist.

#### Leber und Milz:

Die Spleno- bzw. Hepatomegalie wird durch die Speicherung von Sphingomyelin, nicht verestertem Cholesterin [23, 163, 147], Bis(monoacylglycero)phosphat [51, 159, 70, 179, 130, 8], Glukosylceramid [159, 179, 52, 41, 122, 25, 26], anderen Phospholipiden und Glykolipiden ausgelöst. Die Lipidspeicherung in der Milz ist stärker ausgeprägt als in der Leber [159]. Eine pathologische Lipidspeicherung wurde sogar im Fetus nachgewiesen [52, 168, 162]. Die Cholesterinakkumulation bei NPC-Patienten ist nicht sekundär durch eine Sphingomyelinablagerung bedingt [162].

### **Gehirn:**

Der Cholesterin- und Sphingomyelingehalt sind in der Hirnrinde nicht erhöht [23, 147, 24]. In der weißen Hirnsubstanz sind diese in Abhängigkeit vom Demyelinisierungsgrad sogar erniedrigt [167]. Da das exogene LDL-Cholesterin die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann [59], ist das Gehirn zur Myelinbildung auf die de-novo-Cholesterin-Synthese angewiesen. Auffallend ist jedoch ein Anstieg von Glukosylceramiden, Laktosylceramiden und G<sub>M3</sub>- und G<sub>M2</sub>-Gangliosiden [94, 52, 30, 121, 130, 26, 163, 69]. Dieses Glykolipid-Speichermuster ist in der weißen Substanz weniger ausgeprägt.

### **1.3.3. Klinische Phänotypen**

Über das weite klinische Spektrum der Niemann-Pick Typ C Erkrankung machten als Erste Crocker und Farber in ihrer 1958 erschienen Arbeit [23] aufmerksam. In den letzten Jahren konnten die verschiedenen Untergruppen besser voneinander abgegrenzt werden [164, 34, 93, 165, 71, 157, 141, 170, 138, 91, 64, 61, 62, 184]. Nach den heutigen Kenntnissen können NPC1- von NPC2-Patienten klinisch nicht unterschieden werden. Die meisten bisher beschriebenen NPC2-Patienten leiden an einer akuten, schweren Erkrankungsform, oftmals mit einer ausgeprägten Lungenbeteiligung [101].

Die Erkrankung kann sich zwischen der Perinatalperiode und dem Erwachsenenalter manifestieren. Es werden vier verschiedene, vom Manifestationsalter abhängige Formen unterschieden:

#### **Perinatale Verlaufsform:**

In der Perinatalzeit tritt bei der Hälfte der Patienten eine Lebererkrankung auf, während die andere Hälfte asymptomatisch bleibt. Es wurden Fälle mit fetalem Aszites und Hydrops beschrieben [93]. Am häufigsten wird ein protrahierter Neonatalikterus, der bei den meisten Patienten bis zum zweiten bis vierten Lebensmonat anhält, mit einer progressiven Hepatosplenomegalie gefunden [164, 71]. In 10 % der Fälle kann die Lebererkrankung zu einem rapiden, fatalen Leberversagen führen [126]. Patienten mit dieser Manifestation versterben ohne Auftreten neurologischer Symptome bis zum sechsten Lebensmonat. Es wurden ferner Erkrankungsfälle mit schwerem neonatalem Lungenversagen beschrieben [126].

**Infantile Verlaufsform:**

Bei den meisten Kleinkindern kann eine isolierte Hepatosplenomegalie für viele Jahre das einzige Krankheitssymptom sein. Jedoch konnten auch Patienten mit einer weniger häufig vorkommenden, schweren frühkindlichen neurologischen Manifestationsform, begleitet von einer immer vorhandenen Hepatosplenomegalie, diagnostiziert werden [164, 165]. Eine muskuläre Hypotonie und eine verzögerte Entwicklung motorischer Meilensteine treten im Alter von sechs bis zwölf Monaten auf. Im Verlauf leiden die Kinder unter einem Verlust erworbener motorischer Fähigkeiten, milder psychomotorischer Retardierung und einer ausgeprägten Spastizität mit Beteiligung der Pyramidenbahn. Ein Intentionstremor kommt häufig vor, eine vertikale supranukleäre Blickparese fehlt in der Regel, und epileptische Anfälle, wie sie bei der klassischen Verlaufsform vorkommen, sind ungewöhnlich. Die meisten Patienten mit dieser Form erreichen nicht das fünfte Lebensjahr.

**Klassische Verlaufsform mit Auftreten neurologischer Symptome im Kindes- und Jugendalter:**

Am häufigsten kommen die spät-infantile und juvenile Verlaufsform (60–70 %), [173] vor. Ein neurologischer Ausbruch der Erkrankung im dritten bis fünften Lebensjahr erscheint anfangs als Ataxie, begleitet von einer Spleno- oder Hepatomegalie. Die ersten Symptome eines Krankheitsbeginns zwischen dem sechsten und zwölften Lebensjahr sind Lernschwierigkeiten und eine eingeschränkte Feinmotorik. Fokale und generalisierte epileptische Anfälle und Kataplexie [68] können ebenfalls vorkommen. Im weiteren Verlauf treten Symptome auf wie Ataxie, Dysarthrie, vertikale supranukleäre Blickparese (abwärts, aufwärts oder beides), [49, 136], Pyramidenbahnzeichen, Spastizität und psychische Störungen. Viele dieser Patienten sterben im Teenageralter, einige jedoch erst im zweiten oder dritten Lebensjahrzehnt.

**Adulte Verlaufsform:**

In 5 % der Fälle [167] treten die ersten Symptome der juvenilen Erkrankungsform schleichend im Alter von 18–59 Jahren [141] auf. Eine Psychose oder Demenz sind nicht selten, können sogar eine Erstmanifestation darstellen. Außerdem kommen Bewegungsstörungen und extrapyramidale Zeichen häufiger vor als bei der juvenilen Form. Bei der Hälfte der adulten Patienten findet sich eine Splenomegalie, die manchmal die einzige Manifestation sein kann [32, 100]. Die mediane Überlebenszeit beträgt ca. 20 Jahre [91].

### 1.3.4. Diagnostik

#### 1.3.4.1. Molekulargenetik

Mit Hilfe von Zellhybridisierungsstudien konnten eine Haupt- (NPC1) und eine Nebenkompimentationsgruppe (NPC2) entdeckt werden [98, 131, 176]. Ursache der NPC-Erkrankung ist in etwa 95 % der Fälle eine Mutation im NPC1-Gen [18] und in 5 % im NPC2 (= HE1)-Gen [100].

Das NPC1-Gen ist auf Chromosom 18q11-q12 lokalisiert, ist 56 kb lang und enthält 25 Exone [18, 4, 103]. Bislang wurden über 133 krankheitsverursachende NPC1-Mutationen berichtet, in 71 % der Fälle handelte es sich um missence-Mutationen [18, 47, 99, 100, 4, 103, 48, 149, 65, 98, 131, 153, 180, 181]. Die drei häufigsten vorkommenden Mutationen sind: I1061T, P1007A und G992W. Das NPC1 ist ein großes membranständiges Glykoprotein, das nur bei LDL-vermittelter Endozytose in den späten Endosomen zu finden ist und mit dem trans-Golgi-Apparat interagiert [56, 107]. Ist NPC1 defekt, werden auch andere Stoffwechselwege blockiert [87, 91].

Das NPC2-Gen ist auf Chromosom 14q24.3 lokalisiert. Es ist 13,5 kb lang und umfasst fünf Exone. Auch für dieses Gen wurden mehrere Mutationen gefunden [101]. Das NPC2 ist ein lösliches, ubiquitär exprimiertes, lysosomales Protein. Es geht eine Verbindung mit freiem Cholesterin, weniger mit Cholesterinester [112] und dem Mannose-6-phosphat-Rezeptor [105] ein. Das NPC2 kommt sowohl in Lysosomen cholesterinentzogener als auch -gesättigter Zellen vor [185].

Als Niemann-Pick Typ D wurden nach Crocker Patienten mit einer der juvenilen Form des Typ C ähnlichen, neuroviszeralen Erkrankung bezeichnet [24]. Da dieser Typ nur bei einigen Angehörigen einer Familie, die von der Außenwelt abgeschnitten in Nova Scotia/Kanada lebt, diagnostiziert wurde, stößt man in der Literatur manchmal auch auf den Begriff Nova Scotia Typ D. Es konnte gezeigt werden, dass die ursächliche Störung des Typ D in einer Mutation auf Chromosom 18q11-q12 liegt und zur Hauptkomplementationsgruppe gehört [46]. Somit ist der Typ D eine allelische Variante des NPC1 [171].

Da die Typ-C-Erkrankung durch eine Mutation zweier verschiedener Gene unterschiedlicher Größe verursacht werden kann, des Weiteren über 130 Mutationen des NPC1-Gens bekannt sind, ist die molekulargenetische Diagnostik erschwert. Da davon auszugehen ist, dass nicht alle krankheitsrelevanten Mutationen bekannt sind, reicht die Molekulargenetik als alleiniges diagnostisches Mittel nicht aus.

### **1.3.4.2. Andere Untersuchungen**

Vor der Entdeckung der intrazellulären Cholesterintransportstörung in NP-C-Zellen war es üblich, die Diagnose anhand von in Leberbiopsien durchgeführten Lipidanalysen [147, 164] zu stellen. In manchen Fällen war der zusätzliche Nachweis einer partiell reduzierten ASMase-Aktivität in kultivierten Fibroblasten sehr hilfreich [164, 178, 7].

Die Diagnosestellung erfordert heute den Nachweis einer intrazellulären Cholesterintransportstörung mit daraus resultierender Beeinträchtigung der Cholesterinveresterung und intralysosomalen Akkumulation von unverestertem Cholesterin in kultivierten Fibroblasten oder Lymphozyten. Die verminderte Cholesterinveresterung wird mit der Oleat-Inkorporation, einer komplizierten und langwierigen dünn-schichtchromatographischen Methode, nachgewiesen. Dieses Verfahren ist weniger sensitiv und spezifisch als die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Makrolidantibiotikum Filipin, da sie auch bei Patienten mit saurer Lipase-Mangel, CESD, familiärer Hypercholesterinämie und I-Zell-Erkrankung positive Ergebnisse liefert. Bei der Filipin-Färbung zeigen pathologische Fibroblasten eine intensive Fluoreszenz perinukleärer Vakuolen, die den mit unverestertem Cholesterin voll bepackten Lysosomen entsprechen.

Die Kombination der beiden zuletzt genannten Untersuchungen ist für die Diagnose des Typ C von großer Bedeutung, da beide zusammen zu einer relativ schnellen und sicheren Diagnosestellung beitragen.

### **1.3.4.3. Pränatale Diagnostik**

Für die pränatale Diagnose werden kultivierte Zellen benötigt. Aufgrund des späteren Entnahmezeitpunktes und der häufig falsch positiven Ergebnisse in Amnionzellen [168] werden zur Durchführung der Oleat-Inkorporation und Filipin-Färbung bevorzugt Chorionzotten verwendet. Während diese Methoden zur Ermittlung biochemisch klassischer Phänotypen erfolgreich angewendet werden können, sind sie zur pränatalen Diagnostik biochemisch varianter Phänotypen, die immerhin bei ca. 20 % der NP-C-Patienten vorkommen, nicht zu gebrauchen, da mit diesen Methoden variante Formen nicht von Kontrollzellen unterschieden werden können [168].

Angesichts der Nachteile dieser Untersuchungen (komplizierte Methodik, Durchführbarkeit in wenigen Speziallaboratorien, Resultat erst nach fünf bis sechs Wochen, falsch negative Be-



funde in 20 % der Fälle), konnte die Identifizierung der Gene NPC1 (1997) und NPC2 (2001) die pränatale Diagnostik wesentlich verbessern [101, 116]. Mit Hilfe der in Chorionzotten schnell durchführbaren molekulargenetischen Untersuchung lassen sich auch Feten mit einem biochemisch varianten Phänotyp diagnostizieren. Jedoch sind auch dieser Untersuchung aufgrund der Größe des NPC1-Gens und der über 130 bekannten krankheitsrelevanten Mutationen Grenzen gesetzt.

## 2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, Verfahren zu entwickeln, die eine sichere Diagnose der Niemann-Pick Erkrankung Typ A, B und C ermöglichen. Da die Typen A und B zusammen genauso häufig vorkommen wie der Typ C allein, wird bei Patienten mit Verdacht auf Niemann-Pick Erkrankung zunächst eine einfache und schnelle Bestimmung der sauren Sphingomyelinase-Aktivität in Gewebezellen durchgeführt. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der biochemischen Charakterisierung dieses Enzyms, die spektrophotometrisch mit einem künstlichen, und radioisotopisch mit dem natürlichen Substrat erfolgte. Die auf diese Weise bestimmten Aktivitäten in NPD-Patientenfibroblasten werden anschließend miteinander verglichen.

Bei eindeutig verminderter Enzymaktivität kann je nach Klinik sowohl Typ A als auch B vorliegen. Bei Vorliegen einer partiell verminderten bzw. normalen Aktivität kann mit einer von uns eingeführten Methode der Nachweis einer intrazellulären Cholesterintransportstörung, die der Typ-C-Erkrankung zugrunde liegt, erbracht werden. Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Filipin-Färbung, die bei Verdacht auf Typ C als Ausschlussmethode durchgeführt werden muss, daneben mit der spektrophotometrischen Aktivitätsbestimmung der sauren Sphingomyelinase nach exzessiver Cholesterinzufuhr in lebenden Fibroblasten. Ebenfalls wird die [<sup>3</sup>H]-Oleat-Inkorporation in lebenden Fibroblasten und die Lipase-Aktivitätsbestimmung dargestellt.

### **3. MATERIAL**

#### **3.1. Untersuchungsmaterial**

Die für diese Arbeit benötigten Blutproben zur Gewinnung von Leukozyten, Leberbiopsien, Hautbiopsien, zur Kultivierung von Fibroblasten und Chorionzottenproben stammen von Patienten der Dr. von Haunerschen Kinderklinik der Universität München, der Medizinischen Fakultät Çapa der Universität Istanbul/Türkei, der Kinderklinik der Universität Ulsan/Südkorea und der Kinderklinik der Universität Leiden/Niederlande.

#### **3.2. Geräte**

- Sonifier B 10 Cell disrupter, Branson, Sonic Power Company, Dunburry, Conneticut, USA
- Eppendorf Rotationsmischer VF 2 der Fa. Janke & Kunkel
- Eppendorfcentrifuge Mikro 22 der Fa. Hettich
- Radiometer Copenhagen PHM 82 Standard pH Meter
- Spectrophotometer Ultrospec Plus 4054 UV der Fa. LKB Biochrom, Präzisionsküvette
- Inkubator und Heizblock der Fa. Liebisch
- Liquid Scintillation Counter 1214 Rackbeta der Fa. LKB Wallac
- Eppendorfpipetten, Eppendorf-Tubes, Einmalreagenzgläser
- Rührspatel, Einweg-Pasteur-Pipetten
- Brutschrank Cellstar UniTec GmbH, Uniflow UV 1200
- Beckman Coulter GPR-Centrifuge
- Brutflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>) und Einmalscraper 3010 der Fa. Costar
- Chamber Slide der Fa. Merck Eurolab, Deckgläser
- Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzmikroskop der Fa. Nikon

#### **3.3. Chemikalien**

Fa. Sigma Chemie, München:

- Glycin (Aminoacetic acid), minimum 99 % (TLC)
- Sphingomyelin, from bovine brain, approx. 99 %
- Triton X-100

- Albumin, bovine, solution 30 %, essentially fatty acid free
- Minimal Essential Medium Eagle, Mc COY's 5A Medium Modified
- Serum, Fetal Calf, lipoprotein deficient
- Filipin III from Streptomyces filipinensis minimum 85 % (HPLC)
- 10 % Formalin (approx. 4 % formaldehyd), neutral buffered solution
- N-N-Dimethylformamide minimum 99 %
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
- Cholic-Acid, sodium salt, from ox or sheep bile
- Lipoprotein, Low Density from human plasma 5 mg
- Albumin, EDTA, Taurocholat, Mercaptoethanol
- Cholesteryloleat, Oleat

Fa. Merck, Darmstadt:

- Natriumacetat wasserfrei, pro analysi; Essigsäure (Eisessig) 100 %, pro analysi
- Ethanol absolut pro analysi
- Methanol, Li Chrosolv; Chloroform, Li Chrosolv; Benzol, Li Chrosolv
- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz
- Natriumkarbonat, Kupfersulfat
- Seignettesalz

Fa. Nensure TM, Boston:

- Sphingomyelin (Bovine, Choline-Methyl-<sup>14</sup>C), 1,9 GBq/mmol (52,00 mCi/mmol)
- Oleic acid [9,10-<sup>3</sup>H (N)]- 555,0 TBq/mmol (15,00 Ci/mmol)

Fa. Amersham Pharmacia Biotech UK Limited:

- Cholesteryl-[1-<sup>14</sup>C]oleate, 2,07 GBq/mmol (56,0 mCi/mmol)

Apotheke der LMU München:

- NaOH 1 mol/l, Versen Trypsin ohne Phenolrot

Fa. Calbiochem, Deutschland:

- 2N-Hexadecanoylamino-4-nitrophenyl-phosphorylcholin

Fa. Biochrom KG:

- Dulbecco's MEM, Fetal bovine serum

Fa. Zinser Analytik, Frankfurt:

- Szintillationsflüssigkeit Quicksafe A

Fa. Qbiogene, Deutschland:

- Dapi/Antifade (0,1 µg/ml)

Fa. Seromed, Deutschland:

- L-Glutamine (200 mM) 2,5 ml

Fa. Gibco, Deutschland:

- Antibiotic-Antimycotic

Fa. Baxter, Deutschland

- NaCl

## 4. METHODEN

### 4.1. Probenvorbereitung

#### 4.1.1. Leukozytenpräparation

Für die Präparation der Leukozyten aus venösem Blut werden mindestens 2 ml EDTA bzw. Heparin-Blut benötigt. Das Blut wird mit Leukozytenlösung im Verhältnis 5:1 gut gemischt, in ein neues Reagiergefäß blasenfrei abgefüllt und für eine halbe bis eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis sich die Erythrozyten vollständig abgesetzt haben. Anschließend wird der Überstand abgehoben und bei 2000 U/min 5 Minuten zentrifugiert. Das Überstandsplasma wird abgehoben und verworfen. Das Leukozytensediment wird dann zur Zerstörung verbliebener Erythrozyten mit ca. 250 µl eiskaltem Wasser 20–30 Sekunden lang geschüttelt und mit 0,9 % NaCl-Lösung aufgefüllt, gut gemischt und zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgekippt, in 1 ml 0,9 % NaCl gelöst und in Eppendorf-Tubes überführt. Nach der Zentrifugation wird das NaCl vollständig abgehoben. Die Leukozyten-Pellets können bis zum Testbeginn bei -20 °C gelagert werden.

Die Leukozytenlösung enthält in 100 ml folgende Bestandteile:

5 g Dextran

78 ml NaCl 0,9 %

1,3 ml Heparin (5000 U/ml)

20,7 ml H<sub>2</sub>O

#### 4.1.2. Kultivierung der Fibroblasten [82]

Für die Kultivierung der Fibroblasten werden Versen Trypsin ohne Phenolrot, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) und folgende Medien benötigt:

##### **Medium I:**

Dulbecco's MEM

+ 10 % Fetal bovine serum (FBS)

+ 400 mM Glutamin

+ Antibiotic-Antimycotic (1:100)

##### **Medium II:**

Dulbecco's MEM

+ 10 % FBS

+ 400 mM Glutamin

#### 4.1.2.1. Anlegen einer Primärkultur

Eine aseptisch entnommene und in Medium gebrachte Hautbiopsie sollte sofort verarbeitet werden, eine kurzfristige Lagerung im Kühlschrank bis zu 24 Stunden ist möglich.

Als Erstes werden vier Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) mit 5 ml Medium I ausgespült. Danach wird in einer sterilen Petrischale, die so viel Medium I (ca. 10 ml) enthält, dass der Boden bedeckt ist, das Hautstück mittels zweier Skalpelle in möglichst kleine Stückchen (1–2 mm<sup>2</sup>) geschnitten und durch Abkratzen von Fett und Blutresten befreit. Es werden mindestens drei Hautstückchen in jede Kulturflasche überführt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der Boden nur etwas mit Medium I bedeckt wird, da sonst ein Anwachsen des Hautstücks erschwert wird. In der Regel stellt man nach vier Tagen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C ein Anwachsen der Stücke fest. Nun werden 2 ml Medium I in jede Brutflasche pipettiert und vorsichtig geschwenkt. Ein Mediumwechsel erfolgt dann alle drei bis vier Tage, so lange, bis sich um jedes Hautstück ein Hof mit einem Durchmesser von mindestens 2 cm bildet. Erst jetzt können die Zellen subkultiviert werden.

#### 4.1.2.2. Subkultivierung

Die Fibroblasten wachsen nicht mehr weiter, wenn die Brutflasche vollständig eingenommen worden ist. Um eine starke Abnahme der Proliferationsrate bzw. ein Absterben der Kultur zu verhindern, müssen die Fibroblasten nach erreichter Maximaldichte „passagiert“ werden, d. h. sie werden unter Verdünnung von der alten Brutflasche in eine neue überführt.

Das alte Medium wird aus der Brutflasche abgesaugt. Die Zellen werden mit 5 ml PBS gewaschen, nach Zugabe von 5 ml Trypsin für ca. 3 Minuten in den Brutschrank gestellt, bis sich die Fibroblasten von der Unterlage abgelöst haben und abgerundet in der Trypsinierungslösung schwimmen. Dieser Vorgang wird mit 5 ml Nährmedium II gestoppt. Die Zellsuspension wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert, mit 5 ml Medium II resuspendiert, in zwei 75 cm<sup>2</sup> Brutflaschen aufgeteilt und mit 10 ml Medium II aufgefüllt. Um einen ungehinderten Gasaustausch bei CO<sub>2</sub>-Begasung der Zellen zu gewährleisten, werden die Brutflaschen 30 Minuten lang im Brutschrank mit leicht geöffneten Schraubverschlüssen inkubiert. Danach werden die Deckel ganz verschlossen.

In den darauf folgenden 24 Stunden sollten die Zellen weder aus dem Brutschrank genommen noch an ihnen manipuliert werden, da sonst der initiale Anhaftungsprozess gestört wird. Auch ein Mediumwechsel sollte in den nächsten 48 Stunden unterbleiben.

#### 4.1.2.3. Gewinnung der Fibroblasten-Pellets

Für die Durchführung der Enzymtests müssen Fibroblasten-Pellets mechanisch gewonnen werden. Dazu wird das Medium aus der Brutflasche abgegossen und zwei- bis dreimal mit 0,9%igem NaCl gewaschen. Nach Zugabe von 5 ml NaCl werden die Zellen mit einem Gummischaber von oben nach unten vorsichtig abgeschabt („gescrapt“) und in zwei Reagiergefäße verteilt. Dieser Vorgang wird noch zwei- bis dreimal wiederholt. Die gewonnene Zellsuspension wird fünf Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert, der NaCl-Überstand zügig abgegossen, das Pellet in 1 ml NaCl aufgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach einer erneuten Zentrifugation wird der Überstand vollständig abpipettiert und das Pellet bis zum Testbeginn bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.2. Proteinbestimmung nach Lowry [92]

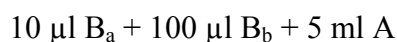
Für die Proteinbestimmung werden folgende Lösungen benötigt:

**A** : 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in n/10 NaOH

**B<sub>a</sub>**: 5,5 g CuSO<sub>4</sub>/100 ml

**B<sub>b</sub>**: 1,35 g Seignettesalz/100 ml NaK-Tartrat

Das Reaktionsgemisch **C** wird immer frisch hergestellt aus:



Als Standard dient Rinderalbuminlösung in den Konzentrationen 0,03 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml und 0,5 mg/ml.

20 µl Standard bzw. verdünnte Probe wird mit 250 µl Reaktionsgemisch C versetzt. Nach fünf- bis zehnminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur, fügt man 25 µl Folin-Ciocalteus-Phenol-Lösung (1:1 verdünnt mit 2%iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) hinzu und inkubiert diesen Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Danach wird die Extinktion der Standards

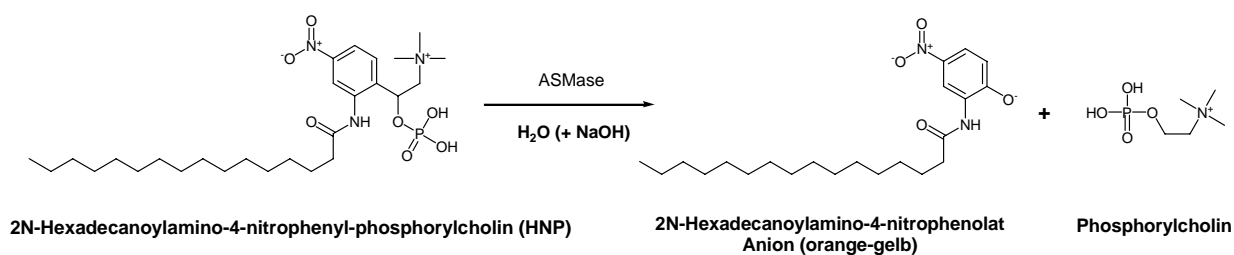


und der Proben bei 734 nm Wellenlänge photometrisch gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wird an der Eichkurve abgelesen.

### 4.3. Nachweis einer verminderten ASMase-Aktivität

#### 4.3.1. Spektrophotometrische Messung der ASMase-Aktivität

Die spektrophotometrische Bestimmung der ASMase-Aktivität wurde nach einer von Gal et al. [38] beschriebenen Methode, die durch uns modifiziert wurde, mit dem farbstoffbildenden, künstlichen Substrat 2N-Hexadecanoylamino-4-nitrophenyl-phosphorylcholin (HNP) durchgeführt. Die ASMase katalysiert den Abbau des HNP in ein gelbes Anion und Phosphorylcholin (Abb. 8).



**Abb. 8:** Hydrolytischer Abbau des HNP durch die Sphingomyelinase

##### 4.3.1.1. Testansatz

Das Reaktionsgemisch wird durch Zugabe von 30 mM 2N-Hexadecanoylamino-4-nitrophenyl-phosphorylcholin (HNP) in 0,2 M Natrium-Azetat-Puffer, pH 5,6 hergestellt. Um ein vollständiges Auflösen des HNP im Puffer zu erreichen, wird das Gemisch bis zu einer Stunde bei 37 °C inkubiert und zwischendurch sehr gut geschüttelt.

Die Gewebeproben werden zuerst in 0,5 % Natrium-Cholat sonifiziert. Als Leerwerte werden 25 µl Probenlösung vor Inkubation ohne Substratgemisch drei Minuten bei 95 °C denaturiert. 25 µl Probe und Leerwert werden mit je 25µl Reaktionsgemisch versetzt und eine Stunde (bzw. zwei Stunden für Leukozyten, siehe 6.1.1.) bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird nach Ablauf der Inkubationszeit durch Erhitzen (5 min, 95 °C) gestoppt, 150 µl Ethanol und 100 µl

Glycin-OH-Puffer, pH 11, hinzugefügt, gut vermischt und fünf Minuten zentrifugiert. Die Extinktion wird bei 410 nm photometrisch bestimmt.

#### 4.3.1.2. Berechnung der Enzymaktivität

$$\frac{\Delta E}{41,67} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{[\text{Protein}]} \times \frac{V_{(\text{Gesamt})}}{V_{(\text{Probe})}} \times 1000$$

$$\frac{\Delta E}{41,67} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{[\text{Protein}]} \times \frac{300 \mu\text{l}}{25 \mu\text{l}} \times 1000$$

Die saure Sphingomyelinase-Aktivität wird in nmol Substratumsatz/h/mg Protein angegeben.

#### 4.3.2. Radioisotopische Messung der ASMase-Aktivität

Diese Untersuchung wurde nach einer von Wenger und Folch et al. [177, 36] beschriebenen, von uns modifizierten Methode mit dem authentischen [<sup>14</sup>C]-markierten Substrat Sphingomyelin durchgeführt.

##### 4.3.2.1. Testansatz

Herstellung des Reaktionsgemisches:

[<sup>14</sup>C]-Sphingomyelin (10 µCi) und 2 µmol kaltes Sphingomyelin werden nach Zugabe von 0,4 ml Triton X-100 kräftig geschüttelt, das Lösungsmittel vorsichtig mit Stickstoff abgedampft und in 2 ml 0,5 M Natrium-Azetat-Puffer, pH 5,0, aufgelöst.

25 µl in 0,5%igem Na-Cholat sonifizierte Probe und Leerwert (0,5%iges Na-Cholat statt Probe) werden mit je 25 µl Reaktionsgemisch versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl kaltem Wasser gestoppt und auf Eis belassen. Eine Zwei-Phasen-Trennung kann durch Zugabe von 0,6 ml Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1), gründlichem Schütteln und fünfminütiger Zentrifugation bei 2000 U/min herbeigeführt werden. 150 µl des Überstandes werden in Vials mit jeweils 5 ml Wasser und Quickszint versetzt, gut vermischt und im Szintillationszähler gemessen.

#### 4.3.2.2. Berechnung der Enzymaktivität

$$\frac{\text{cpm(P)} - \text{cpm(LW)}}{100 \% \text{ cpm}} \times \text{mM Sphingomyelin} \times \frac{V_{(\text{Puffer})}}{V_{(\text{Reakt.})}} \times \frac{V_{(\text{ges.})}}{V_{(\text{gez.})}} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{[\text{Protein}]} \times 1000$$

$$\frac{\text{cpm(P)} - \text{cpm(LW)}}{100 \% \text{ cpm}} \times 1\text{mM} \times \frac{2 \text{ ml}}{2,4 \text{ ml}} \times \frac{225 \mu\text{l}}{150 \mu\text{l}} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{[\text{Protein}]} \times 1000$$

Die saure Sphingomyelinase-Aktivität wird in nmol Substratumsatz/h/mg Protein angegeben.

#### 4.4. Nachweis einer intrazellulären Cholesterintransportstörung

Eine Akkumulation des nicht veresterten Cholesterins in NPC-Zellen konnte in den folgenden Versuchen 4.4.1.–4.4.3. durch Kultivierung der Fibroblasten in bestimmten Medien in vitro simuliert werden.

Ein schnelles Wachstum der Fibroblasten wird durch viertägiges Bebrüten in Minimal Essential Medium Eagle, das 10 % fetales Kälberserum (FBS) enthält, erreicht. Danach wird dieses Medium durch das lipoprotein-deficient Serum (10 %) enthaltende McCoy's 5A Medium Modified ersetzt, um ihnen das exogene Cholesterin zu entziehen. Die Fibroblasten wachsen zwar in lipoprotein-deficient Serum nicht, können sich aber bis zu 48 Stunden teilen. Währenddessen kann eine maximale Induktion der LDL-Rezeptoraktivität beobachtet werden. Nach Zugabe von LDL bzw. FBS wird die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und die LDL-Rezeptorsynthese supprimiert und die Cholesterin-Synthese mittels ACAT stimuliert [45].

##### 4.4.1. Filipin-Färbung

Die Filipin-Färbung [72] ist inzwischen eine Screening-Methode, die bei Verdacht auf eine Niemann-Pick Typ-C-Erkrankung obligatorisch durchgeführt werden sollte. Das hierfür verwendete, von *Streptomyces filipinensis* syntheseierte, polyene Makrolid-Antibiotikum Filipin III bindet spezifisch 3 $\beta$ -Hydroxysterole [110, 140] und ermöglicht durch die Fluoreszenz des entstehenden Filipin-III-Cholesterinkomplexes den Nachweis lysosomal gespeicherten nicht veresterten Cholesterins.

Vor der Färbung müssen für diesen Nachweis frische Fibroblasten sieben Tage lang in folgenden Medien gezüchtet werden.

**Medium A:** Minimal Essential Medium Eagle  
+ 10 % Fetal Bovine Serum (FBS)  
+ 2 mM Glutamin

**Medium B:** Mc COY'S 5A Medium Modified  
+ 10 % Lipoprotein-deficient Serum (LPDS)  
+ 2 mM Glutamin

**Medium C:** Mc COY'S 5A Medium Modified  
+ 10 % LPDS  
+ 10 mg LDL  
+ 2 mM Glutamin

Jeder Färbevorgang wird neben den zu untersuchenden Patientenzellen mit einer Positiv- und Negativkontrolle durchgeführt. Die zu untersuchenden Fibroblastenzellreihen werden in zweikammerigen Chamber-Slides in Medium A für vier Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet. Danach wechselt man Medium A gegen B aus und lässt die Fibroblasten für weitere zwei Tage im Brutschrank wachsen. Am sechsten Tag wird das Medium B abgesaugt. Es folgt eine 24-stündige Inkubation in Medium C.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Chamber-Slides dreimal mit 4 ml PBS gewaschen, in 4 ml 10%igem Phosphat-gepufferten (pH 7,4) Formalin bei Raumtemperatur eine Stunde lang fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Filipin-Lösung pro Kammer eine Stunde gefärbt. Anschließend werden die Zellen ein letztes Mal mit 4 ml PBS dreimal gewaschen. Im noch nassem Zustand werden in jede Kammer 3–4 µl DAPI pipettiert. Beim Auflegen des Deckglases ist auf eine gute Verteilung des Eindeckmediums zu achten. Die gefärbten Fibroblasten werden unter einem Immunfluoreszenzmikroskop (Filter 510 nm) beurteilt.

#### Herstellung der Filipin-Lösung:

In 1 ml N-N-Dimethylformamid werden 1,5 mg Filipin-III aufgelöst. Dieses Gemisch wird in 50 ml PBS überführt und gut geschüttelt.

#### 4.4.2. Spektrophotometrische Bestimmung der ASMase-Aktivität nach Inkubation mit/ohne FBS in lebenden Fibroblasten [166, 156]

##### 4.4.2.1. Subkultivierung der Fibroblasten

Erforderliche Medien:

<b>Medium A:</b>	Minimal Essential Medium Eagle	
	+ 10 % FBS	
	+ 2 mM Glutamin	
<b>Medium B:</b>	Mc COY'S 5A Medium Modified	} - FBS
	+ 10 % LPDS	
	+ 2 mM Glutamin	
<b>Medium C:</b>	Mc COY'S 5A Medium Modified	} + FBS
	+ 10 % LPDS	
	+ 20 % FBS	
	+ 2 mM Glutamin	

Fibroblasten eines Patienten und einer Kontrollperson werden wie unter 4.1.2.2. beschrieben in je zwei 75 cm<sup>2</sup> große Brutflaschen überführt und nach Zugabe von je 12,5 ml Medium A bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> vier Tage lang im Brutschrank bebrütet. Am vierten Tag wird das alte Medium abgesaugt, die Zellen werden mit 5 ml PBS gewaschen und 8 ml Medium B hinzugefügt. Nach zweitägiger Inkubation werden die Medien aus beiden Brutflaschen abpipettiert. In die erste Brutflasche werden erneut 8 ml Medium B (- **FBS**), in die zweite dagegen 8 ml Medium C (+ **FBS**) gegeben und 24 Stunden lang inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation werden die Fibroblasten, wie unter 4.1.2.3. beschrieben, gescrapt und sofort weiterverarbeitet.

##### 4.4.2.2. Testansatz

Die Aktivität der sauren Sphingomyelinase wird nach der unter 4.3.1.1. beschriebenen Methode in Fibroblasten photometrisch gemessen.

#### 4.4.2.3. Berechnung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität wird mit derselben Formel wie unter 4.3.1.2. berechnet. Die Einheit wird auch hier in nmol/h/mg Protein angegeben.

#### 4.4.3. [<sup>3</sup>H]-Oleat-Inkorporation in lebenden Fibroblasten

Fibroblasten, die in lipoprotein-deficient Serum bebrütet werden, können gerade noch ausreichend Cholesterin für ihr Wachstum synthetisieren. Wenn diese Zellen mit [<sup>3</sup>H]-Oleat inkubiert werden, wird nur ein geringer Anteil des [<sup>3</sup>H]-Oleat in Cholesteryl-[<sup>3</sup>H]oleat inkorporiert. Falls nun exogen zugeführtes LDL-Cholesterin endozytotisch in die Zelle aufgenommen wird, aktiviert das freigesetzte Cholesterin die ACAT. Bei zusätzlicher Inkubation mit [<sup>3</sup>H]-Oleat ist eine deutliche Inkorporationszunahme des [<sup>3</sup>H]-Oleats in Cholesterin-[<sup>3</sup>H]-Oleat festzustellen [45].

##### 4.4.3.1. Subkultivierung der Fibroblasten

Für diesen 24-stündigen Inkorporationsversuch werden dieselben Nährmedien A–C, wie unter 4.4.2.1. beschrieben, verwendet. Das Inkorporationsgemisch wird folgendermaßen hergestellt [145]:

- I: 10 ml Rinderalbumin (14 %) + 6 mM Oleat
- II: 500 µl Oleat-Albumin-Gemisch (I) + 4 µl [<sup>3</sup>H]-Oleat

Die Fibroblasten werden bis zum sechsten Tag, wie unter 4.4.2.1. beschrieben, vorbereitet. Nach Entfernen des Mediums B und anschließendem Waschen mit 5 ml PBS, gibt man in die erste Brutflasche eines Patienten und einer Kontrolle je 8 ml Medium B und je 100 µl Inkorporationsgemisch (II). Die zweite Brutflasche dagegen erhält 8 ml Medium C und 100 µl Inkorporationsgemisch (II). Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) werden die Zellen gescrept (siehe 4.1.2.3.) und Pellets hergestellt.

#### 4.4.3.2. Testansatz

Fibroblasten-Pellets werden in 230  $\mu\text{l}$  aqua dest. sonifiziert, jeweils 100  $\mu\text{l}$  werden im Eisbad in zwei Eppendorfgefäße pipettiert und der verdünnte Rest für die Proteinbestimmung aufgehoben. Danach werden die Proben mit jeweils 1 ml Benzol/Chloroform/Methanolgemisch (1,0:0,5:1,2) und 150  $\mu\text{l}$  0,3 M NaOH versetzt und gut geschüttelt. Eine anschließende fünfminütige Zentrifugation bei 2000–3000 U/min führt zu einer deutlichen Zwei-Phasen-Trennung.

Nun werden jeweils 500  $\mu\text{l}$  des Überstandes in mit 5 ml gefüllte Vials übertragen, mit 5 ml Szintillationslösung versetzt und nach kräftigem Schütteln im Counter gezählt.

#### 4.4.3.3. Berechnung des [ $^3\text{H}$ ]-Oleat-Wertes

$$\frac{\text{cpm}}{100\% \text{ cpm}} \times \text{mM Oleat} \times \frac{V_{\text{ges.}}}{V_{\text{gez.}}} \times \frac{V_{\text{Prob.}}}{V_{\text{gez.Son.}}} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{[\text{Protein}]} \times 1000$$

$$\frac{\text{cpm}}{100\% \text{ cpm}} \times 6\text{mM} \times \frac{750\mu\text{l}}{500\mu\text{l}} \times \frac{230\mu\text{l}}{100\mu\text{l}} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{[\text{Protein}]} \times 1000$$

Der [ $^3\text{H}$ ]-Oleat-Wert wird in pmol/h/mg Protein angegeben.

#### 4.4.4. Radioisotopische Messung der zytoplasmatischen CEHase-Aktivität

Die radioisotopische Bestimmung der zytoplasmatischen CEHase (Cholesterinesterhydrolyase)-Aktivität wurde nach einer von Beaudet et al. [5] und Hoeg et al. [58] beschriebenen, von uns modifizierten Methode mit dem [ $^{14}\text{C}$ ]-markierten Substrat Cholesterinoleat durchgeführt. Die zytoplasmatische CEHase-Aktivität katalysiert den Abbau des Cholesterinoleats in Cholesterin und Oleat.

#### 4.4.4.1. Testansatz

Leukozyten- und Fibroblastenpellets mit einem Proteingehalt von je 2–3 mg/ml werden für diese Untersuchung in aqua dest. sonifiziert.

Herstellung der benötigten Gemische:

- I Puffergemisch: Dieses besteht zu gleichen Teilen aus 0,5 % Triton X-100, 1,25 % Taurocholat, 0,3 M Na-citrat-phosphat-Puffer pH 8,2, 15 mg/ml Albumin, 50 mM Mercaptoethanol, 10 mM EDTA und 250 mM NaCl.
- II Cholesteryl-Puffergemisch: Es wird durch Mischen von 1 ml Puffergemisch (I) mit 3,6 mM Cholesteryloleat hergestellt und so lange sonifiziert, bis eine homogene Lösung mit einem pH von 7,6–7,8 entsteht.
- III Substratgemisch: Dieses wird durch Sonifikation aus 25 µl Cholesteryl-Puffer-Gemisch (II), 975 µl reines Puffergemisch (I) und 20 µl Cholesteryl-[<sup>14</sup>C]-oleat gewonnen.

30 µl Gewebshomogenat und der durch Hitzedenaturierung (5 min, 95 °C) gewonnener Leerwert werden mit 75 µl des Substratgemisches versetzt, unter Eiskühlung sonifiziert und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Benzol/Chloroform/Methanolgemisch (1,0:0,5:1,2), das 0,1 mM Oleat enthält, gestoppt. Jedem Eppendorfgefäß werden danach 150 µl 0,3 M NaOH zugefügt, so dass es zu einer Verseifung kommt.

Intensives Schütteln und eine 5-minütige Zentrifugation führen zu einer Zwei-Phasen-Trennung. Es werden jeweils 600 µl des Überstandes in mit 5 ml Wasser gefüllte Vials pipetiert und mit 5 ml Quickszint-Szintillationslösung versetzt. Nach kräftigem Schütteln werden die Vials mit dem Eluat im Counter gezählt.

#### 4.4.4.2. Berechnung der Enzymaktivität

$$\frac{\text{cpm(P)} - \text{cpm(LW)}}{100 \% \text{ cpm}} \times \text{mM Cholesterinoleat} \times \frac{V_{(\text{ges.})}}{V_{(\text{gez.})}} \times \frac{V_{(\text{Substratgem.})}}{V_{(\text{Probe})}} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{[\text{Protein}]} \times 1000$$

$$\frac{\text{cpm(P)} - \text{cpm(LW)}}{100 \% \text{ cpm}} \times 3,6\text{mM} \times \frac{825\mu\text{l}}{600\mu\text{l}} \times \frac{75\mu\text{l}}{30\mu\text{l}} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{[\text{Protein}]} \times 1000$$

Die Lipase-Aktivität wird in nmol/h/mg Protein angegeben.



## **5. PATIENTEN**

### **5.1. Niemann-Pick Typ A**

#### Patient 1:

Bei dem Jungen gesunder nicht konsanguiner, deutschstämmiger Eltern, die aus Russland übergesiedelt sind, wurde im Alter von drei Monaten eine Hepatosplenomegalie festgestellt. Bei der durchgeführten Leberbiopsie konnten histologisch schaumzellig vergrößerte Kupferzellen und elektronenmikroskopisch eine Myelinablagerung in den Hepatozyten nachgewiesen werden. Im Alter von neun Monaten zeigte das Kind eine ausgeprägte Gedeihstörung und psychomotorische Retardierung; bei der augenärztlichen Untersuchung wurde ein kirschroter Makula-Fleck gesehen.

#### Patient 2:

Diese türkische Patientin zeigte im Alter von vier Monaten eine Hepatosplenomegalie, sechs Monate später eine Gedeihstörung, deutliche muskuläre Hypotonie, motorische Entwicklungsverzögerung und einen kirschroten Makula-Fleck. Die Gedeihstörung machte eine PEG-Anlage (perkutane endoskopische Gastrostomie) notwendig.

### **5.2. Niemann-Pick Typ B**

#### Patient 3:

Dieser Patient koreanischer Abstammung wurde im Alter von drei Jahren durch chronischen Husten und Atemnot symptomatisch. Bei der körperlichen Untersuchung konnten weder eine Hepatosplenomegalie noch eine neurologische Beteiligung festgestellt werden. Eine durchgeführte Röntgen-Untersuchung des Thorax zeigte eine retikuläre pulmonale Zeichnungsvermehrung. In einer daraufhin entnommenen Lungenbiopsie konnte eine starke schaumzellige Makrophageninfiltration in den Alveolarraum und das Bindegewebe nachgewiesen werden.

#### Patient 4:

Das zweite Kind konsanguiner türkischer Eltern zeigte, außer einer im Alter von sechs Monaten diagnostizierten Hepatosplenomegalie, keine weiteren Auffälligkeiten, bis es im Alter von 14 Jahren akut an Dyspnoe und Brustschmerzen erkrankte. Im Röntgenbild des Thorax konnte

eine retikuläre pulmonale Zeichnungsvermehrung gesehen werden. Eine neurologische Beteiligung wurde ausgeschlossen. Die Knochenmarkbiopsie zeigte schaumzellige Makrophagen.

Patient 5:

Im Alter von zwei Jahren fiel bei dieser kroatischen Patientin eine Splenomegalie erstmals auf. Ein Jahr später wurde bei der körperlichen Untersuchung auch eine Vergrößerung der Leber festgestellt. Im Röntgen- und CT-Bild der Lunge zeigte sich ein basal betontes fein retikulo-noduläres Muster im Bereich der gesamten Lunge. Die Knochenmarksdifferenzierung lieferte das Bild schaumzelliger Histiocyten. Die Patientin war neurologisch unauffällig.

**5.3. Niemann-Pick Typ C**

Patient 6:

Diese koreanische Patientin wurde im dritten Lebensmonat durch eine Hepatosplenomegalie symptomatisch. Im Alter von zwei Jahren kamen eine motorische Entwicklungsverzögerung und eine muskuläre Hypotonie hinzu. Im Magnetresonanztomogramm des Gehirns sah man eine leichte diffuse Atrophie des Corpus callosum und eine Vergrößerung des Subarachnoidalraumes und Ventrikelsystems. In der Knochenmarkbiopsie zeigten sich schaumzellige Histiocyten.

Patient 7:

Dieser Junge aus den Vereinigten Arabischen Emiraten wurde im Alter von sechs Monaten durch eine Hepatosplenomegalie und epileptische Anfälle auffällig. Im MRT konnte eine Hirnatrophie gesehen werden.

Patient 8:

Dieses holländische Mädchen litt nach der Geburt an einem protrahierten Neonatalikterus. Es entwickelte im Alter von fünf Monaten eine Hepatosplenomegalie. Bis zum sechsten Lebensjahr waren die neurologische und ophthalmologische Untersuchung unauffällig. Eine Lungenbeteiligung lag zu keiner Zeit vor.

Patient 9:

Bei diesem türkischen Patienten wurde im Alter von sechs Monaten eine Bauchumfangszunahme aufgrund einer Hepatosplenomegalie sichtbar. Im Alter von acht Monaten zeigte das Kind zusätzlich eine chronische Lungenerkrankung mit Atemnot, psychomotorische Retardierung und eine ausgeprägte Gedeihstörung. Auch bei diesem Patienten fand man in der Knochenmarkbiopsie die typischen schaumzelligen Makrophagen.

Patient 10:

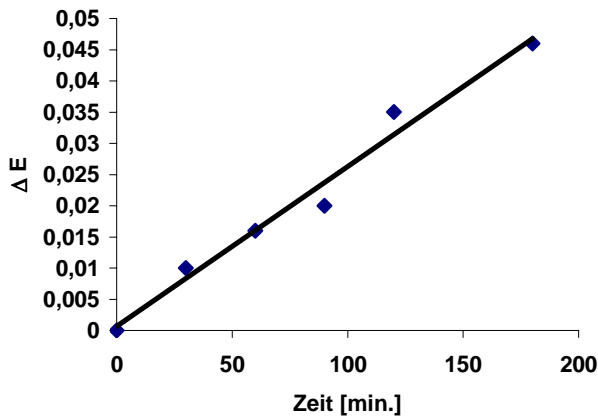
Wie bei allen Typ-C-Patienten konnte auch bei diesem türkischen Mädchen im Alter von sechs Monaten eine Hepatosplenomegalie palpatorisch diagnostiziert werden. Sie war im Alter von zwei Jahren stark untergewichtig, zeigte eine psychomotorische Retardierung und eine spastische Bewegungsstörung aller vier Extremitäten.

## 6. ERGEBNISSE

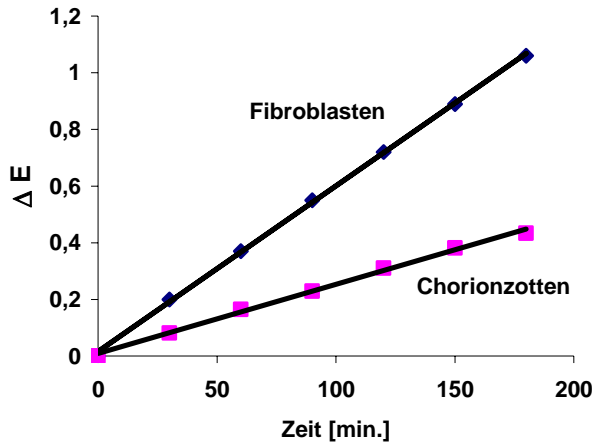
### 6.1. Spektrophotometrische Bestimmung der ASMase-Aktivität

#### 6.1.1. Inkubationszeitabhängigkeit

Die folgende Untersuchung zeigt die Abhängigkeit der ASMase-Aktivität von der Inkubationszeit in Leukozyten, Fibroblasten und Chorionzotten. Hierzu wurden Homogenate der jeweiligen Zellreihen hergestellt und unterschiedlich lang (30, 60, 90, 120, 150, 180 min) inkubiert. In den Abbildungen 9 a und b ist ein stetiger, linearer Anstieg der Absorptionsänderung bei Zunahme der Inkubationsdauer ersichtlich. Für die Routine-Untersuchung wurde eine Inkubationszeit von einer Stunde für Fibroblasten und Chorionzotten und von zwei Stunden für Leukozyten festgelegt.



**Abb. 9 a:** Inkubationszeitabhängigkeit der ASMase-Aktivität in Leukozyten

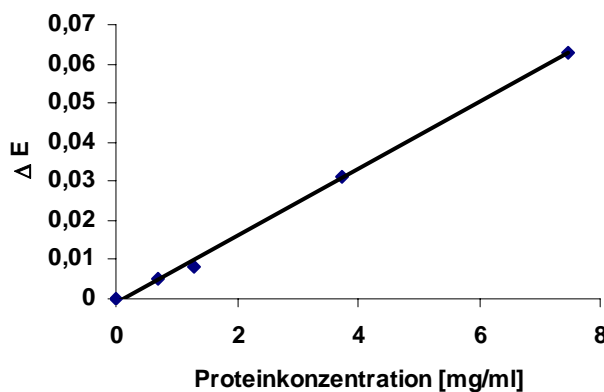


**Abb. 9 b:** Inkubationszeitabhängigkeit der ASMase-Aktivität in Fibroblasten und Chorionzotten

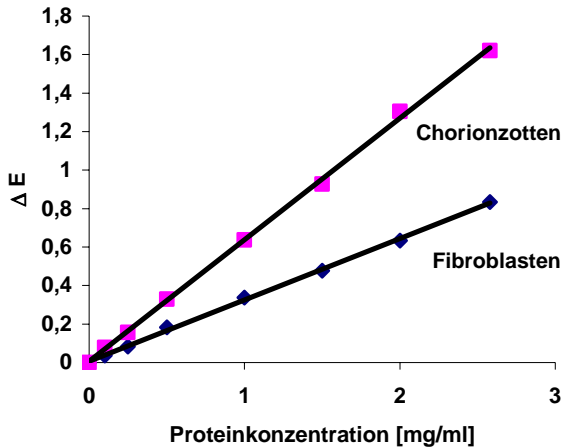
### 6.1.2. Proteinabhängigkeit

Bei dieser Untersuchung wurden aus Leukozyten-, Fibroblasten-, und Chorionzottenhomogenat durch Verdünnen mit 0,5%igem Natrium-Cholat verschiedene Lösungen mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen hergestellt und anschließend die ASMase-Aktivität bestimmt.

In den Messungen zeigte sich in allen Zellreihen ein zur Proteinkonzentration direkt proportionales Verhalten der Extinktion. Dies ist in den Abbildungen 10 a und b grafisch dargestellt. Es wurde für alle Versuche ein Proteingehalt von 2,5–3,5 mg/dl für Leukozyten und 1,5–2,5 mg/dl für Fibroblasten und Chorionzotten gewählt.



**Abb. 10 a:** Proteinabhängigkeit der ASMase-Aktivität in Leukozyten

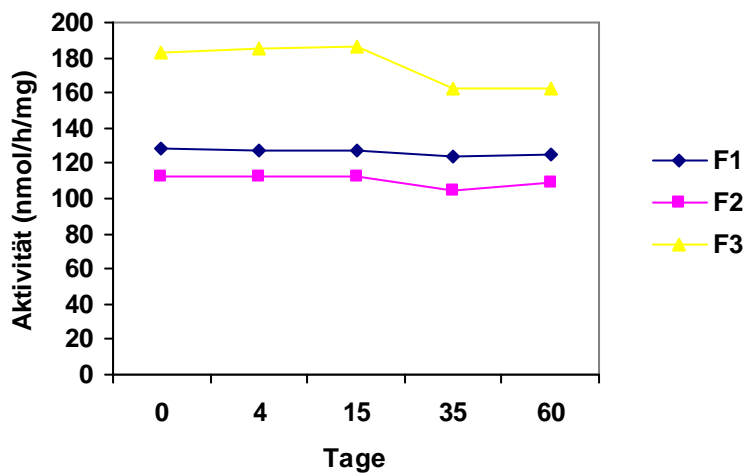


**Abb. 10 b:** Proteinabhängigkeit der ASMase-Aktivität in Fibroblasten und Chorionzotten

### 6.1.3. Stabilitätsmessungen

Für diese Untersuchung wurden ASMase-Aktivitäten in drei verschiedenen Fibroblastenproben (F1–3) unmittelbar nach Gewinnung eines Pellets, bzw. 4, 15, 35 und 60 Tage danach, bestimmt. Zwischenzeitlich wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

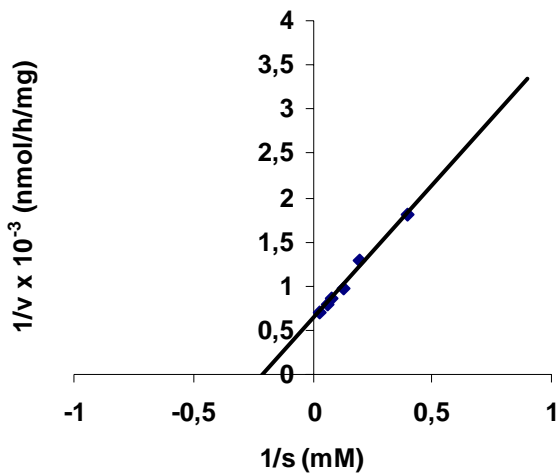
Die Enzymaktivität sinkt mit der Häufigkeit des Einfrierens und Wiederauftauens nur geringfügig in F1 bzw. bleibt in F2 und F3 fast stabil. Das Enzym zeigt hiermit eine große Stabilität. Trotzdem wurden bei der Durchführung der Untersuchungen möglichst frische Fibroblasten verwendet.



**Abb. 11:** Stabilitätsmessungen in Fibroblasten

### 6.1.4. Enzymkinetik

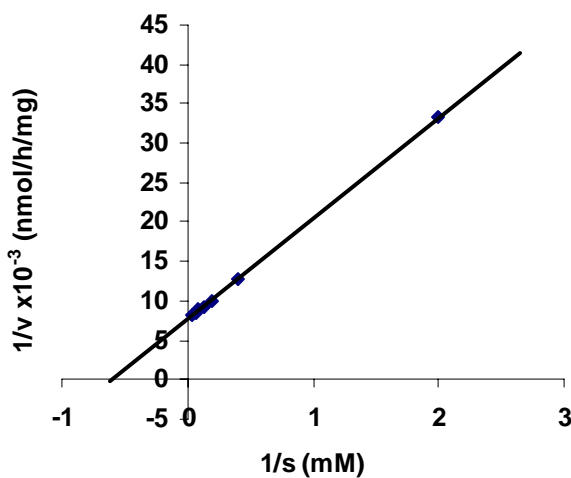
Für die Untersuchung der kinetischen Eigenschaft der sauren Sphingomyelinase wurde die Reaktion mit jeweils unterschiedlicher Substratkonzentration (2,5/5/7,5/12,5/15/30 mM) in Leukozyten, Fibroblasten und Chorionzotten gestartet. Die Aktivität wurde nach einer Inkubationsdauer von einer bzw. zwei Stunden gemessen und wie in den Abbildungen 12 a–c zu sehen, doppeltreziprok nach Lineweaver-Burk linear dargestellt. Daraus ergeben sich Michaelis-Menten Konstanten ( $K_M$ -Werte) für Leukozyten von 3,3 und 4,8 mM, für Fibroblasten von 1,25–2,9 mM und für Chorionzotten von 1,1 und 1,2 mM (Tab. 2 a–c).



Leukozyten	$K_M$ (mM)
L1	3,3
L2*	4,8

**Tab. 2 a:**  $K_M$ -Werte in Leukozyten;  
L: Leukozyten  
\*: Abb. 12 a

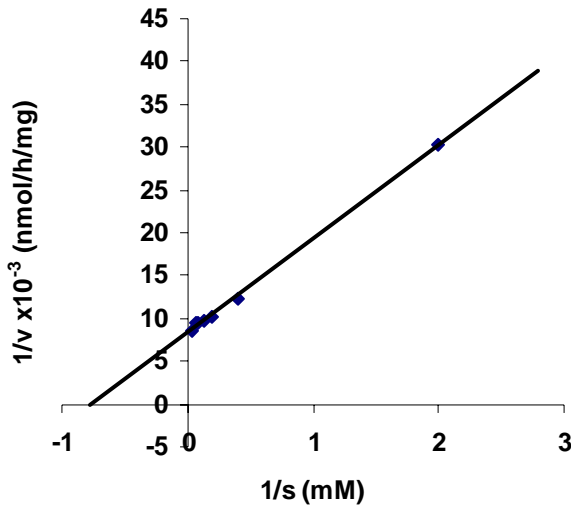
**Abb. 12 a:** Enzymkinetik in Leukozyten



Fibroblasten	$K_M$ (mM)
F1	2,9
F2	1,25
F3*	2,0

**Tab. 2 b:**  $K_M$ -Werte in Fibroblasten;  
F: Fibroblasten  
\*: Abb. 12 b

**Abb. 12 b:** Enzymkinetik in Fibroblasten



Chorionzotten	$K_M$ (mM)
C1*	1,2
C2	1,1

**Tab. 2 c:**  $K_M$ -Werte in Chorionzotten;  
**C:** Chorionzotten  
**\*: Abb. 12 c**

**Abb.: 12c:** Enzymkinetik in Chorionzotten

### 6.1.5. ASMase-Aktivitätsbereich

Die ASMase-Aktivität wurde in Leukozyten, kultivierten Fibroblasten, Chorionzotten, Amnionzellen und Lebergewebe gemessen (Tab. 3). Die mittlere Aktivität der ASMase in 37 Fibroblastenkulturen beträgt 84,60 nmol/h/mg bei einer Standardabweichung von 32,03. Die ASMase-Aktivität, die in jeweils zwei Amnionzellen- bzw. Chorionzottenkulturen bestimmt wurde, beträgt im Mittel 38,30 bzw. 78,76 nmol/h/mg. Die in vier Leberbiopsien bestimmte Aktivität lag zwischen 11,92–26,52 nmol/h/mg mit einer durchschnittlichen Aktivität von 16,26 nmol/h/mg. Von allen Zellarten war die mittlere Aktivität in Leukozyten mit 1,80 nmol/h/mg am niedrigsten. Die Standardabweichung lag bei 0,94.

In der Tabelle 4 sind die in Niemann-Pick Typ-A–C-Fibroblasten gemessenen Aktivitäten zusammengefasst. In Typ-A-Fibroblasten beträgt die Restaktivität weniger als 5 %. Bei den Typ-B-Patientenzellen 3 und 4 liegt die Restaktivität zwischen 3 und 14 %. Auffällig ist die Aktivität des Typ-B-Patienten, die mit 43,65 nmol/h/mg im Normbereich liegt. Die Aktivität des Patienten 7 mit Typ C-Erkrankung liegt ebenso im Normbereich. In den übrigen NPC-Fibroblasten wurde eine partiell erniedrigte Aktivität von 17,87–26,07 nmol/h/mg gemessen.



Zellart	ASMase-Aktivität (nmol/h/mg)
<b>Fibroblasten</b> ( <i>kultiviert</i> )	
<b>Kontrollen</b> ( <i>n = 37</i> )	39,75–188,80
<b>Mittelwert:</b>	84,60
<b>Standardabweichung:</b>	32,03
<b>Amnionzellen</b> ( <i>kultiviert</i> )	
<b>Kontrollen</b> ( <i>n = 2</i> )	29,02/47,57
<b>Mittelwert:</b>	38,30
<b>Chorionzotten</b> ( <i>kultiviert</i> )	
<b>Kontrollen</b> ( <i>n = 2</i> )	70,70/86,82
<b>Mittelwert:</b>	78,76
<b>Leukozyten</b>	
<b>Kontrollen</b> ( <i>n = 43</i> )	0,57–4,99
<b>Mittelwert:</b>	1,80
<b>Standardabweichung:</b>	0,94
<b>Leber</b> ( <i>Biopsie</i> )	
<b>Kontrollen</b> ( <i>n = 4</i> )	11,92–26,52
<b>Mittelwert:</b>	16,26

**Tab. 3:** Normwerte für saure Sphingomyelinase

	Typ A		Typ B			Typ C				
Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aktivität	0,97	0,67	5,57	1,33	43,65	18,24	44,91	26,07	22,27	17,87

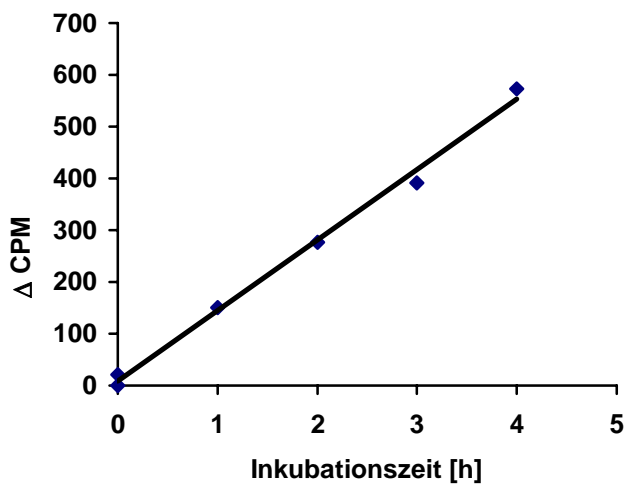
**Tab. 4:** ASMase-Aktivität (nmol/h/mg) in Patientenfibroblasten

## 6.2. Radioisotopische Bestimmung der ASMase-Aktivität

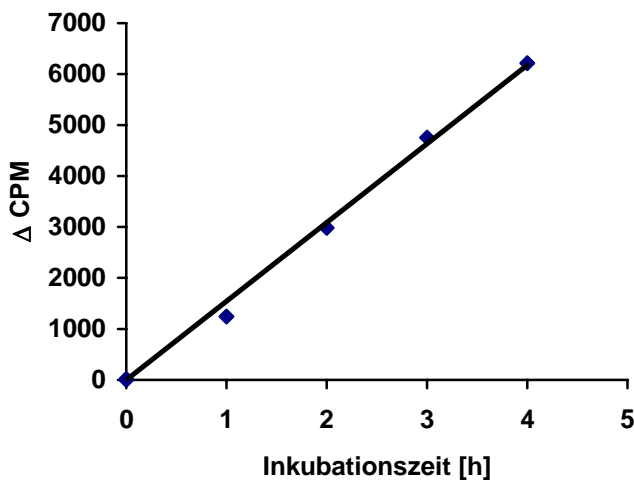
### 6.2.1. Inkubationszeitabhängigkeit

Diese Untersuchung zeigt den Einfluss der Inkubationszeit auf die Aktivität der sauren Sphingomyelinase. Dabei wurden Leukozyten-, Fibroblasten- und Chorionzottenhomogenate unterschiedlich lang (1/2/3/4 h bzw. 0,5/1/2/3 h) inkubiert.

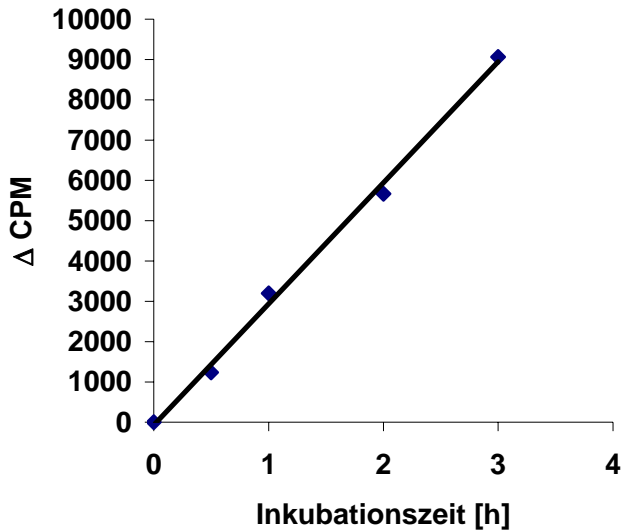
In den Abbildungen 13 a–c zeigen die Graphen für alle Zellarten einen linearen Verlauf. Daher wurde für alle Versuche eine Inkubationszeit von einer Stunde festgelegt.



**Abb. 13 a:** Inkubationszeitabhängigkeit der ASMase-Aktivität in Leukozyten



**Abb. 13 b:** Inkubationszeitabhängigkeit der ASMase-Aktivität in Fibroblasten

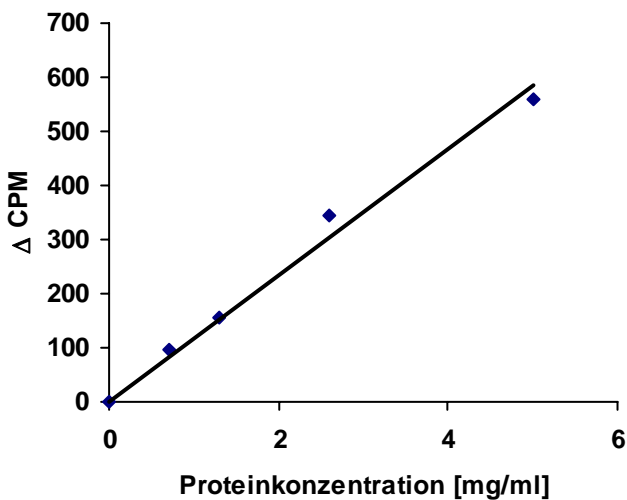


**Abb. 13c:** Inkubationszeitabhängigkeit der ASMase-Aktivität in Chorionzotten

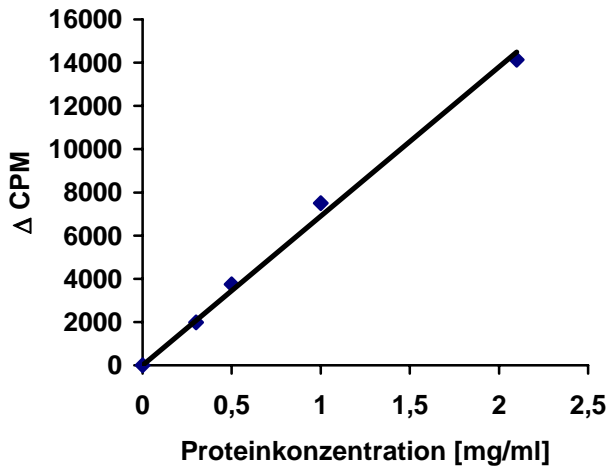
### 6.2.2. Proteinabhängigkeit

Aus Leukozyten-, Fibroblasten- und Chorionzottenhomogenat wurden durch Verdünnen mit 0,5%igem Natrium-Cholat verschiedene Lösungen mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen hergestellt und anschließend die ASMase-Aktivität bestimmt.

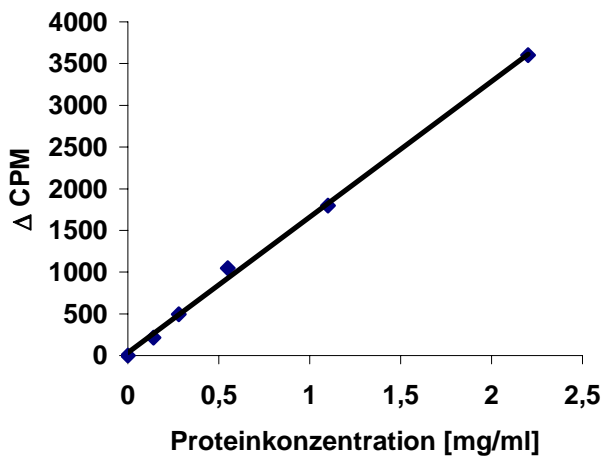
In den durchgeführten Versuchen verhält sich die Enzymaktivität direkt proportional zur Proteinkonzentration (Abb. 14 a–c). Für die Routine-Untersuchung wurde ein Proteingehalt von 2,5–3,5 mg/dl für Leukozyten und 1–2 mg/dl für Fibroblasten und Chorionzotten gewählt.



**Abb. 14 a:** Proteinabhängigkeit der ASMase-Aktivität in Leukozyten



**Abb. 14 b:** Proteinabhängigkeit der ASMase-Aktivität in Fibroblasten

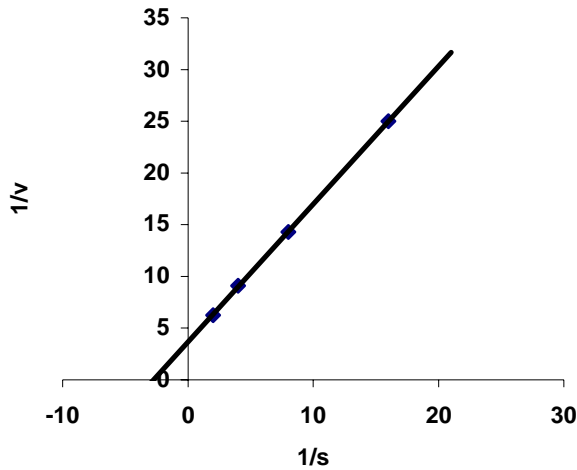


**Abb. 14c:** Proteinabhängigkeit in Chorionzotten

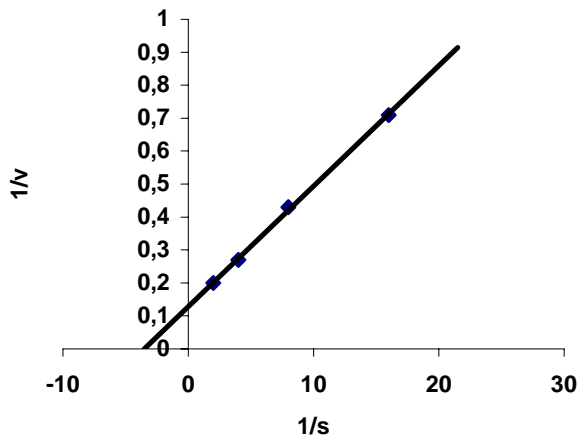
### 6.2.3. Enzymkinetik

In den Abbildungen 15 a und b sind die Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in doppeltreziproker Darstellung nach Lineweaver-Burk aufgetragen.

Daraus ergeben sich  $K_m$ -Werte für Leukozyten von  $360 \mu\text{M}$  und für Fibroblasten von  $330 \mu\text{M}$ .



**Abb. 15 a:** Enzymkinetik in Leukozyten



**Abb. 15 b:** Enzymkinetik in Fibroblasten

#### 6.2.4. ASMase-Aktivitätsbereich

Die ASMase-Aktivität wurde in verschiedenen Geweben gemessen (Tab. 5). Die mittlere Aktivität in Fibroblasten beträgt 17,14 nmol/h/mg bei einer Standardabweichung von 9,44. Die in je zwei kultivierten Amnionzellen gemessene mittlere Aktivität betrug 7,14 nmol/h/mg und in Chorionzotten 13,57 nmol/h/mg. Leukozyten zeigten die geringste Aktivität mit einem Normbereich von 0,11–0,72 nmol/h/mg. Der Mittelwert beträgt 0,33 bei einer Standardabweichung von 0,15. Die ASMase-Aktivität, die in zwei verschiedenen Leberbiopsien gemessen wurde, liegt mit einer Aktivität von 9,56 nmol/h/mg im Aktivitätsbereich von Fibroblasten und Chorionzotten.

Zellart	ASMase-Aktivität (nmol/h/mg)
<b>Fibroblasten (kultiviert)</b>	
<b>Kontrollen (n = 34)</b>	4,17–46,89
<b>Mittelwert:</b>	17,14
<b>Standardabweichung:</b>	9,44
<b>Amnionzellen (kultiviert)</b>	
<b>Kontrollen (n = 2)</b>	5,32/8,95
<b>Mittelwert:</b>	7,14
<b>Chorionzotten (kultiviert)</b>	
<b>Kontrollen (n = 2)</b>	6,14/21,00
<b>Mittelwert:</b>	13,57
<b>Leukozyten</b>	
<b>Kontrollen (n = 43)</b>	0,11–0,72
<b>Mittelwert:</b>	0,33
<b>Standardabweichung:</b>	0,15
<b>Leber (Biopsie)</b>	
<b>Kontrollen (n = 2)</b>	5,70/13,42
<b>Mittelwert:</b>	9,56

**Tab. 5:** Normwerte für saure Sphingomyelinase

Aus der Tabelle 6 sind die in Patientenfibroblasten bestimmten ASMase-Aktivitäten zu entnehmen. Typ-A- und -B-Patienten zeigen eine deutliche niedrige Aktivität von 0,13–0,29 nmol/h/mg. Auch beim Patienten 5 liegt die Aktivität mit 0,36 nmol/h/mg deutlich vermindert unter dem Normbereich. Von den Typ-C-Patienten befindet sich nur der Patient 7 mit einer Aktivität von 6,89 nmol/h/mg im Normbereich, die anderen liegen mit Aktivitäten von 3,54–3,94 nmol/h/mg leicht unter dem Normbereich.

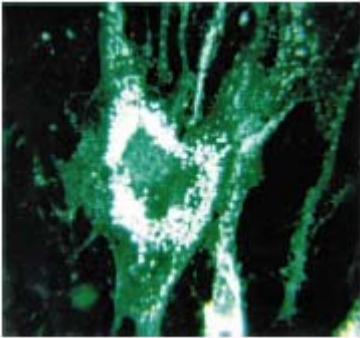
	Typ A		Typ B			Typ C				
Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aktivität	0,23	0,19	0,29	0,13	0,36	3,54	6,89	3,60	3,62	3,94

**Tab. 6:** ASMase-Aktivität (nmol/h/mg) in Patientenfibroblasten

### 6.3. Filipin-Färbung kultivierter Fibroblasten

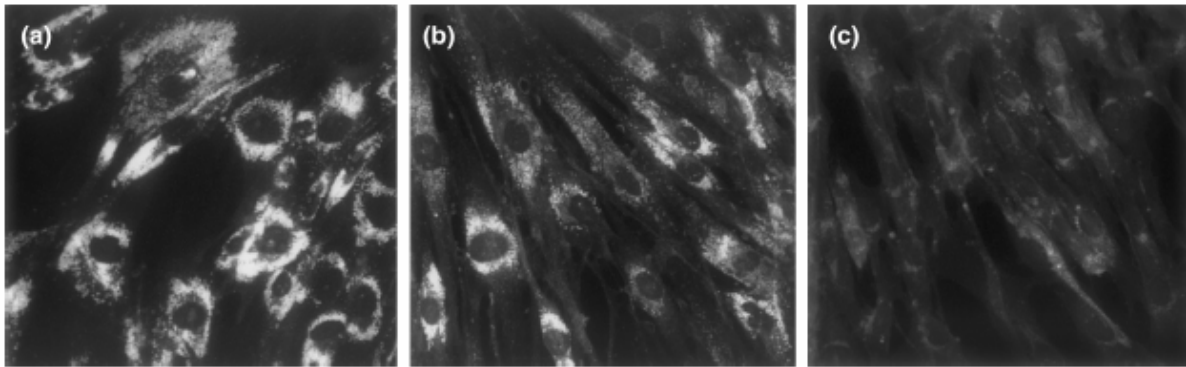
#### 6.3.1. Beurteilung der Färbung [116]

Sowohl Kontroll- als auch NP-C-Fibroblasten, die nur in LPDS enthaltendem Medium gezüchtet und anschließend gefärbt werden, zeigen eine leichte Filipin-Fluoreszenz der Plasmamembran. Eine eindeutige Differenzierung dieser Zellen erfolgt durch eine 24-stündige LDL-Inkubation mit anschließender Färbung. In normalen Fibroblasten fluoreszieren intrazelluläre Strukturen nur leicht und die fluoreszierende Eigenschaft der Plasmamembran nimmt zu. NP-C-Fibroblasten zeigen dagegen eine intensive Fluoreszenzfärbung perinukleärer Vakuolen, die den Lysosomen entsprechen [145, 9], (Abb. 16).



**Abb. 16:** Typisches perinukleäres Fluoreszenzmuster in NP-C-Hautfibroblasten [171]

Je nach Färbeverhalten unterscheidet man ein „klassisches“ von einem „varianten“ Muster. Bei der klassischen Form zeigen 95 % der Zellen eine perinukleäre Fluoreszenz, bei der varianten Form hingegen nur 50 % der Zellen (Abb. 17).



**Abb. 17:** Darstellung der Cholesterin-Akkumulation in Lysosomen mittels Filipin-Färbung und Immunfluoreszenzmikroskopie in Hautfibroblasten nach Inkubation mit LDL: (a) klassische NP-C-Zelllinie; (b) variante NP-C-Zelllinie; (c) normale Zelllinie [173]

### 6.3.2. Färbeergebnisse

Als Positivkontrollen dienten die Patientenzelllinien 8, die an der Universität Leiden/Niederlande als klassischer biochemischer NPC1-Phänotyp diagnostiziert, und 10, die uns von der Medizinischen Fakultät Çapa Istanbul/Türkei als diagnostizierter Typ C geschickt wurden. Da die Diagnose im Auftrag einer anderen türkischen Klinik in Lyon/Frankreich gestellt wurde, konnte uns die biochemische Phänotypenklassifikation nicht mitgeteilt werden. Als Negativkontrollen wurden Fibroblasten gesunder Probanden verwendet.

Die Filipin-Färbung stellte sich bei drei weiteren Patienten, Nr. 6, 7 und 9 als positiv dar. Außer den Zelllinien 9 und 10, bei der nur 50 % der Zellen eine intensive perinukleäre Fluoreszenz zeigten, typisch für das „variante“ Färbeverhalten, konnten die anderen Zelllinien dem „klassischen“ Muster zugeordnet werden. Die Färbung in Typ-A- und -B-Patientenzellen war wie erwartet negativ (Tab. 7).

	Typ A		Typ B			Typ C				
Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ergebnis	n. d.	neg.	neg.	neg.	neg.	classic	classic	classic	variant	variant

**Tab. 7:** Färbeergebnisse nach LDL-Inkubation in Niemann-Pick Patientenfibroblasten; n. d.: nicht durchgeführt; neg.: negativ

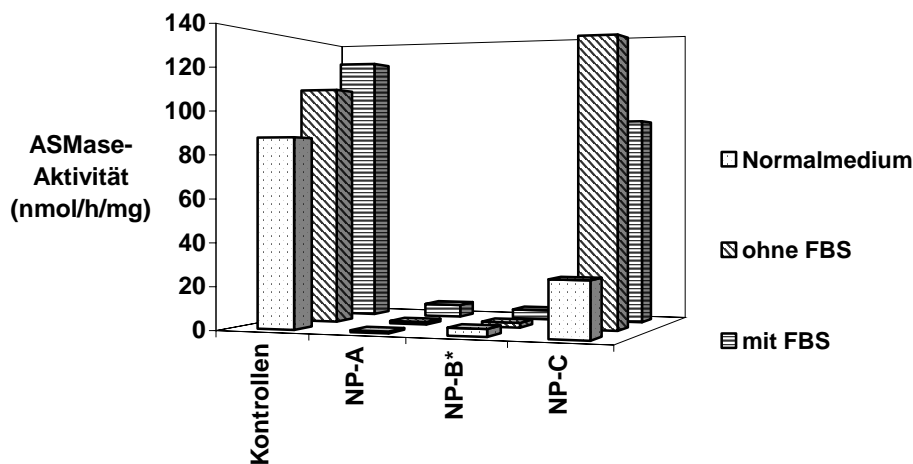


Das Färbeergebnis nach 24-stündiger Inkubation mit FBS anstelle LDL war nicht eindrucksvoll. Die Zelllinien 6, 7 und 8 zeigten eine schwache perinukleäre Fluoreszenz. Die Fibroblasten 9 und 10 waren von normalen Zellen nicht zu unterscheiden.

#### 6.4. Spektrophotometrische Bestimmung der ASMase-Aktivität nach Inkubation mit oder ohne FBS in lebenden Fibroblasten

Bei dieser Untersuchung wurde sowohl in Kontroll- als auch in NPD-Fibroblasten die ASMase-Aktivität nach Kultivierung in Nährmedium ohne FBS bzw. mit FBS spektrophotometrisch bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden mit den nach Kultivierung in Normalmedium bestimmten Aktivitäten (Tab. 8 und 9) verglichen (Abb. 18). Die im Normalmedium (Dulbecco's MEM) gemessenen Aktivitäten der NP-A- und NP-B-Zelllinien und die nach Inkubation ohne FBS bestimmten Werte erwiesen sich als nahezu gleich hoch. Die Kontrollzellen zeigten einen Anstieg der mittleren Aktivitäten um 24 nmol/h/mg. Die mittlere Aktivität der NP-C-Fibroblasten nahm deutlich um 109 nmol/h/mg zu.

In Kontrollzellen blieb die Aktivität nach FBS-Zugabe unverändert oder wurde sogar viel höher gemessen als ohne FBS-Zugabe (Tab. 9). Bei den Typ-A und -B-Patientenzellen konnte eine Aktivitätszunahme nach Inkubation mit FBS um das Vielfache festgestellt werden (Tab. 8). Die NP-C-Fibroblasten verhielten sich dagegen umgekehrt, die Aktivität nahm nach FBS-Gabe ab. Die Patientenzellen Nr. 8 und 10 zeigen nur noch eine Restaktivität von ca. 60 % (Tab. 8).



**Abb. 18:** Darstellung der nach Kultivierung im Normalmedium (siehe 4.1.2.) und  $\pm$  FBS-haltigem Medium (siehe 4.4.2.1.) bestimmten mittleren ASMase-Aktivitäten in Kontroll-, NP-A-, NP-B- und NP-C-Fibroblasten; \*: ohne Patient 5

In der Tabelle 8 sind die Aktivitäten in NPD-Patientenfibroblasten zusammengefasst. Die Zunahme der Aktivität nach FBS-Inkubation in NP-A- und NP-B-Zellen bzw. Abnahme in NP-C-Zellen verglichen mit der Aktivität ohne FBS-Zugabe ist deutlich zu sehen. Auch hier liegt die spektrophotometrisch bestimmte Aktivität des Patienten 5 im Normbereich. Jedoch verhalten sich diese Zellen genauso wie die NP-A- und übrigen NP-B-Fibroblasten, die Aktivität nimmt nach FBS-Gabe zu.

Die Tabelle 9 zeigt die mittleren Aktivitäten in NPD- und Kontrollfibroblasten.

Patient	ASMase-Aktivität (nmol/h/mg)			
	NM	- FBS	+ FBS	
A	1	0,97	2,06	8,97
	2	0,67	0,31	2,67
B	3	5,57	2,22	3,49
	4	1,33	2,27	5,19
	5	43,65	170,23	191,35
C	6	18,24	149,29	120,56
	7	44,91	152,54	116,94
	8	26,07	167,74	97,03
	9	22,27	137,09	111,49
	10	17,87	67,25	37,08

**Tab. 8:** Im Normalmedium (NM; siehe 4.1.2.) und Medium  $\pm$  FBS (siehe 4.4.2.1.) bestimmte ASMase-Aktivitäten in NPD-Patientenfibroblasten

Fibroblasten	ASMase-Aktivität (nmol/h/mg)		
	NM	- FBS	+ FBS
NP-A (n = 2)	0,82	1,19	5,82
NP-B (n = 2)*	3,45	2,25	4,34
NP-C (n = 5)	25,87	134,78	96,76
Kontrollen (n = 23)	88,14	112,12	127,83

**Tab. 9:** Im Normalmedium (NM; siehe 4.1.2.) und Medium  $\pm$  FBS (siehe 4.4.2.1.) bestimmte mittlere ASMase-Aktivitäten in NPD-Patienten- und Kontrollfibroblasten, \*: ohne Patient 5

## 6.5. [<sup>3</sup>H]-Oleat-Inkorporation in lebenden Fibroblasten

### 6.5.1. Inkubationszeitabhängigkeit

In diesen Versuchen wurde die Abhängigkeit des Oleat-Verbrauchs von der Verweildauer der Zellen im Inkorporationsgemisch, bestehend aus Oleat-Albumin-Gemisch und [<sup>3</sup>H]-Oleat, ermittelt. Es wurden für diese Untersuchung Negativ- (Kontrolle 1 und 2) und Positivkontrollen (Patient 8 und 10) benötigt. Je zwei Fibroblasten-Brutflaschen des Patienten 8 und der Kontrolle 1 bzw. des Patienten 10 und der Kontrolle 2 wurden nach Zugabe des Inkorporationsgemisches (Oleat-Albumin-Gemisch + [<sup>3</sup>H]-Oleat) und Medien mit und ohne FBS sechs, zwölf und 24 Stunden lang inkubiert.

In den Tabellen 10 a–12 a sind die [<sup>3</sup>H]-Oleat-Werte der Kontrolle 1 und des Patienten 8 und in 10 b–12 b der Kontrolle 2 und des Patienten 10 zusammengefasst. Die Kontrollzellen 1 und 2 zeigen nach sechsständiger ± FBS-Inkubation eine Differenz [(- FBS) - (+ FBS)] von 8,2 und 6,3 pmol/h/mg, die nach zwölf Stunden auf 4,6 und 3,8 pmol/h/mg abnimmt. Nach 24-stündiger ± FBS-Inkubation haben beide Zellreihen nach einem weiteren Abfall die niedrigste Differenz von 2,7 und 2,2 pmol/h/mg erreicht.

Bei den Patientenfibroblasten 8 nimmt der nach sechs Stunden gemessene Differenzbetrag von 11,7 pmol/h/mg zunächst nach zwölf Stunden auf 9,7 pmol/h/mg leicht ab, und steigt nach 24 Stunden auf 11,0 pmol/h/mg wieder an.

Die nach sechsständiger ±FBS-Inkubation gemessene Differenz 10,0 pmol/h/mg in den Patientenfibroblasten 10 fällt nach zwölf Stunden stark ab auf 2,9 pmol/h/mg. Nach 24 Stunden beträgt die Differenz nach einem leichten Anstieg 5,8 pmol/h/mg.

	F B S	[ <sup>3</sup> H]-Oleat-Wert (pmol/h/mg)
<b>Kontrolle 1</b>	-	33,44
<b>Kontrolle 1</b>	+	25,28
<b>Δ</b>		8,2
<b>Patient 8</b>	-	37,96
<b>Patient 8</b>	+	26,28
<b>Δ</b>		11,7

**Tab. 10 a:** [<sup>3</sup>H]-Oleat-Wert nach sechsständiger ± FBS-Inkubation in Fibroblasten der Kontrolle 1 und des Patienten 8

	F B S	[ <sup>3</sup> H]-Oleat-Wert (pmol/h/mg)
<b>Kontrolle 2</b>	-	42,80
<b>Kontrolle 2</b>	+	39,12
<b>Δ</b>		6,3
<b>Patient 10</b>	-	51,62
<b>Patient 10</b>	+	41,60
<b>Δ</b>		10,0

**Tab. 10 b:** [<sup>3</sup>H]-Oleat-Wert nach sechsständiger ± FBS-Inkubation in Fibroblasten der Kontrolle 2 und des Patienten 10

	F B S	[ <sup>3</sup> H]-Oleat-Wert (pmol/h/mg)
<b>Kontrolle 1</b>	-	22,14
<b>Kontrolle 1</b>	+	17,52
$\Delta$		4,6
<b>Patient 8</b>	-	28,24
<b>Patient 8</b>	+	18,52
$\Delta$		9,7

**Tab. 11 a:** [<sup>3</sup>H]-Oleat-Werte nach zwölfstündiger  $\pm$  FBS-Inkubation in Fibroblasten der Kontrolle 1 und des Patienten 8

	F B S	[ <sup>3</sup> H]-Oleat-Wert (pmol/h/mg)
<b>Kontrolle 2</b>	-	40,96
<b>Kontrolle 2</b>	+	37,16
$\Delta$		3,8
<b>Patient 10</b>	-	34,08
<b>Patient 10</b>	+	31,02
$\Delta$		2,9

**Tab. 11 b:** [<sup>3</sup>H]-Oleat-Werte nach zwölfstündiger  $\pm$  FBS-Inkubation in Fibroblasten der Kontrolle 2 und des Patienten 10

	F B S	[ <sup>3</sup> H]-Oleat-Wert (pmol/h/mg)
<b>Kontrolle 1</b>	-	22,50
<b>Kontrolle 1</b>	+	19,82
$\Delta$		2,7
<b>Patient 8</b>	-	21,70
<b>Patient 8</b>	+	10,70
$\Delta$		11,0

**Tab. 12a :** [<sup>3</sup>H]-Oleat-Werte nach 24-stündiger  $\pm$  FBS-Inkubation in Fibroblasten der Kontrolle 1 und des Patienten 8

	F B S	[ <sup>3</sup> H]-Oleat-Wert (pmol/h/mg)
<b>Kontrolle 2</b>	-	24,26
<b>Kontrolle 2</b>	+	22,04
$\Delta$		2,2
<b>Patient 10</b>	-	22,97
<b>Patient 10</b>	+	17,21
$\Delta$		5,8

**Tab. 12 b:** [<sup>3</sup>H]-Oleat-Werte nach 24-stündiger  $\pm$  FBS-Inkubation in Fibroblasten der Kontrolle 2 und des Patienten 10

### 6.5.2. Oleat-Inkorporation: [<sup>3</sup>H]-Oleat-Werte in Patienten- und Kontrollfibroblasten

Die Oleat-Inkorporation wurde in Kontrollfibroblasten, NP-A-, NP-B- und NP-C-Fibroblasten untersucht (Tab. 13). Der mittlere [<sup>3</sup>H]-Oleatwert beträgt in Kontrollzellen nach Inkubation ohne FBS 23,75 pmol/h/mg und nach Inkubation mit FBS 17,63 pmol/h/mg. Die daraus gebildete Differenz liegt zwischen 2,2–8,4 pmol/h/mg. Die  $\pm$  FBS-Werte in Niemann-Pick Typ-A- und -B-Fibroblasten liegen im Normbereich mit einer Differenz von 3,8–8,0 pmol/h/mg (Tab. 14). Die NP-C-Patientenfibroblasten 6 und 7 zeigen wie 8 gleich hohe [<sup>3</sup>H]-Oleat-Werte nach 24-stündiger FBS-Inkubation. Der Differenzbereich liegt zwischen 11,0–12,0 pmol/h/mg. Die Patientenzellen 9 und 10 befinden sich mit Differenzen von 8,2 und 5,8 pmol/h/mg im Normbereich (Tab. 13). Da die Fibroblasten der Patienten 6 und 7 bezüglich der Differenz ähnlich hohe Werte aufweisen wie die Zellen des als biochemisch klassisch diagnostizierten Patienten

8 besitzen, werden sie auch als biochemisch klassischer Typ bezeichnet. Die zweite Positivkontrolle, Patient 10, zeigt ebenso wie Patient 9, eine im Normbereich liegenden Differenzbetrag und zählt somit zu der biochemisch varianten Gruppe.

Fibroblasten	[ <sup>3</sup> H]-Oleat-Wert (pmol/h/mg)		
	- FBS	+ FBS	Differenzbereich
NP-A (n = 2)	19,31	13,73	3,8/7,3
NP-B (n = 3)	18,18	10,73	5,7–8,0
NP-C (n = 5)	23,89	15,01	5,8–12,0
Kontrollen (n=20)	23,75	17,63	2,2–8,4

**Tab. 13:** [<sup>3</sup>H]-Oleat-Mittelwerte in NPD-Patienten- und Kontrollfibroblasten

Patient		[ <sup>3</sup> H]-Oleat-Wert (pmol/h/mg)		
		- FBS	+ FBS	Δ
A	1	19,95	12,63	7,3
	2	18,66	14,83	3,8
B	3	20,13	12,15	8,0
	4	15,89	10,24	5,7
	5	16,22	9,31	6,9
C	6	24,80	12,81	12,0
	7	26,03	15,02	11,0
	8	21,70	10,70	11,0
	9	19,81	11,65	8,2
	10	22,97	17,21	5,8

**Tab. 14:** [<sup>3</sup>H]-Oleat-Werte in NPD-Patientenfibroblasten

### 6.6. Radioisotopische Bestimmung der zytoplasmatischen CEHase-Aktivität

Die mittlere zytoplasmatische CEHase-Aktivität der Kontrollfibroblasten beträgt 0,15 nmol/h/mg (Tab. 15). Die Aktivität in Typ-A- und –B-Fibroblasten liegt im Normbereich. Die Typ-C-Patientenzellen 7, 8 und 9 zeigen eine verminderte Aktivität von 0,04 und 0,05 nmol/h/mg, während die Aktivität der Zellen 6 und 10 im Normbereich liegt (Tab. 16).

Zellart	Zytoplasmatische CEHase-Aktivität (nmol/h/mg)
<b>Fibroblasten</b> ( <i>kultiviert</i> )	
<b>Kontrollen</b> ( <i>n = 28</i> )	0,08–0,29
<b>Mittelwert:</b>	0,15
<b>Standardabweichung:</b>	0,05

**Tab.15:** Normbereich der zytoplasmatischen CEHase-Aktivität in Kontrollfibroblasten

	Typ A		Typ B			Typ C				
Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Aktivität</b>	0,23	0,15	0,18	0,34	0,16	0,20	0,05	0,05	0,04	0,28

**Tab. 16:** Zytoplasmatische CEHase-Aktivität in Niemann-Pick Patientenfibroblasten

## 7. DISKUSSION

### 7.1. Bestimmung der ASMase-Aktivität

#### 7.1.1. Spektrophotometrischer Test

Die spektrophotometrische Aktivitätsbestimmung der ASMase mit dem künstlichen Substrat 2N-Hexadecanoylamino-4-nitrophenyl-phosphorylcholin (HNP) beruht auf einer von Gal et al. 1975 [38] erstmals beschriebenen Methode, die durch uns modifiziert und erweitert wurde. In der Originalarbeit wurde die Charakterisierung des Enzyms nur in Fibroblasten durchgeführt. Gal et al. zeigten, dass sich die Proteinkonzentration zur Absorptionsänderung bis zu einem Proteingehalt von 268  $\mu\text{g}$  linear verhält. Während bei seiner Untersuchung zur Inkubationszeitabhängigkeit ein linearer Anstieg der Absorptionsänderung in den ersten beiden Stunden zu entnehmen ist, flacht die Kurve danach leicht ab. Wir konnten mit unserer Methode eine lineare Abhängigkeit sowohl der Proteinkonzentration (Abb. 10 a, b) als auch der Inkubationszeit zur Absorptionsänderung innerhalb der ersten drei Stunden (Abb. 9 a, b) in Leukozyten, Fibroblasten und Chorionzotten nachweisen. Der von Gal et al. für Fibroblasten angegebene  $K_M$ -Wert von 2,4 mM liegt in dem von uns ermittelten Bereich von 1,25–2,9 mM ( $n = 3$ ). Eine  $K_M$ -Wertbestimmung in Leukozyten von 3,3/4,8 mM ( $n = 2$ ) und Chorionzotten von 1,1/1,2 mM ( $n = 2$ ) wurde von uns erstmalig durchgeführt.

Der von Gal et al. [38] angegebene hohe Normbereich in kultivierten Fibroblasten von 92–168 nmol/h/mg ( $n = 15$ ) und Amnionzellen 163/180 nmol/h/mg ( $n = 2$ ) ist möglicherweise auf Kulturbedingungen zurückzuführen. Der hohe Normbereich in Leukozyten von 3,9–7,5 nmol/h/mg ( $n = 11$ ) ist sowohl durch unsere leicht erhöhten Leerwerte als auch durch eine von unserer Methode abweichenden Leukozytenpräparationstechnik zu erklären [39]. Normbereiche für die spektrophotometrische ASMase-Bestimmung in Chorionzotten und Leber wurden erstmals durch unsere Untersuchungen ermittelt. Unsere Untersuchungen (siehe 6.1.5.) ergaben für kultivierte Zellen folgende Mittelwerte in nmol/h/mg: Fibroblasten  $84,60 \pm 32,03$  ( $n = 37$ ), Amnionzellen 38,30 ( $n = 2$ ) und Chorionzotten 78,76 ( $n = 2$ ). Die Aktivität, gemessen in 43 Leukozyten, lag in einem Bereich von 0,57–4,99 nmol/h/mg ( $1,80 \pm 0,94$  nmol/h/mg). Der in der Leber bestimmte Mittelwert beträgt 16,26 nmol/h/mg mit einem Aktivitätsbereich von 11,92–26,52 nmol/h/mg.

Da der optische Dichteunterschied in mit HNP inkubierten Kontrollen ohne Enzym und Leukozytenextrakten sehr gering ist, wird zur ASMase-Aktivitätsbestimmung in Leukozyten das [<sup>14</sup>C]-markierte Sphingomyelin als Substrat empfohlen [38].

### 7.1.2. Radioisotopischer Test

Wir führten in unserem Labor erstmals eine radioisotopische ASMase-Aktivitätsbestimmung mit [<sup>14</sup>C]-Sphingomyelin angelehnt an eine von Wenger [177] und Folch et al. [36] beschriebene, von uns modifizierte Methode durch. In der Originalarbeit wurden Protein- und Inkubationszeitabhängigkeitsstudien nur in Fibroblasten durchgeführt. In diesen Versuchen zeigt die ASMase-Aktivität eine lineare Abhängigkeit der Proteinkonzentration bis zu einem Proteingehalt von 75 µg und der Inkubationszeit bis zu 90 Minuten, der Graf flacht dann bis 120 Minuten sehr leicht ab. In unseren Untersuchungen in Leukozyten, Fibroblasten und Chorionzotten verhielten sich die Proteinkonzentration (Abb. 14 a–c) und die Inkubationszeit (Abb. 13 a, b) zur cpm-Änderung in Leukozyten und Fibroblasten bis vier Stunden und in Chorionzotten bis drei Stunden (Abb. 13 c) linear. Die in der Literatur angegebenen  $K_M$ -Werte für das [<sup>14</sup>C]-Sphingomyelin variieren sehr stark von 25–500 µM [128, 182, 183]. Unsere gemessenen  $K_M$ -Werte von 360 µM für Leukozyten und 330 µM für Fibroblasten liegen in diesem Bereich.

Die von Wenger [177] angegebenen mittleren Werte für Fibroblasten von  $83 \pm 22,7$  nmol/h/mg ( $n=60$ ), für Amnionzellen von 68,5 nmol/h/mg mit einem Aktivitätsbereich von 40,7–106,0 nmol/h/mg ( $n = 9$ ) und für Leukozyten von  $1,94 \pm 0,93$  nmol/h/mg ( $n = 30$ ) liegen deutlich höher als unsere gemessenen Werte. Dies kann durch unterschiedliche Versuchs- und Kulturbedingungen erklärt werden. Normbereiche für Chorionzotten und Leber wurden bisher nicht beschrieben.

Die durch uns in verschiedenen Zellarten bestimmten ASMase-Aktivitäten werden in Tabelle 17 den Angaben aus der Literatur gegenübergestellt.

Es kann gezeigt werden, dass unsere Werte in großen Bereichen mit den \*markierten Literaturangaben korrelieren.



Normwerte	Fibroblasten	Amnionzellen	Chorionzotten	Leukozyten	Leber
<b>Eigene Werte</b>	4,17–46,89 (n = 34) 17,14±9,44	5,32/8,95 (n = 2) 7,14	6,14/21,00 (n = 2) 13,57	0,11–0,72 (n = 43) 0,33±0,15	5,70/13,42 (n = 2) 9,56
<b>deWinter et al. [27]</b>	4,9–20,5* (n = 12)	3,1–8,0* (n = 11)	--	--	--
<b>Takada et al. [150]</b>	32,8–59,1 (n = 3) 42,4	--	--	0,69–1,09* (n = 5)	--
<b>Fukada et al. [37]</b>	--	(n = 9) 18,8±10,5	(n = 9)* 7,8±3,7	--	--
<b>Minami et al. [102]</b>	--	--	--	(n = 16) 2,56	(n = 7) 23,94
<b>Higami et al. [55]</b>	(n = 2) 11,4	--	--	--	--
<b>Epstein et al. [31]</b>	--	8,7/8,9 (n = 2)	--	--	(n = 2)* 9,70

**Tab. 17:** Zusammenfassung der eigenen und Literatur-Normwerte; 1. Zeile: Normbereich; 2. Zeile: Probenanzahl; 3. Zeile: Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung)

\*: enge Korrelation der Literaturangaben mit unseren Werten

### 7.1.2. Patientenergebnisse

Die spektrophotometrisch und radioisotopisch bestimmten ASMase-Aktivitäten in Niemann-Pick Typ-A-, -B- und -C-Patientenfibroblasten sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Die Aktivitäten der Typ-A- und -B-Patientenzellen 1–4 sind auf weniger als 10 % des unteren Normbereichs reduziert. Es ist zu beachten, dass die Werte nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren [161]. Eine Subklassifikation in Typ A oder B kann nicht allein anhand einer verminderten ASMase-Aktivität, sondern nur zusammen mit dem klinischen Erscheinungsbild erfolgen. Von den in fünf Typ-C-Patienten bestimmten Werten, zeigen vier eine, wie in der Literatur beschriebene [178, 158, 6] partiell verminderte ASMase-Aktivität. Nur Patient 7 liegt mit beiden Aktivitäten in den entsprechenden Normbereichen. Auffällig ist ferner die spektrophotometrisch gemessene, im Normbereich liegende Aktivität des Patienten 5, während der radioisotopisch ermittelte Wert mit weniger als 10 % deutlich unter dem unteren Aktivitätsbereich liegt. Auf dieses Phänomen wurde ausdrücklich durch Vanier in einer im Jahr 2002 veröffentlichten Abhandlung [172] hingewiesen. Eine von Harzer et al. [53] veröffentlichte Studie lieferte ein Jahr später die Erklärung: Von 24 untersuchten Typ-A- und

-B-Patientenzellen zeigten vier Zelllinien eine hohe im Normbereich liegende Aktivität mit dem künstlichen Substrat und eine eindeutig verminderte unter dem Normbereich liegende Aktivität mit dem authentischen Substrat [ $^{14}\text{C}$ ]-Sphingomyelin. Bei bestimmten Mutationen, wie z. B. der Q292K, wird die positiv geladene Aminosäure Lysin gegen die neutrale Aminosäure Glutamin ausgetauscht. Dies hat die Entstehung eines defekten Enzymproteins mit höherer Substrataffinität zum HNP zur Folge.

Die Untersuchung mit dem künstlichen Substrat bietet erhebliche Vorteile:

Für viele Laboratorien wird der Kostenfaktor von großem Interesse sein, das künstliche Substrat ist viel günstiger als das radioaktive. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass diese Untersuchung ohne radioaktive Zusätze auskommt. Die Vermeidung radioaktiver Abbauprodukte ermöglicht ein umweltschonenderes Arbeiten. Außerdem erübrigt sich eine betriebsärztliche Untersuchung der Labormitarbeiter auf mögliche, einschränkende gesundheitliche Probleme hinsichtlich des Umgangs mit radioaktivem Material. Schwangere Mitarbeiterinnen oder Mitarbeiter mit einer Strahlenbelastung in der Vorgeschichte können bedenkenlos mit dem Substrat arbeiten. Der letzte wichtige Punkt ist die Durchführung der Untersuchung in für Radioaktivität nicht zugelassenen Räumen.

Trotzdem ist es anzuraten, bei typischer Klinik die ASMase-Aktivität zusätzlich radioisotopisch zu bestimmen, um falsch negative Befunde zu vermeiden.

Patient	ASMase-Aktivität <sup>1,a</sup>	ASMase-Aktivität <sup>1,b</sup>	Filipin-Färbung	ASMase-Aktivität <sup>1,a</sup>		$^3\text{H}$ -Oleat-Wert <sup>2</sup>			Lipase-Aktivität <sup>1</sup>
				- FBS	+ FBS	- FBS	+ FBS	$\Delta$	
1	0,97	0,23	n.d.	2,06	8,97	19,95	12,63	7,32	0,23
2	0,67	0,19	neg.	0,31	2,67	18,66	14,83	3,83	0,15
3	5,57	0,29	neg.	2,22	3,49	20,13	12,15	7,98	0,18
4	1,33	0,13	neg.	2,27	5,19	15,89	10,24	5,65	0,34
5	43,65	0,36	neg.	170,23	191,35	16,22	9,31	6,91	0,16
6	18,24	3,54	classic	149,29	120,56	24,80	12,81	11,99	0,20
7	44,91	6,89	classic	152,54	116,94	26,03	15,02	11,01	0,05
8	26,07	3,60	classic	167,74	97,03	21,70	10,70	11,00	0,05
9	22,27	3,62	variant	137,09	111,49	19,81	11,65	8,16	0,04
10	17,87	3,94	variant	67,25	37,80	22,97	17,21	5,76	0,28

**Tab. 18:** Zusammenfassung aller Ergebnisse in Patientenfibroblasten  
a: spektrophotometrische ASMase-Bestimmung; b: radioisotopische ASMase-Bestimmung  
1: Einheit in nmol/h/mg; 2: Einheit in pmol/h/mg  
n.d.: nicht durchgeführt

## **7.2. Methoden zum Nachweis einer intrazellulären Cholesterintransportstörung**

### **7.2.1. Filipin-Färbung**

Die von Kruth et al. [72] entwickelte, seit 1987 als Screening-Methode hauptsächlich in Fibroblasten durchgeführte Filipin-Färbung weist mit hoher Sensitivität und Spezifität akkumuliertes nicht verestertes, Cholesterin in Lysosomen nach. Die Färbung kann auch in kultivierten Lymphozyten [2], Chorionzotten und Amnionzellen [168] erfolgen. Da im Normalmedium, z.B. Dulbecco's MEM, gezüchtete und gefärbte Zellen zu 80 % keine Fluoreszenz zeigen, werden sie zuerst in LPDS enthaltendem Medium bebrütet und erst nach 24-stündiger LDL-Inkubation gefärbt. Bei den meisten NP-C-Patienten zeigen 95 % der Zellen eine intensive Fluoreszenzfärbung perinukleärer Strukturen, die als Lysosomen [145, 9] identifiziert wurden. Dieses Färbeverhalten wird als zytochemisch „klassisch“ bezeichnet. Bei zytochemisch „varianten“ Formen sind nur 50 % der perinukleären Strukturen gefärbt. Ein positives, jedoch deutlich differierendes Filipin-Färbemuster wird auch in Fibroblasten von Patienten mit I-Zell-Erkrankung gefunden [166]. Die intrazelluläre Cholesterinakkumulation in diesen Zellen ist Folge einer lysosomalen Fehlsteuerung des NPC2-Proteins [21].

Wir konnten Vanier et al's Beobachtung [166], dass sich nach 24-stündiger FBS-Inkubation nur klassische NP-C-Patientenfibroblasten positiv färben und variante Zellen von normalen nicht unterscheiden, bestätigen. Von den fünf untersuchten NP-C-Fibroblasten zeigten die Zellen 6, 7 und 8 ein klassisches und die Zellen 9 und 10 ein variantes Färbemuster (Tab. 7, 18). Die Färbung in NP-A- und -B-Fibroblasten war negativ.

### **7.2.2. Spektrophotometrische Bestimmung der ASMase-Aktivität nach Inkubation mit oder ohne FBS in lebenden Fibroblasten**

Mit dieser einfachen, sicheren und schnell durchführbaren Methode können Fibroblasten von Niemann-Pick Typ-C-Patienten eindeutig von Typ-A- und -B-Patienten- und Kontrollzellen unterschieden werden. Unsere Untersuchungen lieferten mit der Literatur [166, 156] vergleichbare Ergebnisse. Die in Kontroll- und NP-C-Fibroblasten nach Subkultivierung in Standardmedium (Dulbecco's MEM) gemessenen ASMase-Aktivitäten stiegen nach dreitägiger Bebrütung in LPDS-Medium deutlich an (Abb. 18). Die Lipoproteine, die im Dulbecco's MEM enthalten sind, haben somit eine hemmende Wirkung auf die Enzymaktivität. Die Akti-

vitäten der Typ-A- und -B-Patientenzellen wurden dagegen kaum beeinflusst. Eine zweitägige Subkultivierung der Fibroblasten in LPDS-Medium und anschließender 24-stündiger FBS-Inkubation zeigte in einigen Kontrollfibroblasten eine gleich hohe Aktivität, jedoch bei den meisten einen weiteren Anstieg, und in NP-C-Fibroblasten einen Abfall der Aktivitäten auf im Normbereich liegende Werte. Die Aktivitäten in NP-A- und -B-Fibroblasten stiegen erst nach FBS-Zugabe um das Vielfache an. Dieser deutliche Einfluss des Lipoproteingehaltes des Mediums auf das nicht veresterte lysosomale Cholesterin wurde bereits in verschiedenen Studien beschrieben [84, 16, 119, 145]. Durch Entfernung des exogenen Lipoproteins aus dem Medium können der Sphingomyelinase-Mangel und die Cholesterinakkumulation korrigiert werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Änderung des Cholesteringehaltes die biochemische oder klinische Manifestation der Erkrankung beeinflussen könnte [156]. Pentchev et al. [117] konnten anhand eines Maus-Modells zeigen, dass die Schwere und Progression der Erkrankung bei Mäusen, die zusätzlich mit exogenem Cholesterin gefüttert wurden, stärker zunahm, als bei diätetisch gut eingestellten Kontrollmäusen. Beim Menschen konnte eine Abnahme der hepatischen und Plasmacholesterinspiegel nach kombinierter medikamentöser Therapie mit Cholesterinsenkern gezeigt werden. Eine positive Einflussnahme auf neurologische Symptome konnte nicht bewiesen werden [115], dennoch wird NP-Patienten eine cholesterinarme Ernährung und medikamentöse Therapie empfohlen.

### 7.2.3. [<sup>3</sup>H]-Oleat-Inkorporation in lebenden Fibroblasten

Die [<sup>3</sup>H]-Oleat-Inkorporation wird in Anlehnung an eine von Vanier et al. [166] entwickelten Methode durchgeführt. Bei dieser relativ komplizierten und zeitaufwändigen Untersuchung werden Kontroll- und NP-C-Fibroblasten nach Subkultivierung in LPDS-Medium, 24 Stunden lang in einem  $\pm$ LDL-Medium, das [<sup>3</sup>H]-Oleat enthält, inkubiert. Nach rezeptorvermittelter Aufnahme des LDL-Cholesterins und Diffusion des [<sup>3</sup>H]-Oleats in die Zelle stellt man in normalen Zellen eine deutliche Inkorporationszunahme des [<sup>3</sup>H]-Oleats in Cholesterin[<sup>3</sup>H]-Oleat fest. Die Menge des in vitro gebildeten Cholesterin[<sup>3</sup>H]-Oleats wird dünnschichtchromatografisch bestimmt. Da NP-C-Zellen aufgrund des NPC1- bzw. NPC2-Proteindefektes exogen zugeführtes Cholesterin nicht verestern können, akkumuliert es in den Lysosomen. Vanier et al. [166] konnte zwei biochemische Phänotypen unterscheiden. Mehr als 80 % der Patienten zeigten einen biochemisch klassischen Typ mit einer Veresterungsrate von weniger als 10 % des Normbereiches. Bei ca. 15–20 % der Patienten mit einem biochemisch varianten

Typ konnte eine partiell verminderte Veresterungsrate bis zu 50 % des Normbereiches gemessen werden. Während biochemisch klassische NP-C -Fibroblasten nach 24-stündiger Inkubation eine eindeutig hohe Cholesterin-Akkumulation aufweisen, nimmt die weniger ausgeprägte Cholesterinanhäufung in biochemisch varianten NP-C-Zellen nach zwölf bis 24 Stunden auf Normalwerte ab. Eine Normalisierung der Cholesterin-Akkumulation in biochemisch klassischen NP-C-Zellen tritt erst nach 48 Stunden auf [3].

Die Oleat-Inkorporation, die auch in kultivierten Lymphozyten [2], Chorionzotten und Amnionzellen [168] durchgeführt werden kann, ist weniger sensitiv und spezifisch als die Filipin-Färbung, da verminderte Veresterungsraten nicht nur in NP-C-Zellen, sondern auch in Zellen von Patienten mit Hypercholesterinämie, Cholesterinesterspeicherstörung (CESD), Wolman- und I-Zell-Erkrankung gefunden werden. Die zytochemischen Typen korrelieren in der Regel mit den biochemischen Typen. Ein klassischer Phänotyp liegt demnach vor, wenn zyto- und biochemisch ein klassischer Typ diagnostiziert wurde. Ein zyto- und biochemisch varianter Typ wird als varianter Phänotyp bezeichnet. Eine in über 300 NP-C-Familien durchgeführte Studie konnte zeigen, dass eine stark beeinträchtigte intrazelluläre Cholesterinhomöostase nicht streng mit dem klinischen Phänotyp korreliert [167, 165].

Wir konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit eine neue, einfache [ $^3\text{H}$ ]-Oleat-Inkorporations-Methode entwickeln, bei der nicht die entstehende Cholesterin[ $^3\text{H}$ ]-Oleat-Konzentration, sondern der zelluläre [ $^3\text{H}$ ]-Oleat-Verbrauch bestimmt wurde. Hierbei konnte auf dünnschichtchromatographische Methoden vollständig verzichtet werden. Unsere indirekte Methode erlaubt, eine positive Filipin-Färbung und sekundär verminderte ASMase-Aktivität nach Inkubation mit FBS vorausgesetzt, eine schnellere biochemische Klassifikation als die durch Vanier beschriebene Methode [4]. Es gelang uns die Patienten 6 und 7, zusätzlich zum bekannten Patienten 8, als biochemisch klassischen Typ zu verifizieren. Die Patientenzellen 9 und 10, die der varianten Gruppe angehören, verhielten sich deutlich anders. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen der Filipin-Färbung (Tab.18).

Unsere in Kontroll- und NP-C-Fibroblasten durchgeführte Inkubationsstudie zeigte ein unterschiedliches Verhalten biochemisch klassischer und varianter Formen. Während Kontrollzellen in den ersten sechs Stunden einen höheren Oleat-Verbrauch als nach 24 Stunden zeigen, bleibt der Verbrauch bei biochemisch klassischen Typen gleich hoch bzw. nimmt bei varianten Typen ab. Diese Beobachtung lässt sich folgendermaßen erklären: In normalen Fibroblasten ist die Verarbeitung des exogen zugeführten Cholesterins nicht beeinträchtigt. Das ebenfalls exogen zugeführte [ $^3\text{H}$ ]-Oleat wird in Cholesterin-[ $^3\text{H}$ ]-Oleat inkorporiert und somit verbraucht. Nach 24 Stunden stellt sich ein Gleichgewicht ein. In NP-C-Zellen wird

dagegen exogen aufgenommenes Cholesterin und [<sup>3</sup>H]-Oleat nicht zu Cholesterin-[<sup>3</sup>H]-Oleat weiterverarbeitet. Ein kleiner Teil des [<sup>3</sup>H]-Oleats wird für die Veresterung des endogen synthetisierten Cholesterins benötigt, der Großteil aber wird der  $\beta$ -Oxidation zugeführt, wobei aus dem Oleat unter Energiegewinnung vermehrt Acetyl-CoA entsteht. Aus dem überschüssigen Acetyl-CoA wird  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) gebildet, das unter anderem für die Cholesterin de-novo-Synthese benötigt wird [59].

#### 7.2.4. Radioisotopische Bestimmung der zytoplasmatischen CEHase-Aktivität

Bei diesem Versuch, der eigentlich zum Nachweis einer Wolman-Erkrankung bzw. Cholesterinesterspeicherstörung (CESD) auf dem Boden eines sauren Lipase-Mangels entwickelt wurde [5, 58], veränderten wir den pH-Wert von 3,7–3,9 auf 7,6–7,8, um eine Hydrolysestörung des Cholesterinoleats in Cholesterin und Oleat in NP-C-Fibroblasten aufzudecken. Tatsächlich konnten wir bei drei Patienten, 7, 8 und 9, eine verminderte Enzymaktivität von 0,04 und 0,05 nmol/h/mg bestimmen (Tab. 16, 18). Die Aktivitäten der NP-A- und -B-Patienten, sowie der NP-C-Patienten 6 und 10 liegen mit 0,20 und 0,28 nmol/h/mg im Normbereich (Tab. 16, 18). Der Aktivitätsbereich der Kontrollzellen variiert von 0,08–0,29 nmol/h/mg mit einem Mittelwert von 0,15 nmol/h/mg (Tab. 15).

Da dieses Phänomen bei diesem pH-Wert bisher von niemandem beschrieben wurde, nehmen wir an, dass bei der NP-C-Erkrankung in einigen Fällen die zytoplasmatische Cholesterinesterhydrolyase (CEHase)-Aktivität in Fibroblasten vermindert ist.

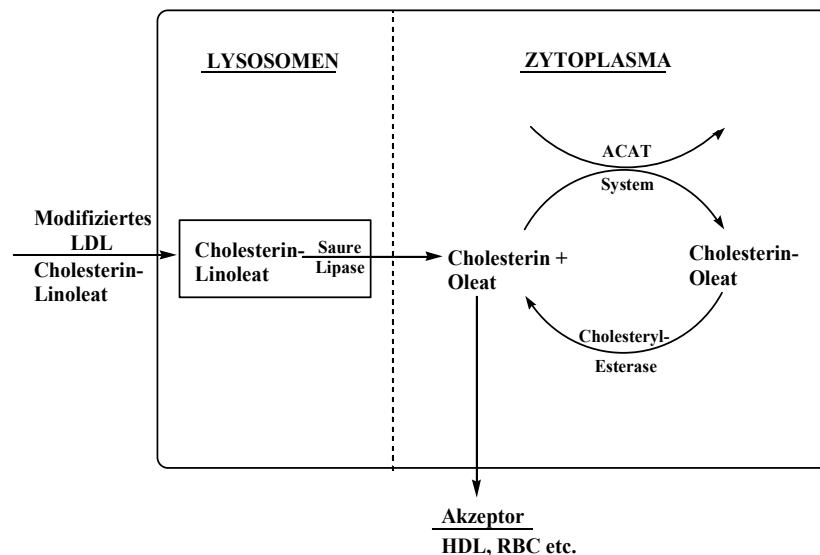
In Fibroblasten, Blutzellen und glatten Muskelzellen können zwei Cholesterinesterhydrolyasen unterschieden werden [132, 133, 58]. Die saure Cholesterinesterase (= Lipase) mit einem pH-Optimum im sauren Milieu katalysiert die Hydrolyse von Cholesterinoleat zu Cholesterin und Oleat in den Lysosomen. Die im Zytoplasma vorkommende CEHase mit einem neutralen pH-Optimum besitzt im Vergleich zur sauren Lipase eine relativ niedrige hydrolytische Aktivität [133]. Die zytoplasmatische CEHase baut ebenfalls Cholesterinoleat zu Cholesterin und Oleat ab und ist ebenso wie die ACAT [59] am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert [133].

In der Abbildung 19 ist das von Brown et al. [14] vorgeschlagene Zwei-Kompartimentenmodell des Cholesterinmetabolismus in Makrophagen dargestellt:

An Lipoproteine gebundene Cholesterinester werden LDL-vermittelt in den Makrophagen aufgenommen. Nach mehreren Schritten gelangen sie schließlich in ein Lysosom, das dem

ersten zellulären Kompartiment entspricht. In den Lysosomen baut die saure Lipase die Cholesterinester hydrolytisch ab [44, 132]. Das freigesetzte Cholesterin verlässt das Lysosom und gelangt in das Zytoplasma, dem zweiten zellulären Kompartiment. Im Zytoplasma wird das Cholesterin entweder sofort ausgeschieden oder durch die ACAT zu Cholesterinoleat verestert und als Tröpfchen gespeichert.

Brown et al. konnten zeigen, dass in Makrophagen zytoplasmatische Cholesterinester in einem 24-stündigen Zyklus hydrolysiert und wiederverestert werden [14]. Der Abbau der zytoplasmatischen Cholesterinester zu Cholesterin und Fettsäuren wird durch die zytoplasmatische Cholesterinesterhydrolase katalysiert [57, 14]. Bei Anwesenheit eines Cholesterinakzeptors, z. B. HDL oder Erythrozyten, verlässt das freigesetzte Cholesterin die Zelle. Bei Fehlen eines Akzeptors verbleibt das Cholesterin in der Zelle, wobei 50 % der gespeicherten Cholesterinester alle 24 Stunden am zytoplasmatischen Zyklus teilnehmen [14].



**Abb. 19:** Zwei-Kompartimentenmodell des Cholesterinestermetabolismus in Makrophagen, das den zytoplasmatischen Cholesterinesterzyklus darstellt [14];

Cholesteryl-Esterase = Cholesterinester-Hydrolase; RBC = rote Blutkörperchen

Da wir mit unserer Untersuchung in Kontrollfibroblasten (zytoplasmatischer pH-Wert  $\cong$  pH-Wert des Reaktionsgemisches, siehe Abb. 6) eine eindeutige Enzymaktivität bestimmen konnten, gehen wir davon aus, dass dieses Modell auch auf Fibroblasten übertragen werden kann. Bei den Patienten 7, 8 und 9 liegt demnach ein zweifacher Block vor. Einerseits kommt es zur Akkumulation von Cholesterin in den Lysosomen, also im ersten Kompartiment, andererseits

kann das de-novo-synthetisierte Cholesterin aus den Cholesterinestertröpfchen im zweiten Kompartiment nicht freigesetzt werden.

Dieses Ergebnis könnte dazu beitragen, die komplexe Pathophysiologie der NP-C-Erkrankung besser zu verstehen. Dazu muss aber eine größere Anzahl von NP-C-Fibroblasten untersucht werden, um die Manifestationshäufigkeit zu ermitteln und mögliche Korrelationen festzustellen. Im Hinblick auf die Fragestellung, ob der zytoplasmatische CEHase-Mangel und die intrazelluläre Cholesterintransportstörung durch dieselbe Mutation auf Chromosom 18 bzw. 14 bedingt sind, könnten molekulargenetische Untersuchungen bei NP-C-Patienten mit verminderter oder normaler zytoplasmatischer CEHase-Aktivität aufschlussreich sein. Ebenfalls interessant wäre die nähere Untersuchung der zytoplasmatischen CEHase in Fibroblasten.

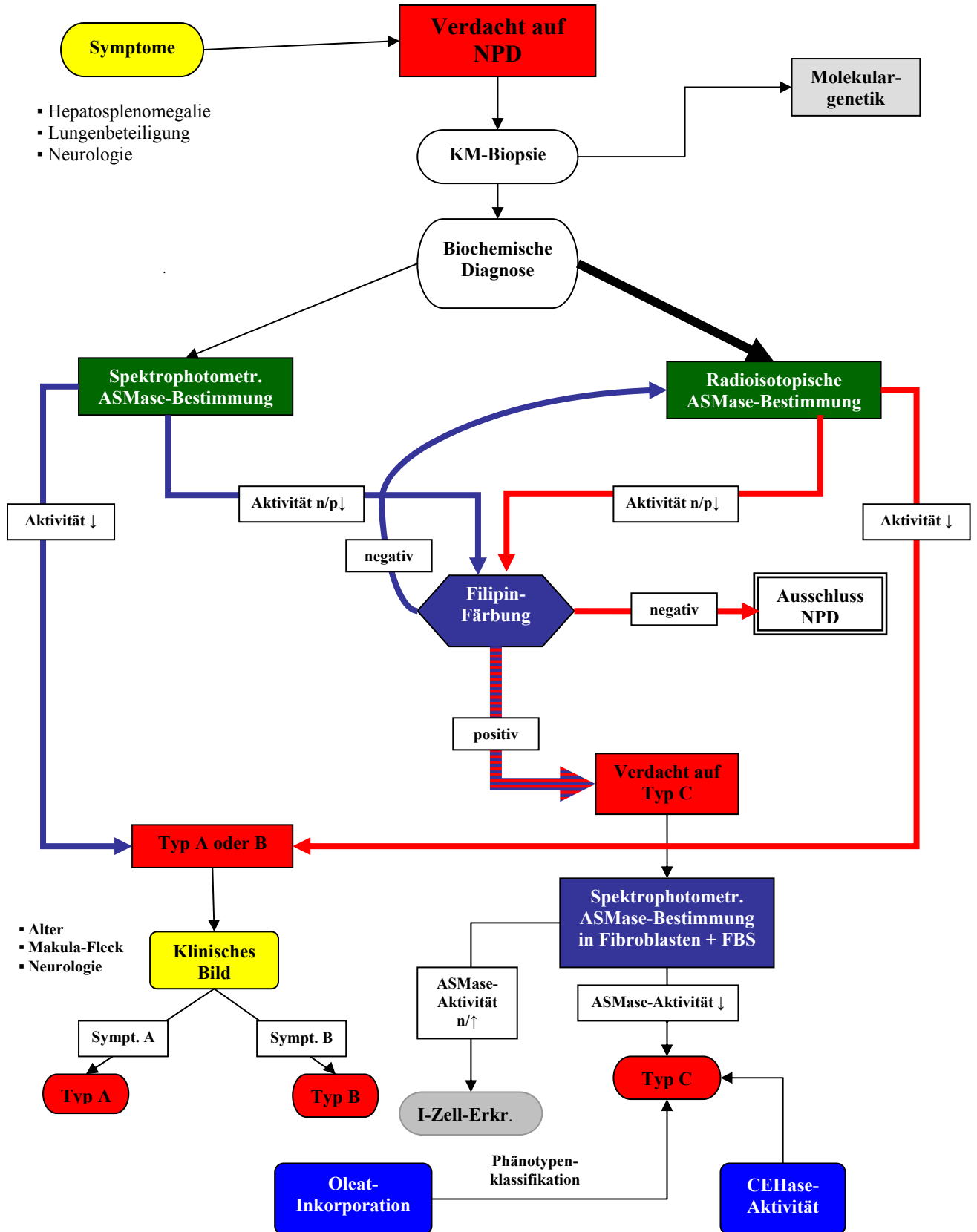
### **7.3. Darstellung der neu etablierten Methoden und der von uns entwickelten Methoden in der Diagnostik der NP-Erkrankungen**

In dem in Abbildung 20 dargestellten Flussdiagramm ist die diagnostische Vorgehensweise bei einem Niemann-Pick-Verdachtsfall in mehreren Schritten dargestellt. Die Knochenmarkbiopsie steht in der Diagnostik an erster Stelle. Bei eindeutiger Klinik ist sie eigentlich nicht notwendig. Jedoch wird auf eine Biopsie nicht verzichtet, da im Kindesalter Tumorerkrankungen viel häufiger vorkommen als seltene Stoffwechselerkrankungen.

Zur Bestimmung der ASMase-Aktivität wird die radioisotopische Methode empfohlen. Eine Typ-A- oder -B-Erkrankung kann allein durch spektrophotometrische ASMase-Aktivitätsbestimmung nicht sicher erfolgen. Zum Ausschluss bzw. zur Diagnose eines Typ C könnte jedoch auf radioisotopische Methoden, wie dem Schaubild zu entnehmen ist, komplett verzichtet werden. Durch die günstigeren Chemikalien und den Wegfall der Radioaktivität ergeben sich die unter 7.1.3. näher beschriebenen Vorteile. Eine Phänotypenklassifikation, falls erwünscht, ist mit der Oleat-Inkorporations Methode möglich.

Eine Bestimmung der zytoplasmatischen CEHase-Aktivität in NP-C-Fibroblasten sollte durchgeführt werden, um weitere Fälle mit diesem Enzymmangel aufzudecken.





**Abb. 20:** Flussdiagramm zum Nachweis einer NP-Erkrankung  
 n: normal; p: partiell; Erkr.: Erkrankung

## 8. ZUSAMMENFASSUNG

Das 1914 als erstes durch Albert Niemann beschriebene, später als Niemann-Pick-Erkrankung bezeichnete Krankheitsbild, wird zu den Sphingomyelolipidosen gerechnet und umfasst eine seltene heterogene Gruppe von autosomal rezessiv vererbten Erkrankungen. Beim Typ A und B handelt es sich um eine familiär gehäufte, insbesondere in der jüdischen Bevölkerung auftretende Erkrankung, die durch einen auf Chromosom 11 liegenden Gendefekt, der eine verminderte ASMase-Aktivität zur Folge hat, bedingt ist. Die ASMase katalysiert den Abbau des Sphingomyelins zu Ceramid und Phosphocholin. Bei einem Mangel dieses Enzyms ist die Speicherung von Sphingomyelin im mononukleären Makrophagensystem vor allem im ZNS, der Milz, Leber und im Knochenmark charakteristisch.

Beim Typ C und D dagegen liegt eine intrazelluläre Cholesterintransportstörung vor, die durch ein Fehlen des NPC1- bzw. NPC2-Proteins in den Endo- bzw. Lysosomen verursacht wird. Der Gendefekt, der zu einer NPC1-Erkrankung führt, ist auf Chromosom 18 lokalisiert. Da die ursächliche Störung des Typ D auch auf dem gleichen Chromosom liegt, handelt es sich beim Typ D um eine allelische Variante des NPC1. Der Gendefekt, der eine NPC2-Erkrankung bedingt, ist auf Chromosom 14 zu finden. Alle Subtypen sind durch die pathologische Anhäufung von Cholesterin und Sphingomyelin in den Lysosomen des ZNS, der Milz und der Leber, die in den meisten Fällen mit einer sekundär verminderten ASMase-Aktivität einhergeht, gekennzeichnet.

Bei der Untersuchung von Patienten-Gewebezellen mit Verdacht auf Morbus Niemann-Pick sind wir in mehreren Schritten vorgegangen. Im ersten Schritt bestimmten wir die ASMase-Aktivität. Dazu verbesserten wir die in unserem Labor schon mit dem künstlichen Substrat HNP durchgeführte Aktivitätsbestimmung und führten zusätzlich eine radioisotopische Methode mit  $^{14}\text{C}$ -Sphingomyelin als Substrat ein. Mit beiden Methoden wurden die kinetischen Eigenschaften des Enzyms und der Aktivitätsbereich in verschiedenen Geweben und Zellen erarbeitet. Ein Vergleich der so ermittelten Aktivitäten in Patientenfibroblasten zeigte bei einem Typ-B-Patienten radioisotopisch eine Restaktivität von weniger als 10 % und spektrophotometrisch eine im Normbereich liegende Aktivität. Obwohl beide Methoden einfach und schnell durchführbar sind, ist die radioisotopische Methode der spektrophotometrischen vorzuziehen, um das Auftreten falsch negativer Resultate zu vermeiden. Dies ist durch das bei bestimmten Mutationen entstehende defekte Enzymprotein mit höherer Substrataffinität zum künstlichen Substrat und damit falsch hoher Enzymaktivität zu erklären. Von den in fünf NP-C-Patientenfibroblasten bestimmten ASMase-Aktivitäten hatten vier eine partiell verminderte Aktivität.

Eine sichere Diagnose der fünf NPC-Verdachtsfälle wurde durch eine Reihe von Verfahren, die wir erstmals in unserem Labor etablieren konnten, ermöglicht. Zunächst erfolgte der Nachweis einer Cholesterin-Akkumulation in den Lysosomen durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit Filipin, einem Makrolid-Antibiotikum, das spezifisch  $3\beta$ -Hydroxysterole bindet. Bei einem positiven Färberergebnis bestimmten wir die in vitro ASMase-Aktivität. Dazu wurde durch Kultivierung der Fibroblasten in cholesterinentzogenem (LPDS = - FBS) bzw. reichem (+ FBS) Medium eine Cholesterin-Akkumulation simuliert. Mit dieser Methode ist aufgrund der charakteristischen sekundär verminderten ASMase-Aktivität in NP-C-Zellen nach Bebrütung in cholesterinreichem Medium eine sehr sensitive und spezifische Diagnose pathologischer Zellen möglich. Eine phänotypische Klassifikation der NP-C-Zellen erforderte die Durchführung der Oleat-Inkorporationsmethode. Es gelang uns drei Patienten mit klassischem und zwei mit einem varianten Phänotyp zu diagnostizieren. Als Letztes bestimmten wir die zytoplasmatische CEHase-Aktivität in NPD- und Kontrollfibroblasten im leicht alkalischen Bereich. Erstaunlicherweise lieferte diese Messung eine verminderte Aktivität in drei NP-C-Fibroblasten, die bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde. Es ist auch keine Erkrankung mit diesem Enzymmangel bekannt. Deshalb nehmen wir an, dass zusätzlich zu den Mutationen der NPC-Proteine bei manchen Patienten eine weitere Mutation entweder auf Chromosom 18 bzw. 14 oder in einem bisher noch nicht identifizierten Gen liegen muss.

Durch die Etablierung dieser empfindlichen Methoden zur Bestimmung der ASMase-Aktivität und zum Nachweis einer intrazellulären Cholesterintransportstörung war es uns möglich, erstmals in unserem Labor zehn Patienten mit Niemann-Pick Erkrankung, davon zwei Typ A, drei Typ B und fünf Typ C, mit großer Sicherheit zu diagnostizieren. Unsere Untersuchungsverfahren erwiesen sich als mit verhältnismäßig geringem Aufwand durchführbar und günstiger als die bisher durchgeführten Methoden. Zur Diagnosestellung reicht eine Hautbiopsie in den meisten Fällen aus, so dass den kleinen Patienten eine invasive Diagnostik erspart werden kann.

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Al-Essa, M. A., Ozand, P. T.: Atlas of common lysosomal and peroxisomal disorders, *King Fahd National Library, Riyadh, Saudi Arabia, 1999*
2. Argoff, C. E., Kaneseki, C. R., Blanchette-Mackie, E. J., Comly, M. E., Dwyer, N. K., Brown, A., Brady, R. O., Pentchev, P. G. (1990): Type C Niemann-Pick disease: documentation of abnormal processing in lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm. 171: 38-45*
3. Argoff, C. E., Comly, M. E., Blanchette-Mackie E. J., Kruth, H. S., Pye, H. T., Goldin, E., Kaneski, C., Vanier, M. T., Brady, R. O., Pentchev, P. G. (1991): Type C Niemann-Pick disease: cellular uncoupling of cholesterol homeostasis is linked to the severity of disruption in the intracellular transport of exogenously derived cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta 1096: 319-327*
4. Bauer, P., Knoblich, R., Bauer, C., Finckh, U., Hufen, A., Kropp, J., Braun, S., Kustermann-Kuhn, B., Schmidt, D., Harzer, K., Rolfs, A. (2002): NPC1: complete genomic sequence, mutation analysis, and characterization of haplotypes. *Hum. Mutat. 19: 30-38*
5. Beudet, A. L., Lipson, M. H., Ferry, G. D., Nichols, B. L. Jr. (1974): Acid lipase in cultured fibroblasts: cholesterol ester storage disease. *J. Lab. Clin. Med. 84: 54-61*
6. Besley, G. T. (1977): Sphingomyelinase defect in Niemann-Pick disease, type C, fibroblasts. *FEBS Lett. 80: 71-74*
7. Besley, G. T., Moss, S. E. (1983): Studies on sphingomyelinase and beta-glucosidase activities in Niemann-Pick disease variants. Phosphodiesterase activities measured with natural and artificial substrates. *Biochim. Biophys. Acta 752: 54-64*
8. Besley, G. T., Elleder, M. (1986): Enzyme activities and phospholipid storage patterns in brain and spleen samples from Niemann-Pick disease variants: a comparison of neuropathic and non-neuronopathic forms. *J. Inherit. Metab. Dis. 9: 59-71*
9. Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Amende, L. M., Kruth, H. S., Butler, J. D., Sokol, J., Comly, M. E., Vanier, M. T., August, J. T., Brady, R. O., Pentchev, P. G. (1988): Type C Niemann-Pick disease: low density lipoprotein uptake is associated with premature cholesterol accumulation in the Golgi complex and excessive cholesterol storage in lysosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8022-8026*
10. Brady, R. O. (1973): The abnormal biochemistry of inherited disorders of lipid metabolism. *Fed. Proc. 32: 1660-1667*
11. Brown, M. S., Dana, S. E., Goldstein, J. L. (1974): Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem. 249: 789-796*
12. Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1975): Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell 6: 307-316*
13. Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1979): Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3330-3337*
14. Brown, M. S., Ho, Y. K., Goldstein, J. L. (1980): The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J. Biol. Chem. 255: 9344-9352*
15. Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1985): The LDL receptor and HMG-CoA reductase- two membrane molecules that regulate cholesterol homeostasis. *Curr. Topics Cell. Reg. 26: 3-15*
16. Butler, J. D., Comly, M. E., Kruth, H. S., Vanier, M. T., Filling-Katz, M., Fink, J., Barton, N., Weintraub, H., Quirk, J. M., Tokoro, T., Marshall, D. C., Brady, R. O., Pentchev, P. G. (1987): Niemann-Pick variant disorders: comparison of errors of cellular cholesterol homeostasis in group D and C fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 556-560*

17. Callahan, J. W., Khalil, M. (1975): Sphingomyelinases in human tissues. III. Expression of Niemann-Pick disease in cultured skin fibroblasts. *Pediatr. Res.* 9: 914-918
18. Carstea, E. D., Morris, J. A., Coleman, D. G. et al. (1997): Niemann-Pick C 1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277: 228-231
19. Chapman, M. J. (1986): Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. *Methods. Enzymol.* 128: 70-143
20. Chatterjee, S., Ghosh, N. (1989): Neutral sphingomyelinase from human urine. Purification and preparation of monospecific antibodies. *J. Biol. Chem.* 264: 12554-12561
21. Chikh, K., Vey, S., Simonot, C., Vanier, M. T., Millat, G. (2004): Niemann-Pick type C disease: importance of N-glycosylation sites for function and cellular location of the NPC2 protein. *Mol. Genet. Metab.* 83: 220-230
22. Coleman, R. J., Robb, S. A., Lake, B. D., Brett, E. M., Harting, A. E. (1988): The diverse neurological features of Niemann-Pick disease type C: a report of two cases. *Mov. Disord.* 3: 295-299
23. Crocker, A. C., Farber, S. (1958): Niemann-Pick disease: a review of eighteen patients. *Medicine* 37: 1-98
24. Crocker, A. C. (1961): The cerebral defect in Tay-Sachs disease and Niemann-Pick disease. *J. Neurochem.* 7: 69-80
25. Dacremont, G., Kint, J. A., Carton, D., Cocquyt, G. (1974): Glucosylceramide in plasma of patient with Niemann-Pick disease. *Clin. Chim. Acta* 52: 365-367
26. Dawson, G. (1972): Glycosphingolipid levels in an unusual neurovisceral storage disease characterized by lactosylceramide galactosylhydrolase deficiency: lactosylceramidosis. *J. Lipid. Res.* 13: 207-219
27. de Winter, J. M., Janse, H. C., van Diggelen, O. P., Los, F. J., Beemer, F. A., Kleijer, W. J. (1992): Prenatal diagnosis of Niemann-Pick disease type C. *Clin. Chim. Acta* 208: 173
28. Druzhinina, K. V., Kritsman, M. G. (1952): Lecithinase C from animal tissue. *Biokhimiia* 17: 77-81
29. Elleder, M., Jirasek, A. (1983): International symposium on Niemann-Pick disease. *Eur. J. Pediatr.* 140: 90-91
30. Elleder, M., Jirásek, A., Smid, F., Ledvinova, J., Besley, G. T. N., Stopekova, M. (1984): Niemann-Pick disease type C with enhanced glycolipid storage. Report on further case of so-called lactosylceramidosis. *Virchows. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 402: 307-317
31. Epstein, C. J., Brady, R. O., Schneider, E. L., Bradley, R. M., Shapiro, D. (1971): In utero diagnosis of Niemann-Pick disease. *Am. J. Hum. Genet.* 23: 533-535
32. Fensom, A. H., Grant, A. R., Steinberg, S. J., Ward, C. P., Lake, B. D., Logan, E. C., Hulman, G. (1999): An adult with a non-neuronopathic form of Niemann-Pick C disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 22: 84-86
33. Ferlinz, K., Hurwitz, R., Sandhoff, K. (1991): Molecular basis of acid sphingomyelinase deficiency in a patient with Niemann-Pick disease type A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 1187-1191
34. Fink, J. K., Filling-Katz, M. R., Sokol, J., Cogan, D. G., Pikus, A., Sonies, B., Soong, B., Pentchev, P. G., Comly, M. E., Brady, R. O. et al. (1989): Clinical spectrum of Niemann-Pick disease type C. *Neurology* 39: 1040-1049
35. Fredrickson, D. S., Sloan, H. R.: Sphingomyelin lipidosis: Niemann-Pick disease, in Stanbury, J. B., Wyngarden, J. B., Fredrickson, D. S. (eds.): *The metabolic Basis of inherited Disease*, 3d ed. New York, Mc Graw-Hill, 1972, p. 783
36. Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509

37. Fukuda, M., Tanaka, A., Isshiki, G. (1990): Variation of lysosomal enzyme activity with gestational age in chorionic villi. *J. Inher. Metab. Dis.* 13: 862-866
38. Gal, A. E., Brady, R. O., Hibbert, S. R., Pentchev, P. G. (1975): Apractical chromogenic procedure for the detection of homozygotes and heterozygous carriers of Niemann-Pick disease. *N. Engl. J. Med.* 293: 632-636
39. Gal, A. E., Brady, R. O., Barranger, J. A., Pentchev, P. G. (1980): The diagnosis of type A and type B Niemann-Pick disease and detection of carriers using leukocytes and a chromogenic analogue of sphingomyelin. *Clin. Chim. Acta* 104: 129-132
40. Gatt, S., Dinur, T., Kopolovic, J. (1978): Niemann-Pick disease: presence of the magnesium-dependent sphingomyelinase in brain of the infantile form of the disease. *J. Neurochem.* 31: 547-550
41. Gilbert, E. F., Callahan, J., Viseskul, C., Opitz, J. M. (1981): Niemann-Pick disease type C. Pathological, histochemical, ultrastructural and biochemical studies. *Eur. J. Pediatr.* 136: 263-274
42. Golde, D. W., Schneider, E. L., Bainton, D. F., Pentchev, P. G., Brady, R. O., Epstein, C. J., Cline, M. J. (1975): Pathogenesis of one variant of sea blue histiocytosis. *Lab. Invest.* 33: 371-378
43. Goldstein, J. L., Dana, S. E., Brown, M. S. (1974): Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 4288-4292
44. Goldstein, J. L., Dana, S. E., Faust, J. R., Beaudet, A. L., Brown, M. S. (1975): Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein: observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J. Biol. Chem.* 250: 8487-8495
45. Goldstein, J. L., Basu, S. K., Brown, M. S. (1983): Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol.* 98: 241-260
46. Greer, W. L., Riddell, D. C., Byers, D. M., Welch, J. P., Girouard, G. S., Sparrow, S. M., Gillan, T. L., Neumann, P. E. (1997): Linkage of Niemann-Pick disease type D to the same region of human chromosome 18 as Niemann-Pick disease type C. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 139-142
47. Greer, W. L., Riddell, D. C., Gillan, T. L., Girouard, G. S., Sparrow, S. M., Byers, D. M., Dobson, M. J., Neumann, P. E. (1998): The Nova Scotia type D form of Niemann-Pick disease is caused by a G 3097 T transversion in NPC1. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 52-54
48. Greer, W. L., Dobson, M. J., Girouard, G. S., Byers, D. M., Riddell, D. C., Neumann, P. E. (1999): Mutations in NPC1 highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1252-1260
49. Grover, W. D., Naiman, J. L. (1971): Progressive paresis of vertical gaze in lipid storage disease. *Neurology* 21: 896-899
50. Grunebaum, M. (1976): The roentgenographic findings in the acute neuronopathic form of Niemann-Pick disease. *Br. J. Radiol.* 49: 1018
51. Harzer, K., Anzil, A. P., Schuster, I. (1977): Resolution of tissue sphingomyelinase isoelectric profile in multiple components is extraction-dependent: evidence for a component defect in Niemann-Pick disease type C is spurious. *J. Neurochem.* 29, 1155-1157
52. Harzer, K., Schlote, W., Pfeiffer, J., Benz, H. U., Anzil, A. P. (1978): Neurovisceral lipodosis compatible with Niemann-Pick disease type C: morphological and biochemical studies of a late infantile case and enzyme and lipid assays in a prenatal case of the same family. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 43: 97-104
53. Harzer, K., Rolfs, A., Bauer, P., Zschesche, M., Mengel, E., Backes, J., Kustermann-Kuhn, B., Bruchelt, G., van Diggelen, O. P., Mayrhofer, H., Krageloh-Mann, I. (2003): Niemann-Pick disease type A and B are clinically but also enzymatically heterogenous: pitfall in the laboratory diagnosis of sphingomyelinase deficiency associated with the mutation Q292K. *Neuropediatrics.* 34: 301-306
54. Heller, M., Shapiro, B. (1966): Enzymic hydrolysis of sphingomyelin by rat liver. *Biochem. J.* 98: 763-769

55. Higami, S., Omura, K., Nishizawa, K., Yamashita, T., Tada, K. (1978): Prenatal diagnosis and fetal pathology of Niemann-Pick disease. *Tohoku J. exp. Med.* 125: 11-17
56. Higgins, M. E., Davies, J. P., Chen, F. W., Ioannou, Y. A. (1999): Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Mol. Genet. Metab.* 68: 1-13
57. Ho Y. K., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1980): Hydrolysis and excretion of cytoplasmic cholesteryl esters by macrophages: stimulation by high density lipoprotein and other agents. *J. Lipid Res.* 21: 391-398
58. Hoeg, J. M., Demosky, S. J. Jr., Brewer, H. B. (1982): Characterization of neutral and acid ester hydrolase in Wolman's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 711: 59-65
59. Horn, L. et al.: *Biochemie des Menschen*. 1. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, New-York, 2002
60. Howes, E. L. Jr., Wood, I. S., Golbus, M., Hogan, M. L. (1975): Ocular pathology of infantile Niemann-Pick disease. Study of fetus of 23 weeks' gestation. *Arch. Ophthalmol.* 93: 494-500
61. Imrie, J., Wraith, J. E. (2001): Isolated splenomegaly as the presenting feature of Niemann-Pick disease type C. *Arch. Dis. Child.* 84: 427-429
62. Imrie, J., Vijayaraghaven, S., Whitehouse, C., Harris, S., Heptinstall, L., Church, H., Cooper, A., Besley, G. T. N., Wraith, J. E. (2002): Niemann-Pick disease type C in adults. *J. Inherit. Metab. Dis.* 25: 491-500
63. Ivemark, B. I., Svennerholm, L., Thoren, C., Tunnel, R. (1963): Niemann-Pick disease in infancy. Report of two siblings with clinical, histologic and chemical studies. *Acta. Paediatr.* 52: 391-404
64. Jan, M. M., Camfield, P. R. (1998): Nova Scotia Niemann-Pick disease type D: clinical study of 20 cases. *J. Child. Neurol.* 13: 75-78
65. Kaminski, W. E., Klünemann, H. H., Ibach, B., Aslanidis, C., Klein, H. E., Schmitz, G. (2002): Identification of novel mutations in the NPC1 gene in German patients with Niemann-Pick C disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 25: 385-389
66. Kampine, J. P., Brady, R. O., Kanfer, J. N., Shapiro, D. (1967): Diagnosis of Gaucher's disease and Niemann-Pick disease with small samples of venous blood. *Science* 155: 86-88
67. Kamoshita, S., Aron, A. M., Suzuki, K., Suzuki, K. (1969): Infantile Niemann-Pick disease. A chemical study with isolation and characterization of membranous cytoplasmic bodies and myelin. *Am. J. Dis. Child.* 117: 379-394
68. Kandt, R. S., Emerson, R. G., Singer, H. S., Valle, D. L., Moser, H. W. (1982): Cataplexy in variant forms of Niemann-Pick disease. *Ann. Neurol.* 12: 284-288
69. Kannan, R., Tjong, H. B., Debuch, H., Wiedemann, H. R. (1974): Unusual glycolipids in brain cortex of a visceral lipidosis (Niemann-Pick disease?). *Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem.* 355: 551-556
70. Karpati, G., Carpenter, S., Wolfe, L. S., Andermann, F. (1977): Juvenile dystonic lipidosis: an unusual form of neurovisceral storage disease. *Neurology* 27: 32-42
71. Kelly, D. A., Portmann, B., Mowat, A. P., Sherlock, S., Lake, B. D. (1993): Niemann-Pick disease type C: diagnosis and outcome in children, with particular reference to liver disease. *J. Pediatr.* 123: 242-247
72. Kruth, H. S., Comly, M. E., Butler, J. D., Vanier, M. T., Fink, J. K., Wenger, D. A., Patel, S., Pentchev, P. G. (1986): Type C Niemann-Pick disease: abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261: 16769-16774
73. Kudoh, T., Velkoff, M. A., Wenger, D. A. (1983): Uptake and metabolism of radioactively labeled sphingomyelin in cultured skin fibroblasts from control and patients with Niemann-Pick disease and other lysosomal storage diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 754: 82-92

74. Landrieu, P., Said, G. (1984): Peripheral neuropathy in type A Niemann-Pick disease: a morphological study. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 63: 66-71
75. Lever, A. M. L., Ryder, J. B. (1983): Cor pulmonale in an adult secondary to Niemann-Pick disease. *Thorax* 38: 873-874
76. Levran, O., Desnick, R. J., Schuchman, E. H. (1991): Niemann-Pick disease: a frequent missense mutation in the acid sphingomyelinase gene of Ashkenazi Jewish type A and B patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3748-3752
77. Levran, O., Desnick, R. J., Schuchman, E. H. (1991): Niemann-Pick type B disease. Identification of a single codon deletion in the acid sphingomyelinase gene and genotype/phenotype correlations in type A and B patients. *J. Clin. Invest.* 88: 806-810
78. Levran, O., Desnick, R. J., Schuchman, E. H. (1992): A common missense mutation (L302P) in Ashkenazi Jewish type A Niemann-Pick disease patients. Transient expression studies demonstrate the causative nature of the two common Ashkenazi Jewish Niemann-Pick disease mutations. *Blood* 80: 2081-2087
79. Levran, O., Desnick, R. J., Schuchman, E. H. (1993): Type A Niemann-Pick disease: a frame-shift mutation in the acid sphingomyelinase gene (fsP330) occurs in Ashkenazi Jewish patients. *Hum. Mutat.* 2: 317-319
80. Levran, O., Desnick, R. J., Schuchman, E. H. (1993): Identification of a 3' acceptor splice site mutation (g2610c) in the acid sphingomyelinase gene of patients with Niemann-Pick disease. *Hum. Mol. Genet.* 2: 205-206
81. Libert, J., Toussant, D., Guiselings, R. (1975): Ocular finding in Niemann-Pick disease. *Am. J. Ophthalmol.* 80: 991-1002
82. Lindl, T.: Zell- und Gewebekultur. 4. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin* 2000
83. Lipson, M. H., O'Donnell, J., Callahan, J. W., Wenger, D. A., Packmann, S. (1986): Ocular involvement in Niemann-Pick disease type B. *J. Pediatr.* 108: 582-584
84. Liscum, L., Faust, J. R. (1987): Low density lipoprotein (LDL)-mediated suppression of cholesterol synthesis and LDL uptake is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 262: 17002-17008
85. Liscum, L., Ruggiero, R. M., Faust, J. R. (1989): The intracellular transport of low density lipoprotein derived cholesterol is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 108: 1625-1636
86. Liscum, L., Klausek, J. J. (1998): Niemann-Pick disease type C. *Curr. Opin. Lipidol.* 9: 131-135
87. Liscum, L. (2000): Niemann-Pick type C mutations cause lipid traffic jam. *Traffic* 1: 218-225
88. Liscum, L., Sturley, S. L. (2004): Intracellular trafficking of Niemann-Pick C proteins 1 and 2: obligate components of subcellular lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1685: 22-27
89. Löffler, G.: Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 3. Auflage, *Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York* 1998
90. Longstreth, W. T. Jr., Daven, J. R., Farrell, D. F., Bolen, J. W., Bird, T. D. (1982): Adult dystonic lipidosis: clinical, histologic, and biochemical findings of a neurovisceral storage disease. *Neurology* 32: 1295-1299
91. Lossos, A., Schlesinger, I., Okon, E., Abramsky, O., Bargal, R., Vanier, M. T., Zeigler, M. (1997): Adult-onset Niemann-Pick type C disease. Clinical, biochemical, and genetic study. *Arch. Neurol.* 54: 1536-1541
92. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
93. Maconochie, I. K., Chong, S., Mieli-Vergani, G., Lake, B.D., Mowat, A.P. (1989): Fetal ascites: an unusual presentation of Niemann-Pick disease type C. *Arch. Dis. Child.* 64: 1391-1393



94. Martin, J. J., Lowenthal, A., Ceuterick, C., Vanier, M. T. (1984): Juvenile dystonic lipidosis (variant of Niemann-Pick disease type C). *J. Neurol. Sci.* 66: 33-45
95. Maruyama, E. N., Arima, M. (1989): Purification and characterization of neutral and acid sphingomyelinases from rat brain. *J. Neurochem.* 52: 611-618
96. Maziere, J. C., Maziere, C., Hosli, P. (1978): An ultramicrochemical assay for shingomyelinase: rapid prenatal diagnosis of a fetus at risk for Niemann-Pick disease. *Monogr. Hum. Genet.* 9: 198-201
97. Maziere, J. C., Maziere, C., Mora, L., Routier, J. D., Polonovski, J. (1982): In situ degradation of sphingomyelin by cultured normal fibroblasts and fibroblasts from patients with Niemann-Pick disease type A and C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108: 1101-1106
98. Meiner, V., Shpitzen, S., Mandel, H., Klar, A., Ben-Neriah, Z., Zlotogora, J., Sagi, M., Lassos, A., Bargal, R., Sury, V., Carmi, R., Leitersdorf, E., Zeigler, M. (2001): Clinical-biochemical correlation in molecularly characterized patients with Niemann-Pick type C. *Genet. Med.* 3: 343-348
99. Millat, G., Marçais, C., Rafi, M. A., Yamamoto, T., Morris, J. A., Pentchev, P. G., Ohno, K., Wenger, D. A., Vanier, M. T. (1999): Niemann-Pick C1 disease: the I 1061 T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1321-1329
100. Millat, G., Marçais, C., Tomasetto, C., Chikh, K., Fensom, A. H., Harzer, K., Wenger, D. A., Ohno, K., Vanier, M. T. (2001): Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and the cysteine-rich luminal loop. *Am. J. Hum. Genet.* 68:1373-1385
101. Millat, G., Chikh, K., Naureckiene, S., Sleat, D. E., Fensom, A. H., Higaki, K., Elleder, M., Lobel, P., Vanier, M. T. (2001): Niemann-Pick disease type C: spectrum of HE1 mutations and genotype/phenotype correlations in the NPC2 group. *Am. J. Hum. Genet.* 69: 1013-1021
102. Minami, R., Matsuura, Y., Nakamura, F., Kudoh, T., Sogawa, H., Oyanagi, K., Orii, T., Maruyama, K., Nakao, T. (1979): Sphingomyelinase activities in cultured skin fibroblasts from patients with Niemann-Pick disease. *Hum. Genet.* 47: 159-167
103. Morris, J. A., Zhang, D., Coleman, K. G., Nagle, J., Pentchev, P. G., Carstea, E. D. (1999): The genomic organization and polymorphism analysis of the human Niemann-Pick C1 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 493-498
104. Mukherjee, S., Maxfield, F. R. (2004): Lipid and cholesterol trafficking in NPC. *Biochim. Biophys. Acta* 1685: 28-37
105. Naureckiene, S., Sleat, D. E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M. T., Wattiaux R., Jadot, M., Lobel, P. (2000): Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick disease. *Science* 290: 2298-2301
106. Nelson, D., Cox, M.: *Lehninger Biochemie*. 3. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York 2001
107. Neufeld, E. B., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A. M., Dwyer, N. R., Roff, C. F., Ohno, K., Morris, J. A., Carstea, E. D., Incardona, J. P., Strauss, J. F. 3<sup>rd</sup>, Vanier, M. T., Patterson, M. C., Brady, R. O., Pentchev, P. G., Blanchette-Mackie, E. J. (1999): The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of lysosomal cargo. *J. Biol. Chem.* 274: 9627-9635
108. Neville, B. G., Lake, B. D., Stephens, R., Sanders, M. D. (1973): A neurovisceral storage disease with vertical supranuclear ophthalmoplegia, and its relationship to Niemann-Pick disease. A report of nine patients. *Brain* 96: 97-120
109. Niemann, A. (1914): Ein unbekanntes Krankheitsbild. *Jahrb. Kinderheilkd.* 79: 1-10
110. Norman, A. W., Demel, R. A., Kruff, B. de, Deenen, L. L. M. van. (1972): Studies on the biological properties of polyene antibiotics: evidence for the direct interaction of filipin with cholesterol. *J. Biol. Chem.* 247: 1918-1929

111. Ohno, K., Nanba, T., Nakano, T., Inui, K., Okada, S., Takeshita, K. (1993): Altered sensitivities to potential inhibitors of cholesterol biosynthesis in Niemann-Pick type C fibroblasts. *Cell. Struct. Funct.* 18: 231-240
112. Okamura, N., Kiuchi, S., Tamba, M., Kashima, T., Hiramoto, S., Baba, T., Dacheux, F., Dacheux, J. L., Sugita, Y., Jin, Y. Z. (1999): A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis, HE1, specifically binds cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 1438: 377-387
113. Ory, D. S. (2004): The Niemann-Pick disease genes regulators of cellular cholesterol homeostasis. *Trends Cardiovasc. Med.* 14: 66-72
114. Patrick, A. D., Young, E., Kleijer, W. J., Niermeijer, M. F. (1977): Prenatal diagnosis of Niemann-Pick disease type A using chromogenic substrate. *Lancet* 2: 144.
115. Patterson, M. C., Di Bisceglie, A. M., Higgins, J. J., Abel, R. B., Schiffmann, R., Parker, C. C., Argoff, C. E., Grewal, R. P., Yu, K., Pentchev, P. G., Brady, R. O., Barton, N. W. (1993): The effect of cholesterol-lowering agents on hepatic and plasma cholesterol in Niemann-Pick disease type C. *Neurology* 43: 61-64
116. Patterson, M. C., Vanier, M. T., Suzuki, K., Patterson, M. C. (2001): Niemann-Pick disease Type C: a lipid trafficking disorder. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease (8<sup>th</sup> edn)*, Scriver C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., et al. (eds.). McGraw-Hill: New York; 3611-3634
117. Pentchev, P. G., Boothe, A. D., Kruth, H. S., Weintraub, H., Stivers, J., Brady, R. O. (1984): A genetic storage disorder in BALB/c mice with a metabolic block in esterification of exogenous cholesterol. *J. Biol. Chem.* 259: 5784-5791
118. Pentchev, P. G., Kruth, H. S., Comly, M. E., Butler, J. D., Vanier, M. T., Wenger, D. A., Patel, S. (1986): Type C Niemann-Pick disease. A parallel loss of regulatory responses in both the uptake and esterification of low density lipoprotein-derived cholesterol in cultured fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261: 16775-16780
119. Pentchev, P. G., Comly, M. E., Kruth, H. S., Tokoro, T., Butler, J., Sokol, J., Filling Katz, M., Quirk, J. M., Marshall, D. C., Patel, S., Vanier, M. T., Brady, R. O. (1987): Group C Niemann-Pick disease: faulty regulation of low density lipoprotein uptake and cholesterol storage in cultured fibroblasts. *FASEB J.* 1: 40-45
120. Pentchev, P. G., Vanier, M. T., Suzuki, K., Patterson, M. C.: Niemann-Pick disease type C: a cellular cholesterol lipidosis, in Scriver, C. R., et al., *The metabolic and Molecular Bases of inherited diseases*, McGraw-Hill, New York, 1995, pp. 2625-2639
121. Philippart, M., Martin, L., Martin, J. J., Menkes, J. H. (1969): Niemann-Pick disease. Morphologic and biochemical studies in the visceral form with late central nervous system involvement (Crocker's group C). *Arch. Neurol.* 20: 227-238
122. Philippart, M.: Glycolipid, mucopolysaccharide and carbohydrate distribution in tissues, plasma and urine from glycolipidoses and other disorders, in Zambotti, V., Tettamanti, G., Arrigoni, M. (eds): *Glycolipids, Glycoproteins and Mucopolysaccharides of the Nervous System*. New York, Plenum, 1972, p 231
123. Pick, L. (1926): Der Morbus Gaucher und die ihm ähnlichen Erkrankungen (die lipoidzellige Splenohepatomegalie Typus Niemann und die diabetische Lipoidzellenhypoplasie der Milz). *Ergeb. Inn. Med. Kinderheilkd.* 29: 519-627
124. Pick, L. (1927): Über die lipoidzellige Splenohepatomegalie Typus Niemann-Pick als Stoffwechselerkrankung. *Med. Klin.* 23: 1483-1488
125. Pick, L. (1933): II. Niemann-Pick's disease and other forms of so called xanthomas. *Am. J. Med. Sci.* 185: 601-616
126. Pin, I., Pradines, S., Pincemaille, O., Frappat, P., Brambilla, E., Vanier, M. T., Bost, M. (1990): Forme respiratoire mortelle de maladie de Niemann-Pick type C. *Arch. Fr. Pediatr.* 47: 373-375
127. Poulos, A., Shankaran, P., Jones, C. S., Callahan, J. W. (1983): Enzymatic hydrolysis of sphingomyelin liposomes by normal tissues and tissues from patients with Niemann-Pick disease. *Biochim. Biophys. Acta* 751: 428-431

128. Quintern, L. E., Weitz, G., Nehr Korn, H., Tager, J. M., Schram, A. W., Sandhoff, K. (1987): Acid sphingomyelinase from human urine: purification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 922: 323-336
129. Rao, B. G., Spence, M. W. (1976): Sphingomyelinase activity at pH 7.4 in human brain and a comparison to activity at pH 5.0. *J. Lipid. Res.* 17: 506-515
130. Rao, B. G., Spence, M. W. (1977): Niemann-Pick disease type D: lipid analyses and studies on sphingomyelinases. *Ann. Neurol.* 1: 385-392
131. Ribeiro, I., Marcão, A., Amaral, O., Sa Miranda, M. C., Vanier, M. T., Millat, G. (2001): Niemann-Pick type C disease: NPC 1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Hum. Genet.* 109: 24-32
132. Riddle, M. C., Smuckler, E. A., Glomset, J. A. (1975): Cholesteryl ester hydrolytic activity of rat liver plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 388: 339-348
133. Riddle, M. C., Fujimoto, W., Ross, R. (1977): Two cholesterol ester hydrolases. Distribution in rat tissues and in cultured human fibroblasts and monkey arterial smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta* 488: 359-369
134. Robb, R. M., Kuwabara, T. (1973): The ocular pathology of type A Niemann-Pick disease. A light and electron microscopy study. *Invest. Ophthalmol.* 12: 366-377
135. Roitman, A., Gatt, S. (1963): Isolation of phospholipase C from rat brain. *Isr. J. Chem.* 1: 190.
136. Rottach, K. G., von Maydell, R. D., Das, V. E., Zivotofsky, A. Z., Discenna, A. O., Gordon, J. L., Landis, D. M., Leigh, R. J. (1997): Evidence for independent feedback control of horizontal and vertical saccades from Niemann-Pick type C disease. *Vision. Res.* 37: 3627-3638
137. Schettler, G., Kahlke, W.: Niemann-Pick disease, in Schettler G. (ed.): *Lipids and Lipidosis*. New York, Springer-Verlag, 1967
138. Schiffmann, R. (1996): Niemann-Pick disease type C. From bench to bedside. *JAMA* 276: 561-564
139. Schneider, P. B., Kennedy, E. P. (1967): Sphingomyelinase in normal human spleens and in spleens from subjects with Niemann-Pick disease. *J. Lipid. Res.* 8: 202-209
140. Schroeder, C. P., Holland, J. F., Bieber, L. L. (1972): Fluorometric investigations of the interaction of polyene antibiotics with sterols. *Biochemistry* 11: 3105-3111
141. Shulman, L. M., David, N. J., Weiner, W. J. (1995): Psychosis as the initial manifestation of adult-onset Niemann-Pick disease type C. *Neurology* 45: 1739-1743
142. Schuchman, E. H., Desnick, R. J. (2001): Type A and B Niemann-Pick disease: deficiencies of acid sphingomyelinase activity. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease (8<sup>th</sup> edn)*, Scriver C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., et al. (eds.). McGraw-Hill: New York; 3589-3610
143. Sloan, H. R., Uhlendorf, B. W., Kanfer, J. N., Brady, R. O., Fredrickson, D. S. (1969): Deficiency of sphingomyelin-cleaving enzyme activity in tissue cultures derived from patients with Niemann-Pick disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34: 582-588
144. Sogawa, H., Horino, K., Nakamura, F., Kudoh, T., Oyanagi, K., Yamanou-Chi, T., Minami, R., Nakoa, T., Watanabe, A., Matsuura, Y. (1978): Chronic Niemann-Pick disease with sphingomyelinase deficiency in two brothers with mental retardation. *J. Pediatr.* 128: 235-240
145. Sokol, J., Blanchette-Mackie, J., Kruth, H. S., Dwyer, N. K., Amende, L. M., Butler, J. D., Robinson, E., Patel, S., Brady, R. O., Comly, M. E., Vanier, M. T., Pentchev, P. G. (1988): Type C Niemann-Pick disease. Lysosomal accumulation and defective intracellular mobilization of low density lipoprotein cholesterol. *J. Biol. Chem.* 263: 3411-3417

146. Spence, M. W., Wakkary, J., Clarke, J. T., Cook, H. W. (1982): Localization of neutral magnesium-stimulated sphingomyelinase in plasma membrane of cultured neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 719: 162-164
147. Spence, M. W., Callahan, J. W. Sphingomyelin-cholesterol lipidoses: the Niemann-Pick group of diseases. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, V. S., Valle, D. (eds.) *The metabolic basis of inherited disease*, 6<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, New York, 1989, pp. 1655-1676
148. Spence, M. W., Byers, D. M., Palmer, F. B., Cook, H. W. (1989): A new Zn<sup>2+</sup>-stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum. *J. Biol. Chem.* 264: 5358-5363
149. Sun, X., Marks, D. L., Park, W. D., Wheatley, C. L., Puri, V., O'Brien, J. F., Kraft, D. L., Lundquist, P. A., Patterson, M. C., Pagano, R. E., Snow, K. (2001): Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 1361-1372
150. Takada, G., Satoh, W., Komatsu, K., Konn, Y., Miura, Y., Uesaka, Y. (1987): Transitory type of sphingomyelinase deficient Niemann-Pick disease: clinical and morphological studies and follow-up of two sisters. *Tohoku J. exp. Med.* 153: 27-36
151. Takahashi, T., Desnick, R. J., Takada, G., Schuchman, E. H. (1992): Identification of a missense mutation (S436R) in the acid sphingomyelinase gene from a Japanese patient with type B Niemann-Pick disease. *Hum. Mutat.* 1: 70-71
152. Takahashi, T., Suchi, M., Desnick, R. J., Takada, G., Schuchman, E. H. (1992): Identification and expression of five mutations in the human acid sphingomyelinase gene causing types A and B Niemann-Pick disease. Molecular evidence for genetic heterogeneity in the neuronopathic and non-neuronopathic forms. *J. Biol. Chem.* 267: 12552-12558
153. Tarugi, P., Ballarini, G., Bembi, B., Battisti, C., Palmeri, S., Panzani, F., Di Leo, E., Martini, C., Federico, A., Calandra, S. (2002): Niemann-Pick type C disease: mutations of NPC1 gene and evidence of abnormal expression of some mutant alleles in fibroblasts. *J. Lipid. Res.* 43: 1908-1919
154. Tassoni, J. P., Fawak, K. A., Johnson, D. E. (1991): Cirrhosis and portal hypertension in a patient with adult Niemann-Pick disease. *Gastroenterology* 100: 567-569
155. Thannhauser, S. J., Reichel, M. (1940): Studies on animal lipids. XVI. The occurrence of sphingomyelin as a mixture of sphingomyelin fatty acid ester and free sphingomyelin, demonstrated by enzymatic hydrolysis and mild saponification. *J. Biol. Chem.* 135: 1-13
156. Thomas, G. H., Tuck-Muller, C.M., Miller, C. S., Reynolds, L. W. (1989): Correction of sphingomyelinase deficiency in Niemann-Pick type C fibroblasts by removal of lipoprotein fraction from cell culture media. *J. Inherit. Metab. Dis.* 12: 139-151
157. van de Vlasakker, C. J., Gabreels, F. J., Wijburg, H. C., Wevers, R. A. (1994): Clinical features of Niemann-Pick disease type C. An example of the delayed onset, slowly progressive phenotype and an overview of recent literature. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 96: 119-123
158. Vanier, M. T., Revol, A., Fichet, M. (1980): Sphingomyelinase activities in various human tissues in control subjects and in Niemann-Pick disease. Development and evaluation of a microprocedure. *Clin. Chim. Acta* 106: 257-267
159. Vanier, M. T. (1983): Biochemical studies in Niemann-Pick disease. I. Major sphingolipids of liver and spleen. *Biochim. Biophys. Acta* 750: 178-184
160. Vanier, M. T., Boue, J., Dumez, Y. (1985): Niemann-Pick disease type B: first-trimester prenatal diagnosis on chorionic villi and biochemical study of a foetus at 12 weeks of development. *Clin. Genet.* 28: 348-354
161. Vanier, M. T., Rousson, R., Garcia, I., Bailloud, G., Juge, M. C., Revol, A., Louisot, P. (1985): Biochemical studies in Niemann-Pick disease. III. In vitro and in vivo assays of sphingomyelin degradation in cultured skin fibroblasts and amniotic fluid cells for the diagnosis of the various forms of the disease. *Clin. Genet.* 27: 20-32

162. Vanier, M. T., Rousson, R., Zeitouni, R., Pentchev, P. G., Louisot, P.: Sphingomyelinase and Niemann-Pick disease, in Freysz, L., Deyfus, H., Massarelli, R., Gatt, S. (eds): *Enzymes of Lipid metabolism II. New York, Plenum, 1986, p 791*
163. Vanier, M. T., Pentchev, P. G., Rousson, R.: Pathophysiological approach of Niemann-Pick disease type C: definition of a biochemical heterogeneity and reevaluation of the lipid storage process. In: Salvayre, R., Douste-Blazy, L., Gatt, S. (eds.): *Lipid Storage Disorders: Biological and Medical Aspects. Plenum Press, New York, 1988, pp. 175-185*
164. Vanier, M. T., Wenger, D. A., Comly, M. E., Rousson, R., Brady, R. O., Pentchev, P. G. (1988): Niemann-Pick disease group C: clinical variability and diagnosis based on defective cholesterol esterification. A collaborative study on 70 patients. *Clin. Genet. 33: 331-348*
165. Vanier, M. T., Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Duthel, S., Harzer, K., Pentchev, P. G., Revol, A., Louisot, P. (1991): Type C Niemann-Pick disease: biochemical aspects and phenotypic heterogeneity. *Dev. Neurosci. 13: 307-314*
166. Vanier, M. T., Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Gazzah, N., Juge, M. C., Pentchev, P. G., Revol, A., Louisot, P. (1991): Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochim. Biophys. Acta 1096: 328-337*
167. Vanier, M. T., Pentchev, P., Roudriguez-Lafrasse, C., Rousson, R. (1991): Niemann-Pick disease type C: an update. *J. Inherit. Metab. Dis. 14: 580-595*
168. Vanier, M. T., Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Mandon, G., Boué, J., Choiset, A., Peyrat, M. F., Dumontel, C., Juge, M.-C., Pentchev, P. G., Revol, A., Louisot, P. (1992): Prenatal diagnosis of Niemann-Pick type C disease: current strategy from an experience of 37 pregnancies at risk. *Am. J. Hum. Genet. 51: 111-122*
169. Vanier, M. T., Ferlinz, K., Rousson, R., Duthel, S., Louisot, P., Sandhoff, K., Suzuki, K. (1993): Deletion of arginine (608) in acid sphingomyelinase is the prevalent mutation among Niemann-Pick disease type B patients from northern Africa. *Hum. Genet. 92: 325-330*
170. Vanier, M. T., Suzuki, K.: Niemann-Pick diseases. In: *Neurodystrophies and neurolipidosis. Handbook of clicinal neurology (Moser, H. W., ed.) Vol.66. Amsterdam: Elsevier Science: 133-162, 1996*
171. Vanier, M. T., Suzuki, K. (1998): Recent advances in Elucidating Niemann-Pick C disease: *Brain Pathology 8: 163-174*
172. Vanier, M. T. (2002): Prenatal diagnosis of Niemann-Pick diseases types A, B and C. *Prenat. Diagn. 22: 630-632*
173. Vanier, M. T., Millat, G. (2003): Mini Review: Niemann-Pick disease type C. *Clin. Genet. 64: 269-281*
174. Voet, D., Voet, J. G.: *Biochemie. VCH, Weinheim, New-York, Basel, Cambridge 1992*
175. Walton, D. S., Robb, R. M., Crocker, A. C. (1978): Ocular manifestations of group A Niemann-Pick disease. *Am. J. Ophthalmol. 85: 174-180*
176. Watari, H., Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Glick, J. M., Patel, S., Neufeld, E. B., Brady, R. O., Pentchev, P. G., Strauss, J. F. 3rd (1999): Niemann-Pick C1 protein: obligatory roles for N-terminal domains and lysosomal targeting in cholesterol mobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 805-810*
177. Wenger, D. A.: Niemann-Pick disease. In Glow, R. H., Peters, S. P. (eds.) *Practical enzymology of the sphingolipidosis, Vol. 1., New York 1977, pp. 39-70*
178. Wenger, D. A., Barth, G., Githens, J. H. (1977): Nine cases of sphingomyelin lipidosis, a new variant in Spanish-American children. Juvenile variant of Niemann-Pick disease with foamy and sea-blue histiocytes. *Am. J. Dis. Child. 131: 955-961*
179. Wiedemann, H.R., Debuch, H., Lennert, K., Caesar, R., Blumcke, S., Harms, D., Tolksdorf, M., Seng, P. N., Gerken, H., Freitag, F., Dorner, K. (1972): Über eine infantil-juvenile, subchronisch verlaufende, den

Sphingomyelinosen (Niemann-Pick) anzureihende Form der Lipidosen- ein neuer Typ? Klinische, pathohistologische, elektronmikroskopische und biochemische Untersuchungen. *Z. Kinderheilkd.* 112: 187-225

180. Yamamoto, T., Nanba, E., Ninomiya, H. et al. (1999): NPC1 gene mutations in Japanese patients with Niemann-Pick disease type C. *Hum. Genet.* 105: 10-16

181. Yamamoto, T., Ninomiya, H., Matsumoto, M., Ohta, Y., Nanba, E., Tsutsumi, Y., Yamakawa, K., Millat, G., Vanier, M. T., Pentchev, P. G., Ohno, K. (2000): Genotype-phenotype relationship of Niemann-Pick disease type C: a possible correlation between clinical onset and levels of NPC1 protein in isolated skin fibroblasts. *J. Med. Genet.* 37: 707-712

182. Yedger, S., Gatt, S (1976): Effect of Triton X-100 on the hydrolysis of sphingomyelin by sphingomyelinase of rat brain. *Biochemistry* 15: 2570-2573

183. Yedger, S., Gatt, S. (1980): Enzyme hydrolysis of sphingomyelin in the presence of bile salts. *Biochem. J.* 185: 749-754

184. Yerushalmi, B., Sokol, R. J., Narkewicz, M. R., Smith, D., Ashmead, J. W., Wenger, D. A. (2002): Niemann-Pick disease type C in neonatal cholestasis at a North American Center. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 35: 44-50

185. Zhang, M., Sun, M., Dwyer, N. K., Comly, M. E., Patel, S. C., Sundaram, R., Hanover, J. A., Blanchette-Mackie, E. J. (2003): Differential trafficking of the Niemann-Pick C1 and 2 proteins highlights distinct roles in late endocytic lipid trafficking. *Acta Paediatr., Suppl.* 92: 63-73

## 10. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gebührt Frau Prof. Dr. Yoon S. Shin für die Überlassung des interessanten Themas, für die kompetente und engagierte Betreuung und für die Anteilnahme an den Fortschritten dieser Arbeit.

Bei Herrn Franz Jansen und Herrn Jan Tausendfreund bedanke ich mich ganz herzlich für die Einführung und Hilfestellung bezüglich des Methodenteils dieser Arbeit.

Bei Frau Rita Maibek möchte ich mich für die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Helga Priessmann für die immerwährende moralische Unterstützung und für das hilfreiche Korrekturlesen.

Frau Brigitte Unterrheitmeier und Frau Birgül Turan danke ich ebenfalls für die moralische Unterstützung.

Herrn Tamer Demirel danke ich für die Auswahl der Chemie-Software und für das Erstellen der PDF-Datei.

Meiner Familie bin ich für ihre persönliche und finanzielle Unterstützung während meines Medizinstudiums sehr dankbar.

Meine ganz besondere Dankbarkeit gilt meinem Mann, der durch seine Unterstützung und Motivation wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen hat.

## 11. LEBENS LAUF

### Persönliche Daten:

Name: Nurcan Alpay, geb. Topal  
Geburtsdatum: 15.04.1977  
Geburtsort: München  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung:

1983 Besuch der Grundschule am Karl-Marx-Ring in München  
1984-1987 Besuch der Grundschule an der Max-Kolmspergerstr. in München  
1987-1996 Besuch des Asam-Gymnasiums in München  
1996 *Allgemeine Hochschulreife*

### Beruflicher Werdegang:

1997-2004 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität  
in München

8/1999 *Ärztliche Vorprüfung*

8/2000 *Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*

8/2003 *Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*

Praktisches Jahr: 1. Tertial: Anästhesie Klinikum Großhadern, München  
2. Tertial: Innere Medizin Medizinische Klinik-Innenstadt, München  
3. Tertial: Chirurgie Krankenhaus München-Neuperlach

10/2004 *Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*

seit 5/2005 Assistenzärztin, Innere Medizin, Universitätsklinikum des Saarlandes