



**Diagnostische Wertigkeit von Gb3-  
Ablagerungen in der Haut von Patienten  
mit M. Fabry**

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**Nils Schröter**

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann**

**Diagnostische Wertigkeit von Gb3-Ablagerungen in  
der Haut von Patienten mit M. Fabry**

**Inaugural – Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Nils Schröter**

**aus Freiburg**

**Würzburg, September 2017**

Referentin: Prof. Dr. med. N. Üçeyler

Korreferent: Prof. Dr. med. Ch. Wanner

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2018

Der Promovend ist Arzt.

## **Inhaltsverzeichnis**

|  |    |
|--|----|
| 1 Einleitung   | 1  |
| 1.1 Definition M. Fabry  | 1  |
| 1.2 Epidemiologie des M. Fabry   | 2  |
| 1.3 Pathophysiologie des M. Fabry  | 2  |
| 1.4 Diagnostik bei M. Fabry  | 5  |
| 1.5 Klinisches Bild des M. Fabry   | 7  |
| 1.6 Schmerz bei M. Fabry   | 10 |
| 1.7 Therapie des M. Fabry  | 11 |
| 1.8 Biomarker in der Diagnostik von M. Fabry                                 | 12 |
| 1.9 Probleme bei der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung bei M. Fabry         | 14 |
| 1.10 Hautbiopsate als Biomarker bei nicht dermatologischen Krankheitsbildern | 15 |
| 1.11 Gb3-Ablagerungen in der Haut von M. Fabry-Patienten                     | 17 |
| 1.12 Zielsetzung der Arbeit  | 18 |
| 1.13 Hypothesen  | 18 |
| 2 Material und Methoden  | 19 |
| 2.1 Studienkollektiv   | 19 |
| 2.2 Biometrische Fallzahlberechnung  | 20 |

|   |    |
|---|----|
| 2.3 Klinische Untersuchung und Fragebögen   | 21 |
| 2.4 Quantitative sensorische Testung (QST)  | 23 |
| 2.5 Elektroneurographie   | 25 |
| 2.6 Internistische Zusatzuntersuchungen   | 26 |
| 2.7 Hautstanzbiopsie  | 26 |
| 2.8 Immunfluoreszenzfärbungen   | 28 |
| 2.9 Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte und Quantifizierung der dermalen Gb3-Last | 30 |
| 2.10 Statistische Analyse   | 34 |
| 3 Ergebnisse  | 34 |
| 3.1 Ergebnisse der klinischen Untersuchung  | 34 |
| 3.2 Subgruppenanalyse   | 37 |
| 3.3 Gb3-Ablagerungen bezogen auf Geschlecht und im Vergleich mit Kontrollen.                    | 43 |
| 3.4 Lokalisation der Gb3-Ablagerungen in der Haut   | 45 |
| 3.5 Gb3-Ablagerungen in Korrelation mit der Nierenfunktion                                      | 47 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.6 Gb3Ablagerung in Korrelation mit M. Fabry assoziierten Veränderungen des peripheren Nervensystems | 50  |
| 3.7 Gb3 Ablagerungen in Korrelation mit M. Fabry assoziierter Kardiomyopathie                         | 65  |
| 3.8 Gb3-Ablagerungen in Korrelation mit gastrointestinaler Symptomatik                                | 70  |
| 3.9 Gb3-Ablagerungen und Schmerz  | 75  |
| 3.10 Gb3 Ablagerungen und ERT   | 76  |
| 4 Diskussion  | 79  |
| 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse  | 79  |
| 4.2 Diskussion der klinischen Befunde   | 80  |
| 4.3 Diskussion der Subgruppenanalyse  | 83  |
| 4.4 Diskussion der Befunde der Gb3 Ablagerungen   | 94  |
| 4.5 Kritikpunkte und offene Fragen  | 102 |
| 4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen   | 108 |
| 5 Literaturverzeichnis  | 111 |
| 6 Geräte, Material und Chemikalien  | 129 |
| 6.1 Geräte und Laborhilfen  | 129 |
| 6.2 Verbrauchsmaterialien   | 129 |
| 6.3 Medikamente   | 131 |

|   |     |
|---|-----|
| 6.4 Antikörper und Reagenzien für die<br>Immunhistochemie | 131 |
| 6.5 Verwendete Software                                   | 134 |
| 7 Abkürzungen   | 136 |

# **1 Einleitung**

## **1.1 Definition M. Fabry**

M. Fabry ist eine X-chromosomal rezessiv vererbte lysosomale Speichererkrankung. Beschrieben wurde sie von den Dermatologen Johannes Fabry und William Anderson im Jahr 1898; bezeichnet wurde sie initial als „Angiokeratoma corporis diffusum“ (Anderson 1898, Fabry 1898). M. Fabry wird durch Mutationen verursacht, die im codierenden Gen der  $\alpha$ -Galaktosidase A ( $\alpha$ -GAL) liegen. Diese Mutationen führen zu einer eingeschränkten oder vollständig ausgefallenen Aktivität der  $\alpha$ -GAL, was zur Ablagerung von Sphingolipiden wie Globotriaosylceramide (Gb3) führt. Diese lysosomalen Ablagerungen finden sich insbesondere in den Nieren, dem Herzen und dem zentralen sowie peripheren Nervensystem und machen den M. Fabry zu einer lebenslimitierenden Multiorganerkrankung.



## **1.2 Epidemiologie des M. Fabry**

Die Prävalenz des M. Fabry liegt bei 1:40.000 und 1:117.000 (Desnick et al. 2001; Meikle et al. 1999). Die Zahlen schwanken allerdings sowohl zwischen den Studien als auch in den Angaben für verschiedene Länder. In einer italienischen Studie wurde ein systematisches Screening bei männlichen Säuglingen durchgeführt; hier fand sich eine Inzidenz von 1:3.100 (Spada et al. 2006), in Taiwan liegt die Inzidenz unter männlichen Neugeborenen bei 1:1250 (Hwu et al. 2009).

## **1.3 Pathophysiologie des M. Fabry**

Dem M. Fabry liegen Mutationen im codierenden Gen der lysosomalen  $\alpha$ -GAL (GLA-Gen) zugrunde (Opitz et al. 1965).  $\alpha$ -GAL katalysiert die Abspaltung eines Galaktosemoleküls von Gb3 (Bradey et al. 1967). Gb3 ist ein amphiphiles membranständiges Molekül. Aktuell sind über

600 Mutationen dieses Genes bekannt ([www.fabry-database.org](http://www.fabry-database.org)). Zusätzlich gibt es eine große Anzahl von Polymorphismen, deren pathophysiologische Wertigkeit noch unbekannt ist. Führt die genetische Alteration zu einer Funktionseinschränkung des Enzyms, folgt die lysosomale Akkumulation von alpha- und beta-Galaktosyl, sowie von Glukosylzuckern (Kanda et al. 2000), aber insbesondere von Gb3, da dieses nur unzureichend und im Gegensatz zu den anderen Zuckern durch kein weiteres Enzym verstoffwechselt wird. Diese Akkumulation führt über noch unvollständig verstandene Mechanismen zur Zellschädigung und zum Zelluntergang in verschiedenen Geweben (Namdar et al. 2012). Erstmals aus Nierengewebe isoliert und nachgewiesen wurden diese Akkumulationen gaschromatographisch als Glykolipide

eingeordnet (Sweeley et al.1963). Gb3 lagert sich insbesondere im Endothel von Gefäßen, Perizyten, glatten Muskelzellen, Spinalganglien und ekkrinen Schweißdrüsen ab (Gadoth et al. 1983, Lao et al. 1998, Palungwachira et al. 2002). Hier findet es sich auch zytoplasmatisch oder im endoplasmatischen Retikulum (Askari et al. 2003, Kanekura et al. 2005). Beim X-chromosomalen Erbgang sind Männer mit M. Fabry in der Regel früher und schwerer betroffen als Frauen (Navarro et al. 2006). Allerdings können Frauen jeden Schweregrad der Erkrankung erreichen. Dies liegt daran, dass es bei Frauen, der Lyon-Hypothese nach, zu einer zufälligen Inaktivierung der X-Chromosomen und somit zu zwei unterschiedlichen Allelpopulationen innerhalb eines Individuums kommt (Romeo et al. 1970). Statistisch gesehen sollte die Hälfte der Zellen eine regelrechte  $\alpha$ -GAL Enzymaktivität

besitzen (Dobrovoly et al. 2005). Kommt es zu einer sogenannten skewed X-Inaktivierung, das heißt zu einer ungleichen Inaktivierung der X-Chromosomen zu Gunsten des pathologischen Allels, kann dieses allerdings zu einem frühen Erkrankungsbeginn und einer deutlichen Ausprägung M. Fabry assoziierter Symptome führen (Elstein et al. 2012, Echevarria et al. 2016).

#### **1.4 Diagnostik bei M. Fabry**

Auf Grund der vielfältigen Symptomatik des M. Fabry liegt häufig eine lange Zeitspanne zwischen dem ersten Auftreten von Beschwerden bis zur Diagnosestellung. Bei Männern beträgt dieser Zeitraum im Median 14 Jahre, bei Frauen sogar 16 Jahre (Mehta et al. 2004). Die Diagnosestellung erfolgt durch die Bestimmung der Enzymaktivität mittels eines  $\alpha$ -GAL-Assays. Dies kann sowohl im Plasma als auch in Leukozyten durchgeführt werden,

wobei die Bestimmung der Aktivität in Leukozyten der Bestimmung der Enzymaktivität im Plasma bei Frauen überlegen ist (Wilcox et al. 2008). Bei heterozygoten Frauen kann die Enzymaktivität im Referenzbereich liegen. Daher wird bei begründetem Verdacht eine Sequenzierung des  $\alpha$ -GAL-Genes zur Diagnosesicherung durchgeführt (Wilcox et al. 2008). Die Diagnosestellung kann zudem durch die Bestimmung der Enzymaktivität mittels eines  $\alpha$ -GAL-Assays im Urinsediment erfolgen (Desnick et al. 1979, Kitagawa et al. 2008). Eine alternative Möglichkeit ist die Enzymaktivitätsbestimmung aus Trockenblut (Caudron et al. 2015). Es gibt auch Menschen mit einer in-vitro erniedrigten  $\alpha$ -GAL-Aktivität bei vollständig erhaltener intrazellulärer Aktivität ohne pathologischen Wert, die durch Mutationen im Pseudodefizienz-Allel

verursacht wird (Yasuda et al. 2003, Farooq et al. 2016).

Auch bei Männern ist die genetische Testung zu empfehlen, da verschiedene Mutationen mit unterschiedlichen Phänotypen einhergehen können. Beim Nachweis von Polymorphismen ist jedoch auch nach der Sequenzierung des  $\alpha$ -GAL-Genes eine sichere Diagnosestellung nicht immer möglich (Gomez et al. 2012, Smid et al. 2015, Lukas et al. 2016). An die Diagnosesicherung sollte sich ein Familienscreening anschließen, um weitere Betroffene zu identifizieren.

### **1.5 Klinisches Bild des M. Fabry**

Klinisch präsentiert sich der M. Fabry heterogen. Kardial ist eine linksventrikuläre Hypertrophie charakteristisch, insbesondere die Fabry-typische myokardiale Fibrose spielt hier eine Schlüsselrolle (Krämer et al. 2014). Potenziell letale Arrhythmien können sich

ebenso manifestieren wie Herzinfarkte oder eine Herzinsuffizienz (Linhart et al. 2002, Senechal et al 2003, Kampmann et al. 2008). Renal ist eine chronische Niereninsuffizienz mit Mikroalbuminurie und Proteinurie eine häufige Komplikation (Sheth et al. 1983, Branton et al. 2002, Ortiz et al. 2008). Neurologisch stehen bereits im Kindesalter auftretende episodische brennende Schmerzen im Vordergrund. Diese manifestieren sich besonders bei Fieber, Hitze oder körperlicher Belastung, sind meist akral lokalisiert und beeinträchtigen die Lebensqualität erheblich (Ries et al. 2005; Üçeyler et al. 2014). Des Weiteren kann es zu rezidivierenden zerebralen Ischämien insbesondere im jungen Lebensalter kommen (Mehta et al. 2005, Rolfs et al. 2005, Goeggel et al. 2015). Mittels kranialer Kernspintomographie lassen sich zudem Marklagerläsionen unklarer Ursache und

biologischer Relevanz, sogenannte white matter lesions, nachweisen (Moore et al. 2003, Rost et al. 2016). Das periphere Nervensystem ist meist im Sinne einer small fiber Neuropathie (SFN) betroffen, was zu den Fabry-assoziierten Schmerzen beitragen kann (Üçeyler et al. 2014). Zudem berichten die meisten Patienten von einer Schweißsekretionsstörung im Sinne einer Hypo- bis Anhidrose (McDermot et al. 2001). Auch wird von gastrointestinalen Beschwerden berichtet, insbesondere abdominale Schmerzen sowie wiederkehrende Diarrhoen spielen hier eine wichtige Rolle (Cable et al. 1982, Hoffmann et al. 2007a, Hoffmann et al. 2007b). Ophthalmologisch kann sich eine Cornea verticillata ebenso finden wie eine Tortuositas vasorum bei ausgeprägtem arteriellem Hypertonus (Macrae et al. 1985, Sodi et al. 2007). In der dermatologischen Untersuchung sind



sogenannte Angiokeratome typisch, bei denen es sich um Hämangiome oder Gefäßektasien in der Haut handelt (Hashimoto et al. 1965, Altmeyer et al. 2009). Als weitere Symptome werden von den Patienten häufig über Fatigue sowie eine Depression berichtet (Sadek et al. 2004, Bugescu et al. 2015, Lelieveld et al. 2015).

### **1.6 Schmerz bei M. Fabry**

Schmerz ist eines der ersten bei Fabry-Patienten auftretenden Symptome (Ries et al. 2003, Laney et al. 2015). Etwa 60% der Jungen und 40% der Mädchen mit M. Fabry leiden unter Schmerzen (Hopkin et al. 2008). Der Schmerz ist meist in den Händen und Füßen der Patienten lokalisiert, kann sich jedoch auch z.B. in den Gelenken oder Zähnen manifestieren. Ausgelöst wird der Schmerz durch körperliche Belastung, Hitze oder Fieber. Der Schmerz präsentiert sich häufig

episodisch, teils auch krisen- oder attackenartig und hat meist einen brennenden oder stechenden Charakter (Üçeyler et al. 2014). Der Würzburg Fabry Pain Questionnaire ist ein auf den M. Fabry ausgerichteter Fragebogen, der die Vielzahl der möglichen Präsentationsformen des Fabry-assoziierten Schmerzes bei erwachsenen Patienten berücksichtigt (Üçeyler et al. 2014, Magg et al., 2015).

### **1.7 Therapie des M. Fabry**

Zur Behandlung des M. Fabry steht die Enzymersatztherapie (ERT) zur Verfügung (Eng et al. 2001, Schiffmann et al. 2001) mit den beiden Präparaten Agalsidase alfa (Replagal; Shire Human Genetic Therapies AB, Danderyd, Sweden) und Agalsidase beta (Fabrazyme; Genzyme Corporation, Cambridge, MA). Diese müssen alle zwei Wochen intravenös verabreicht werden. Nach

aktueller Datenlage besteht kein Unterschied in der Effizienz der beiden Präparate (Vedder et al. 2007). Die Wirksamkeit einer Dosissteigerung bei besonders schwer betroffenen Patienten wird aktuell diskutiert (Schiffmann et al. 2015). Kürzlich wurde zudem das oral einzunehmende Migalastat (Galafold, Amicus Therapeutics) zugelassen, das als Chaperon wirkend den Anteil der korrekt gefalteten  $\alpha$ -GAL steigert und somit die Enzymaktivität verbessert (Warnock et al. 2015, Germain et al. 2016). Ziel ist es, jeweils durch den frühen Beginn einer Therapie den Organbefall und das Ausmaß der Organschädigung gering zu halten.

### **1.8 Biomarker in der Diagnostik von M. Fabry**

Ein Biomarker ist ein Parameter, der durch Nachweis bzw. Quantifizierung mit der Diagnose und/oder mit der Schwere einer

Erkrankung assoziiert ist. Zudem kann er dem Monitoring des Verlaufes der Erkrankung und des Therapieerfolges dienen (Cox 2006). Zur Verfügung steht aktuell der elektronenmikroskopische Nachweis charakteristischer Ablagerungen in Herz- und Nierenbiopsaten (Smid et al. 2014, Martins et al. 2014, Tøndel et al. 2015). Insbesondere Nierenbiopsien werden in der klinischen Routine angewandt, da sie neben dem diagnostischen Wert auch eine Aussage über den renalen Gewebeschaden liefern. Beide Biopsien sind jedoch mit einer invasiven Diagnostik und mit einem individuellen Risikoprofil verbunden. Als nicht-invasives Verfahren wird der Plasmaspiegel von Globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) mittels Massenspektrometrie bestimmt; dieser ist bei männlichen Fabry-Patienten erhöht, nicht jedoch bei gesunden Probanden. Bei

weiblichen Fabry-Patienten ist er ebenso erhöht, es besteht jedoch eine Überschneidung mit dem lyso-Gb3-Spiegel gesunder Kontrollen (Smid et al. 2015, Sueoka et al. 2015). Die weitere massenspektrometrische Aufschlüsselung des lyso-Gb3 in seine Analoga kann die diagnostische Treffsicherheit und insbesondere auch die prognostische Abschätzung verbessern (Boutin et al. 2016). Auch die Ausscheidung von Gb3 im Urin trägt zur Diagnostik bei (Alharbi et al. 2016). Andere Marker wie Prostaglandin H2 Disomerase, Uromodulin und Prosaposin im Urin werden diskutiert, spielen in der klinischen Routine jedoch aktuell noch keine Rolle (Matafora et al. 2015).

### **1.9 Probleme bei der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung bei M. Fabry**

Trotz verschiedener potenzieller Biomarker und vieler weiterer Möglichkeiten der Diagnostik bei

M. Fabry ist sowohl die Diagnosestellung als auch das Monitoring des Krankheitsverlaufes weiterhin schwierig. Nachteile der Nieren- und Herzbiopsien sind die Invasivität, die damit verbundenen Risiken und zudem die hierzu und für die Gewebebeurteilung benötigte Arbeitszeit und Expertise. Auf Grund zahlreicher Polymorphismen mit noch unbekannter pathophysiologischer Bedeutung ist auch nach genetischer Sequenzierung eine Diagnosestellung nicht immer sicher möglich.

### **1.10 Hautbiopsate als Biomarker bei nicht dermatologischen Krankheitsbildern**

Hautbiopsien spielen nicht nur bei dermatologischen Erkrankungen, auch auf Grund des einfachen Zugangsweges eine wichtige Rolle. So tragen Hautbiopsien auch zur Differenzialdiagnostik von peripheren Neuropathien bei (Lauria et al. 2005). Aber auch bei Erkrankungen des zentralen

Nervensystems findet sich häufig ein Korrelat in der Haut. So finden sich bei der Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy, der CADASIL, charakteristische Veränderungen in den glatten Muskelzellen von dermalen Arterien (Cotrutz et al. 2010). Auch bei der Diagnostik des M. Parkinson und der Multisystematrophie kann die Hautbiopsie hinweisend sein (Miki et al. 2010, Haga et al. 2015). Hautbiopsien können jedoch nicht nur zur Diagnostik herangezogen werden, sondern auch einen prädiktiven Wert haben und somit ein Indikator bei der Therapieevaluation sein. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass sogenannte Advanced Glycation Endproducts, also an Proteine gekoppelte Zucker, in Hautbiopsien von Patienten mit Diabetes mellitus sowohl mit einer Hyper-Creatinämie als

auch diabetischer Retinopathie korrelieren (Sternberg et al. 2016).

### **1.11 Gb3-Ablagerungen in der Haut von M. Fabry-Patienten**

Neben dem Herz, den Nieren und dem Gehirn akkumuliert Gb3 auch in der Haut von M. Fabry-Patienten, wo es sich insbesondere in Fibroblasten anreichert (Askari et al. 2007). Vergleicht man Hautbiopsien vor und nach dem Beginn einer ERT, so zeigen sich die Gb3-Ablagerungen in Fibroblasten reduziert, während sie in Muskeln und Schweißdrüsen persistieren (Keslova-Veslikova et al. 2008). Die Darstellung von Gb3 erfolgte dabei meist elektronenmikroskopisch. Diese Methode zeichnet sich durch hohe Kosten und Zeitaufwand aus, was dem Einsatz im klinischen Alltag als Routinediagnostik entgegensteht.



### **1.12 Zielsetzung der Arbeit**

Die Diagnostik des M. Fabry erfolgt laborchemisch mittels Enzymaktivitätsbestimmung und mittels genetischer Testung. Als Biomarker zur Prognoseeinschätzung und zum Monitoring der Erkrankung hat sich bislang lediglich das Lyso-Gb3 etabliert. Ziel dieser Studie war es, die diagnostische Wertigkeit von Gb3-Ablagerungen in der Haut von Patienten mit M. Fabry zu untersuchen.

### **1.13 Hypothesen**

In der vorgelegten Arbeit wurden folgende Hypothesen überprüft:

Die Gb3-Last ist in der Haut mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisbar.

Die Menge an Gb3 in der Haut lässt sich mittels Immunfluoreszenzmikroskopie quantifizieren.

Die Menge an Gb3 in der Haut ist bei Patienten mit M. Fabry in Abhängigkeit von der Krankheitsschwere erhöht.

Die Menge an Gb3 in der Haut ist bei Patienten mit M. Fabry größer als bei gesunden Kontrollen.

Die Menge an Gb3 in der Haut von M. Fabry-Patienten nimmt durch ERT ab.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studienkollektiv**

Es wurden 84 Patienten mit genetisch gesichertem M. Fabry am Fabry Zentrum für interdisziplinäre Therapie (FAZiT) der Universität Würzburg rekrutiert. Am FAZiT werden Fabry-Patienten aus ganz Deutschland betreut, die sich zur Diagnosesicherung, Therapieeinleitung und Langzeitbehandlung vorstellen. Die Rekrutierung erfolgte prospektiv

zwischen 2008 und 2013. Es wurden nur Patientinnen und Patienten in die Studie eingeschlossen, die mindestens 18 Jahre alt waren. Zudem musste die genetische Testung ebenso wie eine Aktivitätsbestimmung der  $\alpha$ -GAL die Diagnosesicherung erbracht haben. Die Studie erhielt von der Ethikkommission der Universität Würzburg ein positives Votum (#20/13). Alle Studienteilnehmer wurden umfassend schriftlich und mündlich über die Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Zudem wurden 27 gesunde Kontrollen aus dem Freundes- und Bekanntenkreis der Patienten und des Untersuchers rekrutiert.

## **2.2 Biometrische Fallzahlberechnung**

Für den Unterschied zwischen den zwei Gruppenmittelwerten wurde ein Effekt von  $d = 0.8$  angenommen, was einer großen Effektstärke entspricht, da in der Literatur

bereits Gb3-Ablagerungen bei Patienten mit M. Fabry nachgewiesen werden konnten und bei gesunden Kontrollen keine relevanten Ablagerungen zu erwarten waren. Um diesen Effekt mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% bei Durchführung eines t-Tests zur Berechnung der Mittelwertunterschiede zweier unabhängiger Gruppe zu identifizieren, bei einseitigem  $\alpha$  von  $\alpha = 0.05$  und angestrebten/angenommenen Verhältnis von 3,5:1, wird eine Stichprobe von mindestens  $N = 69$  Patienten und von mindestens  $N = 23$  gesunden Kontrollen benötigt.

### **2.3 Klinische Untersuchung und Fragebögen**

Alle Patienten wurden klinisch-neurologisch untersucht und mit standardisierten Schmerzfragebögen befragt: Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI) (Bouhassira et al. 2004; Sommer et al. 2011), Graded Chronic

Pain Scale (GCPS) (von Korff et al. 1992). Zudem beantworteten alle Patienten die Fragen der Allgemeinen Depressionsskala (ADS) (Deutsche Version des Zentrum für epidemiologische Studien, CES (Radloff 1977)). Der NPSI unterteilt den Schmerz in verschiedene Formen wie Spontanschmerz, Schmerzattacken und evozierten Schmerz. Zudem wird der Schmerz nach der Qualität weiter aufgeschlüsselt, so wird z.B. nach stechenden oder elektrisierenden Schmerzen gefragt, und die Intensität auf einer numerischen Ratingskala zwischen 0 (kein Schmerz) und 10 (stärkster Schmerz) bewertet. Auch die Schmerzdauer und -häufigkeit wird abgefragt. Im GCPS wird der zeitliche Verlauf der Schmerzen in den zurückliegenden vier Wochen betrachtet und evaluiert, inwieweit die Aktivitäten durch den Schmerz eingeschränkt wurden. Die Aktivitäten werden jeweils nach

Alltag, Freizeit und Beruf unterschieden. Zudem wird die maximale und durchschnittliche Schmerzstärke quantifiziert, auch hier wird der Schweregrad auf einer Skala zwischen 0 und 10 bewertet. Da ein Zusammenhang zwischen Schmerz und Depression besteht und zudem Depression bei M. Fabry gehäuft auftritt (Sadek et al. 2004, Lelieveld et al. 2015) wurde zur Erkennung depressiver Symptome der ADS verwendet. Im ADS werden depressionstypische Denk- und Verhaltensmuster, die in der zurückliegenden Woche aufgetreten waren, und die Häufigkeit des Auftretens abgefragt (Radloff et al. 1977).

## **2.4 Quantitative sensorische Testung (QST)**

Die QST ist eine psychophysische Testbatterie, bei der 13 Tests zur Prüfung der Funktion der kleinen dünn- und unbemerkten Nervenfasern integriert sind. Die Untersuchungen erfolgten

nach einem standardisierten Protokoll des Deutschen Forschungsverbundes Neuropathischer Schmerz (DFNS) (Rolke et al. 2006). Es wurde ein kalibriertes QST-Gerät (Somedic AB, Hörby, Schweden) verwendet. Alle Messungen erfolgten standardmäßig am linken Fußrücken sowie an der linken Wange als Kontrollareal. Untersucht wurden die thermischen und mechanischen Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen (als Funktionen der kleinkalibrigen Nervenfasern), sowie die Vibrationswahrnehmungsschwellen (als Funktion der dick-bemerkten Nervenfasern). Zudem wurden paradoxe Hitzeempfindungen aufgezeichnet, dies bedeutet, dass kalte Reize als warm wahrgenommen wurden. Die individuellen QST-Daten wurden mit den veröffentlichten Normwerten (Magerl et al. 2010) verglichen.

## **2.5 Elektroneurographie**

Bei jedem Patienten wurde eine sensible Neurographie des N. suralis rechts durchgeführt. Hierzu wurde eine antidrome Nervenstimulation durchgeführt. Verwendet wurden Oberflächenelektroden und standardisierte Messbedingungen (Kimura 2001). Die Ergebnisse wurden mit den Normwerten unseres Labors verglichen. Der untere Grenzwert für das sensible Nervenaktionspotenzial (SNAP) lag bei 10  $\mu$ V für Patienten < 65 Jahre und bei 5  $\mu$ V bei Patienten  $\geq$  65 Jahre. Der untere Grenzwert für die Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) lag für jede Altersgruppe bei 40 m/s. Alle Messungen wurden unter Temperaturkontrolle der Haut ( $\geq 32^{\circ}\text{C}$ ) des distalen Unterschenkels durchgeführt.



## **2.6 Internistische Zusatzuntersuchungen**

Im Rahmen des Besuches am FAZIT in Würzburg erfolgten zudem weitere Untersuchungen. Die Nierenfunktion wurde mittels der glomerulären Filtrationsrate (GFR) beurteilt. Eine nicht eingeschränkte Nierenfunktion wurde als  $GFR \geq 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$  definiert (Schiffmann et al. 2009; Tahir et al. 2007; Vedder et al. 2007). Zum Monitoring einer möglichen Fabry-Kardiomyopathie wurde eine Echokardiographie sowie, wenn möglich, eine kardiale MRT mit der Fragestellung nach kardialer Fibrose und links ventrikulärer Hypertrophie durchgeführt. Zudem wurden die Patienten nach gastrointestinalen Beschwerden im Sinne von Diarrhoe, Obstipation und Magenschmerzen befragt.

## **2.7 Hautstanzbiopsie**

Bei allen an der Studie teilnehmenden Patienten und Kontrollprobanden wurde jeweils

eine Hautstanzbiopsie am linken Unterschenkel 10 cm oberhalb des Malleolus lateralis sowie des linken Rückens paramedian auf Höhe Th10 durchgeführt. Dies erfolgte nach Ausschluss von Kontraindikationen wie z.B. Allergien auf Lokalanästhetika oder Wundheilungsstörungen. Die Biopsie wurde standardisiert mit einer 5 mm Stanze (Stiefel GmbH, Offenbach, Deutschland) nach Sprühdesinfektion in Lokalanästhesie mit 1% Scandicain (McCarthy et al. 1995) durchgeführt. Die Wundversorgung erfolgte mit Leukostrips (Smith & Nephew, Lohfelden, Deutschland) sowie Hautpflastern. Die ausgestanzte Hautbiopsie wurde in einer Tiefe von ca. 4 mm mit einem Skalpell von der Subkutis abgelöst. Im Anschluss an die Entnahme wurden die Hautbiopsien steril geteilt, eine Hälfte wurde bei -80°C gelagert und für Genexpressionsanalysen, die andere

Hälfte nach der Entnahme für 30 Minuten in 4% Paraformaldehyd (pH 7,4) fixiert und für Immunfluoreszenzdoppelfärbungen asserviert (Üçeyler et al. 2010).

## **2.8 Immunfluoreszenzfärbungen**

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Hautproben dreimal in Phosphatpuffer gewaschen und in 10% Saccharose mit 0,1 M Phosphatpuffer inkubiert. Das Gewebe wurde in Tissue Tek® (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet, in 2-Methylbutan eingefroren, gekühlt durch flüssigen Stickstoff und bei -80°C gelagert bis zur weiteren Bearbeitung.

Es wurden Kryoschnitte von 10 µm Schichtdicke angefertigt. Diese Schnitte wurden für 30 Minuten luftgetrocknet und dann umrandet. Es folgte das zweimalige Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde in 5%

BSA/PBS mit 0,1% Triton bei Raumtemperatur gestellt. Über Nacht wurden die Proben mit den Primärantikörpern inkubiert. Verwendet wurden hier ein Antikörper vom Kaninchen gegen den pan-axonalen Marker protein gene product 9.5 (PGP 9.5; Ultraclone, UK 1:800) sowie ein Antikörper von der Maus gegen den Marker von Gb3, CD77 (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany, 1:100) (Tetaud et al., 2003). Am Folgetag wurden die Schnitte jeweils dreimal in PBS gewaschen und im Anschluss für zwei Stunden mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden ein Antikörper von der Ziege gegen den Antikörper von der Maus, verbunden mit cyanine 3.18 (Amersham, USA, 1:50 Cy3) sowie ein Antikörper vom Esel gegen den Antikörper vom Kaninchen, verbunden mit dylight (Biolegend, USA, 1:200) verwendet. Im Anschluss wurden die Objektträger nochmals dreimal in PBS

gewaschen und daraufhin mit Vectashield (Vector Laboratories Burlingame, USA) eingedeckt.

Analog zu den Doppelfärbungen mit CD77 und PGP 9.5 wurden ebenso Färbungen mit CD77 und von-Willebrand-Faktor (vWF), einem Marker für Gefäße, angefertigt. Hierfür wurde in dem oben beschriebenen Protokoll der PGP 9.5 Antikörper gegen einen Anti-Faktor-VIII Antikörper (von-Willebrand-Faktor, Dako, USA, 1:200) ausgetauscht.

## **2.9 Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte und Quantifizierung der dermalen Gb3-Last**

Drei Kryoschnitte pro Biopsie à 10 µm wurden auf für den Untersucher verblindeten Objektträgern mit einem Zeiss Axiophot 2 Mikroskop (Axiophot 2, Zeiss, Deutschland) untersucht. Die Bilder wurden mit einer CCD Kamera (Visitron Systems, Tuchheim,

Deutschland) aufgenommen und mit SPOT Advanced Software (Windows Version 4.5, Diagnostic Instruments, Inc, Sterling Heights, USA) ausgewertet. Die Zählung und Auswertung der intraepidermalen Nervenfasern erfolgte nach veröffentlichten Regeln (Lauria et al. 2005). Die Normwerte unseres Labors für die intraepidermale Nervenfaserdichte (IENFD) sind für den Unterschenkel 9 +/- 3 Fasern/mm und für den Rücken 12 +/- 4 Fasern/mm.

Für die Quantifizierung der Gb3-Ablagerungen wurden jeweils drei Schnitte, die mit einem Antikörper gegen CD77 inkubiert worden waren, ausgewertet. Von jedem einzelnen Schnitt wurden jeweils drei Bilder bei 20x Vergrößerung aufgenommen. Ein Bild wurde subepidermal am linken lateralen Rand, ein zweites subepidermal am rechten lateralen Rand und ein drittes medial im unteren

Abschnitt des Schnittes, wie in Abbildung 2.1 dargestellt, aufgenommen. Die Bilder wurden kalibriert auf 2724 Pixel/ $\mu\text{m}$  und halbautomatisiert mit ImageJ Software (Version 1.45; <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>) offline ausgewertet. Es wurde der prozentuelle Anteil bestimmt, der in den einzelnen Bildern mit Gb3 bedeckt war. Aus diesen Prozentzahlen wurde der Mittelwert gebildet, der in die Gesamtauswertung einging.

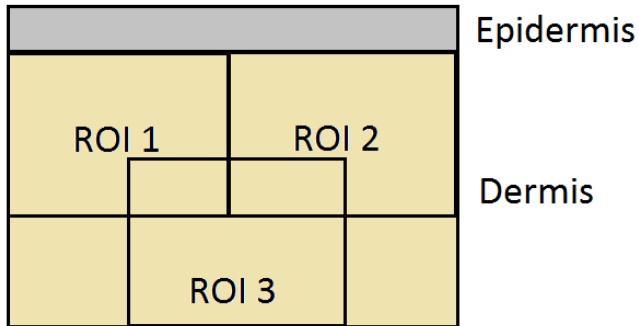


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der bearbeiteten Hautprobe, aufgegliedert in Epidermis (grau) und Dermis (beige). Dargestellt ist die Auswahl der regions of interest (ROI) für die Gb3-Quantifizierung. Die erste ROI lag am linken Rand des Schnittes, angrenzend an die Epidermis, die zweite ROI am rechten Rand des Schnittes, angrenzend an die Epidermis, die dritte ROI am unteren Rand der Dermis mit gleichem Abstand zu beiden Rändern.



## **2.10 Statistische Analyse**

Zur statistischen Analyse der erhobenen Daten wurde IBM SPSS Statistics 22.0 Software (IBM, Ehningen, Deutschland) verwendet. In den Analysegruppen bestand keine Normalverteilung, sodass der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test für Gruppenvergleiche verwendet wurde. Die Ergebnisse sind als Boxplots dargestellt, angegeben werden der Median sowie die obere und untere 25% Perzentile. Ab einem P-Value  $<0.05$  wurde ein Ergebnis als signifikant gewertet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Ergebnisse der klinischen Untersuchung**

Epidemiologisch unterschieden sich die Patienten- und Kontrollgruppe bzgl. Alter und Geschlecht nicht voneinander. In der klinisch

neurologischen Untersuchung fand sich bei 21/84 (25%) ein pathologischer Befund: in 8/21 Fällen fand sich eine Hypästhesie, in 13/21 Fällen eine Hypakusis. In 50/84 (64%) aller Fälle war der klinisch-neurologische Untersuchungsbefund normal. 46/84 (55%) der Patienten gaben Fabry-assoziierten Brennschmerz der Hände und Füße an, hierunter 28/38(74%) Männer und 18/46 (39%) Frauen. Der Median des NPSI Summenscores war 0,24 für Männer (Spanne 0-0,64) und 0,1 für Frauen (Spanne 0-0,53) mit M. Fabry, was für eine stärkere Ausprägung der neuropathischen Schmerzen bei den männlichen Patienten sprach. 27/84 (32%) der Patienten hatten im ADS einen pathologischen Wert von >16 Punkten, was auf eine Depression hinweisen kann, hierunter 16/38 (42%) Männer und 11/46 (24%) Frauen. Die QST ergab angehobene

Wahrnehmungsschwellen für thermische Reize (CDT, WDT, TSL) als Hinweis auf eine SFN in 25/36 (69%) der männlichen und 22/46 (48%) der weiblichen Fabry Patienten. Die sensible Neurographie des N. suralis zeigte in 6/82 (7%) aller Fälle, hierunter 6/37 (16%) Männer und 0/45 (0%), eine reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit <40 m/s als Zeichen einer Demyelinisierung; die SNAP Amplitude war in 6/82 (7%) Fälle auf <10 $\mu$ V bei Patienten  $\leq$ 65 Jahren und <5 $\mu$ v bei Patienten >65 Jahren vermindert als Hinweis auf eine axonale Schädigung hierunter 5/37 (14%) Männer und 1/44 (2%) Frauen; in 2/84 Fällen war die Untersuchung vom Patienten abgelehnt worden. In 53/81 (65%) aller Patienten lag die distale IENFD unterhalb der Normwerte unseres Labors (Median 2,8 Fasern/mm, Spanne 0-5,9 Fasern/mm), hierunter 33/38 (87%) Männer und 20/43 (47%) Frauen, die

proximale IENFD war in 22/81 (27%) reduziert (Median 9,9 Fasern/mm, Spanne 0,6-14,8 Fasern/mm), hierunter 14/38 (37%) Männer und 8/43 (19%) Frauen. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen war die distale IENFD ( $p < 0,001$ ) und die proximale IENFD ( $p < 0,05$ ) bei unseren Patienten niedriger. Nach den Kriterien von Devigili et al. hatten 21/38 (55%) der Männer und 16/46 (35%) der Frauen mit M. Fabry eine assoziierte SFN (Devigili et al. 2008).

### **3.2 Subgruppenanalyse**

Bei den männlichen Fabry-Patienten hatten 12/38 (32%) eine GFR  $< 60$  ml/min. Die Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion waren im Median mit 51,1 Jahren (Spanne 30,7-71,4) älter als jene mit einer normalen GFR (Median 37,2 Lebensjahre, Spanne 18,0-64,6). Die Zeit seit Diagnosestellung war mit je 1,9 Jahren im

Median gleich (Spanne 0-14,7 bei GFR < 60 ml/min, Spanne 0,1-8,9 bei GFR ≥ 60 ml/min). Je 50% der Patienten mit einer eingeschränkten und 50% der Patienten mit einer normalen Nierenfunktion erhielten ERT. Die Dauer der Therapie lag bei Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion mit 3,7 Jahren im Median (Spanne 1,2-6,0) leicht über der Behandlungsdauer der Patienten mit einer normalen Nierenfunktion von 2,5 Jahren (Spanne 1,0-8,9). Der relative Anteil von Patienten mit einer SFN lag bei Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion höher als bei Patienten mit normaler Nierenfunktion (67% versus 50%). Die IENFD der Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion lag mit 0,5 Fasern/mm im Median (Spanne 0,0-3,0) am Unterschenkel sowie 10,9 Fasern/mm (Spanne 0,6-23,9) deutlich unter derjenigen der Patienten mit einer normalen Nierenfunktion.

Hier fand sich am Unterschenkel eine mediane IENFD von 2,8 Fasern/mm (Spanne 0-13,4) sowie am Rücken von 19 Fasern/mm (Spanne 6,9-30,6). Während die Anzahl der Patienten mit Fabry-assoziierten Schmerzen sich zwischen den Gruppen nicht wesentlich unterschied (62% versus 50%), litten 75% aller Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion unter Hypo- oder Anhidrose, während dies bei den Patienten mit normaler Nierenfunktion nur 50% beklagten. Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion erreichten zudem einen höheren NPSI Summenscore (Median 0,16, Spanne 0,00-0,54 versus Median 0,09, Spanne 0,00-0,64). Umgekehrt verhielt es sich beim ADS-Fragebogen. Hier lag der Score der Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion mit 10 im Median (Spanne 0-31) unter dem ADS der Patienten mit einer normalen

Nierenfunktion (Median 17, Spanne 3-40). Der Anteil von Patienten mit einer Fabry-Kardiomyopathie war mit 75% bei Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion im Vergleich zu den Patienten mit normaler Nierenfunktion mit 38% deutlich erhöht.

Bei Frauen mit M. Fabry hatten 5/46 (11%) eine GFR < 60 ml/min. Im Median waren weibliche Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion 8 Jahre älter als weibliche Patienten mit normaler Nierenfunktion (Median 47,6 Jahre, Spanne 39,4-69,5 versus Median 39,6 Jahre, Spanne 19,9-66,8). 60% der weiblichen Fabry-Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion erhielten eine ERT im Median über 1,0 Jahr (Spanne 0,2-2,3 Jahre), während lediglich 20% der weiblichen Fabry-Patienten mit einer normalen Nierenfunktion eine ERT erhielten, hier im Median für 5,4 Jahre (Spanne 0,3-7,0 Jahre).

Die Zeitspanne seit der Diagnosestellung war in beiden Gruppen nur kurz bis zu der Entnahme der Hautbiopsie (Median 0,2 Jahre, Spanne 0,2-2,9 versus Median 0,5 Jahre, Spanne 0-35,4). 60% der weiblichen Fabry Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion hatten nach Devigili et al. eine SFN, bei einer normalen Nierenfunktion war diese mit 32% deutlich seltener zu diagnostizieren. Die IENFD lag im Median bei 3,7 Fasern/mm (Spanne 1,8-4,5) am Unterschenkel sowie 23,0 Fasern/mm (Spanne 8,9-35,2) am Rücken bei weiblichen Fabry-Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion. Bei weiblichen Fabry-Patienten mit einer normalen Nierenfunktion lag die IENFD am Unterschenkel im Median bei 7,0 Fasern/mm (Spanne 1,8-16,6) und 23,8 Fasern/mm (6,2-53,6) am Rücken. Fabry-assoziiertes Schmerz war in beiden Gruppen sehr ähnlich vertreten (60% vs 59%). Der NPSI



Summenscore lag im Median bei 0,04 (Spanne 0,00-0,37) bei den weiblichen Fabry-Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion und 0,08 (Spanne 0,00-0,53) bei den weiblichen Fabry-Patienten mit normaler Nierenfunktion. Während keine Frau mit M. Fabry und eingeschränkter Nierenfunktion unter einer Hypo- oder Anhidrose litt, wurden diese von 37% der weiblichen Fabry-Patienten mit einer normalen Nierenfunktion beschrieben. Im Gegensatz zu den männlichen Patienten erreichten weibliche Fabry-Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion im Median 18 Punkte (Spanne 10-36) auf der ADS während die weiblichen Fabry-Patienten mit einer normalen Nierenfunktion lediglich 9,5 (Spanne 0-45) Punkte erreichten. Der Anteil der Fabry-Kardiomyopathie war mit 40% und 32% relativ ähnlich.

### **3.3 Gb3-Ablagerungen bezogen auf Geschlecht und im Vergleich mit Kontrollen.**

Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, fanden sich in der distalen Haut von Männern mit M. Fabry größere Mengen an abgelagertem Gb3 als bei Frauen ( $p < 0,05$ ). Vergleich man die Menge an Gb3 Ablagerungen der Fabry-Patienten mit gesunden Kontrollen, zeigte sich sowohl bei den Männern als auch bei Frauen ein Unterschied ( $p < 0,05$ ). Dieselben statistischen Analysen wurden auch mit den Hautproben vom Rücken durchgeführt; hier fand sich jedoch auch in den einzelnen Subgruppen kein Unterschied. Dies galt analog für die nachfolgend durchgeführten Korrelationen.

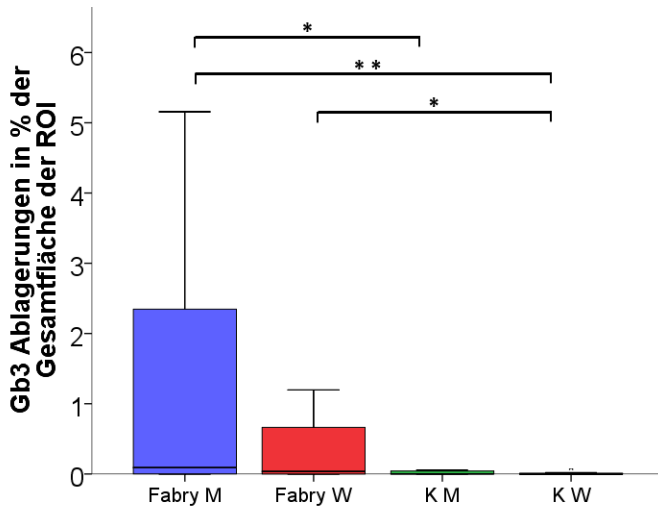


Abb. 3.1. Die Boxplots zeigen den %-Anteil an Gb3-Ablagerungen bezogen auf die Gesamtmenge der ROI der analysierten Hautbiopsate vom Unterschenkel. Bei Männern mit M. Fabry ist diese höher als bei Frauen und bei gesunden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 in der distalen Haut ist auch bei Frauen mit M. Fabry höher als bei gesunden weiblichen Kontrollen.

Anzahl an Probanden pro Box von links nach rechts: n=38, n=46, n=14, n=13. Abkürzungen: ROI: (Region of Interest), M (Männlich), W (Weiblich), K (Kontrolle) (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).

### **3.4 Lokalisation der Gb3-Ablagerungen in der Haut**

In den immunhistochemischen Doppelfärbungen mit Gb3 und PGP 9.5 sowie Gb3 und vWF fand sich Gb3 in der distalen Haut sowohl assoziiert mit dermalen Strukturen (s. unten) als auch diffus in der Dermis verteilt wieder. Schweißdrüsen werden dicht innerviert, daher lassen sich diese indirekt über den panaxonalen Marker PGP 9.5 darstellen. In der Doppelfärbung mit CD77 zeigte sich das Lumen der Schweißdrüsen in 25 von 47 Patienten (53%) durch Gb3-Ablagerungen obliteriert. Die Häufigkeit der obliterierten Schweißdrüsen bei M. Fabry-Patienten war jedoch nicht mit einer Hypo- oder Anhidrose

assoziiert. Bei gesunden Kontrollen fanden sich praktisch keine Gb3-Ablagerungen in der Dermis. In der Doppelfärbung mit vWF zeigten sich Gb3-Ablagerungen in den Gefäßwänden bei Fabry-Patienten in 16 von 51 Fällen (31%), nicht jedoch bei gesunden Kontrollen.

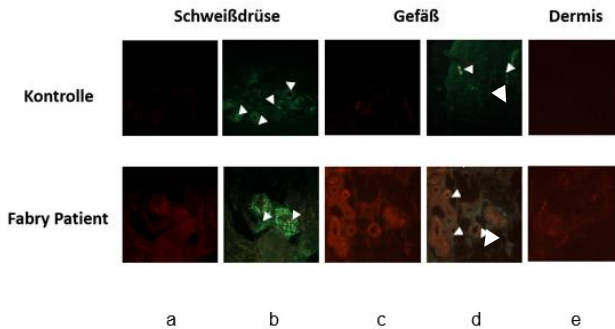


Abb. 3.2: Photomicrographien von Hautstanzbiopsien des Unterschenkels von M. Fabry-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen in der Immunfluoreszenzfärbung. In der oberen Reihe sind Färbungen von

Kontrollen und in der unteren Reihe von Patienten mit einer fortgeschrittenen Erkrankung dargestellt. In den Spalten a, c und e werden jeweils Gb3-Ablagerungen in Rot dargestellt. In der Spalte b sind fusionierte Bilder von Gb3 und PGP 9.5 gezeigt, Schweißdrüsen werden hier indirekt über die sie innervierenden Nervenfasern grün umzeichnet (Pfeilspitzen). In der Spalte d sind fusionierte Bilder von Gb3 und vWF, Gefäßendothel wird hier über das vWF grün dargestellt (Pfeilspitzen).

Abkürzungen: Gb3 (Globotriaosylceramid), PGP 9.5 (protein gene product 9.5), vWF (von-Willebrand-Faktor)

### **3.5 Gb3-Ablagerungen in Korrelation mit der Nierenfunktion**

Männer mit M. Fabry und einer beeinträchtigten Nierenfunktion hatten, wie in Abbildung 3.3 dargestellt, mehr Gb3-Ablagerungen in ihrer

Haut als gesunde Kontrollen ( $p < 0.01$ ). Im Vergleich zu Fabry-Patienten mit regelhafter Nierenfunktion fand sich mehr Gb3 in der distalen Haut von Männern mit M. Fabry und beeinträchtigter Nierenfunktion. ( $p < 0.05$ ). Frauen mit M. Fabry und einer guten Nierenfunktion hatten mehr Gb3-Ablagerungen in ihrer Haut als gesunde Kontrollen ( $p < 0.05$ ). Bei Frauen mit M. Fabry und einer eingeschränkten Nierenfunktion fand sich kein Unterschied zu Kontrollen.

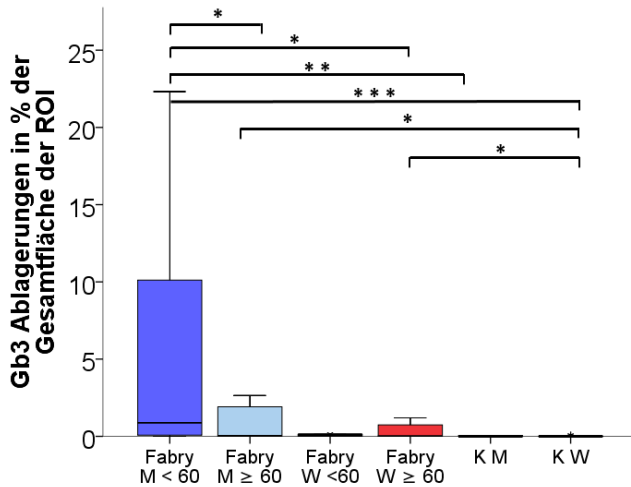


Abb. 3.3. Die Boxplots zeigen den %-Anteil an Gb3-Ablagerungen bezogen auf die Gesamtmenge der ROI der analysierten Hautbiopsate vom Unterschenkel bei Patienten mit M. Fabry, aufgeteilt nach der Nierenfunktion und bei gesunden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion größer als bei männlichen Patienten mit einer normalen Nierenfunktion, als bei weiblichen Fabry-Patienten mit einer normalen Nierenfunktion



sowie als bei beiden Kontrollgruppen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen und weiblichen Fabry-Patienten mit einer uneingeschränkten Nierenfunktion größer als bei weiblichen Kontrollen. Anzahl an Probanden pro Box von links nach rechts: n=12, n=26, n=5, n=41, n=14, n=13. Abkürzungen: ROI: (Region of Interest), M (Männlich), W (Weiblich), < 60 (Glomeruläre Filtrationsrate < 60 ml/min), ≥ 60 (glomeruläre Filtrationsrate ≥ 60 ml/min) (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

### **3.6 Gb3Ablagerung in Korrelation mit M. Fabry assoziierten Veränderungen des peripheren Nervensystems**

Hatte ein Fabry Patient eine SFN, waren, wie in Abbildung 3.4 und 3.5 dargestellt, unabhängig vom Geschlecht mehr Gb3 Ablagerungen in der distalen Haut als bei gesunden Kontrollen

nachweisbar ( $p < 0.05$ ). Es bestand zudem der Trend, dass Patienten mit einer SFN mehr Gb3 Ablagerungen in ihrer distalen Haut als Patienten ohne SFN zeigten. Unterteilte man die Fabry Patienten in eine Gruppe mit einer niedrigen SNAP-Amplitude und einer hohen Amplitude zeigten jene mit einer niedrigen SNAP-Amplitude, wie in Abbildung 3.6 und 3.7 dargestellt, im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine höhere Gb3 Ablagerung. Die Unterteilung in die Einzelgruppen erfolgte hier anhand des Medians der SNAP-Amplitude: lag diese unterhalb des Medians, wurde der Patient in die Gruppe mit einer niedrigen SNAP-Amplitude eingeteilt. Zudem zeigte sich, dass Patienten mit einer reduzierten Nierenfunktion eine geringere SNAP-Amplitude im Sinne einer axonalen Neuropathie hatten als jene mit einer normalen Nierenfunktion ( $P < 0.05$ ). Waren Männer mit M. Fabry von einer Hypo- oder

Anhidrose betroffen zeigten diese im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermehrt Gb3 Ablagerungen in der distalen Haut ( $p < 0.05$ ). Im Vergleich zu Patienten mit einer normalen Schweißneigung bestand dieser Unterschied nicht. Bei Frauen mit M. Fabry war dies, wie in Abbildung 3.8 und 3.9 gezeigt, jedoch umgekehrt, hier hatten weibliche Patienten mit einer normalen Schweißneigung eine höhere Gb3-Last in der distalen Haut als gesunde weibliche Kontrollen.

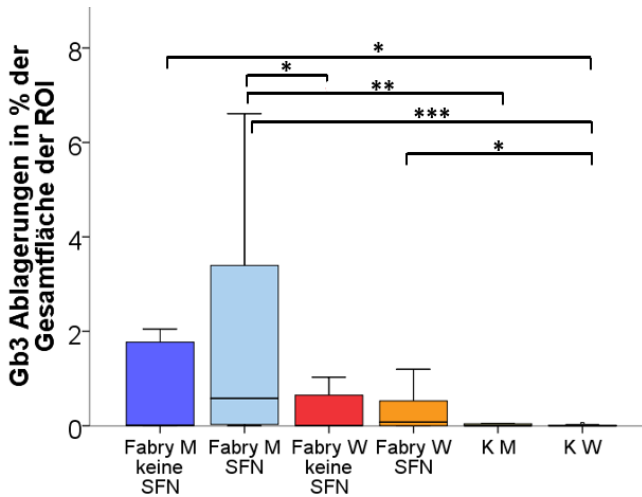


Abb. 3.4. Die Boxplots zeigen den %-Anteil an Gb3-Ablagerungen bezogen auf die Gesamtmenge der ROI der analysierten Hautbiopsate vom Unterschenkel bei Patienten mit M. Fabry, aufgeteilt nach dem Vorhandensein einer SFN und bei gesunden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einer SFN größer als bei weiblichen Fabry-Patienten ohne eine SFN

und größer als bei Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei weiblichen Fabry-Patienten mit einer SFN größer als bei weiblichen Kontrollen. Anzahl an Probanden pro Box von links nach rechts: n=12, n=26, n=5, n=41, n=14, n=13. Abkürzungen: ROI: (Region of Interest), M (Männlich), W (Weiblich), K (Kontrolle), SFN (Small-Fiber-Neuropathie), (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

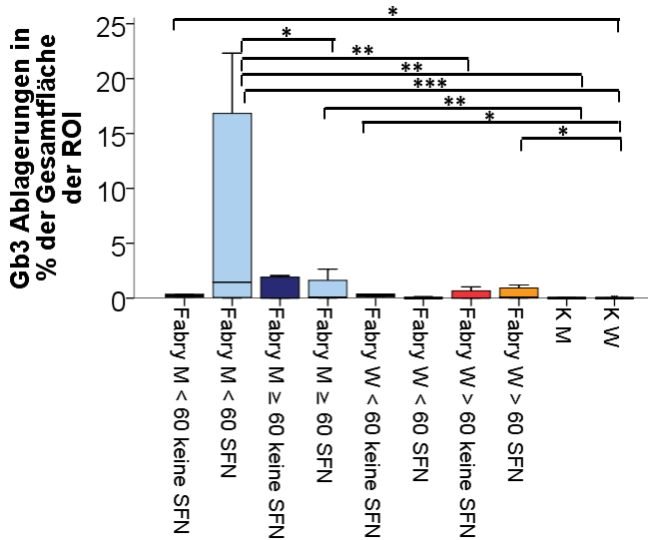


Abb. 3.5. Die Boxplots zeigen den %-Anteil an Gb3-Ablagerungen bezogen auf die Gesamtmenge der ROI der analysierten Hautbiopsate vom Unterschenkel bei Patienten mit M. Fabry, aufgeteilt nach dem Vorhandensein einer SFN, unterteilt nach der Nierenfunktion, und bei gesunden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten ohne eine SFN und mit eingeschränkter Nierenfunktion größer als bei

weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einer SFN und mit eingeschränkter Nierenfunktion größer als bei Patienten mit uneingeschränkter Nierenfunktion und einer SFN sowie als bei weibliche Patienten mit uneingeschränkter Nierenfunktion und keiner SFN und beiden Kontrollgruppen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einer SFN und uneingeschränkter Nierenfunktion größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei weiblichen Fabry-Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion und keiner SFN sowie weiblichen Patienten mit uneingeschränkter Nierenfunktion und einer SFN größer als bei weiblichen Kontrollen. Anzahl an Probanden pro Box von links nach rechts: n=2, n=10, n=11, n=14, n=2, n=3, n=25, n=14, n=14, n=13. Abkürzungen: ROI: (Region of Interest), M (Männlich), W (Weiblich). < 60

(Glomeruläre Filtrationsrate in ml/min < 60),  $\geq$  60 (Glomeruläre Filtrationsrate in ml/min  $\geq$  60), SFN (Small-Fiber-Neuropathie), K (Kontrolle).

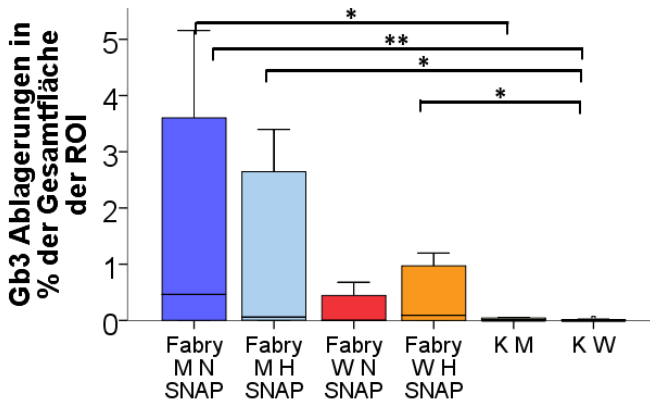


Abb. 3.6. Die Boxplots zeigen den %-Anteil an Gb3-Ablagerungen bezogen auf die Gesamtmenge der ROI der analysierten Hautbiopsate vom Unterschenkel bei Patienten mit M. Fabry, aufgeteilt nach niedrigem oder hohem SNAP und bei gesunden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einem niedrigen SNAP größer als



bei beiden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einem hohen SNAP größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei weiblichen Fabry-Patienten mit einem hohen SNAP größer als bei weiblichen Kontrollen. Anzahl an Probanden pro Box von links nach rechts: n=18, n=18, n=21, n=21, n=14, n=13. Abkürzungen: ROI (Region of Interest), M (Männlich), W (Weiblich), H (Hoch), N (Niedrig), SNAP (Sensory-nerve-actionpotential), K (Kontrolle), (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).

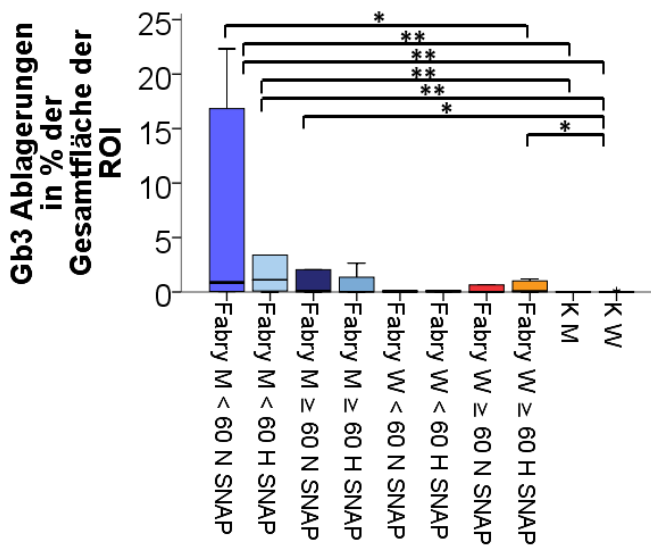


Abb. 3.7. Die Boxplots zeigen den %-Anteil an Gb3-Ablagerungen bezogen auf die Gesamtmenge der ROI der analysierten Hautbiopsate vom Unterschenkel bei Patienten mit M. Fabry, aufgeteilt nach niedrigem und hohem SNAP, unterteilt nach der Nierenfunktion, und bei gesunden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit niedrigem SNAP und mit

eingeschränkter Nierenfunktion größer als bei weiblichen Fabry-Patienten mit hohem SNAP und uneingeschränkter Nierenfunktion und als bei Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit hohem SNAP und mit eingeschränkter Nierenfunktion größer als bei Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit hohem SNAP und mit eingeschränkter Nierenfunktion größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei weiblichen Fabry-Patienten mit hohem SNAP und mit uneingeschränkter Nierenfunktion größer als bei weiblichen Kontrollen. Anzahl an Probanden pro Box von links nach rechts: n=6, n=6, n=12, n=12, n=2, n=2, n=19, n=19, n=14, n=13. Abkürzungen: ROI: (Region of Interest), M (Männlich), W (Weiblich). <60 (Glomeruläre Filtrationsrate in ml/min <60 ml/min), ≥ 60 (Glomeruläre Filtrationsrate in ml/min ≥ 60 ml/min), H (Hoch);

N (Niedrig) SNAP (Sensory-nerve-actionpotential), K (Kontrolle), (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).

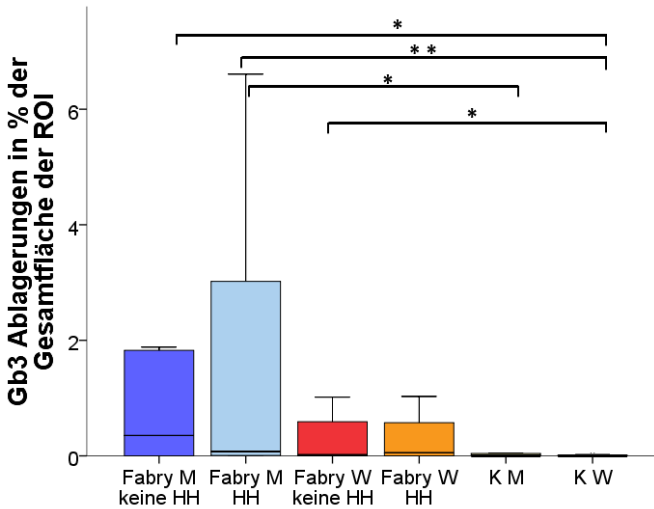


Abb. 3.8. Die Boxplots zeigen den %-Anteil an Gb3-Ablagerungen bezogen auf die Gesamtmenge der ROI der analysierten Hautbiopsate vom Unterschenkel bei Patienten mit M. Fabry, aufgeteilt nach dem Vorhandensein einer Hypohydrose und bei gesunden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist

bei männlichen Patienten ohne einer Hypohydrose größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einer Hypohydrose größer als bei beiden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei weiblichen Fabry-Patienten ohne einer Hypohydrose größer als bei weiblichen Fabry-Patienten. Anzahl an Probanden pro Box von links nach rechts: n=13, n=25, n=28, n=16, n=14, n=13. Abkürzungen: ROI (Region of Interest), M (Männlich), W (Weiblich), HH (Hypohydrose), K (Kontrolle), (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).

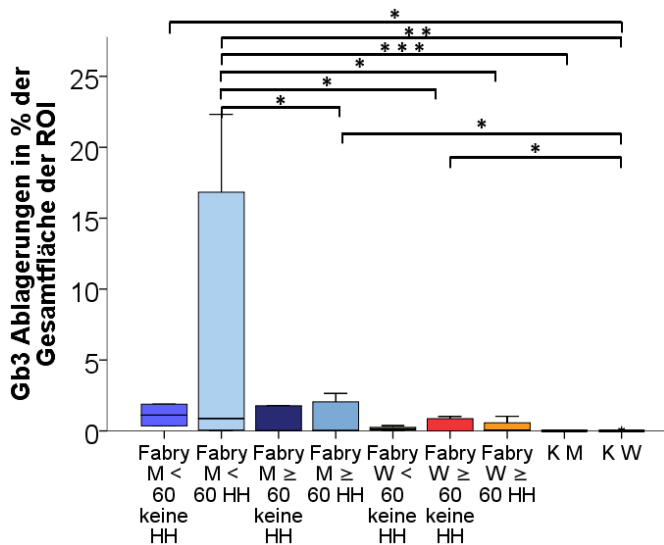


Abb. 3.9. Die Boxplots zeigen den %-Anteil an Gb3 Ablagerungen bezogen auf die Gesamtmenge der ROI der analysierten Hautbiopsate vom Unterschenkel bei Patienten mit M. Fabry, aufgeteilt nach dem Vorhandensein einer Hypohydrose, unterteilt nach der Nierenfunktion, und bei gesunden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten ohne einer Hypohydrose und mit eingeschränkter Nierenfunktion größer

als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einer Hypohydrose und mit eingeschränkter Nierenfunktion größer als bei männlichen Patienten mit einer normalen Nierenfunktion und einer Hypohydrose, weiblichen Fabry Patienten mit uneingeschränkter Nierenfunktion mit und ohne Hypohydrose und beiden Kontrollgruppen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einer Hypohydrose und einer uneingeschränkten Nierenfunktion größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei weiblichen Fabry Patienten ohne einer Hypohydrose und einer uneingeschränkten Nierenfunktion größer als bei weiblichen Kontrollen. Anzahl an Probanden pro Box von links nach rechts: n=2, n=10, n=11, n=15, n=4, n=24, n=16, n=14, n=13. Abkürzungen: ROI (Region of Interest), M (Männlich), W

(Weiblich),  $< 60$  (Glomeruläre Filtrationsrate in ml/min  $< 60$ ),  $\geq 60$  (Glomeruläre Filtrationsrate in ml/min  $\geq 60$  ml/min), HH (Hypohydrose), K (Kontrolle), (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

### **3.7 Gb3 Ablagerungen in Korrelation mit M. Fabry assoziierter Kardiomyopathie**

Patienten mit einer Fabry-Kardiomyopathie hatten, wie in Abbildung 3.10 und 3.11 gezeigt, im Trend mehr Gb3-Ablagerungen in der distalen Haut als Patienten ohne Fabry-Kardiomyopathie, unabhängig vom Geschlecht. Männliche Patienten mit einer Fabry-Kardiomyopathie und eingeschränkter Nierenfunktion hatten mehr Gb3-Ablagerungen in der distalen Haut als Patienten mit einer Fabry-Kardiomyopathie und uneingeschränkter Nierenfunktion und männliche Kontrollen ( $p < 0.05$ ). Bei männlichen Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion fand sich im



Trend bei Patienten mit einer Fabry-Kardiomyopathie mehr Gb3 in der distalen Haut als bei Patienten ohne Fabry-Kardiomyopathie. Bei nierengesunden Patienten war dieser Trend umgekehrt. Bei den weiblichen Fabry-Patienten ohne eingeschränkte Nierenfunktion fanden sich im Trend ebenfalls mehr Gb3-Ablagerungen in der distalen Haut bei weiblichen Fabry Patienten mit einer Fabry-Kardiomyopathie als ohne diese.

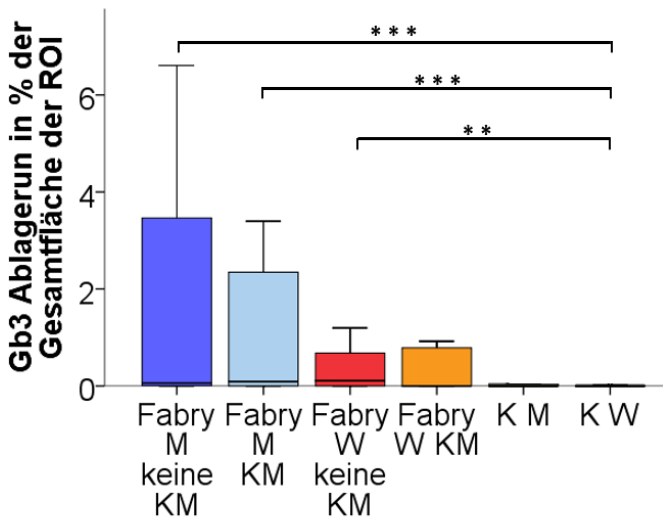


Abb. 3.10. Die Boxplots zeigen den %-Anteil an Gb3-Ablagerungen bezogen auf die Gesamtmenge der ROI der analysierten Hautbiopsate vom Unterschenkel bei Patienten mit M. Fabry, aufgeteilt nach dem Vorhandensein einer Fabry-Kardiomyopathie und bei gesunden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten ohne einer Fabry-Kardiomyopathie größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einer Fabry-Kardiomyopathie größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei weiblichen Fabry-Patienten ohne Fabry-Kardiomyopathie größer als bei weiblichen Kontrollen. Anzahl an Probanden pro Box von links nach rechts: n=18, n=18, n= 28, n=15, n=14, n=13. Abkürzungen: ROI: (Region of Interest), M (Männlich), W (Weiblich). KM

(Kardiomyopathie), K (Kontrolle) (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

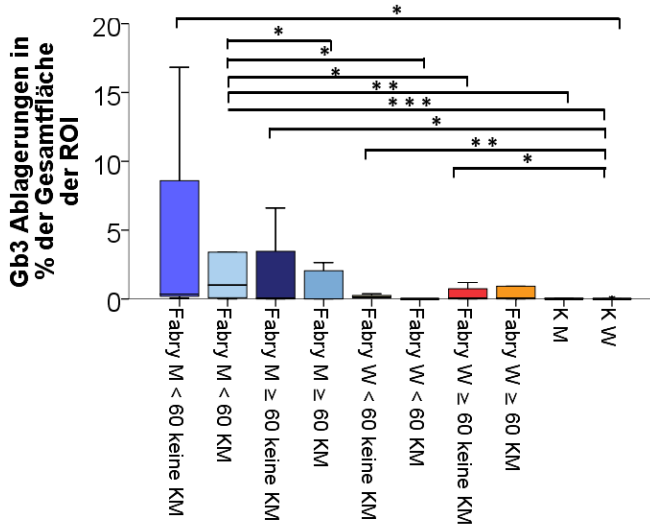


Abb. 3.11. Die Boxplots zeigen den %-Anteil an Gb3- Ablagerungen bezogen auf die Gesamtmenge der ROI der analysierten Hautbiopsate vom Unterschenkel bei Patienten mit M. Fabry, aufgeteilt nach dem Vorhandensein einer Fabry-Kardiomyopathie, unterteilt nach der Nierenfunktion, und bei

gesunden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten ohne einer Fabry-Kardiomyopathie und mit eingeschränkter Nierenfunktion größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einer Fabry-Kardiomyopathie und mit eingeschränkter Nierenfunktion größer als bei männlichen Patienten mit einer normalen Nierenfunktion und einer Fabry-Kardiomyopathie, weiblichen Fabry-Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und Fabry-Kardiomyopathie, weiblichen Fabry Patienten mit normaler Nierenfunktion und ohne Fabry-Kardiomyopathie und beiden Kontrollgruppen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten ohne einer Fabry-Kardiomyopathie und mit uneingeschränkter Nierenfunktion größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei weiblichen Fabry-

Patienten ohne einer Fabry-Kardiomyopathie und mit eingeschränkter Nierenfunktion größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei weiblichen Fabry-Patienten ohne einer Fabry-Kardiomyopathie und mit uneingeschränkter Nierenfunktion größer als bei weiblichen Kontrollen. Anzahl an Probanden pro Box von links nach rechts: n=3, n=9, n=15, n=10, n=3, n=2, n=25, n=13, n=14, n=13. Abkürzungen: ROI: (Region of Interest), M (Männlich), W (Weiblich). < 60 (Glomeruläre Filtrationsrate in ml/min < 60), ≥ 60 (Glomeruläre Filtrationsrate in ml/min ≥ 60 ml/min), KM (Fabry-Kardiomyopathie), K (Kontrolle) (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

### **3.8 Gb3-Ablagerungen in Korrelation mit gastrointestinaler Symptomatik**

M. Fabry-Patienten mit und ohne eine gastrointestinale Symptomatik (hier wurden sowohl Obstipation und Diarrhoe, als auch

wiederkehrende Magenschmerzen gewertet) hatten keine unterschiedliche Ausprägung von Gb3-Ablagerungen in der distalen Haut, wie in Abbildung 3.12 und 3.13 gezeigt. Unterteilte man die Patienten nach der Nierenfunktion, zeigten Patienten ohne gastrointestinale Symptomatik im Trend mehr Gb3-Ablagerungen als Patienten mit gastrointestinaler Symptomatik.

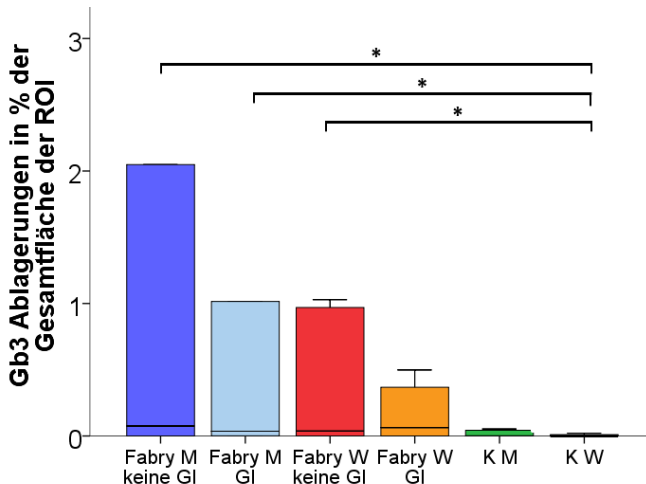


Abb. 3.12. Die Boxplots zeigen den %-Anteil an Gb3-Ablagerungen bezogen auf die Gesamtmenge der ROI der analysierten Hautbiopsate vom Unterschenkel bei Patienten mit M. Fabry, aufgeteilt nach dem Vorhandensein einer gastrointestinalen Symptomatik und bei gesunden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten ohne einer gastrointestinalen Symptomatik größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einer gastrointestinalen Symptomatik größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei weiblichen Fabry-Patienten ohne einer gastrointestinalen Symptomatik größer als bei weiblichen Kontrollen. Anzahl an Probanden pro Box von links nach rechts: n=19, n=15, n=25, n=14, n=14, n=13. Abkürzungen: ROI: (Region of Interest), M

(Männlich), W (Weiblich). GI (gastrointestinal impairment), K (Kontrolle), (\*p < 0,05).

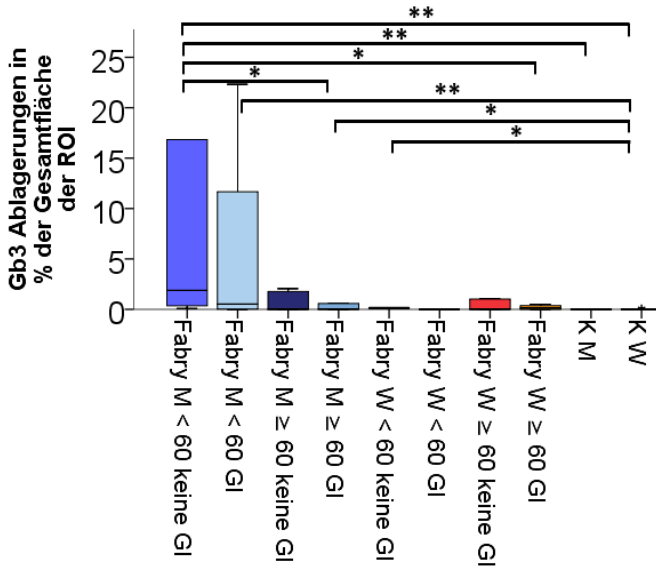


Abb. 3.13. Die Boxplots zeigen den %-Anteil an Gb3-Ablagerungen bezogen auf die Gesamtmenge der ROI der analysierten Hautbiopsate vom Unterschenkel bei Patienten mit M. Fabry, aufgeteilt nach dem Vorhandensein einer gastrointestinalen



Symptomatik, unterteilt nach der Nierenfunktion und bei gesunden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und ohne gastrointestinaler Symptomatik größer als bei männlichen Patienten ohne eingeschränkter Nierenfunktion mit gastrointestinaler Symptomatik, als bei weiblichen Fabry-Patienten mit einer gastrointestinalen Symptomatik und normaler Nierenfunktion und als bei beiden Kontrollgruppen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion und mit gastrointestinaler Symptomatik größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit regelhafter Nierenfunktion und mit gastrointestinaler Symptomatik größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei

weiblichen Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion ohne gastrointestinaler Symptomatik größer als bei weiblichen Kontrollen. Anzahl an Probanden pro Box von links nach rechts: n=5, n=4, n=14, n=11, n=2, n=1, n=23, n=13, n=14, n=13. Abkürzungen: ROI: (Region of Interest), M (Männlich), W (Weiblich). < 60 GFR (glomeruläre Filtrationsrate in ml/min < 60), ≥ 60 (GFR ≥ 60 ml/min), GI (gastrointestinal impairment) (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).

### **3.9 Gb3-Ablagerungen und Schmerz**

Die Menge an Gb3 war nicht mit den verschiedenen untersuchten Aspekten von Schmerz assoziiert. Zu nennen sind hier sowohl die einzelnen Komponenten des NPSI, der NPSI Summenscore und auch das grundsätzliche Vorhandensein von Schmerzen. Auch war ein besonders hoher Score auf der

ADS nicht mit einer erhöhten Menge an kutanem Gb3 assoziiert.

### **3.10 Gb3 Ablagerungen und ERT**

Hatte ein Fabry-Patient jeglichen Geschlechtes keine ERT zeigte sich ein Trend für eine höhere Menge an Gb3-Ablagerungen in der distalen Haut im Vergleich zu Patienten die eine ERT erhielten (unabhängig vom Präparat). Weibliche Patienten ohne ERT zeigten mehr Gb3-Ablagerungen in ihrer distalen Haut als weibliche Kontrollen. Bei Frauen mit M. Fabry, die eine ERT erhielten, zeigte sich dieser Unterschied nicht ( $p < 0.05$ ). Schlüsselte man diese Gruppen weiter nach der Nierenfunktion auf, zeigte sich, dass Patienten mit reduzierter GFR ohne ERT mehr Gb3 in der distalen Haut hatten als männliche Patienten mit einer normalen Nierenfunktion unter ERT ( $p < 0,05$ ), wie in Abbildung 3.14 dargestellt. In der Gruppe der männlichen Patienten mit eingeschränkter

Nierenfunktion zeigten die Patienten unter ERT im Vergleich zu jenen ohne ERT im Trend mehr Gb3-Ablagerungen in der distalen Haut, in den anderen Subgruppen war dies umgekehrt.

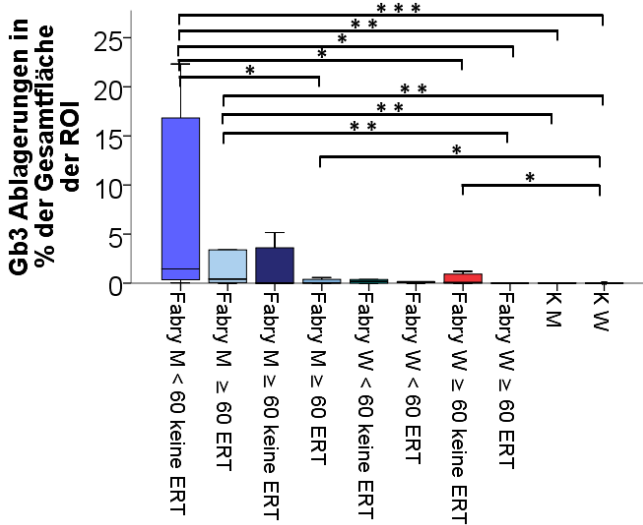


Abb. 3.14. Die Boxplots zeigen den %-Anteil an Gb3-Ablagerungen bezogen auf die Gesamtmenge der ROI der analysierten Hautbiopsate vom Unterschenkel bei Patienten mit M. Fabry, aufgeteilt nach dem Erhalt von Enzymersatztherapie, unterteilt nach der

Nierenfunktion und bei gesunden Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und ohne ERT größer als bei Patienten mit uneingeschränkter Nierenfunktion und ERT, Frauen mit uneingeschränkter Nierenfunktion und ERT sowie ohne ERT sowie beiden Kontrollgruppen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und ERT größer als bei weiblichen Fabry-Patienten mit uneingeschränkter Nierenfunktion und ERT sowie beiden Kontrollgruppen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei männlichen Patienten mit einer uneingeschränkten Nierenfunktion und ERT größer als bei weiblichen Kontrollen. Der %-Anteil von Gb3 ist bei weiblichen Patienten mit uneingeschränkter Nierenfunktion und ohne ERT größer als bei weiblichen Kontrollen. Anzahl an Probanden pro Box von links nach

rechts: n=6, n=6, n=12, n=13, n=2, n=3, n=34, n=6. Abkürzungen: ROI: (Region of Interest), M (Männlich), W (Weiblich), < 60 (glomeruläre Filtrationsrate in ml/min < 60), ≥ 60 (glomeruläre Filtrationsrate in ml/min ≥ 60 ml/min), ERT (Enzymersatztherapie), K (Kontrolle) (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

## **4 Diskussion**

### **4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Wir untersuchten Hautproben von Patienten mit M. Fabry bezüglich der Menge an kutanen Gb3 Ablagerungen und ihrer Wertigkeit für Diagnostik und Therapie. Wir konnten zeigen, dass Gb3-Ablagerungen in der Haut mit Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar sind und dass ihre Menge mit dem Geschlecht und der Krankheitsschwere assoziiert ist.

## **4.2 Diskussion der klinischen Befunde**

Schmerz ist ein von Patienten mit M. Fabry häufig berichtetes Symptom. So gaben in unserer Studie 58% der Patienten Fabry-assoziierte Brennschmerzen der Hände und Füße an. Hierbei waren Männer zu 74% (28/38) und Frauen zu 39% (18/46) betroffen. Verglichen mit früheren Studien liegen die Werte der Männer deutlich über den Werten von Hopkin et al., hier gaben die männlichen Patienten in 59% der Fälle Schmerzen an, die weiblichen 41%. Die Diskrepanz zwischen den Daten könnte durch die im Median längere Krankheitsdauer bei älterer Kohorte in unserer Studie bedingt sein (Mindestalter bei Studieneinschluss 18 Jahre versus Kinder mit 7 bzw. 9 Jahren). Im Vergleich mit den Daten von Weidemann et al., die in einer Kohorte von 40 Patienten unter ERT in 93% der Fälle Schmerzen fanden, liegen unsere Werte deutlich niedriger. Ein möglicher Grund ist hier

die deutlich weiter fortgeschrittene Erkrankung bei älterem Patientenkollektiv sowie bestehender Indikation zur ERT. In einer retrospektiven Analyse der Fabry Outcome Survey (FOS) von 752 Patienten gaben 81% der Männer und 65% der Frauen Schmerzen an (Hoffmann et al. 2007). Die Daten unterstreichen den hohen Stellenwert von Schmerz in sämtlichen Lebensabschnitten der Patienten.

32% unserer Patienten erreichten einen pathologischen ADS Summenscore, was auf eine Depression hindeuten kann. In einer von Lelieveld et al. 2015 publizierten Studie war bei 50% der Patienten in einer Kohorte von 14 Patienten eine Depression diagnostiziert worden. Bei im Altersmedian mit 39 Jahren ähnlichen Werten wäre zum einen die deutlich kleinere Kohorte als auch der mit der Hamilton Depression Rating Scale andere Fragebogen



als Diagnostikum für eine Depression als Ursache für die Diskrepanz in den berichteten Daten möglich. In einer Studie mit 117 Fabry-Patienten wurde bei 27% eine Depression über den Beck Depression Inventory angenommen, dies unterstützt die in unserer Studie erhobenen Werte.

Elektrophysiologisch fanden sich nur bei wenigen Patienten Hinweise auf eine axonale bzw. demyelinisierende Polyneuropathie, ähnlich wie in früheren Berichten. So hatten Üçeyler et al. in einer 2011 publizierte Studie lediglich bei 12% von 120 untersuchten Patienten eine sensible Polyneuropathie gefunden. Der Anteil an Patienten mit einer Kleinfaserpathologie war nach den Kriterien von Devigili et al. mit 55% bei den Männern und 35% bei den Frauen hoch und ähnlich wie in der oben zitierten Studie.

Die Nierenfunktion war bei männlichen Patienten ca. dreimal so häufig eingeschränkt als bei Frauen mit M. Fabry, was dem meist schwereren Verlauf dieser X-chromosomalen Erkrankung bei Männern Rechnung trägt. In einer Analyse des Fabry Registry zeigten 14% der Männer und 5% der Frauen eine eingeschränkte Nierenfunktion in der Baseline-Untersuchung (Wanner et al. 2010); dies unterstützt die in unserer Studie erhobenen Daten. Die Differenz zwischen den absoluten Häufigkeiten einer eingeschränkten Nierenfunktion zwischen den Daten dieser Studie und der Studie von Wanner et al. ist möglicherweise durch das deutlich jüngere Alter der Patienten bei Aufnahme in das Fabry Registry zu erklären.

### **4.3 Diskussion der Subgruppenanalyse**

Bei den männlichen Fabry-Patienten hatten 12 Patienten eine GFR < 60 ml/min, bei 26

Patienten war diese  $\geq 60$  ml/min. Die Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion waren im Median mit 51,1 Lebensjahren älter als jene mit einer guten Nierenfunktion (37,2 Lebensjahre). Ursächlich für die große Altersdifferenz zwischen den nach Nierenfunktion aufgeteilten Gruppen könnte die mit der längeren Erkrankungsdauer assoziierte Zunahme der Symptomatik sein, auch wenn die Zeit seit Diagnosestellung mit je 1,9 Jahren gleich war. Diese Annahme wird durch frühere Studien unterstützt; Wanner et al. zeigten 2010, dass eine rasche Verschlechterung der Nierenfunktion mit einem höheren Alter assoziiert war. Bei den weiblichen Fabry-Patienten hatten 5 Frauen eine GFR  $< 60$  ml/min, 41 eine GFR  $\geq 60$  ml/min. Verglichen mit vorhergehenden Studien von Sunder-Plassmann, 2006, die bei 21% der Patientinnen eine eingeschränkte Nierenfunktion

feststellten, liegt der Anteil in dieser Studie deutlich niedriger als erwartet. Dies könnte an der im Vergleich deutlich kleineren Anzahl an weiblichen Patientinnen in unsrer Studie liegen. Die im Vergleich zum männlichen Patientenkollektiv ausgeprägte Differenz in der Anzahl könnte durch das spätere Auftreten und den teils milderen Verlauf bei weiblichen Patienten zu erklären sein. Im Median waren weibliche Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion 8 Jahre älter als die weiblichen Patienten mit einer normalen Nierenfunktion (47,6 Jahre vs 39,6 Jahre), dieser Zusammenhang zwischen zunehmendem Alter und abnehmender Nierenfunktion war ebenso durch Sunder-Plassmann 2006 beschrieben worden, dies könnte an der mit dem Alter zunehmenden Schwere der Symptomatik liegen.

Die Anzahl der Patienten mit Fabry-assoziierten Schmerzen unterschied sich zwischen den Gruppen nicht wesentlich (50% vs 62%), Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion erreichten jedoch einen höheren NPSI Summenscore (0,16 vs 0,09). Im Vergleich mit früheren Studien liegen die Werte leicht unterhalb der von Mehta et al., 2005, mit 76% angegebenen Werte. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass Schmerzen zu jedem Zeitpunkt zwischen Kindheit und fortgeschrittenem Krankheitsverlauf auftreten.

Bei der Auswertung des ADS-Fragebogens lag der Score der männlichen Patienten mit normaler Nierenfunktion mit 17 im Median wesentlich über dem ADS der Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion, der bei 6 lag, in vorhergehenden Studien von Lelieveld et al., 2015, war der Anteil an Patienten mit einer Depression von 50% auf 21% gefallen, was

unsere Daten unterstützt. Eine mögliche Erklärung wäre das Entwickeln von besseren Copingstrategien im Umgang mit M. Fabry als chronische, unheilbare Erkrankung; in wie weit hier zusätzliche Umweltfaktoren zusätzlich eine Rolle spielen ist aktuell unklar. Entgegengesetzt zu den männlichen Patienten erzielten weibliche Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion im Median 18 Punkte auf der ADS während die weiblichen Patienten mit einer normalen Nierenfunktion lediglich 9,5 Punkte erreichen. Dieser Zusammenhang konnte bereits von Cole et al. 2007 gezeigt werden, der feststellte, dass Patienten mit einer renalen Symptomatik häufiger unter einer Depression litten als Patienten ohne renale Beschwerden.

Es litten 75% aller männlichen Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion unter Hypo- oder Anhidrose, dies beklagten bei den

männlichen Patienten mit normaler Nierenfunktion nur 50%. Diese Daten zeigen sich nahezu identisch mit früheren Studien. So zeigten Ries et al. 2005, dass mit zunehmendem Alter die Häufigkeit einer Anhidrose steigt, so liegt diese im 18. Lebensjahr bereits bei 75%. Eine mögliche Ursache ist eine eingeschränkte renale Elimination des Gb3 mit sukzessiver Zunahme der Ablagerungen z.B. in den Schweißdrüsen, wie mittels Immunfluoreszenz gezeigt. Auch die längere Krankheitsdauer in den Gruppen der Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion könnte ursächlich sein. Während 37% der nierengesunden Frauen unter einer Hypo- oder Anhidrose litten wurde dies durch die weiblichen Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion nicht beschrieben. Verglichen mit früheren Studien liegt der Anteil der Patientinnen mit einer Hypo- oder Anhidrose

nah an dem von McDermot et al. 2001 mit 33% angegebenen Anteil. Das vollständige Fehlen einer Hypo- oder Anhidrose bei eingeschränkter Nierenfunktion ist wahrscheinlich durch die kleine Gruppe der Patientinnen mit eingeschränkter Nierenfunktion zu erklären. Die insgesamt deutlich häufigere Affektion der Schweißsekretion bei männlichen Patienten im Vergleich zu weiblichen Patienten spiegelte die Beobachtung, dass männliche Patienten häufig stärker und früher betroffen sind als weibliche Patienten wieder.

Der relative Anteil von Patienten mit einer SFN verhielt sich hier analog (67% vs 50%) und lag im Vergleich mit vorherigen Studien unter den von Üçeyler et al. 2011 angegebenen Werten, die bei 83% der Patienten eine wahrscheinliche SFN feststellten. Eine Erklärung wäre die im zeitlichen Verlauf deutlich gestiegene



Aufmerksamkeit der Fabry-Erkrankung gegenüber, was eine frühere Diagnosestellung, möglicherweise schon vor Auftreten einer SFN, nach sich ziehen könnte.

Die IENFD der männlichen Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion lag mit 0,5 Fasern/mm am Unterschenkel sowie 10,9 Fasern/mm am Rücken deutlich unter derjenigen männlicher Patienten mit einer regelhaften Nierenfunktion. Hier fand sich am Unterschenkel eine Faserdichte von 2,8 Fasern/mm sowie am Rücken von 19 Fasern/mm. Eine stärkere Reduktion der IENFD bei Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion war ebenso in der Studie von Üçeyler et al. 2011 festgestellt worden. Als Ursache wäre die längere Krankheitsdauer anzunehmen. Die IENFD lag bei 3,7 Fasern/mm am Unterschenkel sowie 23,0 Fasern/mm am Rücken bei weiblichen Fabry-

Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion. Bei weiblichen Fabry-Patienten mit einer guten Nierenfunktion lag die IENFD am Unterschenkel bei 6,8 Fasern/mm und 24,8 Fasern/mm am Rücken. Auch hier zeigten sich weibliche Patienten im Vergleich zu den männlichen Patienten mit einer deutlich mildereren Symptomatik. Die unterschiedliche IENFD zwischen den Patienten mit einer eingeschränkten und einer normalen Nierenfunktion könnte durch die längere Erkrankungsdauer sowie die Niereninsuffizienz zu erklären sein. Auch hier ist jedoch auf die kleine Probandenanzahl in der Gruppe der weiblichen-Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion zu verweisen.

Besonders ausgeprägt war der Unterschied zwischen den männlichen Patienten mit eingeschränkter und normaler Nierenfunktion in Bezug auf Fabry-Kardiomyopathie (75% vs

38%). Ursächlich könnte erneut das unterschiedliche Alter zwischen den Gruppen der nach Nierenfunktion stratifizierten Patienten sein. Kampmann et al. zeigten 2008, dass es im Verlauf der Erkrankung zu einer Zunahme der Fabry-Kardiomyopathie kommt, was unsere Daten unterstützt. Auch ein kausaler Zusammenhang zwischen reduzierter Nierenfunktion und Fabry-Kardiomyopathie wäre möglich. Der Anteil der Fabry-Kardiomyopathie war bei den weiblichen-Patienten mit 40% und 32% relativ ähnlich. Diese Daten zeigen sich im Vergleich zu der Studie von Kampmann et al. 2008, die in 38 % der weiblichen Fabry Patienten eine Fabry-Kardiomyopathie fanden sehr ähnlich.

Je 50% der männlichen Patienten mit einer eingeschränkten und einer uneingeschränkten Nierenfunktion erhielten ERT. Ursächlich für den fehlenden Unterschied zwischen den

beiden Gruppen könnte der immer frühere Behandlungsbeginn mit einer ERT sein. 60% der weiblichen Fabry-Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion erhielten eine ERT über 1 Jahr, während lediglich 20% der Frauen mit einer normalen Nierenfunktion eine Enzyersatztherapie erhielten, hier im Median für 5,4 Jahre. Auffällig ist die große Differenz zwischen dem männlichen und weiblichen Patientenkollektiv mit normaler Nierenfunktion. Diese ist möglicherweise durch das spätere Auftreten und die teils mildere Symptomatik bei weiblichen Patienten zu erklären. In wie weit auch hier ein früherer Beginn der ERT helfen könnte den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen sollte in einer weiteren Studie evaluiert werden. Die Zeit seit Diagnosestellung war in beiden Gruppen nur kurz vor der Entnahme der Hautbiopsie (0,2 vs 0,5 Jahre).

#### **4.4 Diskussion der Befunde der Gb3 Ablagerungen**

Die Anwendung von Immunfluoreszenz für Gb3 ist sehr selten durchgeführt worden. Beim Vergleich mit Immunfluoreszenzfärbungen für Gb3 in den Konjunktiven, wo bei sechs von sechs Patienten Gb3-Ablagerungen nachgewiesen werden konnten (Rozenfeld et al. 2006), zeigte sich die Sensitivität in der vorliegenden Studie deutlich geringer. Ursächlich könnten sowohl das unterschiedliche Probenmaterial mit Haut und Konjunktiven sowie die deutlich kleinere Probandenanzahl in der 2006 veröffentlichten Studie sein.

In einer Studie von Keslova-Veslikova et al. konnten 2008 elektronenmikroskopisch in einer Kohorte von 3 Patienten bei allen Patienten Gb3-Ablagerungen mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden.

Auch hier ist die deutlich kleinere Kohorte als Ursache für die wesentlich höhere Nachweisquote der Ablagerungen anzunehmen. Jedoch wären auch die unterschiedlichen Untersuchungsmodalitäten mit Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie als Ursache denkbar. Der deutlich höhere zeitliche Aufwand in der Durchführung und Auswertung der Befunde der elektronenmikroskopischen Untersuchung spricht ebenso gegen einen Einsatz in der Routinediagnostik wie die signifikant höheren Kosten dieser Methodik. Für die Immunfluoreszenz spricht zudem die Möglichkeit der Untersuchung deutlich größerer Probenflächen, was die Gefahr eines Sample Fehlers reduziert. Die Möglichkeit der semiautomatischen Quantifizierung in der Immunfluoreszenz reduziert die Prüferabhängigkeit der Untersuchung.

In der Literatur finden sich aktuell keine Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Gb3-Ablagerungen und Organschäden oder Fabry-assoziierten Symptomen.

Im Vergleich zu den Patienten ohne ERT zeigten Patienten unter ERT im Trend weniger Gb3-Ablagerungen in der distalen Haut. Eng et al. zeigten 2001, dass sich in einer Kohorte sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch eine deutliche Abnahme der Gb3-Ablagerungen nach einer Behandlung mit ERT ergab. Ein direkter Vergleich zwischen beiden Studien ist auf Grund der fehlenden Verlaufsbiopsien in dieser Studie nicht möglich, auffällig ist jedoch, dass sich auch bei Patienten unter ERT ausgeprägte Gb3-Ablagerungen in dieser Studie nachweisen ließen. Ursächlich für den weiteren Nachweis von Gb3 trotz ERT in dieser Studie

könnte sein, dass in der Studie von Eng et al. der Fokus auf Ablagerungen im Endothel lag, das für ein i.v. gegebenes Medikament deutlich besser zugänglich ist als das Endothel umgebende Gewebe, wo sich große Teile der Ablagerungen in dieser Studie zeigten. Auch die mit 15 Patienten relativ kleine Kohorte könnte zu den unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen haben.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützend, konnten Thurberg et al. 2006 nachweisen, dass es unter ERT zwar zu einem vollständigen Verlust von Gb3-Ablagerungen im Endothel in der Haut kam, jedoch weiterhin Ablagerungen im Perineurium und in den glatten Muskelzellen in der Haut nachweisbar waren. Dies könnte erklärend für die teils ausgeprägten Gb3 Ablagerungen in der Haut von Fabry-Patienten trotz ERT sein. Auch bei Kindern konnte in der Studie von Thurberg eine Reduktion der Gb3



Ablagerungen im Endothel in Hautbiopsien nachgewiesen werden.

In einer Studie von Wijburg et al. aus dem Jahr 2015 an männlichen Patienten ohne ERT im Alter zwischen 5 und 18 Jahren konnten elektronenmikroskopisch bei 74% Gb3 moderate Ablagerungen in der Haut nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis liegt leicht über den in dieser Studie nachgewiesenen Ablagerungen, ursächlich könnte die fehlende ERT sein.

Eine besonders wichtige Rolle bei der Akkumulation von Gb3 in der distalen Haut der Patienten scheint die Nierenfunktion zu spielen. So zeigten sich über mehrere klinische Befunde wie einer Fabry-Kardiomyopathie, SFN oder auch die SNAP-Amplitude konstant die Gruppe mit einer eingeschränkten Nierenfunktion als diejenige mit der größten Menge an distalem Gb3. Unklar bleibt hier der Pathomechanismus.

So stellt sich die Frage, ob die hohe dermale Gb3-Menge ein Anzeichen der besonderen Schwere des M. Fabry ist und somit als von der Nierenfunktion unabhängiger Marker für die Krankheitsschwere gesehen werden kann, oder aber, ob die eingeschränkte Nierenfunktion ursächlich für die Gb3-Menge ist.

Es wurde gezeigt, dass sich nur in der distalen Haut Unterschiede in der dermalen Gb3-Menge zwischen den einzelnen Gruppen fanden, während dies proximal nicht nachzuvollziehen war. Erklärungsansätze wären die bessere proximale Durchblutung der Haut, was zu einem rascheren Abtransport des Gb3 führen könnte, oder aber ein, durch distale weitere Faktoren zusätzlich zum Gb3 beeinflusster, erhöhter Zellumsatz, was zu einer erhöhten Menge an distalen Gb3-Ablagerungen führen könnte.

Bei Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion fanden sich größere Mengen an Gb3 in den distalen Hautproben. Dies könnte, gerade bei Patienten mit einem Polymorphismus des  $\alpha$ -GAL-Genes, bei dem der Krankheitswert der Genalteration noch nicht bekannt ist, einen entscheidenden Hinweis für die Interpretation des humangenetischen Befundes liefern. Bei Patienten mit einem unklaren chronischen Nierenversagen und einem Polymorphismus des  $\alpha$ -GAL-Genes könnte der distale Hautbefund zudem einen Hinweis zur Behandlungsbedürftigkeit bzw. zum wahrscheinlichen Ansprechen auf die ERT liefern.

Die beobachtete Kolo-kalisation der Gb3-Ablagerungen mit Schweißdrüsen legt zwei mögliche Erklärungsmechanismen der bei Fabry Patienten beobachteten Hypo- oder

Anhidrose nahe. Möglich wäre zum einen eine rein mechanische, durch die Obliteration der Schweißdrüsen mit Gb3 bedingte, Ursache. Zum anderen könnte auch die Innervation der Schweißdrüsen durch eine Affektion der Nervenfasern durch das in der Proximität liegende Gb3 beeinträchtigt sein und somit zu einer Reduktion der Schweißsekretion führen.

Die beobachtete Kolo-kalisation der Gb3-Ablagerungen mit intraepidermalen Nervenfasern könnte auf eine mögliche Kausalität zwischen den Ablagerungen und einer SFN hindeuten. So zeigten Patienten mit einer SFN auch größere Mengen an Gb3 Ablagerungen als Patienten ohne eine SFN. Ein linearer Zusammenhang zwischen der IENF und den Gb3 Ablagerungen ließ sich jedoch nicht nachvollziehen.

#### **4.5 Kritikpunkte und offene Fragen**

Nachdem Rozenfeld et al. bereits 2006 mittels Immunfluoreszenz der Nachweis von Gb3 in Konjunktiven gelang, konnte in dieser Studie dies ebenso für Hautstanzbiopsien nachgewiesen werden.

Elektronenmikroskopisch war bereits durch Wijburg et al. 2015 eine Quantifizierung der Gb3-Ablagerungen in verschiedenen Zellpopulationen von Hautstanzbiopsien erfolgt. Im Unterschied hierzu erfolgte in der vorliegenden Studie die Quantifizierung der Gb3-Ablagerungen zellpopulationsübergreifend mittels Immunfluoreszenz, was zu einer Abnahme der Sensitivität führte. Durch die untersuchungsbedingt deutlich größere ROI war in dieser Studie eine wesentlich genauere Quantifizierung der Gb3-Ablagerungen möglich. Da zudem auf diese Weise die

gesamte Menge an Gb3 in den ROI in den Hautbiopsien quantifiziert wurde und nicht nur von einzelnen Zellen wie z.B. Endothel sind möglicherweise auch Rückschlüsse auf andere Organsysteme und Symptome möglich.

Eine Korrelation der Krankheitsschwere des M. Fabry mit Gb3-Ablagerungen in der Haut war aktuell noch nicht erfolgt. In dieser Arbeit ließ sich diese, in Bezug auf die üblicherweise als Marker des Schweregrades gewählte eingeschränkte Nierenfunktion, klar nachweisen. Dies eröffnet möglicherweise eine Möglichkeit zur genaueren Bestimmung der Schwere der Erkrankung. Sie könnte als weiterer Baustein in der Entscheidungsfindung für die Indikationsstellung zur ERT bei M. Fabry eine Rolle spielen.

Die Menge an Gb3 in der Haut ist bei Patienten mit M. Fabry größer als bei gesunden Kontrollen. Dies eröffnet die Möglichkeit,

Immunfluoreszenz in der Diagnostik von M. Fabry einzusetzen. Bei klarem humangenetischem Befund und bereits nachgewiesenen Organschäden besteht, auch im Hinblick auf die minimale Invasivität, keine Indikation zur Hautbiopsie. Bei Patienten, welche unter einer Niereninsuffizienz leiden, deren Ätiologie unklar ist, und einer nachgewiesenen Mutation im humangenetischen Befund, deren Bedeutung in Bezug auf den Krankheitswert ungeklärt ist, könnte die Bestimmung der Gb3-Ablagerungen in den Hautbiopsien jedoch einen gewichtigen Teil zur Diagnosestellung beitragen und ggf. dem Patienten so auch die Möglichkeit einer medikamentösen Therapie seiner Erkrankung eröffnen. In der Literatur finden sich unseres Wissens keine vergleichenden Studien über den Unterschied von Gb3-Ablagerungen bei Patienten und gesunden Kontrollen.

Entgegengesetzt zu unserer Hypothese nahm die Menge an Gb3 in der Haut von M. Fabry-Patienten durch ERT nicht ab. Dies mutet insbesondere daher überraschend an, da dies sowohl durch Eng et al. 2001 und Thurberg et al. 2006 zuvor in kleineren Kohorten nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise ist die sehr heterogene Dauer der ERT mit teilweise nur einer Gabe in unserer Kohorte Ursache des fehlenden Nachweises der Abnahme der Gb3-Menge in der Haut. Auch die kleinen Subgruppen nach Stratifizierung nach Geschlecht, Schwere der Erkrankung und Behandlung mit ERT könnten eine Ursache sein.

Zur weiteren Klärung der Aussagekraft der Gb3-Menge in der Haut bei Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion wäre eine Kontrollgruppe mit Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion ohne M. Fabry



sowie eine Kontrollgruppe mit Polymorphismen ohne Krankheitswert interessant. Limitierend ist zudem die Anzahl der Studienteilnehmer. 84 Patienten mit M. Fabry sind sowohl deutschlandweit als auch im internationalen Vergleich eine ausgesprochen große Kohorte. Da für die Auswertung jedoch die Stratifizierung nach Geschlecht und Betroffenheit von der Erkrankung anhand der Nierenfunktion erforderlich ist, entstehen entsprechend kleine Subgruppen. Dies traf insbesondere auf die Gruppe der weiblichen Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion zu. Wurde noch eine weitere Einteilung nach einem weiteren Parameter vorgenommen, z.B. dem Vorhandensein einer SFN, wurden die Subgruppen entsprechend noch kleiner.

Der Transfer der Studienergebnisse in die Praxis wird durch die für die Routinediagnostik höchst zeitaufwendige semiautomatische

Quantifizierung der Gb3-Menge in den Hautbiopsien limitiert.

Eine interessante, durch die Studie nicht beantwortete Fragestellung wäre die Bestimmung der Gb3-Menge in der distalen Haut im Krankheitsverlauf. Der Fokus wäre hier auf den Verlauf vor und nach dem Beginn der ERT zu legen, um so möglicherweise einen Marker für das Ansprechen auf ERT zu generieren. Da in unserem Zentrum jedoch zum Zeitpunkt der Studie nur eine geringe Anzahl von Re-Biopsien durchgeführt werden konnte und der Zeitpunkt für die Entnahme dieser Biopsien sich um mehrere Jahre unterschied, konnte hierzu leider keine Aussage getroffen werden.

## **4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen**

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob Gb3 in Hautstanzbiopsien von Patienten mit M. Fabry nachweisbar ist, die Ablagerungen quantifizierbar sind, mit der Krankheitsschwere korrelieren, und ob eine Unterscheidung von Patienten und gesunden Kontrollen anhand der dermalen Gb3-Ablagerungen möglich ist. Es wurden 84 Patienten mit M. Fabry über das FAZiT sowie 27 gesunde Kontrollen zwischen 2008 und 2013 prospektiv rekrutiert und jeweils eine proximale und eine distale Hautbiopsie entnommen. Zusätzlich erfolgten eine Anamnese, eine klinische Untersuchung, eine QST, das Ausfüllen von Fragebögen mit der Fragestellung nach Schmerz und Depression sowie eine Blutentnahme und kardiale Diagnostik. Die Immunfluoreszenz erfolgte mit Antikörpern gegen CD77, einem Marker für Gb3. Es erfolgte die verblindete,

semiautomatische Quantifizierung der Gb3 Ablagerungen. Hierzu wurden pro Biopsie drei ROI ausgewählt und die Fläche der ROIs mit Gb3-Ablagerungen in Relation zu der Gesamtfläche der ROIs gesetzt. Für die Auswertung wurden die Patienten sowohl nach Geschlecht als auch nach Krankheitsschwere und einzelnen Symptomen stratifiziert. Die Gb3 Ablagerungen ließen sich bevorzugt in Schweißdrüsen und Endothel nachweisen. Es fanden sich jedoch auch größere Mengen an Gb3-Ablagerungen ohne ersichtliches anatomischer Korrelat. Die Gb3-Ablagerungen wurden semiautomatisch quantifiziert. Es konnte nachgewiesen werden, dass männliche Fabry-Patienten eine deutlich größere Menge an Gb3 in den distalen Hautbiopsien zeigen als gesunde Kontrollen, Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion hatten eine größere Menge an Gb3-Ablagerungen in der

Haut als Patienten mit einer uneingeschränkten Nierenfunktion. Bei Patienten mit einer SFN waren erhöhte dermale Gb3 Mengen vorhanden im Vergleich zu gesunden Kontrollen, bei Patienten ohne eine SFN fand sich dieser Unterschied nicht. Patienten mit einem niedrigen SNAP zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine größere Menge an Gb3 in ihrer distalen Haut, bei Patienten mit einem höheren SNAP fand sich dies nicht. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich ein mögliches weiteres Werkzeug sowohl für die Diagnosestellung als auch für das Monitoring der Erkrankung, sowie weiterführend auch ein möglicher Indikator für den Therapieerfolg der ERT.

## 5 Literaturverzeichnis

Alharbi, F. J., Geberhiwot, T. et al. (2016) „A Novel Rapid MALDI-TOF-MS-Based Method for Measuring Urinary Globotriaosylceramide in Fabry Patients.” J Am Soc Mass Spectrom. **4**: 719-25.

Altmeyer, P., Hoffmann, K., (2009)  
„Basiswissen Dermatologie: Eine vorlesungsorientierte Darstellung” W3I S. 139.

Anderson, W. A. (1898) “A case of angiokeratoma” Br J Dermatol **10**: 113–117.

Askari, H., Kaneski, C. R., et al.(2007)  
„Cellular and tissue localization of globotriaosylceramide in Fabry disease.”  
Virchows Arch. **451**: 823-34.

Bouhassira, D., Attal, N., et al. (2004)  
„Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory.” Pain **108**: 248-57.

Boutin, M., Lavoie, P., et al. (2016) „Tandem Mass Spectrometry Quantitation of Lyso-Gb3 and Six Related Analogs in Plasma for Fabry Disease Patients.” Curr Protoc Hum Genet. **90**:17.23.1-9.

Brady, R. O., Gal, A. E. et al. (1967)  
„Enzymatic Defect in Fabry's Disease —  
Ceramidetrihexosidase Deficiency” N Engl J  
Med **276**: 1163-1167.

Branton, M., Schiffmann, R., et al. (2002)  
„Natural history and treatment of renal  
involvement in Fabry disease.” J Am Soc  
Nephrol. **13**: 139-43.

Branton, M., Schiffmann, R., et al. (2002)  
„Natural history of Fabry renal disease:  
influence of alpha-galactosidase A activity and  
genetic mutations on clinical course.” Medicine  
(Baltimore). **81**: 122-38.

Bugescu, N., Alioto, A., et al. (2015) „The  
neurocognitive impact of Fabry disease on  
pediatric patients.” Am J Med Genet B  
Neuropsychiatr Genet. **168B**: 204-10.

Cable, W. J., Kolodny, E.H. et al. (1982)  
„Fabry disease: impaired autonomic function.”  
Neurology **32**: 498-502.

Caudron, E., Prognon, P. et al. (2015)  
„Enzymatic diagnosis of Fabry disease using a  
fluorometric assay on dried blood spots: An  
alternative methodology.” Eur J Med Genet.  
**58**: 681-4.

Cole, A. L., P. J. Lee, et al. (2007) „Depression in Adults with Fabry Disease: A Common and under-Diagnosed Problem“. Journal of Inherited Metabolic Disease **30 (6)**: 943.

Cotrutz, C. E., Indrei, A., et al. (2010) „Electron microscopy analysis of skin biopsies in CADASIL disease.“ Rom J Morphol Embryol **51**: 455-7.

Cox, T., M. (2006) „Biomarkers in lysosomal storage diseases.“ Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. Chapter 9.

Desnick, R. J., Dawson G, et al. (1971) „Diagnosis of glycosphingolipidoses by urinary-sediment analysis.“ N Engl J Med. **284**:739-44.

Desnick, R. J., Iannou, Y., A., et al. (2001) „Galactosidase A deficiency: Fabry disease“ The metabolic and molecular basis of inherited disease. **8**: 3733–3774.

Devigili G, Tugnoli V et al. (2008) „The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from symptoms to neuropathology.“ Brain **131**: 1912-25.

Dobrovolny, R., Dvorakova, L., et al. (2005) „Relationship between X-inactivation and



clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the alpha-galactosidase A gene in the Czech and Slovak population." J Mol Med (Berl). **83**: 647-54.

Echevarria, L., Benistan, K., et al. (2016) „X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease." Clin Genet. **89**: 44-54.

Elstein, D., Schachamorov, E., et al. (2012) „X-inactivation in Fabry disease" Gene **505**: 266-8.

Eng, C. M., Banikazemi, M., et al., (2001). „A phase 1/2 clinical trial of enzyme replacement in fabry disease: pharmacokinetic, substrate clearance, and safety studies." Am J Hum Genet. **68**: 711-22.

Fabry, J. (1898) „Ein Beitrag zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpra papulosa haemorrhagica Hebrae)." Arch. Derm. Syph. **43**: 189.

Farooq, S., Hiner, B. C., et al. (2016) „Characteristic Pulvinar Sign in Pseudo- $\alpha$ -galactosidase Deficiency Syndrome." JAMA Neurol doi:10.1001 /jamaneurol.2016.0268.

Gadoth N, Sandbank U. „Involvement of dorsal root ganglia in Fabry's disease.” J Med Genet. **20**: 309-12.

Germain, D. P., Hughes D. A. et al. (2016) „Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat.” N Engl J Med. **375(6)**: 545-55.

Goeggel Simonetti, B., Mono, M. L., et al. (2015) „Risk factors, aetiology and outcome of ischaemic stroke in young adults: the Swiss Young Stroke Study (SYSS).” J Neurol. **262**: 2025-32.

Gomez, M., Molina, L., et al. (2012) „Phenotype and genotype characterization and twin association in patients with Anderson-Fabry cardiomyopathy.” Cardiology **121**: 71-5.

Haga, R., Sugimoto, K., et al. (2015) „Clinical Utility of Skin Biopsy in Differentiating between Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy” Parkinsons Dis. Published online 2015 10.

Hashimoto, K., Gross, B. G., et al. (1965) „ANGIOKERATOMA CORPORIS DIFFUSUM (FABRY). HISTOCHEMICAL AND

ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES OF THE SKIN." J Invest Dermatol. **44**: 119-28.

Hoffmann, B., Beck, M., et al. (2007a) „Nature and prevalence of pain in Fabry disease and its response to enzyme replacement therapy-- a retrospective analysis from the Fabry Outcome Survey." Clin J Pain **23**: 535-42.

Hoffmann, B., Schwarz, M., et al. (2007b) „Gastrointestinal symptoms in 342 patients with Fabry disease: prevalence and response to enzyme replacement therapy." Clin Gastroenterol Hepatol. **5**: 1447-53.

Hopkin, R. J., Bissler J, et al (2008) „Characterization of Fabry Disease in 352 Pediatric Patients in the Fabry Registry" Pediatric Research **64**: 550–555.

Hwu, W. L., Chien, Y. H. et al (2009) „Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A)." Hum Mutat. **10**: 1397-405.

Kampmann, C., Linhart, A., et al. (2008) „Onset and progression of the Anderson-Fabry disease related cardiomyopathy." Int J Cardiol. **130**: 367-73.

Kampmann, C., Wiethoff, C. M., et al. (2008) „Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in children and adolescents.” Acta Paediatr. **97**: 463-9.

Kanda, A., Nakao, S., et al. (2000) „Fabry disease: ultrastructural lectin histochemical analyses of lysosomal deposits.” Virchows Arch. **436**: 36-42.

Kanekura, T., Fukushige, T. et al. (2005) „Immunoelectron-microscopic detection of globotriaosylceramide accumulated in the skin of patients with Fabry disease.” Br J Dermatol **153**: 544-8.

Keslová-Veselíková, J., Hůlková, H., et al. (2008) „Replacement of alpha-galactosidase A in Fabry disease: effect on fibroblast cultures compared with biopsied tissues of treated patients.” Virchows Arch.: Epub 2008 Mar 20.

Kimura, J. (2013) „Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: Principles and practice“ Vol. 4, Oxford University Press.

Kitagawa, T., Suzuki, K., et al. (2008) „Non-invasive high-risk screening for Fabry disease hemizygotes and heterozygotes.” Pediatr Nephrol. **23**: 1461-71.

- Krämer, J., Niemann, M., et al. (2014) „Relation of burden of myocardial fibrosis to malignant ventricular arrhythmias and outcomes in Fabry disease.” Am J Cardiol. **114**: 895-900.
- Laney, A., Peck, S. (2015) „Fabry disease in infancy and early childhood: a systematic literature review” Genetics in Medicine **17**: 323–330.
- Lao, L. M., Kumakiri M., et al. (1998) „The ultrastructural characteristics of eccrine sweat glands in a Fabry disease patient with hypohidrosis.” J Dermatol Sci. **18**: 109-117.
- Lauria, G., Hsieh, S. T., et al. (2010) „European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society.” Eur J Neurol. **17**: 903-12.
- Lelieveld, I. M., Böttcher, A., et al. (2015) „Eight-Year Follow-Up of Neuropsychiatric Symptoms and Brain Structural Changes in Fabry Disease.” PLoS One **10**: e0137603.

Linhart, A., Magage, S., et al (2002) „Cardiac involvement in Fabry disease.” Acta Paediatr Suppl. **91**: 15-20.

Löhle, M., Hughes, D., et al. (2015) „Clinical prodromes of neurodegeneration in Anderson Fabry disease“ Neurology **84**: 1454-1464.

Lukas, J., Scalia, S., et al. (2016) „Functional and Clinical Consequences of Novel  $\alpha$ -Galactosidase A Mutations in Fabry Disease.” Hum Mutat **37**: 43-51.

Macrae, W. G., Ghosh, M. et al. (1985) „Corneal changes in Fabry's disease: a clinico-pathologic case report of a heterozygote.” Ophthalmic Paediatr Genet. **5**: 185-90.

Magerl, W., Krumova, E.K. et al. (2010) „Reference data for quantitative sensory testing (QST): refined stratification for age and a novel method for statistical comparison of group data.“ Pain **151**: 598-605.

Magg, B., Riegler, C., et al. (2015) „Self-administered version of the Fabry-associated pain questionnaire for adult patients” Orphanet Journal of Rare **10**:113.

Martins, E., Pinho, T., et al. (2014) „Histopathological evidence of Fabry disease

in a female patient with left ventricular noncompaction." Rev Port Cardiol. **33**: 1-6.

Matafora, V., Cuccurullo, M. et al. (2015) „Early markers of Fabry disease revealed by proteomics." Mol Biosyst. **11**: 1543-51.

McCarthy, B. G., Hsieh, S.T., et al. (1995) „Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy." Neurology **45**: 1848-55.

MacDermot, J., MacDermot, K. D. (2001) „Neuropathic pain in Anderson-Fabry disease: pathology and therapeutic options." Eur J Pharmacol. **429**: 121-5.

MacDermot, K.D., Holmes, A., et al. (2001). „Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females." Journal of Medical Genetics **38**: 769–775.

Meikle, P. J., Hopwood, J. J., et al. (1999). “Prevalence of lysosomal storage disorders." JAMA **281**: 249–254.

Mehta, A., Ricci, R., et al. (2004) „Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry

Outcome Survey." Eur J Clin Invest. **34**: 236-42.

Mehta, A., Ginsberg, L., et al. (2005) „Natural history of the cerebrovascular complications of Fabry disease." Acta Paediatr Suppl. **94**: 24-7.

Miki, Y., Tomiyama, M., et al. (2010) „Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease." Neurosci Lett. **469**: 357-9.

Moore, D. F., Altarescu, G., et al. (2003) „White matter lesions in Fabry disease occur in 'prior' selectively hypometabolic and hyperperfused brain regions." Brain Res Bull. **62**: 231-40.

Namdar, M., Gebhard C., et al (2012). „Globotriaosylsphingosine accumulation and not alpha-galactosidase-A deficiency causes endothelial dysfunction in Fabry disease." PLoS One: Epub 2012 Apr 30.

Navarro, C., Teijeira, S., et al. (2006) „Fabry disease: an ultrastructural comparative study of skin in hemizygous and heterozygous patients." Acta Neuropathol (Berl) **111**: 178-185.



Opitz, J. M., Stiles, F. C., et al. (1965) „The genetics of angiokeratoma corporis diffusum (Fabry's disease), and its linkage with Xg(a) locus.” Am J Hum Genet **17**: 325–342.

Ortiz, A., Oliveira, J. P., et al. (2008) „Recommendations and guidelines for the diagnosis and treatment of Fabry nephropathy in adults.” Nat Clin Pract Nephrol. **4**: 327-36.

Palungwachira, P., Yaguchi, H. (2002) „The ultrastructural study in a case of Fabry disease.” J Med Assoc Thai **85**: 842-849.

Radloff, L. S. (1977). „The CES-D: a self-report symptom scale to detect depression.” Appl Psychol Meas **3** 385–401.

Ries, M., Ramaswami U., et al. (2003) „The early clinical phenotype of Fabry disease: a study on 35 European children and adolescents” European Journal of Pediatrics **162**: 767–772.

Ries, M., Gupta, S., et al. (2005) „Pediatric Fabry disease.” Pediatrics **115**: 344-55.

Rolfs, A., Böttcher, T., et al. (2005) „Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study.” Lancet **366**: 1794-6.

Rolke, R., Baron, R., et al. (2006) „Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values.“ Pain **123**: 231-43.

Romeo G, Migeon BR. (1970) „Genetic inactivation of the alpha-galactosidase locus in carriers of Fabry's disease.“ Science **170**:180-1.

Rost, N. S., Cloonan, L., et al. (2016) „Determinants of white matter hyperintensity burden in patients with Fabry disease.“ Neurology. **86**:1880-6.

Rozenfeld, P. A., Croxatto, O., et al. (2006) „Immunofluorescence detection of globotriaosylceramide deposits in conjunctival biopsies of Fabry disease patients“ Clin Exp Ophthalmol **34(7)**: 689-94.

Sadek, J., Shellhaas, R., et al. (2004) „Psychiatric findings in four female carriers of Fabry disease.“ Psychiatr Genet **14**: 199-201.

Schiffmann, R., Kopp, J. B. et al. (2001) „Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial.“ JAMA **285**: 2743-9.

Schiffmann, R., Swift, C., et al. (2015) „A prospective 10-year study of individualized, intensified enzyme replacement therapy in advanced Fabry disease.” J Inherit Metab Dis **38**: 1129-36.

Senechal, M., Germain, D. P. (2003) „Fabry disease: a functional and anatomical study of cardiac manifestations in 20 hemizygous male patients.” Clin Genet. **63**: 46-52.

Sheth, K. J., Roth, D. A., et al. (1983) „Early renal failure in Fabry’s disease.” Am J Kidney Dis **2**: 651–654.

Smid, B. E., van der Tol, L., et al. (2014) „Uncertain diagnosis of Fabry disease: consensus recommendation on diagnosis in adults with left ventricular hypertrophy and genetic variants of unknown significance.” Int J Cardiol. **177**: 400-8.

Smid, B. E., Hollak, C. E., et al. (2015) „Diagnostic dilemmas in Fabry disease: a case series study on GLA mutations of unknown clinical significance.” Clin Genet **88**: 161-6.

Smid, B. E., van der Tol, L. et al. (2015) „Plasma globotriaosylsphingosine in relation to

phenotypes of Fabry disease.” *J Med Genet.* **52(4)**:262-8.

Sodi, A., Ioannidis, A. S., et al. (2007) „Ocular manifestations of Fabry's disease: data from the Fabry Outcome Survey.” *Br J Ophthalmol.* **91**: 210-4.

Sommer, C., Richter, H., et al. (2011) „A modified score to identify and discriminate neuropathic pain: a study on the German version of the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI).“ *BMC Neurol.* **11**:104.

Spada, M., Pagliardini, S., et al. (2006) „High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening.” *Am J Hum Genet.* **79**: 31-40.

Sternberg, M., M'bemba, J. et al. (2016) „Skin collagen pentosidine and fluorescence in diabetes were predictors of retinopathy progression and creatininemia increase already 6years after punch-biopsy.” *Clin Biochem.* **49**: 225-31.

Sueoka, H., Ichihara, J. et al. (2015) „Nano-LC-MS/MS for Quantification of Lyso-Gb3 and Its Analogues Reveals a Useful Biomarker for Fabry Disease.” *PLoS One* **10**: e0127048.

Sunder-Plassmann, G. (2006). „Renal manifestations of Fabry disease.” Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS, **Chapter 21**.

Sweeley, C. C., Klionsky, B. L. et al. (1963) „Fabry's disease: classification as a sphingolipidosis and partial characterization of a novel glycolipid.” J Biol Chem **238**: PC3148-PC3150.

Tetaud, C., Falguières, T., et al. (2003) „Two distinct Gb3/CD77 signaling pathways leading to apoptosis are triggered by anti-Gb3/CD77 mAb and verotoxin-1.” J Biol Chem. **278**: 45200-8.

Thurberg, B. L., Randolph Byers, H., et al. (2004) „Monitoring the 3-year efficacy of enzyme replacement therapy in fabry disease by repeated skin biopsies.” J Invest Dermatol **122(4)**:900-8.

Tøndel, C., Kanai, T., et al. (2015) „Foot process effacement is an early marker of nephropathy in young classic Fabry patients without albuminuria.” Nephron. **129**: 16-21.

Üçeyler, N., Kafke W, et al. (2010) „Elevated proinflammatory cytokine expression in

affected skin in small fiber neuropathy.”  
Neurology **74**: 1806-13.

Üçeyler, N., He, L., et al. (2011) „Small fibers in Fabry disease: baseline and follow-up data under enzyme replacement therapy” Journal of the Peripheral Nervous System 304–314.

Üçeyler, N., Ganendiran, S., et al. (2014) „Characterization of pain in fabry disease.” Clin J Pain **30**: 915-20.

Üçeyler, N., Magg, B., et al. (2014) „A comprehensive Fabry-related pain questionnaire for adult patients.” Pain **155**: 2301-5.

Vedder, A. C., Linthorst, G.E., et al. (2007) „Treatment of Fabry disease: outcome of a comparative trial with agalsidase alfa or beta at a dose of 0.2 mg/kg.“ PLoS One **2**: e59.

Von Korff, M., Ormel, J., et al: (1992) „Grading the severity of chronic pain.” Pain **50**: 133-149.

Warnock, D. G., Bichet, D.G., et al. (2015) „Oral Migalastat HCl Leads to Greater Systemic Exposure and Tissue Levels of Active  $\alpha$ -Galactosidase A in Fabry Patients when Co-Administered with Infused Agalsidase” PLoS One **10**: e0134341.

Wijburg, F. A., Bénichou, B1., et al. (2015) „Characterization of Early Disease Status in Treatment-Naive Male Paediatric Patients with Fabry Disease Enrolled in a Randomized Clinical Trial” PLoS One **10(5)**: e0124987.

Wilcox, W. R., Oliveira, J. P., et al. (2008) „Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: Lessons from the Fabry Registry” Molecular Genetics and Metabolism **93**: 112–128.

Yasuda, M., Shabbeer, J., et al. (2003) „Fabry disease: characterization of  $\alpha$ -galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele.” Hum Mutat. **22**: 486–92.

## 6 Geräte, Material und Chemikalien

### 6.1 Geräte und Laborhilfen

| Gerät      | Bezeichnung                                       | Hersteller                              |
|------------|---|---|
| CCD-Kamera | CCD-Kamera  | Visitron Systems, Tuchheim, Deutschland |
| Mikroskop  | Axiophot 2  | Zeiss, Göttingen, Deutschland           |
| Mikrotom   | CM 3050 S   | Leica, Wetzlar, Deutschland             |
| Pipetten   | Eppendorf Research Pipette 10 µl, 100 µl, 1000 µl | Eppendorf, Hamburg, Deutschland         |

### 6.2 Verbrauchsmaterialien

| Art  | Bezeichnung          | Hersteller                      |
|------|----------------------|---------------------------------|
| Caps | 0,2 ml; 1,5 ml; 2 ml | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |



|                               |                      |  |
|-------------------------------|----------------------|--|
| Einmalstanze für Hautbiopsien | Biopsy Punch 5 mm    | Stiefel, Offenbacham Main, Deutschland |
| Heftpflaster                  | Leukostrip           | Smith&Nephew, Medical Limited, England |
| Kanülen                       | 20G, BB Microlance   | BD, Fraga, Spanien                     |
| Pipettenspitzen               | 10 µl, 100µl, 1000µl | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland       |
| Skalpelle                     | Skalpelle            | Braun, Melsungen, Deutschland          |
| Spritze                       | 5 ml                 | Braun, Melsungen, Deutschland          |

### 6.3 Medikamente

|                   |                   |                                     |
|-------------------|-------------------|-------------------------------------|
| Lokalanästhetikum | Scandicain 1% 5ml | AstraZeneca, London, United Kingdom |
|-------------------|-------------------|-------------------------------------|

### 6.4 Antikörper und Reagenzien für die Immunhistochemie

| Art             | Bezeichnung | Hersteller                       |
|-----------------|-------------|----------------------------------|
| Saccharose      | 10 %        |                                  |
| Einbettmittel   | Tissue Tek  | Sakura, Zoeterwoude, Niederlande |
| 2-Methylbutanon |             | FA Roth, Karlsruhe, Deutschland  |

|                     |   |  |
|---------------------|---|--|
| BSA                 | Bovines Serumalbumin, 10%               | Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen |
| PBS                 | Phosphat-Buffer-Saline                  | Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen |
| Primärer Antikörper | PGP 9.5 Antikörper vom Kaninchen, 1:800 | Ultrapar, UK                                   |
| Primärer Antikörper | Gb3/CD77 Antikörper von der Maus 1:100  | BD Pharmingen, Heidelberg, Germany             |
| Primärer Antikörper | Faktor VIII/von-Willebrand-             | Dako, USA                                      |

|                              |   |                              |
|------------------------------|---|------------------------------|
|                              | Faktor<br>Antikörper<br>vom<br>Kaninchen,<br>1:200  |                              |
| Sekundäre<br>r<br>Antikörper | cyanine 3.18<br>Antikörper<br>von der<br>Ziege gegen<br>den<br>Antikörper<br>von der<br>Maus 1:50 | Amersham,<br>USA             |
| Sekundäre<br>r<br>Antikörper | dylight<br>Antikörper<br>von dem<br>Esel gegen<br>den<br>Antikörper<br>von dem                    | Biolegend, San<br>Diego, USA |

|                   |                    |  |
|-------------------|--------------------|--|
|                   | Kaninchen<br>1:200 |  |
| Triton            |                    |  |
| Eindeckmit<br>tel | Vectashield        | Vector<br>Laboratories<br>Burlingame,<br>USA |

## 6.5 Verwendete Software

| <b>Art</b>                               | <b>Bezeichnung</b>                | <b>Hersteller</b>      |
|--|-----------------------------------|------------------------|
| Textverarbeitung,<br>Tabellenkalkulation | Microsoft<br>Office 2015          | Microsoft<br>, USA     |
| Statistische<br>Auswertung               | SPSS<br>Software,<br>Version 21.0 | IBM,<br>Armonk,<br>USA |

|   |                               |                                   |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|
| Auswertung der IENFD und Bestimmung des % Anteils des Gb3 | ImageJ software, Version 1.45 | National Institute of Health, USA |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|

## 7 Abkürzungen

ADS            Allgemeinen Depressionsskala

$\alpha$ -GAL         $\alpha$ -Galaktosidase A

BSA            Bovines Serumalbumin

CADASIL    Cerebral Autosomal Dominant  
Arteriopathy with Subcortical Infarcts and  
Leukoencephalopathy

CD77         Cluster of Differentiation 77

DFNS Deutscher            Forschungsverbund  
Neuropathischer Schmerz

ERT            Enzyersatztherapie

FAZiT        Fabry            Zentrum            für  
interdisziplinäre Therapie

Gb3            Globotriaosylceramide

GCPS         Graded Chronic Pain Scale

GFR            glomeruläre Filtrationsrate

|                   |                                    |
|-------------------|------------------------------------|
| GI                | Gastrointestinal Impairment        |
| HH                | Hypohydrose                        |
| IENF              | Intraepidermal nerve fiber density |
| K                 | Kontrolle                          |
| KM                | Fabry-Kardiomyopathie              |
| lyso-Gb3          | Globotriaosylsphingosine           |
| M                 | Männlich                           |
| M. Fabry          | Morbus Fabry                       |
| MRT               | Magnetresonanztomographie          |
| NLG               | Nervenleitgeschwindigkeit          |
| NPSI<br>Inventory | Neuropathic Pain Symptom           |
| N. suralis        | Nervus suralis                     |
| PBS               | Phosphat-Buffer-Saline             |



|         |                                  |
|---------|----------------------------------|
| PGP 9.5 | protein gene product 9.5         |
| QST     | Quantitative sensorische Testung |
| ROI     | Region of Interest               |
| SFN     | small fiber Neuropathie          |
| SNAP    | sensory nerve action potential   |
| vWF     | von-Willebrand-Faktor            |
| W       | Weiblich                         |

## **8 Danksagung**

Mein aufrichtiger Dank gilt den Menschen, die mich in der Durchführung und dem Abschluss meiner Dissertation unaufhörlich Unterstützt haben

Ich danke Frau Professor Dr. med Nurcan Üçeyler für das Überlassen des Dissertationsthemas, die intensive Betreuung sowohl in der klinischen als auch der laborchemischen Arbeit sowie die stetige Motivation im Verlauf der Dissertation

Ich danke Frau Professor Dr. med. Claudia Sommer, die mir sowohl in der Projektplanung als auch im Verlauf stets mit hilfreichen Ideen und Ratschlägen zur Seite stand

Ich danke allen Mitarbeitern der Histologie, insbesondere Sonja Mildner, Barbara Broll, Hiltrud Klüpfel und Kathleen Stahl für die Anleitung und Unterstützung in der Arbeit im Labor.

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Christoph Wanner für die Übernahme des Korreferats der Arbeit

Ich danke meiner Frau Charlotte Schröter für die ausdauernde Motivation und selbstlose Unterstützung

Ich danke meinen Eltern Carsten und Hanne Schröter sowie meiner Schwester Wiebke Schröter für die stete Unterstützung im Verlauf der Dissertation

## **Lebenslauf**

Geboren am 06.12.1987 in Marburg, Deutschland

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet, 1 Tochter

Ehefrau: Charlotte Schröter, Trainerin

im Weiterbildungswesen

Konfession: evangelisch

Eltern: Dr. Carsten Schröter, Arzt für

Neurologie

Dr. Hannelore Schröter,

Ärztin

Geschwister: Wiebke Schröter, geb. 07.09.1990

## **Ausbildungsdaten:**

08/1998 – 07/2007

Felix-Klein-

Gymnasium, Göttingen

*Allgemeine*

*Hochschulreife*

Notendurchschnitt:

1,6

04/2008 – 11/2014

Julius-Maximilians-

Universität Würzburg

*Humanmedizin*

Erster Abschnitt der

Ärztlichen Prüfung mit

der Note „gut“,

Erhalten der

Approbation mit der

Note 2,16

## Berufserfahrungen:

01/2015 – 08/2016

Universitätsklinikum,  
Würzburg  
Assistenzarzt und  
wissenschaftlicher  
Mitarbeiter an der  
Neurologischen Klinik  
und Poliklinik (Prof. J.  
Volkman)  
Mitarbeit in der  
Morbus Fabry  
Ambulanz  
Mitarbeit in dem  
Neuromuskulären  
Zentrum

Seit 9/16

Universitätsklinikum

Freiburg

Assistenzarzt und

wissenschaftlicher

Mitarbeiter an der

Neurologischen Klinik

(Prof. Dr. Weiller)

#### Spezifische Fortbildungen:

07/2011

Junge Neurologen  
(Deutsche  
Gesellschaft für  
Neurologie), Halle  
*Scientific Summer  
School*

08/2011 – 06/2012

Förderung durch  
Medizinisches  
Promotionsprogramm  
des  
Sonderforschungsber  
eichs 581: Die  
pathophysiologische  
Funktion von GB3-  
Ablagerungen im

Nervensystem bei  
Morbus Fabry  
(Betreuer: Frau  
Professor C.  
Sommer, Frau  
Professor E. Asan)

04/2011 – 08/2011  
Universität, Würzburg

Julius-Maximilians-

*Kurs Medical English*

04/2012

Graduate School of  
Life Sciences,  
Würzburg  
*Kurs zur Erstellung  
wissenschaftlicher  
Poster „Poster  
Design“*

## **Veröffentlichungen**

Üçeyler, N., Schröter, N., et al. (2016). „Skin Globotriaosylceramide 3 Load Is Increased in Men with Advanced Fabry Disease.“ PLoS ONE, 11(11).

Posterpräsentation beim Internationalen Symposium des SFB 581 in Würzburg (2012):  
“Is staining for deposits of globotriaosylceramide 3 in skin punch biopsies



useful for the diagnosis or prognosis in Fabry disease?" N. Schröter, N. Üçeyler, C. Sommer)

Posterpräsentation beim European Round Table on Fabry disease in Paris (2015) "GL-3 load in skin punch biopsies of patients with Fabry disease" Nils Schröter, Hans Guerrero, Claudia Sommer, Nurcan Üçeyler