

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. J. Volkmann

**Die Auswirkungen der X-Inaktivierung auf den
klinischen Phänotyp bei Patientinnen mit Morbus Fabry**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Laura Maria Wagenhäuser

aus Waldbüttelbrunn

Würzburg, August 2022

Referentin: Univ.-Prof. Dr. med. Nurcan Üçeyler
Koreferentin: Prof. Dr. Eva Klopocki
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21. März 2023

Vorwort

Es wurden bereits Teile der vorliegenden Arbeit veröffentlicht:

- Wagenhäuser L., Rickert V., Sommer C, Nordbeck P., Wanner C., Rost S. & Üçeyler N. 2022. X-chromosomal inactivation patterns in women with Fabry Disease. *Mol Genet Genomic Med.* 2022 Aug 16:e2029. doi: 10.1002/mgg3.2029. Im Druck.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	M. Fabry	1
1.1.1	Grundlagen	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Diagnostik	1
1.1.4	Einteilung der Gensequenzvarianten	2
1.1.5	Klinisches Bild	2
1.1.6	Therapie	4
1.2	X-Inaktivierung	4
1.2.1	Grundlagen	4
1.2.2	Gene mit X-Inaktivierung	5
1.2.3	Random und skewed X-Inaktivierung	6
1.2.4	X-Inaktivierung bei M. Fabry	6
1.3	Ziel der Arbeit	8
1.4	Hypothesen	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Studienkollektiv	9
2.2	Einteilung der Sequenzvarianten	9
2.2.1	Einteilung nach dem klinischen Phänotyp	9
2.2.2	Einteilung nach Pathogenitätsklasse	9
2.2.3	Einteilung nach Lage der Mutation im Enzym	10
2.3	Klinische Untersuchung, Laborparameter und Fragebögen	10
2.3.1	Kategorisierung der Nierenfunktion	10
2.3.2	Kategorisierung der Herzfunktion	11
2.3.3	Fabry-spezifische Laboruntersuchungen	11
2.4	Score für den klinischen Phänotyp	11
2.5	Biomaterial	11
2.5.1	Mundschleimhautabstriche	12
2.5.2	Blutentnahme	12
2.5.3	Hautstanzbiopsie	12
2.6	Hautfibroblastenkultur	13
2.6.1	Anlegen einer Hautfibroblastenkultur	13
2.6.2	Passagieren der Hautfibroblastenkultur	13

2.6.3	Ernte der Hautfibroblasten für die DNA-Isolierung.....	14
2.6.4	Erläuterung zur Fibroblastenkultur.....	14
2.7	DNA-Isolierung.....	14
2.7.1	Mundschleimhautabstriche.....	14
2.7.2	Blut.....	15
2.7.3	Hautfibroblasten.....	16
2.8	X-Inaktivierungsanalyse.....	16
2.8.1	Messung des DNA-Gehalts.....	17
2.8.2	Verdünnung der DNA-Proben.....	17
2.8.3	Restriktionsverdau der unmethylierten DNA.....	18
2.8.4	Polymerasekettenreaktion.....	19
2.8.5	Fragmentlängenanalyse.....	20
2.9	Berechnung des X-Inaktivierungsverhältnisses.....	21
2.10	Bestimmung des mutierten X-Chromosoms.....	22
2.11	Statistische Auswertung.....	23
3	Ergebnisse.....	23
3.1	Kohorte und Biomaterial.....	23
3.2	Klassifikation der Sequenzvarianten.....	26
3.3	Klinischer Phänotyp und Laborergebnisse der Studienkohorte.....	27
3.4	X-Inaktivierungsmuster und klinischer Phänotyp.....	28
3.4.1	X-Inaktivierungsmuster in Mundschleimhautepithel.....	29
3.4.2	X-Inaktivierungsmuster in Blut.....	29
3.4.3	X-Inaktivierungsmuster in Hautfibroblasten.....	32
3.5	Einfluss der Zellkultivierung auf X-Inaktivierungsmuster von Hautfibroblasten.....	33
3.6	X-Inaktivierung in den biologischen Replikaten.....	33
3.7	X-Inaktivierung in den technischen Replikaten.....	34
3.8	Intraindividuelle Variabilität der X-Inaktivierungsmuster.....	35
4	Diskussion.....	35
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	35
4.2	Einfluss des X-Inaktivierungsmuster auf den klinischen Phänotyp.....	36
4.3	Relevanz der Klassifikation von Sequenzvarianten.....	37
4.4	Stabilität der X-Inaktivierung über die Zeit.....	37
4.5	Reliabilität der verwendeten Methode.....	38
4.6	Intraindividuelle Variabilität der X-Inaktivierung zwischen verschiedenen Geweben.....	38

4.7	Kenntnis des Aktivierungsstatus des mutierten X-Chromosoms	38
4.8	Offene Fragen und Limitationen	39
4.9	Fazit und Ausblick	40
5	Zusammenfassung	41
6	Literaturverzeichnis	43

Appendix

I	Geräte, Material und Chemikalien
II	Abkürzungsverzeichnis
III	Abbildungsverzeichnis
IV	Tabellenverzeichnis
V	Danksagung
VI	Eigene Veröffentlichungen

1 Einleitung

1.1 M. Fabry

1.1.1 Grundlagen

Morbus Fabry ist eine X-chromosomal vererbte Krankheit, die erstmals 1898 von Anderson und Fabry unabhängig voneinander beschrieben wurde (Anderson, 1898; Fabry, 1898). Ursächlich für die Erkrankung sind Mutationen im α -Galaktosidase A Gen (*GLA*). Die daraus resultierende verminderte oder sogar fehlende Aktivität des lysosomalen Enzyms führt in den Zellen zu einem gestörten Glycosphingolipid-Stoffwechsel und damit zum verminderten Abbau von lysosomalem Globotriaosyl-Ceramid (Lyso-Gb3) (Germain, 2010). Durch die Akkumulation von Lyso-Gb3, die ubiquitär im Körper erfolgt (Askari et al., 2007; Rozenfeld et al., 2020), kommt es zu diversen zellulären Schädigungen und somit zur Manifestation als Multisystemerkrankung (Germain, 2010).

1.1.2 Epidemiologie

Die genaue Angabe einer Prävalenz für M. Fabry erweist sich als schwierig. Die Häufigkeit der Erkrankung bei Lebendgeburten variiert je nach untersuchtem Land und wird beispielsweise für die Niederlande mit 1:476.000 (Poorthuis et al., 1999) und für Australien mit 1:117.000 (Meikle et al., 1999) angegeben, wobei diese Zahlen wahrscheinlich zu gering sind, da sich diese Angaben nur auf Männer beziehen. Auch bei Studien, die versuchten die Prävalenz anhand von Neugeborenen-Screenings einzuschätzen, variiert diese je nach untersuchtem Land von 1:3.100 in Italien (Spada et al., 2006) bis 1:1.250 in Taiwan (Hwu et al., 2009) und 1:7.700 im Nordwesten Spaniens (Colon et al., 2017).

1.1.3 Diagnostik

Die Diagnose erfolgt bei Männern über die Bestimmung der reduzierten α -Galaktosidase-Aktivität im Blut aus Plasma oder Leukozyten. Daran schließt sich eine genetische Diagnostik zur Bestimmung der krankheitsverursachenden Variante an. Bei Frauen gelingt die Diagnose ausschließlich über eine genetische Testung, da die α -Galaktosidase-Aktivität meist im Normbereich liegt (Germain, 2010).

Ein weiterer Parameter, der meist zusätzlich aus dem Blut bestimmt wird, ist das Lyso-Gb3. Dieser Biomarker ist bei Fabry Patienten meist erhöht. Eine Erhöhung korreliert hierbei mit der Krankheitsschwere und wird als unabhängiger Risikofaktor für eine Aggravation der Erkrankung angesehen. Er wird allerdings auch zur Kontrolle des Therapieerfolges herangezogen (Germain, 2010).

1.1.4 Einteilung der Gensequenzvarianten

Die >900 verschiedenen Sequenzvarianten (Viggiano and Politano, 2021), die bereits bekannt sind, werden momentan in der Klinik über die Einteilung nach dem klinischen Phänotyp kategorisiert, den sie auslösen. Man unterscheidet die Kategorien klassisch, nicht klassisch (auch „late onset“ genannt) und „benign“ (Arends et al., 2017).

Des Weiteren gibt es eine neuere Einteilung für Missense-Sequenzvarianten. Hierbei wird die Stelle der Sequenzvariante im fertigen Enzym für die Einteilung herangezogen. Dadurch entstehen die Klassen „active site“, womit die Lokalisation der Variante nahe dem aktiven Zentrum der α -Galaktosidase gemeint ist, „buried“, bei der die Sequenzvariante zu einer gestörten Tertiärstruktur des Enzyms führt, und „other“, wobei diese Position geringere räumliche Auswirkungen auf das Enzym hat (Garman and Garboczi, 2004; Rickert et al., 2020).

Eine weitere Klassifikation, die in der humangenetischen Diagnostik verwendet wird, basiert auf den fünf Pathogenitätsklassen des „American College of Medical Genetics and Genomics“ (ACMG) (Richards et al., 2015). Die jeweilige Bedeutung dieser Klassen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Pathogenitätsklassen

1	Benign
2	Likely benign
3	VUS
4	Likely pathogenic
5	Pathogenic

Abkürzung: VUS: Variant of unknown significance.

Alle drei Klassifikationen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Näheres zu den Einteilungen siehe 2.2 Einteilung der Sequenzvarianten.

1.1.5 Klinisches Bild

Der klinische Phänotyp von M. Fabry kann in die zwei Kategorien klassisch und nicht klassisch unterteilt werden, wobei hier vor allem der Zeitpunkt der Erstmanifestation von Symptomen der ausschlaggebende Unterschied ist.

Der klassische Phänotyp beginnt in der Kindheit, wohingegen sich der nicht-klassische Typ meist erst in der Jugend manifestiert. Auch die Schwere der Krankheit ist bei der klassischen Form ausgeprägter, wobei die betroffenen Organsysteme und Symptome gleich sein können (Germain, 2010; Arends et al., 2017).

Die Organsysteme, die betroffen sein können, sowie die daraus folgenden Manifestationen sind in Tabelle 2 zusammengefasst:

Tabelle 2 Betroffene Organsysteme und Manifestationen bei M. Fabry

Organsystem	Manifestationen
Auge	Cornea verticillata
Herz	Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt
Haut	Angiokeratome Hypo- bis Anhidrosis
HNO	Tinnitus, Hörstürze
Niere	Niereninsuffizienz
PNS	Small fiber Neuropathie
ZNS	TIA, Schlaganfall

(erstellt nach Germain, 2010)

Abkürzungen: HNO: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde; PNS: peripheres Nervensystem; TIA: transitorische ischämische Attacke; ZNS: zentrales Nervensystem.

M. Fabry geht auch mit einer reduzierten Lebensqualität (Wilcox et al., 2008) und Lebenserwartung einher. Hier sind die Beteiligung von Herz und Nieren, die langfristig zu einer Insuffizienz führen, sowie eine zerebrale Manifestation ausschlaggebend (Mehta et al., 2004).

Dass auch Frauen von dieser X-chromosomalen Erkrankung betroffen sind, ist bereits lange bekannt. Allerdings variiert der klinische Phänotyp und die Schwere der Erkrankung unter den Frauen, sowie im Vergleich zu Männern stark. Die Erstmanifestation ist später und die Häufigkeit der Symptome ist geringer als bei betroffenen Männern (Wilcox et al., 2008). Der Grund dafür, dass Frauen überhaupt betroffen sind und die erhebliche Varianz bezüglich ihrer Krankheitsschwere, könnte auf

eine Veränderung in der X-Inaktivierung der Frauen zurückzuführen sein (Dobrovoly et al., 2005; Echevarria et al., 2016), welche in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet wurde.

1.1.6 Therapie

Seit 2001 gibt es die Möglichkeit das Enzym α -Galaktosidase A mittels einer Infusion alle 2 Wochen zu ersetzen. Hierfür stehen zwei rekombinante Enzympräparate zur Verfügung: Agalsidase- α und Agalsidase- β (Germain, 2010).

Der klinische Nutzen der beiden Medikamente wurde in mehreren Studien nachgewiesen (Lidove et al., 2010; El Dib et al., 2017; Eng et al., 2001a; Eng et al., 2001b; Schiffmann et al., 2001), wobei eine Überlegenheit einer der beiden Substanzen bezogen auf die klinische Ereignisrate nicht festgestellt wurde (Arends et al., 2018). Insgesamt wirkt sich die Enzymersatztherapie nachweislich positiv auf eine weitere Progression der Organmanifestationen (Germain, 2010), sowie die Inzidenz von renalen, kardiovaskulären und zerebrovaskulären Ereignissen aus (El Dib et al., 2017).

Eine weitere Therapie ist seit 2016 für ausgewählte Missense-Sequenzvarianten zugelassen, die für schätzungsweise 35-50% der Patienten in Frage kommt (Hughes et al., 2017). Hierbei handelt es sich um eine orale Therapie, die alle zwei Tage eingenommen wird und ein Chaperon beinhaltet, welches das Enzym stabilisiert und so seine Aktivität verbessert (McCafferty and Scott, 2019; Feriozzi and Hughes, 2020). Der positive Nutzen dieser Therapie auf u.a. die kardiale und renale Organmanifestation, sowie der Effekt des reduzierten Lyso-Gb3-Spiegels und die gesteigerte Enzymaktivität, wurde in mehreren Studien belegt (Germain et al., 2016; Hughes et al., 2017; Germain et al., 2019; Lenders et al., 2020).

1.2 X-Inaktivierung

1.2.1 Grundlagen

Die X-Inaktivierung (XCI) ist der Ausdruck einer Dosiskompensation in weiblichen Säugetieren, die früh in der embryonalen Entwicklung weiblicher Individuen geschieht. Bereits 1961 postulierte Mary Frances Lyon, dass eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Zellen inaktiviert ist. Dabei stützte sie sich u.a. auf die zytologischen Beobachtungen von Murray Llewellyn Barr, der in Interphase Zellkernen von weiblichen Säugetieren stark anfärbbares Chromatin fand, das in männlichen Individuen fehlte (Graw, 2015; Lyon, 1961; Barr and Bertram, 1949).

Hierbei handelte es sich um das heute als Barr-Körperchen bekannte Geschlechtschromatin, welches das inaktivierte X-Chromosom repräsentiert. Das auch als Heterochromatin bezeichnete Material ist genetisch inaktiv (Graw, 2015).

Der Mechanismus dieser Inaktivierung wird durch das X-chromosomale Inaktivierungszentrum (Xic) gesteuert, das vier Gene enthält. Eines davon ist das Gen *Xist* (engl. X inactive specific transcript), dessen RNA allerdings nicht translatiert wird und der Funktionalität von Xic dient. Die anderen Genprodukte dienen der Expression von *Xist*. Aus verschiedenen Modellen lässt sich schließen, dass der Beginn des Inaktivierungsprozesses mit der Menge an *Xist*-Transkripten korreliert. Diese *Xist*-Transkripte lagern sich an das Chromatin des X-Chromosoms an und führen über Rekrutierung weiterer Faktoren schließlich zur Abschaltung der Transkription, Modifikation des Chromatins, Acetylierung und Methylierung von Histonen und somit zur Inaktivierung dieses X-Chromosoms (Graw, 2015).

Dieser Prozess findet in der frühen embryonalen Entwicklung statt, aber nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt, d.h. in verschiedenen Zellen kann dieser variieren. Auch ist der Vorgang irreversibel, das bedeutet, dass das bestehende XCI-Muster an alle Tochterzellen und die darauffolgenden Zellpopulationen weitergegeben wird (Graw, 2015).

Ebenso ist die Entscheidung darüber welches X-Chromosom inaktiviert wird, maternales oder paternales, zufällig, sodass ein Mosaik aus aktiven Zellen entsteht, die das maternale oder das paternale X-Chromosom verwenden. Im Phänotyp sichtbar wird dieses Mosaik aus verschiedenen X-inaktivierten Zellen bei einigen X-chromosomal vererbten Erkrankungen, wie beispielsweise Chondrodysplasia punctata, Incontinentia pigmenti oder fokale dermale Hypoplasie. Hier werden durch die mit der Krankheit einhergehenden Hautveränderungen die Blaschko-Linien sichtbar (Happle, 2002). Ein weiteres Beispiel aus der Tierwelt ist die gefleckte Fellfarbe einer weiblichen Katze, da die Information für die Fellfarbe ebenfalls auf dem X-Chromosom codiert ist (Graw, 2015).

1.2.2 Gene mit X-Inaktivierung

Allerdings werden nicht alle Gene auf dem X-Chromosom inaktiviert. 15% der Gene sind von der Inaktivierung ausgenommen, dazu gehören vor allem Gene am äußersten Ende des kurzen Arms und einige andere Genorte (Berletch et al., 2011; Graw, 2015), die in Abbildung 1 dargestellt sind. Dies lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass der kurze Arm des X-Chromosoms evolutionär später hinzugekommen ist (Graw, 2015), sowie dadurch, dass einige dieser aktiven Gene ein Korrelat auf dem Y-Chromosom haben (Knippers, 2006).

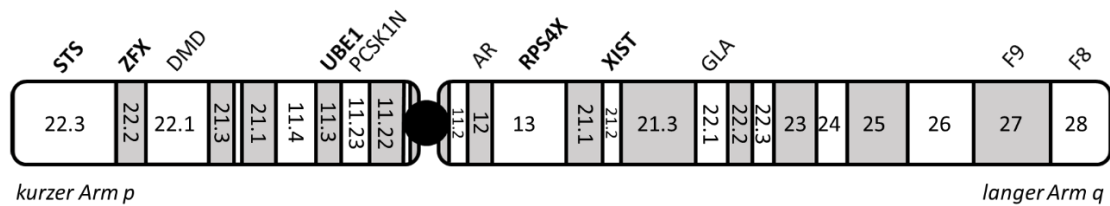


Abbildung 1 X-Chromosom mit einigen Genen

Die fettgedruckten Gene entziehen sich der X-Inaktivierung und werden exprimiert (modifiziert nach Knippers, 2006).

Abkürzungen: AR: Androgenrezeptor; DMD: Duchenne Muskeldystrophie; F8: Gerinnungsfaktor 8; F9: Gerinnungsfaktor 9; GLA: α -Galaktosidase A; PCSK1N: Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Typ 1 Inhibitor; RPS4X: ribosomales Protein S4 X-chromosomal; STS: Steroidsulfatase; UBE1: Ubiquitinaktivierendes Enzym E1; XIST: X inactive specific transcript; ZFX: Zink-Finger-Protein.

Für die Analyse der XCI wurden die Gene für den Androgen-Rezeptor (*AR*) (Allen et al., 1992) und das Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Typ 1 Inhibitor (*PCSK1N*) (Bertelsen et al., 2011) herangezogen, die der Inaktivierung unterliegen. Beide Gene liegen auf dem X-Chromosom auf verschiedenen Armen. *AR* liegt auf dem langen Arm q12 und *PCSK1N* auf dem kurzen Arm p11.23. Im Vergleich dazu liegt das Gen *GLA*, wie *AR*, auf dem langen Arm q22.1 (UCSC Genome Browser Uni California).

1.2.3 Random und skewed X-Inaktivierung

Die XCI erfolgt normalerweise zufällig, d.h. es gibt keine Präferenz für das maternale oder paternale X-Chromosom, sodass ein Mosaik mit einer Zellpopulation entsteht, das nahezu 50% das maternale und zu 50% das paternale X-Chromosom verwendet. Diese Situation wird als „random“ bezeichnet. Weicht das XCI-Muster zu einer Seite ab, d.h. ist das X-Chromosom eines Elternteils vermehrt aktiv, spricht man von „Skewing“ (Viggiano and Politano, 2021). Die Definition, ab wann ein Verhältnis als „skewed“ zu bezeichnen ist, wird in der Literatur unterschiedlich definiert (vgl. Tabelle 3).

1.2.4 X-Inaktivierung bei M. Fabry

Für einige X-chromosomal vererbte Erkrankungen ist schon länger bekannt, dass auch Frauen von der Krankheit betroffen sein können, beispielsweise bei der Duchenne Muskeldystrophie (Matthews et al., 1995; Mercier et al., 2013; Viggiano et al., 2016) oder bei Hämophilie A und B (Garagiola et al., 2021). Der Grund hierfür ist ein „Skewing“ im XCI-Muster, das dazu führt, dass bei den Konduktorinnen auch Krankheitssymptome auftreten, wenn das X-Chromosom mit der Mutation im entsprechenden Gen aktiv ist. Dies ist in Abbildung 2 veranschaulicht: eine Zelle, in der das X-Chromosom ohne Mutation aktiv ist, ist gesund daher grün. Eine Zelle, in der wiederum das X-Chromosom mit der Mutation aktiv ist, wird krankheitsspezifische Fehlfunktionen aufweisen und ist

daher im Schaubild rot dargestellt. Betrachtet man alle Zellen im Körper zusammen entsteht so ein Mosaik aus kranken und gesunden Zellen, das je nach X-Inaktivierungsverhältnis zu einem krankheitsspezifischen Phänotyp der Frau führt.

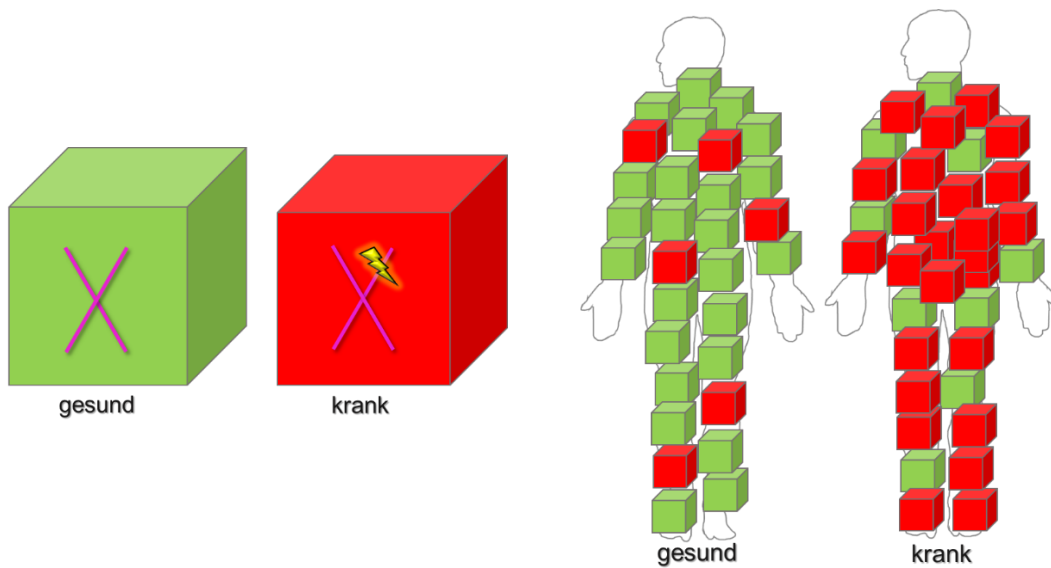


Abbildung 2a Auswirkung der X-Inaktivierung auf die Zelle
(modifiziert nach Viggiano, 2021)

Abbildung 2b X-Inaktivierungsmosaik der Zellen im Körper und Auswirkung auf den Phänotyp
(modifiziert nach Viggiano, 2021)

Für M. Fabry wurde beobachtet, dass Frauen ebenfalls in verschiedenen Schweregraden von der Krankheit betroffen sein können. Allerdings haben Studien, die das X-Inaktivierungsverhältnis von Patientinnen mit ihrem klinischen Phänotyp verglichen, bisher zu verschiedenen Ergebnissen der Korrelation beider Parameter geführt. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über bereits durchgeführte Studien:

Tabelle 3 Übersicht über Studien zur X-Inaktivierung bei M. Fabry

Studie	Anzahl der Patienten	Untersuchtes Gewebe	XCR Grenzen	Korrelation
Rossanti et al., 2021	9	Leukozyten aus peripherem Blut; Urin	$\geq 80:20$ skewed $\geq 90:10$ extremely skewed	nein
Hossain et al., 2019	36	Blut; Leukozyten aus peripherem Blut	keine Grenze definiert	ja
Juchniewicz et al., 2018	12	Speichel	$\geq 75:25$ skewed	nein
Echevarria et al., 2016	56	Mundschleimhautabstrich; Urin; 2 Hautbiopsien; EDTA-Blut	$\geq 75:25$ skewed $\geq 90:10$ highly skewed	ja
Dobrovolya et al., 2015	39	Leukozyten aus peripherem Blut; kultivierte Hautfibroblasten	$\geq 75:25$ skewed	ja
Elstein et al., 2012	77	Leukozyten aus peripherem Blut	$\geq 75:25$ skewed $\geq 80:20$ highly skewed	nein

Abkürzungen: EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; XCR: X-Inaktivierungsverhältnis.

1.3 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Studie war es zu prüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen dem X-Inaktivierungsverhältnis (XCR) bei Patientinnen mit M. Fabry und ihrem klinischen Phänotyp gibt, sowie die Nutzung dieser möglichen Beziehung zur Vorhersage des individuellen Krankheitsverlaufes und damit der Therapieplanung. Dabei stand auch im Fokus ein geeignetes, repräsentatives Biomaterial für die X-Inaktivierungsanalyse zu finden, das sich auch im klinischen Alltag praktikabel asservieren lässt.

1.4 Hypothesen

In der Studie wurden folgende Hypothesen überprüft:

- Der Grad der X-Inaktivierung in Frauen mit M. Fabry korreliert mit deren klinischem Phänotyp und der Symptomausprägung.
- Das bedeutet, dass eine Frau mit einem XCR $\geq 75:25$ mehr von der Krankheit betroffen ist als eine Frau mit einem niedrigerem XCR.

2 Material und Methoden

Wenn nicht an entsprechender Stelle erwähnt, wurden alle Methoden von der Autorin selbst durchgeführt.

2.1 Studienkollektiv

Zwischen August 2018 und März 2020 wurden 154 StudienteilnehmerInnen prospektiv rekrutiert. Dabei erfolgte die Rekrutierung sowohl aus dem stationären bzw. ambulanten Bereich des Fabry Zentrums für interdisziplinäre Therapie (FAZIT) der Uniklinik Würzburg, als auch postalisch nach vorheriger telefonischer Information. Die Studienteilnahme erfolgte freiwillig. Die Aufklärung erfolgte mündlich und schriftlich. Eine schriftliche Einverständniserklärung der PatientInnen, sowie ein positives Ethikvotum für die Studie liegt vor (#259/17).

Die Studienkohorte besteht aus 104 Frauen mit genetisch gesichertem M. Fabry und 50 Männern, aus dem Verwandtenkreis der Teilnehmerinnen. Das bedeutet, bevorzugt ein verwandter Mann ersten Grades mit bekanntem Krankheitsstatus, um in der späteren Analyse das X-Chromosom mit der Mutation zu identifizieren.

2.2 Einteilung der Sequenzvarianten

Die Genotypen der StudienteilnehmerInnen lagen bei Erstvorstellung im FAZIT vor, entweder durch Vorbefunde der PatientIn oder durch humangenetische Bestimmung (Centogene, Rostock, Deutschland). Für die genauere Einschätzung der Auswirkung der Sequenzvarianten auf den Phänotyp wurden diese anhand von drei Systemen kategorisiert.

2.2.1 Einteilung nach dem klinischen Phänotyp

Hierfür wurden die überprüften Sequenzvarianten in die Datenbank „International Fabry Disease Genotype Phenotype Database“ (www.dbfgp.org) eingegeben und die Einteilung in die Phänotypen „benign“, „later onset“, „classic“ oder „variant of unknown significance“ (VUS) übernommen (Arends et al., 2017).

2.2.2 Einteilung nach Pathogenitätsklasse

Die Einteilung der Pathogenitätsklassen wurde mittels des Programms Alamut visual Version 2.11 (Interactive Biosoftware, Rouen, Frankreich) bestimmt. Hierfür wurde die in der Krankenakte der Patientin dokumentierte Sequenzvariante eingegeben und die Korrektheit der Schreibweise überprüft, sowie gegebenenfalls korrigiert. Der jeweilige Eintrag in Alamut wurde dann zur Kategorisierung der Sequenzvariante in die Klassen 1-5 nach ACMG herangezogen (Richards et al., 2015) (siehe Tabelle 1).

Für die Klasseneinteilung wurden die Informationen des Eintrags über die Häufigkeit der Sequenzvariante in verschiedenen Populationen, Mutationsdatenbanken, Vorhersagewerkzeuge zu den Änderungen der Variante und Literaturinformationen verwendet.

Zusätzlich wurde noch die Klasse 3+ eingeführt (Kolokotronis et al., 2020). Hierzu wurden Mutationen gezählt, bei denen in Alamut kein Eintrag bezüglich des Phänotyps vorlag, die Art der Mutation bzw. weitere Informationen des Eintrags allerdings eine pathologische Auswirkung auf diesen stark vermuten lässt.

2.2.3 Einteilung nach Lage der Mutation im Enzym

Die Einteilung von Missense-Sequenzvarianten nach ihrer Lage im gefalteten Enzym ist noch relativ neu und beruht auf Garman and Garboczi (2004) und Rickert et al. (2020). Hierbei wurde die 3D-Struktur der α -Galactosidase aus der Protein-Datenbank (Garman, 2003) in das Programm „PyMOL molecular graphics system Version 1.8“ (Schrödinger®, New York, New York, USA) geladen und die Position der Mutation im fertig gefalteten Enzym bestimmt. Je nach Position erfolgte die Einteilung der Mutation in die Klassen „active site“, „buried“ oder „other“.

2.3 Klinische Untersuchung, Laborparameter und Fragebögen

Alle Patientinnen wurden sowohl klinisch internistisch, als auch neurologisch untersucht, sowie Laboruntersuchungen einschließlich renaler und kardialer Parameter durchgeführt. Zusätzlich wurden folgende Untersuchungen bei jeder Patientin angestrebt: eine transthorakale Echokardiographie (TTE), eine Elektrokardiographie (EKG), eine Elektroneurographie (ENG), eine quantitative sensorische Testung (QST) und die Erhebung des Würzburger Fabry Schmerzfragebogens (Üçeyler et al., 2014). Je nach Indikation erfolgten zur Ergänzung noch eine kraniale Magnetresonanztomographie (MRT), ein Kardio-MRT oder eine Hautstanzbiopsie zur Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte.

Des Weiteren wurden transiente ischämische Attacken (TIA) und Schlaganfälle (Stroke) in der Anamnese der Patientinnen als Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS) gewertet. Die Diagnose einer Small Fiber Neuropathie (SFN) erfolgte anhand der bekannten Kriterien (Devigili et al., 2008).

2.3.1 Kategorisierung der Nierenfunktion

Die Nierenfunktion wurde mittels der Albuminurie kategorisiert, die anhand des Albumin-Kreatinin-Quotienten im Morgenurin bestimmt wurde. Die Einteilung erfolgte nach den Vorgaben der Organisation „Kidney Disease-Improving Global Outcomes“ (KDIGO). Eine Albuminurie ab ≥ 30 mg/g, entsprechend A2, wurde als Nephropathie gewertet

(Rickert et al., 2020). Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wurde nach der Formel der „Chronic kidney disease epidemiology collaboration“ (CKD-EPI) berechnet und ebenfalls nach KDIGO eingestuft.

2.3.2 Kategorisierung der Herzfunktion

Die Herzfunktion wurde mittels der linksventrikulären Hypertrophie im TTE, Late Gadolinium Enhancement (LGE) im MRT bewertet. Die linksventrikuläre Hypertrophie wurde anhand der septalen Wanddicke oder des linksventrikulären Massenindex (LVMI), die beide mittels TTE bestimmt wurden, eingeteilt. Eine septale Wanddicke über ≥ 12 mm oder eine LVMI ≥ 95 g/m² wurde als Kardiomyopathie gewertet. Für das LGE wurde Menge und Lokalisation der Aufnahme des Kontrastmittels im Kardio-MRT kategorisiert. Eine intramurale, transmurale oder über 2 Segmente verteilte LGE wurde als Kardiomyopathie angesehen (Rickert et al., 2020).

2.3.3 Fabry-spezifische Laboruntersuchungen

Die α -Galaktosidase-Aktivität (GLA) wurde in Leukozyten gemessen (Podskarbi Laboratory, München, Deutschland; Referenzbereich: [0,4-1,0 nmol/min/mg] oder [>5 nmol/h/ml]). Die Plasmakonzentration von Gb3 wurde von Centogene (Rostock, Deutschland) mittels Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie bestimmt (Referenzbereich: [$<0,9$ ng/ml]).

2.4 Score für den klinischen Phänotyp

Um die Beteiligung der wichtigsten Organsysteme abzubilden, berechneten wir einen Score, der den Schweregrad des klinischen Phänotyps in Bezug auf die Symptome darstellen soll. Hierfür wurde die Beteiligung von Nieren, Herz, ZNS und die Angabe von Schmerzen im Würzburger Fabry Schmerzfragebogen mit jeweils einem Punkt bewertet. Der Score besteht aus vier Kategorien mit 0 Punkten= keine, 1 Punkt= milde, 2 Punkte= moderate, ≥ 3 Punkte= schwere klinische Symptomatik.

2.5 Biomaterial

Es wurde angestrebt von jeder Patientin möglichst alle drei Gewebe - Mundschleimhautepithel, Blut und Hautfibroblasten - zu asservieren, sofern die Einwilligung der StudienteilnehmerInnen vorlag. Von den Männern wurde nur Mundschleimhautepithel asserviert. Bei Frauen wurden zusätzlich sogenannte biologische Replikate von Mundschleimhautepithel und Blut gesammelt. Das heißt, es erfolgte eine erneute Probenasservierung bei Wiedervorstellung im FAZIT während des Studienzeitraums.

2.5.1 Mundschleimhautabstriche

Die Mundschleimhautabstriche zur Gewinnung von Epithelzellen wurden mittels FLOQ Swabs® (Copan Diagnostics Inc., Brescia, Italien), sowohl bei Patientinnen als auch bei den männlichen Verwandten, durchgeführt. Hierzu wurde ein standardisiertes Vorgehen festgelegt (siehe Appendix 1), um eine möglichst hohe Zahl an Epithelzellen zu erhalten. Es wurden jeweils zwei Abstriche pro Person durchgeführt und anschließend 30 min getrocknet, um die Haltbarkeit bis zur Weiterverarbeitung zu verbessern. Die Isolation der Desoxyribonukleinsäure (DNA) musste auf Grund der bakteriellen Kontamination möglichst zeitnah erfolgen, da sonst die Ausbeute an DNA sinkt.

2.5.2 Blutentnahme

Für die Gewinnung von DNA aus Blut wurde eine Blutentnahme bei den Patientinnen in ein 2,7 ml Ethylendiamintetraessigsäure-Röhrchen (EDTA) durchgeführt. Das Blut wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.5.3 Hautstanzbiopsie

Für die Gewinnung von DNA aus Hautfibroblasten wurde nach Einwilligung der Probandin eine Hautstanzbiopsie ca. 10 cm oberhalb des Malleolus lateralis durchgeführt. Zuvor wurden Kontraindikationen wie eine Allergie auf Lokalanästhetika, Wundheilungsstörung oder die Einnahme von Blutverdünnern ausgeschlossen. Die Biopsie wurde mit einer Stanze von 6 mm Durchmesser (Kai Industries Co. Ltd., Seki City, Gifu, Japan) nach vorheriger Sprühdesinfektion (Schülke GmbH, Norderstedt, Deutschland) unter Mecain [10 mg/ml] Lokalanästhesie (Puren Pharma GmbH & Co. KG, München, Deutschland) durchgeführt. Das Biopsat wurde mittels eines Skalpell (Braun, Melsungen, Deutschland) in der Subkutis abgetrennt und die Wunde mit sterilen Heftpflastern (Smith&Nephew, Medical Limited, London, England) und einem Hautpflaster (BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) versorgt. Anschließend wurde das Hautstück steril geteilt, wobei eine Hälfte zur diagnostischen Bestimmung der Nervenfaserdichte asserviert wurde, die andere Hälfte wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit Fibroblastenmedium (Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) verbracht und zur Kultivierung von Fibroblasten weiterverwendet. Vorversuche, die DNA direkt aus dem Biopsat zu isolieren führten zu einer zu niedrigen DNA-Konzentration im Isolat, welche für die weitere Analyse nicht ausreichte. Die Gewinnung und Kultivierung erfolgte teils modifiziert im Vergleich zu den zuvor veröffentlichten Vorgehensweisen (Üçeyler et al., 2010; Karl et al., 2019).

2.6 Hautfibroblastenkultur

Die Kultivierung der Hautfibroblasten wurde freundlicherweise von unserer Biologie-Laborantin Daniela Urlaub übernommen.

2.6.1 Anlegen einer Hautfibroblastenkultur

Das zuvor in ein Zentrifugenröhrchen mit Fibroblastenmedium überführte Hautbiopsat wurde zuerst in eine Petrischale gegossen, um anschließend mittels einer Pinzette und Skalpell die Dermis abzupräparieren und diese in mehrere kleine Stücke zu schneiden. Diese Stücke wurden auf dem Boden einer 25 cm² Zellkulturflasche (Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich) verteilt und die Flasche mit 500 µl Fibroblastenmedium befüllt, sodass die Biopsate von Flüssigkeit benetzt waren. Anschließend wurden die Flaschen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank (Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA) inkubiert.

2.6.2 Passagieren der Hautfibroblastenkultur

Sobald um die Hautstücke herum großflächig Fibroblasten gewachsen waren, wurde der Inhalt auf eine 75 cm² Flasche aufgeteilt. Hierfür wurde zuerst das Fibroblastenmedium und das Waschmedium DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA) im Wasserbad (A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland) auf 37°C erwärmt. Dann wurde das Kulturmedium aus der Flasche abgesaugt und 1,5 ml vom Enzym TrypLE (Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA) dazugegeben, um die Zellen von der Flasche zu lösen. Nach leichtem Schwenken der Flasche zur Durchmischung des Inhalts, wurde die Flasche für 10 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde unter dem Mikroskop (Olympus AG, Shinjuku, Tokio, Japan) kontrolliert, ob sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst haben, bevor 10 ml des Waschmediums DMEM/F12 zur Kulturfalsche gegeben wurden. Falls sich die Zellen nach 10 min noch nicht gelöst haben, wurden sie nochmals im Brutschrank inkubiert. Der Inhalt der Flasche wurde nun in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g für 10 min zentrifugiert (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Währenddessen wurden je 4 ml Fibroblastenmedium in die drei neuen Flaschen gefüllt und im Brutschrank bei 37°C zwischengelagert. Als nächstes wurde der Überstand aus den zentrifugierten Röhrchen abgesaugt und das so erhaltene Pellet in 3 ml Fibroblastenmedium resuspendiert. Die so entstandene Suspension wurde nun auf die vorbereiteten Kulturflaschen verteilt. Die weitere Kultivierung der Fibroblasten erfolgte im Brutschrank bei 37°C und unter 5% CO₂.

2.6.3 Ernte der Hautfibroblasten für die DNA-Isolierung

Wenn die 75 cm² Flasche (Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich) zu 95% konfluent mit Fibroblasten bewachsen war, wurden die Fibroblasten geerntet und für die spätere DNA-Isolierung asserviert. Hierfür wurde das Kulturmedium aus der Flasche abgesaugt und 4,5 ml des Enzyms TrypLE zugegeben, um die Zellen von der Flasche zu lösen. Die Flasche wurde leicht geschwenkt und anschließend für 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Kontrolle der Ablösung unter dem Mikroskop wurden die Zellen mittels 10 ml Fibroblastenmedium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation des Röhrchens bei 300 g für 5 min wurde der entstandene Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das Pellet mit 10 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) resuspendiert und das Zentrifugenröhrchen nochmals bei 300 g für 5 min zentrifugiert, um das Kulturmedium auszuwaschen. Abschließend wurde das überstehende PBS möglichst vollständig abgesaugt und das Fibroblasten-Pellet im Zentrifugenröhrchen für die spätere DNA-Isolierung bei -20°C eingefroren.

2.6.4 Erläuterung zur Fibroblastenkultur

Die erste Passage p1 entspricht stets der ersten 25 cm² Zellkulturflaschen, die aus dem ursprünglichen Hautbiopsat angelegt wird. Die erste 75 cm² Flasche, die mit Fibroblasten aus p1 angesetzt wurde, entspricht dann p2. Mit jedem Ansetzen einer neuen 75 cm² Flasche erhöhte sich die Passage. Es wurde stets angestrebt, Hautfibroblasten der Passage p2 für die DNA-Isolierung zu verwenden. Allerdings waren von vielen Patientinnen nur Hautfibroblasten höherer Passagen asserviert, sodass hier die niedrigste erhältliche Passage genommen wurde.

2.7 DNA-Isolierung

Aus den bereits genannten asservierten Biomaterialien wurde mit Hilfe des QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) DNA isoliert. Hierfür wurde je nach vorliegendem Material ein anderes Isolationsschema verwendet, sowie die Anleitung des Herstellers leicht modifiziert, um die Ausbeute an DNA zu erhöhen.

2.7.1 Mundschleimhautabstriche

Für die Isolation der DNA aus dem Mundschleimhautabstrich sollte dieser möglichst frisch sein, denn je älter er ist desto weniger DNA ist auf Grund bakterieller Kontamination vorhanden. Zuerst wurden die Mundabstriche mittels einer Schere, die zuvor mit vergälltem Ethanol gereinigt wurde, um die Kontamination mit anderer DNA zu verhindern, einige mm vor dem Tupfer abgeschnitten und in ein 2 ml Eppendorf Cap überführt. Das Gleiche wurde mit dem zweiten Abstrich der gleichen Person

durchgeführt, sodass zwei Caps für eine Isolierung verwendet wurden. In die Caps wurden jeweils 400 µl PBS, 20 µl Proteinase K und 200 µl des Lysepuffers AL dazu pipettiert. Anschließend wurden beide Caps gevortext (A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland), zentrifugiert und bei 56°C für 15 min im Heizblock inkubiert. Nach vorherigem Abzentrifugieren wurden die Mundschleimhautabstriche mittels einer mit Ethanol gereinigten Pinzette in jeweils einen DNA IQ™ Spin Baskets (Promega, Madison, Wisconsin, USA), die in 2 ml Eppendorf Caps gesetzt wurden, überführt. Daraufhin wurden die Abstriche 2 min bei 6.000 g zentrifugiert, um die DNA-haltige Restflüssigkeit im Tupfer zu gewinnen und die DNA-Ausbeute so zu erhöhen. Die so erhaltene Restflüssigkeit wurde in das jeweilige Cap zurück pipettiert. Als nächstes wurden jeweils 400 µl absolutes Ethanol zu beiden Caps hinzugefügt und leicht geschüttelt. Anschließend wurden nach und nach die Probeflüssigkeiten beider Abstriche auf eine Säule pipettiert. Hierfür wurden maximal 650 µl auf die Säule pipettiert, 1 min bei 6.000 g zentrifugiert und das Sammelröhrchen gewechselt. Dies wurde insgesamt viermal wiederholt, bis die gesamte Probeflüssigkeit beider Caps über die Säule gelaufen ist. Danach wurde 500 µl des Waschpuffers AW1 auf die Säule gegeben und 1 min bei 6.000 g zentrifugiert. Nach Wechsel des Sammelröhrchens wurden 500 µl des Waschpuffers AW2 auf die Säule pipettiert und erneut 3 min bei 20.000 g zentrifugiert. Nach erneutem Wechsel des Sammelröhrchens wurde die Säule für 1 min bei 2.817 g zentrifugiert und anschließend die Säule in einen 1,5 ml Eppendorf-Cap gesteckt. Nach 5 min trocknen an Raumluft mit geöffnetem Deckel wurden 50 µl des Puffers AE, der aus Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) und EDTA besteht, auf die Säule gegeben. Hierfür wurde AE zuvor im Heizblock auf 70°C erwärmt. Nachdem die Säule weitere 5 min mit geöffnetem Deckel an der Luft stand, wurde die Säule abschließend 1 min bei 20.000 g zentrifugiert. Danach wurde die Säule verworfen und der Tube mit der extrahierten DNA bei -20°C eingefroren.

2.7.2 Blut

Als erstes wurden 20 µl Proteinase K in ein 2-ml Eppendorf Cap pipettiert. Anschließend wurden nach vorherigem Auftauen und Resuspendieren 200 µl EDTA-Blut und 200 µl Lysepuffer AL dazu pipettiert. Nun wurde der Inhalt des Caps durch leichtes Schütteln gemischt und dann in der Tischzentrifuge (Heathrow Scientific®, Vernon Hills, Illinois, USA) abzentrifugiert. Danach wurden die Caps für 15 min bei 56°C im Heizblock (Biosan Ltd, Riga, Lettland) inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden 200 µl absolutes Ethanol hinzugefügt und das Cap leicht geschüttelt und abzentrifugiert. Anschließend wurden 630 µl der Probe auf eine vorbereitete Säule pipettiert und 1 min bei 6.000 g zentrifugiert (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Nachdem die Probe in ein neues Sammelröhrchen gesteckt wurde, wurden 500 µl des Waschpuffers AW1 hinzugefügt

und die Säule 1 min bei 6.000 g erneut zentrifugiert. Vor der Zugabe von 500 µl des Waschpuffers AW2 wurde die Säule in ein frisches Sammelröhrchen gesteckt. Danach wurde die Probe erneut 3 min bei 20.000 g zentrifugiert. Hierauf wurde das Sammelröhrchen nochmals gewechselt und die Probe 1 min bei 2.817 g zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf Cap eingesetzt und 5 min bei geöffnetem Deckel getrocknet, sodass das Ethanol verdampfen kann. Nach hinzufügen von 60 µl Puffer AE, das zuvor auf 70°C im Heizblock erwärmt wurde, wurde der Tube weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde der Cap 1 min bei 20.000g zentrifugiert und die Säule entfernt. Die Probe mit der isolierten DNA befand sich nun im Cap und wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.7.3 Hautfibroblasten

Zur Isolation der Hautfibroblasten-DNA wurden die zuvor eingefrorenen Hautfibroblastenproben aufgetaut und ein möglicher Überstand über dem Pellet vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde anschließend in 200 µl PBS überführt und damit wie im Blutprotokoll (siehe Kapitel 2.7.2 Blut) weiterverarbeitet. Das heißt statt den 200 µl EDTA-Blut wurden 200 µl Fibroblasten in PBS eingesetzt. Allerdings wird die Hautfibroblasten-DNA abschließend in nur 50 µl Puffer AE gelöst.

2.8 X-Inaktivierungsanalyse

Es gibt drei verschiedene Ansätze, um XCI-Muster zu bestimmen. Sie basieren auf der Methylierung des X-Chromosoms, der Expression von Polymorphismen oder der Analyse der DNA-Replikationszeit (Vacca et al., 2016).

In der vorliegenden Studie wurde die auf der unterschiedlichen Methylierung der beiden X-Chromosomen beruhende Methode des HUMARA-Assays (engl. Human Androgen Receptor methylation analysis) verwendet. Hierbei wird nach Verwendung einer Methyl-CpG-sensitiven Restriktionsendonuclease eine Polymerasekettenreaktion (PCR) für Polymorphismen der Short Tandem Repeats im Gen *AR* durchgeführt. Dies erfolgt unter der Annahme, dass der Methylierungsstatus der *AR* Allele dem des ganzen X-Chromosoms entspricht (Vacca et al., 2016).

Die verwendeten Methoden und Primer entsprechen mit einigen Modifikationen den vorgeschriebenen zur X-Inaktivierungsanalyse (Allen et al., 1992; Bertelsen et al., 2011). Bei jeder X-Inaktivierungsanalyse wurden zusätzlich zu den DNA-Proben der PatientInnen jeweils eine gesunde weibliche, sowie männliche Kontrolle und eine erkrankte weibliche Patientin mit einer 100% XCI analysiert, um den regelrechten Ablauf der Analyse zu überprüfen. Die Reliabilität des Verfahrens und somit die Vergleichbarkeit der Daten zwischen den einzelnen Analysen wurde mittels technischer Replikate

nachgewiesen, hierfür wurden Proben ein zweites oder drittes Mal analysiert und die XCR der Analysen verglichen.

2.8.1 Messung des DNA-Gehalts

Für die Analyse der XCI wurde zuerst der DNA-Gehalt in den DNA-Proben gemessen, die zuvor aus den asservierten Biomaterialien isoliert wurden. Hierfür wurde der Qubit Fluorometer verwendet (Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA). Dabei wurden alle Proben zuerst mit dem Qubit dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit (Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA) gemessen, das eine Detektionsspanne von 0,2-100 ng hat. Wenn der DNA-Gehalt über dieser Grenze lag, wurde die Probe mit dem Qubit dsDNA Broad range (BR) Assay Kit (Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA) nachgemessen, das eine Detektionsspanne von 2-1.000 ng besitzt. Für die DNA-Gehaltsmessung wurden alle DNA-Proben als erstes durch leichtes Schütteln gemischt und kurz in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Proben wurden nach den Schemata in Tabelle 4 pipettiert.

Tabelle 4 Pipettierschema für Patientenproben und Standards zur DNA-Quantifizierung mittels Qubit

Patientenproben		Standards	
Reagenz	Volumen	Reagenz	Volumen
Puffer	198 µl	Puffer	190 µl
Farbstoff	1 µl	Farbstoff	1 µl
DNA	2 µl	Standard	10 µl

Abkürzungen: DNA: Deoxyribonucleic acid.

Die Standards enthalten je nach Kit für Standard-1 [0 ng/µl] und für Standard-2 bei HS [10 ng/µl] bzw. BR [100 ng/µl]. Anschließend wurden die Proben 4 sec gevortext und im Dunkeln für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert, um den Farbstoff vor Licht zu schützen. Nach der Kalibrierung mit den jeweiligen Standards wurden die Proben gemessen.

2.8.2 Verdünnung der DNA-Proben

Für das weitere Vorgehen mussten die Proben auf einen DNA-Gehalt von [10 ng/µl] verdünnt werden. Da später insgesamt 20 µl von jeder Probe benötigt wurden, wurde die Verdünnung auf 23 µl angesetzt. Nach Berechnung der benötigten Menge des TE-Puffers aus TRIS und EDTA, wurde die notwendige Menge an DNA darin gelöst.

$$\frac{230 \text{ ng}}{\text{gemessene DNA-Konzentration in ng/}\mu\text{l}} = \text{Menge der benötigten DNA in } \mu\text{l}$$

$$23 \mu\text{l} - \text{Menge der benötigten DNA in } \mu\text{l} = \text{Menge des benötigten TE in } \mu\text{l}$$

Hierfür wurden die Proben kurz mittels Tischzentrifuge abzentrifugiert, dann 4 sec gevortext, sowie nochmals abzentrifugiert und anschließend für 20 min bei 56°C in den Heizblock gestellt.

Falls die DNA-Konzentration der Probe so gering war, dass eine Probenmenge über 23 µl benötigt wurde, um eine DNA-Konzentration von [10 ng/µl] zu erreichen, wurde die errechnete Menge DNA eingedampft. Hierzu wurde anhand der überschüssigen Flüssigkeitsmenge die Zeit im Verdampfer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) berechnet, d.h. pro 10 µl Überschuss musste die Probe 5 min bei 30°C in den Verdampfer.

2.8.3 Restriktionsverdau der unmethylierten DNA

Als Nächstes wurde mit den zuvor verdünnten DNA-Proben ein Verdau angesetzt, sowie jeweils eine Kontrolle, das bedeutet es wurden zwei Ansätze angelegt, wovon einer das Restriktionsenzym *HhaI* mit seinem Puffer (Promega, Madison, Wisconsin, USA) enthielt, der andere nur den Puffer. Hierbei fungierte *HhaI* als Restriktionsenzym, dass nur DNA ohne Methylgruppen spaltet, sodass die unmethylierte und somit aktive DNA verdaut wurde. Zur Dokumentation eines regelrechten Restriktionsverdaus im Ansatz und somit der Enzymaktivität, diente hierbei die männliche Kontrolle, da die gesamte männliche X-chromosomale DNA auf Grund der fehlenden Methylierung durch das Enzym *HhaI* verdaut wird, sodass später in diesem Ansatz keine X-chromosomale DNA mehr vorhanden sein sollte. Hierfür wurden zwei Mastermixe nach dem Schema in Tabelle 5 hergestellt.

Tabelle 5 Pipettierschema für Restriktionsverdau und Kontrolle

Restriktionsverdau		Kontrolle	
Reagenz	Volumen	Reagenz	Volumen
DNA [10 ng/µl]	10 µl	DNA [10 ng/µl]	10 µl
Puffer C [10x]	2 µl	Puffer C [10x]	2 µl
<i>HhaI</i> [10 U/µl]	0,5 µl	Aqua dest.	8 µl
Aqua dest.	7,5 µl		

Abkürzung: DNA: Deoxyribonucleic acid; dest.: destilliert.

Anschließend wurden 10 µl des jeweiligen Mastermixes mit je 10 µl der jeweiligen DNA-Probe zusammen pipettiert und der Ansatz jeweils kurz mittels Tischzentrifuge zentrifugiert, durch leichtes Schütteln gemischt und nochmals zentrifugiert.

Sowohl Restriktionsverdau, als auch Kontrolle wurden dann bei 37°C für 4 h im Cycler (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) inkubiert, sodass die nicht methylierte DNA vom Enzym *HhaI* verdaut wurde. Nach Ablauf der 4 h wurden die Proben nochmals mit

0,3 µl HhaI nachgespalten und hierfür erneut für 30 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde das Enzym *HhaI* 15 min bei 65°C inaktiviert.

2.8.4 Polymerasekettenreaktion

Als Nächstes wurde mit den Proben aus dem Restriktionsverdau und deren Kontrollen eine PCR für die Gene *AR* und *PCSK1N* angesetzt. Hierfür wurde je ein markierter Forward-Primer (F) und ein Reverse-Primer (R) mit folgender Sequenz verwendet (siehe Tabelle 6),

Tabelle 6 Primer mit Sequenz und Markierung

Name	Primer Sequenz 5'→3'	Markierung
AR-F*	TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC	6-Fam
AR-R	GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT	
PCSK1N-F*	ATGCGAAGACCATTCCCTCT	6-Fam
PCSK1N-R	GTGCGTGTGATGTGAGGAGA	

Abkürzungen: AR: Androgenrezeptor; PCSK1N: Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Typ 1 Inhibitor; 6-Fam: 6-Carboxyfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff).

sowie folgende Mastermixe zusammengestellt (siehe Tabelle 7):

Tabelle 7 Pipettierschema für die Polymerasekettenreaktion für die Gene *AR* und *PCSK1N*

AR		PCSK1N	
Reagenz	Volumen	Reagenz	Volumen
PCR-Puffer A°	23 µl	PCR-Puffer B°	23 µl
Primer AR-F* [10 pmol/µl]	1 µl	Primer PCSK1N-F* [10 pmol/µl]	1 µl
Primer AR-R [10 pmol/µl]	1 µl	Primer PCSK1N-R [10 pmol/µl]	1 µl
Platinum Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl	Platinum Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl
Verdau- bzw. Kontrollansatz	1,5 µl	Verdau- bzw. Kontrollansatz	1,5 µl

°Die genaue Zusammensetzung des Puffers ist in Anhang I Geräte, Material und Chemikalien zu finden.

Abkürzungen: AR: Androgenrezeptor; PCSK1N: Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Typ 1 Inhibitor.

Mit je 25,2 µl des jeweiligen Mastermixes und je 1,5 µl des Verdauansatzes und des Kontrollansatzes wurden für jede Probe zwei PCR Reihen angelegt. Somit lagen abschließend PCR-Produkte für *AR* und *PCSK1N* mit jeweils einer verdauten und unverdauten DNA-Probe vor.

Für die Durchführung der PCR wurden die Proben mit dem jeweiligen Programm in den Cycler gestellt (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8 PCR-Schema für AR und PCSK1N

Bedingungen AR			
Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95	4 min	1
Denaturierung	95	30 s	31
Anlagerung	65	40 s	
Elongation	72	1 min	
Abschließende Elongation	72	20 min	1
Haltetemperatur	10	--	1
Bedingungen PCSK1N			
Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95	4 min	1
Denaturierung	95	30 s	2
Anlagerung	64	30 s	
Elongation	72	30 s	
Denaturierung	95	30 s	2
Anlagerung	61	30 s	
Elongation	72	30 s	
Denaturierung	95	30 s	26
Anlagerung	58	30 s	
Elongation	72	30 s	
Abschließende Elongation	72	20 min	1
Haltetemperatur	13	--	1

Abkürzungen: AR: Androgenrezeptor; PCSK1N: Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Typ 1 Inhibitor.

2.8.5 Fragmentlängenanalyse

Zur Vorbereitung der Fragmentlängenanalyse wurden die Proben in einer Platte vorgelegt. Hierbei diente Rox Size Standard (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) als Größenstandard für die spätere Auswertung der Fragmentlängen und HiDi-Formamid (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) zur Resuspendierung der Proben. Es wurden je 1,5 µl der PCR-Produkte mit 20 µl Formamid und 0,5 µl Rox pipettiert und die Platte mit einem Gummideckel verschlossen. Anschließend wurde die Platte für 30 sec bei 800 g abzentrifugiert (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland), einmal gevortext und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Zur Denaturierung der Einzelstränge wurde die Platte nun für 6 min bei 96°C im Cyclyer (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) inkubiert und im Anschluss auf Eis gestellt.

Die Fragmentlängen wurden im Sequenzer ABI 3730 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts; USA) mit 8 sec Injektionszeit analysiert und mittels des

Programms GeneMapper™ (Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA) ausgewertet.

Durch die so erhaltenen Daten konnte das XCR der Proben berechnet werden.

2.9 Berechnung des X-Inaktivierungsverhältnisses

Ein Beispiel für die durch den GeneMapper erhaltenen Daten zeigt Abbildung 3 (S.22). Es werden jeweils beide Allele mit ihrer Länge und der Fläche unter der Kurve für die Gene *AR* und *PCSK1N* im verdauten und unverdauten Ansatz angezeigt. Die Auswertung liefert somit die Länge der PCR-Fragmente, sowie durch die Fläche unter den Kurven eine Korrelation zur Menge der Produkte.

Anhand der verschiedenen Flächen unter den Peaks kann das XCR berechnet werden, hierfür wurde folgende Formel verwendet (Echevarria et al., 2016):

$$\frac{\frac{XC1 \text{ verdaut}}{XC1 \text{ unverdaut}}}{\frac{XC1 \text{ verdaut}}{XC1 \text{ unverdaut}} + \frac{XC2 \text{ verdaut}}{XC2 \text{ unverdaut}}}$$

Hierbei entspricht XC1 dem kürzeren Allel und XC2 dem längeren Allel.

Beispielsweise die Fibroblastenprobe der Patientin FD 1104 (siehe Abbildung 3): Hier beträgt XC1 verdaut 1579 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU), XC1 unverdaut 1394 RFU, XC2 verdaut 100 RFU, XC2 unverdaut 1457 RFU,

$$\frac{\frac{1579 \text{ RFU}}{1394 \text{ RFU}}}{\frac{1579 \text{ RFU}}{1394 \text{ RFU}} + \frac{100 \text{ RFU}}{1457 \text{ RFU}}} = 0,94$$

daraus folgt ein X-Inaktivierungsverhältnis XC1:XC2 von 94:6 Prozent.

Das XCR wurde bei Vorliegen eines informativen Ergebnisses für *AR*, d.h. es liegen zwei auf Grund ihrer unterschiedlichen Länge voneinander abgrenzbare Allele vor, für dieses Gen berechnet. Im Falle eines nicht informativen Ergebnisses wurde das XCR für *PCSK1N* berechnet.

Gab es mehrere Proben für ein Gewebe, d.h. von einer Patientin wurden mehrere biologische Replikate gesammelt, wurde der Mittelwert des XCR berechnet. Dies erfolgte für 21 Mundschleimhautepithelproben und 28 Blutproben.

Anhand des XCR wurden die Proben in die Gruppen „skewed“ bei $\geq 75:25$ und „random“ bei $< 75:25$ eingeteilt.

Diese Auswertung liefert das XCR im vorliegenden Gewebe. Allerdings kann hierdurch keine Aussage getroffen werden, welches der beiden X-Chromosomen der Frau die Mutation trägt. Hierfür ist die Betrachtung des zugehörigen Verwandten nötig.

2.10 Bestimmung des mutierten X-Chromosoms

Zur Identifizierung des X-Chromosoms mit der Fabry-spezifischen Mutation wurden die Fragmentlängen der replizierten Genfragmente der X-Chromosomen von der Patientin und ihrem jeweiligen Verwandten verglichen. Hierfür wurden verwandte Männer mit bekanntem Mutationsstatus oder erkrankte Frauen aus der Kohorte verwendet. Dabei entsprach bei einem erkrankten Mann die Länge des X-Chromosoms, das in diesem Fall der Mutationsträger ist, dem X-Chromosom der Frau mit der gleichen Länge, das somit ebenfalls die Mutation trägt. Somit war die Bestimmung des mutierten X-Chromosoms durch den Vergleich der Fragmentlängen von Probandin und des Verwandten möglich.

Diese Bestimmung wurde bei allen Patientinnen mit einem verschobenen XCR in mindestens einem Biomaterial durchgeführt.

Zum besseren Verständnis dient das folgende Beispiel in Abbildung 3 und Abbildung 4:

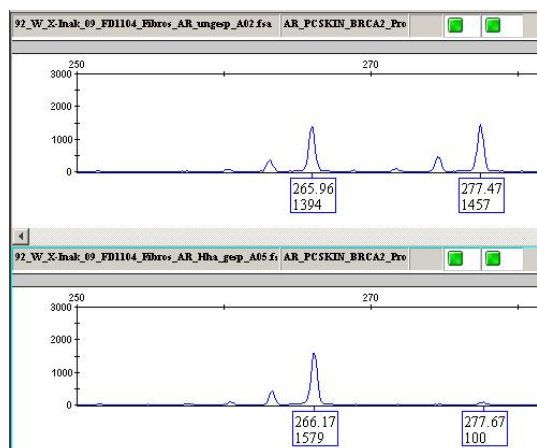


Abbildung 3 Fragmentlängenanalyse von Fibroblasten der Patientin FD 1104

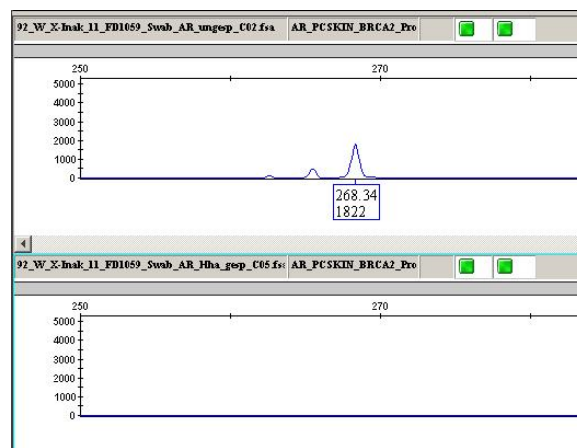


Abbildung 4 Fragmentlängenanalyse vom Mundabstrich des Bruders FD 1059

Bei der Patientin FD 1104 sind die Fibroblasten im Verhältnis 94:6 inaktiviert, d.h. das kürzere Allel mit der Länge ca. 266 Basenpaare (bp) ist zu 94% methyliert also inaktiviert, das längere Allel, hier ca. 277 bp lang, ist zu 6% inaktiviert (siehe Abbildung 3).

Um eine Aussage über den Aktivierungsgrad des mutierten X-Chromosoms treffen zu können werden die Fragmentlängen beider Allele mit der Länge des Allels einer verwandten Person verglichen. Im vorliegenden Beispiel wurde der Mundschleimhautabstrich des ebenfalls erkrankten Bruders FD 1059 der Patientin analysiert. Die Fragmentlänge seines Allels auf dem X-Chromosom beträgt 268 bp

(siehe Abbildung 4). Somit repräsentiert das Allel mit der Länge 268 bp das X-Chromosom mit der Mutation.

Dieses Allel entspricht dem Kürzeren der Frau mit der annähernd gleichen Länge von ca. 266 bp. Hierbei ist anzumerken, dass die Allellängen geringfügig voneinander abweichen können, vor allem je weiter die Verwandtschafts-verhältnisse auseinander liegen.

Das bedeutet zusammenfassend, dass das X-Chromosom mit der Mutation bei der Frau in der Fibroblastenprobe zu 94% inaktiviert ist.

Durch dieses Vorgehen konnte also bei vorliegender verwandter Kontrollperson das mutationstragende X-Chromosom durch Vergleich der Fragmentlängen identifiziert werden und die Unterteilung der Proben aus der „skewed“ Gruppe in „mutiertes X ist aktiv“ und „mutiertes X ist inaktiv“ erfolgen.

2.11 Statistische Auswertung

Numerische Daten werden als absolute Zahlen oder mit Median, Spannweite (R) angegeben. Kategoriale Daten werden als Prozentwerte dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels IBM SPSS 27 Software (Fa. IBM, Ehningen, Deutschland). Es lag keine Normalverteilung der Daten vor, sodass der Mann-Whitney-U Test und den Chi²-Test verwendet wurden, um die Gruppen miteinander zu vergleichen. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient (ρ) wurde für die biologischen und technischen Replikate berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Kohorte und Biomaterial

Insgesamt wurden 104 Frauen und 50 Männer rekrutiert. Von den Frauen waren 49/104 (47%) miteinander verwandt. Es wurden 9/104 (9%) Frauen von der Studie ausgeschlossen, da 6 von ihnen lediglich eine intronische Variante oder eine 5'UTR Substitution aufwiesen. 3 weitere wurden auf Grund von nicht informativen Ergebnissen in der X-Inaktivierungsanalyse, sowohl für das Gen *AR*, als auch für *PCSK1N*, ausgeschlossen (Abbildung 5). Somit wurden für die weitere Analyse das Biomaterial von 95 Frauen und 50 Männern verwendet. In dieser Gruppe waren 45/95 (47%) Frauen miteinander verwandt. Das mediane Alter der Frauen betrug 53 Jahre (Spanne 18-77), das der Männer 42 Jahre (Spanne 18-74). Es lagen von den Frauen 94/95 (99%) Mundschleimhautabstriche, 94/95 (99%) Blutproben und 30/95 (32%)

Hautfibroblastenproben vor. Ein Mundschleimhautabstrich lag von allen 50/50 (100%)
Männern vor.

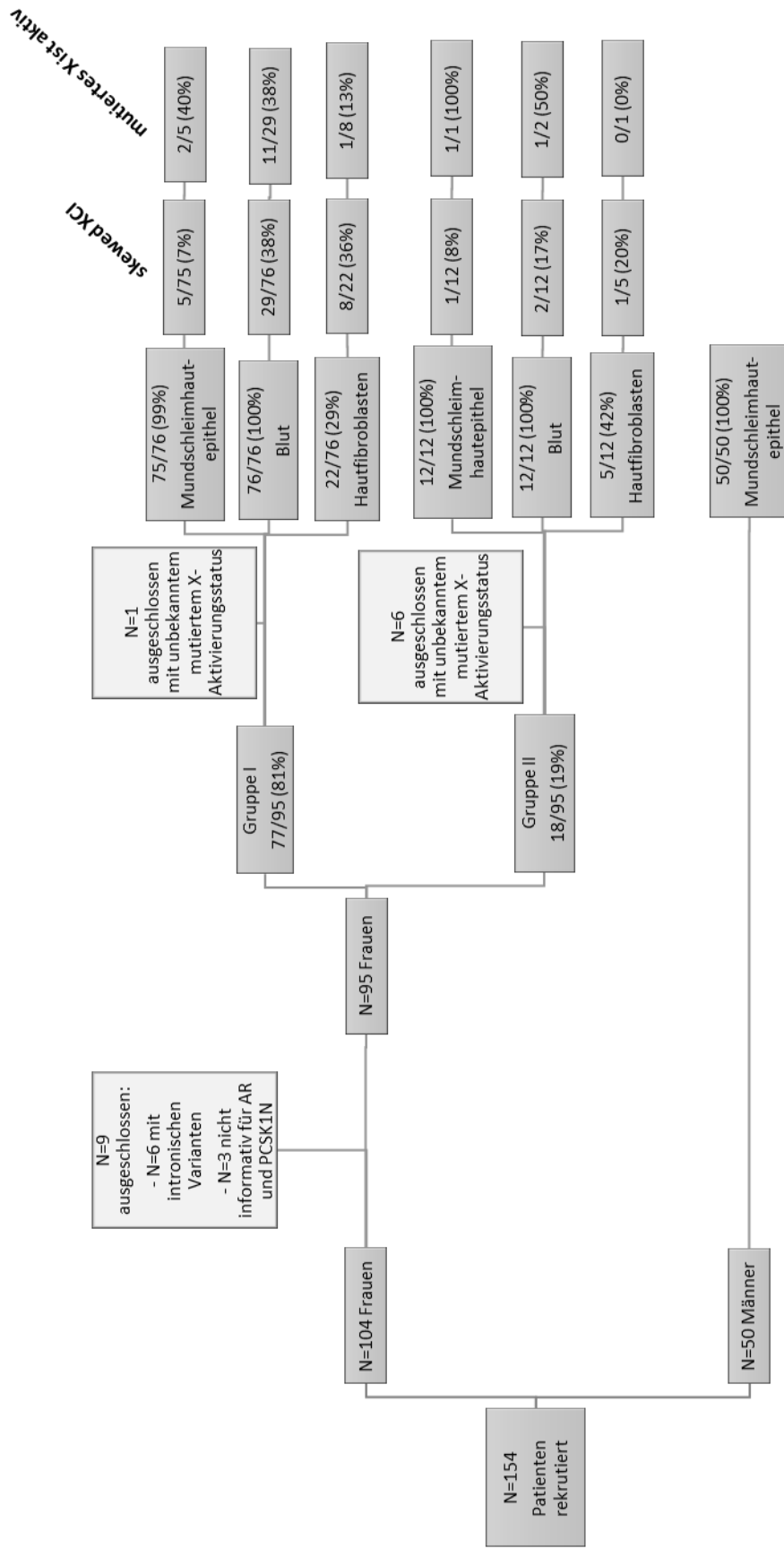


Abbildung 5 Übersicht über die Kohorte und untersuchten Biomaterialien mit ihrem X-Inaktivierungsmuster. Frauen in der Gruppe I tragen als potenziell pathogene eingestufte Sequenzvariante. In der Gruppe II sind Frauen mit apathogenen Sequenzvarianten zusammengefasst (modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022).
 Abkürzungen: AR: Androgen Rezeptor; PCSK1N: proprotein convertase subtilisin/kexin Typ 1 Inhibitor; XCI: X-Inaktivierung.

3.2 Klassifikation der Sequenzvarianten

In der Kohorte von 95 Frauen fanden sich 48 verschiedene Sequenzvarianten des α -Galaktosidase A Gens (siehe Appendix 2). 5/95 (5%) Frauen hatten mehr als eine Variante, wobei alle stets auf dem gleichen Allel lagen (siehe Appendix 3). In diesen Fällen wurde die Sequenzvariante mit dem wahrscheinlich pathogensten Effekt auf den klinischen Phänotyp für die weitere Einteilung und Analyse verwendet.

Tabelle 9 zeigt die Verteilung der Sequenzvarianten in den drei angewandten Klassifikationssystemen. Ein großer Teil der Kohorte zeigt hierbei pathogene Varianten, mit 43/95 (45%) als classic bzw. 38/95 (40%) als Klasse 5 bewerteten Sequenzvarianten. Von den 70/95 (74%) Missense Sequenzvarianten liegen mit 44/70 (62%) die meisten in der „other“ Lokalisation und damit außerhalb des aktiven Zentrums. Bei 18/95 (19%) der Frauen lag eine als „benign“ eingestufte Sequenzvariante vor. Es fanden sich die Varianten D313Y (9/95, 9%), A143T (8/95, 8%) und W399S (1/95, 1%). Diese Sequenzvarianten wurden bereits vielfach als apathogen eingestuft (Lenders et al., 2016; Lukas et al., 2016; Oder et al., 2016). Aus diesem Grund wurde die Kohorte von 95 Frauen in zwei Gruppen aufgeteilt und getrennt voneinander analysiert. Gruppe I (n=77) beinhaltet alle Frauen mit als potenziell pathogen eingestuften Sequenzvarianten und Gruppe II (n=18) Frauen mit den apathogenen Sequenzvarianten D313Y, A143T und W399S.

Vor der weiteren Analyse wurden Patientinnen mit einem unbekanntem mutierten X-Aktivitätsstatus aus beiden Gruppen ausgeschlossen, d.h. es gab keine verwandte Person, um das mutierte X-Chromosom und so dessen Aktivitätsstatus zu bestimmen. Dadurch wurden aus Gruppe I n=1 und Gruppe II n=6 Patientinnen ausgeschlossen (Abbildung 5).

Tabelle 9 Verteilung der Sequenzvarianten in den drei Klassifikationssystemen

Klinischer Phänotyp	
classic	43/95 (45%)
(likely) late onset	23/95 (24%)
benign	18/95 (19%)
VUS	11/95 (12%)
Pathogenitätsklasse	
1	0/95 (0%)
2	10/95 (11%)
3	12/95 (13%)
3+	22/95 (23%)
4	13/95 (14%)
5	38/95 (40%)
Lokalisation	
active site	3/70 (4%)
buried	23/70 (32%)
other	44/70 (62%)

(modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022)

Abkürzung: VUS: Variant of unknown significance.

3.3 Klinischer Phänotyp und Laborergebnisse der Studienkohorte

In Tabelle 10 sind die Fabry-spezifischen Symptome, die in den beiden Gruppen der Studienkohorte auftraten, mit ihrer Häufigkeit dargestellt. Bei 62% der Gruppe I gab es die Diagnose einer Cornea verticillata. Auch eine Beteiligung von Herz und Nieren zeigte sich bei knapp 50% der Patienten. Wohingegen zerebrovaskuläre Ereignisse, wie TIA und Schlaganfall, mit zusammen 14% selten auftraten. In Gruppe II hingegen traten Symptome des Hals-Nasen-Ohren-System, Gastrointestinaltrakts und Schmerzen mit annähernd 50% am häufigsten auf. Die Beteiligung von Herz oder Niere war hingegen mit jeweils 8% selten.

Tabelle 10 Verteilung von Fabry-spezifischen Symptomen in der Studienkohorte

	Gruppe I*	Gruppe II**
Cornea verticillata	29/47 (62%)	1/5 (20%)
Kardiomyopathie	43/76 (55%)	1/12 (8%)
Schmerz	38/74 (51%)	5/11 (45%)
Hals-Nasen-Ohren Symptome (einschließlich Tinnitus, Schwindel, Hörsturz)	39/76 (51%)	6/12 (50%)
Nephropathie	32/76 (42%)	1/12 (8%)
An-/hypohidrosis	17/75 (23%)	3/12 (25%)
Gastrointestinale Symptome	17/76 (22%)	5/12 (42%)
SFN	15/76 (20%)	3/12 (25%)
Angiokeratome	13/68 (19%)	1/12 (8%)
Schlaganfall	7/76 (9%)	4/12 (33%)
TIA	4/76 (5%)	0/12 (0%)

* Gruppe I besteht aus n=77 Frauen mit einer pathogenen Sequenzvariante. Frauen mit unbekanntem mutiertem X Status (n=1) wurden hier ausgeschlossen.
 ** Gruppe II besteht aus n=18 Frauen mit den apathogenen Sequenzvarianten: D313Y, A143T, and W399S. Frauen mit unbekanntem mutiertem X Status (n=6) wurden hier ausgeschlossen (modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022).
 Abkürzungen: SFN: Small Fiber Neuropathie; TIA: transiente ischämische Attacke.

3.4 X-Inaktivierungsmuster und klinischer Phänotyp

Die X-Inaktivierungsanalyse ergab bei 90/95 (95%) der Frauen informative Ergebnisse für das Gen *AR*. Bei 5/95 (5%) der Frauen wurde bei nicht informativem *AR* auf *PCSK1N* zurückgegriffen. Es wurden somit XCI-Muster von 94 Mundschleimhautabstrichen, 94 Blutproben und 30 Hautfibroblastenproben analysiert. Beim intraindividuellen Vergleich des XCI-Musters der verschiedenen Gewebe gab es zum Teil Unterschiede in Bezug auf die Einteilung in „random“ und „skewed“ (siehe Appendix 4). Insgesamt hatten 6/87 (7%) der Mundschleimhautepithelproben (Gruppe I: 5/75, 7%; Gruppe II: 1/12, 8%), 31/88 (35%) der Blutproben (Gruppe I: 29/76, 38%; Gruppe II: 2/12, 17%) und 9/27 (33%) Hautfibroblastenproben (Gruppe I: 8/22, 36%; Gruppe II: 1/5, 20%) ein „skewed“

XCI-Muster (siehe Abbildung 5), alle anderen Proben zeigten ein „random“ Verteilungsmuster auf.

3.4.1 X-Inaktivierungsmuster in Mundschleimhautepithel

Im Mundschleimhautepithel trat bei 6/87 (7%) Patientinnen (Gruppe I: 5/75, 7%; Gruppe II: 1/12, 8%) ein „skewed“ XCI-Muster auf (Abbildung 5). Ein statistischer Vergleich der Subgruppen war auf Grund der geringen Fallzahl der „mutiertes X ist aktiv/inaktiv“-Gruppen nicht möglich. Die Zusammenfassung des klinischen Phänotyps von Gruppe I, II ist im Appendix 5 und Appendix 6 zu finden.

3.4.2 X-Inaktivierungsmuster in Blut

Blut zeigte von allen drei untersuchten Geweben mit 31/88 (35%) Proben, die höchste Rate an verschobenen XCI-Mustern auf. Von diesen 31 Proben war in 12/31 (39%) das mutierte X-Chromosom aktiv (Gruppe I: 11/29, 38%; Gruppe II: 1/2, 50%) (Abbildung 5).

In Gruppe I zeigt sich in der Subgruppe mit dem aktiven mutierten X-Chromosom eine niedrigere GLA-Enzymaktivität und ein höherer Lyso-Gb3 Spiegel als bei Patientinnen mit einem inaktiven mutierten X-Chromosom in der Blutprobe (Abbildung 5, Abbildung 6 A,B). Auch die Prävalenzen von Kardiomyopathie und Nephropathie waren in der „mutiertes X ist aktiv“-Gruppe höher (Kardiomyopathie: 7/11, 64%; Nephropathie: 6/11, 55%) als in der mit inaktivem mutiertem X-Chromosom (Abbildung 6 C-F). Die Unterschiede waren allerdings nicht statistisch signifikant. Ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gab es beim Vergleich von Herzseptumdicke, Herzgewicht, GFR und Albuminurie (Abbildung 6 C-F). Die Häufigkeit von ZNS Symptomen (Schlaganfall, TIA) war höher in der Gruppe mit aktivem mutiertem X-Chromosom (Abbildung 7). Wiederum kein Unterschied zeigte sich bei der Häufigkeit von PNS Symptomen (Fabry-assoziierte Schmerz, SFN, Hypo-/Anhidrosis, angehobene Temperaturwahrnehmungsschwelle im QST) (Abbildung 6 G, H). Im klinischen Phänotyp Score waren die Symptome häufiger moderat oder schwer, wenn das mutierte X-Chromosom aktiv war, ebenso gab es keine Patientin ohne Symptome. Allerdings war die Häufigkeit für einen schweren Phänotyp in der „mutierten X ist aktiv“-Gruppe mit 4/11 (36%) ähnlich der in der inaktiven Gruppe mit 7/18 (39%) (Abbildung 7). Die Anzahl der Patientinnen, die eine Fabry-spezifische Behandlung erhielten, war in beiden Gruppen annähernd gleich (Abbildung 7).

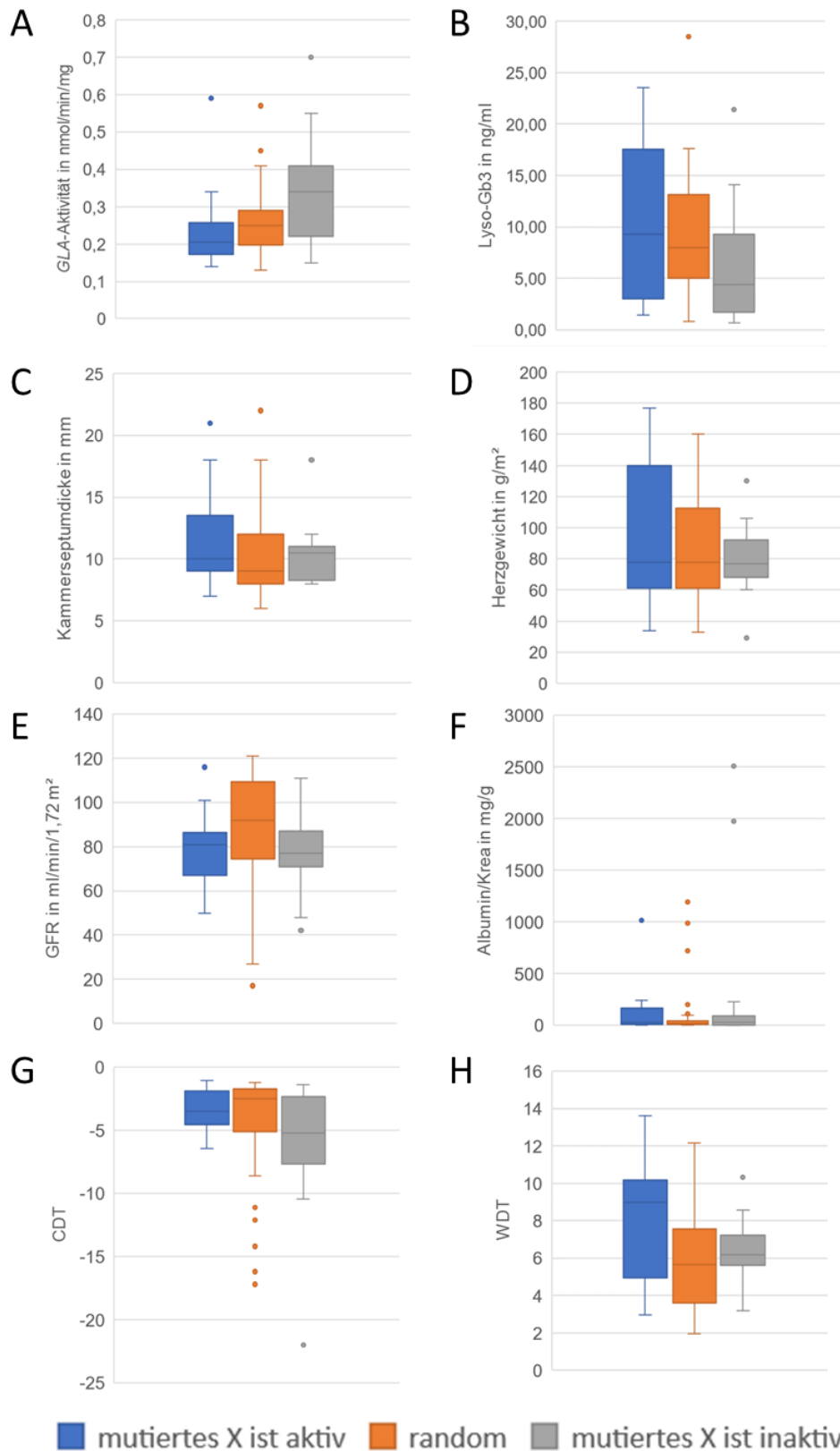


Abbildung 6 Vergleich von klinischen Parametern zwischen Subgruppen in Blutproben der Gruppe I

(modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022)

Abkürzungen: CDT: cold detection threshold; GLA: alpha-Galaktosidase A; Gb3: Globotriaosylceramide; GFR: glomeruläre Filtrationsrate; Krea: Kreatinin; WDT: warm detection threshold.

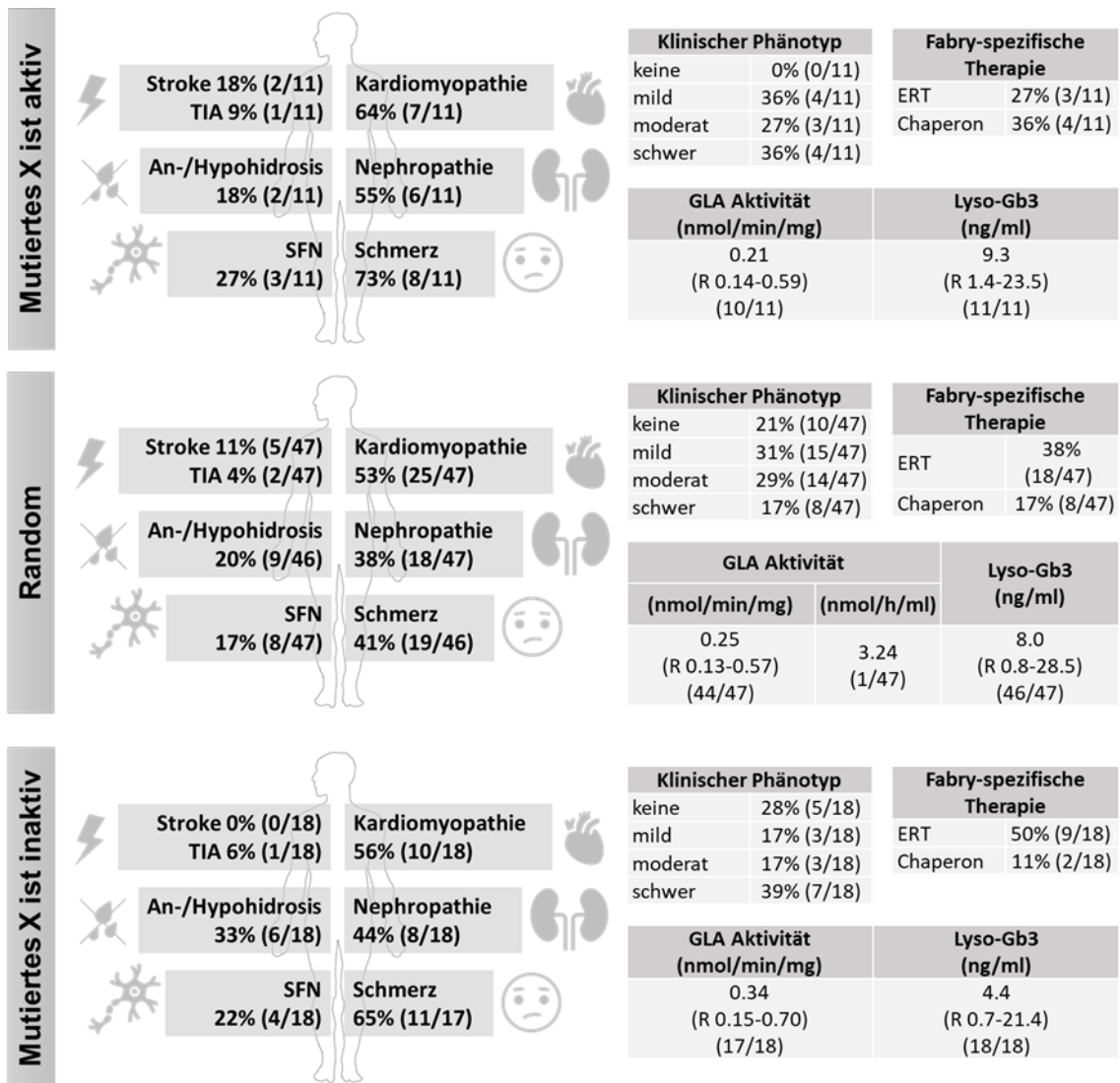


Abbildung 7 X-Inaktivierungsmuster und klinischer Phänotyp in Blut von Gruppe I

(modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022)

Abkürzungen: ERT: Enzyersatztherapie; GLA: alpha-Galaktosidase A; SFN: Small Fiber Neuropathie; TIA: transiente ischämische Attacke.

Da es in Gruppe II jeweils nur eine Patientin in der „mutiertes X ist aktiv“- und „mutiertes X ist inaktiv“-Gruppe gab, konnte keine statistische Analyse auf Grund der niedrigen Fallzahl durchgeführt werden (Abbildung 8).

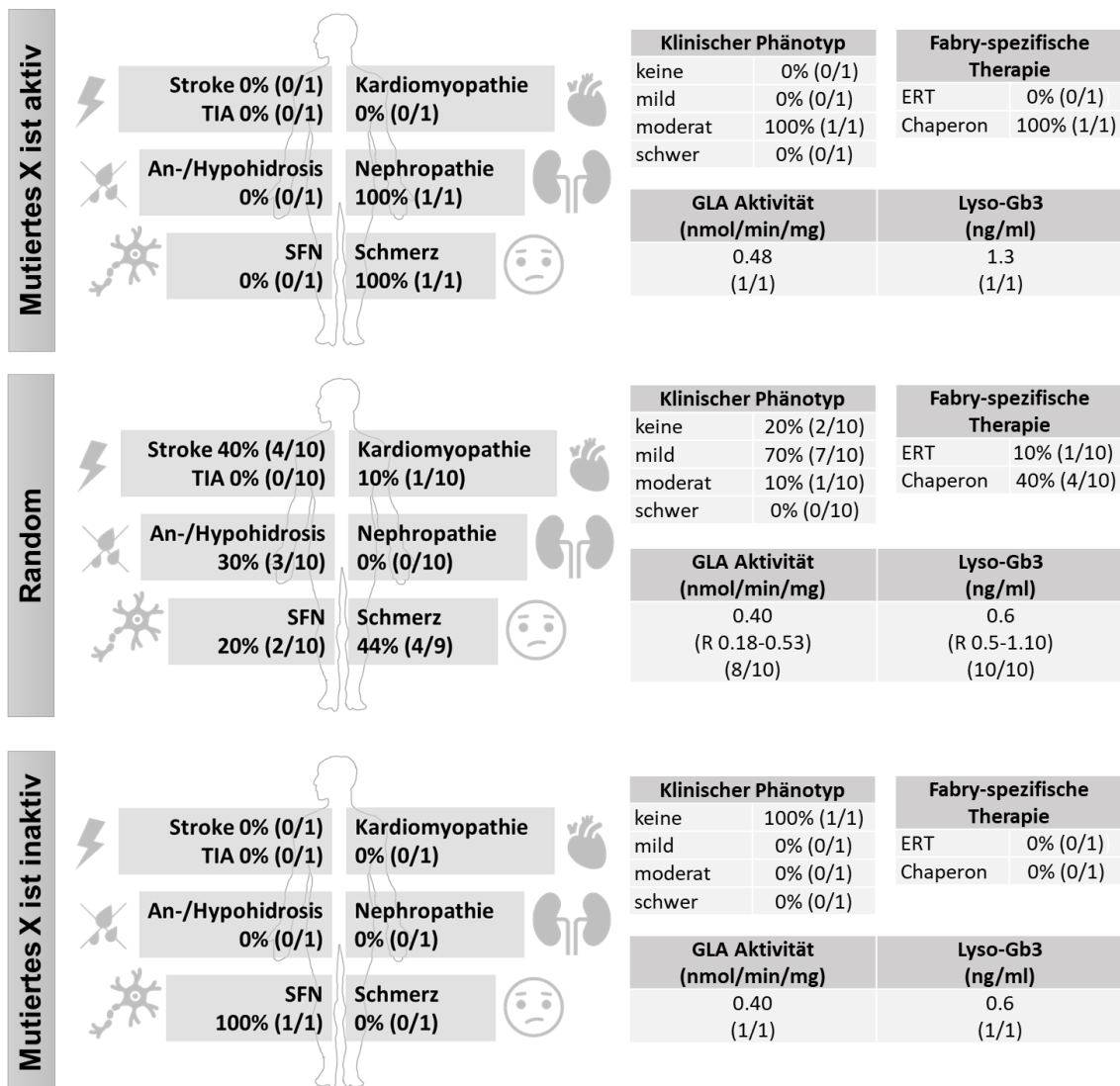


Abbildung 8 X-Inaktivierungsmuster und klinischer Phänotyp in Blut von Gruppe II

(modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022)

Abkürzungen: ERT: Enzymersatztherapie; GLA alpha-Galaktosidase A; SFN: Small Fiber Neuropathie; TIA: transiente ischämische Attacke.

3.4.3 X-Inaktivierungsmuster in Hautfibroblasten

In den Hautfibroblastenproben fanden sich bei 9/27 (33%) Frauen (Group I: 8/22, 36%; Group II: 1/5, 20%) verschobene XCI-Muster. Auf Grund der geringen Fallzahl in den Subgruppen „mutiertes X ist aktiv/inaktiv“ war eine statistische Analyse nicht möglich. Ein Überblick über den klinischen Phänotyp in Gruppe I und II ist im Appendix 7 und Appendix 8 zu finden.

3.5 Einfluss der Zellkultivierung auf X-Inaktivierungsmuster von Hautfibroblasten

Die Fibroblasten-DNA wurde aus einer Hautfibroblastenkultur des Biopsats gewonnen. Diese Kultivierung dauerte bei den verschiedenen Proben unterschiedlich lange, sodass sich die Frage nach einem möglichen Einfluss der Kulturbedingungen auf das XCI-Muster der Hautfibroblasten stellte. Aus diesem Grund wurden Hautfibroblasten von 3 Patientinnen über einen Zeitraum von 35 bis maximal 73 Tagen kultiviert und die XCR für die Passagen p2, 3, 5, 8 bzw. p3, 5, 8 bzw. p2, 4, 5 bestimmt. Tabelle 11 zeigt die analysierten Passagen und die Dauer der Kultivierung dieser Passage, d.h. die Zeit vom Ansetzen der Zellkultur bis zur Zellernte, sowie die XCR Ergebnisse. Hier zeigte sich in allen Passagen der drei Kulturreihen eine XCR von nahezu 100:0.

Tabelle 11 XCR von verschiedenen Passagen einer Hautfibroblastenkultur

ID	Passage	Zeitraum in Tagen	XCR
FD 1104	p2	35	94:6
	p3	49	98:2
	p5	55	98:2
	p8	62	99:1
FD 1204	p2	37	13:87
	p3	49	7:93
	p4	62	8:92
	p5	73	6:94
FD 1232	p3	45	95:5
	p5	51	100:0
	p8	58	99:1

Es sind verschiedene Hautfibroblastenpassagen von drei Patientinnen dargestellt, sowie die Dauer der Kultivierung der einzelnen Passagen und die jeweiligen XCR der Proben. Der Zeitraum der Kultivierung einer Passage entspricht hier den Tagen vom Ansetzen bis zur Ernte der jeweiligen Passage.
Abkürzungen: XCR: X-Inaktivierungsverhältnis.

3.6 X-Inaktivierung in den biologischen Replikaten

Um eine mögliche Änderung des XCI-Musters im zeitlichen Verlauf festzustellen, wurden von 49/95 (52%) Patientinnen sog. biologische Replikate gesammelt. Das bedeutet eine erneute Probenasservierung zu einem zweiten oder dritten Zeitpunkt nach einer medianen Zeitdauer von einem Jahr (Spanne 0,2-3,0). Es wurden 42 Mundschleimhautepithelproben von 21/95 (22%) Frauen und 60 Blutproben von 28/95 (29%) Frauen asserviert. Die gesammelten Mundschleimhautepithelproben lagen im

Median 0,6 Jahre (Spanne 0,2-1,3) auseinander. Beim Vergleich des XCR zwischen den einzelnen Zeitpunkten ergab sich eine mediane Differenz von 6% (Spanne 0-19; $\rho = 0,86$, $p < 0,001$). Zwischen den Sammelzeitpunkten der Blutproben lagen im Median 1,6 Jahre (Spanne 0,2-3,0), die XCR differierten im Median um 6% (Spanne 0-25; $\rho = 0,91$, $p < 0,001$).

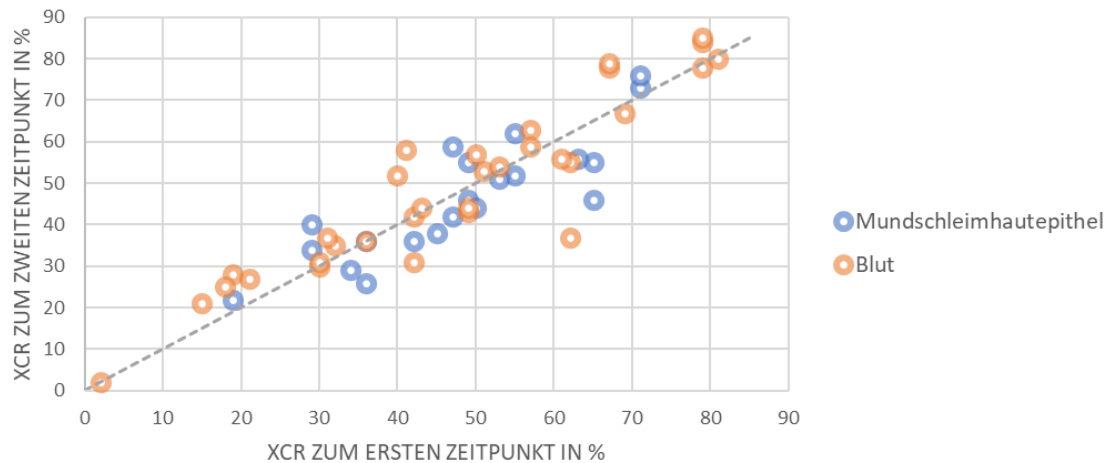


Abbildung 9 Vergleich des X-Inaktivierungsverhältnisses in biologischen Replikaten

In der Grafik sind die X-Inaktivierungsverhältnisse von biologischen Replikaten zum ersten Zeitpunkt einer Probenasservierung gegen einen zweiten Zeitpunkt aufgetragen. Es wurden biologische Replikate von Mundschleimhautepithel und Blut gesammelt. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient beträgt für Mundschleimhautepithel XCR $\rho = 0,86$ ($p < 0,001$) und für Blut XCR $\rho = 0,91$ ($p < 0,001$). Die Gerade stellt eine vollständige Übereinstimmung der XCR bei $\rho = 1$ dar (modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022).
Abkürzungen: XCR: X-Inaktivierungsverhältnis.

3.7 X-Inaktivierung in den technischen Replikaten

Um die Stabilität der Ergebnisse der X-Inaktivierungsanalyse zu überprüfen, wurden insgesamt 65 technische Replikate durchgeführt. Das heißt eine zweite oder dritte X-Inaktivierungsanalyse von 24 Mundschleimhautepithelproben, 31 Blutproben und 4 Hautfibroblastenproben, gesammelt von 29/95 (31%) Patientinnen. Wobei bei 2/24 (8%) Mundschleimhautepithelproben und 4/31 (13%) Blutproben eine dritte Analyse durchgeführt wurde. Beim Vergleich der XCR der technischen Replikate ergab sich eine mediane Differenz von 5% (Spanne 0-48; $\rho = 0,87$, $p < 0,001$).

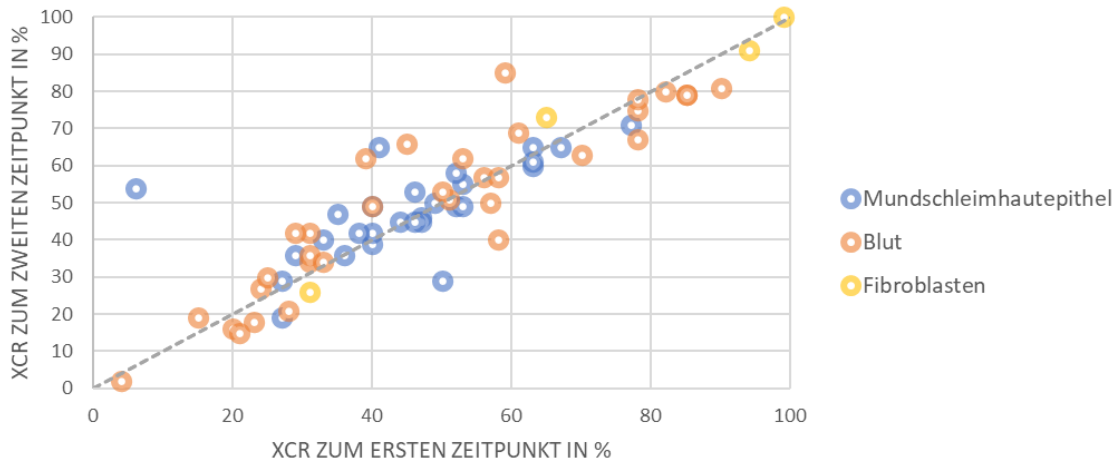


Abbildung 10 Vergleich der X-Inaktivierungsverhältnisse von technischen Replikaten

In der Grafik sind die X-Inaktivierungsverhältnisse von technischen Replikaten, d.h. die XCR einer erneuten X-Inaktivierungsanalyse einer Probe, dem Verhältnis der ersten Analyse gegenübergestellt. Es wurden technische Replikate von Mundschleimhautepithel, Blut und Hautfibroblasten durchgeführt. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient für das XCR aller Replikate beträgt $\rho=0,87$ ($p<0,001$). Die Gerade stellt eine vollständige Übereinstimmung der XCR bei $\rho=1$ dar (modifiziert Wagenhäuser et al., 2022).
Abkürzungen: XCR: X-Inaktivierungsverhältnis.

3.8 Intraindividuelle Variabilität der X-Inaktivierungsmuster

Die Gegenüberstellung der XCI-Muster der einzelnen Gewebe einer Patientin zeigte bei 37/95 (39%) eine Abweichung des XCI-Musters in Bezug auf die Einteilung in „random“ bzw. „skewed“. Das mediane Alter dieser Gruppe betrug 57 Jahre (Spanne 26-74). Insgesamt gab es bei 3/37 (8%) Patientinnen eine Abweichung in Richtung „skewed“ im Mundschleimhautepithel, bei 31/37 (84%) in Blut und bei 9/37 (24%) in Hautfibroblasten. Eine Abweichung sowohl in Blut, als auch in Hautfibroblasten wurde bei 4/37 (11%) Patientinnen festgestellt. Die gleichzeitige Abweichung des XCI-Musters in Richtung „skewed“ von Mundschleimhautepithel und Blut lag bei 1/37 (3%) Patientin vor, ebenso gab es nur 1/37 (3%) gemeinsame Abweichung von Mundschleimhautepithel und Hautfibroblasten.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es wurden die XCI-Muster von 77 Frauen mit pathogenen Sequenzvarianten für M. Fabry in den drei Geweben Mundschleimhautepithel, Blut und Hautfibroblasten analysiert und mit dem klinischen Phänotyp der Patientin verglichen. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des Aktivierungsstatus des mutierten X-Chromosoms. Hierbei erwies sich Blut als das geeignetste Gewebe, allerdings zeigte sich keine Korrelation zwischen den XCI-Mustern und dem klinischen Phänotyp der Patientinnen. Ebenso lag keine Korrelation mit der GLA-Aktivität oder dem Lyso-Gb3-Spiegel vor.

4.2 Einfluss des X-Inaktivierungsmuster auf den klinischen Phänotyp

Dass die XCI der Grund für die Ausbildung eines klinischen Phänotyps bei X-chromosomal vererbten Krankheiten sein kann, ist bereits für Erkrankungen wie die Duchenne Muskeldystrophie und Hämophilie A, B bekannt (Garagiola et al., 2021; Mercier et al., 2013). Obwohl auch Frauen mit M. Fabry verschiedene Krankheitsausprägungen aufweisen, ist die Frage nach dem Einfluss der XCI auf dieses beobachtete Phänomen umstritten. Einige frühere Studien wiesen einen Zusammenhang zwischen der XCI und der Symptomschwere nach (Dobrovolny et al., 2005; Echevarria et al., 2016; Hossain et al., 2019), wohingegen andere dies nicht konnten (Elstein et al., 2012; Juchniewicz et al., 2018; Rossanti et al., 2021). Eine Metaanalyse von fünf dieser früheren Studien fand ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen den klinischen Symptomen, wie einer Herzbeteiligung, und der XCI (Viggiano and Politano, 2021).

In einer dieser früheren Studien wurde eine Korrelation zwischen dem XCR in Blut und Hautfibroblasten und klinischen Symptomschwere-Scores nachgewiesen (Dobrovolny et al., 2005). Eine andere Studie erhielt ähnliche Ergebnisse bei Betrachtung von XCI-Mustern in Mundschleimhautepithel, Blut, Urin und Hautfibroblasten (Echevarria et al., 2016), wobei -im Gegensatz zur vorliegenden Studie- die Einstufung als „skewed“ erst erfolgte, wenn mehr als ein Gewebe ein verschobenes XCI-Muster aufwies. Auch wurden für den Vergleich Scores wie der Mainzer Severity Score Index (MSSI) herangezogen, die in der vorliegenden Studie auf Grund fehlender Daten nicht angewendet werden konnten. Somit ist hier eine direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse nicht möglich.

In der vorliegenden Studie wurde keine Korrelation zwischen dem XCI-Muster und der Symptomschwere gefunden, was im Einklang mit den Ergebnissen einiger früherer Studien steht (Elstein et al., 2012; Juchniewicz et al., 2018; Rossanti et al., 2021). Allerdings ist die Studienkohorte bei zwei der Studien sehr klein (n=12 und n=9), des Weiteren lag nur bei jeweils einer Patientin ein „skewed“ XCI-Muster vor (Juchniewicz et al., 2018; Rossanti et al., 2021). Auch fehlt bei einer weiteren die Bestimmung des Aktivierungsstatus des mutierten X-Chromosoms (Echevarria et al., 2016), was für die Analyse und Interpretation der Daten essenziell ist.

Die höchste Prävalenz an „skewed“ XCI-Mustern zeigte sich im Blut, wobei sich bei den Hautfibroblasten ähnliche Daten abzeichneten. Auf Grund der niedrigen Probenzahl lässt sich hier allerdings keine abschließende Aussage über die Relevanz dieses Befundes treffen. In Mundschleimhautepithel zeigte sich im überwiegenden Teil ein „random“ XCI-Muster. Diese Unterschiede im XCI-Muster zwischen den einzelnen

Gewebetypen, sowie die hohe Prävalenz von verschobenen XCI-Mustern in Blut, sind auch bei gesunden Frauen vorbeschrieben (Zito et al., 2019), wobei der Grund hierfür unbekannt ist. Er könnte allerdings in der unterschiedlichen Herkunft der Gewebe aus der Embryonalentwicklung vermutet werden.

4.3 Relevanz der Klassifikation von Sequenzvarianten

Es zeigte sich, dass die Klassifikation der vorliegenden Sequenzvariante einen Vorteil in der klinischen Praxis bietet. Denn Frauen, deren Sequenzvariante als classic, höher als 3+ oder als „active site“ oder „buried“ eingestuft wurde (Arends et al., 2017; Rickert et al., 2020; Richards et al., 2015), wiesen einen ausgeprägteren klinischen Phänotyp auf, als Patientinnen mit einer anderen Einstufung (siehe Appendix 2, Appendix 4). Diese Tatsache ist vor allem bei Neudiagnosen von M. Fabry von Vorteil, um eine Vorhersage des Krankheitsverlaufes zu treffen. Allerdings liefern hier nur Aussagen über bereits vielfach beschriebene, häufige Sequenzvarianten eine gute Vorhersage. Bei seltenen oder noch unbekanntem Varianten ist die Klassifikation nach dem klinischen Phänotyp eher ungeeignet. Deshalb gab es einige Versuche in solchen Fällen eine Vorhersage anhand der strukturellen Veränderungen durch die Sequenzvarianten zu treffen (Saito et al., 2010; Matsuzawa et al., 2005). Dieses Vorgehen ähnelt der in der Arbeit verwendeten Klassifikation nach Pathogenitätsklassen und Lage der Mutation im Enzym (Richards et al., 2015; Rickert et al., 2020). Dadurch kann versucht werden auch für noch wenig bekannte Sequenzvarianten die Auswirkung auf den klinischen Phänotyp vorherzusagen, um den jeweiligen klinischen Verlauf einschätzen und so einen passenden Therapieplan erstellen zu können. Deshalb sollten solche Klassifikationsysteme für Sequenzvarianten bei jeder Frau mit neu diagnostiziertem M. Fabry angewandt werden.

4.4 Stabilität der X-Inaktivierung über die Zeit

Es ist ein bekanntes Phänomen, dass sich das XCI-Muster mit dem Lebensalter verändert (Busque et al., 1996). Aus diesem Grund wurden biologische Replikate untersucht, bei denen sich eine zeitliche Stabilität der XCR von annähernd 2 Jahren nachweisen ließ (Abbildung 9). Andere Untersuchungen von gesunden Frauen zeigten, dass die Prävalenz von verschobenen XCI-Mustern von 16% auf 38% beim Vergleich der unter 32- mit den über 60-Jährigen steigt (Busque et al., 1996). Ebenso fand sich eine hohe Prävalenz von „skewed“ XCI-Mustern in Blut bei Frauen über 60 Jahren (Sharp et al., 2000). Trotz dieser Kenntnisse sind prospektive Langzeitstudien erforderlich, um die Frage zu klären, wie sich das XCI-Muster konkret im Alter verändert und nach welchem Zeitraum eine erneute XCI-Analyse zu veränderten Ergebnissen führt.

4.5 Reliabilität der verwendeten Methode

Um die Reliabilität der verwendeten Methode zu überprüfen, wurden technische Replikate untersucht. Hierfür wurde dieselbe Probe mehrmals in Bezug auf ihre XCI analysiert und die XCR der Analysen miteinander verglichen. Insgesamt zeigte sich eine mediane Differenz von 5% zwischen den XCR der untersuchten Proben (Abbildung 10). Diese hohe Reliabilität erlaubte sowohl den individuellen Vergleich der XCR von Geweben einer Person, als auch den interindividuellen Vergleich der XCR von Geweben der gesamten Kohorte. Eine ähnliche Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von 3% wurde in einer anderen Studie nachgewiesen, die ebenfalls das HUMARA-Assay verwendete (Busque et al., 2009).

4.6 Intraindividuelle Variabilität der X-Inaktivierung zwischen verschiedenen Geweben

Beim intraindividuellen Vergleich der XCI-Muster zeigte sich eine Übereinstimmung bezogen auf die Einteilung in „random“ bzw. „skewed“ in 60-70% der Fälle je nachdem welche Gewebe gegenübergestellt wurden. Ähnliche Daten finden sich in vergleichbaren Studien (Dobrovolny et al., 2005; Echevarria et al., 2016; Rossanti et al., 2021). Auch die Prävalenz von „random“ XCI-Mustern in Blut und Hautfibroblasten ist in einigen Studien annähernd gleich der Prävalenz in der durchgeführten Studie (70% vs. 65-67%) (Dobrovolny et al., 2005; Echevarria et al., 2016; Elstein et al., 2012). Die Unterschiede zwischen den Geweben, können auf deren unterschiedliche embryonale Herkunft zurückzuführen sein. Während das Mundschleimhautepithel aus dem Endoderm stammen, gehen das Blut und die Hautfibroblasten aus dem Mesoderm hervor (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019). Daher könnten in den drei Keimblättern verschiedene etablierte XCI-Muster an die späteren Gewebe weitergegeben werden, was zu einem Unterschied im XCI-Muster zwischen ihnen führen kann.

Betrachtet man alle Gewebe, so fällt vor allem auf, dass das XCI-Muster in den Blutproben am häufigsten eine Abweichung in Richtung „skewed“ aufweist. Das mediane Alter der Frauen (36/95, 38%) mit einer Abweichung der XCI-Muster zwischen den Geweben lag bei 57 Jahren (R 26-74). Dieses Phänomen wurde bereits in einer Studie mit gesunden Frauen festgestellt, in der die Prävalenz von „skewed“ XCI bei Frauen über 60 Jahren gegenüber jüngerer Vergleichsgruppen erhöht war und die intraindividuelle Variabilität der XCI-Muster in den Geweben ebenfalls mit dem Alter zunimmt (Sharp et al., 2000).

4.7 Kenntnis des Aktivierungsstatus des mutierten X-Chromosoms

Ein wichtiger Punkt ist die Bestimmung des Aktivierungsstatus des mutierten X-Chromosoms, da diese Information eine genaue Interpretation der Auswirkung des XCI-

Musters auf die Klinik erlaubt. Diese Bestimmung wurde in vorherigen Studien ebenfalls über Verwandtschaftsverhältnisse durchgeführt (Dobrovlny et al., 2005; Echevarria et al., 2016; Juchniewicz et al., 2018). Ein Vernachlässigen dieses Aspekts würde die Interpretation der Daten verfälschen, weshalb die Bestimmung des mutierten X-Chromosoms trotz größerem Aufwand bei der Rekrutierung und Auswertung essenziell für die Interpretation der XCI ist.

4.8 Offene Fragen und Limitationen

Einige Fragen konnten durch die durchgeführte Studie nicht beantwortet werden. Zwar wurde eine Stabilität des XCR über annähernd 2 Jahre nachgewiesen, aber für eine Aussage über einen längeren Zeitraum sind weitere Verlaufsuntersuchungen nötig. Des Weiteren ist ungeklärt, inwieweit sich eine veränderte XCR auf den klinischen Phänotyp auswirkt. Auch ist fraglich, ob die XCI-Muster der verwendeten Biomaterialien Mundschleimhautepithel, Blut und Hautfibroblasten die Krankheitsschwere widerspiegeln (Viggiano and Politano, 2021). Zwar sind diese Biomaterialien leicht zu entnehmen, aber gehören nicht zu den bei M. Fabry eigentlich betroffenen Geweben wie Herz oder Niere. Auch stammt das Mundschleimhautepithel aus einem anderen embryonalen Gewebe als Herz und Niere, sodass fraglich ist ob die XCI-Muster übereinstimmen. Aus diesem Grund wären weitere XCI-Analysen mit krankheitsspezifischen Geweben sinnvoll.

Eine Limitation findet sich bei der XCI-Analyse von Hautfibroblasten. Hier wurde aus technischen Gründen eine Kultur der gewonnenen Hautbiopsie angelegt. Diese Kultivierung der Hautfibroblasten könnte zu einer Veränderung des ursprünglichen XCI-Musters führen. Allerdings konnte diese Vermutung durch die durchgeführte Versuchsanordnung mit Analyse verschieden lang kultivierter Fibroblastenproben weitestgehend entkräftet werden. Hier zeigten sich keine Veränderung des XCI-Musters mit der Dauer der Kultivierung. Dennoch kann ein Einfluss der Kultur auf das XCI-Muster der Hautfibroblasten, allein auf Grundlage dieser kleinen Anzahl von untersuchten Proben nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Eine weitere Limitation kann in der XCI-Analyse gesehen werden. Hier wird nicht wie in neueren Studien die Methylierung des für M. Fabry ursächliche Gen *GLA* betrachtet (Hossain et al., 2019), sondern die Gene *AR* und *PCSK1N*. Bei der verwendeten Methode wird die Hypothese genutzt, dass die Inaktivierung für das gesamte X-Chromosom identisch ist und daher für alle Gene übereinstimmt. Hierbei ist anzumerken, dass *AR* wie *GLA* auf dem langen Arm des X-Chromosoms liegt. Zwar gilt für *PCSK1N* das Gegenteil, d.h. es liegt auf dem kurzen Arm, aber dies trifft auch für *DMD* zu. Für *DMD* wurde in einer vorherigen Studie eine Korrelation zwischen dem

Methylierungsgrad von *AR* und des klinischen Phänotyps nachgewiesen (Mercier et al., 2013), sodass die Annahme die Inaktivierung ist für das gesamte X-Chromosom gleich annehmbar zu sein scheint. Ebenso wurde diese Methode in zahlreichen früheren Studien zur XCI in M. Fabry angewandt (Dobrovoly et al., 2005; Elstein et al., 2012; Echevarria et al., 2016). Allerdings gibt es auch Hinweise, dass *GLA* sich der XCI entzieht (Carrel and Willard, 2005), was die Analyse des Methylierungsstatus hinauf machen würde. Dieser Aspekt ist vor allem im Hinblick auf die widersprüchlichen Ergebnisse früherer Studien in Bezug auf die Korrelation zwischen der XCI und dem klinischen Phänotyp von M. Fabry zu beachten.

4.9 Fazit und Ausblick

Der Einfluss der XCI auf klinischen Phänotyp von M. Fabry ist immer noch umstritten und ließ sich auch durch die vorliegende Studie nicht sicher nachweisen. Zwar zeigten sich einige Tendenzen für eine Korrelation zwischen dem XCI-Muster und dem klinischen Phänotyp, diese waren aber nicht statistisch signifikant. Aus diesem Grund eignet sich das XCI-Muster nicht als alleiniger Parameter zur Vorhersage des klinischen Phänotyps und des Krankheitsverlaufes einer Patientin mit M. Fabry. Mit Mundschleimhautepithel und Blut fanden sich allerdings zwei Biomaterialien, die leicht zu asservieren waren und sich sehr gut für die XCI-Analyse eignen.

Mit den Erkenntnissen, die in dieser Studie gewonnen wurden, bietet es sich an, größere Kohorten von Frauen mit M. Fabry zu untersuchen und diese bezüglich der Pathogenität der Sequenzvariante genauer einzustufen. Auch eine ausführlichere klinische Evaluation würde die Anwendung der bekannten Scores ermöglichen. Ebenso zeigte sich, dass ein längerer Beobachtungszeitraum der Frauen zur Detektion von Änderungen im XCI-Muster nötig ist.

5 Zusammenfassung

Obwohl M. Fabry eine X-chromosomal vererbte Erkrankung ist, zeigen auch Frauen verschiedene Ausprägungen des klinischen Phänotyps. Der Grund hierfür ist bis heute umstritten. Versuche den Einfluss der X-Inaktivierung auf den klinischen Phänotyp bei Frauen mit M. Fabry nachzuweisen ergaben widersprüchliche Befunde.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit eben diesem Thema. Hierfür wurden insgesamt 104 Frauen und 50 Männer rekrutiert und eine Analyse der XCI-Muster wurde anhand von Mundschleimhautepithel, Blut und Hautfibroblasten durchgeführt. Von den Männern wurde eine Mundschleimhautepithelprobe zur Bestimmung des mutierten X-Chromosoms bei den Frauen asserviert. Die Frauen unterliefen eine umfangreiche klinische und laborchemische Diagnostik. Der daraus abgeleitete klinische Phänotyp, wurde mittels eines numerischen Scores abgebildet und in die Kategorien keine, milde, moderate und schwere Symptomatik unterteilt. Eine Einteilung der vorliegenden Sequenzvarianten von *GLA* nach resultierendem klinischem Phänotyp, Pathogenitätsklassen und Lage im fertigen Enzym erfolgte ebenfalls. Die Analyse des XCI-Musters erfolgte über das etablierte HUMARA-Assay. Dadurch konnten die Proben in „random“ und „skewed“ XCI-Muster unterteilt werden. Zusätzlich wurde bei „skewed“ Proben je nach Aktivitätsstatus des mutierten X-Chromosoms die Einteilung in „mutiertes X ist aktiv“ bzw. „mutiertes X ist inaktiv“ vorgenommen. Des Weiteren wurden biologische und technische Replikate durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass Blut als leicht erhältliches Biomaterial eine hohe Prävalenz an „skewed“ XCI-Mustern aufweist. Wobei sich allerdings keine signifikante Korrelation mit dem klinischen Phänotyp nachweisen ließ. In Blut und Hautfibroblasten fand sich ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen der XCI und der Klinik der Patientinnen. Allerdings lässt sich der klinische Phänotyp mit allen drei Einteilungen der Sequenzvarianten gut abbilden und somit auch vorhersagen. In den biologischen Replikaten zeigte sich eine Stabilität des XCI-Musters von 2 Jahren. Die gewählte Analysemethode HUMARA wies eine hohe Reliabilität in der Analyse der technischen Replikate auf. In etwa 40% der Patientinnen gab es intraindividuelle Unterschiede der XCI-Muster verschiedener Gewebe bezogen auf die Einteilung in „random“ und „skewed“, wobei hier vor allem ein „Skewing“ im Blut auffiel.

Zusammenfassend lässt sich sagen, um die Frage des Einflusses der XCI auf die Ausprägung des klinischen Phänotyps bei M. Fabry abschließend zu klären, sind weitere Studien mit einer größeren Patientenkohorte, einem längeren Beobachtungszeitraum, sowie das Analysieren von XCI-Mustern in betroffenen Organsystemen nötig. Als alleiniges Vorhersagetool des sich entwickelnden klinischen Phänotyps eignet sich die

XCI noch nicht. Hierfür sollte eine Kategorisierung der vorliegenden Sequenzvariante erfolgen, die einen guten Vorhersagewert besitzt.

6 Literaturverzeichnis

- Allen R. C., Zoghbi H. Y., Moseley A. B., Rosenblatt H. M. & Belmont J. W. 1992. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet*, 51, 1229-39.
- Anderson W. 1898. A case of "Angeio-keratoma". *British Journal of Dermatology*, 10, 113-117.
- Arends M., Biegstraaten M., Wanner C., Sirrs S., Mehta A., Elliott P. M., Oder D., Watkinson O. T., et al. 2018. Agalsidase alfa versus agalsidase beta for the treatment of Fabry disease: an international cohort study. *J Med Genet*, 55, 351-358.
- Arends M., Wanner C., Hughes D., Mehta A., Oder D., Watkinson O. T., Elliott P. M., Linthorst G. E., Wijburg F. A., Biegstraaten M. & Hollak C. E. 2017. Characterization of Classical and Nonclassical Fabry Disease: A Multicenter Study. *J Am Soc Nephrol*, 28, 1631-1641.
- Askari H., Kaneski C. R., Semino-Mora C., Desai P., Ang A., Kleiner D. E., Perlee L. T., Quezado M., Spollen L. E., Wustman B. A. & Schiffmann R. 2007. Cellular and tissue localization of globotriaosylceramide in Fabry disease. *Virchows Arch*, 451, 823-34.
- Barr M. L. & Bertram E. G. 1949. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*, 163, 676.
- Berlitch J. B., Yang F., Xu J., Carrel L. & Disteche C. M. 2011. Genes that escape from X inactivation. *Hum Genet*, 130, 237-45.
- Bertelsen B., Tümer Z. & Ravn K. 2011. Three new loci for determining x chromosome inactivation patterns. *J Mol Diagn*, 13, 537-40.
- Busque L., Mio R., Mattioli J., Brais E., Blais N., Lalonde Y., Maragh M. & Gilliland D. G. 1996. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood*, 88, 59-65.
- Busque L., Paquette Y., Provost S., Roy D. C., Levine R. L., Mollica L. & Gilliland D. G. 2009. Skewing of X-inactivation ratios in blood cells of aging women is confirmed by independent methodologies. *Blood*, 113, 3472-4.
- Carrel L. & Willard H. F. 2005. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, 434, 400-4.
- Colon C., Ortolano S., Melcon-Crespo C., Alvarez J. V., Lopez-Suarez O. E., Couce M. L. & Fernández-Lorenzo J. R. 2017. Newborn screening for Fabry disease in the north-west of Spain. *Eur J Pediatr*, 176, 1075-1081.
- Devigili G., Tugnoli V., Penza P., Camozzi F., Lombardi R., Melli G., Broglio L., Granieri E. & Lauria G. 2008. The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from symptoms to neuropathology. *Brain*, 131, 1912-25.
- Dobrovolny R., Dvorakova L., Ledvinova J., Magage S., Bultas J., Lubanda J. C., Elleder M., Karetova D., Pavlikova M. & Hrebicek M. 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., Toussaint A., Dubourg O., Hagege A. A., Eladari D., Jabbour F., Beldjord C., De Mazancourt P. & Germain D. P. 2016. X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. *Clin Genet*, 89, 44-54.

- El Dib R., Gomaa H., Ortiz A., Politei J., Kapoor A. & Barreto F. 2017. Enzyme replacement therapy for Anderson-Fabry disease: A complementary overview of a Cochrane publication through a linear regression and a pooled analysis of proportions from cohort studies. *PLoS One*, 12, e0173358.
- Elstein D., Schachamov E., Beerl R. & Altarescu G. 2012. X-inactivation in Fabry disease. *Gene*, 505, 266-8.
- Eng C. M., Banikazemi M., Gordon R. E., Goldman M., Phelps R., Kim L., Gass A., Winston J., et al. 2001a. 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.
- Eng C. M., Guffon N., Wilcox W. R., Germain D. P., Lee P., Waldek S., Caplan L., Linthorst G. E. & Desnick R. J. 2001b. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med*, 345, 9-16.
- Fabry J. 1898. Ein Beitrag zur Kenntniss der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). *Archiv für Dermatologie und Syphilis*, 43, 187-200.
- Feriozzi S. & Hughes D. A. 2020. New drugs for the treatment of Anderson-Fabry disease. *J Nephrol*.
- Garagiola I., Mortarino M., Siboni S. M., Boscarino M., Mancuso M. E., Biganzoli M., Santagostino E. & Peyvandi F. 2021. X Chromosome inactivation: a modifier of factor VIII and IX plasma levels and bleeding phenotype in Haemophilia carriers. *Eur J Hum Genet*, 29, 241-249.
- Garman S. C. & Garboczi D. N. 2004. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Biol*, 337, 319-35.
- Garman S. C., Garboczi, D.N. 2003. *Structure of human alpha-galactosidase* [Online]. Available: <https://www.rcsb.org/structure/1R46> [Accessed 2020].
- Germain D. P. 2010. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis*, 5, 30.
- Germain D. P., Hughes D. A., Nicholls K., Bichet D. G., Giugliani R., Wilcox W. R., Feliciani C., Shankar S. P., et al. 2016. Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. *N Engl J Med*, 375, 545-55.
- Germain D. P., Nicholls K., Giugliani R., Bichet D. G., Hughes D. A., Barisoni L. M., Colvin R. B., Jennette J. C., Skuban N., Castelli J. P., Benjamin E., Barth J. A. & Viereck C. 2019. Efficacy of the pharmacologic chaperone migalastat in a subset of male patients with the classic phenotype of Fabry disease and migalastat-amenable variants: data from the phase 3 randomized, multicenter, double-blind clinical trial and extension study. *Genet Med*, 21, 1987-1997.
- Graw J. 2015. *Genetik*, 6. Auflage. S.318-325. Berlin, Heidelberg, Springer Spektrum.
- Happle R. 2002. Dohi Memorial Lecture. New aspects of cutaneous mosaicism. *J Dermatol*, 29, 681-92.
- Hossain M. A., Wu C., Yanagisawa H., Miyajima T., Akiyama K. & Eto Y. 2019. Future clinical and biochemical predictions of Fabry disease in females by methylation studies of the GLA gene. *Mol Genet Metab Rep*, 20, 100497.
- Hughes D. A., Nicholls K., Shankar S. P., Sunder-Plassmann G., Koeller D., Nedd K., Vockley G., Hamazaki T., et al. 2017. Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease:

- 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. *J Med Genet*, 54, 288-296.
- Hwu W. L., Chien Y. H., Lee N. C., Chiang S. C., Dobrovolny R., Huang A. C., Yeh H. Y., Chao M. C., Lin S. J., Kitagawa T., Desnick R. J. & Hsu L. W. 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*, 30, 1397-405.
- Juchniewicz P., Kloska A., Tylki-Szymanska A., Jakobkiewicz-Banecka J., Wegrzyn G., Moskot M., Gabig-Ciminska M. & Piotrowska E. 2018. Female Fabry disease patients and X-chromosome inactivation. *Gene*, 641, 259-264.
- Karl F., Wußmann M., Kreß L., Malzacher T., Fey P., Groeber-Becker F. & Uçeyler N. 2019. Patient-derived in vitro skin models for investigation of small fiber pathology. *Ann Clin Transl Neurol*, 6, 1797-1806.
- Knippers R. 2006. *Molekulare Genetik, 8. Auflage. S.518.* Stuttgart, Thieme Verlag.
- Kolokotronis K., Pluta N., Klopocki E., Kunstmann E., Messroghli D., Maack C., Tejman-Yarden S., Arad M., Rost S. & Gerull B. 2020. New Insights on Genetic Diagnostics in Cardiomyopathy and Arrhythmia Patients Gained by Stepwise Exome Data Analysis. *J Clin Med*, 9.
- Lenders M., Nordbeck P., Kurschat C., Karabul N., Kaufeld J., Hennermann J. B., Patten M., Cybulla M., et al. 2020. Treatment of Fabry's Disease With Migalastat: Outcome From a Prospective Observational Multicenter Study (FAMOUS). *Clin Pharmacol Ther*.
- Lenders M., Weidemann F., Kurschat C., Canaan-Kühl S., Duning T., Stypmann J., Schmitz B., Reiermann S., Krämer J., Blaschke D., Wanner C., Brand S. M. & Brand E. 2016. Alpha-Galactosidase A p.A143T, a non-Fabry disease-causing variant. *Orphanet J Rare Dis*, 11, 54.
- Lidove O., West M. L., Pintos-Morell G., Reisin R., Nicholls K., Figuera L. E., Parini R., Carvalho L. R., Kampmann C., Pastores G. M. & Mehta A. 2010. Effects of enzyme replacement therapy in Fabry disease--a comprehensive review of the medical literature. *Genet Med*, 12, 668-79.
- Lukas J., Scalia S., Eichler S., Pockrandt A. M., Dehn N., Cozma C., Giese A. K. & Rolfs A. 2016. Functional and Clinical Consequences of Novel α -Galactosidase A Mutations in Fabry Disease. *Hum Mutat*, 37, 43-51.
- Lüllmann-Rauch R. & Asan E. 2019. Befruchtung und Frühentwicklung. In: LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. (eds.) *Taschenlehrbuch Histologie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.
- Lyon M. F. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, 190, 372-3.
- Matsuzawa F., Aikawa S., Doi H., Okumiya T. & Sakuraba H. 2005. Fabry disease: correlation between structural changes in alpha-galactosidase, and clinical and biochemical phenotypes. *Hum Genet*, 117, 317-28.
- Matthews P. M., Benjamin D., Van Bakel I., Squier M. V., Nicholson L. V., Sewry C., Barnes P. R., Hopkin J., Brown R., Hilton-Jones D. & Et Al. 1995. Muscle X-inactivation patterns and dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy carriers. *Neuromuscul Disord*, 5, 209-20.
- Mccafferty E. H. & Scott L. J. 2019. Migalastat: A Review in Fabry Disease. *Drugs*, 79, 543-554.
- Mehta A., Ricci R., Widmer U., Dehout F., Garcia De Lorenzo A., Kampmann C., Linhart A., Sunder-Plassmann G., Ries M. & Beck M. 2004. Fabry disease

- defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest*, 34, 236-42.
- Meikle P. J., Hopwood J. J., Clague A. E. & Carey W. F. 1999. Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama*, 281, 249-54.
- Mercier S., Toutain A., Toussaint A., Raynaud M., De Barace C., Marcorelles P., Pasquier L., Blayau M., et al. 2013. Genetic and clinical specificity of 26 symptomatic carriers for dystrophinopathies at pediatric age. *Eur J Hum Genet*, 21, 855-63.
- Oder D., Üçeyler N., Liu D., Hu K., Petritsch B., Sommer C., Ertl G., Wanner C. & Nordbeck P. 2016. Organ manifestations and long-term outcome of Fabry disease in patients with the GLA haplotype D313Y. *BMJ Open*, 6, e010422.
- Poorthuis B. J., Wevers R. A., Kleijer W. J., Groener J. E., De Jong J. G., Van Weely S., Niezen-Koning K. E. & Van Diggelen O. P. 1999. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet*, 105, 151-6.
- Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W. W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K. & Rehm H. L. 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, 17, 405-24.
- Rickert V., Wagenhäuser L., Nordbeck P., Wanner C., Sommer C., Rost S. & Üçeyler N. 2020. Stratification of Fabry mutations in clinical practice: a closer look at alpha-galactosidase A-3D structure. *J Intern Med*, 288, 593-604.
- Rossanti R., Nozu K., Fukunaga A., Nagano C., Horinouchi T., Yamamura T., Sakakibara N., Minamikawa S., et al. 2021. X-chromosome inactivation patterns in females with Fabry disease examined by both ultra-deep RNA sequencing and methylation-dependent assay. *Clin Exp Nephrol*.
- Rozenfeld P. A., De Los Angeles Bolla M., Quietto P., Pisani A., Feriozzi S., Neuman P. & Bondar C. 2020. Pathogenesis of Fabry nephropathy: The pathways leading to fibrosis. *Mol Genet Metab*, 129, 132-141.
- Saito S., Ohno K., Sese J., Sugawara K. & Sakuraba H. 2010. Prediction of the clinical phenotype of Fabry disease based on protein sequential and structural information. *J Hum Genet*, 55, 175-8.
- Schiffmann R., Kopp J. B., Austin H. A., 3rd, Sabnis S., Moore D. F., Weibel T., Balow J. E. & Brady R. O. 2001. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *Jama*, 285, 2743-9.
- Sharp A., Robinson D. & Jacobs P. 2000. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet*, 107, 343-9.
- Spada M., Pagliardini S., Yasuda M., Tükel T., Thiagarajan G., Sakuraba H., Ponzzone A. & Desnick R. J. 2006. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet*, 79, 31-40.
- Üçeyler N., Kafke W., Riediger N., He L., Necula G., Toyka K. V. & Sommer C. 2010. Elevated proinflammatory cytokine expression in affected skin in small fiber neuropathy. *Neurology*, 74, 1806-13.
- Üçeyler N., Magg B., Thomas P., Wiedmann S., Heuschmann P. & Sommer C. 2014. A comprehensive Fabry-related pain questionnaire for adult patients. *Pain*, 155, 2301-5.

- University of California Santa Cruz. 2000. *UCSC Genome Browser* [Online]. Available: <https://genome.ucsc.edu/index.html> [Accessed 2020].
- Vacca M., Della Ragione F., Scalabri F. & D'esposito M. 2016. X inactivation and reactivation in X-linked diseases. *Semin Cell Dev Biol*, 56, 78-87.
- Viggiano E., Ergoli M., Picillo E. & Politano L. 2016. Determining the role of skewed X-chromosome inactivation in developing muscle symptoms in carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet*, 135, 685-98.
- Viggiano E. & Politano L. 2021. X Chromosome Inactivation in Carriers of Fabry Disease: Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*, 22.
- Wagenhäuser L., Rickert V., Sommer C., Wanner C., Nordbeck P., Rost S. & Üçeyler N. 2022. X-chromosomal inactivation patterns in women with Fabry disease. *Mol Genet Genomic Med*, e2029.
- Wilcox W. R., Oliveira J. P., Hopkin R. J., Ortiz A., Banikazemi M., Feldt-Rasmussen U., Sims K., Waldek S., et al. 2008. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab*, 93, 112-28.
- Zito A., Davies M. N., Tsai P. C., Roberts S., Andres-Ejarque R., Nardone S., Bell J. T., Wong C. C. Y. & Small K. S. 2019. Heritability of skewed X-inactivation in female twins is tissue-specific and associated with age. *Nat Commun*, 10, 5339.

Appendix

Appendix 1 Anleitung für Mundschleimhautabstrich

Anleitung für den Mundschleimhautabstrich

Sie benötigen: 2 Mundschleimhautabstrichröhrchen
1 leeres, sauberes Glas

Durchführung:

Vorher dürfen Sie für 30 min. NICHTS essen oder trinken.
Dazu zählt auch Kaugummi kauen, Bonbons lutschen, rauchen.



1. Nehmen Sie das Wattestäbchen mit sauberen Händen aus der Verpackung.
Hierfür den roten Deckel aufdrehen bis die Versiegelung eingerissen ist. Achten Sie darauf, dass Sie es nur am roten Deckel festhalten.
Berühren Sie NIE den Wattebausch.
Achten Sie darauf, dass der Tupfer NICHT mit Gegenständen in Berührung kommt. Legen Sie ihn NICHT ab.



2. Öffnen Sie Ihren Mund und streichen mit dem Wattestäbchen auf der Innenseite der Wange entlang. Während Sie ~15mal auf und ab reiben, drehen Sie das Wattestäbchen dabei langsam.
Wiederholen Sie das mit demselben Wattestäbchen auf der Innenseite der anderen Wange.
Da am Wattebausch später einige Zellen haften sollen, dürfen Sie hier wirklich reiben!
Ein leichtes Streichen über die Wangeninnenseite reicht NICHT aus.



3. Schieben Sie das Wattestäbchen nach der Probeentnahme sofort wieder in die sterile Verpackung.
Achten Sie darauf, dass das Wattestäbchen nur das Innere des Röhrchens berührt.

4. Stellen Sie nun das Röhrchen in ein sauberes, leeres Glas.

5. Wiederholen Sie die Schritte 1-4 mit dem zweiten Wattestäbchen.

6. Lassen Sie nun beide Tupfer für **30 Minuten** bei Raumtemperatur antrocknen. Hierfür wird der rote Deckel auf dem Röhrchen leicht nach hinten gesetzt.

7. Danach den roten Deckel wieder fest in das Röhrchen drücken und das Röhrchen so verschließen.

8. Beschriften Sie bitte das Röhrchen mit dem heutigen Datum.



Appendix 2 Sequenzvarianten der weiblichen Kohorte

	Sequenzvariante	Häufigkeit	Klassifikation basierend auf		
			klinischer Phänotyp*	Pathogenitätsklasse**	Lokalisation***
missense	c.137A>G // p.H46R	1	classic	4	buried
	c.155G>C // p.C52S	1	classic	3+	other
	c.188G>A // p.C63Y	2	classic	4	other
	c.334C>T // p.R112C	1	classic	5	buried
	c.350T>G // p.I117S	1	classic	4	buried
	c.386T>C // p.L129P	1	classic	4	buried
	c.404C>T // p.A135V	5	classic	4	buried
	c.408T>A // p.D136E	2	classic	3+	buried
	c.416A>G // p.N139S	1	late onset	2	other
	c.427G>A // p.A143T	8	benign	2	other
	c.471G>C // p.Q157H	1	VUS	3	buried
	c.484T>G // p.W162G	1	classic	3+	buried
	c.486G>T // W162C	1	classic	3+	buried
	c.515G>A // p.C172Y	3	classic	3+	active site
	c.559A>G // p.M187V	1	classic	3+	buried
	c.612G>T // p.W204C	1	classic	3+	buried
	c.644A>G // p.N215S	16	late onset	5	other
	c.806T>G // p.V269G	1	classic	4	buried
	c.860G>C // p.W287S	1	VUS	3+	buried
	c.902G>A // p.R301Q	3	late onset	5	other
c.937G>T // p.D313Y	9	benign	2	other	

	Sequenzvariante	Häufigkeit	Klassifikation basierend auf		
			klinischer Phänotyp*	Pathogenitätsklasse**	Lokalisation***
missense	c.973G>A // p.G325S	1	late onset	3+	other
	c.1025G>T // p.R342L	3	classic	3	buried
	c.1184G>C // p.G395A	2	likely late onset	3	other
	c.1196G>C // p.W399S	1	benign	2	other
	c.1250T>C // p.L417P	2	VUS	3	buried
nonsense	c.648T>A // p.Y216*	2	VUS	5	NA
	c.934C>T // p.Q312*	2	classic	5	NA
	c.1196G>A // p.W399*	1	classic	5	NA
frameshift	c.290del // p.A97Vfs*24	1	VUS	5	NA
	c.363del // p.N122Ifs*8	1	classic	5	NA
	c.568del // p.A190Pfs*2	1	classic	5	NA
	c.757del // p.I253Lfs*16	3	VUS	5	NA
	c.718_719del // p.K240Efs*9	1	classic	5	NA
	c.927del // p.L310Sfs*7	1	VUS	5	NA
	c.994dup // p.R332Kfs*7	3	classic	5	NA
	c.1223del // p.N408Ifs*10	2	classic	5	NA
deletion/ delins	c.35_58del // p.C12_A20delinsS	1	classic	3	NA
	c.354_368del // p.Q119_Y123del	1	classic	3	NA
	c.963_964delinsCA // p.Q321_D322delinsHN	1	classic	3	NA
	c.1072_1074del // p.E358del	1	classic	4	NA

	Sequenzvariante	Häufigkeit	Klassifikation basierend auf		
			klinischer Phänotyp*	Pathogenitätsklasse**	Lokalisation***
essential splice site	c.369+1G>A	1	classic	5	NA
	c.547+1G>A	1	classic	3+	NA
	c.802-3_802-2del	1	classic	3+	NA
intronisch	c.370-10C>T	2	VUS	3	NA
	c.370-81_370-77del	1	VUS	1	NA
	c.640-16A>G	1	VUS	1	NA
	c.1000-22C>T	4	VUS	1	NA

* nach <http://www.dbfpg.org>.

** 1 = benign, 2 = likely benign, 3 = VUS, 3+ = VUS with probable pathogenicity, 4 = likely pathogenic, 5 = pathogenic (Richards et al., 2015; Kolokotronis et al., 2020).

*** active site mutation = Variante im aktiven Zentrum der alpha-galactosidase A, buried mutation = Variante in der Nähe des aktiven Zentrums, other mutation = Variante fernab des aktiven Zentrums (Rickert et al., 2020).

Abkürzungen: NA = nicht anwendbar, VUS = variant of unknown significance.

(modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022)

Appendix 3 Frauen mit mehreren Sequenzvarianten

ID	Sequenzvariante	Art der Sequenzvariante	Klassifikation basierend auf		
			Pathogenitätsklasse	klinischer Phänotyp	Lokalisation
FD1036	c.612G>T // p.W204C	missense	3+	classic	buried
	c.370-10C>T	intron	3	VUS	NA
	c.1000-22C>T	intron	1	VUS	NA
FD1037	c.1196G>C // p.W399S	missense	3	benign	other
	c.370-10C>T	intron	3	VUS	NA
	c.370-81_370-77del	intron	1	VUS	NA
	c.640-16A>G	intron	1	VUS	NA
	c.1000-22C>T	intron	1	VUS	NA
FD1048	c.806T>G // p. V269G	missense	4	classic	buried
	c.937G>T // p. D313Y	missense	2	benign	other
FD1198	c.188G>A // p.C63Y	missense	4	classic	other
	c.1000-22C>T	intron	1	VUS	NA
FD1223	c.188G>A // p.C63Y	missense	4	classic	other
	c.1000-22C>T	intron	1	VUS	NA

Die fettgedruckte Sequenzvariante wurde für die weitere Analyse herangezogen.

Abkürzungen: c.: coding sequence; del: deletion; delins: deletion-insertion; dup: duplication; fs: frameshift; NA = nicht anwendbar; p.: protein sequence; VUS: variant of unknown significance.

(modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022)

Appendix 4 Individuelle X-Inaktivierungsmuster

ID	Genotyp	Anzahl der als skewed eingestufteten Gewebe	Mundschleimhautepithel	Blut	Hautfibroblasten	Klinischer Score (0=keine; 1=milde; 2=moderate; 3≥schwere Symptome)
Gruppe I						
FD 1005	p.N139S	0/2	52:48	68:32	-	2
FD 1019	p.R332Kfs*7	1/2	54:46	82:18 Xi	-	3
FD 1025	p.G325S	0/2	72:28	59:41	-	2
FD 1026	p.A135V	0/2	29:71	29:71	-	1
FD 1027	p.A135V	2/3	21:79 Xa	33:67	0:100 Xa	0
FD 1032	p.R342L	1/3	33:67	23:77 Xi	34:66	3
FD 1035	p.R342L	1/2	31:69	24:76 Xi	-	3
FD 1036	p.W204C	0/2	48:52	70:30	-	2
FD 1040	p.N122Ifs*8	0/3	60:40	54:46	48:52	3
FD 1044	p.L129P	0/2	56:44	52:48	-	4
FD 1045	p.C52S	0/2	32:68	57:43	-	1
FD 1048	p.V269G	1/2	-	95:5 Xi	56:44	3
FD 1049	p.W399*	1/2	30:70	20:80 Xi	-	1
FD 1056	p.Q157H	0/2	59:41	60:40	-	3
FD 1064	p.N215S	1/2	45:55	80:20 Xi	-	0
FD 1074	p.I253Lfs*16	0/3	39:61	54:46	30:70	2
FD 1077	p.W287S	1/3	36:64	59:41	91:9 Xi	1
FD 1086	p.W162G	0/2	47:53	58:42	-	4
FD 1087	p.A135V	0/2	50:50	32:68	-	1
FD 1088	p.A135V	0/2	31:69	30:70	-	1
FD 1090	p.R332Kfs*7	0/2	48:52	57:43	-	1

ID	Genotyp	Anzahl der als skewed eingestufteten Gewebe	Mundschleimhautepithel	Blut	Hautfibroblasten	Klinischer Score (0=keine; 1=milde; 2=moderate; 3≥schwere Symptome)
FD 1092	p.Q321_D322delinsHN	0/2	43:57	28:72	-	3
FD 1099	p.K240Efs*9	2/3	68:32	81:19 Xi	91:9 Xi	3
FD 1104	p.N215S	2/3	74:26	75:25 Xi	94:6 Xi	2
FD 1110	p.Y216*	0/2	41:59	52:48	-	1
FD 1111	p.Y216*	0/2	43:57	52:48	-	1
FD 1113	p.N215S	0/2	47:53	35:65	-	0
FD 1125	p.R301Q	1/2	56:44	21:79 Xi	-	0
FD 1127	p.A135V	1/2	34:66	2:98 Xa	-	3
FD 1129	p.D136E	1/2	24:76 Xi	46:54	-	1
FD 1131	p.L417P	1/2	52:48	24:76 Xi	-	3
FD 1132	p.L417P	0/2	49:51	41:59	-	3
FD 1136	c.369+1G>A	0/2	37:63	45:55	-	0
FD 1139	p.E358del	0/3	39:61	70:30	30:70	3
FD 1141	p.N215S	0/2	29:71	27:73	-	2
FD 1146	p.N215S	0/2	44:56	60:40	-	0
FD 1152	p.A190Pfs*2	0/3	41:59	36:64	26:74	2
FD 1156	p.R112C	0/2	53:47	43:57	-	3
FD 1159	p.M187V	0/2	42:58	29:71	-	1
FD 1160	p.N215S	1/3	59:41	92:8 Xi	65:35	1
FD 1162	p.Q312*	0/2	50:50	46:54	-	1
FD 1163	p.Q312*	0/2	47:53	46:54	-	2
FD 1164	p.C172Y	0/2	52:48	49:51	-	0

ID	Genotyp	Anzahl der als skewed eingestuftes Gewebe	Mundschleimhautepithel	Blut	Hautfibroblasten	Klinischer Score (0=keine; 1=milde; 2=moderate; 3≥schwere Symptome)
FD 1166	p.A97Vfs*24	0/2	38:62	53:47	-	1
FD 1168	p.N215S	0/2	46:54	44:56	-	0
FD 1174	p.G395A	1/3	60:40	34:66	2:98 Xi	1
FD 1175	p.N215S	1/2	30:70	22:78 Xi	-	1
FD 1176	p.Q119_Y123del	0/3	39:61	59:41	26:74	2
FD 1182	p.D136E	2/2	83:17 Xi	98:2 Xi	-	2
FD 1185	p.N215S	3/3	75:25 Xi	87:13 Xi	96:4 Xi	0
FD 1189	p.R301Q	1/2	68:32	87:13 Xa	-	1
FD 1190	p.R342L	1/3	35:65	17:83 Xa	57:43	2
FD 1193	c.547+1G>A	1/2	55:45	76:24 Xa	-	4
FD 1196	p.N408lfs*10	1/2	68:32	83:17 Xa	-	4
FD 1198	p.C63Y	0/2	50:50	35:65	-	2
FD 1200	p.N408lfs*10	1/2	39:61	15:85 Xa	-	2
FD 1202	p.N215S	1/2	58:42	10:90 Xa	-	1
FD 1203	p.R301Q	0/2	39:61	50:50	-	0
FD 1204	p.G395A	2/3	31:69	4:96 Xi	13:87 Xi	0
FD 1207	p.N215S	1/2	54:46	85:15 Xa	-	3
FD 1209	p.C172Y	0/2	44:56	39:61	-	2
FD 1211	p.C172Y	0/2	37:63	28:72	-	1
FD 1212	p.N215S	1/2	37:63	6:94 Xi	-	3
FD 1213	p.I117S	2/2	23:77 Xa	16:84 Xa	53:47	2
FD 1214	p.L310Sfs*7	0/3	52:48	45:55	40:60	0

ID	Genotyp	Anzahl der als skewed eingestuftes Gewebe	Mundschleimhautepithel	Blut	Hautfibroblasten	Klinischer Score (0=keine; 1=milde; 2=moderate; 3≥schwere Symptome)
FD 1216	p.N215S	2/3	36:64	5:95 Xa	79:21 Xi	1
FD 1217	p.H46R	0/3	42:58	34:66	32:68	2
FD 1218	p.W162C	0/2	51:49	50:50	-	0
FD 1219	p.R332Kfs*7	0/2	66:34	63:37	-	2
FD 1220	p.N215S	0/2	34:66	30:70	-	1
FD 1222	p.I253Lfs*16	0/3	40:60	40:60	74:26	2
FD 1223	p.C63Y	1/2	36:64	20:80 Xi	-	0
FD 1225	p.N215S	1/2	47:53	76:24 Xa	-	1
FD 1228	p.N215S	0/2	44:56	63:37	-	0
FD 1230	p.I253Lfs*16	1/2	53:47	77:23 Xi	-	2
FD 1234	p.C12_A20delinsS	0/3	37:63	46:54	57:43	2
Gruppe II						
FD 1003	p.A143T	0/2	54:46	45:55	-	1
FD 1053	p.D313Y	0/2	42:58	38:62	-	0
FD 1085	p.A143T	0/3	44:56	38:62	38:62	2*
FD 1098	p.D313Y	0/3	49:51	66:34	73:27	0
FD 1114	p.A143T	0/2	57:43	49:51	-	1
FD 1135	p.A143T	0/2	54:46	73:27	-	1
FD 1147	p.D313Y	0/2	54:46	51:49	-	1
FD 1183	p.D313Y	0/3	57:43	32:68	49:51	1
FD 1188	p.A143T	1/3	48:52	76:24 Xi	45:55	0
FD 1194	p.D313Y	0/2	47:53	44:56	-	1

ID	Genotyp	Anzahl der als skewed eingestuftes Gewebe	Mundschleimhautepithel	Blut	Hautfibroblasten	Klinischer Score (0=keine; 1=milde; 2=moderate; 3≥schwere Symptome)
FD 1201	p.A143T	0/2	62:38	47:53	-	1
FD 1232	p.D313Y	3/3	25:75 Xa	18:82 Xa	95:5 Xi	2**

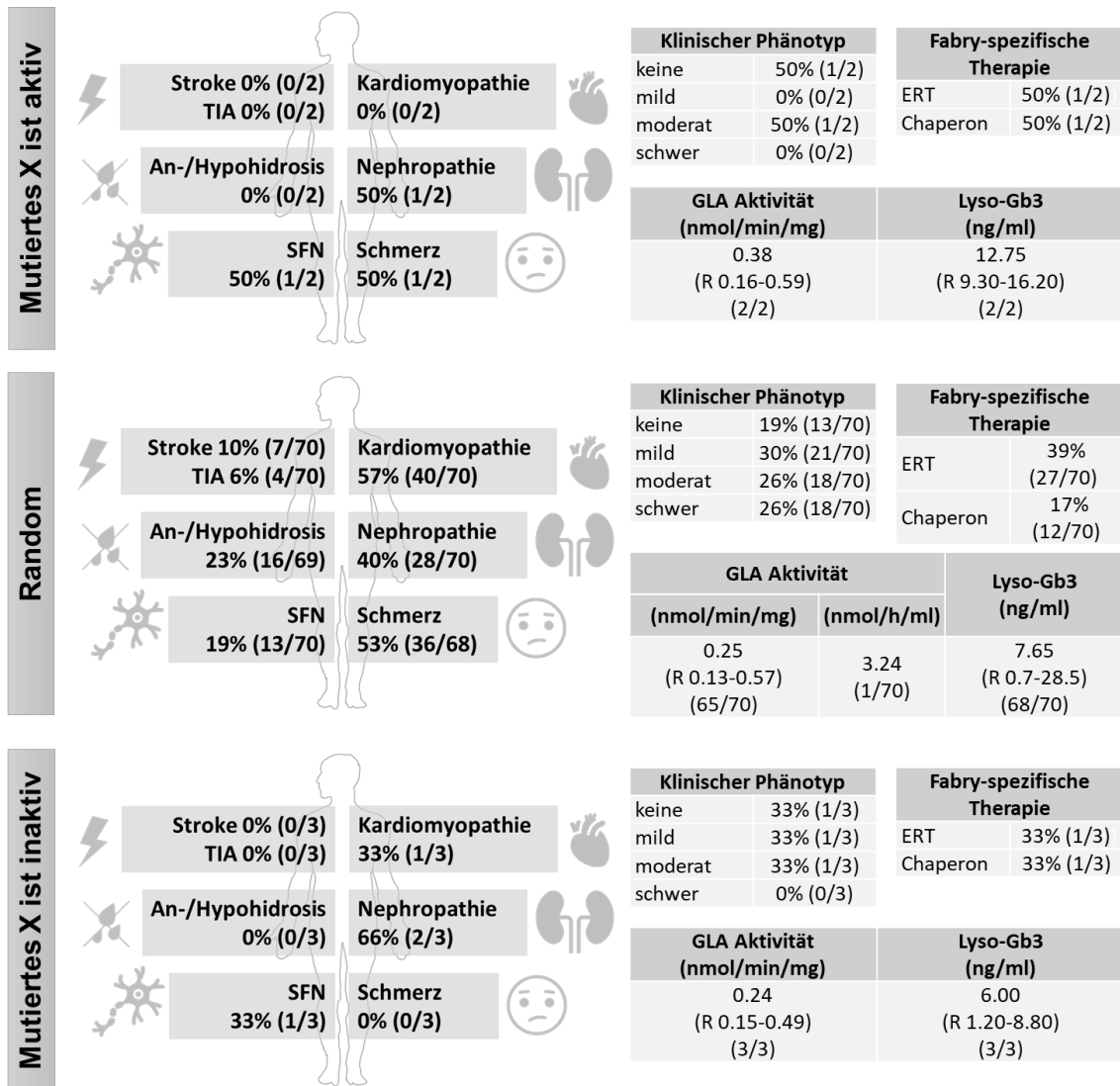
* Patient mit chronischen Schmerzen in mehreren Körperregionen und Hirninfarkt.

** Patient mit Nephropathie durch arterielle Hypertonie und chronischem Schmerzsyndrom. Nierenbiopsie ohne Gb3 Ablagerungen.

Abkürzungen: c.: coding sequence; del: deletion; delins: deletion-insertion; dup: duplication; FD: Fabry disease; fs: frameshift; ID: identification number; p.: protein sequence; Xa: mutiertes X-Chromosom aktiv; Xi: mutiertes X-Chromosom inaktiv; "-": keine Probe vorhanden.

(modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022)

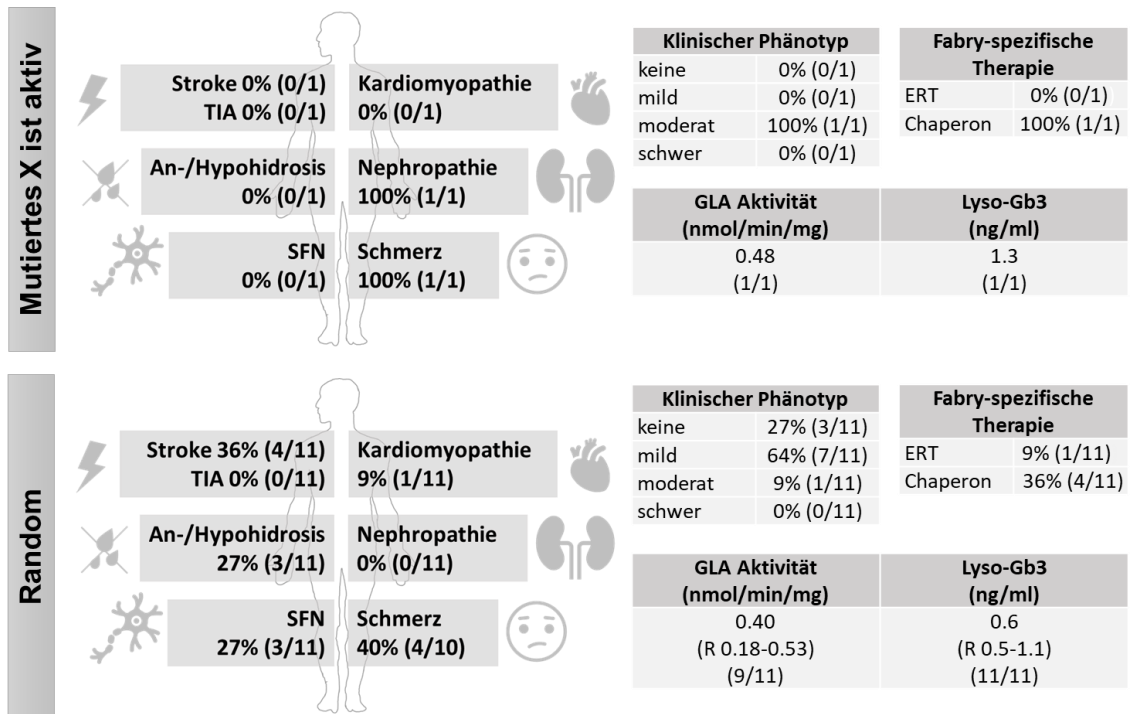
Appendix 5 X-Inaktivierungsmuster und klinischer Phänotyp in Mundschleimhautepithel Gruppe I



Abkürzungen: ERT: Enzyersatztherapie; GLA: alpha-Galaktosidase A; SFN: Small Fiber Neuropathie; TIA: transiente ischämische Attacke.

(modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022)

Appendix 6 X-Inaktivierungsmuster und klinischer Phänotyp in Mundschleimhautepithel
Gruppe II

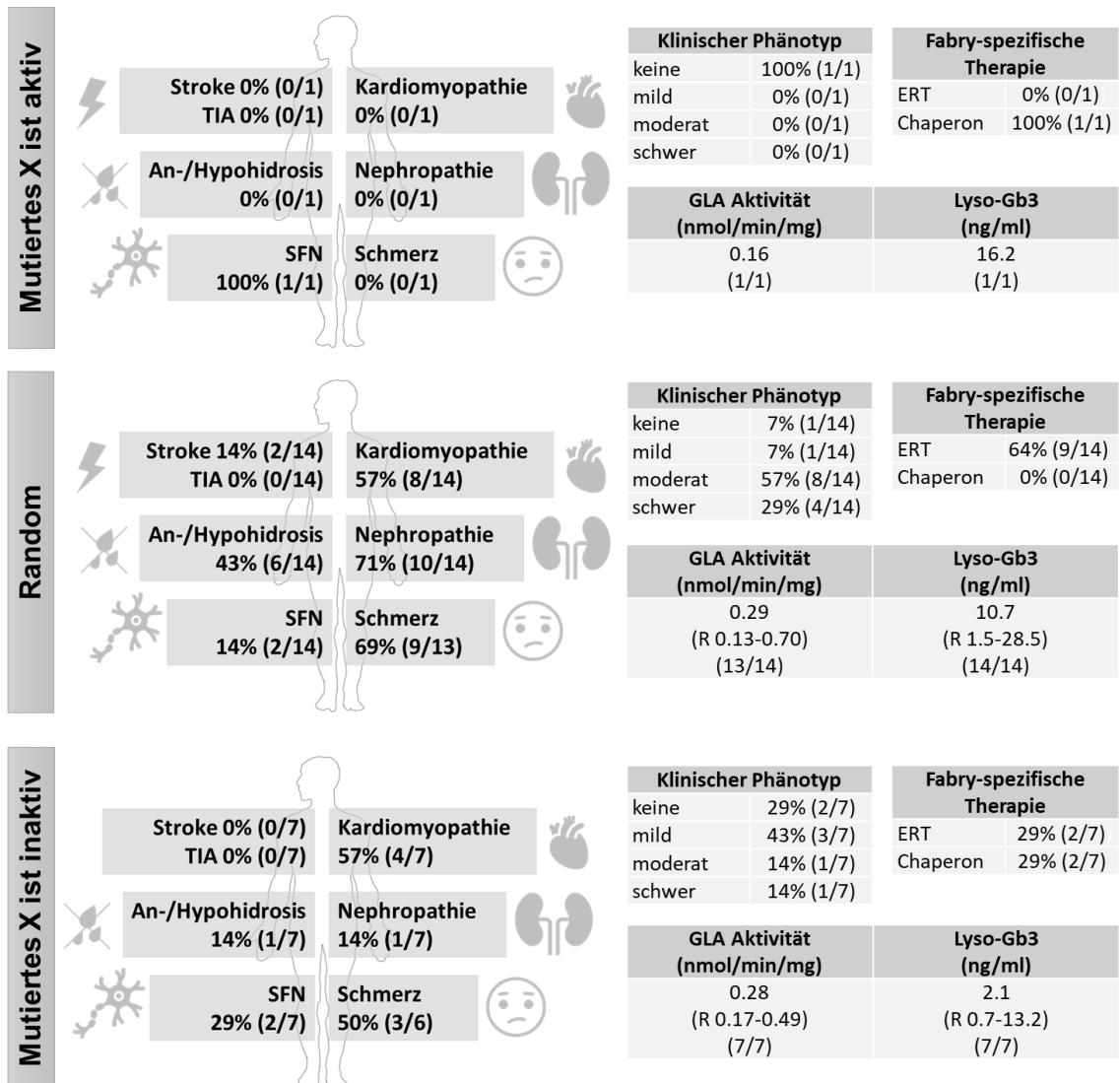


In Mundschleimhautproben der Gruppe II gab es keine Probe mit einem „mutiertes X ist inaktiv“ XCI-Muster.

Abkürzungen: ERT: Enzymersatztherapie; GLA: alpha-Galaktosidase A; SFN: Small Fiber Neuropathie; TIA: transiente ischämische Attacke

(modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022)

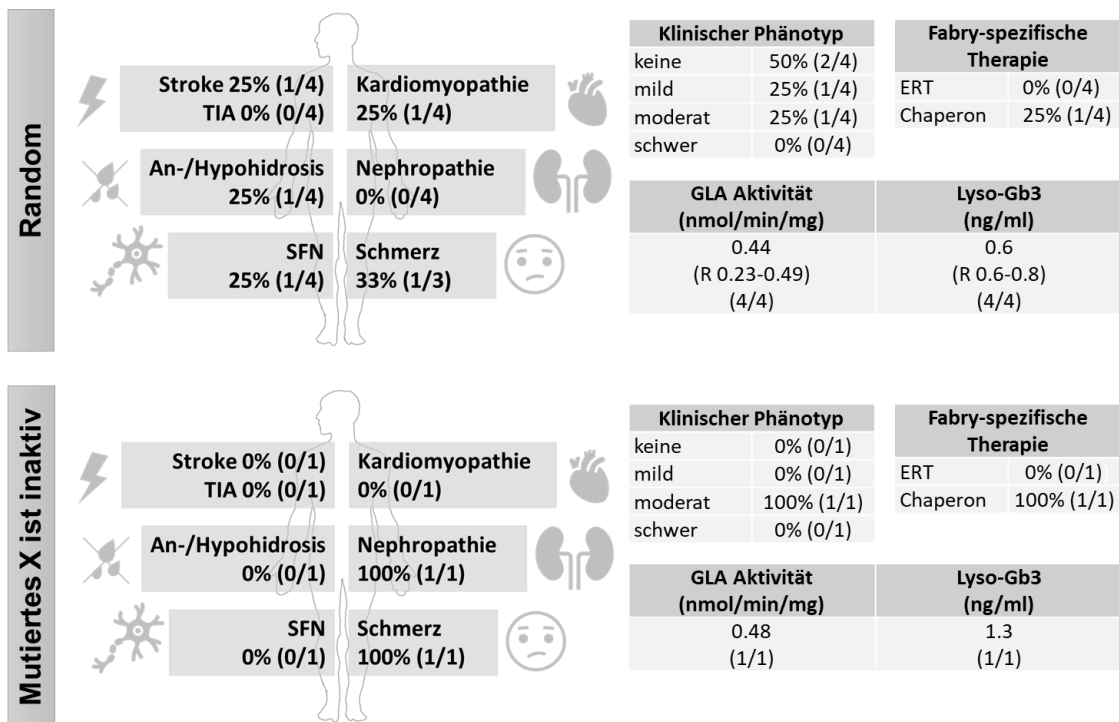
Appendix 7 X-Inaktivierungsmuster und klinischer Phänotyp in Hautfibroblasten Gruppe I



Abkürzungen: ERT: Enzyersatztherapie; GLA: alpha-Galaktosidase A; SFN: Small Fiber Neuropathie; TIA: transiente ischämische Attacke.

(modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022)

Appendix 8 X-Inaktivierungsmuster und klinischer Phänotyp in Hautfibroblasten Gruppe II



In Hautfibroblastenproben der Gruppe II gab es keine Probe mit einem „mutiertes X ist aktiv“ XCI-Muster.

Abkürzungen: ERT: Enzymersatztherapie; GLA: alpha-Galaktosidase A; SFN: Small Fiber Neuropathie; TIA: transiente ischämische Attacke.

(modifiziert nach Wagenhäuser et al., 2022)

I Geräte, Material und Chemikalien

Geräte und Laborhilfen

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Absauger für Zellkultur		A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Brutschrank	Heracell™ 150i CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA
Cycler für Verdau, PCR	T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Cycler für Denaturierung	TProfessional Thermocycler Basic Gradient	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Heizblock	TS-100 C Thermo- Shaker	Biosan Ltd, Riga, Lettland
Mikroskop	Inversmikroskop CKX41	Olympus AG, Shinjuku, Tokio, Japan
Pipetten	2,5µl, 10µl, 100µl, 1000µl Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	1-10 µl Discovery 8- channel Pipette	Kinesis GmbH, Langenfeld, Deutschland
	Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Qubit Fluorometer		Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
Sequenzier	ABI 3730 Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA
Tischzentrifuge	Sprout™ Mini- Zentrifuge	Heathrow Scientific®, Vernon Hills, Illinois, USA
Verdampfer	Concentrator plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Vortexer	GLW- L46	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Wasserbad		A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zentrifuge DNA-Isolierung	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Zellkultur und X- Inaktivierungsanalyse	Rotanta 460	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Art	Bezeichnung	Hersteller
Desinfektionsmittel	Octeniderm® farblos	Schülke GmbH, Norderstedt, Deutschland
EDTA Monovetten	S-Monovetten Hämatologie/EDTA K 2,7 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Einmalstanze für Hautbiopsie	Disposable Biopsy Punch 6 mm	Kai Industries Co. Ltd., Seki City, Gifu, Japan
Zentrifugenröhrchen	Falcon Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Heftpflaster	Leukostrips	Smith&Nephew, Medical Limited, London, England
Kanüle	BD Eclipse™ Needle 27G	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Kompressen	Gazin® Mullkompressen	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, Deutschland

Mundschleimhautabstriche	FLOQSwabs ^R	Copan Diagnostics Inc., Brescia; Italien
PCR-Platten	4titude® 96 Well Skirted PCR Plate	Brooks Life Sciences, Chelmsford, Massachusetts, USA
PCR-Streifen	PCR Stripes 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Petrischale	TC-Schale 100 Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pflaster	Leudkomed® hospital 8x10 cm	BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Biosphere® Filter Tips 20, 100, 1000	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Qubit Caps	Axygen™ 0,5 ml PCR Tubes	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA
Reaktions-Caps	Safe lock tubes 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Skalpell	Sterile Surgical Blades	Braun, Melsungen, Deutschland
Spin Baskets	DNA IQ™ Spin Baskets	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Spritze	Injekt ® Einmalspritze 5ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Zellkulturflaschen	T25 50 ml/25 cm ² ; T75 250 ml/75 cm ²	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich

Medikamente

Art	Bezeichnung	Hersteller
Lokalanästhetikum	Mecain 10mg/ml	Puren Pharma GmbH & Co. KG, München, Deutschland

Reagenzien

Art	Bezeichnung	Hersteller
Ammonium-Puffer	1M Tris HCL [750mM]	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
	Ammoniumsulfat [200 mM]	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	Tween 20 0,1%	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
AR-Primer	AR-R; AR-F-Fam	Metabion International AG, Planegg, Deutschland
DNA Isolierungskit	QIAamp® DNA Mini Kit	Quiagen, Venlo, Niederlande
DNA-Polymerase	Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
Enzym TrypLE	Gibco TrypLE Express Enzyme no phenol red	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA
Ethanol absolut		Honeywell International Inc., Morristown, New Jersey, USA
Ethanol vergällt	Ethanol 70% vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fibroblastenmedium	500 ml Waschmedium DMEM/F-12	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA
	5 ml Gibco Penicillin Streptomycin [10.000 Units/ml]	

	50 ml fetal bovine serum F7524	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Formamid	HiDi™ Formamid	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
PBS	PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
PCSK1N-Primer	PCSK1N-R; PCSC1N-F-Fam	Metabion International AG, Planegg, Deutschland
Puffer A	4 ml Taq-Polymerase-Puffer [10x] (bestehend aus [200mM] Tris-HCL ph 8,4; [500mM] KCl)	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
	1,2 ml Magnesiumchlorid [50mM]	
	80µl dATP [100mM]	
	80µl dTTP [100mM]	
	80µl dCTP [100mM]	
	80µl dGTP [100mM]	
	30,48 ml Aqua destillata	Braun, Melsungen, Deutschland
Puffer B	4 ml Ammonium-Puffer [10x]	siehe Ammonium- Puffer
	80 µl dATP [100mM]	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
	80 µl dTTP [100mM]	
	80 µl dCTP [100mM]	
	80 µl dGTP [100mM]	
	1,76 ml Magnesiumsulfat [50mM]	
	8 ml Enhancer [10x]	
19,2 ml Aqua destillata	Braun, Melsungen, Deutschland	
Qubit Assays Kits	Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
	Qubit™ dsDNA BR Assay Kit	

Rox	GeneScan™ 500 Rox™ Size Standard	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Steriles Wasser	Aqua Ad Injectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
TE	10mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
	1mM EDTA (Dinatriumsalz)	
Restriktionsenzym	HhaI	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Restriktionspuffer	Buffer C [10x] Buffer	
Waschmedium DMEM/F-12	Gibco Dulbecco´s Modified Eagle Medium, 500ml F-12 Nutrient Mixture (Ham), (+) L-Glutamine	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA

Software

Variantenklassifikation	Alamut® visual, Version 2.11	Interactive Biosoftware, Rouen, Frankreich
	PyMOL Molecular Graphics System Version 1.8	Schrödinger®, New York, New York, USA
Statistische Auswertung	SPSS Software, Version 27	IBM, Ehningen, Deutschland
Textverarbeitung, Tabellenkalkulation	Microsoft Office 2019	Microsoft, Albuquerque, New Mexiko; USA
X-Inaktivierungsanalyse	GeneMapper™, Version 4.0	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts; USA

II Abkürzungsverzeichnis

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AE	Puffer aus TRIS und EDTA
AR	Androgenrezeptor
bp	Basenpaare
BR	broad range
CDT	cold detection threshold
CKD-EPI	Chronic kidney disease epidemiology collaboration
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ENG	Elektroneurographie
FAZIT	Fabry Zentrum für interdisziplinäre Therapie
FD	Fabry disease
Gb3	Globotriosyl-Ceramid
GFR	Glomerulärefiltrationsrate
GLA	Galaktosidase A <i>Gen</i> oder Enzym
HS	high sensitivity
HUMARA	Human Androgen Receptor methylation analysis
ICD	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
KDIGO	Kidney Disease- Improving Global Outcomes
LGE	Late Gadolinium Enhancement
LVMi	linksventrikulärer Massenindex
M.	Morbus
MRT	Magnetresonanztomographie
MSSI	Mainzer Severity Score Index
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCSK1N	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Typ 1 Inhibitor
PNS	peripheres Nervensystem
QST	quantitative sensorische Testung
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
SFN	Small Fiber Neuropathie
TE	Puffer aus TRIS und EDTA
TIA	Transiente ischämische Attacke
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTE	Transthorakale Echokardiographie
UTR	untranslatierte Region
VUS	Variant of unknown significance
WDT	warm detection threshold
XCI	X-Inaktivierung
XCR	X-Inaktivierungsverhältnis
Xic	X-chromosomales Inaktivierungszentrum
Xist	X inactive specific transcript
ZNS	zentrales Nervensystem

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	X-Chromosom mit einigen Genen.....	6
Abbildung 2a	Auswirkung der X-Inaktivierung auf die Zelle.....	7
Abbildung 2b	X-Inaktivierungsmosaik der Zellen im Körper und Auswirkung auf den Phänotyp.....	7
Abbildung 3	Fragmentlängenanalyse von Fibroblasten der Patientin FD 1104.....	22
Abbildung 4	Fragmentlängenanalyse vom Mundabstrich des Bruders FD 1059.....	22
Abbildung 5	Übersicht über die Kohorte und untersuchten Biomaterialien mit ihrem X-Inaktivierungsmuster.....	25
Abbildung 6	Vergleich von klinischen Parametern zwischen Subgruppen in Blutproben der Gruppe I.....	30
Abbildung 7	X-Inaktivierungsmuster und klinischer Phänotyp in Blut von Gruppe I.....	31
Abbildung 8	X-Inaktivierungsmuster und klinischer Phänotyp in Blut von Gruppe II.....	32
Abbildung 9	Vergleich des X-Inaktivierungsverhältnisses in biologischen Replikaten.....	34
Abbildung 10	Vergleich der X-Inaktivierungsverhältnisse von technischen Replikaten.....	35

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Pathogenitätsklassen.....	2
Tabelle 2	Betroffene Organsysteme und Manifestationen bei M. Fabry ...	3
Tabelle 3	Übersicht über Studien zur X-Inaktivierung bei M. Fabry	8
Tabelle 4	Pipettierschema für Patientenproben und Standards zur DNA- Quantifizierung mittels Qubit	17
Tabelle 5	Pipettierschema für Restriktionsverdau und Kontrolle.....	18
Tabelle 6	Primer mit Sequenz und Markierung.....	19
Tabelle 7	Pipettierschema für die Polymerasekettenreaktion für die Gene AR und PCSK1N.....	19
Tabelle 8	PCR-Schema für AR und PCSK1N.....	20
Tabelle 9	Verteilung der Sequenzvarianten in den drei Klassifikationssystemen	27
Tabelle 10	Verteilung von Fabry-spezifischen Symptomen in der Studienkohorte	28
Tabelle 11	XCR von verschiedenen Passagen einer Hautfibroblastenkultur	33

V Danksagung

Mein aufrichtiger Dank geht an alle Menschen, die mich bei der Umsetzung meiner Dissertation unterstützt haben.

Ich danke Frau Professor Nurcan Üçeyler für das Überlassen des Dissertationsthemas, sowie die Betreuung und Beratung während der gesamten Arbeit.

Ich danke Frau PD Simone Rost für Ihre Beratung und Hilfe bei allen humangenetischen Fragen.

Ich danke Birgit Halliger-Keller und Daniela Urlaub für ihre tatkräftige Unterstützung und Expertise bei allen Laborarbeiten.

Ich danke Barbara Broll und Irina Schumacher für Ihre Hilfe bei der Rekrutierung der Patienten.

Ich danke meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung.

VI Eigene Veröffentlichungen

- Rickert V., Wagenhäuser L., Nordbeck P., Wanner C., Sommer C., Rost S. & Üçeyler N. 2020. Stratification of Fabry mutations in clinical practice: a closer look at alpha-galactosidase A-3D structure. *J Intern Med*, 288, 593-604.
- Wagenhäuser L., Rickert V., Sommer C, Nordbeck P., Wanner C., Rost S. & Üçeyler N. 2022. X-chromosomal inactivation patterns in women with Fabry Disease. *Mol Genet Genomic Med*. 2022 Aug 16:e2029. doi: 10.1002/mgg3.2029. Im Druck.