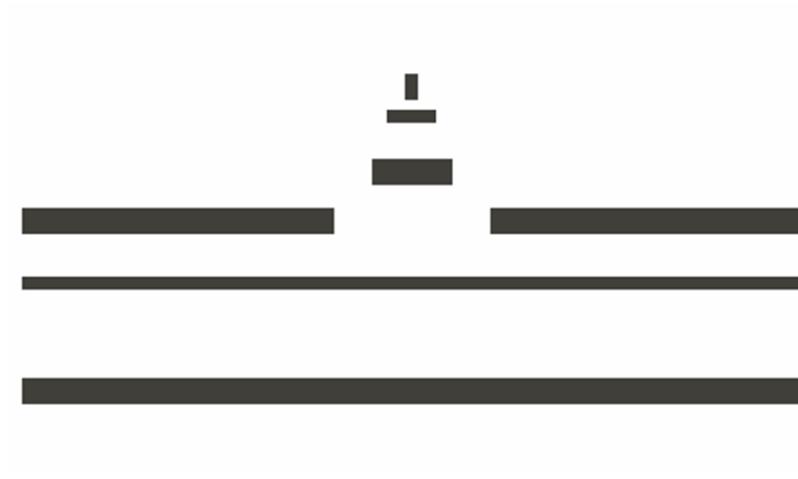


**Michael Schelleckes**

**Die Regulation der *alpha-Galaktosidase A* - ein  
komplementärer Ansatz aus funktionellen Analysen und  
klinischer Charakterisierung**

**-2014-**

# Biologie



## **Die Regulation der *alpha-Galaktosidase A* - ein komplementärer Ansatz aus funktionellen Analysen und klinischer Charakterisierung**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Michael Schelleckes  
aus Wesel

- 2014 -

---

<b>Dekan:</b>	Univ.-Prof. Dr. Dirk Prüfer
<b>Erster Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Eva Brand
<b>Zweiter Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Wolf-Michael Weber
<b>Datum der mündlichen Prüfung:</b>	25.09.2014
<b>Datum der Promotion:</b>	17.10.2014



*„Nur wenige wissen, wie viel man wissen muss,  
um zu wissen, wie wenig man weiß.“*

*Werner Heisenberg (1901 - 1976)*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Lysosomale Speichererkrankungen.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Morbus Fabry.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Genetik und Vererbung.....	3
1.2.2 Pathogenese.....	5
1.2.3 Klinischer Verlauf des „klassischen“ Morbus Fabry.....	6
1.2.4 Diagnostik und Therapie.....	8
1.2.5 Atypische Morbus Fabry Phänotypen.....	10
<b>1.3 Eukaryotische Genexpression.....</b>	<b>11</b>
1.3.1 <i>Cis</i> -regulatorische Elemente.....	11
1.3.2 Der <i>Core</i> -Promotor.....	12
1.3.3 Die eukaryotische Transkriptionsmaschinerie.....	13
1.3.4 Der Transkriptionszyklus.....	14
1.3.5 Proximale Promotor-Elemente .....	14
1.3.6 Distale regulatorische-Elemente.....	15
1.3.7 Bidirektionale Promotoren.....	16
1.3.8 Eukaryotische Genregulation und humane Erkrankungen.....	17
<b>1.4 Ziel der Arbeit.....</b>	<b>17</b>
<b>2. Material.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Chemikalien.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Verbrauchsmaterialien und Kits.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Seren und Medien.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4 DNA-Größenstandards.....</b>	<b>21</b>
<b>2.5 Enzyme und Antibiotika.....</b>	<b>22</b>
<b>2.6 Antikörper.....</b>	<b>22</b>
<b>2.7 Plasmide und Vektoren.....</b>	<b>22</b>
<b>2.8 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Stämme.....</b>	<b>23</b>
<b>2.9 Eukaryotische Zelllinien.....</b>	<b>23</b>

<b>2.10 Geräte</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Methoden</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.1.1 Isolation von Nukleinsäuren.....	25
3.1.1.1 Extraktion genomischer DNA.....	25
3.1.1.2 Extraktion der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen.....	25
3.1.1.3 Extraktion der Gesamt-RNA aus Vollblut.....	25
3.1.1.4 Isolation der Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Mini-Präparation).....	25
3.1.1.5 Isolation der Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxi-Präparation).....	26
3.1.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	26
3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	26
3.1.3.1 <i>Touchdown</i> -PCR.....	27
3.1.3.2 <i>Nested</i> -PCR.....	27
3.1.3.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	28
3.1.3.4 <i>Real-time</i> PCR.....	28
3.1.4 <i>Rapid amplification of 5'-cDNA ends</i> (5'-RACE).....	29
3.1.5 DNA/RNA-modifizierende Reaktionen.....	29
3.1.5.1 Restriktionsendonukleasen.....	29
3.1.5.2 Dephosphorylierung von DNA.....	29
3.1.5.3 Ligation.....	29
3.1.5.4 Biotinylierung der 3'-Enden einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide... 30	
3.1.5.5 Zielgerichtete Mutagenese.....	30
3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	31
3.1.7 Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	32
3.1.7.1 Gelextraktion.....	32
3.1.7.2 DNA-Fällung.....	32
3.1.7.3 Exo-SAP-Aufreinigung.....	32
3.1.7.4 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion.....	32
3.1.8 Sequenzierung.....	33
3.1.9 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	33
3.1.10 <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA).....	34
3.1.11 <i>Exon-Trapping</i> .....	35
3.1.12 Generierung serieller Promotordeletionskonstrukte.....	36
3.1.13 Reportergenassay.....	39

3.1.13.1 Bidirektionaler Reportergenassay.....	39
<b>3.2 Protein-biochemische Methoden.....</b>	<b>40</b>
3.2.1 Isolierung von Kernproteinen.....	40
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	41
3.2.3 Western-Blot (Tank-Blot).....	41
<b>3.3 Zellbiologische und mikrobiologische Methoden.....</b>	<b>42</b>
3.3.1 Prokaryotische Zellen.....	42
3.3.1.1 Kulturbedingungen.....	42
3.3.1.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	42
3.3.1.3 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> .....	43
3.3.2 Eukaryotische Zellen.....	43
3.3.2.1 Kulturbedingungen.....	43
3.3.2.2 Lagerung.....	43
3.3.2.3 Transiente Transfektion.....	44
<b>3.4 Statistische Auswertung.....</b>	<b>44</b>
<b>3.5 Studienpopulationen.....</b>	<b>44</b>
<b>3.6 <i>In silico</i> Analysen zur Vorhersage putativer TFBS.....</b>	<b>45</b>
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Genomischer Aufbau der alpha-Galaktosidase A und         Lokalisation der Transkriptionsstartstelle.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2 Identifizierung transkriptionell aktiver Regionen         im 5'-flankierenden Bereich der <i>GLA</i>.....</b>	<b>46</b>
4.2.1 Potentielle <i>Enhancer</i> -Funktion des distalen Promotorbereichs.....	49
4.2.2 Bidirektionale Regulation durch duale Promotorfunktion.....	50
<b>4.3 Einfluss der 5'-UTR auf die <i>GLA</i>-Transkriptionsaktivität.....</b>	<b>53</b>
<b>4.4 Beteiligung des Transkriptionsfaktors EB an der <i>GLA</i>-Regulation....</b>	<b>54</b>
4.4.1 Nachweis der endogenen TFEB-Bindung an <i>GLA</i> -Promotorbereiche durch Chromatin-Immunopräzipitation.....	56
<b>4.5 Identifizierung genetischer Varianten im <i>GLA</i>-Promotor.....</b>	<b>57</b>
4.5.1 Einfluss der genetischen Variante -10C>T auf die Transkriptionsaktivität... 58	
4.5.2 <i>In silico</i> -Analysen der Variante -10C>T.....	59
4.5.3 Das minore -10T-Allel führt zu einem veränderten DNA-Protein-Bindungsmuster.....	61
<b>4.6 Klinische Bedeutung des minore -10T-Allels.....</b>	<b>63</b>
4.6.1 Der -10T-Haplotyp.....	63

4.6.2 Das minore -10T-Allel ist mit neurologischen Manifestationen assoziiert....	63
4.6.3 Das -10T-Allel führt zu einer verminderten <i>GLA</i> -Expression in humanen Leukozyten.....	69
4.6.4 Einfluss intronischer Varianten auf die mRNA-Prozessierung.....	70
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>73</b>
<b>5.1 Charakterisierung des <i>GLA</i>-Promotors und Einfluss der Variante     -10C&gt;T auf die Genexpression.....</b>	<b>73</b>
<b>5.2 Einfluss der 5'-untranslatierten Region auf die <i>GLA</i>-Expression.....</b>	<b>74</b>
<b>5.3 Regulation der <i>GLA</i> durch den Transkriptionsfaktor EB.....</b>	<b>75</b>
<b>5.4 Mögliche Interaktion von TFEB mit der <i>GLA</i> 5'-UTR.....</b>	<b>77</b>
<b>5.5 Klinische Bedeutung und funktionelle Analyse von -10T.....</b>	<b>77</b>
<b>5.6 Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>6. Ausblick.....</b>	<b>82</b>
<b>7. Referenzen.....</b>	<b>83</b>
<b>8. Kongressbeiträge.....</b>	<b>95</b>
<b>9. Publikationen.....</b>	<b>95</b>
<b>10. Curriculum vitae.....</b>	<b>97</b>

## Abkürzungen

µm	Mikrometer
A	Adenin
AA	Acrylamid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Bisacrylamid
bp	Basenpaar
BRE <sup>D</sup>	TFIIB <i>downstream recognition element</i>
BRE <sup>U</sup>	TFIIB <i>upstream recognition element</i>
BS	Bindestelle
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	Cytosin
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	cluster of differentiation
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPE-bind	<i>Core-Promotor-Element-binding</i>
DCE	<i>downstream core element</i>
dd	didesoxy
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPE	<i>downstream promoter element</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EA.hy926	humane vaskuläre Endothelialzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylennitrilo)-tetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>

ER	endoplasmatisches Retikulum
ERT	Enzymersatztherapie
ExoI	Exonuklease I
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FLAIR	<i>fluid attenuated inversion recovery</i>
fmol	Femtomol
g	g-Beschleunigung
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gb-3	Globotriaosylceramid
GLA	alpha-Galaktosidase A
GTF	genereller Transkriptionsfaktor
h	Stunde
HEK 293-T	humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNRNP2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2
IgG	Immunglobulin G
IFAZ	interdisziplinäres Fabryzentrum des Universitätsklinikums Münster
IHKE	<i>immortalized human kidney epithelial</i>
Inr	Initiator
INR	Initiator-Element
IVS	<i>intervening sequence</i>
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
KOAc	Kaliumacetat
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LAMP	Lysosom-assoziiertes-Membranprotein
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LiCl	Lithiumchlorid
LIMP	Lysosom-integrales-Membranprotein
LSD	<i>lysosomal storage disorder</i>
Lyso-Gb3	Globotriaosylsphingosin
M	molare Masse

M6P	Mannose-6-Phosphat
Mb	Megabase
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MnCl <sub>2</sub>	Mangan(II)chlorid
min	Minute
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MnCl <sub>2</sub>	Mangan(II)-chlorid
MolProMD	<i>Molecular Functional Profiling for Mechanism Detection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MTE	<i>motif ten element</i>
N	Asparagin
NaAc	Natriumacetat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	Natriummolybdat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
o. B.	ohne Befund
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIK	Präinitiationskomplex
pmol	Picomol
pol II	RNA Polymerase II
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	<i>retinoic acid</i>

RbCl	Rubidiumchlorid
RLM-RACE	<i>RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA-ends</i>
RLU	<i>relative light unit</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
S	Serin
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
s	Sekunde
SFN	<i>small fiber</i> Neuropathie
SH-SY5Y	Neuroblastomzellen
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SV40	Simian-Virus 40
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAF	TBP-assoziierter Faktor
TATA	TATA-Box
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TdT	Terminale Desoxynukleotid Transferase
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindestelle
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
THP-1	monozytäre Zelllinie
TIA	transiente ischämische Attacke
Tm	Schmelztemperatur
TSS	Transkriptionsstartstelle
Ttx	Thyroid-Hormon-Rezeptor
U	<i>unit</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
WML	<i>white matter lesion</i>

wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
w/w	<i>weight per weight</i>

## Abstract

Fabry disease (FD) is a rare progressive multisystemic disorder with renal, cardiac and neurological manifestations resulting from a cellular Globotriaosylceramide accumulation caused by a deficiency of the lysosomal enzyme alpha-galactosidase A (GLA, EC 3.2.1.22). FD diagnosis is based on low GLA activity in leukocytes or plasma, the identification of *GLA* variants within the coding region and the clinical picture. However, the impact of non-coding genetic variants on the pathogenesis of FD is yet unclear.

We performed a clinical characterization of 15 patients with neurological manifestations of unknown etiology carrying the GLA haplotype -10C>T [rs2071225], IVS2-81\_-77delCAGCC [rs5903184], IVS4-16A>G [rs2071397], and IVS6-22C>T [rs2071228] including brain MRI and skin biopsies. GLA mRNA levels were analyzed by *real-time* PCR. Serial promoter deletion constructs were generated and the minor -10T allele was introduced by site-directed mutagenesis to assess transcriptional activity. DNA-protein interactions were analyzed by electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). The influence of intronic variants transmitted together with the minor T allele on mRNA processing was analyzed by an exon trapping assay.

-10T allele carriers suffered from stroke, transient ischemic attacks, white matter lesions, small fiber neuropathy with acroparesthesiae and pain attacks, and showed a mean ~30% decreased GLA mRNA expression level. Electron microscopy of skin biopsies revealed "myelin-like" figures, which could be precursors of FD-pathognomonic zebra bodies. We identified two *GLA* promoter portions, a proximal region between -110 and -425 and a distal region between -1106 and -1396 with substantial transcriptional activity. The -10T allele resulted in a reduced promoter activity and altered transcription factor binding, while a functional relevance of the transmitted intronic variants was excluded by exon trapping.

Based on this complementary approach of clinical assessment and functional testing, we conclude that the -10C>T in the non-coding *GLA* region may cause FD-typical neurological manifestations by altered transcription factor binding within the *GLA* promoter leading to reduced GLA mRNA expression. Future studies are needed to clarify whether GLA -10T carriers with clinical FD symptoms may also benefit from enzyme replacement therapy for end-organ damage prevention.

---

Morbus Fabry ist eine seltene, progressive Multisystemerkrankung mit renalen, kardialen und neurologischen Manifestationen, die aus einer zellulären Globotriaosylceramid-Akkumulation infolge einer Defizienz des lysosomalen Enzyms alpha-Galaktosidase A (GLA, EC 3.2.1.22) resultieren. Die Fabry-Diagnose basiert auf einer erniedrigten GLA-Aktivität in Leukozyten oder Plasma, der Identifizierung von *GLA*-Varianten innerhalb der kodierenden Region und

dem klinischen Bild. Die Auswirkungen nicht-kodierender genetischer Varianten auf die Pathogenese des Morbus Fabry sind bisher allerdings unklar.

Bei 15 Patienten mit neurologischen Symptomen unbekannter Ätiologie, die Träger des -10T-Haplotypen (-10C>T [rs2071225], IVS2-81\_-77delCAGCC [rs5903184], IVS4-16A>G [rs2071397], und IVS6-22C>T [rs2071228]) waren, wurde eine klinische Charakterisierung einschließlich Hautbiopsien und MRT-Untersuchungen des Kopfes durchgeführt. Die Analyse des GLA-Transkript-Levels wurde durch *real-time* PCRs analysiert. Durch die Generierung serieller *GLA*-Promotordeletionskonstrukte und der Insertion des minoren -10T-Allels durch zielgerichtete Mutagenese wurde der Einfluss auf die Transkriptionsaktivität untersucht. Mittels EMSA-Experimenten erfolgte die Analyse von DNA-Protein-Interaktionen. Die Auswirkungen der mit dem -10T-Allel gekoppelten intronischen Varianten auf die mRNA-Prozessierung wurden durch *Exon-Trapping*-Experimente überprüft.

Die 10T-Allel-Träger litten unter Hirninfarkten, transienten ischämischen Attacken, *white matter lesions*, *small fiber* Neuropathien mit Akroparästhesien und Schmerzattacken und zeigten eine um ~30% reduzierte GLA-mRNA-Expression. Mittels Elektronenmikroskopie-Untersuchung der Hautbiopsien wurden "Myelin-ähnliche" Strukturen nachgewiesen, die möglicherweise Vorstufen von *zebra bodies* sein können, welche pathognomonisch für den Morbus Fabry sind. Mittels Reporterassay konnten zwei Regionen im *GLA*-Promotor mit einer erheblichen Transkriptionsaktivität identifiziert werden, ein proximaler Bereich zwischen -110 und -425 sowie ein distaler Bereich zwischen -1106 und -1396. Die Insertion des -10T-Allels führte zu einer verminderten Promotoraktivität und einer veränderten Transkriptionsfaktorbindung. Eine funktionelle Relevanz der gekoppelten intronischen Varianten wurde durch *Exon-Trapping*-Experimente ausgeschlossen.

Basierend auf diesem komplementären Ansatz aus klinischer Charakterisierung von Patienten und funktionellen Analysen kann geschlossen werden, dass die -10C>T Variante in der nicht-kodierenden *GLA*-Region zu Fabry-typischen neurologischen Manifestationen führen kann, die durch veränderte Transkriptionsfaktorbindung innerhalb des *GLA*-Promotors sowie der dadurch bedingten Abnahme der GLA mRNA-Expression ausgelöst werden können. Zukünftige Studien müssen klären, ob eine Enzymersatztherapie bei symptomatischen -10T-Trägern vor Endorganschäden schützen kann.

## 1 Einleitung

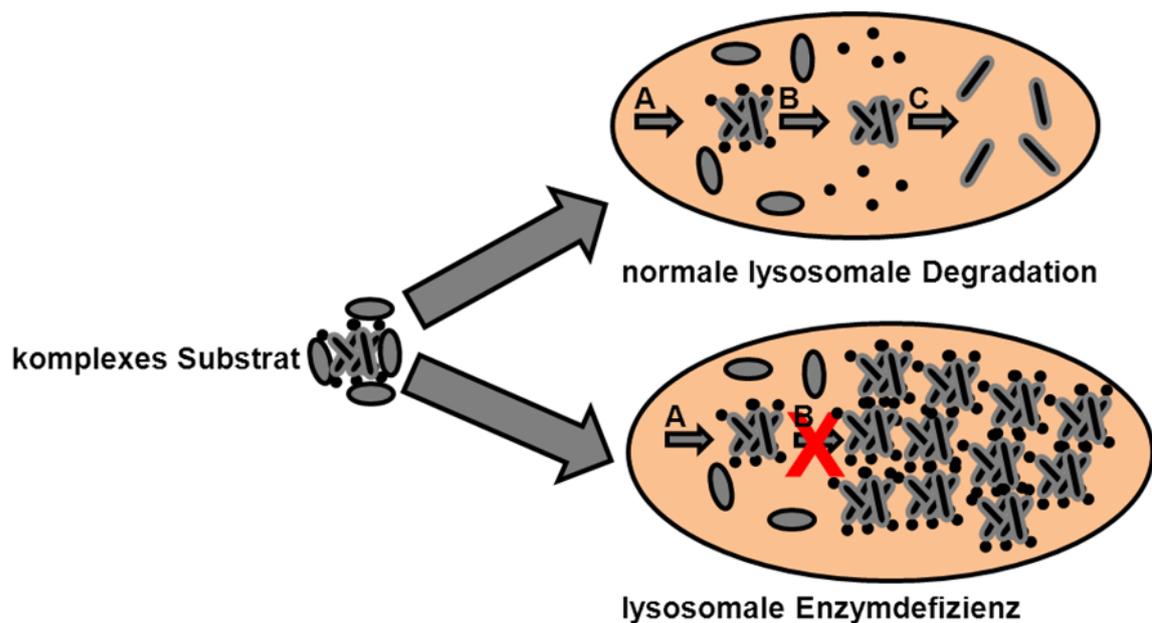
### 1.1 Lysosomale Speichererkrankungen

Lysosomen sind dynamische Zellorganellen deren Aufgabe der Abbau von zellfremden und zelleigenen Makromolekülen ist. Für die Degradation von Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden und Kohlenhydraten enthalten Lysosomen über 60 verschiedene Hydrolasen (Coutinho 2012). Die für die Degradation bestimmten Verbindungen werden aus dem extrazellulären Raum mittels Endozytose zum Lysosom transportiert (Luzio et al., 2007), intrazelluläre Moleküle hingegen erreichen durch die Verschmelzung von Autophagosomen und Lysosomen das Kompartiment (Dunn 1990). Im Gegensatz zum Zytoplasma besitzen Lysosomen in ihrem Inneren einen niedrigen pH-Wert von 4,6 bis 5. Dieser pH-Bereich wird durch membranständige, ATP-getriebene Protonenpumpen (vATPasen) aufrechterhalten und entspricht dem pH-Optimum der im Lysosom enthaltenen Hydrolasen (Mellman et al., 1986). Die unterschiedlichen pH-Werte zwischen Lysosom und Zytoplasma sollen die Zelle vor einer unkontrollierten Verdauung durch freigesetzte lysosomale Hydrolasen schützen, die bei einem neutralen pH-Wert inaktiv sind. Neben der Aufrechterhaltung des pH-Gradienten ist die lysosomale Membran essentiell für den Proteinimport aus dem Zytosol, der Membranfusion und dem Transport degradierter Produkte in das Zytosol (Eskelinen et al., 2003). Von den etwa 25 Membranproteinen sind das Lysosom-assoziierte-Membranprotein 1 (LAMP1), LAMP2, das Lysosom-integrale-Membranprotein 2 (LIMP2) und CD63 die am häufigsten vertretenen Mitglieder (Lübke et al., 2009; Saftig und Klumpermann 2009). Lysosomale Membranproteine besitzen wichtige Aufgaben bei der Biogenese neuer Lysosomen sowie der Funktionsaufrechterhaltung bestehender Lysosomen.

Als lysosomale Speichererkrankungen (*lysosomal storage disorders*, LSDs) wird eine Gruppe von seltenen hereditären Stoffwechselkrankheiten bezeichnet. Eine Gemeinsamkeit aller LSDs ist die Defizienz lysosomaler Enzyme, Aktivator- oder Membranproteine (Wilcox 2004). Für die Mehrzahl der aktuell über 50 bekannten LSDs sind allerdings Defekte in löslichen Enzymen verantwortlich, die zu einer gestörten katabolen Funktion des Lysosoms und damit zu einer progressiven Akkumulation nicht abgebauter Substrate führen (Winchester 2004; Saftig und Klumpermann 2009; Filocamo und Morrone 2011; Abbildung 1). Die Aktivierung pathogener Kaskaden führt schließlich zu einem heterogenen klinischen Bild, welches meist durch eine multisystemische Beteiligung charakterisiert ist (Ballabio und Gieselmann 2009). Die phänotypische Ausprägung der verschiedenen LSDs ist dabei abhängig von Faktoren wie der Art des Substrats und des von der Akkumulation betroffenen Zelltyps, der residualen Enzymaktivität sowie des individuellen genetischen Hintergrunds (Filocamo und Morrone 2011; Platt et al., 2012). Ebenfalls unterschiedlich ist das Alter, in dem die ersten Symptome und Organmanifestationen auftreten. Viele LSDs zeichnen sich

durch Knochen- und Organanomalien sowie einer Beteiligung des zentralen und peripheren Nervensystems aus, und ihr Verlauf ist grundsätzlich chronisch-progredient. LSDs werden entsprechend des akkumulierten Substrats in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Dazu gehören unter anderem Mukopolysaccharidosen, Mukolipidosen Sphingolipidosen, Oligosaccharidosen und Glykoproteinosen sowie Glykogenosen (Ballabio und Gieselmann 2009).

Mit Ausnahme der X-chromosomal vererbten Morbus Hunter, Morbus Danon und Morbus Fabry werden alle LSDs autosomal rezessiv vererbt (Neufeld 1991; Sugie et al., 2003). Die kombinierte Inzidenz aller LSDs beträgt 1:5000 bis 1:8000 (Meikle et al., 1999).

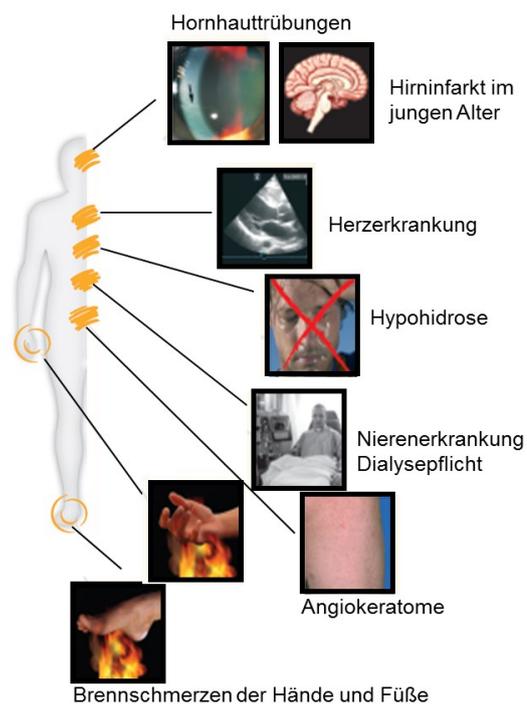


**Abbildung 1: Lysosomale Speichererkrankung.** Komplexe Substrate werden unter normalen Bedingungen von verschiedenen lysosomalen Enzymen degradiert. Die Defizienz eines lysosomalen Enzyms führt zu einer progressiven Akkumulation des nicht degradierten Moleküls. Abbildung modifiziert nach <http://medizinembbs.blogspot.de/2011/02/genetic-diseases.html>.

### 1.2 Morbus Fabry

Morbus Fabry (OMIM 301500) ist eine X-chromosomal vererbte LSD, die auf einer Defizienz der alpha-Galaktosidase A (GLA) beruht. Die GLA ist für die Hydrolyse von  $\alpha$ -Galaktosylbindungen in Glykosphingolipiden verantwortlich und ein Enzymdefekt führt zur progressiven zellulären Akkumulation von neutralen Sphingolipiden in den Lysosomen, insbesondere von Globotriaosylceramid (Gb-3), aufgrund dessen die Erkrankung in die Gruppe der Sphingolipidosen eingeordnet wird. Die Folge der ubiquitären Glykosphingolipid-Akkumulation ist eine Dysfunktion zahlreicher Zelltypen einschließlich Endothelzellen, Nieren-, Herz- und Nervenzellen. Ebenfalls betroffen sein können Haut, Augen und Ohren sowie der Gastrointestinaltrakt (Germain 2010; Abbildung 2). Die kardiale, renale und zerebrale Beteiligung macht den Morbus Fabry zu einer Multisystemerkrankung,

die ohne adäquate Therapie zu einer deutlich verkürzten Lebenserwartung führt. Die Inzidenz des Morbus Fabry wurde ursprünglich mit 1:117000 in der Normalbevölkerung beschrieben (Meikle et al., 1999). Ein Neugeborenen-Screening-Programm in Italien zeigte allerdings deutlich, dass viel mehr Individuen von der Krankheit betroffen sind als ursprünglich angenommen. Bei diesem *Screening* männlicher Neugeborener wurde eine Inzidenz von 1:3100 nachgewiesen (Spada et al., 2006). Zudem wurden zahlreiche bisher nicht diagnostizierte Fälle des Morbus Fabry durch *Screening*-Programme in Risikokollektiven bei Patienten mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz (Gaspar et al., 2010), Hirninfarkten (Rolfs et al., 2005) und Gefäßerkrankungen (Sachdev et al., 2002) identifiziert.



**Abbildung 2: Klinische Morbus Fabry Manifestationen.** Aufgrund der renalen, kardialen und neurologischen Beteiligung ist der Morbus Fabry eine Multisystemerkrankung. Abbildung modifiziert nach [http://www.genzyme.de/thera/pdf-thera/de\\_tp\\_fz\\_patienteninformation.pdf](http://www.genzyme.de/thera/pdf-thera/de_tp_fz_patienteninformation.pdf).

### 1.2.1 Genetik und Vererbung

Das 10,2 kb umfassende *GLA*-Gen ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms lokalisiert (Xq22) und wird durch 7 Exons kodiert (Bishop et al., 1988). Zu den aktuell über 500 bekannten *GLA*-Mutationen zählen unter anderem *Missense*-, *Nonsense*- und *Splicing*-Mutationen, Deletionen und Insertionen (Stenson et al., 2003; Tabelle 1). Mit über 500 beschriebenen Mutationen stellen einfache Basenaustausche (*Missense und Nonsense*) den häufigsten Mutationstypen dar. *Missense*-Mutationen die zu strukturellen Veränderungen des Proteins führen oder das aktive Zentrum des Enzyms betreffen sowie *Nonsense*-Mutationen führen in den meisten Fällen zu einer deutlichen Reduktion oder einem vollständigen Verlust der *GLA*-Enzymaktivität (Garman und Garboczi 2004). Da der

Schweregrad der Erkrankung von der residualen Enzymaktivität abhängig ist, führen diese Mutationen zu dem „klassischen“ Krankheitsverlauf mit multipler Organbeteiligung. Im Gegensatz dazu stehen *Missense*-Mutationen wie z. B. N215S, die mit einer relativ hohen residualen Enzymaktivität assoziiert sind und als *late-onset* Mutationen bezeichnet werden. Bei betroffenen Patienten treten die ersten Symptome deutlich später auf, der Krankheitsverlauf ist meist milder und in den meisten Fällen sind nur einzelne Organe wie das Herz oder die Niere betroffen (Spada et al., 2006; Nakao et al., 1995; Nakao et al., 2003).

Viele der beschriebenen Mutationen sind nur innerhalb einzelner Familien vorzufinden und werden daher als „private“ Mutationen bezeichnet (Eng und Desnick 1994). Der Genotyp korreliert dabei allerdings nicht immer mit der phänotypischen Ausprägung der Krankheit. Eine bestimmte Mutation im *GLA*-Gen kann in verschiedenen Patienten zu unterschiedlichen Krankheitsverläufen führen und zeigt, dass noch weitere Faktoren wie der genetische Hintergrund eine modulierende Funktion einnehmen (Ries und Gal 2006). Noch deutlicher wird die heterogene Ausprägung identischer Mutationen bei weiblichen Patientinnen. Heterozygote Trägerinnen galten zunächst lediglich als Überträger der Krankheit, die selbst keine Manifestationen der Krankheit oder nur milde Verläufe aufweisen. Zahlreiche Studien zeigten allerdings, dass heterozygote Patientinnen trotz einer gesunden Kopie des *GLA*-Gens auf einem der beiden X-Chromosomen ebenfalls genauso stark von der Krankheit betroffen sein können wie Männer, die phänotypische Ausprägung identischer Mutationen aber noch heterogener sein kann (Guffon et al., 2003; Metha et al., 2002; Deegan et al., 2006). Diese Beobachtung basiert auf dem Effekt der Lyonisierung, bei dem jeweils eins der beiden X-Chromosomen in jeder Zelle inaktiviert wird (Lyon 1961; Lyon 1998). Dabei wird zufällig ausgewählt, welches der beiden X-Chromosomen von der Inaktivierung betroffen ist. Infolgedessen weisen Frauen ein individuelles Inaktivierungsmuster mit unterschiedlicher Expression gesunder bzw. defekter Genkopien auf. Da das *GLA*-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, geben hemizygoten Patienten den Gendefekt an all ihre Töchter und an keinen der männlichen Nachkommen weiter. Bei heterozygoten Trägerinnen sind 50% aller männlichen und weiblichen Nachkommen betroffen.

**Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen *alpha*-Galaktosidase A-Mutationen.** (www.hgmd.cf.ac.uk), Stand: 20.02.2014.

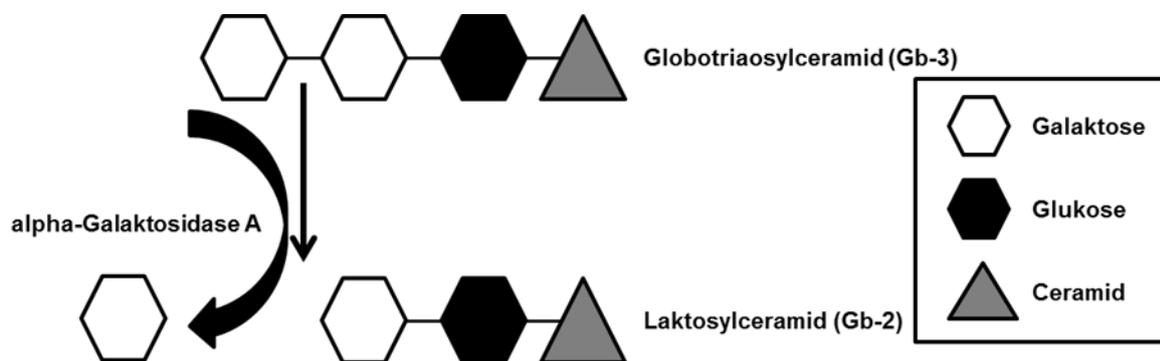
<b>Mutationsart</b>	<b>Anzahl der beschriebenen Mutationen</b>
<i>missense/nonsense</i>	517
<i>splicing</i> -Mutationen	34
regulatorische Mutationen	3
kleine Deletionen	108
kleine Insertionen	37
kombinierte Deletionen/Insertionen	10
große Deletionen	32
große Insertionen	4
komplexe Mutationen	6

### 1.2.2 Pathogenese

Das GLA-Enzym ist für die Hydrolyse von  $\alpha$ -Galaktosylbindungen in Glykosphingolipiden verantwortlich und eine Enzymdefizienz führt zu einer progressiven Akkumulation neutraler Glykosphingolipide in den Lysosomen vaskulärer Endothelzellen und in Zellen von Haut, Herz, Nieren und dem zentralen Nervensystem (Germain 2010). Dabei akkumuliert vor allem das Substrat Gb-3, welches unter Normalbedingungen durch Abspaltung von Galaktose in Laktosylceramid abgebaut wird (Abbildung 3). Gb-3 ist ein Bestandteil der Zellmembran und fungiert zudem als nicht-peptidischer Rezeptor für bakterielle Toxine der Shiga-Familie (Paton und Paton 1998; Lingwood et al., 2010). Auf der Oberfläche von Erythrozyten stellt es das seltene Blutgruppen-Antigen P<sup>k</sup> dar (Marcus et al., 1981). Bereits 5-10% residueller Enzymaktivität scheinen ausreichend zu sein, um eine klinisch signifikante Akkumulation von Gb-3 zu verhindern (Clarke 2007). Als Folge der Gb-3-bedingten zellulären Dysfunktion kommt es zu inflammatorischen und fibrotischen Prozessen, die zu einer Funktionsstörung betroffener Organe führen (Zarate und Hopkin 2008). Die Stimulation peripherer mononukleärer Blutzellen durch Gb-3 führt zudem zu einer dosisabhängigen Induktion der Apoptose (De Francesco et al., 2011). Eine durch die Gb-3-Akkumulation im vaskulären Endothel bedingte reduzierte Perfusion im Herzen, in den Nieren und im Nervensystem scheint einen möglichen Mechanismus der Organschädigung darzustellen (Zarate und Hopkin 2008). Die Fabry-typischen Schmerzen und Akroparästhesien scheinen durch eine schlechte Durchblutung der peripheren Nerven oder durch die Gb-3-Akkumulation in Lysosomen von Neuronen, Spinalganglien und des Rückenmarks verursacht zu werden, die zu einer Degeneration der kleinen unmyelinisierten Nerven führen (Clarke 2007; Hilz 2002).

Hirnfarkte können eine direkte Folge von Kardioembolien sein oder bedingt sein durch eine Kombination aus Gb-3-bedingten Gefäßwandveränderungen und einer abnormalen Reaktivität und Signaltransduktion, die zu einer Aktivierung des Koagulation-Signalwegs beisteuern (Zarate und Hopkin 2008). Im Herzen ist der Großteil der Zellen, wie z. B. Kardiomyozyten, valvuläre Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen von Gb-3-Ablagerungen betroffen, die Prozesse wie Hypertrophie, Apoptose, Nekrose und Fibrose auslösen (Zarate und Hopkin 2008). In den Nieren führen Gb-3-Ablagerungen in Glomeruli, endothelialen Zellen, Podozyten, Mesangialzellen und epithelialen Tubuluszellen zu einer Vakuolisierung der Zellen, die einhergeht mit einem graduellen Verlust der Nierenfunktion (Meroni et al., 1997; Torra 2008). Neben dem Verlust der Filterfunktion durch Ablagerungen in den Podozyten, führen Gb-3-bedingte vaskuläre Okklusionen zu einer Glomerulosklerose und damit zu einem Funktionsverlust der Nieren (Zarate und Hopkin 2008).

Neben der Pathogenität von Gb-3 scheint auch das spontane Spaltprodukt lyso-Gb<sub>3</sub>, die deacetylierte Form des Gb-3, an der Pathogenese beteiligt zu sein. Lyso-Gb<sub>3</sub> inhibiert die GLA-Aktivität und führt zu einer erhöhten Proliferation glatter Muskelzellen (Aerts et al., 2008).



**Abbildung 3: Enzymatischer Abbau von Globotriaosylceramid (Gb-3).** Gb-3 wird durch die alpha-Galaktosidase A zu Laktosylceramid (Gb-2) abgebaut. Eine Enzymdefizienz führt zu einer progressiven Gb-3-Akkumulation.

### 1.2.3 Klinischer Verlauf des „klassischen“ Morbus Fabry

Den klinischen Verlauf bei Patienten mit einem „klassischen“ Morbus Fabry zeigt Abbildung 4. (Zarate und Hopkin 2008). Obwohl Gb-3-Ablagerungen bereits pränatal nachweisbar sind, treten ersten Symptome der Erkrankung erst in der Kindheit auf (Metha et al., 2004; Vedder et al., 2006). Während die ersten Anzeichen bei männlichen Patienten im Alter von 6 Jahren auftreten, sind weibliche Patienten aufgrund des X-chromosomalen Erbgangs der Krankheit durchschnittlich 2 Jahre später betroffen (Ramaswami et al., 2006). Die ersten Symptome werden durch eine Schädigung kleiner Nervenfasern des peripheren und autonomen

Nervensystems hervorgerufen und äußern sich durch chronische und akute neuropathische Schmerzen sowie gastrointestinale Manifestationen (Ramaswami et al., 2006). Die auch als Fabry-Krisen bezeichneten episodisch wiederkehrenden Schmerzen werden durch verschiedene Faktoren wie Stress, körperliche Anstrengung sowie Hitze ausgelöst, und stehen in Zusammenhang mit einer Hypohidrose, der verminderten Schweißsekretion betroffener Patienten (Desnick und Brady 2004). Chronische Schmerzen treten als Akroparästhesien mit Brennen, Kribbeln oder Taubheit der Extremitäten auf und werden durch eine Schädigung der kleinen Nervenfasern, der *small fiber* Neuropathie (SFN), hervorgerufen (Germain 2010).

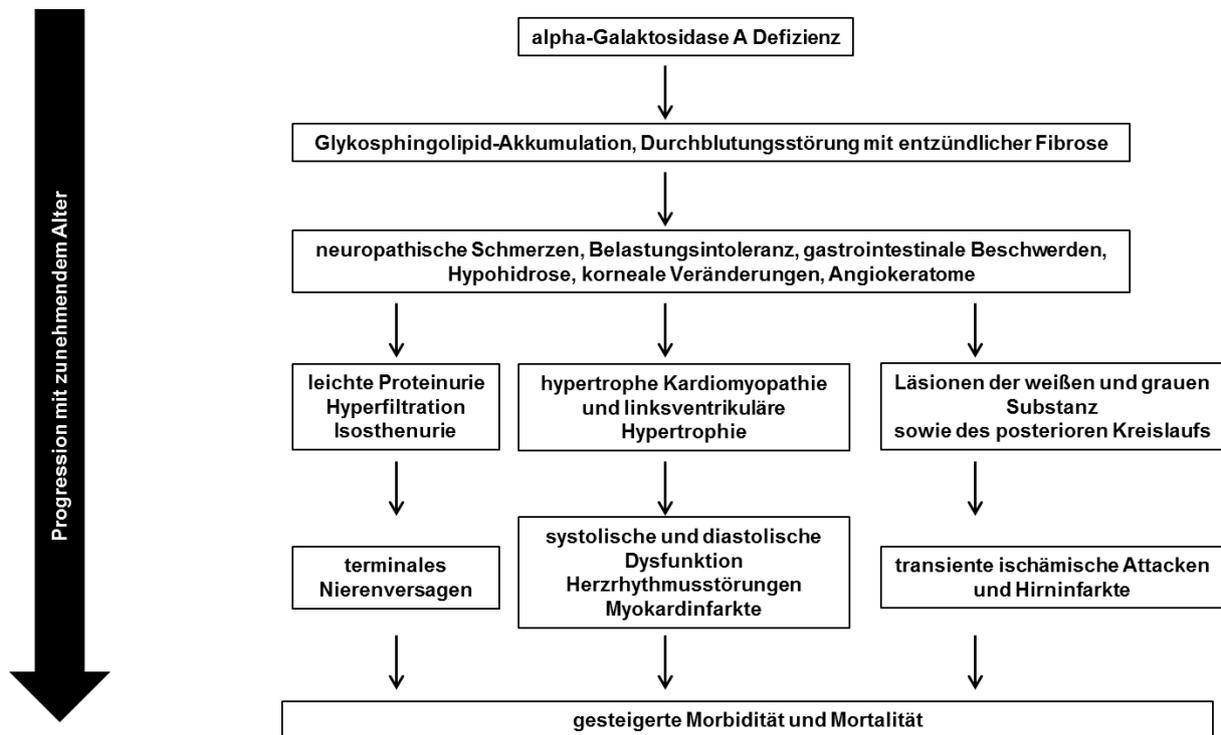
Ein frühes sichtbares Merkmal des Morbus Fabry sind Angiokeratome, kleine rötliche Gefäßerweiterungen die vornehmlich auf den Oberschenkeln, dem unteren Abdomenbereich (insbesondere periumbilikal), in der Leistenregion und im Genitalbereich auftreten, aber auch die Schleimhäute betreffen können (Orteu et al., 2007; Germain 2010). Zu den ersten Anzeichen der Krankheit zählen auch Veränderungen der Augen. Gb-3-Ablagerungen im Hornhautepithel des Auges führen zu einer bilateralen spiralförmigen Trübung, der *Cornea verticillata* (Samiy 2008).

Bereits in jungen Jahren äußert sich die beginnende Schädigung der Nieren in einer nachweisbaren Mikroalbuminurie (Ramaswami et al., 2012). Zwischen der zweiten und dritten Lebensdekade äußern sich die Anzeichen einer renalen Dysfunktion in einer Hyperfiltration und Proteinurie oder Isosthenurie (Breunig und Wanner 2008). Im progressiven Verlauf der Krankheit führen die Ablagerungen in den verschiedenen Zellen der Niere, hauptsächlich in Podozyten und distalen Tubulusepithelzellen, zu einer terminalen Niereninsuffizienz mit Dialysepflichtigkeit (Thurberg et al., 2002).

Eine kardiale Beteiligung des Morbus Fabry lässt sich bereits in einer frühen Phase der Krankheit nachweisen (Kampmann et al., 2008). Erste klinische Manifestationen zeigen sich bei männlichen Patienten allerdings erst zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr und bei Frauen etwa 10 Jahre später in einer charakteristischen linksventrikulären Hypertrophie (O'Mahony und Elliot 2010). Obwohl Gb-3 in nahezu allen Zellen des Herzens, wie Kardiomyozyten, den Zellen des Leitungssystems, valvulären Fibroblasten, Endothelzellen sowie glatten Muskelzellen akkumuliert, machen die histologisch nachweisbaren Ablagerungen nur 1-2% der kardialen Masse aus, und Hypertrophie, Apoptose und Fibrose sind vermutlich durch Aktivierung von Signalwegen sekundär ausgelöste Prozesse (Zarate und Hopkin 2008; Linhard und Elliott 2007).

Im Gegensatz zu den Störungen des peripheren Nervensystems treten die des zentralen Nervensystems erst mit zunehmendem Alter auf. Transiente ischämische Attacken und Hirninfarkte zählen dabei zu den häufigsten Ereignissen, die durch zerebrale Vaskulopathien, endotheliale Dysfunktionen und die Dysregulation des zerebralen

Blutflusses verursacht werden (Buechner et al., 2008). Etwa 2-4% der 18- bis 55-jährigen Hirninfarkt-Patienten in der Normalbevölkerung leiden an Morbus Fabry (Rolfs et al., 2005).



**Abbildung 4: Morbus Fabry im Krankheitsverlauf.** Während erste Globotriaosylceramid-Ablagerungen bereits pränatal nachweisbar sind, treten neuropathische Schmerzen als erste Symptome in der Kindheit auf. Im weiteren Verlauf führt die Multisystemerkrankung zu einer kardialen, renalen und neurologischen Beteiligung. Abbildung modifiziert nach Zarate und Hopkin 2008.

Aufgrund von reno-, kardio- und zerebrovaskulärer Komplikationen haben Fabry Patienten eine deutlich verkürzte Lebenserwartung. Die klinischen Manifestationen lassen sich sowohl in männlichen als auch in weiblichen Patienten beobachten und der Schweregrad dieser Manifestationen korreliert positiv mit zunehmendem Alter (Kampmann et al., 2008).

### 1.2.4 Diagnostik und Therapie

Aufgrund einer Vielzahl betroffener Organe, der heterogenen phänotypischen Ausprägung der Krankheit sowie diverser unspezifischer Symptome wird die Diagnose Morbus Fabry bei vielen Patienten oft um viele Jahre verzögert gestellt (Eng et al., 2007). Bei Verdacht auf Morbus Fabry aufgrund einer entsprechenden Symptomatik erfolgt die Diagnose bei Männern durch eine enzymatische Untersuchung der GLA-Aktivität in Plasma, Serum, Fibroblasten oder Leukozyten mit Hilfe des synthetischen Substrats 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-Galaktopyranosid (Beutler et al., 1972; Desnick et al., 1973; Mayes et al., 1981). Obwohl die Untersuchung aus getrockneten Blutproben auf Filterpapier eine weitere kosten- und zeiteffiziente Möglichkeit der Aktivitätsbestimmung ist und auch bei

Neugeborenen *screenings* angewendet wird, ist die Bestimmung in Leukozyten der diagnostische „Gold-Standard“ (Spada et al., 2006; Chamoles et al., 2001; Gal et al., 2011). Männlichen Patienten, die von einem „klassischen“ Phänotypen betroffen sind, weisen im Vergleich zu gesunden Individuen eine sehr niedrige (<5%) oder komplett defiziente Aktivität auf, welche bei atypischen Phänotypen residual vorhanden sein kann (Gal et al., 2011). Damit stellt die biochemische Untersuchung der enzymatischen GLA-Aktivität eine zuverlässige Methode zur Morbus Fabry-Diagnostik bei männlichen Patienten dar, auf die eine molekulargenetische Analyse zur Bestätigung der Mutation erfolgt. Aufgrund der Lyonisierung und der damit verbundenen Aktivitätsvariabilität können heterozygote Patienten, die von einer „klassischen“ Mutation betroffenen sind, normale Aktivitäten aufweisen (Lyon 1961; Lyon 1998; Deegan et al., 2006). Daher ist eine molekulargenetische Analyse für die Diagnostik bei Frauen zwingend erforderlich.

Ein weiterer Hinweis auf Morbus Fabry ist der Nachweis des akkumulierten Substrats im Urin oder Plasma. Während die Gb-3-Konzentration bei hemizygoten „klassischen“ Morbus Fabry-Patienten sowohl im Urin als auch im Plasma deutlich erhöht ist, kann sie bei atypischen Varianten und heterozygot betroffenen Patienten im Normbereich liegen, und ist daher kein auszureichendes Diagnosekriterium (Kitagawa, et al., 2005; Kitagawa, et al., 2008). Zurzeit wird angenommen, dass die deacetylierte Form des Gb-3, das Lyso-Gb-3, ein zuverlässigerer Biomarker ist und auch als Prognosemarker für die Effektivität einer Enzymersatztherapie (ERT) geeignet ist (Aerts et al., 2007; Togawa et al., 2010). Bis zur Einführung der ERT war eine Behandlung des Morbus Fabry nur symptomatisch möglich (Pisani et al., 2012). Die defiziente enzymatische Aktivität der GLA kann seit 2001 durch die ERT kausal therapiert werden (Metha et al., 2010). Die ERT wurde bereits in den 70er-Jahren mit aufgereinigtem humanen Enzym aus Plazenta (Brady et al., 1973), Milz und Plasma (Desnick et al., 1979) erfolgreich initiiert, größere Mengen des Enzyms konnten jedoch erst durch gentechnologische Methoden hergestellt werden. Zurzeit sind mit Agalsidase-alfa (Replagal; Shire, Cambridge, USA) und Agalsidase-beta (Fabrazyme; GenzymeCorp, Cambridge, USA) zwei Präparate auf dem deutschen Markt verfügbar. Während Agalsidase-alfa aus gentechnisch modifizierten humanen Fibroblastenzellen gewonnen wird, sind Ovarzellen des chinesischen Hamsters die Quelle für Agalsidase-beta (Zarate und Hopkin 2008). Sowohl Agalsidase-alfa als auch Agalsidase-beta besitzen identische biochemische Eigenschaften, Enzymstabilitäten sowie -aktivitäten und unterscheiden sich lediglich in ihrem Glykosylierungsmuster sowie der MPR-vermittelten Aufnahme (Pisani et al., 2012). Beide Präparate werden alle zwei Wochen intravenös in gewichtsadaptierter Dosierung (Fabrazyme: 1 mg/kg Körpergewicht; Replagal: 0,2 mg/kg Körpergewicht) infundiert (Germain 2010). Klinischen Studien konnten belegen, dass beide Präparate sicher und effektiv sind, und zu einer Reduktion von Gb-3 im Plasma und Urin

sowie von Gb-3-Ablagerungen in mikrovaskulären Endothelzellen in Niere, Herz und Haut führen (Eng et al., 2001; Schiffmann et al., 2001; Germain et al., 2007). Neben einer Reduktion neuropathischer Schmerzen führt die ERT zu einer Verlangsamung der Krankheitsprogression sowie zur Stabilisierung der Organfunktionen, und ein rechtzeitiger Therapiebeginn kann vor irreversiblen Organschäden schützen (Metha et al., 2010).

### 1.2.5 Atypische Morbus Fabry Phänotypen

Neben der „klassischen“ Verlaufsform des Morbus Fabry sind auch atypische Phänotypen beschrieben. Sie unterscheiden sich durch das Vorhandensein einer residualen GLA-Aktivität, einer in der Regel milderen Verlaufsform und einem späteren Eintreten erster Manifestationen (Desnick et al., 2001). Die typischen Symptome in der Kindheit wie Parästhesien und Angiokeratome bleiben in den meisten Fällen aus (Nakao et al., 1995; Nakao et al., 2003). Diese atypischen Varianten gehen mit Manifestationen an einzelnen Organen einher und sind bisher mit einer Beteiligung der Nieren (Nakao et al., 2003; Rosenthal et al., 2004) und des Herzen (Nakao et al., 1995) beschrieben. Die „kardiale Variante“ ist gekennzeichnet durch eine linksventrikuläre Hypertrophie als Folge einer Gb-3-Ablagerung in den Kardiomyozyten, und ist neben einer im Alter auftretenden Proteinurie die einzige Manifestation (Nakao et al., 1995; Linhard und Elliott 2007). Die „renale Variante“ zeigt eine Niereninsuffizienz als einzige Organmanifestation (Nakao et al., 2003; Rosenthal et al., 2004).

Bei den beschriebenen atypischen Varianten des Morbus Fabry handelt es sich um *Missense*-Mutationen, bei denen ein Basenaustausch in der kodierenden *GLA*-Sequenz zu einer veränderten Peptidsequenz führt. Bei der *GLA*-Variante IVS4+919G>A führt ein Basenaustausch in Intron 4 zu einem alternativen Spleißen, bei dem ein 57 Nukleotid langes intronisches Fragment in das Transkript eingefügt wird. Dieses alternative Transkript resultiert in einem trunkierten Polypeptid mit nicht vorhandener enzymatischer Aktivität, welches auch bei gesunden Individuen 5-8% der *GLA*-Gesamttranskriptmenge ausmacht. Bei betroffenen Patienten verschiebt sich das Verhältnis zwischen beiden Transkripten, wobei das alternative Transkript zu ~76% vorhanden ist und in einer um 90% reduzierten residualen Enzymaktivität resultiert. Diese genetische Variante ist mit einem kardialen Morbus Fabry Phänotypen assoziiert (Ishii et al., 2002; Hsu et al., 2014).

Eine in ihrer Bedeutung kontrovers diskutierte genetische *GLA*-Variante ist -10C>T (rs2071225). Diese *Missense*-Mutation führt zu einem Basenaustausch in der *GLA* 5'-UTR und betrifft damit - wie IVS4+919G>A - einen nicht kodierenden Bereich des Gens. Die -10C>T Variante ist mit Morbus Fabry-typischen neurologischen Manifestationen wie SFN (Tansilav et al., 2011) und zerebrovaskulären Kleingefäßkrankungen (WML; Oliveira et al., 2008) assoziiert, wurde aber auch bei Patienten mit „klassischen“ Manifestationen

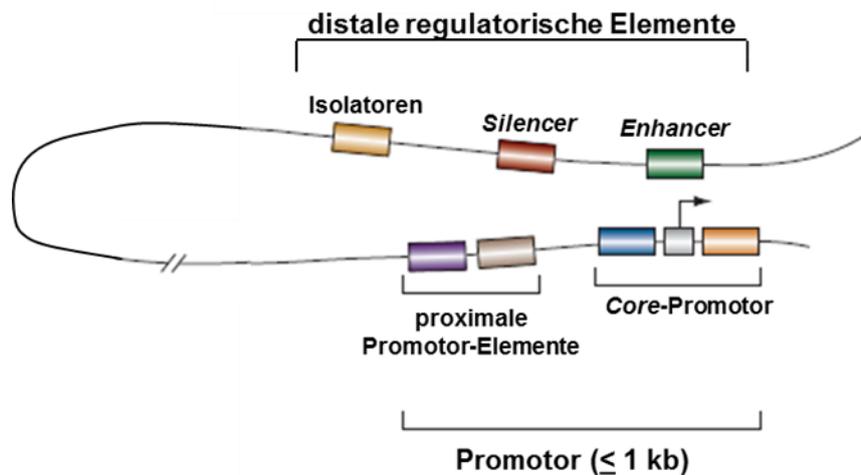
identifiziert (Pisani et al., 2012). Sowohl die enzymatische GLA-Aktivität als auch die Konzentrationen der Biomarker Gb-3 und Lyso-Gb3 betroffener Patienten korreliert dabei nicht immer mit dem Schweregrad der neurologischen oder „klassischen“ Manifestationen (Pisani et al., 2012; Tanislav et al., 2011). Obwohl -10T mit einer reduzierten Proteinexpression und enzymatischen GLA-Aktivität in Leukozyten assoziiert ist, die vermutlich auf einem dosisabhängigen Effekt des -10T-Allels basieren, sind die molekularen Ursachen der beobachteten Effekte bisher nicht bekannt (Oliveira et al., 2008).

### 1.3 Eukaryotische Genexpression

Alle Zellen eines menschlichen Organismus enthalten identische Geninformation und somit ein kongruentes Genom. Die Differenzierung und Entwicklung einzelner Zellen in spezifische Gewebe bzw. Organe erfordert daher eine räumlich und zeitlich getrennte Genexpression, welche auch bei differenzierten Zellen für Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Altern von essentieller Bedeutung ist. Die Kontrolle der eukaryotischen Genexpression findet auf mehreren Ebenen statt und beinhaltet Initiation und Elongation der Transkription sowie Prozessierung, Transport und Translation der mRNA. Die Regulation der Transkriptionsinitiation scheint allerdings die wichtigste Kontrolleebene der Genexpression darzustellen (Maston et al., 2006).

#### 1.3.1 *Cis*-regulatorische Elemente

Die koordinierte Expression Protein-kodierender Gene durch die RNA-Polymerase II (pol II) erfordert eine sorgfältige Regulation. Nur etwa 1,5% des humanen Genoms umfassen die ~22500 Protein-kodierenden Gene. Von der Hälfte der übrigen 98,5% wird angenommen, dass sie wichtige *cis*-regulatorische Elemente beinhalten (Heintzman und Ren 2009). Dazu zählen *Core*- und proximale Promotoren sowie distale Elemente wie *Enhancer*, *Silencer* und Isolatoren, die spezifische Erkennungssequenzen für *trans*-regulatorische Elemente enthalten, deren Bindung entweder zu einer Erhöhung oder Abnahme der Genexpression führt (Maston et al., 2006; Abbildung 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Gen-regulatorischen-Bereichs.** Der Promotor setzt sich aus *Core-Promotor* und proximalem Promotor zusammen und umspannt in der Regel einen Bereich von weniger als 1 kb. Distale regulatorische Elemente wie *Enhancer*, *Silencer* und *Isolatoren* können bis zu 1 Mb von dem Promotor entfernt lokalisiert sein. Durch eine Schleifenbildung des Chromatins können distale regulatorische Elemente mit der Promotor-Region interagieren. Abbildung modifiziert nach Maston et al., 2006.

### 1.3.2 Der Core-Promotor

Der etwa 35 bp um die Transkriptionsinitiationsstelle lokalisierte *Core-Promotor* dient als Assemblierungsstelle für die basale Transkriptionsmaschinerie. Er definiert damit die Position der Transkriptionsstartstelle (TSS) und gibt die Transkriptionsrichtung vor. In den meisten Fällen interagieren *Core-Promotor*-Elemente direkt mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie und sind damit essentiell für die Promotorfunktion (Maston et al., 2006; Smale und Kadonaga 2003). Die bisher identifizierten *Core-Promotor*-Elemente sind TATA-Box, *downstream promoter element* (DPE), Initiator (Inr), *motif ten element* (MTE), *downstream core element* (DCE), TFIIB *upstream* (BRE<sup>U</sup>) und *downstream recognition element* (BRE<sup>D</sup>) (Thomas und Chiang 2006; Tabelle 2). Die unterschiedliche Zusammensetzung der einzelnen Elemente führt zu einer strukturellen und funktionellen Diversität verschiedener *Core-Promotoren* und damit zu einer „kombinatorischen Regulation“ der Genexpression (Smale und Kadonaga 2003). Während Inr-Elemente in etwa 50% der humanen *Core-Promotoren* enthalten sind, sind TATA-Box (~20%), BRE- (25%) und DPE-Elemente (25%) weniger präsent. Etwa ein Viertel der humanen *Core-Promotoren* enthalten keines dieser vier Elemente (Maston et al., 2006).

**Tabelle 2: Lage und Konsensussequenz der Core-Promotor-Elemente.** Abbildung modifiziert nach Thomas und Chiang 2006.

Core-Promotor-Element	Position relativ zur TSS	Konsensussequenz (5' ⇒ 3')
<b>BRE<sup>u</sup></b>	-38 bis -32	(G/C)(G/C)(G/A)CGCC
<b>TATA</b>	-31 bis -24	TATA(A/T)A(A/T)(A/G)
<b>BRE<sup>d</sup></b>	-23 bis -17	(G/A)T(T/G/A)(T/G)(G/T)(T/G)(T/G)
<b>Inr</b>	-2 bis +5	PyPyAN(T/A)PyPy
<b>MTE</b>	+18 bis +29	C(G/C)A(A/G)C(G/C)(G/C)AACG(G/C)
<b>DPE</b>	+28 bis +34	(A/G)G(A/T)CGTG
<b>DCE</b>	3 Unterelemente	
	+6 bis +11	S <sub>I</sub> CTTC
	+16 bis +21	S <sub>II</sub> CTGT
	+30 bis +34	S <sub>III</sub> AGC

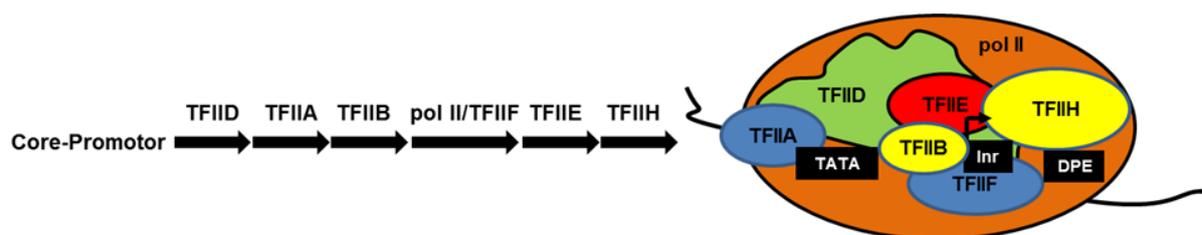
BRE<sup>u</sup>: TFIIB *upstream recognition element*; TATA: TATA-Box; BRE<sup>d</sup>: TFIIB *downstream recognition element*; Inr: Initiator; MTE: *motif ten element*; DPE: *downstream promoter element*; DCE: *downstream core element*; TSS: Transkriptionsstartstelle

### 1.3.3 Die eukaryotische Transkriptionsmaschinerie

Die an der Expression eukaryotischer Gene beteiligten Faktoren lassen sich in drei Klassen aufteilen. Neben den generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs), welche essentiell für die Transkriptionsinitiation sind, sind spezifische Transkriptionsfaktoren (TFs) und Ko-Aktivatoren weitere Bestandteile der Transkriptionsmaschinerie. Die basale Transkriptionsmaschinerie setzt sich aus den GTFs (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF und TFIIH) sowie der pol II zusammen. Die Assemblierung der GTFs an den Core-Promotor führt zur Ausbildung des Präinitiationskomplexes (PIKs), welcher die pol II an die TSS leitet und eine basale Transkription ermöglicht. Durch Bindung von Sequenz-spezifischen TFs im proximalen Promotor kann die basale Transkription moduliert werden. Ko-Aktivatoren bilden die dritte Klasse von Faktoren, die in der Lage sind, die Genexpression durch direkte Interaktionen mit TFs zu modulieren (Maston et al., 2006).

### 1.3.4 Der Transkriptionszyklus

Das konventionelle Modell des Transkriptionszyklus ist durch eine Serie von acht Schritten charakterisiert: **(1)** Vor der Assemblierung des PIKs an den *Core*-Promotor erfolgt eine Auflockerung der Chromatinstruktur, welche die Zugänglichkeit von GTFs und der pol II an die DNA ermöglicht (Fuda et al., 2009). **(2)** Die Bindung von TFIID, einem Komplex aus dem TATA-Box-bindenden Protein (TBP) und TBP-assoziierten Proteinen (TAFs), ist der erste Schritt in der Ausbildung des PIKs (Maston et al., 2006). Durch die anschließende Bindung von TFIIA und TFIIB wird die Interaktion von TFIID und Promotor stabilisiert und führt zur Rekrutierung von TFIIF und der pol II. Die PIK-Assemblierung wird durch Einbeziehung von TFIIIE und TFIIH in den stabilen TFIID-TFIIA-TFIIB-pol II/TFIIF-Komplex abgeschlossen (Abbildung 6). Neben der schrittweisen Assemblierung des PIKs wird ein alternatives Modell beschrieben, in dem pol II und die GTFs in einem Holoenzymkomplex an den *Core*-Promotor binden (Thomas und Chiang 2006). **(3)** Nach Bindung des PIK erfolgt die Aufschmelzung der DNA-Stränge um die TSS und die Transkriptionsinitiation durch die pol II. **(4)** Es folgt die Freisetzung der pol II vom *Core*-Promotor und die Transkription von etwa 20 bis 50 Basen stromabwärts der TSS bevor es zu einer Elongationspause kommt. **(5)** Diese wird durch eine Hyperphosphorylierung des pol II-Komplexes beendet und die Elongation kann an dieser Stelle entweder terminiert oder fortgesetzt werden. **(6)** Im Falle der Elongation erfolgt die Transkription des gesamten Gens. **(7)** Nach Termination der Transkription und Freisetzung von RNA und der pol II von der DNA kann ein weiterer Transkriptionszyklus begonnen werden **(8)** (Fuda et al., 2009).



**Abbildung 6: Die sequentielle Assemblierung des Präinitiationskomplexes (PIKs).** Der stufenweise Einbau der verschiedenen generellen Transkriptionsfaktoren führt zur Ausbildung eines stabilen Komplexes an den Promotor. pol II: RNA-Polymerase II; Inr: Initiator; DPE: *downstream promoter element*; TATA: TATA-Box; TF: Transkriptionsfaktor. Abbildung modifiziert nach Thomas und Chiang 2006.

### 1.3.5 Proximale Promotor-Elemente

Die Modulation der basalen Transkription erfolgt durch Bindung von TFs im proximalen Promotor. Dieser ist etwa 100-200 bp stromaufwärts des *Core*-Promotors lokalisiert und enthält zahlreiche Bindestellen für Sequenz-spezifische TFs, deren Bindung einen

aktivierenden oder reprimierenden Effekt auf die Transkription haben kann (Nolis et al., 2009). Aufgrund ihrer charakteristischen DNA-Bindedomäne lassen sich TFs in verschiedene Familien einteilen, die jeweils spezifische DNA-Sequenzen binden können. Typischerweise bestehen Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) aus einer 6 bis 12 bp langen Konsensussequenz, in der einige Positionen essentiell für die Bindung des TFs sind, während andere variabel sein können. Je nach Abweichung von der Konsensussequenz kann die Bindungsstärke eines TFs an die TFBS variieren. Zum einen binden TFs oft als Homo- oder Heterodimere an die DNA, und die Variabilität der TFBS ermöglicht Präferenzen für bestimmte Bindungspartner. Zum anderen können Abweichungen von der Konsensussequenz zu Strukturveränderungen des TFs führen, die einhergeht mit einer veränderten Aktivität dieses Faktors. Die Auswirkungen einer TF-Bindung ist also abhängig von der Sequenzvariabilität in der TFBS (Maston et al., 2006).

Neben der DNA-Bindedomäne enthalten TFs noch regulatorische Domänen. Diese sind für die Rekrutierung von Ko-Faktoren verantwortlich, welche an der Umstrukturierung des Chromatins im Promotorbereich beteiligt sind oder interagieren direkt mit Komponenten des PIKs (Heintzman und Ren 2009). Durch Bindung von TFs im proximalen Promotor kann die basale Transkriptionsaktivität positiv oder negativ beeinflusst werden und ist letztlich abhängig von der Kombination aus vorhandenen TFs und rekrutierten Ko-Faktoren (Maston et al., 2006).

### 1.3.6 Distale regulatorische Elemente

Neben *Core*- und proximalem Promotor bilden *Enhancer*, *Silencer* und Isolatoren eine weitere Klasse von *cis*-regulatorischen Elementen. *Enhancer* ähneln in ihrer Funktionsweise proximalen Promotor-Elementen und können durch gleiche Wirkmechanismen die Transkription stimulieren. Im Gegensatz zu ihnen ist ihre Lokalisation allerdings unabhängig von der TSS. Sie können mehrere 100 kb stromaufwärts oder -abwärts davon liegen sowie in intronischen Bereichen oder auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sein (Maston et al., 2006; Nolis et al., 2009). *Enhancer* bestehen typischerweise aus einem Cluster von TFBS, die kooperativ zusammenwirken, um die Transkription zu steigern. Während die Orientierung und Entfernung des Clusters in Bezug auf die TSS keinen Einfluss auf die regulatorische Aktivität hat, ist die räumliche Organisation der TFBS innerhalb dieses Clusters wesentlich dafür. Ein Promotor kann dabei in Abhängigkeit von Zeit, Zelltyp oder äußeren Reizen, mit verschiedenen Elementen innerhalb eines Clusters interagieren. Für *Enhancer*-Promotor-Interaktionen müssen sich beide Elemente in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Dies geschieht durch eine Schleifenbildung der zwischen den Elementen befindlichen DNA (Maston et al., 2006).

*Silencer* wirken ähnlich wie *Enhancer* unabhängig von Orientierung und Entfernung zur TSS, enthalten aber im Gegensatz dazu BS für reprimierende TFs. Der negative Einfluss auf die Transkription kann durch zusätzliche Rekrutierung von Ko-Repressoren unterstützt werden, die auch in der Lage sind, aktivierende TFs in reprimierende umzuwandeln (Ogbourne und Antalis 1998). Die reprimierende Wirkung kann unter anderem durch Blockierung von nahgelegenen Aktivator-Bindestellen (Harris et al., 2005) oder dem Konkurrieren um die gleiche Bindestelle (Li et al., 2004) erfolgen. Durch Rekrutierung von Histon-stabilisierenden Protein-Komplexen können Repressoren die Zugänglichkeit für GTFs oder Aktivatoren an den Promotor erschweren (Srinivasen und Atchison 2004), und sie sind in der Lage die Assemblierung des PIKs zu inhibieren (Chen und Widom 2005).

Isolatoren sind DNA-Bereiche, die als Barriere zwischen transkriptionsaktiven Genen fungieren, und auf diese Weise verhindern, dass ein Gen von der Transkriptionsaktivität eines benachbarten Gens beeinflusst wird. Die Eingrenzung aktiver regulatorischer Elemente durch Isolatoren führt zu Gliederung des Genoms in definierte Bereiche mit transkriptionell aktiven Genen, und wird zum einen durch Inhibierung von *Enhancer*-Promotor-Interaktionen erreicht (*Enhancer*-blockierende Aktivität). Zum anderen können Isolatoren die Ausbreitung von reprimierendem Chromatin verhindern (Heterochromatin-Barriere-Aktivität). Die Funktion eines Isolators ist abhängig von der Position, aber unabhängig von der Orientierung (Maston et al., 2006).

### 1.3.7 Bidirektionale Promotoren

Mehr als 10% der etwa 22500 Protein-kodierenden Gene im humanen Genom sind als divergente Genpaare auf gegenüberliegenden DNA-Strängen angeordnet, und ihre TSS liegen weniger als 1000 bp voneinander entfernt. Die Expression beider Gene wird über eine gemeinsam genutzte Promotorregion bidirektional reguliert. Der GC-Gehalt in bidirektionalen Promotoren ist mit durchschnittlich 66% höher als in nicht-bidirektionalen Promotoren und damit ein charakteristisches Strukturmerkmal. Des Weiteren sind 77% der bidirektionalen Promotoren in einer CpG-Insel lokalisiert und lediglich 8% verfügen über eine TATA-Box (Trinklein et al., 2004). Andere *Core*-Promotor-Elemente wie *DPE*, *BRE* und *Inr* sind dagegen nicht abweichend zu unidirektionalen Promotoren verteilt (Wakano et al., 2012). Die durch bidirektionale Promotoren regulierten Genpaare gehören häufig gleichen Funktionsklassen an und werden in 90% der Fälle koexprimiert. Diese positive Korrelation ermöglicht eine koordinierte Expression beider Gene zu bestimmten Zeitpunkten oder als Antwort auf äußere Einflüsse und ist dabei von vorhandenen, teilweise Zelltyp-spezifischen, *trans*-regulatorischen Elementen abhängig (Wei et al., 2011). Während einige TFBS gehäuft in bidirektionalen Promotoren vorgefunden werden, ist der Großteil der charakterisierten TFBS (73%) unterrepräsentiert (Lin et al., 2007).

### 1.3.8 Eukaryotische Genregulation und humane Erkrankungen

Intakte *cis*-regulatorische Elemente sind eine wichtige Voraussetzung für die kontrollierte Genexpression. Mutationen in diesen Bereichen können zu einer veränderten Genexpression führen, und sind daher häufig mit humanen Erkrankungen assoziiert. Für das Bernard-Soulier-Syndrom ist beispielsweise eine Mutation in einem proximalen Promotor-Element krankheitsverursachend (Ludlow et al., 1996). Aber auch Mutationen in *Core*-Promotoren, *Enhancern*, *Silencern* und Isolatoren sind bekannte Ursachen für zahlreiche humane Erkrankungen (Maston et al., 2006). Neben Mutationen in regulatorischen Bereichen können auch *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) die Genexpression modulieren. In etwa 40 bis 50% der charakterisierten Promotoren führen SNPs zu einer veränderten Genexpression. Diese sind oftmals in unmittelbarer Nähe der TSS (innerhalb von 100 bp) gehäuft vorzufinden (Buckland et al., 2005). Die Bedeutung vieler intergenischer Bereiche im humanen Genom, und deren putative Beteiligung an der Gen-Regulation sind noch unklar. Es ist anzunehmen, dass die Anzahl der Genexpression-modulierenden SNPs deutlich größer ist (Buckland et al., 2005; Heintzman und Ren 2009). Da bisher keine Möglichkeit besteht die funktionelle Bedeutung der SNPs vorauszusagen, müssen putative Einflüsse auf die Genexpression experimentell überprüft werden (Buckland et al., 2005).

### 1.4 Ziel der Arbeit

Die Ursache der X-chromosomal vererbten lysosomalen Stoffwechselerkrankung Morbus Fabry sind Mutationen im betroffenen *GLA*-Gen. Diese führen zu einer defizienten enzymatischen *GLA*-Aktivität und der daraus resultierenden progressiven Akkumulation neutraler Sphingolipide in den Lysosomen. Die meisten der über 500 beschriebenen Mutationen betreffen den kodierenden *GLA*-Bereich und resultieren damit in einer veränderten Peptidsequenz, welche das aktive Zentrum des Enzyms oder die Proteinstabilität negativ beeinträchtigen kann (Stenson et al., 2003; Garman und Garboczi 2004). Während sich zahlreiche aktuelle klinische Studien und experimentelle Arbeiten mit der Analyse kodierender *GLA*-Mutationen beschäftigten, blieb die transkriptionelle *GLA*-Regulation weitestgehend unerforscht und bildet unter Anwendung verschiedenster molekularbiologischer Methoden das Ziel dieser Arbeit.

Die Promotorfunktion des *GLA*-Gens soll dabei durch Verwendung serieller Promotordeletionskonstrukte analysiert und transkriptionell aktive Bereiche der 5'-flankierenden Region identifiziert werden. Die Überprüfung putativer TFBS wird durch gezielte Mutagenese selbiger und Überexpressionen sowie Stimulationen von TFs im Reporterassay erfolgen. Direkte Interaktion von TFs und entsprechenden Promotorbereichen sollen im Anschluss mittels CHIP-Experimenten überprüft werden.

Da bereits gezeigt wurde, dass SNPs in etwa 40% bis 50% der charakterisierten Promotoren zu einer Veränderung der Genexpression führen (Buckland et al., 2005), soll die Verteilung genetischer Varianten durch direkte Sequenzierung der *GLA* 5'-flankierenden Region in Patientenkollektiven untersucht werden. Anschließend wird der Einfluss dieser identifizierten Varianten auf die Transkriptionsaktivität im Reporterassay überprüft. Gleichzeitig soll ein möglicher Effekt der genetischen Varianten auf DNA-Protein-Interaktionen mittels EMSA überprüft werden.

Ein besonderes Augenmerk soll in dieser Arbeit auf dem -10T-Haplotypen (IVS0 -10C>T, rs2071225; IVS2 -81-77delCAGCC, rs5903184; IVS4 -16A>G, rs2071397; IVS6 -22C>T, rs2071228) liegen. Dieser Haplotyp wurde bereits in der Literatur mit neurologischen Manifestationen assoziiert (Oliveira et al., 2008; Oliveira et al., 2008b), jedoch ist dessen funktionelle Relevanz bisher unklar. Neben dem Einfluss der in der *GLA* 5'-UTR lokalisierten Variante -10C>T auf Promotorfunktion und mögliche DNA-Protein-Interaktionen soll zudem mittels *Exon-Trapping*-Experimenten untersucht werden, ob die gekoppelten intronischen Varianten einen Einfluss auf die *GLA* mRNA-Prozessierung haben. Parallel dazu wird bei Trägern des -10T-Haplotypen das *GLA*-Transkriptlevel in Leukozyten mittels *real-time* PCR bestimmt und eine klinische Charakterisierung bezüglich kardialer, renaler und neurologischer Manifestationen erfolgen.

Dieser komplementäre Ansatz aus funktionellen Analysen des *GLA*-Gens sowie klinischer Datenerhebung bei betroffenen Patienten soll eine Übertragung der experimentellen Daten in die Klinik sowie umgekehrt ermöglichen und damit die Bedeutung des Haplotypen für Fabry-typische Manifestationen klären.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
2-Hydroxyestradiol (HE)	Steraloids, Newport, USA
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Ammonium Peroxysulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bacto Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Betain	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biotin-16-ddUTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fisher Scientific, Schwerte
<i>epidermal growth factor</i> (EGF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglykol-Tetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd, 37%	Roth, Karlsruhe
Formamid	AppliChem, Darmstadt
Glycerol, 87%	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Insulin-Transferrin-Selenium (100x)	Fisher Scientific, Schwerte
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Fisher Scientific, Schwerte
L-Glutamin 200 mM (100x)	Fisher Scientific, Schwerte
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Mangan(II)chlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe

Chemikalien	Hersteller
Methanol	Roth, Karlsruhe
N', N', N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
NP-40 (Igepal)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phorbol12-myristat13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
poly dA•dT	USB Corporation Cleveland, USA
poly dI•dC	USB Corporation Cleveland, USA
Rubidiumchlorid (RbCl)	AppliChem, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Spermidin	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-base)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

## 2.2 Verbrauchsmaterialien und Kits

Verbrauchsmaterialien/Kits	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Fisher Scientific, Schwerte
BigDye Terminator v3.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
CL-X Posure Film	Fisher Scientific, Schwerte
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Dual-Luciferase Reporter Assay System</i>	Promega, Mannheim
FirstChoice RLM-RACE Kit	Ambion, Darmstadt
GoTaq qPCR Mastermix	Promega, Mannheim
Immobilon-P Transfer Membrane (PVDF)	Millipore, Bedford, USA
jetPEI (Polyplus transfection)	HiSS Diagnostics, Freiburg
KAPAHiFi PCR Kit	PEQLAB, Erlangen
LightShift Chemiluminescent EMSA Detection Kit	Fisher Scientific, Bonn
Lipofectamin 2000	Life technologies, Karlsruhe
LR <i>Clonase</i> II Enzym Mix	Life technologies, Karlsruhe

Verbrauchsmaterialien/Kits	Hersteller
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Magnetic Protein-G Beads	Life technologies, Karlsruhe
Nanofectin	PAA, Pasching, Österreich
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA Blood Midi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel, Düren
Passiv Lysepuffer (5x)	Promega, Mannheim
pCR8/GW/TOPO TA Cloning	Life technologies, Karlsruhe
PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Life technologies, Karlsruhe
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraktions Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript II Reverse Transkriptase	Life technologies, Karlsruhe
tRNA	Roche Diagnostics, Mannheim
Whatman Paper 3MM Chr.	Biometra, Göttingen

### 2.3 Seren und Medien

Seren und Medien	Hersteller
BSA	PAA, Pasching, Österreich
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	PAA, Pasching, Österreich
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA, Pasching, Österreich
HAM's F12-Medium (Ham's Nutrient Mixtures)	PAA, Pasching, Österreich
MEM Aminosäuren-Lösung (50x)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ohne MgCl <sub>2</sub> und CaCl <sub>2</sub>	PAA, Pasching, Österreich
Roswell Park Memorial Institut Medium 1640-Medium (RPMI)	PAA, Pasching, Österreich

### 2.4 DNA-Größenstandards

DNA Größenstandards	Hersteller
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fisher Scientific, Schwerte
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fisher Scientific, Schwerte

## 2.5 Enzyme und Antibiotika

Enzyme und Antibiotika	Hersteller
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Exonuklease I ( <i>E. coli</i> )	Fisher Scientific, Schwerte
GOTaq DNA Polymerase	Promega, Mannheim
Penicillin-Streptomycin (PenStrep; 10000 U/ml)	Fisher Scientific, Schwerte
Proteinase K	Fisher Scientific, Schwerte
Restriktionsendonukleasen	Fisher Scientific, Schwerte
RiboLock	Fisher Scientific, Schwerte
<i>shrimp alkaline phosphatase</i> (SAP)	Fisher Scientific, Schwerte
T4 DNA-Ligase	Fisher Scientific, Schwerte
Terminale Desoxynukleotid Transferase (TdT)	Roche-Diagnostics, Mannheim
Trypsin-EDTA (0,05%)	Fisher Scientific, Schwerte

## 2.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Maus-IgG	Merck Millipore, Darmstadt
TFEB-C6	Santa Cruz, Heidelberg

## 2.7 Plasmide und Vektoren

Plasmide	Hersteller/Referenz
p3xFLAG-CMV-10-TFEB	Andrea Ballabio, Universität Neapel
pCR8/GW/TOPO	Life technologies, Karlsruhe
pGEM-T Easy	Promega, Mannheim
pGL3-Basic	Promega, Mannheim
pGL3-Control	Promega, Mannheim
pLucRLuc	Prof. David Reisman, Universität von South Carolina
pRL-CMV Vector	Promega, Mannheim
pSPL3	Life technologies, Karlsruhe
pCDNA3.1(+)	Life technologies, Karlsruhe

## 2.8 *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
One Shot Mach1-T1	F- $\phi$ 80( <i>lacZ</i> ) $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>hsdR</i> ( $r_K$ - $m_K$ +) $\Delta$ <i>recA1398</i> <i>endA1</i> <i>tonA</i>	Life technologies, Karlsruhe
One Shot TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80( <i>lacZ</i> ) $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Life technologies, Karlsruhe

## 2.9 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
EA.hy926	humane vaskuläre Endothelzellen	Edgell et al., 1983
HEK 293-T	humane embryonale Nierenzellen	ATCC: CRL-11268
IHKE	immortalisierte humane epitheliale Nierenzellen	Tveito et al., 1989
SH-SY5Y	humane Neuroblastomzellen	ATCC: CRL-2266
THP-1	humane Monozyten	ATCC: TIB-202

## 2.10 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Systec VX-75	Systec, Wettenberg
Bakterienschüttler	Shaker Series 25	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Brutschrank (Bakterien)	B 6120	Heraeus, Hanau
Cell Counter	Casy Modell TT	Innovatis, Bielefeld
CO <sub>2</sub> -Inkubator	MCO-18AIC	Sanyo, München
Kryo-Freezing Container	Mr. Frosty	Fisher Scientific, Schwerte
Heizblock	VMS-A	VWR International, Darmstadt
Luminometer	Sirius Single Tube	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
Mikroskop	AE20	Motic, Wetzlar
<i>Real-time Cycler</i>	MX3000P	Agilent Technologies, Waldbronn
pH-Meter	FiveEasy	Mettler-Toledo, Gießen
Photometer	NanoPhotometer	Implem, München
<i>power supply</i>	PowerPackBasic	BioRad, München
Rotator	SB2 Tube Rotator	Bibby Scientific Limited, Stone, UK
Sequenzierer	7500 ABIprism	Applied Biosystems, Foster City, USA
Schüttler	GFL 3006	GFL, Großburgwedel

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Sonifikator	Bioruptor UCD-200	Diagenode, Liège, Belgien
Sterilbank (bakteriell)	Class II type EF	Clean air Techniek B.V., Woerden, Niederlande
Sterilbank (eukaryotisch)	LaminAir HB2448	Heraeus, Hanau
Tank-Blot Kammer	Mini Trans-Blot Cell	BioRad, München
<i>Thermocycler</i>	PTC-225 DNA Engine Tetrad 2	MJ Research, Miami, USA
Thermoschüttler	TS-100	Kisker Biotech, Steinfurt
UV-Tisch	AlphamagerEC	Innotech Corp, San Leandro, USA
Waage	TE313S	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	GFL 1083	GFL, Großburgwedel
Vortexer	PV-1	Grant instruments, Cambridge, GBR
Zentrifuge	FVL-2400N	Kisker Biotech, Steinfurt
Zentrifuge	MIKRO 200R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	J2-21M/E	Beckman Coulter, Krefeld

## **3 Methoden**

### **3.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.1.1 Isolation von Nukleinsäuren**

##### **3.1.1.1 Extraktion genomischer DNA**

Genomische DNA wurde mittels QIAamp DNA Blood Mini-Kit (Qiagen) aus Leukozyten aus EDTA-behandeltem Vollblut oder Zelllinien extrahiert. Die Extraktion der DNA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden 200 µl Vollblut (EDTA-behandelt) oder  $5 \times 10^6$  kultivierte Zellen mit 20 µl Proteinase K sowie 200 µl Puffer AI (Bindepuffer) versetzt und bei 56°C für 10 min inkubiert. Nach Bindung der DNA an die Silica-Membran-Säule erfolgte nach mehrfachen Waschschritten die Eluierung der DNA, welche für kurze Zeiträume bei 4°C bzw. längere Zeiträume bei -20°C gelagert wurde.

##### **3.1.1.2 Extraktion der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen**

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mittels NucleoSpin RNA II-Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Die Zellen ( $5 \times 10^6$ ) wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 350 µl Lysepuffer (+1% v/v β-Mercaptoethanol) lysiert. Es folgte die Reinigung des Lysats durch Filtration und die Bindung an die Silica-Membran-Säule. Nach DNA-Verdau auf der Säule durch Zugabe von rDNase und mehreren Waschschritten erfolgte die Eluierung der Gesamt-RNA mit RNase-freiem Wasser. Die Gesamt-RNA wurde bei -80°C gelagert.

##### **3.1.1.3 Extraktion der Gesamt-RNA aus Vollblut**

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus Vollblut (EDTA-behandelt) wurde mit dem NucleoSpin RNA Blood Midi-Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt. Nach Anweisung des Herstellers erfolgte zunächst die Erythrozytenlyse durch Inkubation von 1,3 ml Blut mit 1,3 ml Lysepuffer DL und 33 µl Proteinase K für 10 min bei RT. Das Lysat wurde im Anschluss über eine Silica-Membran-Säule gegeben und die DNA durch rDNase Zugabe verdaut. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Eluierung der Gesamt-RNA mit RNase-freiem Wasser. Die Gesamt-RNA wurde bei -80°C gelagert.

##### **3.1.1.4 Isolation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)**

Plasmid-DNA aus 5 ml *E. coli* über Nacht-Kulturen wurde nach Herstellerangaben mittels NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) isoliert. Dazu wurden 2 ml der *E. coli*-Kultur durch Zentrifugation pelletiert (11000x g; 30 s; RT) und in 250 µl Resuspendierungspuffer A1

resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Lysepuffer A2 und Inkubation für 5 min bei RT kam es zur Zelllyse. Das Lysat wurde zur Neutralisierung mit 300 µl Puffer A3 versetzt und zur Entfernung von Zellresten abzentrifugiert (11000x g; 8 min; RT). Die an Silica-Membran gebundene DNA wurde vor der Eluierung zweimal gewaschen.

### 3.1.1.5 Isolation der Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxi-Präparation)

Um große Mengen Plasmid-DNA höchster Qualität für die Transfektion eukaryotischer Zellen zu isolieren, wurden Maxi-Präparationen mit dem *PureLink HiPure Plasmid DNA Purification-Kit* (Life technologies) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden 200 ml *E. coli* über Nacht-Kulturen pelletiert, in Resuspendierungspuffer gelöst und für 5 min lysiert. Nach Zugabe des Neutralisationspuffers wurden Zellreste durch Zentrifugation vom Lysat entfernt. Im Anschluss folgte ein Endotoxin-Reinigungsschritt. Dazu wurde das Lysat mit 1/10 Volumen *Endotoxin-Removal-Puffer A* für 30 min bei 4°C inkubiert, auf die äquilibrierte Anionen-Austausch-Säule gegeben und mit einem Volumen *Endotoxin-Removal-Puffer B* gereinigt. Im Anschluss erfolgten der Waschschrift und die Eluierung der gebunden Plasmid-DNA. Das Eluat wurde durch Zugabe von Isopropanol (70% v/v) und Zentrifugation (15000x g, 30 min, 4°C) präzipitiert, um anschließend mit 70%-igem Ethanol gewaschen zu werden. Das getrocknete Pellet wurde abschließend in TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

#### **Endotoxin-Removal-Puffer**

50 mM MOPS, pH 7.0  
750 mM NaCl  
10% (w/v) Triton X-100  
10% (v/v) Isopropanol

#### **Endotoxin-Removal-Puffer B**

100 mM Natriumacetat, pH 5.0  
750 mM NaCl  
1% (w/v) Triton X-100

### 3.1.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Konzentration sowie Reinheit von DNA- und RNA-Proben wurden mittels NanoPhotometer (Implen) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger-DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA. Bei einzelsträngiger-RNA beträgt die Konzentration 33 µg/ml. Das Verhältnis der Extinktion E<sub>260</sub>/E<sub>280</sub> gibt Auskunft über die Reinheit der Probe, ein Wert von  $\geq 1,8$  entspricht reiner DNA, ein Wert von  $\geq 2$  reiner RNA.

### 3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurde leicht verändert nach Mullis et al. (Mullis et al., 1986) durchgeführt. Standard-Amplifikationen wurden mit der GOTaq-Polymerase (Promega) durchgeführt. Für die Erstellung serieller Promotordeletionskonstrukte oder Expressionsvektoren, bei denen

die Erhaltung der originalen *Template*-Sequenz von großer Bedeutung war, wurde die PCR mit der KAPAHiFi-Polymerase (Peqlab) durchgeführt, welche über eine verbesserte Fehlerkorrektur verfügt.

#### **Standard-PCR-Ansatz**

5 ng	<i>Template</i> -DNA
0,5 µM	<i>sense</i> Primer
0,5 µM	<i>antisense</i> Primer
1x	5x GoTaq-Reaktionspuffer
1U	GOTaq-Polymerase
250 µM	dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

#### **Standard-PCR-Programm**

initiale Denaturierung	5 min 95°C	} 25 – 30 Zyklen
Denaturierung	45 s 95°C	
<i>annealing</i> <sup>#</sup>	45 s x°C	
Elongation	72°C 1 min/kb	
finale Elongation	10 min 72°C	

<sup>#</sup>Die *annealing*-Temperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der Oligonukleotide und wurde standardmäßig berechnet als  $[T_m - 2^\circ\text{C}]$ .

#### **3.1.3.1 Touchdown-PCR**

Die *Touchdown*-PCR wurde bei problematischen *Templates* verwendet. Hierbei wurde die berechnete *annealing*-Temperatur zunächst um 5-10°C erhöht, um anschließend in jedem dritten Zyklus der Reaktion um 2°C herabgesetzt zu werden. Nach dem Erreichen der optimalen *annealing*-Temperatur wurden weitere 25 bis 30 Zyklen durchgeführt. Dies erhöhte die Spezifität der Reaktion und diente der Anreicherung des spezifischen Produktes.

#### **3.1.3.2 Nested-PCR**

Die *Nested*-PCR diente der spezifischen Amplifikation schwacher bzw. unspezifischer Amplikons. Hierfür wurde zunächst eine Standard-PCR durchgeführt und der Reaktionsansatz wurde entweder auf einem Agarosegel aufgetragen, um die spezifische Bande zu extrahieren oder direkt für den zweiten PCR-Lauf eingesetzt. Die Oligonukleotide für den zweiten PCR-Lauf wurden so gewählt, dass ihre Bindestellen innerhalb des zuvor amplifizierten Bereichs lagen. Durch diese Vorgehensweise wurden Spezifität und Konzentration des Amplikons erhöht.

### 3.1.3.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die cDNA-Synthese wurde mittels SuperScript II (Life technologies) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden 200 ng bis 1 µg Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen (Abschnitt 3.1.1.2) oder aus Vollblut (Abschnitt 3.1.1.3) mit Oligo(dT) Primern und dNTPs versetzt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von Reaktionspuffer, DTT und RNase-Inhibitor (Ribolock, Fisher Scientific) wurde der Probenansatz für 2 min bei 42°C inkubiert, mit 1 µl SuperScript II versetzt und für weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte durch eine Inkubation bei 70°C für 10 min.

### 3.1.3.4 Real-time PCR

Mittels *real-time* PCR wurden die GLA-Transkriptlevel in humanen Leukozyten analysiert. Dafür wurden zunächst 500 ng der aus Vollblut isolierten RNA (Abschnitt 3.1.1.3) mittels SuperScript II in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 3.1.3.3) und diese 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Das relative GLA-Transkriptlevel wurde mit SYBR Green (GOTaq qPCR Mastermix, Promega) in Duplikaten auf einem MX3000P (Stratagene) bestimmt. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente dabei als endogene Kontrolle. Die *real-time* PCRs wurden wie folgt durchgeführt: initiale *HotStart*-Aktivierung bei 95°C für 2 min, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung (95°C; 15 s) und einem kombinierten *annealing/Elongations*-Schritt (60°C, 60 s). Zusätzlich erfolgte die Generierung einer Dissoziationskurve (1 min 95°C; 30 s 60°C; 30 s 95°C) zur Analyse der PCR-Spezifität. Die Primereffizienzen wurden mit Hilfe von cDNA-Verdünnungsreihen berechnet und lagen bei allen verwendeten Primern über 90%. Die Reaktionsspezifität der Signale wurde routinemäßig auf 2%-igen Agarosegelen überprüft. Das relative GLA-Transkriptlevel wurde mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode berechnet (Livak und Schmittgen 2001). Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

#### Real-time PCR Ansatz

12,5 µl	GOTaq qPCR Mastermix
5 µl	cDNA (1:5 Verdünnung)
0,5 µl	Oligonukleotid [10 µM] (jeweils)
7 µl	H <sub>2</sub> O

**Tabelle 3: In der *real-time* PCR verwendete Oligonukleotide.** Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die Translationsstartstelle. *Accession*-Nummern: GAPDH: NM\_002046.4; GLA: NM\_000169.2

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Position
GAPDH <i>sense</i>	CTGCACCACCAACTGCTTAGCAC	+453
GAPDH <i>antisense</i>	GTGATGGCATGGACTGTGGTCATGAG	+545
GLA <i>sense</i>	ACCAGCTTAGACAGGGAGAC	+986

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Position
GLA <i>antisense</i>	AAGAGCGAGGTCCACCAATC	+1093

### 3.1.4 Rapid amplification of 5'-cDNA ends (5'-RACE)

Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes erfolgte nach Herstellerangaben mit dem FirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion). Mittels RLM-RACE wurden nur vollständig prozessierte mRNAs für die Bestimmung des Transkriptionstartpunktes einbezogen. Zunächst erfolgte dafür die Entfernung freier 5'-Phosphatreste mittels alkalischer Phosphatase an isolierter Gesamt-RNA (Abschnitt 3.1.1.2), wobei vollständig prozessierte mRNAs durch ihre Cap-Struktur vor dieser Behandlung geschützt sind. Anschließend wurde die Cap-Struktur durch Pyrophosphatase-Behandlung entfernt und an dem freien 5'-Phosphatrest ein RNA-Adapter ligiert. Nach cDNA-Synthese mit Zufallsprimern wurde eine *Nested-PCR* (Abschnitt 3.1.3.2) mit Adapter-spezifischen *sense* Primern und Gen-spezifischen *antisense* Primern durchgeführt. Durch die Sequenzierung der Amplikons konnte das 5'-Ende der entsprechenden RNA bestimmt werden.

### 3.1.5 DNA/RNA-modifizierende Reaktionen

#### 3.1.5.1 Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten aus PCRs wurde mittels Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Dafür wurden 100 ng bis 1 µg DNA mit dem entsprechenden Enzym und dem dazu optimalen Reaktionspuffer in einem 20 µl Ansatz für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70°C erfolgte die Analyse durch Agarosegelelektrophorese. Für präparative Zwecke erfolgte anschließend die Extraktion der Fragmente aus dem Agarosegel.

#### 3.1.5.2 Dephosphorylierung von DNA

Die *shrimp alkaline phosphatase* (SAP; Fisher Scientific) wurde zum Dephosphorylieren von 5'-Phosphatresten an linearisierter Plasmid-DNA eingesetzt, um damit eine Re-Ligation zu verhindern. Dazu wurde nach Restriktion und Hitzeinaktivierung der Endonuklease (Abschnitt 3.1.5.1) 1 U SAP in den Reaktionsansatz gegeben. Die Zugabe von spezifischem SAP-Puffer entfiel, da die SAP in allen gängigen Endonuklease-Puffern vollständig aktiv ist. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37°C erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 15 min.

#### 3.1.5.3 Ligation

Mittels T4 DNA-Ligase (Fisher Scientific) wurden zueinander komplementäre

DNA- Überhänge sowie nicht überhängende DNA-Enden enzymatisch miteinander verbunden. Das Enzym katalysierte dabei die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen unter Verbrauch von ATP. In einem Ligationsansatz wurden dephosphorylierte Plasmid-DNA und aufgereinigtes Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 (Plasmid:Insert) eingesetzt. In Gegenwart von 1x Ligationspuffer und 1 Weiss-U wurde der Ligationsansatz bei 16°C über Nacht oder 3 h bei RT inkubiert.

#### 3.1.5.4 Biotinylierung der 3'-Enden einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide

Die für EMSA-Experimente eingesetzten Sonden wurden durch die Biotinylierung von komplementären Oligonukleotiden und anschließend *annealing* der Einzelstränge zu einem Doppelstrang hergestellt. Fünf pmol der dafür verwendeten 28 nt-langen Oligonukleotide (Life technologies; HPLC-gereinigt; Oligonukleotidsequenzen siehe Tabelle 4) wurden zunächst mit Hilfe von 60 U terminaler Desoxynukleotid-Transferase und in Gegenwart von 2 mM CoCl<sub>2</sub>, 500 pmol Biotin-16-ddUTP, 1x TdT-Reaktionspuffer (alle Roche Diagnostics) sowie H<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte für 10 min bei 70°C. Durch eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion wurden die biotinylierten Oligonukleotide aufgereinigt und überschüssiges Biotin entfernt. Anschließend erfolgte das *annealing* der zueinander komplementären Oligonukleotide durch Zugabe von 100 mM NaCl und 1,5 M Betain sowie einer Inkubation für 5 min bei 95°C und dem darauffolgenden langsamen Abkühlen des Probenansatzes über Nacht. Das *annealing* nicht-biotinylierter Oligonukleotide erfolgte unter identischen Reaktionsbedingungen. Das *annealing* der Oligonukleotide wurde routinemäßig mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

**Tabelle 4: Sequenzen der EMSA-Sonden.** Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die Translationsstartstelle. *Accession*-Nummer: NM\_000169.2

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Position
GLA -10C-Allel <i>sense</i>	AAATTTATGCTGTCCGGTCACCGTGACA	-28
GLA -10C-Allel <i>antisense</i>	TGTCACGGTGACCGGACAGCATAAATTT	-1
GLA -10T-Allel <i>sense</i>	AAATTTATGCTGTCCGGTTACCGTGACA	-28
GLA -10T-Allel <i>antisense</i>	TGTCACGGTAACCGGACAGCATAAATTT	-1

#### 3.1.5.5 Zielgerichtete Mutagenese

Das gezielte Einbringen von Mutationen in Vektorkonstrukte erfolgte mittels zielgerichteter Mutagenese. Dazu wurden zunächst ca. 40 nt lange, spezifische Oligonukleotide kreiert, welche die erwünschte Punktmutation beinhalteten und komplementär zueinander waren. In einem PCR-Ansatz mit Wildtyp-Plasmid, den Mutageneseprimern und einer

*proofreading*-Polymerase wurde die Mutation in den Vektor eingebracht. Im Anschluss an die PCR wurden die parentalen Wildtyp-Vektoren durch das methylierungsabhängige Restriktionsenzym *DpnI* gespalten (60 min, 37°C) und die mutierten Vektoren in kompetente *E. coli* transformiert.

#### **Standard-Ansatz**

Plasmid-DNA	50 ng
dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	300 µM (jeweils)
KAPAHiFi-Polymerase	1 U
KAPAHiFi 5x Reaktionspuffer	1x
<i>sense</i> Primer	0,6 µM
<i>antisense</i> Primer	0,6 µM
ad H <sub>2</sub> O	25 µl

#### **Standard-PCR-Programm**

98°C 5 min	} 17 Zyklen
98°C 45 s	
55°C 1 min	
72°C 1 min/kb	
72°C 20 min	

#### **3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Lineare DNA-Fragmente wurden in 1x TBE-Agarosegelen aufgetrennt. Je nach zu erwartender Fragmentgröße wurden dafür 0,8% bis 2% Agarose (w/v) in 1x TBE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Agarose auf ca. 50°C erfolgte die Zugabe von 0,03 µg/ml Ethidiumbromid. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt (1x Endkonzentration) und auf die ausgehärteten Agarosegele aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TBE verwendet und als Größenstandard dienten *Gene Ruler DNA-Ladder* (Fisher Scientific). Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte mittels AlphamagerEC.

#### **10x TBE-Puffer**

890 mM Tris
890 mM Borsäure
20 mM EDTA

#### **6x Ladepuffer**

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)
0,03% (w/v) Bromphenolblau
0,03% (w/v) Xylencyanol
60% (v/v) Glycerol
60 mM EDTA

### 3.1.7 Aufreinigung von Nukleinsäuren

#### 3.1.7.1 Gelextraktion

Die Aufreinigung von PCR-Produkten für Sequenzierreaktionen oder Klonierungen erfolgte aus Agarosegelen mittels QIAquick Gelextraktion-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Für die Gelextraktion wurde das entsprechende DNA-Fragment unter dem AlphamagerEC aus dem Agarosegel geschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von Puffer QG wurde das Agarosefragment für 10 min bei 50°C geschmolzen und anschließend an eine Silica-Membran gebunden. Nach mehrmaligem Waschen der Säule wurde die DNA mit 50 µl AE-Puffer eluiert.

#### 3.1.7.2 DNA-Fällung

Zur Aufkonzentrierung von DNA wurde diese mit NaAc und Ethanol gefällt. Dazu wurde der DNA-Ansatz mit dem 0,1-fachen Volumen 3 M NaAc-Lösung (pH 5,2) sowie dem 2,5-fachen Volumen Ethanol (100%) versetzt und über Nacht bei -20°C gelagert. Nach der Zentrifugation (14000 rpm, 20 min, 4°C) wurde das DNA-Pellet zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und luftgetrocknet. Je nach zu erwartender DNA-Konzentration erfolgte die Aufnahme des DNA-Pellets in ~20 µl H<sub>2</sub>O und die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.

#### 3.1.7.3 Exo-SAP-Aufreinigung

Für sensitive Reaktionen wie Sequenzierungen wurden Oligonukleotide und dNTPs aus PCR-Ansätzen mittels Exo-SAP-Aufreinigung entfernt. Dafür wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mit 2 µl des Exo-SAP-Ansatzes versetzt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Hitzeinaktivierung der Enzyme erfolgte bei 80°C für 15 min.

#### **Exo-SAP-Ansatz**

Exonuklease I (20 U/µl; Thermo Scientific)	0,1 µl
<i>shrimp alkaline phosphatase</i> (1 U/µl; Thermo Scientific)	1 µl
ad H <sub>2</sub> O	10 µl

#### 3.1.7.4 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion

Um Proteine aus DNA-Ansätzen zu entfernen, wurde eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion durchgeführt. Hierfür wurde die DNA-Probe mit dem gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, durchmischt und anschließend zentrifugiert (15000 rpm; 10 min; 4°C). Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene DNA gefällt (3.1.7.2).

### 3.1.8 Sequenzierung

Zur Detektion genetischer Varianten und der Kontrolle der Sequenzintegrität von PCRs sowie Plasmiden erfolgte eine Sequenzierung mittels ABI3730 Fluoreszenz-Sequenzierer. Die Sequenzieransätze wurden nach Angaben des Herstellers mittels *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) erstellt.

#### Sequenzieransatz

150 ng Plasmid-DNA bzw. 50 ng PCR-Produkt  
 0,5 µl BigDye v3.1  
 2 µl 5x Sequenzierpuffer  
 1,5 µl Oligonukleotid [1 µM]  
 ad 10 µl H<sub>2</sub>O

#### Sequenzier-PCR

96°C	5 min	} 26 Zyklen
96°C	15 s	
50°C	15 s	
60°C	4 min	

### 3.1.9 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Für die Analyse von *in vivo* DNA-Protein-Interaktionen wurden ChIP-Experimente nach einem modifizierten Protokoll (Boyd et al., 1998; Liu et al., 2000) durchgeführt. Bei der Methode werden endogene Proteine zunächst an die DNA fixiert und der Chromatin-Protein-Komplex wird unter Verwendung spezifischer Antikörper präzipitiert. Mittels PCR mit spezifischen Oligonukleotiden erfolgt der Nachweis einer Proteinbindung an ausgewählte DNA-Bereiche.

Die Fixierung der Zellen ( $1 \times 10^7$ ; 20 min; RT) mit Formaldehyd (Endkonzentration 1%) wurde durch die Zugabe von 140 µl/ml Glycin und einer 5-minütigen Inkubation bei RT gestoppt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS und Zellisolation (800x g; 5 min; 4°C) erfolgte die Lyse in 400 µl Zelllysepuffer (20 min; RT). Im Anschluss an die Sedimentation der intakten Zellkerne (800x g; 5 min; 4°C) wurden diese durch Zugabe von 1 ml Kernlysepuffer lysiert. Um eine durchschnittliche Fragmentgröße von 500 bp zu erhalten, wurde das Chromatin mit Hilfe eines Bioruptors (Diagenode; Intensität: *high*; Interval: 0.5; 45 min) sonifiziert. Die Größe der Chromatinfragmente wurde routinemäßig mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand zunächst mit *rabbit pre-immune* Serum inkubiert (30 min; 4°C) und anschließend mit frisch präparierten magnetischen Protein-G *beads* (blockiert mit BSA und tRNA; 1 h; 4°C) inkubiert (30 min; 4°C). Im Anschluss an eine Zentrifugation (15000 rpm; 2 min; 4°C) wurde der Überstand in ein *low-binding* Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 4 µg Antikörper [TFEB (Santa Cruz); IgG (Merck)] über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Ansätze mit frisch präparierten magnetischen Protein-G *beads* für 3 h bei 4°C inkubiert und anschließend mehrfach mit den Waschpuffern I, II und III gewaschen bevor die Eluierung der Antikörper/Protein/DNA-Komplexe von den *beads* erfolgte. Die reverse Quervernetzung wurde durch eine über Nacht-Inkubation der Proben bei 67°C durchgeführt.

Am nächsten Tag wurden die Proteine im Probenansatz durch Proteinase K-Behandlung (37°C; 2 h) degradiert und die DNA anschließend durch eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion aufgereinigt und in H<sub>2</sub>O aufgenommen, um für weitere PCR-Analysen verwendet zu werden (Oligonukleotidsequenzen siehe Tabelle 5).

#### Zellysepuffer

10 mM Tris pH 8.0  
10 mM NaCl  
0.2% (v/v) NP-40  
Proteinase-Inhibitor

#### Kernlysepuffer

50 mM Tris pH 8.0  
10 mM EDTA  
1% (w/v) SDS  
Proteinase-Inhibitor

#### Dilutionspuffer

20 mM Tris pH 8.0  
2 mM EDTA  
150 mM NaCl  
1% (w/v) Triton X-100  
Proteinase-Inhibitor

#### Waschpuffer I

20 mM Tris pH 8.0  
2 mM EDTA  
50 mM NaCl  
1% (w/v) Triton X-100  
0.1% (w/v) SDS

#### Waschpuffer II

10 mM Tris pH 8.0  
1 mM EDTA  
0.25 mM LiCl  
1% (v/v) NP-40  
1% (w/v) Desoxycholsäure

#### Waschpuffer III

20 mM Tris pH 7.6  
50 mM NaCl

#### Eluierungspuffer

10 mM NaHCO<sub>3</sub>  
1% (w/v) SDS

**Tabelle 5: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide für die Chromatin-Immunopräzipitation Analyse.** Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die Transkriptionsstartstelle. Accession-Nummer: NM\_000169.2

Bezeichnung	Sequenz 5´-3´	Position
GLA-ChIP <i>sense</i>	CACACCAACCTCTAACGATAC	-425
GLA-ChIP <i>antisense</i>	GCACCTTAGTGATCCCGAG	-240

#### **3.1.10 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)**

Die Analyse von DNA-Protein-Interaktionen wurde mittels EMSA-Experimenten durchgeführt. Dabei migrieren DNA-Protein-Komplexe in einem nativen Polyacrylamidgel in Abhängigkeit von ihrer Größe und Ladung. Die Bindung von Proteinen an die DNA-Sonden führt im Vergleich zur freien ungebundenen DNA-Sonde zu einer Verschiebung des detektierbaren Signals. Die Experimente wurden mit dem *LightShift Chemiluminescent EMSA Detection Kit* (Thermo Scientific) nach geringfügig modifizierten Herstellerangaben durchgeführt. Fünf µg Kernproteine wurden dafür in 1x *Bandshift*-Puffer, 500 ng poly dI•dC/dA•dT sowie 250 mM Betain für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von biotinylierter DNA-Sonde (Abschnitt 3.1.5.4) und eine weitere Inkubation für 30 min bei RT. Als Kontrolle diente der gleiche Ansatz mit einem 200-fachen Überschuss nicht-biotinylierter Sonde (Kompetitor) sowie ein Ansatz ohne Kernextrakt. Die elektrophoretische Auftrennung der

Probenansätze erfolgte in einem nativen 6%-igen Polyacrylamidgel (0,5x TBE; 100 V). Anschließend wurden die Sonden und Komplexe mittels Tank-Blot-Verfahren (Abschnitt 3.2.3) auf eine PVDF-Membran transferiert (0,5x TBE; 100V; 1 h). Die Quervernetzung von Proteinen und DNA-Sonden erfolgte für 15 min bei 312 nm auf dem AlphasMagerEC. Die Signale wurden anschließend mittels *Chemiluminescent Nucleic Acid Detection* Kit (Thermo Scientific) visualisiert. Dafür wurde die PVDF-Membran zunächst geblockt, viermal gewaschen, äquiliert und anschließend in Substrat-Arbeitslösung (*luminollenhancer*- und Peroxidase-Lösung) inkubiert. Durch Exposition eines Autoradiographiefilms (CL-X Posure Film, Fisher Scientific) wurden die Signale sichtbar gemacht.

#### **4x Bandshift-Puffer**

20 mM MgCl<sub>2</sub>  
240 mM KCl  
40 mM HEPES/KOH pH 7,9  
5 mM Spermidin  
16% (w/v) Ficoll

#### **5x TBE-Puffer**

450 mM Tris  
450 mM Borsäure  
10 mM EDTA

#### **6%-iges natives Polyacrylamidgel**

2 ml AA/BA, 30%  
1 ml 5x TBE  
83.7 µl APS, 10% (w/v)  
3.7 µl TEMED  
ad 10 ml H<sub>2</sub>O

#### **3.1.11 Exon-Trapping**

Das *Exon-Trapping* dient der Identifizierung von Exons in eukaryotischen Genen und wurde ursprünglich von Buckler et al. (Buckler et al., 1991) entwickelt. Dabei nutzt man die Eigenschaft eukaryotischer Gene, dass intronische Bereiche aus prä-mRNAs mittels Spleißen entfernt werden, wofür intakte Donor- und Akzeptor-*splice-sites* notwendig sind. Grundlage des *Exon-Trapping* ist der Vektor pSPL3, in dem zwei Exons von einem Intron separiert sind. Nach Transfektion des Vektors in eukaryotische Zellen wird die Exon-Intron-Exon-Sequenz in prä-mRNA transkribiert und anschließend in eine reife mRNA prozessiert, deren Größe und Sequenz bekannt ist. Die über die MCS im intronischen Bereich des Vektors eingebrachten DNA-Fragmente, die aus einem Exon und angrenzenden intronischen Bereichen bestehen, werden ebenso prozessiert und in der reifen mRNA von den bekannten Exons des Vektors umgeben. Da sich durch das eingebrachte Exon die Länge des Transkripts ändert, können Größenunterschiede mittels PCR und Gelelektrophorese untersucht werden. Dafür wurden die Oligonukleotide SD6 und SA2 verwendet, mit denen im Falle des Leervektors ein 261 bp großes Fragment amplifiziert wird.

Eine Sequenzierung aus den bekannten Exonsequenzen des Vektors in das eingebrachte Exon ist ebenfalls möglich.

Zur Analyse der intronischen *GLA*-Varianten wurden die entsprechenden *GLA*-Exons (IVS2-81\_-77delCAGCC: Exon 3; IVS4-16A>G: Exon 5; IVS6-22C>T: Exon 7; Kontrolle: IVS4+919G>A: Exon 5) mit etwa 250 bp der flankierenden intronischen Bereiche mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotidsequenzen siehe Tabelle 6). Als *Template* dafür diente Patienten-DNA. Über die in den Oligonukleotiden eingebrachten Restriktionsschnittstellen *Bam*HI (*sense*) und *Eco*RI (*antisense*) wurden die Fragmente in die MCS des Vektors pSPL3 kloniert. Die zu untersuchenden intronischen Varianten wurden mittels zielgerichteter Mutagenese (Abschnitt 3.1.5.5) in die pSPL3-Konstrukte eingebracht. Die Sequenzintegrität aller generierten Vektoren wurde mittels Sequenzierung kontrolliert. Vierundzwanzig Stunden nach transienter Transfektion (Abschnitt 3.3.2.3) der pSPL3-Konstrukte in EA.hy926- und SH-SY5Y-Zellen erfolgten die Isolation der Gesamt-RNA (Abschnitt 3.1.1.2) und die Synthese der cDNA (Abschnitt 3.1.3.3), welche in der anschließenden PCR mit den Vektor-spezifischen Primern SD6 und SA2 als *Template* diente. Neben der Überprüfung möglicher Größenunterschiede mittels elektrophoretischer Auftrennung der Amplikons auf 2%-igen Agarosegelen erfolgte eine Sequenzierung der Gel-extrahierten Fragmente.

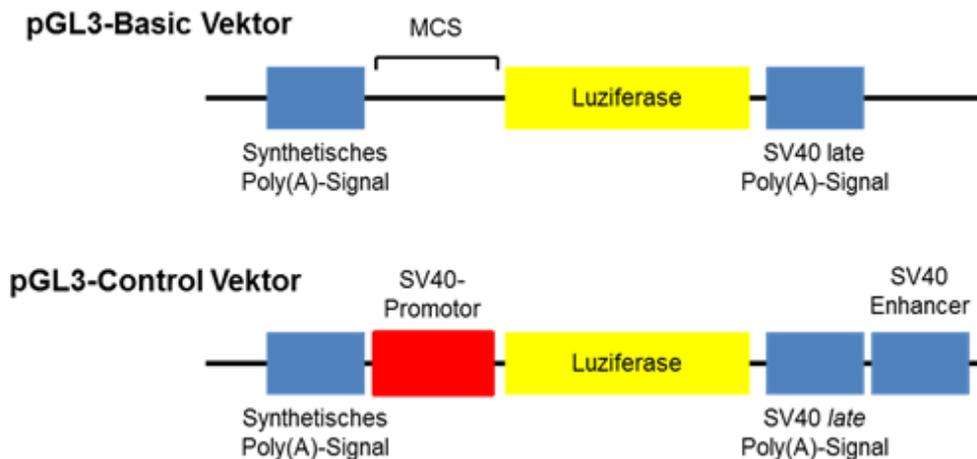
**Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide für den Exon-Trapping Assay.** Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die Translationsstartstelle. *Accession*-Nummern: *GLA*: 4296; pSPL3: U19867

Bezeichnung	Sequenz 5´-3´	Position
IVS2 <i>sense</i>	GTGGAATTGCTGCTAGCTTTCTCCTCAG	+5844
IVS2 <i>antisense</i>	GTGGGATCCGATTGACAACCTGGACTCCC	+6576
IVS4 <i>sense</i>	GTGGAATTGCGAGCTTTTAATTTTACTAAGACC	+8703
IVS4 <i>antisense</i>	GTGGGATCCGAAATAATTCAAACAAGAGAGGAGG	+9322
IVS6 <i>sense</i>	GTGGAATTCCTTGGGCCTAAATCTATTTTTTCC	+9589
IVS6 <i>antisense</i>	GTGGGATCCCAGAGTAGCTGGGACCACAG	+10346
IVS4+919 <i>sense</i>	GTGGAATTCCTGTCCCTCAACACTGCAAG	+7880
IVS4+919 <i>antisense</i>	GTGGGATCCGAAATAATTCAAACAAGAGAGGAGG	+9322
SD6 <i>sense</i>	TCTGAGTCACCTGGACAACC	pSPL3
SA2 <i>antisense</i>	ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC	pSPL3

### 3.1.12 Generierung serieller Promotordeletionskonstrukte

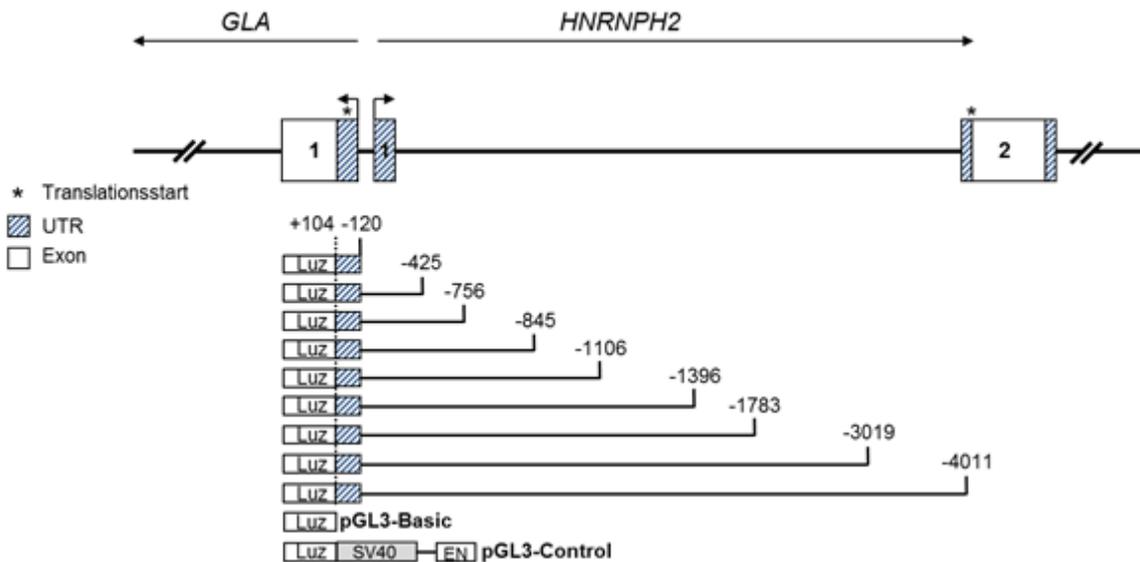
Die Untersuchung transkriptionell aktiver Bereiche in der 5´-flankierenden Region wurde mit Hilfe des pGL3-Vektorsystems der Firma Promega durchgeführt (Abbildung 7). Das Vektorsystem besteht zum einen aus dem promotorlosen Vektor pGL3-Basic und zum anderen aus dem pGL3-Control. Beiden Vektoren gemein ist das *Firefly* (*Photinus pyralis*) Luciferase-Reportergen, welches durch zwei Poly(A)-sites flankiert wird. Die Poly(A)-sites

stellen sicher, dass die Expression des Luziferasegens ausschließlich durch den vorgeschalteten Promotor reguliert wird. Der pGL3-Control Vektor besitzt neben dem Simian Virus 40 (SV40)-Promotor einen SV40 *Enhancer*, womit eine konstitutiv hohe Expression des Reportergens sichergestellt ist und diente als Kontrolle der Transfektionseffizienz. Im Gegensatz dazu besitzt der pGL3-Basic keinen *Enhancer* und keinen Promotor. Die Expression des Reportergens ist daher nur von den eingebrachten Promotorfragmenten abhängig, welche über die MCS in den pGL3-Vektor eingebracht werden.



**Abbildung 7: Aufbau des pGL3-Vektorsystems.** Das eingesetzte pGL3-Vektorsystem besteht aus den beiden Plasmiden pGL3-Basic und pGL3-Control. Beide Vektoren weisen das Firefly (*Photinus pyralis*) Luziferase-Reportergen (gelber Kasten) auf, welches von einem synthetischen Poly(A)-Signal sowie einem SV40 *late* Poly(A)-Signal umgeben ist. Im Gegensatz zu dem promotorlosen pGL3-Basic besitzt der pGL3-Control einen SV40-Promotor und -*Enhancer*, die eine starke Expression des Reportergens sicherstellen.

Als *Template* für die Erstellung der seriellen *GLA*-Promotordeletionskonstrukte diente genomische Patienten-DNA. Die Deletionskonstrukte der 5'-flankierenden *GLA*-Region wurden unter Verwendung eines *antisense* Primers an Position +104 sowie von unterschiedlichen *sense* Primern amplifiziert (Oligonukleotidsequenzen siehe Tabelle 7) und resultierten in seriellen 5'-verkürzten Konstrukten (Abbildung 8). Die *GLA* 5'-UTR-trunkierten Konstrukte wurden durch ein *antisense* Oligonukleotid an Position -120 generiert. Im Folgenden wurden die Amplikons in den Vektor pCR8/GW/TOPO (Life technologies) eingebracht. Die Gateway-Technologie beruht auf der Eigenschaft der zielgerichteten Rekombination des Bakteriophagen  $\lambda$  (Landy 1989). Die Rekombination findet an spezifischen Sequenzabschnitten von Bakterium (*attB-site*) und Bakteriophage (*attP-site*) statt.



**Abbildung 8: Schematische Übersicht der seriellen *GLA*-Promotordeletionskonstrukte.** Dargestellt sind die Positionen und Größen der generierten *GLA*-Promotordeletionskonstrukte. Die gekennzeichneten Positionen sind relativ zum Translationsstart ATG in dem das A als Position +1 bezeichnet wird. *GLA*: *alpha-Galaktosidase A*; *HNRNPH2*: *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2*; UTR: untranslatierte Region; Luz: *Luziferase*-Gen; EN: *Enhancer*.

Die mittels Gelextraktion aufgereinigten PCR-Fragmente wurden zunächst in den Vektor pCR8/GW/TOPO eingebracht, in welchem sie von *attL-sites* flankiert wurden. Nach Transformation der Vektoren in chemisch kompetente *E. coli* erfolgte die Plasmid-Isolation (Abschnitt 3.1.1.4). Der modifizierte Zielvektor pGL3-Basic verfügte über künstliche *attR-sites*, über die eine Rekombination mit dem generierten pCR8/GW/TOPO möglich war. Dazu wurden Gateway-Vektor und Zielvektor zusammen mit dem LR *Clonase* Enzym inkubiert, was zum Austausch der Gateway-Kassette gegen das *GLA*-Promotor-Fragment führte. Mittels Sequenz-spezifischen Restriktionsendonukleasen wurde die Orientierung des *Inserts* überprüft. Die Sequenzintegrität wurde routinemäßig durch Sequenzierung der generierten Vektoren kontrolliert. Zu analysierende genetische Varianten wurden mittels zielgerichteter Mutagenese (Abschnitt 3.1.5.5) in die Konstrukte eingebracht. Kotransfektionen serieller Promotordeletionskonstrukte und Transkriptionsfaktoren wurden in einem Verhältnis von 3 (Transkriptionsfaktor) zu 1 (Deletionskonstrukt) durchgeführt.

### **Standard pCR8/GW/TOPO-Reaktionsansatz**

Salzlösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl <sub>2</sub> )	1 µl
pCR8/GW/TOPO-Vektor [10 ng/µL]	1 µl
Insert	4 µl

Inkubation für 5 min bei RT und anschließende Transformation in chemisch kompetente *E. coli*.

**LR Clonase-Reaktion**

modifizierter pGL3-Basic	100 ng
pCR8/GW/TOPO-Vektor mit GLA-Insert	150 ng
LR-Clonase	2 µl
TE-Puffer	ad 8 µl

Inkubation für 1 h bei 25°C

Zugabe von 1 µl Proteinase K und Inkubation bei 37°C für 10 min

Transformation in chemisch kompetente *E. coli*

**Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide für serielle GLA-Promotordeletionskonstrukte.** Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die Translationsstartstelle. *Accession*-Nummer GLA: 4296

Bezeichnung	Sequenz 5´-3´	Position
GLA -4011	CTACTGTCATGGAAAAATGCTCG	-4011
GLA -3019	GACTAATCTGCCCAGGGATC	-3019
GLA -1783	GGTGAAGTGGGCTTTTCGC	-1783
GLA -1396	GATTTAACAAACATTTACTGATTGCC	-1396
GLA -1106	GTGGGAACCAGGACTCTTTG	-1106
GLA -756	GATAGACCAGCACTCAGACC	-756
GLA -425	CACACCAACCTCTAACGATAC	-425
GLA -110	GTTGCCAGAGAAACAATAACGTC	-110
GLA +104	CCATTGTCCAGTGCTCTAGC	+104
GLA -120	GCAACTGGGACGGTTATCC	-120

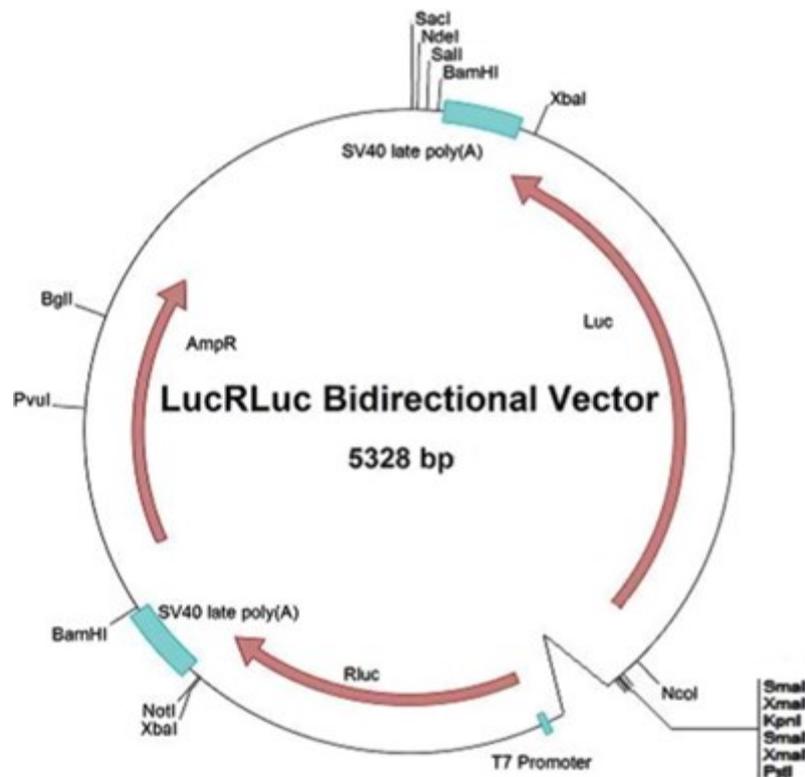
**3.1.13 Reporteragenassay**

Transient transfizierte Zellen wurden nach Entfernen des Mediums und Zugabe von 100 µl 1x Passiv Lysepuffer (Promega) für 20 min bei RT lysiert. Je 20 µl des Lysats wurden mit 75 µl *Luciferase Assay Substrate* versetzt und die Luziferase-Aktivität im Luminometer (Sirius, Berthold Detection System) bestimmt.

**3.1.13.1 Bidirektionaler Reporteragenassay**

Der bidirektionale Vektor pLucRLuc (Polson et al., 2011; Abbildung 9) verfügt über die zwei divergent angeordneten Reportergene *Firefly*-Luziferase (*Photinus pyralis*) sowie *Renilla*-Luziferase (*Renilla reniformis*) und ermöglicht so die Analyse von bidirektionalen Promotoren. Das Promotordeletionskonstrukt -425/+104 wurde über die in den Oligonukleotiden eingebrachte Restriktionsschnittstelle *KpnI* in die MCS des Vektors kloniert. Orientierung und Sequenzintegrität wurden mittels Sequenzierung überprüft. Der generierte Vektor pSPL3 -425/+104 sowie die Positiv-Kontrollen pRL-CMV (*Renilla*-Luziferase Kontrolle; Promega) und pGL3-Control (*Firefly*-Luziferase Kontrolle; Promega) wurden transient für 24 h in EA.hy926- sowie SH-SY5Y-Zellen transfiziert. Nach Entfernung des Mediums erfolgte die Zugabe von 100 µl 1x Passiv Lysepuffer (Promega) und eine

20-minütige Inkubation bei RT. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Reporterogenaktivität nach Angaben des Herstellers im Luminometer (Sirius, Berthold Detection System).



**Abbildung 9: Der bidirektionale Reportergenvektor pLucRLuc.** Der Vektor pLucRLuc verfügt im Gegensatz zum pGL-3-Vektorsystem neben dem Firefly Luziferase- (*Photinus pyralis*) Reportergen auch über ein Renilla Luziferase- (*Renilla reniformis*) Reportergen. Der Vektor wurde speziell für die Untersuchung bidirektionaler Promotoren hergestellt. Über die Schnittstelle *KpnI* wurde das Konstrukt -425/+104 in den Vektor eingebracht, so dass die Transkriptionsaktivität in *GLA*-Orientierung durch die Luziferaseaktivität wiedergegeben wurde und in *HNRNPH2*-Orientierung durch Renillaaktivität. Der Vektor wurde freundlicherweise von Prof. David Reisman, Department of Biological Sciences, University of South Carolina, Columbia, SC, United States zur Verfügung gestellt (Abbildung übernommen aus Polson et al., 2011).

## 3.2 Protein-biochemische Methoden

### 3.2.1 Isolierung von Kernproteinen

Die Isolation von Kernproteinen wurde leicht modifiziert nach der Methode von Schreiber et al. (Schreiber et al., 1986) durchgeführt. Dafür wurden etwa  $1 \times 10^7$  Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 500  $\mu$ l Lysepuffer A aufgenommen. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 25  $\mu$ l einer 10%-igen (v/v) NP-40-Lösung (Sigma-Aldrich). Die Sedimentation der intakten Zellkerne erfolgte durch eine 5-minütige Zentrifugation (5000x g; 4°C). Der Überstand und die darin enthaltenden

zytosolischen Proteine wurden in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde in 100 µl Lysepuffer B resuspendiert und während der 3-stündigen Inkubation auf Eis mehrmals gemischt. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation (14000x g; 4°C) wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für weitere 30 min zentrifugiert (14000x g; 4°C). Der Überstand mit den enthaltenden Kernproteinen wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **Lysepuffer A**

1 mM DTT  
10 mM KCl  
10 mM HEPES, pH7,9  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
Protease-Inhibitor

#### **Lysepuffer B**

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM DTT  
420 mM NaCl  
0,5 mM PMSF  
25% (v/v) Glycerol  
0,2 mM EDTA  
20 mM HEPES; pH 7,9  
Protease-Inhibitor

### **3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde nach Herstellerangaben photometrisch mittels Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) bestimmt. Für die Standardreihe wurden BSA-Verdünnungen (*bovine serum albumine*, Rinderserumalbumin) mit bekannten Konzentrationen verwendet. Zehn µl der Proteinprobe bzw. des Standards wurden mit 1 ml der BCA-Reagenz (Reagenz A:B 50:1) versetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert bevor die photometrische Bestimmung bei 562 nm erfolgte.

### **3.2.3 Western-Blot (Tank-Blot)**

Nach Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe auf nativen Polyacrylamidgelen wurden diese auf PVDF-Membranen (Millipore) transferiert. Dazu wurde die PVDF-Membran zunächst mit Methanol aktiviert und in 0,5x TBE-Puffer äquilibriert. Für den Aufbau der Blotting-Kassette wurde das Gel auf zwei Lagen Whatmanpapier gelegt, gefolgt von der Membran und zwei weiteren Lagen Whatmanpapier. Dieser Aufbau wurde anschließend zwischen zwei Schwämmen in die Blotting-Kassette gespannt, welche vertikal in die mit 0,5x TBE-Puffer befüllte Blotting-Kammer eingespannt wurde. Der Transfer der Komplexe auf die PVDF-Membran erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 1 h.

### 3.3. Zellbiologische und mikrobiologische Methoden

#### 3.3.1 Prokaryotische Zellen

##### 3.3.1.1 Kulturbedingungen

*E. coli* Kulturen wurden entweder in flüssigem LB-Medium kultiviert oder auf festen LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur spezifischen Selektion transformierter Bakterien wurden entsprechende Antibiotika zugesetzt.

##### LB-Medium:

10 g NaCl  
10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,4

##### LB-Agar:

10 g NaCl  
10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
15 g Bacto-Agar  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,4

LB-Medium und LB-Agar wurden bei 121°C und 2 bar für 20 min autoklaviert. Die entsprechenden Antibiotika wurden nach Abkühlen auf 50°C in einer Konzentration von 100 µg/ml zugefügt.

##### 3.3.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* für die Transformation wurde nach einem modifizierten Protokoll von Hanahan (Hanahan 1983) durchgeführt. Am Abend zuvor wurden dafür 5 ml LB-Medium mit einer *E. coli*-Kultur angeimpft und bei 37°C auf dem Bakterenschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden 200 ml LB-Medium mit der über Nacht-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Isolation der Zellen (4000x g; 4°C; 15 min) und die Aufnahme des Pellets in 10 ml MnCl<sub>2</sub>-Puffer. Im Anschluss an eine 10-minütige Inkubation auf Eis wurden die Zellen isoliert (3000x g; 4°C; 10 min) und das Pellet in 7,4 ml MnCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert. Unter vorsichtigem Schwenken erfolgte die tropfenweise Zugabe von 560 µl DMSO. Jeweils 100 µl der *E. coli*-Suspension wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

##### MnCl<sub>2</sub>-Puffer

10 mM HEPES, pH 6,8  
15 mM CaCl<sub>2</sub>  
20 mM KCl  
55 mM MnCl<sub>2</sub>

### 3.3.1.3 Transformation kompetenter *E. coli*

Für die Transformation wurden 10 µl eines Ligationsansatzes oder 50 ng Plasmid-DNA zu den noch gefrorenen Aliquots (100 µl) chemisch kompetenter *E. coli* gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock für 30 s bei 42°C und eine Inkubation für 1 min auf Eis. Die Bakterien wurden nach Zugabe von 1 ml vorgewärmten LB-Medium für 30 min bei 37°C inkubiert und schließlich bei 4000 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet im verbleibenden Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.3.2 Eukaryotische Zellen

#### 3.3.2.1 Kulturbedingungen

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK 293-T und die humane vaskuläre endotheliale Zelllinie EA.hy926 wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; PAA) mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS; PAA), 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM/ml L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin (alle Life Technologies) kultiviert. Für die Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y wurden 20% FCS verwendet.

Die humane monozytäre Zelllinie THP-1 wurde in RPMI 1640 unter Zugabe von 10 % (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM/ml L-Glutamin und 1x MEM Aminosäurelösung (Sigma-Aldrich) kultiviert. Die Konzentration der THP-1-Zellen betrug dabei 0,5 bis  $1 \times 10^6$ /ml.

Immortalisierte humane Nierenepithelzellen (IHKE) wurden in DMEM/Ham's F12-Medium (PAA) mit 1% FCS; 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM/ml L-Glutamin, 10 ml/l Insulin-Transferrin-Sodium Selenium (Fisher Scientific), 1,25 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 55 mg/l Natriumpyruvat, 10 µg/l *epidermal growth factor* (alle Sigma-Aldrich) und 15 mmol/l HEPES (Roth) kultiviert. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C in einer Wasserdampf-gesättigten 5%-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

#### 3.3.2.2 Lagerung

Die Zellen wurden für die Langzeitlagerung zunächst mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Nach Zugabe von Medium wurden die Zellen abzentrifugiert und in FCS mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert. Die in Kryoröhrchen überführten Zellen wurden in einem *Freezing-Container* (Thermo Scientific) bei -80°C eingefroren und dadurch um -1°C pro min runtergekühlt. Für die Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen am darauffolgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden durch ein

schnelles Erwärmen auf 37°C aufgetaut und in vorgewärmtes Medium überführt. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel zur Entfernung des DMSO.

### 3.3.2.3 Transiente Transfektion

Die Plasmid-DNA wurde in HEK 293-T-, IHKE-, EA.hy926-, THP-1- und SH-SY5Y-Zellen mittels Nanofectin (PAA) und jetPEI (HiSS Diagnostics) transient transfiziert. Dafür wurden  $1 \times 10^5$ /ml HEK 293-T-Zellen,  $2 \times 10^5$ /ml EA.hy926-, SH-SY5Y, IHKE-Zellen und  $1 \times 10^6$ /ml THP-1-Zellen in 500  $\mu$ l Medium pro Loch einer 24-Loch-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Vor der Transfektion am nächsten Tag erfolgte zunächst ein Mediumwechsel. Pro Loch wurden 3,2  $\mu$ l Nanofection bzw. 2  $\mu$ l jetPEI und 1  $\mu$ g DNA in jeweils 50  $\mu$ l Nanofectin-Salzlösung bzw. 150 mM jetPEI-NaCl-Lösung gegeben. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei RT wurde der Transfektions-Ansatz tröpfchenweise zur DNA-Lösung gegeben und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Der 100  $\mu$ l Transfektionsansatz wurde tröpfchenweise, unter Schütteln der 24 Loch-Platte, zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 4 h im Brutschrank erfolgte im Falle von HEK 293-T-, IHKE-, SH-SY5Y- und EA.hy926-Zellen ein Mediumwechsel zum Entfernen der Transfektionsreagenz. Die Zellen wurden 24 h post-Transfektion für weitere Analysen isoliert. Die DNA-Konzentration und das Transfektionsreagenz-Volumen wurden für weitere Zellkultur-Formate entsprechend den Herstellerangaben angepasst.

## 3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 5.03; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Signifikanzen wurden mittels ungepaarten zweiseitigen *Student's* t-Test berechnet (Konfidenzintervall 95%). Das Signifikanzniveau wurde festlegt auf: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

## 3.5 Studienpopulationen

Die Verteilung genetischer *GLA*-Varianten wurde zum einen in dem Patientenkollektiv der *Münster Molecular Functional Profiling for Mechanism* (MolProMD; Dördelmann et al., 2008) Studie untersucht und zum anderen in dem Patientenkollektiv des interdisziplinären Fabryzentrums des Universitätsklinikums Münster (IFAZ). In der MolProMD-Studie wurden Patienten erfasst, die unter kardiovaskulären Erkrankungen leiden. Beide Studien wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster genehmigt und eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Studienteilnehmern eingeholt.

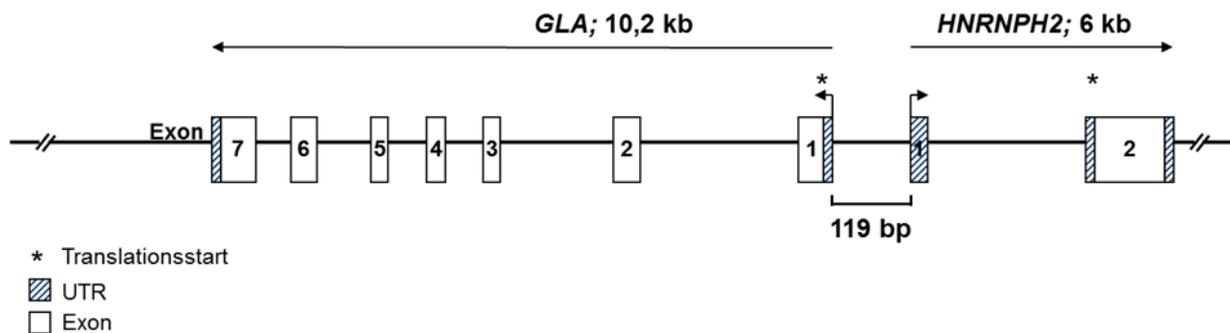
### **3.6 *In silico* Analysen zur Vorhersage putativer TFBS**

Die Analyse putativer TFBS erfolgte *in silico* mit Hilfe der Programme PROMO ([http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo\\_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF\\_8.3](http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3); Messeguer et al., 2002) und AliBaba2.1 (<http://www.gene-regulation.com>; Grabe 2002) unter Standardeinstellungen. Beide Programme verwenden dafür Daten über Bindestellen aus der eukaryotischen *TRANSFAC*-Datenbank.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Genomischer Aufbau der *alpha-Galaktosidase A* und Lokalisation der Transkriptionsstartstelle

Die *alpha-Galaktosidase A* (*GLA*) ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq22) lokalisiert. Das *GLA*-Gen wird von 7 Exons kodiert, die durch 6 Introns getrennt sind. Der genomische Bereich erstreckt sich über eine Gesamtlänge von 10,2 kb und ist auf dem (-) Strang kodiert. Die untranslatierten 5'- und 3'- Regionen besitzen eine Größe von 110 bp bzw. 18 bp (*GLA*; NM\_000169). Eine Besonderheit des Genlocus ist die Lage zum *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H')* (*HNRNPH2*; NM\_001032393), das auf dem (+) Strang codiert ist und *head-to-head* zur *GLA* lokalisiert vorliegt. Der Abstand zwischen den Transkriptionsstartstellen (TSS) beider Gene beträgt lediglich 119 bp (*HNRNPH2*; Abbildung 10).



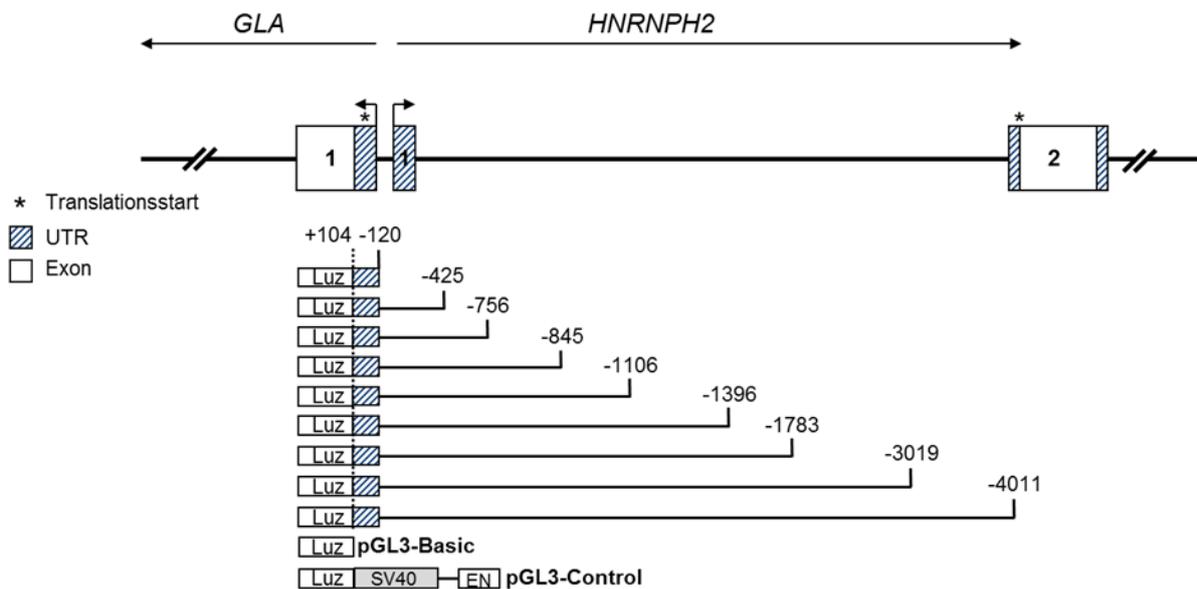
**Abbildung 10: Genomischer Aufbau der *alpha-Galaktosidase A*.** Die *alpha-Galaktosidase A* wird durch den (-) Strang des Chromosoms Xq22 kodiert und umfasst einen genomischen Bereich von 10200 bp. Ein 119 bp großer Bereich trennt das Gen vom benachbarten *HNRNPH2*, welches durch den (+) Strang kodiert wird. UTR: untranslatierte Region.

Die annotierte TSS wurde mittels RLM-RACE in IHKE-Zellen überprüft. Diese Methode bietet im Vergleich zur 5'-RACE den Vorteil, dass nur vollständig prozessierte mRNAs analysiert werden. Dabei konnte die bei NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) angegebene *GLA*-TSS (NM\_000169) bestätigt werden (ohne Abbildung).

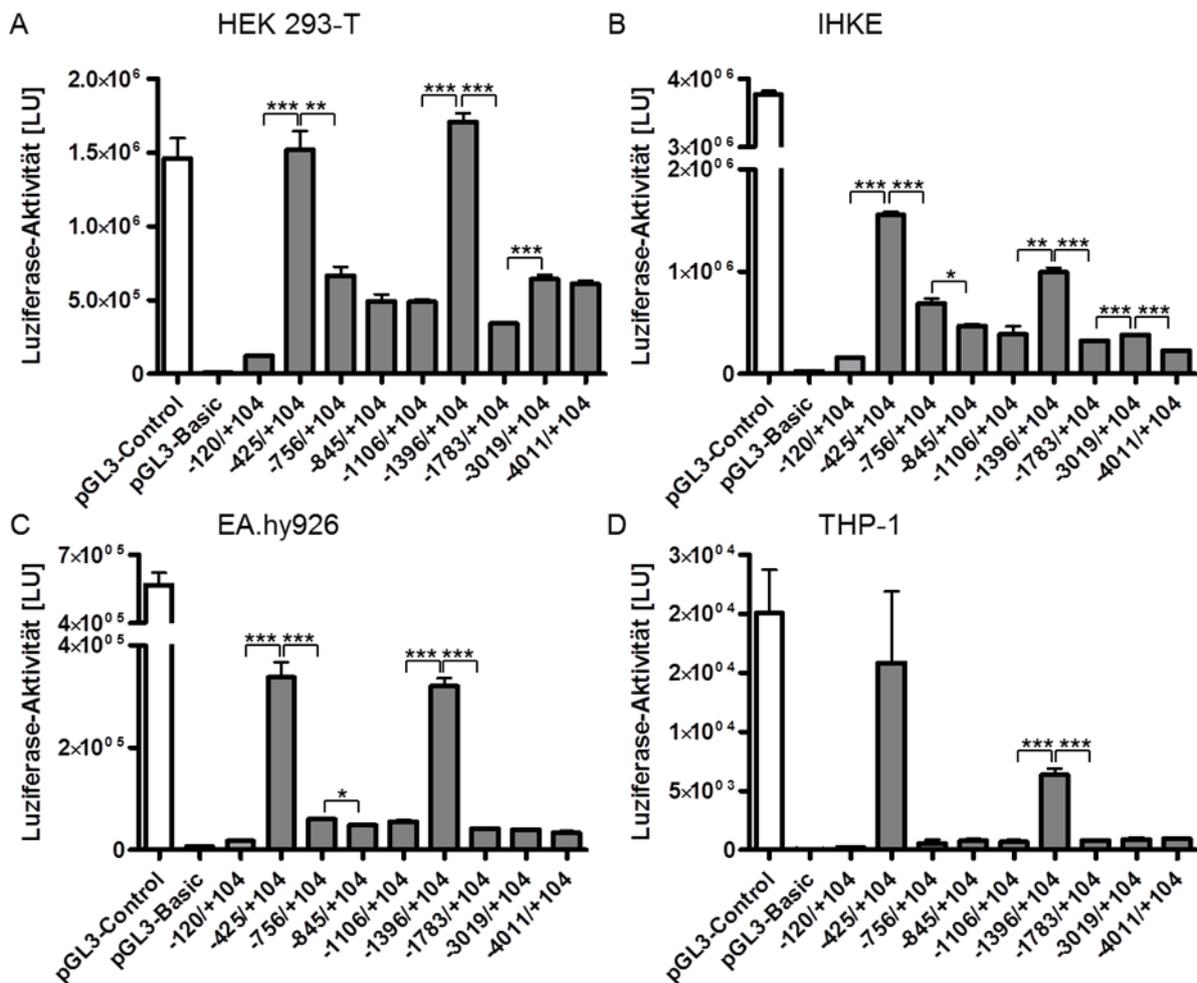
### 4.2 Identifizierung transkriptionell aktiver Regionen im 5'-flankierenden Bereich der *GLA*

Zur Identifizierung transkriptionell aktiver Bereiche in der 5'-flankierenden *GLA*-Region wurden serielle Promotordeletionskonstrukte erstellt (siehe 3.1.12). Ausgehend vom Translationsstart ATG, in dem die Position +1 das A bezeichnet, wurden die Konstrukte

entsprechend ihres 5'-Endes benannt. Das längste Konstrukt -4011/+104 beinhaltet demnach 4011 bp des vom ATG stromaufwärts gelegenen Bereichs. Ausgehend von diesem Konstrukt wurden 5'-Trunkierungen der 5'-flankierenden Region erstellt, die entsprechend ihrer Länge bezeichnet wurden. Die 110 bp große 5'-UTR der *GLA* ist in allen Konstrukten enthalten und liegt im Konstrukt -120/+104 isoliert vor (Abbildung 11). Die seriellen *GLA*-Promotordeletionskonstrukte wurden zur Analyse der transkriptionellen Aktivitäten transient in die humanen Zelllinien HEK 293-T (embryonale Nierenzellen), IHKE (proximale Tubuluszellen), EA.hy926 (endotheliale Zellen) sowie THP-1 (monozytäre Zellen) transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Reportergens (Abbildung 12).



**Abbildung 11: Schematische Darstellung serieller *GLA*-Deletionskonstrukte.** Ausgehend vom Translationsstart ATG, in dem A als Position +1 bezeichnet wird, wurden serielle Deletionskonstrukte im pGL3-Basic Vektor erstellt. Das längste Konstrukt beinhaltet 4011 bp der 5'-flankierenden Region. Ausgehend von diesem Konstrukt entstanden die kürzeren Konstrukte durch 5'-Trunkierungen. Die entsprechenden Längen der Konstrukte und ihr Bezug zum genomischen Kontext sind angegeben. Der Vektor pGL3-Control verfügte über einen starken SV40-Promotor und ermöglichte die Kontrolle der Transfektionseffizienz. Der promotorlose pGL3-Basic Vektor diente als Leervektorkontrolle. Luz: Luziferase; UTR: untranslatierte Region; EN: *Enhancer*; SV40: Simian-Virus 40.



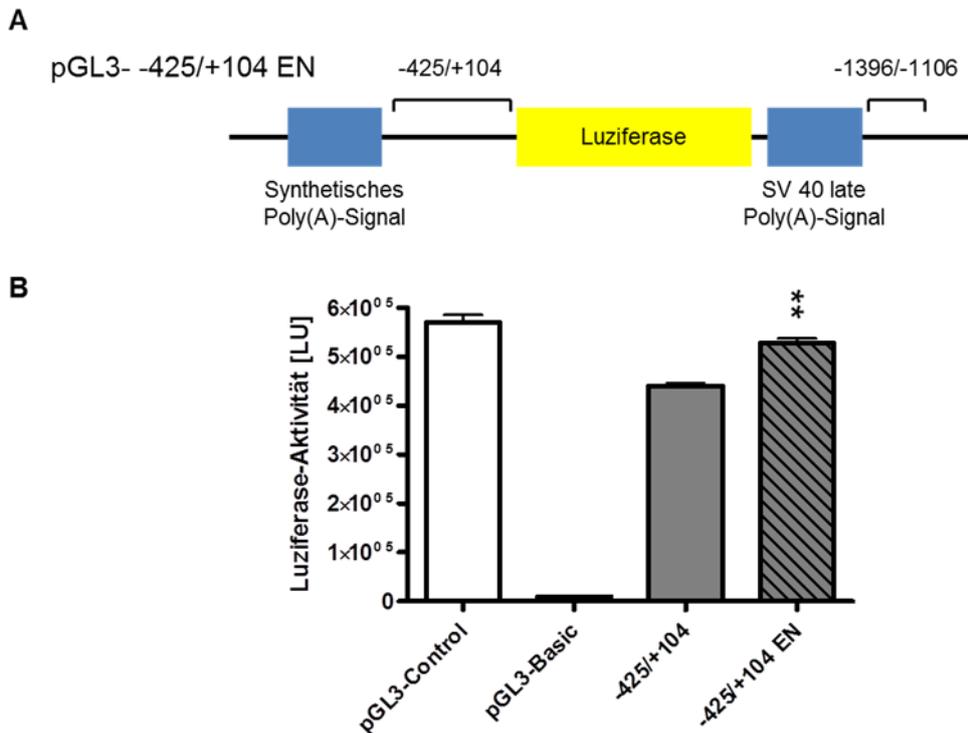
**Abbildung 12: Transkriptionsaktivitäten der seriellen *GLA*-Promotordeletionskonstrukte.** Die seriellen *GLA*-Promotordeletionskonstrukte wurden transient für 24 h in die humanen Zelllinien **(A)** HEK 293-T (embryonale Nierenzellen), **(B)** IHKE (proximale Tubuluszellen), **(C)** EA.hy926 (endotheliale Zellen) sowie **(D)** THP-1 (monozytäre Zellen) transfiziert und die enzymatische Aktivität des Reportergens bestimmt. Eine starke Transkriptionsaktivität konnte in allen untersuchten Zelllinien für das proximale Konstrukt -425/+104 beobachtet werden. In den Konstrukten -756/+104, -845/+104 und -1106/+104 nahm die Aktivität ab bevor sie im distalen Konstrukt -1396/+104 erneut signifikant anstieg. In den darauffolgenden, längeren Konstrukten -1783/104, -3019/+104 und -4011/+104 brach die Transkriptionsaktivität erneut ein. Der Vektor pGL3-Control verfügte über einen starken SV40-Promotor und ermöglichte die Kontrolle der Transfektionseffizienz (weißer Balken). Der promotorlose pGL3-Basic Vektor diente als Leervektorkontrolle (schwarzer Balken). Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Luziferase-Aktivität wurde in *light units* [LU] gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

In den untersuchten Zelllinien zeigten sowohl eine proximale Region zwischen -425 und

-120, als auch eine Region zwischen -1396 und -1106 im Vergleich zu den anderen Bereichen erhöhte Transkriptionsaktivitäten. Die dazwischen liegenden Bereiche zeigten im Vergleich dazu eine deutlich erniedrigte Transkriptionsaktivität. Gleiches gilt für die größeren Konstrukte -1783/+104, -3018/+104 und -4011/+104. Mit Ausnahme von HEK 293-T-Zellen wurde die stärkste Transkriptionsaktivität im proximalen Bereich zwischen -425 und -120 nachgewiesen, was auf die Position des basalen Promotors hinweist. Der Bereich zwischen -1396 und -1106 zeigte ebenfalls in allen Zelllinien eine deutlich erhöhte Transkriptionsaktivität, die durch distal gelegene Promotorregionen mit eventuellen *Enhancer*-Funktionen erklärt werden könnte. Das Konstrukt -120/+104, welches die *GLA* 5'-UTR ohne weitere 5'-flankierende Bereiche repräsentiert, zeigt in den Zelllinien keine bzw. nur eine geringe Transkriptionsaktivität.

### 4.2.1 Potentielle *Enhancer*-Funktion des distalen Promotorbereichs

Die Promotoren eukaryotischer Gene sind in mehrere Bereiche gegliedert. Neben einem Core-Promotor und einem proximalen Promotor verfügen die meisten Gene über *Enhancer*- bzw. Silencer-Regionen. Diese Regionen können mehrere 100 kb von der eigentlichen TSS entfernt liegen (Maston et al., 2006). Um zu überprüfen, ob der aktive distale Bereich zwischen -1396 und -1106 *Enhancer*-Funktionen aufweist, wurde dieser isolierte Bereich über die *Bam*HI/*Sall*-Restriktionsschnittstellen 3' zum SV40 Polyadenylierungssignal in das pGL3-Deletionskonstrukt -425/+104 inseriert. Das neu generierte Konstrukt -425/+104 EN sowie das ursprüngliche Konstrukt -425/+104 wurden transient in EA.hy926-Zellen transfiziert, um die mögliche Veränderung der Transkriptionsaktivität vergleichend zu bestimmen (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Der distale *GLA*-Promotorbereich übt *Enhancer*-Funktionen aus. (A)** Übersicht über das generierte Konstrukt -425/+104 EN zur Analyse einer möglichen *Enhancer*-Funktion des distalen Promotorbereichs zwischen -1396 und -1106. **(B)** Transiente Transfektion der Deletionskonstrukte in EA.hy926-Zellen. Durch Insertion des distalen Promotorbereichs zwischen -1396 und -1106 in das Konstrukt -425/+104 (schraffierter Balken) konnte die Transkriptionsaktivität im Vergleich zum ursprünglichen Konstrukt (weißer Balken) signifikant um den Faktor 1,2 erhöht werden. Dies spricht für eine *Enhancer*-Funktion des distalen Bereichs. Der Vektor pGL3-Control verfügte über einen starken SV40-Promotor und ermöglichte die Kontrolle der Transfektionseffizienz (weißer Balken). Der promotorlose pGL3-Basic Vektor diente als Leervektorkontrolle (schwarzer Balken). Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Luziferase-Aktivität wurde in *light units* [LU] gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts. \*\* $p < 0,01$ .

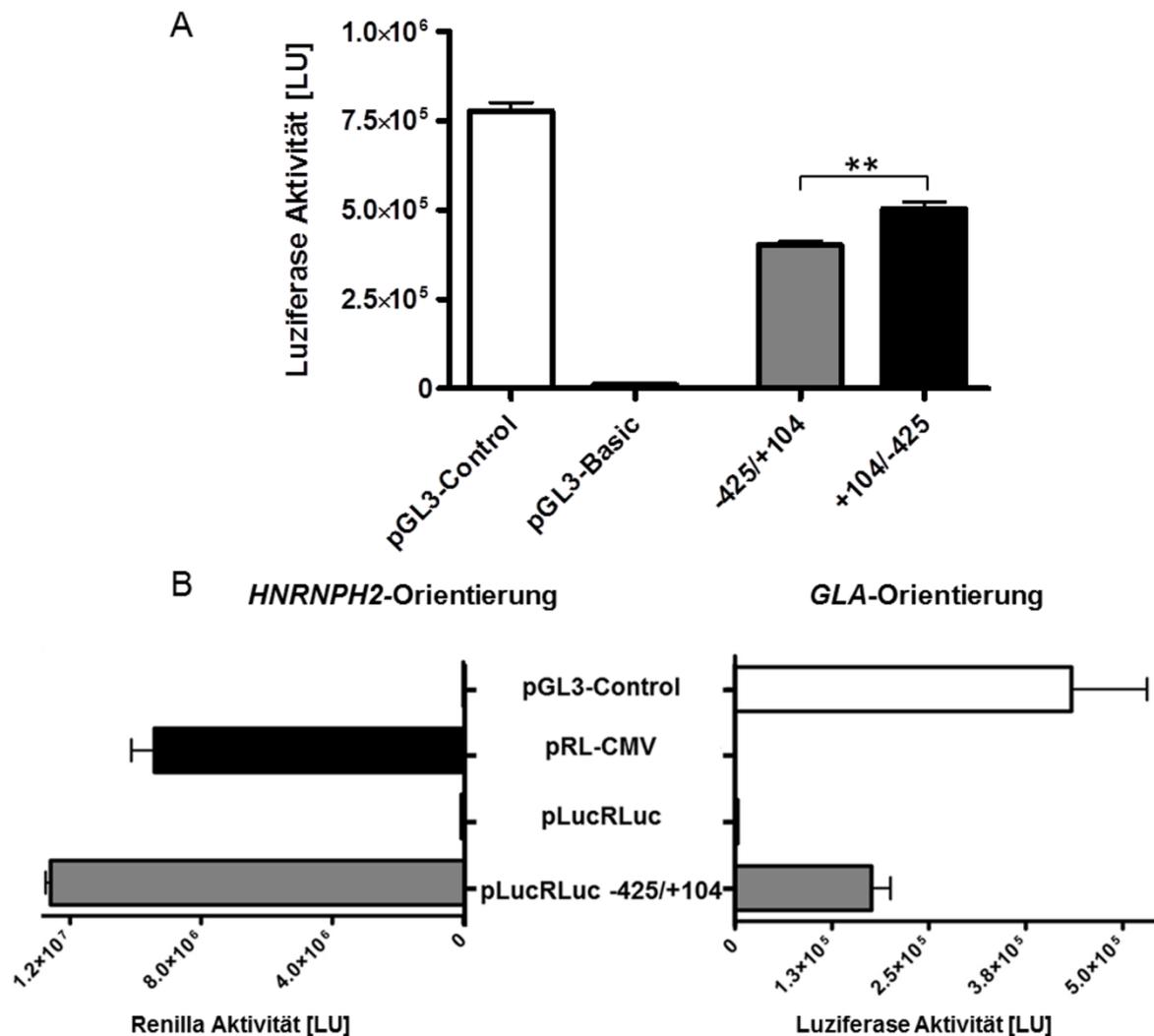
Die Insertion des distalen Promotorbereichs zwischen -1396 und -1106 in das Deletionskonstrukt -425/+104 erhöhte die Transkriptionsaktivität des ursprünglichen Konstrukts signifikant um den Faktor 1,2 ( $p < 0,01$ ). Der isolierte *Enhancer*-Bereich zwischen -1396 und -1106 im pGL3-Basic verfügte über keine eigenständige Transkriptionsaktivität (ohne Abbildung).

#### 4.2.2 Bidirektionale Regulation durch duale Promotorfunktion

Die *head-to-head* lokalisierten Gene *GLA* und *HNRNP2* wurden bereits als ein durch einen dualen Promotor reguliertes System beschrieben (Andrianaki et al., 2010). Die TSS beider Gene liegen lediglich 119 bp auseinander. Das Konstrukt -425/+104, welches die 119 bp

große Region beinhaltet, zeigte in den Reporterassays unter basalen Bedingungen eine hohe Transkriptionsaktivität. Um die mögliche bidirektionale Promotoraktivität zu untersuchen, wurde das Konstrukt in reverser Orientierung (+104/-425) in den pGL3-Basic Vektor eingebracht und die Transkriptionsaktivität in beide Orientierungen bestimmt (Abbildung 14 A).

Das Konstrukt -425/+104 weist sowohl in *GLA*- als auch in *HNRNPH2*-Orientierung eine ausreichend hohe Transkriptionsaktivität auf. Die Aktivität in *HNRNPH2*-Orientierung war im Vergleich zur *GLA*-Orientierung signifikant höher und deutet auf eine höhere Promotoraktivität bzw. Expression in *HNRNPH2*-Orientierung hin. Die im Konstrukt -425/+104 enthaltene Region ist demnach in der Lage die duale Expression beider Gene zu steuern und als bidirektionaler Promotor zu fungieren. Da im Kontext des pGL3-Basic Vektors jeweils nur die Transkriptionsaktivität in eine Orientierung gemessen werden konnte, wurde zusätzlich der bidirektionale Vektor pLucRluc für die parallele Bestimmung der Transkriptionsaktivität genutzt (Abbildung 14 B).



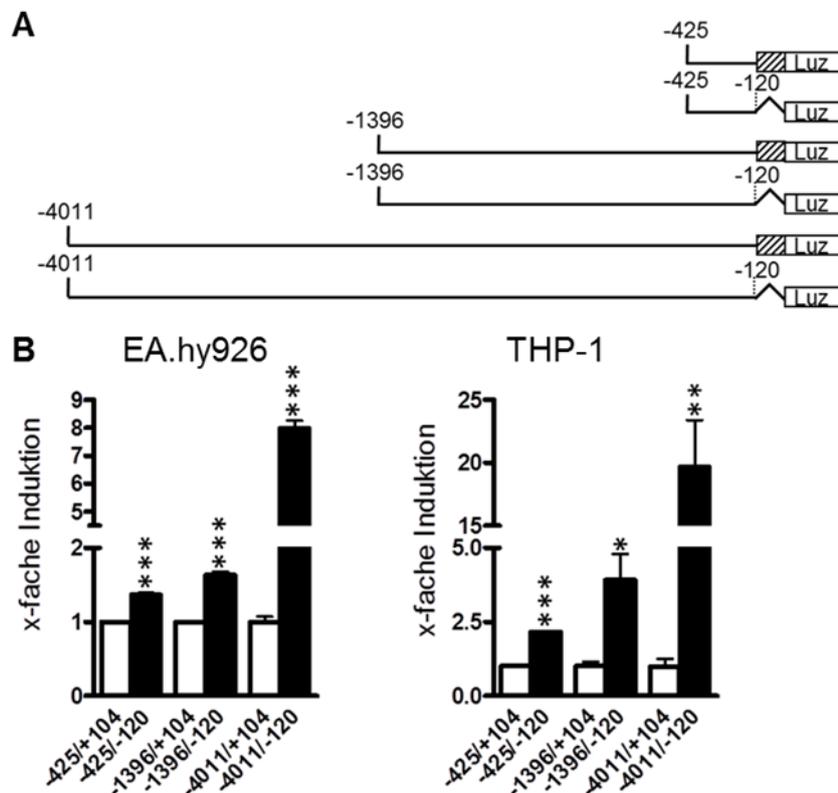
**Abbildung 14: Bidirektionale Transkriptionsaktivität des *GLA*-Promotors.** (A) Das Konstrukt -425/+104 zeigt in *GLA*-Orientierung eine hohe Transkriptionsaktivität (grauer Balken) in EA.hy926-Zellen. Die reverse Orientierung +104/-425 entspricht der *HNRNPH2*-Orientierung (schwarzer Balken) und zeigte ebenfalls eine hohe Transkriptionsaktivität, die im Vergleich zur *GLA*-Orientierung signifikant erhöht war. Neben den seriellen Deletionskonstrukten sind die Positiv-Kontrolle pGL3-Control und die Negativ-Kontrolle pGL3-Basic aufgeführt. (B) Im Kontext des bidirektionalen Vektors konnten Transkriptionsaktivitäten in Orientierung beider Reportergene bestimmt werden. Das Konstrukt -425/+104, welches den 119 bp großen Bereich umfasst, der beide Gene voneinander trennt, ist in der Lage die Expression beider Gene simultan zu steuern. Als Positiv-Kontrolle für die Transkriptionsaktivität beider Reportergene dienten die Vektoren pRL-CMV (Renilla, schwarzer Balken) und pGL3-Control (Luziferase, weißer Balken). Die Abbildungen sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Aktivität der Luziferase wurde in *light units* [LU] gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. \*\*p<0,01

Durch die Nutzung spezifischer Substrate für das jeweilige Reportergen konnte die simultane Transkriptionsaktivität in Orientierung beider Gene bestimmt werden. Die Transfektionen in EA.hy926-Zellen bestätigten die bereits im pGL3-Kontext beobachteten Ergebnisse

(Abbildung 14). Das Konstrukt -425/+104 war auch in diesem experimentellen Ansatz in der Lage die Expression beider Gene zu steuern. Als Positiv-Kontrollen dienten die Vektoren pGL3-Control (Luziferase Reporter) und pRL-CMV (Renilla Reporter).

### 4.3 Einfluss der 5'-UTR auf die *GLA*-Transkriptionsaktivität

Die auch als *Leader*-Sequenz bezeichnete 5'-UTR eines Gens kann neben der ribosomalen Bindungsstelle wichtige Erkennungssequenzen für mRNA-stabilisierende Proteine enthalten und bedeutende Funktionen bei der Initiation und Modifikation der Translation übernehmen (Pickering und Willis 2004). Um die regulatorischen Eigenschaften der *GLA* 5'-UTR zu analysieren, wurden die seriellen Promotordeletionskonstrukte 3'-trunkiert und im Reporterassay untersucht (Abbildung 15).

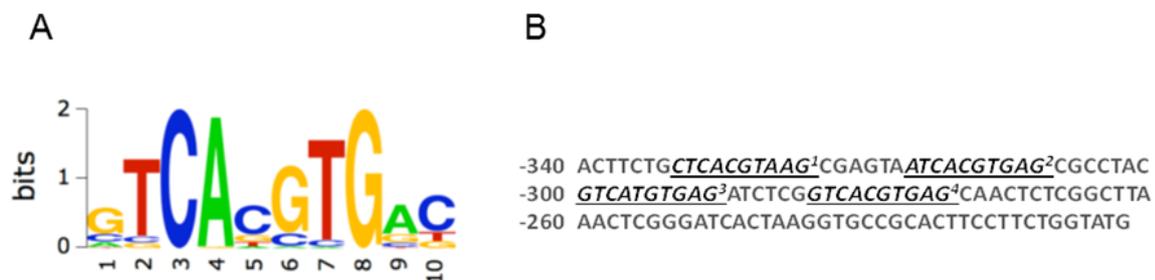


**Abbildung 15: Effekt der *GLA* 5'-UTR auf die Transkriptionsaktivität.** (A) Zur Untersuchung der regulatorischen Eigenschaft der *GLA* 5'-UTR wurden serielle Promotordeletionskonstrukte erstellt, in denen diese Region trunkiert wurde. (B) In EA.hy926- und THP-1-Zellen führte die Deletion (schwarzer Balken) im Vergleich zu Konstrukten mit 5'-UTR (weißer Balken) zu einer signifikant erhöhten Transkriptionsaktivität. Dieser Effekt verstärkte sich mit zunehmender Größe der Konstrukte und war für THP-1-Zellen deutlich stärker. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Die Deletion der 5'-UTR führte in allen untersuchten Konstrukten zu einer signifikanten Erhöhung der Transkriptionsaktivität ( $p < 0,05$ ). Für das Konstrukt -425/-120 erhöhte sich die Transkriptionsaktivität um den Faktor 1,4 und 2,2 in EA.hy926- bzw. THP-1-Zellen. Der größte Effekt konnte in dem Konstrukt -4011/-120 beobachtet werden, mit einem Anstieg der Transkriptionsaktivität um den Faktor 8 und 20 in EA.hy926- bzw. THP-1-Zellen. Mit zunehmender Länge der 5'-UTR-deletierten Konstrukte verstärkte sich in beiden Zelllinien auch der Effekt auf die Transkriptionsaktivität. In THP-1-Zellen war dieser Effekt generell stärker als in EA.hy926-Zellen.

#### 4.4 Beteiligung des Transkriptionsfaktors EB an der GLA-Regulation

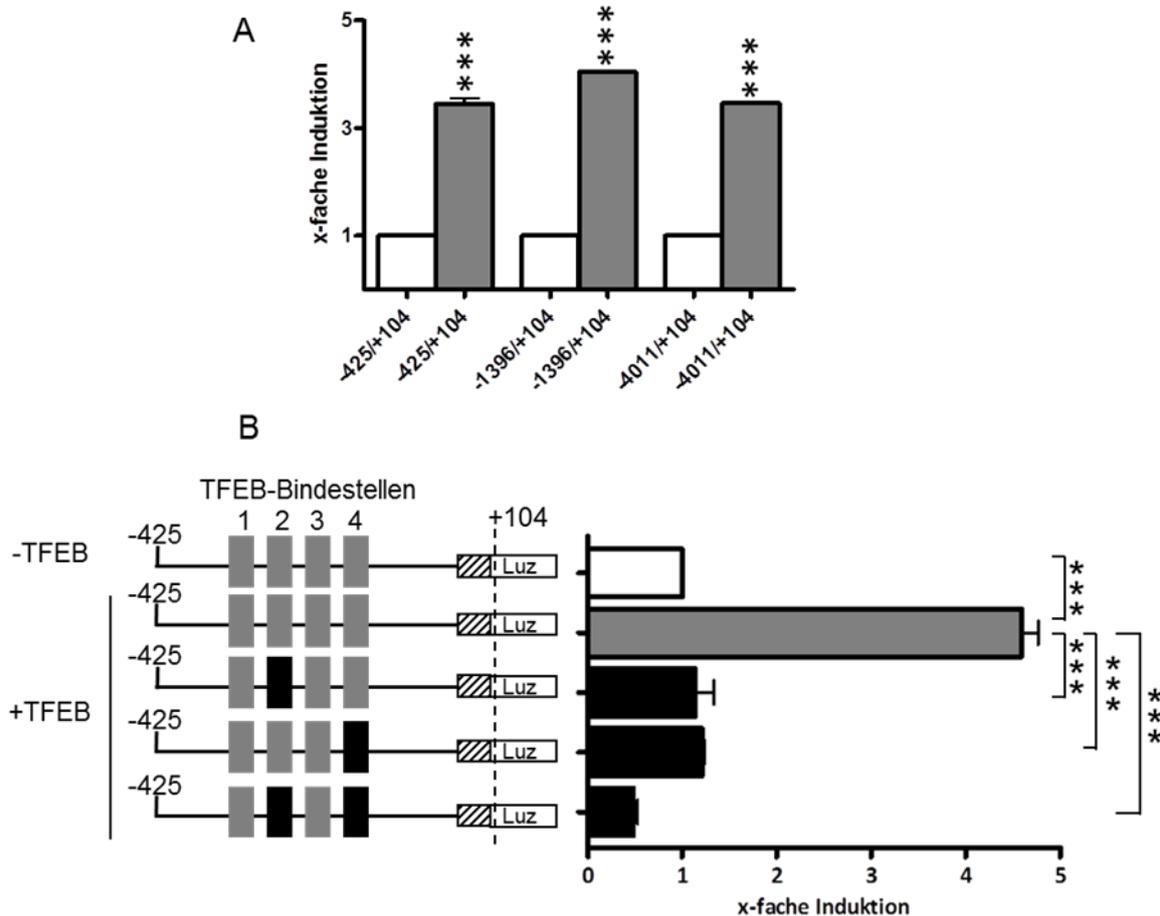
Der Transkriptionsfaktor EB (TFEB) gehört zur Familie der Mikrophthalmia-Transkriptionsfaktoren E (miT/TFE) und wurde als lysosomaler Regulator beschrieben (Sardiello et al., 2009). Es konnte bereits gezeigt werden, dass TFEB durch Bindung an die palindromische Erkennungssequenz 5'-GTCACGTGAC-3', die auch als *coordinated lysosomal expression and regulation element* (CLEAR) bezeichnet wird, im Promotor lysosomaler Gene für deren koordinierte Expression verantwortlich ist (Sardiello et al., 2009). Im *GLA*-Promotor befinden sich vier putative CLEAR-Sequenzen, die sich über einen 60 bp großen Bereich erstrecken, welcher 334 bp vom Translationsstart entfernt liegt. Die vier putativen Bindestellen weichen unterschiedlich stark von der bekannten Konsensussequenz ab (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Im *GLA*-Promotor lokalisierte TFEB-Bindestellen.** (A) Die TFEB-Konsensus-Bindestelle besteht aus einer 10 Nukleotid langen palindromischen Sequenz. Die relative Höhe der Nukleotide in der Abbildung entspricht ihrer Konservierung und spiegelt gleichermaßen die Bedeutung für die Bindung wider. Abbildung übernommen aus Sardiello et al., 2009. (B) In der *GLA* 5'-flankierenden Region befinden sich vier TFEB-Bindestellen die ca. 300 bp vom Translationsstart entfernt liegen. Die Bindestellen zwei und vier entsprechen dabei eher der in (A) dargestellten Konsensussequenz.

Um eine mögliche TFEB-Beteiligung an der *GLA*-Regulation zu überprüfen, wurden die seriellen Deletionskonstrukte -425/+104 und -1396/+104 sowie -4011/+104 in

EA.hy926-Zellen zusammen mit TFEB kotransfiziert. Bei allen Konstrukten konnte eine signifikante Erhöhung der Transkriptionsaktivität durch die zusätzliche TFEB-Expression beobachtet werden (-425/+104: ~3-fach; -1396/+104: ~4-fach; -4011/+104: ~3-fach;  $p < 0,001$ ; Abbildung 17 A).

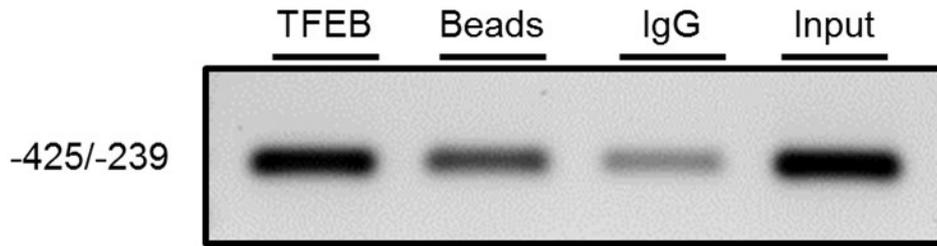


**Abbildung 17: Beteiligung des Transkriptionsfaktors EB an der GLA-Regulation. (A)** Die Überexpression des Transkriptionsfaktors EB (TFEB; grauer Balken) in EA.hy926-Zellen führte im Vergleich zur Leervektorkontrolle zu einer signifikanten Erhöhung der Transkriptionsaktivität (weiße Balken) in den untersuchten Konstrukten -425/+104, -1396/+104 und -4011/+104. **(B)** Die Kotransfektion des Konstrukts -425/+104 mit TFEB (grauer Balken) führte im Vergleich zur Leervektorkontrolle (weißer Balken) in EA.hy926-Zellen zu einem signifikanten 4,5-fachen Anstieg der Transkriptionsaktivität. Durch Mutagenese der Bindestelle zwei oder vier (schwarze Balken) fiel die Transkriptionsaktivität signifikant auf das basale Niveau der Leervektorkontrolle. Die kombinierte Mutagenese der Bindestellen zwei und vier führte zu einer noch deutlicheren Abnahme der Transkriptionsaktivität. Die Abbildungen sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. *Luz*: *Luziferase*.\*\*\* $p < 0,001$

Zur Bestätigung des aktivierenden TFEB-Effekts auf die *GLA*-Transkriptionsaktivität wurden die TFEB-Bindestellen zwei und vier, die am wenigsten von der Konsensussequenz abwichen, durch zielgerichtete Mutagenese verändert. Dies führte in den einzeln oder in Kombination mutierten Bindestellen zum Verlust des CLEAR-Bindemotivs (Abbildung 17 B). In der zehn Basenpaare umfassenden Erkennungssequenz wurden die Nukleotide CA an Position drei und vier sowie TG an Position sieben und acht in AG bzw. GT mutiert (Abbildung 17 B). Durch die Mutagenese der Bindestelle an Position zwei und gleichzeitiger TFEB-Überexpression wurde die vorher signifikant erhöhte Aktivität auf das basale Niveau der Leervektorkontrolle herabgesetzt. Gleiches konnte durch Mutagenese der Bindestelle an Position vier beobachtet werden. Die kombinierte Mutagenese beider Bindestellen führte zu einer noch stärkeren Abnahme der Transkriptionsaktivität unter das Niveau der basalen Transkriptionsaktivität. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse die Interaktion zwischen TFEB und dem *GLA*-Promotor und lassen auf eine mögliche TFEB-Beteiligung an der *GLA*-Regulation schließen.

### **4.4.1 Nachweis der endogenen TFEB-Bindung an *GLA*-Promotorbereiche durch Chromatin-Immunoprecipitation**

In den Reporterassays konnte gezeigt werden, dass die TFEB-Überexpression einen aktivierenden Effekt auf die Transkriptionsaktivität hat, und die Mutagenese der TFEB-Bindestellen diesen Effekt aufhebt. Die beobachteten Ergebnisse wurden im Anschluss durch den Nachweis einer möglichen direkten TFEB-Bindung an *GLA*-Promotorbereiche mittels ChIP-Experimenten in IHKE-Zellen überprüft. Zu diesem Zweck wurden mögliche Proteinbindungen an Chromatin fixiert und die DNA anschließend durch Sonifizierung fragmentiert. Anschließend erfolgte die Präzipitation mit einem spezifischen TFEB-Antikörper und entsprechenden Kontrollen. Der Nachweis einer TFEB-Bindung an *GLA*-Promotorbereiche erfolgte durch eine PCR mit spezifischen Primern, die eine 186 bp große Region (-425/-239) amplifizierten. Diese Region enthielt alle vier TFEB-Bindestellen. Als Kontrollen dienten das lediglich mit magnetischen Beads behandelte Chromatin sowie mit anti-Maus Immunoglobulin G- (IgG) Antikörper präzipitiertes Chromatin (Abbildung 18). Als Positiv-Kontrolle für die PCR-Bedingungen diente 1% des für die Immunoprecipitation eingesetzten Chromatins (Input).



**Abbildung 18: Nachweis der TFEB *in vivo*-Bindung an den GLA-Promotor mittels Chromatin-Immunopräzipitation.** Mittels ChIP-Analyse konnte eine TFEB *in vivo*-Bindung an den Bereich -425/-239 des GLA-Promotors in IHKE-Zellen nachgewiesen werden. Für Kontrollpräzipitationen wurden unbehandelte magnetische Beads und ein anti-Maus IgG-Antikörper verwendet. Der Input besteht aus extrahiertem Chromatin, welches als Positiv-Kontrolle diente. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

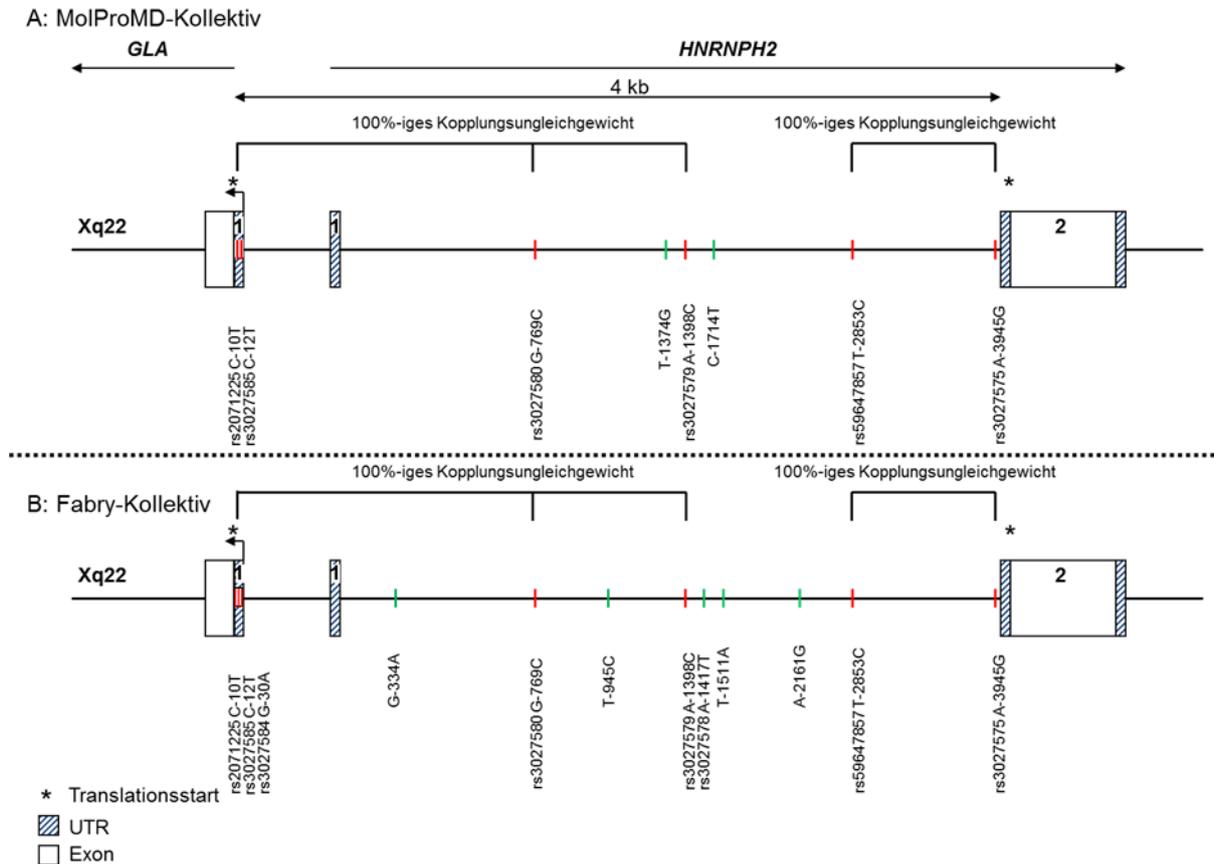
Durch ChIP-Analysen konnte eine *in vivo*-Bindung von endogenem TFEB an den Bereich -425/-239 des GLA-Promotors in IHKE-Zellen nachgewiesen werden. Das mit spezifischem TFEB-Antikörper präzipitierte Chromatin zeigte in der PCR ein deutlich stärkeres Signal als unter Kontrollbedingungen. Der Nachweis der TFEB-Bindung an die Region -425/-239 des GLA-Promotors bestätigt die Beteiligung an der Regulation.

#### 4.5 Identifizierung genetischer Varianten im GLA-Promotor

Für die Identifizierung genetischer Varianten wurden 4000 bp der GLA 5'-flankierenden Region bei zunächst 60 Patienten der *Münster Molecular Functional Profiling for Mechanism Detection* (MolProMD) -Studie mittels direkter Sequenzierung untersucht. Dabei wurden im 5'-flankierenden Bereich acht *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) detektiert, von denen sechs bereits beschrieben wurden (-10C>T [rs2071225]; -12C>T [rs3027585]; -769G>C [rs3027580]; -1398A>C [rs3027579]; -2853T>C [rs59647857]; -3945A>G [rs3027575]) und zwei SNPs neu identifiziert wurden (-1374T>G; -1714C>T; Abbildung 19 A). Die SNPs -10C>T, -769G>C und -1398A>C sowie -2853T>C und -3945A>G lagen in einem 100%-igen Kopplungsungleichgewicht vor, d.h. sie werden nur gemeinsam vererbt.

Um zu untersuchen, ob bei Patienten mit Morbus Fabry eine andere Verteilung genetischer Varianten vorliegt, wurde der GLA-Promotor zusätzlich bei 60 Patienten sequenziert. Im Fabry-Kollektiv wurden acht bereits annotierte SNPs detektiert (-10C>T [rs2071225]; -12C>T [rs3027585]; -30G>A [rs3027584]; -769G>C [rs3027580]; -1398A>C [rs3027579]; -1417A>T [rs3027578]; -2853T>C [rs59647857]; -3945A>G [rs3027575]) sowie vier noch unbeschriebene identifiziert (-334G>A; -945T>C; -1511T>A; -2161A>G; Abbildung 19 B). Interessanterweise traten die in einem 100%-igen Kopplungsungleichgewicht vorliegenden SNPs -10C>T, -769G>C und -1398A>C im Fabry-Kollektiv mit einer erhöhten Frequenz von 26% auf, während der Haplotyp im MolProMD-Kollektiv nur mit einer Häufigkeit von 7%

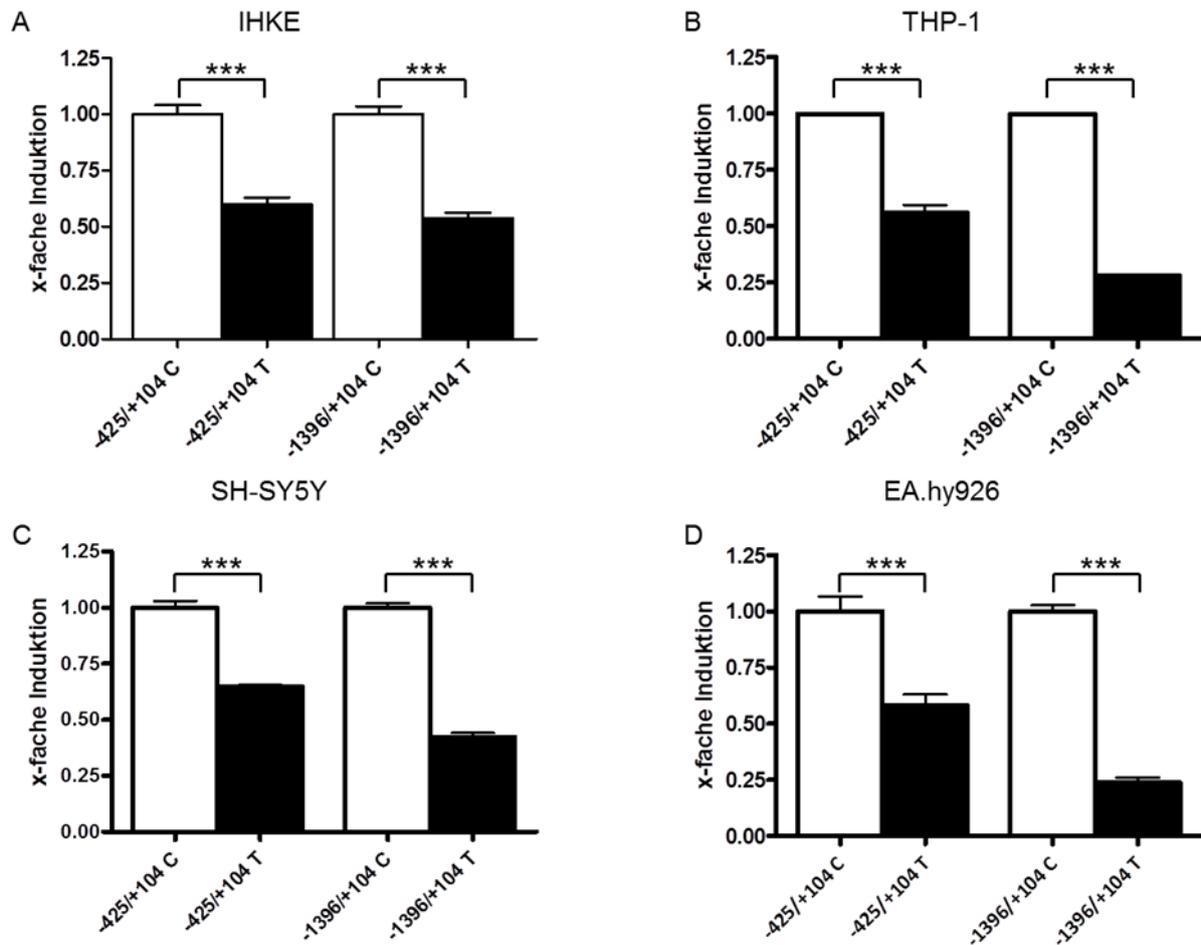
vorlag, was der beschriebenen Verteilung in der Normalbevölkerung entspricht (McVean et al., 2012).



**Abbildung 19: Identifizierte genetische Varianten in der 5'-flankierenden GLA-Region.** Durch direkte Sequenzierung wurden bei jeweils 60 Patienten der MolProMD-Studie (A) und des Fabry-Kollektivs (B) die Verteilung genetischer Varianten in 4000 bp der 5'-flankierenden GLA-Region untersucht. Gekennzeichnet sind die verifizierten (rote Striche) und noch nicht vorbeschriebenen Varianten (grüne Striche) sowie die Transkriptionsstartpunkte (Pfeil), Translationsstartpunkte (Sternchen), UTRs (blau schraffierte Kästchen) und Exons (weiße Kästchen). Die rs-Nummern beziehen sich auf die Einträge in der NCBI-SNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

#### 4.5.1 Einfluss der genetischen Variante -10C>T auf die Transkriptionsaktivität

Das minore -10T-Allel [rs2071225] in der GLA 5'-UTR zeigte ein gehäuftes Auftreten bei Patienten mit Fabry-typischen Manifestationen. Bisher ist die funktionelle Bedeutung ungeklärt (Tanislav et al., 2011; Pisani et al., 2012). Um den Effekt auf die Transkriptionsaktivität zu überprüfen, wurde das minore -10T-Allel mittels zielgerichteter Mutagenese in die seriellen Deletionskonstrukte -425/+104 und -1396/+104 eingebracht. Für beide Konstrukte führte dies zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität in IHKE-, THP-1-, SH-SY5Y- und EA.hy926-Zellen, wobei der beobachtete Effekt für das Konstrukt -1396/+104 mit 70% Aktivitätsabnahme am stärksten war ( $p < 0,001$ ; Abbildung 20).



**Abbildung 20: Einfluss des minoren -10T-Allels auf die Transkriptionsaktivität.** Das Einbringen des minoren -10T-Allels in die Deletionskonstrukte (schwarze Balken) führte im Vergleich zum majoren -10C-Allel (weiße Balken) zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität der Konstrukte -425/+104 und -1396/+104 in (A) IHKE-, (B) THP-1-, (C) SH-SY5Y- und (D) EA.hy926-Zellen. Die Abbildungen sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. \*\*\* $p < 0,001$ .

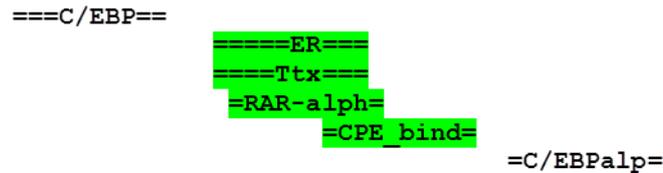
#### 4.5.2 In silico-Analysen der Variante -10C>T

Für eine weitere Charakterisierung des -10C- bzw. -10T-Allels im *GLA*-Promotor wurde zunächst eine *in silico*-Analyse zur Vorhersage möglicher Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) durchgeführt. Die *in silico*-Analyse erfolgte mit dem Programm AliBaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com>), das mittels Datenbankzugriff (Transfac 7.0) und Suchalgorithmus mögliche Bindestellen in der zu untersuchenden Sequenz vorhersagt (Grabe 2002). Da das Programm diese Bindestellen aufgrund von Wahrscheinlichkeiten berechnet, müssen putativ bindende Transkriptionsfaktoren experimentell bestätigt werden. Dies geschieht durch Kotransfektion und Stimulation der Transkriptionsfaktoren im Reporterassay. Für die Position -10 wurden mögliche Bindestellen für den

Östrogenrezeptor (*estrogen receptor*, ER), den Retinsäurerezeptor-alpha (*retinoic acid receptor alpha*, RAR-alpha), den Thyroid-Hormon-Rezeptor (Ttx) sowie einem Core-Promoter-Element (CPE\_bind) vorhergesagt (Abbildung 21). Das minore T-Allel an dieser Position führt zu einer Veränderung der Sequenz und damit zu einem Wegfall der putativen Bindestellen.

-10C

caggttaccgcggaatttatgctgtccggtcaccgtgacaatgcagctgaggaaccca



-10T

caggttaccgcggaatttatgctgtccggtaccgtgacaatgcagctgaggaaccca

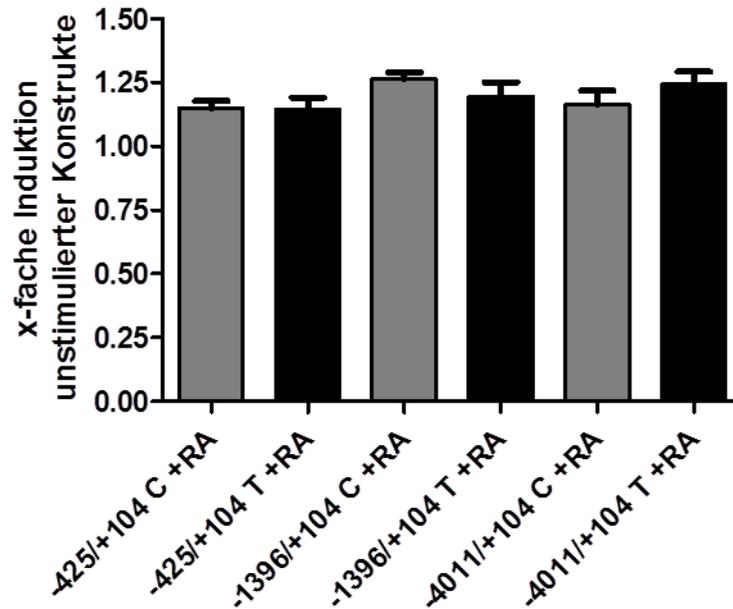


**Abbildung 21: *In silico*-Vorhersage putativer Bindestellen an Position -10 des *GLA*-Promotors.**

An Position -10 des *GLA*-Promotors wurden durch AliBaba-Analyse vier putative Bindestellen vorhergesagt. Das minore T-Allel an dieser Position führt zum Verlust der grün markierten Bindestellen. ER: *estrogen receptor*, Östrogenrezeptor; Ttx: Thyroid-Hormon-Rezeptor, RAR-alpha: *retinoic acid receptor alpha*, Retinsäurerezeptor-alpha; CPE\_bind: *Core-Promoter-Element-binding*.

Um eine Bindung des RAR-alpha zu überprüfen, wurden EA.hy926-Zellen nach transienter Transfektion der Deletionskonstrukte für 24 h mit 5 µM Retinsäure stimuliert. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen führte dies zu einer 1,2-fachen Erhöhung der Transkriptionsaktivität bei allen untersuchten Konstrukten (Abbildung 22). Der Einfluss des RAR-alpha auf die *GLA*-Regulation scheint allerdings unabhängig vom C- bzw. T-Allel zu sein, da keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Allelen festzustellen waren.

Die putative Bindung des Östrogen-Rezeptors im *GLA*-Promotor wurde anhand einer 24 h Stimulation von EA.hy926-Zellen mit 10 nM 2-Hydroxy-Estradiol untersucht (Daten nicht gezeigt). Ebenso wie für die Stimulation mit Retinsäure wurden auch in diesem Experiment keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Allelen festgestellt.

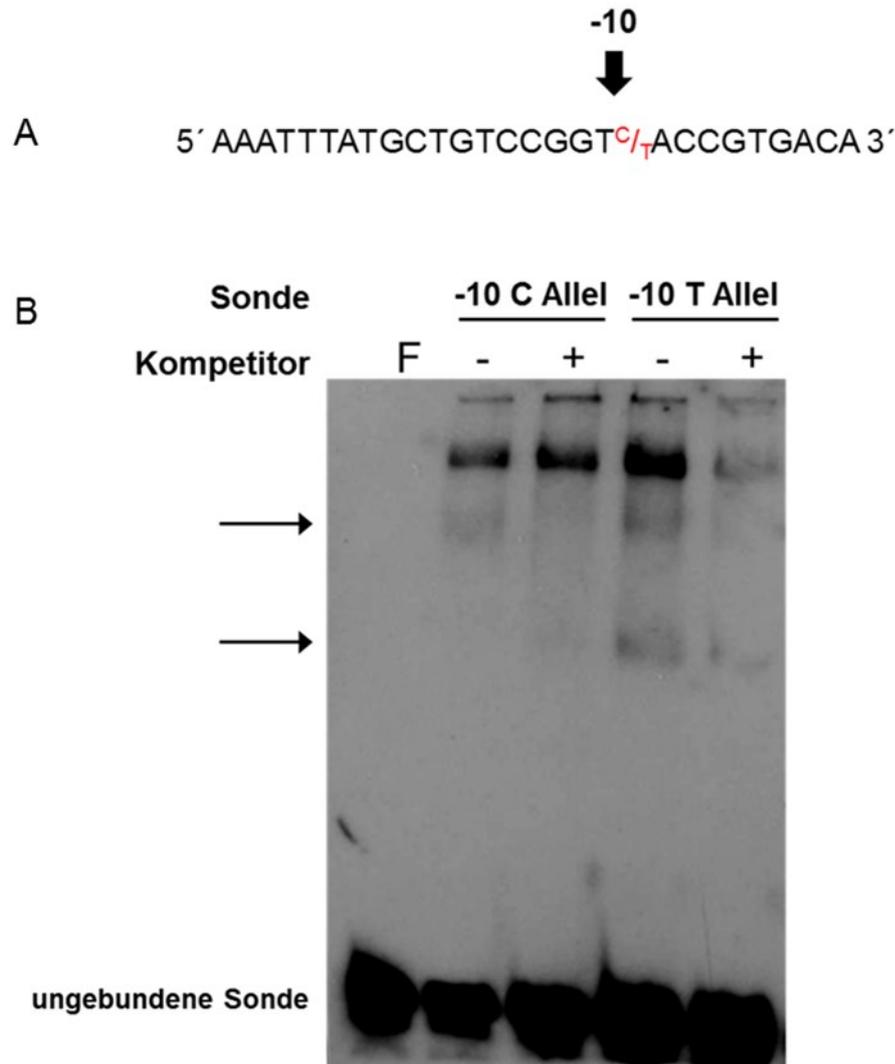


**Abbildung 22: Einfluss von Retinsäure auf die Transkriptionsaktivität in EA.hy926-Zellen.** Nach 24 h Stimulation der EA.hy926-Zellen mit 5  $\mu$ M Retinsäure (RA) wurde der Einfluss auf die Transkriptionsaktivität untersucht. Unter dem Einfluss von Retinsäure wurde kein signifikanter Unterschied zwischen dem C- (grauer Balken) und T-Allel (schwarzer Balken) festgestellt. Gezeigt ist die x-fache Änderung der Transkriptionsaktivität im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes.

#### 4.5.3 Das minore -10T-Allel führt zu einem veränderten DNA-Protein-Bindungsmuster

Mittels EMSA-Analysen können indirekt Interaktionen von DNA und Proteinen untersucht werden. Dafür werden Biotin-markierte DNA-Sonden mit Kernextrakten inkubiert. Eine Bindung von Proteinen an DNA führt zu einem veränderten Laufverhalten der Sonden in einem nativen Polyacrylamidgel. Durch diese Methode lässt sich auch untersuchen, ob genetische Varianten zu einer veränderten Interaktion führen. Um zu überprüfen, ob das minore T-Allel mit einer veränderten DNA-Protein-Interaktion einhergeht, wurden EMSA-Analysen mit Kernextrakten aus EA.hy926-Zellen durchgeführt. Als EMSA-Sonden dienten 28 bp lange, biotinylierte doppelsträngige DNA-Oligomere die entweder das majore -10C-Allel oder das minore -10T-Allel beinhalteten (Abbildung 23 A). Unmarkierte Sonden der gleichen Sequenzen dienten im 200-fachen molaren Überschuss als Kompetitor. Im Assay wurde eine spezifische, kompetierbare Bindung detektiert, die unabhängig von C- oder T-Allel auftrat (Abbildung 23 B, oberer Pfeil). Des Weiteren wurde eine spezifische schneller migrierende Bande für das T-Allel nachgewiesen (Abbildung 23 B, unterer Pfeil). Das T-Allel-spezifische Signal deutet somit auf eine veränderte, bzw. zusätzliche

Proteinbindung an die entsprechende Sequenz der *GLA* 5'-UTR hin und könnte damit die beobachteten Effekte im Reporterassay erklären.

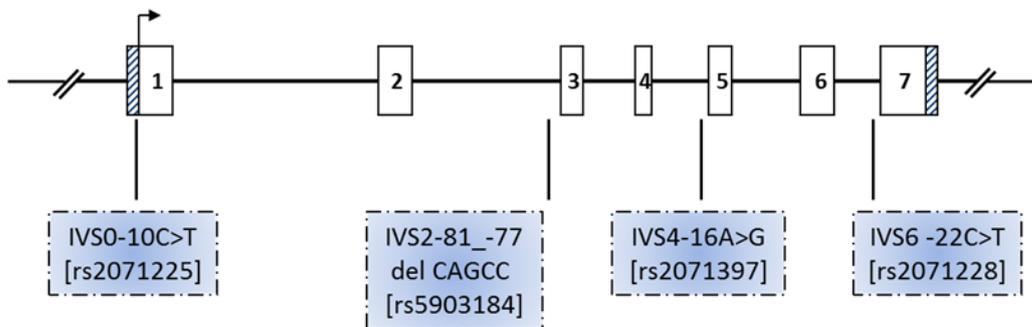


**Abbildung 23: Das minore T-Allel führt zu einer veränderten DNA-Protein-Interaktion. (A)** Für die EMSA-Analysen wurden 28 bp große DNA-Sonden verwendet, die entweder das -10C-Allel oder das -10T-Allel beinhalteten (rot markiert). **(B)** Der EMSA wurde mit 5 µg Kernextrakt aus EA.hy926-Zellen durchgeführt. Als Sonden dienten zwei Biotin-markierte, 28 bp lange, Oligonukleotide, die entweder das -10C- oder -10T-Allel beinhalteten. Unmarkierte Oligonukleotide der gleichen Sequenzen wurden in 200-fachen Überschuss als Kompetitor verwendet. Neben einem nicht-Allel-spezifischen, kompetierbaren Signal (oberer Pfeil) konnte eine schneller migrierende T-Allel-spezifische Bande (unterer Pfeil) nachgewiesen werden. Dieses Signal war ebenfalls kompetierbar.

## 4.6 Klinische Bedeutung des minoren -10T-Allels

### 4.6.1 Der -10T-Haplotyp

Bei allen untersuchten -10T-Allelträgern wurden zusätzlich per direkter Sequenzierung die intronischen Varianten IVS2-81\_-77delCAGCC [rs5903184], IVS4-16A>G [rs2071397] und IVS6-22C>T [rs2071228] identifiziert, die zusammen mit IVS0-10C>T [rs2071225] den -10T-Haplotypen bilden (Abbildung 24). Obwohl betroffene Patienten Fabry-typische neurologische Manifestationen aufweisen, wird der -10C>T-Haplotyp in der Klinik bisher kontrovers diskutiert, da biochemische Parameter wie GLA-Aktivität und Lyso-Gb3 häufig im Referenzbereich liegen und die kodierende Sequenz nicht betroffen ist. Aufgrund der *in vitro*-Ergebnisse, bei denen eine funktionelle Bedeutung der -10C>T-Variante nachgewiesen wurde, wurden ausgehend von einer Indexpatientin genetisch gesicherte Träger des minoren T-Allels klinisch durch kardiale, renale und neurologische Untersuchungen charakterisiert.

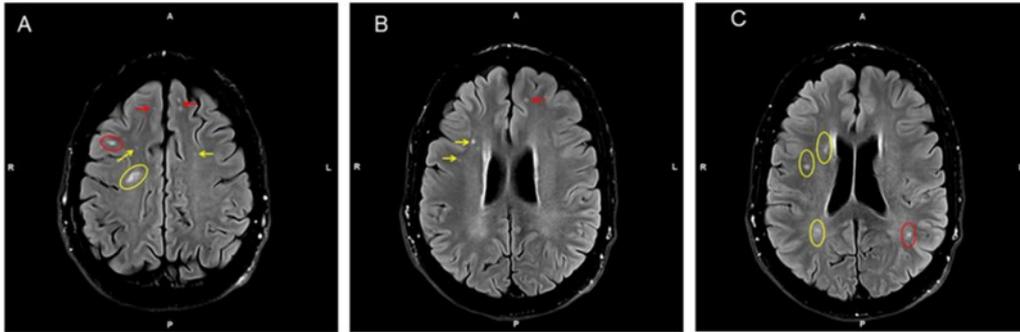


**Abbildung 24: Positionen der genetischen Varianten des -10T-Haplotypen.** Der -10T-Haplotyp besteht aus den genetischen Varianten IVS0-10C>T [rs2071225], IVS2-81-77delCAGCC [rs5903184], IVS4-16A>G [rs2071397] und IVS6-22C>T [rs2071228]. Markiert sind *GLA*-Exons (weiße Kästchen), Translationsstart (Pfeil), UTRs (schraffierte Kästchen) sowie die Position der genetischen Varianten.

### 4.6.2 Das minore -10T-Allel ist mit neurologischen Manifestationen assoziiert

Die Indexpatientin stellte sich 2006 im Alter von 56 Jahren am IFAZ mit neuropathischen Schmerzen vor. Eine Magnetresonanztomographie (MRT) des Kopfes zeigte ausgeprägte periventriculär bis subkortikal gelegene Läsionen der weißen Substanz (*white matter lesions*, WML; Abbildung 25). Zudem wurde durch eine Hautbiopsie, in der die Dichte der intraepidermalen Nervenfasern deutlich reduziert war, eine SFN diagnostiziert. Sowohl WML als auch SFN sind typische neurologische Manifestationen „klassischer“ Fabry-Patienten. Andere Risikofaktoren bzw. Ursachen für WML und SFN konnten in weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Die genetische Diagnostik für Morbus Fabry erfolgte anhand der Sequenzierung der Exone und angrenzenden intronischen Bereiche. Neben dem minoren -10T-Haplotypen wurden keine weiteren *GLA*-Varianten festgestellt.

Sowohl die GLA-Enzymaktivität in den Leukozyten der Patientin als auch die Bestimmung des Progressionsmarkers Lyso-Gb3 aus dem Blutplasma lagen im Normbereich (Tabelle 8).



**Abbildung 25: Magnetresonanztomographie-Aufnahmen der -10T-Allelträgerin (Indexpatientin)**  
**(A-C)** *Fluid attenuated inversion recovery* (FLAIR) -Magnetresonanztomographie-Aufnahmen der Indexpatientin zeigten multiple, periventrikulär (gelbe Pfeile und Kreise) bis subkortikal (rote Pfeile und Kreise) gelegene unterbrochene *white matter lesions* ohne Gadolinium-Anreicherung.

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 8: Charakteristika der Studienpopulation.**

Patient #	Geschlecht	Alter [Jahre]	Genotyp	Fabry-typische Parameter				Laborchemische Parameter		
				neurologisch	kardial	renal	allgemein	GLA-Aktivität [FI]	GLA mRNA-Expression [FI]	Lyso-Gb3 [ng/ml]
1*	w	63	-10T/X	SFN und konsekutive neuropathische Schmerzen, autonome Neuropathie (postprandiale Schmerzen, Diarrhoe), WML, TIA	linksventrikuläre Hypertrophie, diastolische ventrikuläre Dysfunktion	o. B.	Tinnitus	2,67	0,83	0,68
2	w	43	-10T/X	SFN und konsekutive neuropathische Schmerzen	o. B.	o. B.	o. B.	3,09	0,81	1,08
3	m	12	-10T/Y	neuropathische Schmerzen, Kopfschmerzen	o. B.	o. B.	o. B.	0,91	0,58	0,46
4	m	15	-10T/Y	neuropathische Schmerzen, autonome Neuropathie (postprandiale Schmerzen)	o. B.	o. B.	Hyperhidrose	1,76	0,55	0,63
5	m	19	-10T/Y	keine	o. B.	o. B.	o. B.	1,48	0,49	1,12
6	w	46	-10T/X	neuropathische Schmerzen	o. B.	tubuläre Proteinurie	o. B.	2,12	0,76	0,20
7	w	53	-10T/X	Kopfschmerzen	o. B.	o. B.	Angiokeratome, lysosomale zelluläre Einschlüsse (Hautbiopsie)	2,00	-	0,90

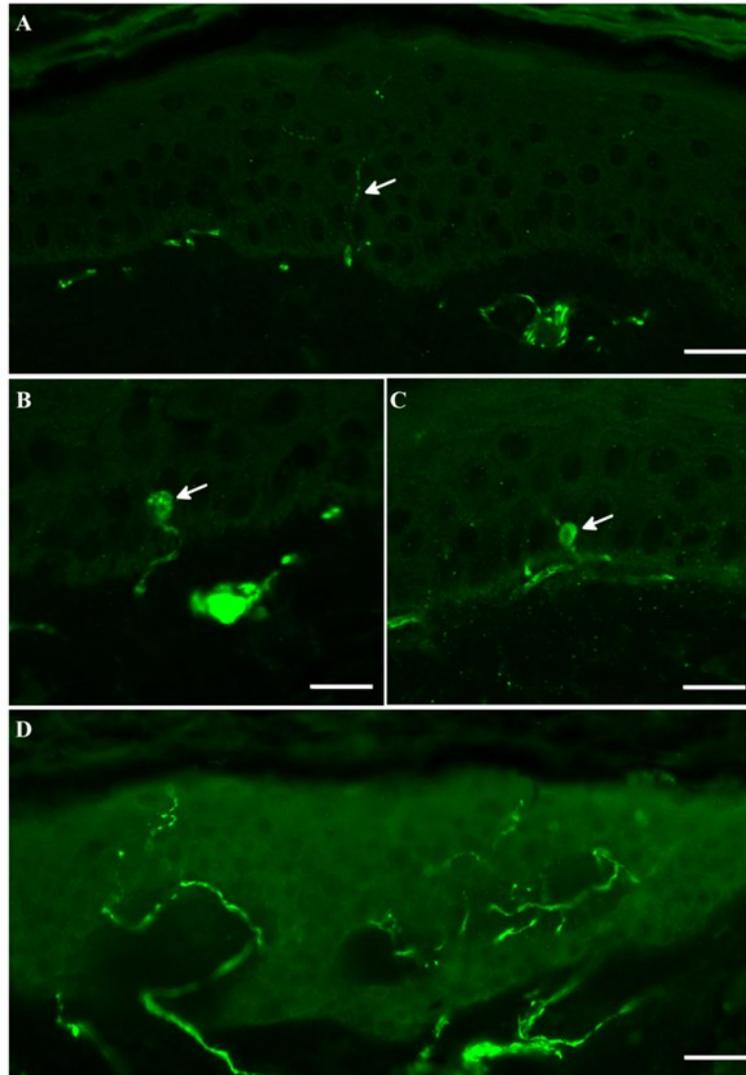
#### 4 Ergebnisse

Patient #	Geschlecht	Alter [Jahre]	Genotyp	Fabry-typische Parameter				Laborchemische Parameter		
				neurologisch	kardial	renal	allgemein	GLA-Aktivität [FI]	GLA mRNA-Expression [FI]	Lyso-Gb3 [ng/ml]
8	w	65	-10T/X	SFN und konsekutive neuropathische Schmerzen, TIA	o. B.	Mikro-albuminurie	Hypohidrose, Angiokeratome, lysosomale zelluläre Einschlüsse (Hautbiopsie)	2,20	0,76	0,50
9	w	49	-10T/X	WML, TIA, Kopfschmerzen	o. B.	o. B.	Hyperhidrose	1,60	0,79	0,50
10	w	55	-10T/X	neuropathische Schmerzen	o. B.	o. B.	Angiokeratome	2,64	1,37	0,50
11	w	54	-10T/-10T	neuropathische Schmerzen, TIA	o. B.	o. B.	Hypohidrose	1,92	0,66	0,30
12	m	33	-10T/Y	o. B.	ICD nach Kammerflimmern	o. B.	o. B.	2,84	0,61	0,40
13	w	72	-10T/X	SFN, WML	o. B.	o. B.	o. B.	0,94	0,81	0,60
14	m	52	-10T/Y	Hirnfarkt	o. B.	o. B.	o. B.	0,61	0,32	0,90
15	m	35	-10T/Y	Hirnfarkt	o. B.	o. B.	o. B.	0,88	-	0,60

Renale Parameter: Ultraschall, Albumin/Kreatinin-Quotient, errechnete glomeruläre Filtrationsrate (eGFR, nach MDRD- und CKD-EPI-Formel). Kardiale Parameter: Echokardiographie, Elektrokardiogramm. Neurologische Parameter: Magnetresonanztomographie (MRT), Nervenleitgeschwindigkeitsmessungen und detaillierte klinische Untersuchungen. Referenzwerte: GLA-Aktivität in Leukozyten >33 nmol MU/h/mg Protein; GLA-Aktivität in dried blood spots  $\geq 2,5$  mmol/l/h. Lyso-Gb3 im Plasma <2,2 ng/ml; WML: white matter lesions; SFN: *small fiber* Neuropathie; TIA: transiente ischämische Attacke; ICD: implantierbarer Kardioverter-Defibrillator; FI: fold-induction (x-fache Veränderung des Referenzwertes); \*enzyme replacement therapy (Enzyersatztherapie); m: männlich; w: weiblich; o. B.: ohne Befund.

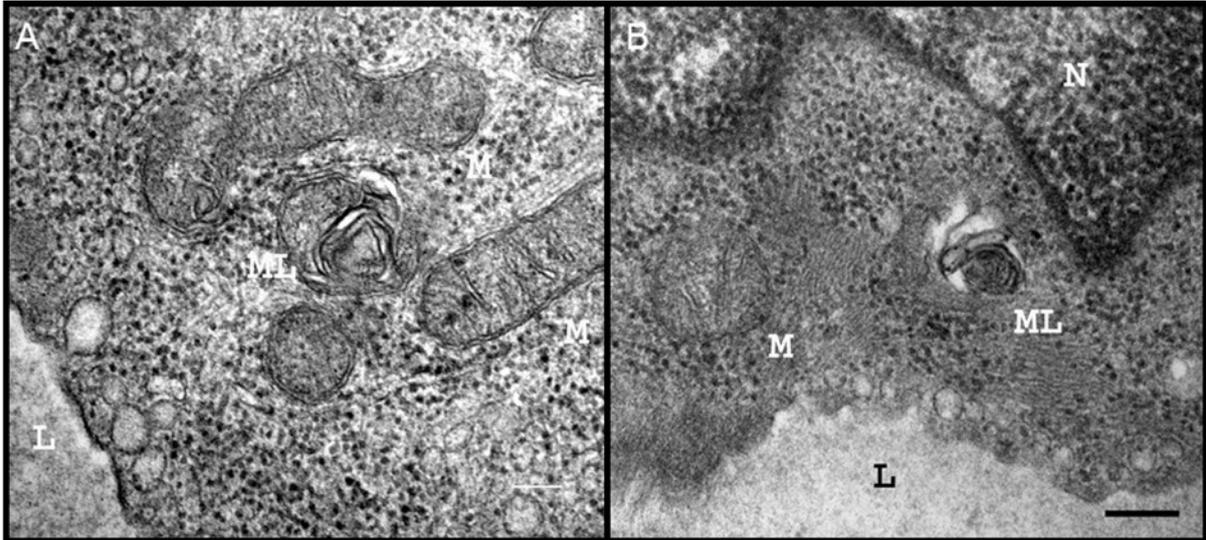
Aufgrund der ausgeprägten neurologischen Fabry-typischen Manifestationen der Indexpatientin wurde 2006 eine Enzymersatztherapie (ERT) mit Agalsidase-beta (Fabrazyme, Genzyme GmbH, 1mg/kg Körpergewicht, alle zwei Wochen, intravenös) initiiert. Umfassende kardiale, renale und neurologische Untersuchungen sowie biochemische Analysen in jährlichen *follow-ups* zeigten, dass die ERT zu einer Stabilisierung der klinischen Manifestationen und zu einer Reduzierung neuropathischer Schmerzen führte. Eine notwendige Dosisreduktion (0,5 mg/kg Körpergewicht) aufgrund eines weltweiten Agalsidase-beta-Lieferengpasses (Sirrs 2011) führte zu erneut auftretenden massiven neuropathischen Schmerzen und einem deutlichen körperlichen Leistungsabfall.

Um mögliche Auswirkungen des *minor* -10T-Allels auf neurologische Manifestationen in einem unbehandelten größeren Patientenkollektiv zu analysieren, wurden 14 zusätzliche -10T-Allelträger (Durchschnittsalter: 44 [12-72]) rekrutiert und klinisch umfassend untersucht (Tabelle 8). Die meisten dieser Patienten litten unter starken neuropathischen Schmerzen. Zwei Patienten (#14 und #15) erlitten einen Hirninfarkt und drei Patienten (#8, #9 und #11) eine transiente ischämische Attacke (TIA, Tabelle 8). In Hautbiopsien von drei weiteren Patienten (#2, #8 und #13) wurde eine Reduktion der intraepidermalen Nervenfaserdichte (#1: 4,64/mm; #2: 4,40/mm; #8: 4,65/mm; #13: 3,70/mm; Normwert: >9,00/mm) gemessen und damit eine SFN diagnostiziert (Tabelle 8, Abbildung 26 A und D). Patientin #2 zeigte eine höhere Anzahl fokaler axonaler Schwellungen mit einem Durchmesser <1,5  $\mu$ m (Abbildung 26 B und C).



**Abbildung 26: Hautbiopsie der Patientin #2.** (A) Die Analyse der Hautbiopsie mit PGP9.5-Immunfluoreszenz zeigte die Reduktion der kleinen intraepidermalen Nervenfasern bei Patientin #2 (Pfeil). Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{m}$ . (B-C) Fokale axonale Schwellungen (Pfeile) mit einem Durchmesser größer als 1,5  $\mu\text{m}$  traten gehäuft auf. Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$ . (D) Hautbiopsie einer geschlechts- und altersentsprechenden gesunden Kontrolle mit normaler intraepidermaler Nervenfaserdichte. Maßstabsbalken = 30  $\mu\text{m}$ .

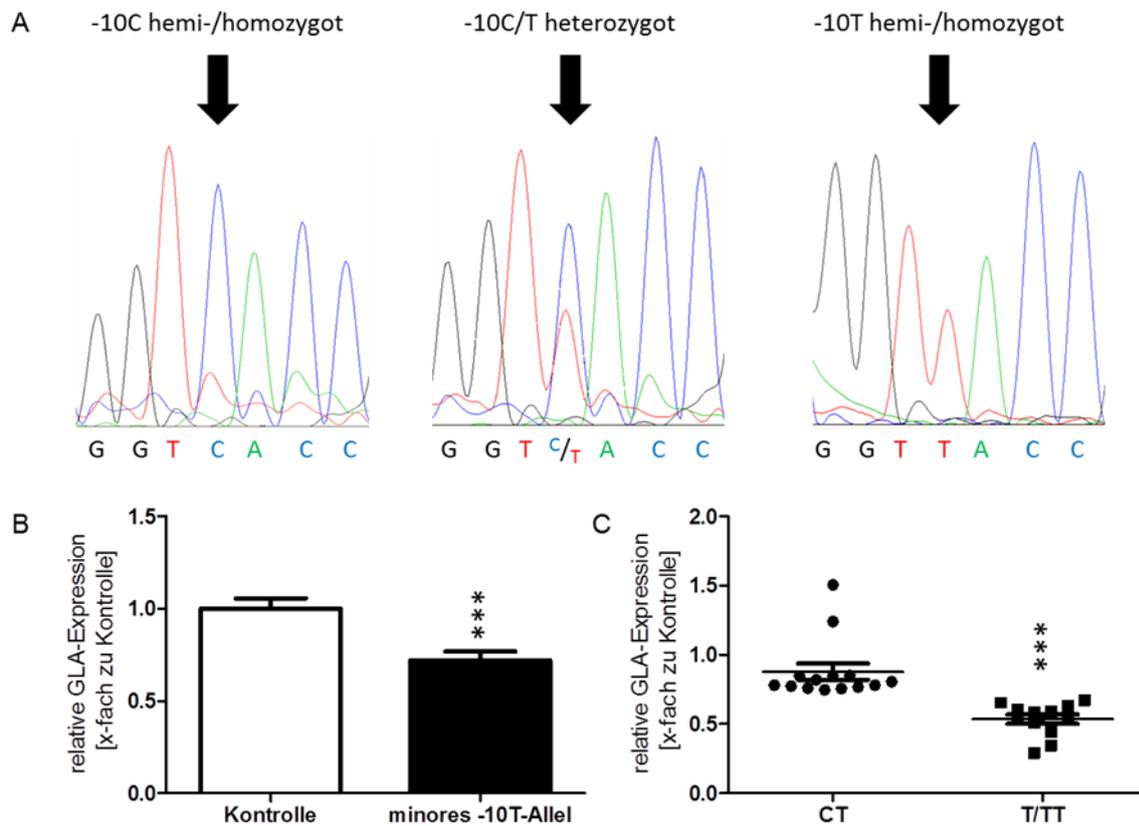
Der gestörte Sphingolipidstoffwechsel bei Morbus Fabry führt zu einer Akkumulation neutraler Sphingolipide, hauptsächlich Globotriaosylceramid (Gb3). Diese Gb3-Ablagerungen werden aufgrund einer charakteristischen lamellaren Struktur *zebra bodies* (Zebrakörper) genannt und sind pathognomonisch für Morbus Fabry. Sie können durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) in Biopsien betroffener Patienten beobachtet werden und befinden sich in Abhängigkeit des untersuchten Gewebes in Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen und Hepatozyten. In den Hautbiopsien zweier -10T-Patienten (#7 und #8) wurden in TEM-Aufnahmen unregelmäßige, nur teilweise konzentrische, lamellare lysosomale Einschlüsse identifiziert, die möglicherweise Vorstufen der *zebra bodies* darstellen (Tabelle 8; Abbildung 27).



**Abbildung 27: Transmissionselektronenmikroskopie der Hautbiopsien von Patient #7 (A) und #8 (B) zeigen lysosomale Einschlüsse.** Die Transmissionselektronenmikroskopie der Hautbiopsie zeigte, dass einige Endothelzellen unregelmäßige, lamellare Einschlüsse aufwiesen, die eine Myelin-ähnliche Struktur (ML) besaßen und möglicherweise Vorstufen der *zebra bodies* darstellen. Mitochondrien (M), Nukleus (N), Kapillarlumen (L). Maßstabsbalken = 500 nm.

#### 4.6.3 Das -10T-Allel führt zu einer verminderten GLA-Expression in humanen Leukozyten

Da die Insertion des minorens -10T-Allels im Reporterassay zu einer signifikanten Reduktion der Transkriptionsaktivität führte (Abbildung 20) und die Analyse des DNA-Protein-Bindemusters im EMSA-Experiment eine zusätzliche T-Allel-spezifische Bindung zeigte (Abbildung 23), wurde die GLA-Expression in Leukozyten von dreizehn -10T-Allelträgern mittels *real-time PCR* untersucht. Im Vergleich zu 10 gesunden Kontrollen waren die Transkriptmengen von minorens T-Allelträgern durchschnittlich um 30% signifikant reduziert (Abbildung 28 B;  $p=0,0005$ ). Zusätzlich zeigte der Vergleich zwischen hemi-/homozygoten und heterozygoten -10T-Allelträgern, dass die mRNA-Reduktion hemi-/homozygoter Träger signifikant niedriger war und damit für einen dosisabhängigen Effekt spricht ( $p<0,0001$ ; Abbildung 28 C). Diese mRNA-Reduktion führte bei vier Patienten (#3, #13, #14 und #15) zu einer Abnahme der enzymatischen GLA-Aktivität (Tabelle 8).



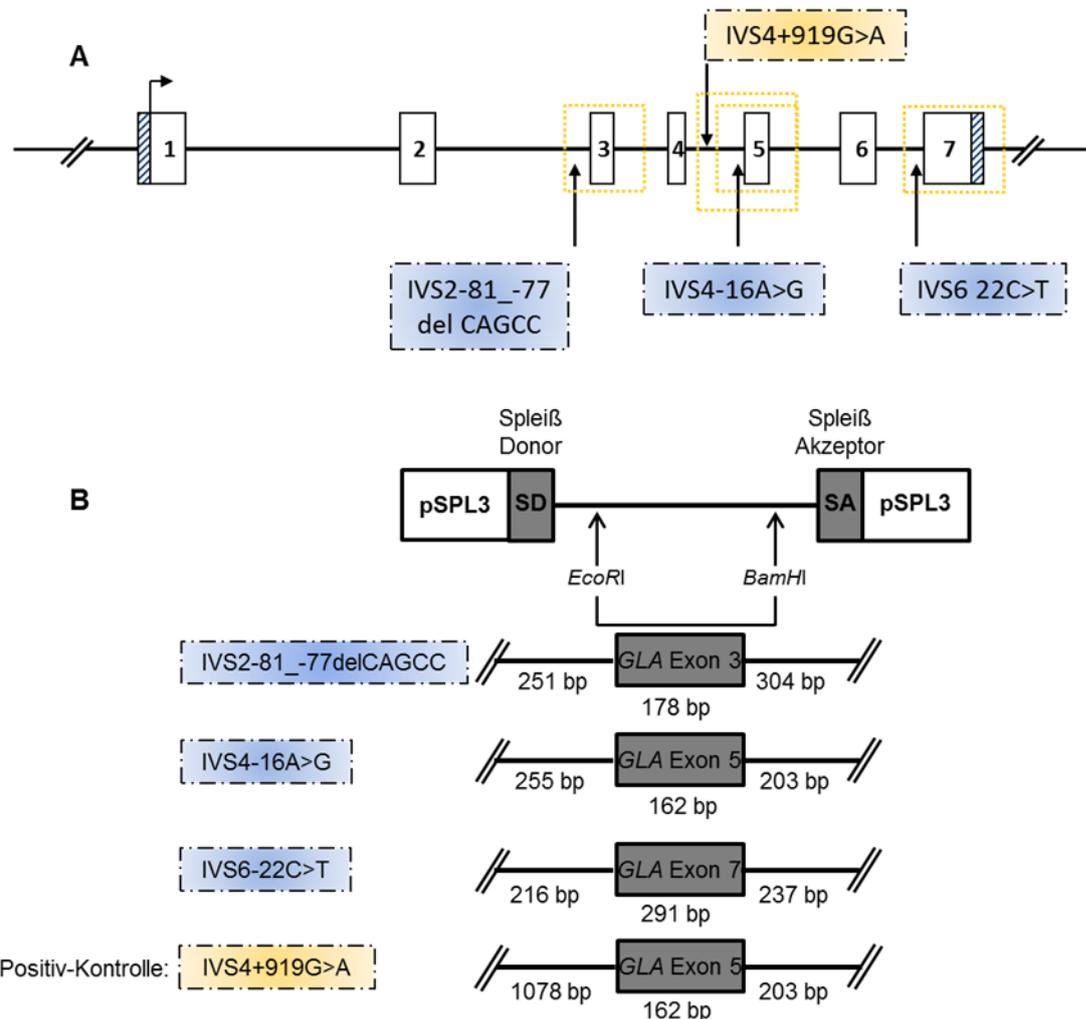
**Abbildung 28: GLA-mRNA-Expression ist bei -10T-Allelträgern signifikant reduziert.** (A) Repräsentative Chromatogramme zeigen die Nukleotid-Substitution an Position -10. (B) Träger des minoren -10T-Allels (schwarzer Balken) zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (weißer Balken) eine signifikant reduzierte GLA-Expression in Leukozyten. (C) Die relative GLA-Expression bei hemi-/homozygoten -10T-Allelträgern (T/TT) war im Vergleich zu heterozygoten Trägern (CT) signifikant reduziert. Die GLA-Expression wurde gegen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Mutationen innerhalb der kodierenden *GLA*-Region wurden durch Sequenzierung ausgeschlossen. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.6.4 Einfluss intronischer Varianten auf die mRNA-Prozessierung

Die bereits beschriebene intronische *GLA*-Variante IVS4+919G>A führt zu einem alternativen Spleißen, bei dem ein 57 nt langer intronischer Bereich in das *GLA*-Transkript eingebracht wird (Ishii et al., 2002; Hwu et al., 2009). Diese intronische Variante ist mit einem kardialen Phänotyp des Morbus Fabry assoziiert.

Um einen möglichen Einfluss der mit dem minoren -10T-Allel gekoppelten intronischen Varianten (IVS2-81\_-77delCAGCC [rs5903184], IVS4-16A>G [rs2071397] und IVS6-22C>T [rs2071228]) auf die Prozessierung des *GLA*-Transkripts zu überprüfen, wurden *Exon-Trapping*-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden zunächst Fragmente aus genomischer Patienten-DNA mittels PCR amplifiziert und über die eingefügten

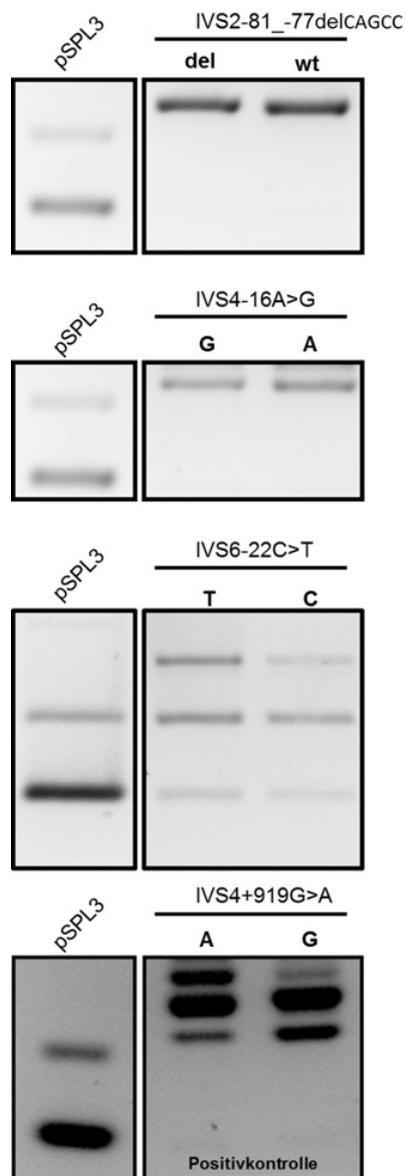
*EcoRI*- (*sense* Primer) und *BamHI*- (*antisense* Primer) Restriktionsschnittstellen in den pSPL3-Vektor eingebracht (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Lage der intronischen GLA-Varianten und Erstellung der pSPL3-Konstrukte. (A)** Dargestellt ist der genomische Aufbau des *GLA*-Gens, in dem Exons (weiße Kästen), Translationsstart (Pfeil) und die Lage der intronischen Varianten gekennzeichnet sind. **(B)** Aus genomischer Patienten-DNA wurden mittels PCR Konstrukte für den pSPL3-Vektor erstellt, die über die eingefügten *EcoRI*- und *BamHI*-Schnittstellen in den Vektor inseriert wurden. Die Größe der eingebrachten Konstrukte setzt sich aus den *GLA*-Exons sowie den stromaufwärts und stromabwärts gelegenen intronischen Bereichen zusammen. Die intronische Variante IVS4+919G>A (orange markiert) diente als Positiv-Kontrolle.

Die Isolation der Gesamt-RNA zur Synthese der als *PCR-Template* dienenden cDNA erfolgte 24 h nach transienter Transfektion in EA.hy926-Zellen. Unterschiede zwischen der intronischen Wildtypsequenz und der jeweiligen genetischen Variante wurden mittels Sequenzierung und gelelektrophoretischer Auftrennung untersucht. Für die untersuchten intronischen Varianten wurden weder Größen- noch Sequenzunterschiede detektiert (Abbildung 30). Dies spricht dafür, dass die Varianten keinen Einfluss auf die GLA

mRNA-Prozessierung haben. Gleiche Ergebnisse wurden auch in SH-SY5Y-Zellen beobachtet (ohne Abbildung).



**Abbildung 30: Gelelektrophoretische Auftrennung der Exon-Trapping-Produkte.** Die PCR-Produkte des Exon-Trappings wurden auf 2,5%-igen Agarosegelen aufgetrennt. Bei den untersuchten intronischen Varianten IVS2-81\_-77delCAGCC (439 bp, [rs5903184]), IVS4-16A>G (423 bp, [rs2071397]) und IVS6-22C>T (552 bp, [rs2071228]) konnten keine Größenunterschiede zwischen Wildtyp und Variante beobachtet werden. Aufgetragen wurden jeweils pSPL3-Leervektor (261 bp), intronische Variante und Wildtyp. wt: Wildtyp, del: Deletion CAGCC.

### 5 Diskussion

Morbus Fabry ist eine seltene, X-chromosomal vererbte lysosomale Speichererkrankung. Die Krankheit wird durch Mutationen im betroffenen *GLA*-Gen ausgelöst, die zu einer Funktionsstörung bzw. einem Funktionsverlust des Enzyms (GLA, EC3.2.1.22) führen. Zu den über 500 beschriebenen Mutationen zählen *missense*- und *nonsense*-Mutationen, sowie Deletionen und Insertionen (Stenson et al., 2003). Bis auf wenige Ausnahmen sind hauptsächlich kodierende Mutationen für die unterschiedlichen Fabry-Phänotypen verantwortlich. Die Regulation des Gens und der Einfluss genetischer Varianten im Promotor blieben bisher für die Fabry-Diagnostik unberücksichtigt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des *GLA*-Promotors und des Einflusses genetischer Varianten im Promotorbereich auf die *GLA*-Regulation. Der Fokus lag hierbei insbesondere auf der als Polymorphismus beschriebenen Variante -10C>T (rs2071225), für die in einem komplementären Ansatz aus funktionellen Analysen und dem klinischen Bild rekrutierter Patienten eine bedeutende Rolle nachgewiesen werden konnte.

#### 5.1 Charakterisierung des *GLA*-Promotors und Einfluss der Variante -10C>T auf die Genexpression

Das *GLA*-Gen ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms lokalisiert und wird durch den (-)- Strang kodiert. In unmittelbarer Nähe des *GLA*-Transkriptionsstartpunktes liegt das durch den (+)-Strang kodierte *HNRNPH2*. Über einen gemeinsamen Promotorbereich findet die bidirektionale Regulation beider Gene statt.

Genomweite Analysen zu bidirektionalen Promotoren zeigten, dass mehr als 10% der untersuchten 23752 humanen Gene in divergenter Orientierung angeordnet sind und ihre Transkriptionsstartpunkte weniger als 1000 bp voneinander entfernt liegen (Trinklein et al., 2004). Berechnungen zufolge weist der Großteil (77%) dieser Genpaare nicht-überlappende Transkripte auf, von denen wiederum 67% weniger als 300 bp voneinander entfernt liegen (Trinklein et al., 2004). Diese charakteristischen Eigenschaften des Großteils bidirektionaler Promotoren treffen auch auf den gemeinsam genutzten Promotorbereich der „Kopf-an-Kopf“ arrangierten Gene *GLA* und *HNRNPH2* zu. Die Transkriptionsstartpunkte beider divergent angeordneten Gene (*GLA*: NM\_000169; *HNRNPH2*: NM\_001032393) trennen 119 bp und ihre Transkripte sind nicht überlappend.

Die dargestellten Experimente zeigen, dass der Promotorbereich zwischen -425 und +104 in der Lage ist sowohl die *GLA*- als auch *HNRNPH2*-Expression zu regulieren. Mit Hilfe des bidirektionalen Vektors pLucRLuc wurde zudem gezeigt, dass die Expression simultan reguliert wird. Gene, die in der gleichen genomischen Region lokalisiert sind, werden häufig koexprimiert (Caron et al., 2001). Die Insertion des minoren -10T-Allels führte im Vergleich

zu dem majoren -10C-Allel zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität in dem Konstrukt -425/+104. Da der Bereich zwischen -425 und +104 in der Lage ist die Expression von *GLA* und *HNRNPH2* zu steuern, könnte die genetische Variante -10C>T auch einen Einfluss auf die Expression von *HNRNPH2* haben. Da die Möglichkeit besteht, dass für die *HNRNPH2*-Regulation andere bzw. weitere Transkriptionsfaktoren notwendig sind, muss der Effekt nicht zwingend negativ sein. Während *GLA* für den Abbau von Glykosphingolipiden in den Lysosomen verantwortlich ist gehört *HNRNPH2* zur Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine, die als RNA-bindende Proteine für pre-mRNA-Prozessierung, RNA-Metabolismus und -Transport verantwortlich sind (Dumauual et al., 2013). Weitere Mitglieder dieser Familie sind HNRNP-H1, -H3 und -F. *HNRNPH2* und -F sind an der Polyadenylierung von RNA-Transkripten beteiligt und für *HNRNPH2* konnte bereits gezeigt werden, dass es im Gegensatz zu *HNRNPF* einen positiven Einfluss auf die RNA-Prozessierung hat (Alkan et al., 2006). Eine fehlerhafte Regulation von *HNRNPH2* kann ebenfalls Einfluss auf biologische Prozesse innerhalb der Zelle haben oder pathologische Prozesse auslösen. Welche exakte Rolle *HNRPH2* dabei hat müssen weiterführende Studien zeigen.

### 5.2 Einfluss der 5'-untranslatierten Region auf die *GLA*-Expression

Die Regulation der Genexpression findet auf mehreren Ebenen statt. Auf Transkriptions-Ebene sind sowohl cis-regulatorische Elemente wie Promotoren, Locus-Kontrollelemente, *Enhancer* und Silencer als auch trans-regulatorische Elemente wie Transkriptionsfaktoren essentiell (Wittkop und Kalay 2012). Daneben findet die Regulation auch posttranskriptional statt. Eine wichtige Aufgabe übernimmt dabei die auch als *leader*-Sequenz bezeichnete 5'-UTR. Die Translationseffizienz, die subzelluläre Lokalisation und die Stabilität von mRNAs werden durch cis-aktive RNA-Elemente vermittelt, die vorwiegend in der 5'-UTR lokalisiert liegen (Pesole et al., 2001). Dabei können RNA-bindende Proteine (RBPs), als trans-aktive Elemente, sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf die Regulation haben.

Die polymorphe Struktur der *GLA* 5'-UTR wurde ursprünglich mittels *single strand conformation polymorphism*- (SSCP) Analyse aufgeklärt (Davies et al., 1993). Dabei wurden die SNPs -10C>T (rs2071225), -12G>A (rs3027585) und -30G>A (rs3027584) identifiziert. Während -30G>A mit einer erhöhten *GLA*-Plasmaaktivität assoziiert ist, gelten -12G>A und -10C>T als neutral (Fitzmaurice et al., 1997; Saifudeen et al., 1995).

Eine wichtige Eigenschaft der 5'-UTR ist die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die einen Einfluss auf die Translationseffizienz haben. Stabile *stem-loop*-Strukturen erschweren die Bindung von pre-Initiationskomplexen an die mRNA und führen damit zu einer Abnahme der Translationseffizienz, während aufgelockerte Strukturen zu einer Erhöhung führen können

(Pickering und Williams 2005). Einzelne Basenaustausche in der 5'-UTR können somit zu einer Veränderung dieser Strukturen führen und damit Einfluss auf die Translationseffizienz nehmen. Die strukturellen und thermodynamischen Eigenschaften von RNAs lassen sich mit Hilfe von Computerprogrammen berechnen. Für die *GLA* 5'-UTR wurde bereits gezeigt, dass weder -30G>A noch -10C>T einen wesentlichen Einfluss auf die Faltung der mRNA haben und keine RNA-Bindemotive beeinflusst werden (Oliveira et al., 2008). Die identifizierten genetischen Varianten in der *GLA* 5'-UTR scheinen also eher einen Einfluss auf die Regulation der Transkription zu haben als auf die der Translation. Dies wurde mit Hilfe transienter Transfektionen serieller Promotordeletionskonstrukte und anschließender Reporterassays in der vorliegenden Arbeit untersucht. Im Vergleich zum majoren -10C-Allel führte die Insertion des minoren -10T-Allels zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität in den Reporterassays und weist somit auf einen Einfluss des SNPs auf die Transkriptionsaktivität hin. Diese Hypothese wird durch die EMSA-Experimente unterstützt, in denen das minore -10T-Allel zu einer zusätzlichen, Allel-spezifischen Bindung von EA.hy926 Kernproteinen an die DNA führte. Diese zusätzliche Bindung scheint somit einen inhibierenden Effekt auf die Transkription zu haben. Zusätzlich konnte im Vergleich zu C-Allel Trägern eine signifikante Abnahme der *GLA* mRNA-Expression bei Trägern des minoren -10T-Allels mittels *real-time* PCR detektiert werden. Die genetische Variante -10C>T scheint also einen regulativen Einfluss auf der Ebene der Transkription zu haben. Allgemein zeichnen sich 5'-UTRs hochexprimierter Gene durch eine Beteiligung bei der Regulation der Transkription aus (Davuluri et al., 2000).

### 5.3 Regulation der *GLA* durch den Transkriptionsfaktor EB

Die von einer einfachen Zellmembran umgebenen Lysosomen spielen eine wichtige Rolle bei der Degradation zelleigener und zellfremder Moleküle. Sie beinhalten in etwa 50 verschiedene Hydrolasen die für den Abbau von spezifischen Substraten verantwortlich sind (Saftig und Klumpermann 2009). Die Defizienz eines einzelnen Enzyms führt zu einer Akkumulation des nicht abgebauten Substrats und in Folge dessen zu einer Beeinträchtigung der Zellfunktion und schließlich zur Apoptose (Ballabio und Gieselmann 2009). Bei den meisten lysosomalen Speichererkrankungen sind Mutationen im entsprechenden Gen für die Enzymdefizienz verantwortlich (Lübke et al., 2009). Neben löslichen Proteinen sind lysosomale Membranproteine essentiell für die Funktion des Lysosoms, da sie für die Aufrechterhaltung des sauren pH-Werts, des Protein-Imports aus dem Zytosol, der Membranfusion und dem Transport degradierter Produkte in das Zytosol verantwortlich sind (Saftig und Klumpermann 2009).

Die Aktivität der Enzyme ist dabei abhängig von dem Zustand der Zelle und muss je nach Bedarf reguliert werden. Unter Mangelbedingungen muss die Aktivität lysosomaler Enzyme

erhöht werden, um den Bedarf an Nährstoffen über den Abbau eigener Moleküle zu gewährleisten. Gleichzeitig muss die Biogenese von Lysosomen gesteigert werden und damit auch die Expression von Membranproteinen (Settembre et al., 2009). Dies erfordert eine koordinierte Expression lysosomaler Gene.

Diese koordinierte Regulation lysosomaler Gene findet auf transkriptioneller Ebene statt und wird von dem Transkriptionsfaktor EB (TFEB) gesteuert, der als auch lysosomaler „Masteregulator“ bezeichnet wird (Sardiello et al., 2009). Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression von 96 lysosomalen Genen koordiniert stattfindet, wurden die Promotorbereiche der entsprechenden Gene auf Sequenzhomologien untersucht. Interessanterweise konnte in dem Großteil lysosomaler Gene (68 von 96) eine palindromische Sequenz identifiziert werden, die im Durchschnitt 200 bp vom Transkriptionsstart entfernt lag und teilweise in multipler Anzahl vorhanden war (Sardiello et al., 2009). Dieses Motiv wurde entsprechend seiner Lokalisation im Promotorbereich lysosomaler Gene als CLEAR (*Coordinated Lysosomal Expression and Regulation*)-Element bezeichnet (Sardiello et al., 2009).

Die GLA ist für den Abbau neutraler Sphingolipide in den Lysosomen verantwortlich und ihre Aktivität muss entsprechend des Bedarfs der Zelle reguliert werden. Im *GLA*-Promotorbereich konnten wir vier CLEAR-Elemente identifizieren, die unterschiedlich stark von der bekannten palindromischen Konsensussequenz 5'-GTCACGTGAC-3' abweichen. Die Bindestellen zwei und vier im *GLA*-Promotor zeigten dabei die größte Homologie zur Konsensussequenz. Im Reporterassay führte die Koexpression von TFEB und seriellen Promotordeletionskonstrukten zu einer Erhöhung der Transkriptionsaktivität. Die Veränderung der einzelnen Bindestellen zwei oder vier durch zielgerichtete Mutagenese führte zu einer Abnahme der Transkriptionsaktivität, die im Vergleich zu basalen Bedingungen (ohne TFEB-Überexpression) dennoch erhöht war. Die Mutation einer TFEB-Bindestelle führt demnach nicht zu einer absoluten Repression der *GLA*-Expression, was dafür spricht, dass TFEB mit mehreren Bindestellen im *GLA*-Promotor interagieren kann. Die gleichzeitige Veränderung der Bindemotive zwei und vier führte zu einer Abnahme der Transkriptionsaktivität unter das basale Niveau und zeigt die Bedeutung der intakten Bindemotive für die *GLA*-Regulation durch TFEB. Bei der Übertragung dieser Erkenntnisse auf den Patienten würde dies bedeuten, dass Mutationen in mehreren TFEB-Bindemotiven zu einer drastischen Abnahme der *GLA*-Expression führen würden und damit eventuell Einfluss auf die Enzymaktivität haben könnten. Bei Patienten mit Fabry-typischen Symptomen und Manifestationen unklarer Genese sollten die TFEB-Bindemotive im *GLA*-Promotor zukünftig auf Sequenzveränderungen untersucht werden.

Die durch TFEB vermittelte, koordinierte Expression lysosomaler Gene wird über den Phosphorylierungsstatus von TFEB gesteuert. Im inaktiven Zustand liegt TFEB

phosphoryliert vor und ist in den meisten Zellen im Zytosol lokalisiert (Settembre et al., 2011). TFEB kann an mindestens zehn verschiedenen Stellen phosphoryliert werden, was für eine komplexe Regulation seiner Aktivität spricht (Dephoure et al., 2008). Unter Bedingungen, die eine Expression lysosomaler Gene oder eine gesteigerte Biogenese von Lysosomen erfordern, translokalisiert TFEB im dephosphorylierten Zustand in den Zellkern und initiiert die Expression seiner Zielgene (Settembre et al., 2012). Die indirekte Interaktion von TFEB mit dem *GLA*-Promotorbereich konnten wir mittels ChIP-Experimenten nachweisen. Ob diese Interaktion gleichzeitig an allen vier Bindestellen stattfindet und über eine Komplexbildung mit anderen Faktoren geschieht oder die Bindestellen mit verschiedenen Affinitäten genutzt werden ist noch nicht bekannt.

### 5.4 Mögliche Interaktion von TFEB mit der *GLA* 5'-UTR

Neben den TFEB-Bindestellen im *GLA*-Promotor scheint die Position -10 ebenfalls eine bedeutende Funktion bei der Expressionsregulation zu besitzen. Das Einbringen des minoren -10T-Allels führte im Vergleich zu dem majoren -10C-Allel zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität und im EMSA zu einer T-Allel-spezifischen DNA-Protein-Bindung. Beide Ergebnisse zeigen, dass die Position -10 bzw. der Bereich um diese Position neben den TFEB-Bindestellen an der *GLA*-Regulation beteiligt ist. Die Rekrutierung des T-Allel-spezifischen Proteins bzw. Proteinkomplexes hat einen reprimierenden Effekt auf die Transkriptionsaktivität. Es besteht die Möglichkeit, dass TFEB gemeinsam mit weiteren Transkriptionsfaktoren die im Bereich -10 binden interagiert und in einem Transkriptionsmodul wirkt. Diese mögliche synergistische Interaktion könnte durch Einbringen des minoren T-Allels erschwert werden. Zum einen könnte dies durch eine gesteigerte Affinität zu anderen Faktoren, welche die ursprüngliche Bindung verdrängen und damit zu einem veränderten Transkriptionsmodul führen, erklärt werden. Zum anderen könnte die T-Allel-spezifische Bindung aber auch zu einer Strukturveränderung des Chromatins führen und damit die Zugänglichkeit des Transkriptionsfaktors EB an die TFEB-Bindestellen erschweren.

### 5.5 Klinische Bedeutung und funktionelle Analyse von -10T

Patienten mit Fabry-typischen Manifestationen und ohne kodierende *GLA*-Varianten stellen ein diagnostisches und therapeutisches Dilemma dar, da sie entsprechend gängiger Leitlinien keiner Enzymersatztherapie (ERT) zugeleitet werden (AWMF-Leitlinie: Interdisziplinäre Leitlinie für die Diagnose und Therapie des Morbus Fabry.). Die in dieser Arbeit beschriebene Patientengruppe mit neurologischen Manifestationen ist Träger des -10T-Haplotypen, welcher in Familienstudien und Fallberichten bereits mit Morbus Fabry assoziiert wurde (Oliveira et al., 2008; Pisani et al., 2012; Tanislav et al., 2011). Die

molekulare Grundlage dieses Haplotypen wurde bisher allerdings noch nicht näher charakterisiert.

Am IFAZ wurden insgesamt 13 Patienten mit Fabry-typischen neurologischen Manifestationen (Hirnfarkt, transiente ischämische Attacken, SFN und Akroparästhesien) vorgestellt. In der Fabry-Diagnostik konnten neben dem -10T-Haplotypen (IVS0-10C>T [rs2071225]; VS2-81\_-77delCAGCC [rs5903184]; IVS4-16A>G [rs2071397] und IVS6-22C>T [rs2071228]) keine kodierenden *GLA*-Mutationen detektiert werden. In einer Fallstudie wurde dieser Haplotyp mit Fabry-typischen Manifestationen bei einer weiblichen, jungen Patientin beschrieben, die unter anderem eine transiente ischämische Attacke erlitten hatte (Pisani et al., 2012). Der Haplotyp wurde zudem mit kryptogenen zerebrovaskulären Gefäßerkrankungen assoziiert und trat gehäuft (16%) in einer Patientenkohorte mit SFN unklarer Genese auf (Oliveira et al., 2008; Tanislav et al., 2011).

In unsere Patientenkohorte konnte eine SFN mittels Hautbiopsie bei vier Patienten diagnostiziert werden. Neben der Reduktion der intraepidermalen Nervenfasern wurde bei einem Patienten zudem eine progrediente Schwellung der Axone festgestellt, die eine Schädigung der intraepidermalen Nerven andeutet. Des Weiteren konnten lysosomale Einschlüsse in Hautbiopsien von zwei Patienten mittels Transmissionselektronenmikroskopie detektiert werden. Diese Myelin-ähnlichen Strukturen könnten Vorläufer von sogenannten *zebra bodies* sein, die pathognomonisch für den Morbus Fabry sind (Navarro et al., 2006). Zudem wurden bei vier Patienten eine TIA diagnostiziert, während zwei männliche Patienten (35 Jahre und 52 Jahre) einen Hirnfarkt erlitten.

Bei dem Großteil der -10T-Träger in unserer Patientengruppe war die *GLA* mRNA-Expression signifikant reduziert. Da mittels *Exon trappings* gezeigt wurde, dass die intronischen Varianten (IVS2-81\_-77delCAGCC; IVS4-16A>G und IVS6-22C>T) keinen funktionellen Effekt auf die mRNA-Prozessierung haben, scheinen die beobachteten neurologischen Manifestationen auf einem funktionellen Effekt des -10T-Allels zu beruhen. Das minore T-Allel führte neben einer reduzierten Transkriptionsaktivität auch zu einem veränderten Proteinbindungsmuster im EMSA-Experiment. Die T-Allel spezifische Bindung könnte einen reprimierenden Effekt auf die *GLA*-Expression haben und damit das reduzierte mRNA-Level der betroffenen Patienten erklären. Ein weiterer Hinweis auf die Funktionalität des -10T-Allels ist der Vergleich der *GLA*-Expressionslevel von hemi-/homozygoten und heterozygoten Patienten. Das signifikant reduzierte Transkriptlevel hemi-/heterozygoter Träger deutet auf einen dosisabhängigen Effekt des minoren -10T-Allels hin. Weiterhin deuten unsere Beobachtungen darauf hin, dass das Vorhandensein des -10T-Allels und eines zusätzlichen bisher unbekanntem neurologischen Faktors zu einer Dysregulation der *GLA* führen und den beobachteten neurologischen Phänotypen auslösen können.

Verglichen mit den Referenzwerten, führt die reduzierte *GLA*-Expression bei vier Patienten in unserer Kohorte zu einer verminderten Enzymaktivität. Zudem tendieren hemi-/homozygote -10T-Träger zu einer niedrigeren *GLA*-Aktivität als heterozygote Träger, was auf einen dosisabhängigen Effekt hinweist. In der Literatur liegen die in Leukozyten gemessenen *GLA*-Aktivitäten von -10T-Trägern mit Fabry-typischen neurologischen Manifestationen häufig im unteren Referenzbereich oder sind leicht reduziert (Tanislav et al., 2011; Pisani et al., 2012). Es scheint also, dass eine im Grenzbereich liegende Enzymaktivität bereits so gering ist, dass sie neurologische Manifestationen bedingt. Das Nervensystem ist generell sehr empfindlich gegenüber reduzierten *GLA*-Aktivitäten, sodass u. a. erste Symptome des Morbus Fabry neuropathische Schmerzen im Kindheitsalter sind (Desnick et al., 2004; Ramaswami et al., 2006). Die Sensibilität des Nervensystems gegenüber *GLA*-Aktivitätsschwankungen zeigen auch „nicht-klassische“ *GLA*-Mutationen, die ebenfalls zu neurologischen Manifestationen führen (Lenders et al., 2013; Baptista et al., 2010).

Bei der Indexpatientin führte die Enzymersatztherapie (Agalsidase-beta, Fabrazyme, Genzyme GmbH; 1,0 mg/kg Körpergewicht, intravenös, alle zwei Wochen) innerhalb des ersten Jahr zu einer deutlichen Reduktion neuropathischer Schmerzen, einer generellen Krankheitsstabilisierung sowie einer erhöhten körperlichen Aktivität und Lebensqualität im Alltag. Der weltweite Agalsidase-beta Lieferengpass und die daraus resultierende Dosisreduktion bei der Indexpatientin (0,5 mg/kg Körpergewicht, intravenös, alle zwei Wochen) führte zu einer Progredienz neuropathischer Schmerzen (progrediente Schmerzintensität und Häufigkeit von Schmerzepisoden). Diese Beobachtung konnte ebenso in einer multizentrischen Studie über Dosisreduktion bei „klassischen“ Fabry-Patienten gemacht werden (Weidemann et al., 2014). Hier führte die Dosisreduktion zu einer signifikanten Zunahme von Schmerzattacken und -krisen. Nachdem die Indexpatientin mit Beendigung des Lieferengpasses wieder die volle Dosis der ERT erhielt, verbesserten sich die Schmerzen und ihr Allgemeinzustand. Basierend auf unserem komplementären Ansatz aus klinischer Datenerhebung und funktioneller Analyse kann geschlossen werden, dass das -10T-Allel bei Trägern mit Fabry-typischen neurologischen Manifestationen und ohne kodierende *GLA*-Mutation kausal sein kann. In zukünftigen Studien muss geklärt werden welcher bisher unbekannte neurologische Faktor an der phänotypischen Ausprägung beteiligt ist, und ob die ERT bei -10T-Trägern vor neurologischer Manifestationen/Progression schützt.

### 5.6 Zusammenfassung

Die *GLA* ist als lysosomales Enzym (*GLA*, EC3.2.1.22) für den Abbau neutraler Glykosphingolipide verantwortlich. Eine Defizienz der enzymatischen Aktivität aufgrund von

Mutationen im kodierenden Bereich führt zu der lysosomalen Speichererkrankung Morbus Fabry. Die progressive Akkumulation der Glykosphingolipide in allen Zellen des Körpers führt im Verlauf der Krankheit zu einer Multisystemerkrankung mit kardialer, renaler und neurologischer Beteiligung.

Da kodierende *GLA*-Mutationen für die Mehrzahl „klassischer“ Fabry-Phänotypen verantwortlich sind, wurden die Regulation des Gens und der Einfluss nicht kodierender Varianten bisher unzureichend charakterisiert. In einzelnen Arbeiten wurde der *GLA* -10T-Haplotyp bereits mit Fabry-typischen Manifestationen assoziiert (Tanislav et al., 2011; Pisani et al., 2012; Oliveira et al., 2008). Die funktionelle Bedeutung des Haplotypen konnte bisher allerdings noch nicht aufgeklärt werden. In dieser Arbeit wurden die *GLA*-Regulation und die Bedeutung des -10T-Haplotypen in einem komplementären Ansatz aus klinischer und experimenteller Datenerhebung detailliert untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass **1)** symptomatische Träger des minoren -10T-Allels unter neurologischen Manifestationen leiden und eine verringerte *GLA* mRNA-Expression aufweisen. **2)** die intronischen Varianten die gemeinsam mit dem -10T-Allel vererbt werden keine Auswirkungen auf die mRNA-Prozessierung haben. **3)** das -10T-Allel funktionell relevant ist und zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität und einer veränderten DNA-Protein-Bindung führt. **4)** die *GLA*-Expression unter anderem von dem lysosomalen „Masterregulator“ TFEB reguliert wird.

Die Indexpatientin und 14 weitere konsekutiv rekrutierte -10T-Allele Träger litten unter Fabry-typischen neurologischen Manifestationen wie Akroparästhesien, SFN, TIAs und Hirninfarkten. In der Fabry-Diagnostik konnten neben dem -10T-Haplotypen keine weiteren genetischen Veränderungen im *GLA*-Gen festgestellt werden. Mittels MRT wurden bei den entsprechenden Patienten zudem Läsionen der weißen Substanz (*white matter lesions*) festgestellt. Die initiale ERT führte zu einer qualitativen und quantitativen Schmerzreduktion und einer Zunahme der körperlichen Leistungsfähigkeit und Lebensqualität bei der Indexpatientin. Obwohl das *GLA*-Transkriptlevel bei den Patienten erniedrigt war, lagen *GLA*-Enzymaktivitäten und die Konzentrationen des Progressmarkers Lyso-Gb3 meist im Referenzbereich. Die verringerte *GLA*-Aktivität bei vier -10T-Trägern zeigte, dass die nicht-kodierende Variante einen reduzierenden Einfluss auf die Expression hat, der zumindest teilweise auch in eine reduzierte Enzymaktivität translatiert wurde. Aufgrund fehlender kodierender *GLA*-Mutationen haben die Patienten entsprechender gängiger Fabry-Leitlinien (AWMF-Leitlinie: Interdisziplinäre Leitlinie für die Diagnose und Therapie des Morbus Fabry.) zurzeit keine Indikation für eine ERT. In weiteren Studien muss geklärt werden, ob die ERT u. a. nach Ausschöpfung analgetischer Therapieregime bei allen -10T-Trägern mit neurologischen Manifestationen zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik/des *Outcome* führt.

In experimentellen Ansätzen wurde die funktionelle Bedeutung des minoren -10T-Allels untersucht. Die Insertion des minoren -10T-Allels in serielle Deletionskonstrukte führte im Vergleich zu dem majoren -10C-Allel zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität in allen untersuchten Zelllinien. Ein möglicher Einfluss der mit dem -10T-Allel gekoppelten intronischen *GLA*-Varianten IVS2-81\_-77delCAGCC [rs5903184], IVS4-16A>G [rs2071397] und IVS6-22C>T [rs2071228] auf die mRNA-Prozessierung wurde durch *Exon-Trapping*-Experimente ausgeschlossen. Zusätzlich konnte eine spezifische DNA-Protein-Bindung für das -10T-Allel detektiert werden, die für den reprimierenden Effekt auf die Transkriptionsaktivität verantwortlich sein könnte. Neben der Position -10 bzw. dem Bereich um diese Position in der *GLA* 5'-UTR konnte gezeigt werden, dass der lysosomale Transkriptionsfaktor EB an der *GLA*-Regulation beteiligt ist. Der positive Effekt auf die Transkriptionsaktivität durch TFEB-Überexpression konnte durch gleichzeitige Mutation der TFEB-Bindestellen inhibiert werden und mittels ChIP konnte eine direkte Bindung von TFEB an die Bindestellen nachgewiesen werden. Der bidirektionale Promotor ist neben der *GLA*-Expression auch für die Regulation von *HNRNPH2* verantwortlich. In einem bidirektionalen Vektor steuert der gemeinsame Promotorbereich die Expression in beide Orientierungen simultan. Ob die genetische Variante -10C>T das Expressionslevel von *HNRNPH2* ebenfalls negativ beeinflusst oder das Expressionsverhältnis von *GLA* und *HNRNPH2* verändert wird müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Ebenfalls muss geklärt werden, ob eine fehlerhafte Expression von *HNRNPH2* einen Einfluss auf biologische Prozesse in der Zelle hat.

### 6 Ausblick

Der -10T-Haplotyp führt bei betroffenen Patienten zu Fabry-typischen neurologischen Manifestationen. Da die Patienten in den meisten Fällen eine normale GLA-Enzymaktivität aufweisen und Lyso-Gb3 als Progressmarker im Referenzbereich liegt, haben diese Patienten aktuell keine Indikation für eine ERT. In weiterführenden Arbeiten müssen sowohl klinische Studien als auch experimentelle Ansätze mit größeren Patientengruppen durchgeführt werden, um die Bedeutung des minoren -10T-Allels für neurologische Phänotypen zu bestätigen und bisher unbekanntere weitere Faktoren und geeignete Biomarker zu identifizieren, welche eine Differenzierung zwischen symptomatischen und asymptomatischen -10T-Allel-Trägern erlauben.

Der Transkriptionsfaktor EB ist als lysosomaler Masterregulator an der *GLA*-Regulation beteiligt. Mutationen in den TFEB-Bindestellen im *GLA*-Promotor führten zu einer signifikanten Abnahme der Transkriptionsaktivität. Diese verringerte Aktivität könnte bei Patienten mit TFEB-Bindestellen-Mutationen ebenfalls zu einer reduzierten *GLA*-Expression führen und damit die Enzymaktivität herabsetzen. Bei Patienten mit Fabry-typischen Symptomen und Manifestationen unklarer Genese, sollten diese Bindestellen ebenfalls bezüglich Sequenzveränderungen analysiert werden. In aktuellen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass TFEB in der Lage ist, die lysosomale Exozytose transkriptionell zu regulieren (Medina et al., 2011). Bei der lysosomalen Exozytose verschmelzen Lysosomen mit der Plasmamembran und entleeren ihren Inhalt in den extrazellulären Raum. In der gleichen Arbeit wurde in Zellmodellen lysosomaler Speichererkrankungen gezeigt, dass akkumulierte Substrate in den Lysosomen durch diesen Prozess aus der Zelle transportiert werden. In einem Morbus Pompe-Mausmodell führte die Überexpression von TFEB zu einer Reduktion des akkumulierten Glykogens (Spampanato et al., 2013). Eine mögliche zukünftige Therapieform von Morbus Fabry und anderen lysosomalen Speichererkrankungen könnte eine Medikamenten-vermittelte Aktivitätserhöhung von TFEB sein, die zu einer gesteigerten lysosomalen Exozytose führt und folglich die intrazellulären Ablagerungen freisetzen könnte. Zunächst müssen Studien durchgeführt werden, die mögliche Nebenwirkungen dieser Therapieoption untersuchen.

Kürzlich wurde basierend auf den vorliegenden Ergebnissen ein Forschungsantrag genehmigt, der die Identifizierung und detaillierte klinische Charakterisierung weiterer symptomatischer -10T-Allel-Träger ohne kodierende *GLA*-Mutationen zum Ziel hat. Ein weiterer Fokus dieses Projektes ist das *screening* von Patienten mit SFN unklarer Ätiologie, um die pathophysiologische Bedeutung der -10C>T-Mutation detaillierter zu analysieren.

## 7 Referenzen

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). S2K-Leitlinie. Interdisziplinäre Leitlinie für die Diagnose und Therapie des Morbus Fabry. Stand: 30.06.2013. AWMF-Leitlinien-Register Nr. 030/134. [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030-134I\\_S2k\\_Morbus\\_Fabry\\_Diagnose\\_Therapie\\_2013-09.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-134I_S2k_Morbus_Fabry_Diagnose_Therapie_2013-09.pdf)

Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, van Roomen C, Mirzaian M, Wijburg FA, Linthorst GE, Vedder AC, Rombach SM, Cox-Brinkman J, Somerharju P, Boot RG, Hollak CE, Brady RO, Poorthuis BJ. (2008) Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 2812-2817.

Alfonso P, Pampín S, García-Rodríguez B, Tejedor T, Domínguez C, Rodríguez-Rey JC, Giraldo P, Pocoví M. (2011) Characterization of the c.(-203)A>G variant in the glucocerebrosidase gene and its association with phenotype in Gaucher disease. *Clin Chim Acta.* **412**, 365-369.

Alkan SA, Martincic K, Milcarek C. (2006) The hnRNPs F and H2 bind to similar sequences to influence gene expression. *Biochem J.* **393**, 361-371.

Ballabio A, Gieselmann V. (2009) Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta.* **1793**, 684-696.

Baptista MV, Ferreira S, Pinho-E-Melo T, Carvalho M, Cruz VT, Carmona C, Silva FA, Tuna A, Rodrigues M, Ferreira C, Pinto AA, Leitão A, Gabriel JP, Calado S, Oliveira JP, Ferro JM; PORTuguese Young STROKE Investigators. (2010) Mutations of the GLA gene in young patients with stroke: the PORTYSTROKE study--screening genetic conditions in Portuguese young stroke patients. *Stroke.* **41**, 431-436.

Beutler E, Kuhl W. (1972) Biochemical and electrophoretic studies of  $\alpha$ -galactosidase in normal man, in patients with Fabry's disease, and in Equidae. *Am J Hum Genet.* **24**, 237-249.

Bishop DF, Kornreich R, Desnick RJ. (1988) Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**, 3903-3907.

- Boyd KE, Wells J, Gutman J, Bartley SM, Farnham PJ. (1998) c-Myc target gene specificity is determined by a post-DNA binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 13887-13892.
- Brady RO, Tallman JF, Johnson WG, Gal AE, Leahy WR, Quirk JM, Dekaban AS. (1973) Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified ceramidetrihexosidase in Fabry's disease. *N Engl J Med.* **5**, 9-14.
- Braulke T, Bonifacino JS. (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1793**, 605-614.
- Breunig F, Wanner C. (2008) Update on Fabry disease: kidney involvement, renal progression and enzyme replacement therapy. *J Nephrol.* **21**, 32-37.
- Buckland PR, Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, Smith SK, O'Donovan MC. (2005) Strong bias in the location of functional promoter polymorphisms. *Hum Mutat.* **26**, 214-223.
- Buckler AJ, Chang DD, Graw SL, Brook JD, Haber DA, Sharp PA, Housman DE. (1991) Exon amplification: a strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 4005-4009.
- Buechner S, Moretti M, Burlina AP, Cei G, Manara R, Ricci R, Mignani R, Parini R, Di Vito R, Giordano GP, Simonelli P, Siciliano G, Borsini W. (2008) Central nervous system involvement in Anderson-Fabry disease: a clinical and MRI retrospective study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **79**, 1249-1254.
- Caron H, van Schaik B, van der Mee M, Baas F, Riggins G, van Sluis P, Hermus MC, van Asperen R, Boon K, Voûte PA, Heisterkamp S, van Kampen A, Versteeg R. (2001) The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science.* **291**, 1289-1292.
- Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. (2001) Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta.* **308**, 195-196.
- Chen L, Widom J. (2005) Mechanism of transcriptional silencing in yeast. *Cell.* **120**, 37-48.
- Clarke JT. (2007) Narrative review: Fabry disease. *Ann Intern Med.* **146**, 425-433.
- Coutinho MF, Prata MJ, Alves S. (2012) Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Mol Genet Metab.* **105**, 542-550.
- Davies JP, Winchester BG, Malcolm S. (1993) Sequence variations in the first exon of alpha-galactosidase A. *J Med Genet.* **30**, 658-663.

Davuluri RV, Suzuki Y, Sugano S, Zhang MQ. (2000) CART classification of human 5' UTR sequences. *Genome Res.* **10**, 1807-1816.

De Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Fossati CA, Rozenfeld PA. (2011) Higher apoptotic state in Fabry disease peripheral blood mononuclear cells.: effect of globotriaosylceramide. *Mol Genet Metab.* **104**, 319-24.

Deegan PB, Baehner AF, Barba Romero MA, Hughes DA, Kampmann C, Beck M; European FOS Investigators. (2006) Natural history of Fabry disease in females in the Fabry Outcome Survey. *J Med Genet.* **43**, 347-52.

Dephoure N, Zhou C, Villén J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP. (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 10762-10767.

Desnick RJ, Allen KY, Desnick SJ, Raman MK, Bernlohr RW, Krivit W. (1973) Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *J Lab Clin Med.* **81**, 157-171.

Desnick RJ, Dean KJ, Grabowski G, Bishop DF, Sweeley CC. (1979) Enzyme therapy in Fabry disease: differential in vivo plasma clearance and metabolic effectiveness of plasma and splenic alpha-galactosidase A isozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**, 5326-5330.

Desnick, R.J., Ioannou, Y.A., Eng, C.M. (2001)  $\alpha$ -Galactosidase a Deficiency: Fabry Disease, in *Schrivver et Al (Eds): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* Pages 3733-3774

Desnick RJ, Brady RO. (2004) Fabry disease in childhood. *J Pediatr.* **144**, S20-26.

Dördelmann C, Telgmann R, Brand E, Hagedorn C, Schröer B, Hasenkamp S, Baumgart P, Kleine-Katthöfer P, Paul M, Brand-Herrmann SM. (2008) Functional and structural profiling of the human thrombopoietin gene promoter. *J Biol Chem.* **283**, 24382-24391.

Dumaul CM, Steere BA, Walls CD, Wang M, Zhang ZY, Randall SK. (2013) Integrated analysis of global mRNA and protein expression data in HEK293 cells overexpressing PRL-1. *PLoS One.* **8**, e72977.

Dunn WA Jr. (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol.* **110**, 1923-1933.

Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. (1983) Permanent cell line expressing human factor kidney epithelial cells by nickel(II). *Cancer Res.* **49**, 1829-1835.

Eng CM, Desnick RJ. (1994) Molecular basis of Fabry disease: mutations and polymorphisms in the human alpha-galactosidase A gene. *Hum Mutat.* **3**, 103-111.

Eng CM, Banikazemi M, Gordon RE, Goldman M, Phelps R, Kim L, Gass A, Winston J, Dikman S, Fallon JT, Brodie S, Stacy CB, Mehta D, Parsons R, Norton K, O'Callaghan M, Desnick RJ. (2001) A phase 1/2 clinical trial of enzyme replacement in fabry disease: pharmacokinetic, substrate clearance, and safety studies. *Am J Hum Genet.* **68**, 711-722.

Eng CM, Fletcher J, Wilcox WR, Waldek S, Scott CR, Sillence DO, Breunig F, Charrow J, Germain DP, Nicholls K, Banikazemi M. (2007) Fabry disease: baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *J Inherit Metab Dis.* **30**, 184-192.

Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* **13**, 137-45.

Filocamo M, Morrone A. (2011) Lysosomal storage disorders: molecular basis and laboratory testing. *Hum Genomics.* **5**, 156-69.

Fitzmaurice TF, Desnick RJ, Bishop DF. (1997) Human alpha-galactosidase A: high plasma activity expressed by the -30G-->A allele. *J Inherit Metab Dis.* **20**, 643-657.

Fuda NJ, Ardehali MB, Lis JT. Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature.* **461**, 186-192.

Gal A, Hughes DA, Winchester B. (2011) Toward a consensus in the laboratory diagnostics of Fabry disease - recommendations of a European expert group. *J Inherit Metab Dis.* **34**, 509-514.

Garman SC, Garboczi DN. (2004) The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Biol.* **337**, 319-35.

Gaspar P, Herrera J, Rodrigues D, Cerezo S, Delgado R, Andrade CF, Forascepi R, Macias J, del Pino MD, Prados MD, de Alegria PR, Torres G, Vidau P, Sá-Miranda MC. (2010) Frequency of Fabry disease in male and female haemodialysis patients in Spain. *BMC Med Genet.* **1**, 11-19.

Germain DP, Waldek S, Banikazemi M, Bushinsky DA, Charrow J, Desnick RJ, Lee P, Loew T, Vedder AC, Abichandani R, Wilcox WR, Guffon N. (2007) Sustained, long-term renal stabilization after 54 months of agalsidase beta therapy in patients with Fabry disease. *J Am Soc Nephrol.* **18**, 1547-1557.

Germain DP. (2010) Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis.* **5**, 30.

Grabe N. (2002) AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. *In Silico Biol.* **2**, 1-15.

Guffon N. (2003) Clinical presentation in female patients with Fabry disease. *J Med Genet.* **40**, e38.

Hanahan D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol.* **166**, 557-580.

Harris MB, Mostecky J, Rothman PB. (2005) Repression of an interleukin-4-responsive promoter requires cooperative BCL-6 function. *J Biol Chem.* **280**, 13114-13121.

Heintzman ND, Ren B. (2009) Finding distal regulatory elements in the human genome. *Curr Opin Genet Dev.* **19**, 541-549.

Hilz MJ. (2002) Evaluation of peripheral and autonomic nerve function in Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl.* **91**, 38-42.

Hsu TR, Sung SH, Chang FP, Yang CF, Liu HC, Lin HY, Huang CK, Gao HJ, Huang YH, Liao HC, Lee PC, Yang AH, Chiang CC, Lin CY, Yu WC, Niu DM. (2014) Endomyocardial biopsies in patients with left ventricular hypertrophy and a common Chinese later-onset fabry mutation (IVS4 + 919G > A). *Orphanet J Rare Dis.* **9**, 96. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24980630.

Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolny R, Huang AC, Yeh HY, Chao MC, Lin SJ, Kitagawa T, Desnick RJ, Hsu LW. (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.

Ishii S, Nakao S, Minamikawa-Tachino R, Desnick RJ, Fan JQ. (2002) Alternative splicing in the alpha-galactosidase A gene: increased exon inclusion results in the Fabry cardiac phenotype. *Am J Hum Genet.* **70**, 994-1002.

Kampmann C, Wiethoff CM, Whybra C, Baehner FA, Mengel E, Beck M. (2008) Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in children and adolescents. *Acta Paediatr.* **97**, 463-469.

Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K, Owada M, Ohashi T, Kobayashi M, Eto Y, Tanaka A, Mills K, Winchester B, Keutzer J. (2005) Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab.* **85**, 196-202.

- Kitagawa T, Suzuki K, Ishige N, Ohashi T, Kobayashi M, Eto Y, Tanaka A, Odaka H, Owada M. (2008) Non-invasive high-risk screening for Fabry disease hemizygotes and heterozygotes. *Pediatr Nephrol.* 2008 **23**, 1461-1471.
- Landy A. (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem.* **58**, 913-949.
- Lenders M, Duning T, Schelleckes M, Schmitz B, Stander S, Rolfs A, Brand SM, Brand E. (2013) Multifocal white matter lesions associated with the D313Y mutation of the  $\alpha$ -galactosidase A gene. *PLoS One.* **8**, e55565.
- Li L, He S, Sun JM, Davie JR. (2004) Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol.* **82**, 460-471.
- Lin JM, Collins PJ, Trinklein ND, Fu Y, Xi H, Myers RM, Weng Z. (2007) Transcription factor binding and modified histones in human bidirectional promoters. *GenomeRes.* **17**, 818-827.
- Lingwood CA, Binnington B, Manis A, Branch DR. (2009) Globotriaosyl ceramide receptor function - where membrane structure and pathology intersect. *FEBS Lett.* **584**, 1879-1886.
- Linhart A, Elliott PM. (2007) The heart in Anderson-Fabry disease and other lysosomal storage disorders. *Heart.* **93**, 528-535.
- Liu S, Spinner DS, Schmidt MM, Danielsson JA, Wang S, Schmidt J. (2000) Interaction of MyoD family proteins with enhancers of acetylcholine receptor subunit genes in vivo. *J Biol Chem.* **275**, 41364-41368.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **25**, 402-408.
- Lübke T, Lobel P, Sleat DE. (2009) Proteomics of the lysosome. *Biochim Biophys Acta.* **1793**, 625-635.
- Ludlow LB, Schick BP, Budarf ML, Driscoll DA, Zackai EH, Cohen A, Konkle BA. (1996) Identification of a mutation in a GATA binding site of the platelet glycoprotein Ibbeta promoter resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Biol Chem.* **271**, 22076-22080.
- Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 622-32.
- Lyon MF. (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* **190**, 372-373.

Lyon MF. (1998) X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet.* **80**, 133-137.

Marcus DM, Kundu SK, Suzuki A. (1981) The P blood group system: recent progress in immunochemistry and genetics. *Semin Hematol.* **18**, 63-71.

Maston GA, Evans SK, Green MR. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **7**, 29-59.

Mayes JS, Scheerer JB, Sifers RN, Donaldson ML. (1981) Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clin Chim Acta.* **112**, 247-251.

Medina DL, Fraldi A, Bouche V, Annunziata F, Mansueto G, Spampanato C, Puri C, Pignata A, Martina JA, Sardiello M, Palmieri M, Polishchuk R, Puertollano R, Ballabio A. (2011) Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Dev Cell.* **21**, 421-430.

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**, 236-242.

Mehta A, Beck M, Eyskens F, Feliciani C, Kantola I, Ramaswami U, Rolfs A, Rivera A, Waldek S, Germain DP. (2010) Fabry disease: a review of current management strategies. *QJM.* **103**, 641-659.

Mehta A, West ML, Pintos-Morell G, Reisin R, Nicholls K, Figuera LE, Parini R, Carvalho LR, Kampmann C, Pastores GM, Lidove O. (2010) Therapeutic goals in the treatment of Fabry disease. *Genet Med.* **12**, 713-720.

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.* **281**, 249-54.

Mellman I, Fuchs R, Helenius A. (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem.* **55**, 663-700.

Meroni M, Sessa A, Battini G, Tazzari S, Torri Tarelli L. (1997) Kidney involvement in Anderson-Fabry disease. *Contrib Nephrol.* **122**, 178-184.

Messeguer X, Escudero R, Farré D, Núñez O, Martínez J, Albà MM. (2002) PROMO:detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics.* **18**, 333-334.

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51**, 263-273.
- Nakao S, Takenaka T, Maeda M, Kodama C, Tanaka A, Tahara M, Yoshida A, Kuriyama M, Hayashibe H, Sakuraba H, et al. (1995) An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med.* **333**, 288-293.
- Nakao S, Kodama C, Takenaka T, Tanaka A, Yasumoto Y, Yoshida A, Kanzaki T, Enriquez AL, Eng CM, Tanaka H, Tei C, Desnick RJ. (2003) Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. *Kidney Int.* **64**, 801-807.
- Navarro C, Teijeira S, Dominguez C, Fernandez JM, Rivas E, Fachal C, Barrera S, Rodriguez C, Iranzo P. (2006) Fabry disease: an ultrastructural comparative study of skin in hemizygous and heterozygous patients. *Acta Neuropathol.* **111**, 178-85.
- Neufeld EF. Lysosomal storage diseases. (1991) *Annu Rev Biochem.* **60**, 257-280.
- Ni X, Canuel M, Morales CR. (2006) The sorting and trafficking of lysosomal proteins. *Histol Histopathol.* **21**, 899-913.
- Nolis IK, McKay DJ, Mantouvalou E, Lomvardas S, Merika M, Thanos D. (2009) Transcription factors mediate long-range enhancer-promoter interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 20222-20227.
- Ogbourne S, Antalis TM. (1998) Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J.* **331**, 1-14.
- Oliveira JP, Ferreira S, Reguenga C, Carvalho F, Månsson JE. (2008) The g.1170C>T polymorphism of the 5' untranslated region of the human alpha-galactosidase gene is associated with decreased enzyme expression--evidence from a family study. *J Inherit Metab Dis.* **31**, S405-413.
- Oliveira JP, Ferreira S, Barceló J, Gaspar P, Carvalho F, Sá Miranda MC, Månsson JE. (2008b) Effect of single-nucleotide polymorphisms of the 5' untranslated region of the human  $\alpha$ -galactosidase gene on enzyme activity, and their frequencies in Portuguese caucasians. *J Inherit Metab Dis.* **31**, S247-253.
- O'Mahony C, Elliott P. (2010) Anderson-Fabry disease and the heart. *Prog Cardiovasc Dis.* **52**, 326-335.

- Orteu CH, Jansen T, Lidove O, Jaussaud R, Hughes DA, Pintos-Morell G, Ramaswami U, Parini R, Sunder-Plassman G, Beck M, Mehta AB; FOS Investigators. (2007) Fabry disease and the skin: data from FOS, the Fabry outcome survey. *Br J Dermatol.* **157**, 331-337.
- Paton JC, Paton AW. (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev.* **11**, 450-479.
- Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S. (2001) Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene.* **276**, 73-81.
- Pickering BM, Willis AE. (2005) The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol.* **16**, 39-47.
- Pisani A, Imbriaco M, Zizzo C, Albeggiani G, Colomba P, Alessandro R, Iemolo F, Duro G. (2012) A classical phenotype of Anderson-Fabry disease in a female patient with intronic mutations of the GLA gene: a case report. *BMC Cardiovasc Disord.* **8**, 12:39.
- Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. (2012) The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol.* **199**, 723-734.
- Polson A, Durrett E, Reisman D. (2011) A bidirectional promoter reporter vector for the analysis of the p53/WDR79 dual regulatory element. *Plasmid.* **66**, 169-79.
- Ramaswami U, Whybra C, Parini R, Pintos-Morell G, Mehta A, Sunder-Plassmann G, Widmer U, Beck M; FOS European Investigators. (2006) Clinical manifestations of Fabry disease in children: data from the Fabry Outcome Survey. *Acta Paediatr.* **95**, 86-92.
- Ramaswami U, Parini R, Pintos-Morell G, Kalkum G, Kampmann C, Beck M; FOS Investigators. (2012) Fabry disease in children and response to enzyme replacement therapy: results from the Fabry Outcome Survey. *Clin Genet.* **81**, 485-490.
- Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds T, Saftig P. (2007) LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell.* **131**, 770-783.
- Ries M, Gal A. (2006) Genotype–phenotype correlation in Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS.* Oxford: Oxford PharmaGenesis, Chapter 34.
- Rolfs A, Böttcher T, Zschiesche M, Morris P, Winchester B, Bauer P, Walter U, Mix E, Löhr M, Harzer K, Strauss U, Pahnke J, Grossmann A, Benecke R. (2006) Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet.* **366**, 1794-1796.

Rosenthal D, Lien YH, Lager D, Lai LW, Shang S, Leung N, Ferverza FC. (2004) A novel alpha-galactosidase a mutant (M42L) identified in a renal variant of Fabry disease. *Am J Kidney Dis.* **44**, e85-89.

Sachdev B, Takenaka T, Teraguchi H, Tei C, Lee P, McKenna WJ, Elliott PM. (2002) Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* **105**, 1407-1411.

Saftig P, Klumperman J. (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**, 623-35.

Saifudeen Z, Desnick RJ, Ehrlich M. (1995) A mutation in the 5' untranslated region of the human alpha-galactosidase A gene in high-activity variants inhibits specific protein binding. *FEBS Lett.* **371**, 181-184.

Samiy N. (2008) Ocular features of Fabry disease: diagnosis of a treatable life-threatening disorder. *Surv Ophthalmol.* **53**, 416-423.

Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A. (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science.* **325**, 473-477.

Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA 3rd, Sabnis S, Moore DF, Weibel T, Balow JE, Brady RO. (2001) Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA.* **285**, 2743-2749.

Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419.

Settembre C, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin S, Erdin S, Huynh T, Ferron M, Karsenty G, Vellard MC, Facchinetti V, Sabatini DM, Ballabio A. (2012) A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* **31**, 1095-1108

Settembre C, Arteaga-Solis E, Ballabio A, Karsenty G. (2009) Self-eating in skeletal development: implications for lysosomal storage disorders. *Autophagy.* **5**, 228-229.

Smale ST, Kadonaga JT. (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem.* **72**, 449-479.

Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, Ponzzone A, Desnick RJ. (2006) High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet.* **79**, 31-40.

Spampanato C, Feeney E, Li L, Cardone M, Lim JA, Annunziata F, Zare H, Polishchuk R, Puertollano R, Parenti G, Ballabio A, Raben N. (2013) Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO Mol Med.* **5**, 691-706.

Srinivasan L, Atchison ML. (2004) YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP. *Genes Dev.* **18**, 2596-2601.

Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. (2003) Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat.* **21**, 577-581.

Sugie K, Koori T, Yamamoto A, Ogawa M, Hirano M, Inoue K, Nonaka I, Nishino I. (2003) Characterization of Danon disease in a male patient and his affected mother. *Neuromuscul Disord.* **13**, 708-711.

Tanislav C, Kaps M, Rolfs A, Böttcher T, Lackner K, Paschke E, Mascher H, Laue M, Blaes F. (2011) Frequency of Fabry disease in patients with small-fibre neuropathy of unknown aetiology: a pilot study. *Eur J Neurol.* **18**, 631-636.

Thomas MC, Chiang CM. The general transcription machinery and general cofactors. (2006) *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **41**, 105-178.

Thurberg BL, Rennke H, Colvin RB, Dikman S, Gordon RE, Collins AB, Desnick RJ, O'Callaghan M. (2002) Globotriaosylceramide accumulation in the Fabry kidney is cleared from multiple cell types after enzyme replacement therapy. *Kidney Int.* **62**, 1933-1946.

Togawa T, Kodama T, Suzuki T, Sugawara K, Tsukimura T, Ohashi T, Ishige N, Suzuki K, Kitagawa T, Sakuraba H. (2010) Plasma globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease. *Mol Genet Metab.* **100**, 257-261.

Torra R. (2008) Renal manifestations in Fabry disease and therapeutic options. *Kidney Int Suppl.* **111**, S29-32.

Trinklein ND, Aldred SF, Hartman SJ, Schroeder DI, O'tillar RP, Myers RM. (2004) An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res.* **14**, 62-66.

Tveito G, Hansteen IL, Dalen H, Haugen A. (1989) Immortalization of normal human VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80**, 3734-3737.

Vedder AC, Strijland A, vd Bergh Weerman MA, Florquin S, Aerts JM, Hollak CE. (2006) Manifestations of Fabry disease in placental tissue. *J Inherit Metab Dis.* **29**, 106-111.

Wakano C, Byun JS, Di LJ, Gardner K. (2012) The dual lives of bidirectional promoters. *Biochim Biophys Acta.* **1819**, 688-693.

Wei W, Pelechano V, Järvelin AI, Steinmetz LM. (2011) Functional consequences of bidirectional promoters. *Trends Genet.* **27**, 267-276.

Weidemann F, Krämer J, Duning T, Lenders M, Canaan-Kühl S, Krebs A, González HG, Sommer C, Uçeyler N, Niemann M, Störk S, Schelleckes M, Reiermann S, Stypmann J, Brand SM, Wanner C, Brand E: (2014) Patients with Fabry disease after enzyme replacement therapy dose reduction versus treatment switch. *J Am Soc Nephrol* **25**, 837-849.

Winchester B. (2005) Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology.* **15**, 1R-15R.

Wittkopp PJ, Kalay G. (2011) Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nat Rev Genet.* **13**, 59-69.

Zarate YA, Hopkin RJ. (2008) Fabry's disease. *Lancet.* **372**, 1427-1435.

## 8 Kongressbeiträge

Schelleckes M, Lenders M, Guske K, Schmitz B, Brand SM, Brand E. Characterization and functional analysis of the *GLA* gene promoter and the potential impact on Fabry's disease. 35. Wissenschaftlicher Kongresses der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention. 24.11.2011-26.11.2011 Köln. Posterpräsentation. Auszeichnung: Young Investigator Award.

Schelleckes M, Lenders M, Guske K, Schmitz B, Brand SM, Brand E. Functional analysis of the *GLA* gene promoter region and the potential impact on Fabry's disease. 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT). 19.03.2012–22.03.2012 Dresden. Posterpräsentation.

Schelleckes M, Lenders M, Guske K, Schmitz B, Brand SM, Brand E. Characterization and functional analysis of the *alpha-galactosidase A* gene promoter and the potential impact on Fabry's disease. 22nd European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection. 26.04.2012–29.04.2012 London. Posterpräsentation.

Schelleckes M, Lenders M, Guske K, Schmitz B, Brand SM, Brand E. The *alpha-galactosidase A* gene promoter in Fabry's disease - characterization and functional analysis. 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie. 06.10.2012–09.10.2012 Hamburg. Posterpräsentation.

Schelleckes M, Lenders M, Guske K, Schmitz B, Brand SM, Brand E. Regulation of the *alpha-galactosidase A* gene in Fabry's disease – characterization and functional analysis of the promoter. 36. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL - Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention. 06.12.2012–08.12.2012 Berlin. Posterpräsentation.

Schelleckes M, Lenders M, Duning T, Guske K, Schmitz B, Katona I, Weis J, Brand SM, Brand E. The non-coding genetic variant -10C>T within the regulatory *alpha-galactosidase A* region is associated with Fabry disease-typical neurological manifestations. Kongress für Nephrologie 2013. 5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie. 05.10.2013-08.10.2013 Berlin. Posterpräsentation.

Schelleckes M, Lenders M, Duning T, Guske K, Schmitz B, Ständer S, Metze D, Katona I, Weis J, Brand SM, Brand E. The *alpha-galactosidase A* -10C>T variant in the 5'-untranslated region leads to Fabry disease typical neurological manifestations. 37. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL – Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention. 12.12.2013–14.12.2013 Münster. Posterpräsentation.

## 9 Publikationen

Lenders M, Duning T, Schelleckes M, Schmitz B, Stander S, Rolfs A, Brand SM, Brand E. (2013) Multifocal white matter lesions associated with the D313Y mutation of the  $\alpha$ -galactosidase A gene. *PLoS One*. **8**, e55565.

Schmitz B, Vischer P, Brand E, Schmidt-Petersen K, Korb-Pap A, Guske K, Nedele J, Schelleckes M, Hillen J, Rötrige A, Simmet T, Paul M, Cambien F, Brand SM. (2013) Increased monocyte adhesion by endothelial expression of VCAM-1 missense variation in vitro. *Atherosclerosis*. **230**, 185-190.

Weidemann F, Krämer J, Duning T, Lenders M, Canaan-Kühl S, Krebs A, González HG, Sommer C, Uçeyler N, Niemann M, Störk S, Schelleckes M, Reiermann S, Stypmann J, Brand SM, Wanner C, Brand E: (2014) Patients with Fabry disease after enzyme replacement therapy dose reduction versus treatment switch. *J Am Soc Nephrol* **25**, 837-849.

Schmitz B, Nedele J, Guske K, Maase M, Lenders M, Schelleckes M, Kusche-Vihrog K, Brand SM, Brand E. (2014) Soluble Adenylyl Cyclase in Vascular Endothelium: Gene Expression Control of Epithelial Sodium Channel- $\alpha$ , Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase- $\alpha/\beta$ , and Mineralocorticoid Receptor. *Hypertension*. **63**, 753-761.

Guske K, Schmitz B, Schelleckes M, Duning K, Kremerskothen J, Pavenstädt HJ, Brand SM, Brand E. (2014) Tissue-specific differences in the regulation of KIBRA gene expression involve transcription factor TCF7L2 and a complex alternative promoter system. *J Mol Med*. **92**, 185-196.

Schelleckes M, Lenders M, Duning T, Guske K, Schmitz B, Ständer S, Metze D, Katona I, Weis J, Brand SM, Brand E. Cryptogenic stroke and small fiber neuropathy of unknown etiology in patients with alpha-galactosidase A -10T genotype. *In revision*.



---

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Dr. Dr. Eva Brand für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas sowie für das Vertrauen in meine Arbeit und Person bedanken. Zudem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen vorstellen zu dürfen.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. Wolf-Michael Weber von der biologischen Fakultät der WWU für die Betreuung meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an die Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Dr. Dr. Brand und Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Brand. Den technischen Assistentinnen Birgit Orlowski, Mira Schiwiek und Alois Rötrige danke ich für das bewältigen alltäglicher Laborprobleme und die tollen Gespräche und Diskussion. Mein Dank gilt zudem Dr. Malte Lenders für die tolle Zusammenarbeit beim Fabry Projekt und die gemeinsamen Publikationen sowie Dr. Boris Schmitz für die Unterstützung beim Projekt sowie zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen. Johanna Nedele danke ich für die gemeinsame spaßige Zeit im Labor und die wissenschaftlichen Diskussionen auch außerhalb des Labors (Aasee und Garten grüßen). Ein Dank geht auch an die ehemaligen Kollegen Dr. Dirk Roosterman und Nicole Höcker für die Einführung in das Labor und die Begleitung meiner Arbeit in der Anfangszeit.

Ein herzlichen Dank auch an das Fabry-Team Anne Huster und Jutta Beilker für die tolle und unkomplizierte Zusammenarbeit sowie für den ein oder anderen „Notfallkaffee“. Ebenfalls möchte ich mich bei den Patienten für ihre Unterstützung bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ohne Geschäftszimmer wäre natürlich auch nichts gegangen. Von daher auch an verdientes Dankeschön an Petra Hemker, Melanie Langener und Bettina Seegers für die administrative Unterstützung.

Auch außerhalb der Arbeitsstelle gibt es Menschen bei denen ich mich bedanken möchte. Meine Familie danke ich für die grenzenlose Unterstützung vor, während und hoffentlich auch nach meiner Promotion. Besonderen Dank an Edwin, Petra, Elke, Georg, Max, Anna-Maria und Ava.

Auch möchte ich meinen Jungs aus Büderich und Wesel für die angenehmen Momente abseits der Doktorarbeit danken. Ihr habt es immer geschafft mich positiv abzulenken!

Zuletzt möchte ich einem für mich ganz besonderen Menschen danken. Katrin Guske hat es immer wieder geschafft mich auch in schwierigen Phasen zu motivieren und aufzubauen. Ohne Dich hätte ich das nicht geschafft. Vielen lieben Dank für deine Unterstützung und den Glauben an mich!