

Klinik für Innere Medizin II
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Lammert

**Genetisches und biochemisches Screening auf
Gaucher- und Cholesterinesterspeicher-Krankheit
bei Patienten mit unklarer Hepatosplenomegalie**

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2015

vorgelegt von

Dominik Seifert

geboren am 23.09.1986 in Saarlouis

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Zusammenfassung – Summary	7
2. Einleitung	8
3. Patienten und Methodik	12
3.1 Patientenkollektiv	12
3.2 Genetisches Screening.....	13
3.2.1. Probengewinnung.....	13
3.2.2 DNA-Extraktion	13
3.2.3 Ermittlung der DNA-Quantität und -Qualität.....	14
3.2.4 Allelische Diskriminierung	14
3.2.5. Bestimmung des <i>GBA</i> -Polymorphismus p.L444P SNP	18
3.3 Biochemisches Screening	18
3.3.1 Chitotriosidase-Enzymaktivität	18
3.3.2 Saure Lipase-Enzymaktivität.....	19
3.3.3 β -Glukozerebrosidase-Enzymaktivität	20
3.4 Statistische Analyse.....	20
3.5 Geräte und Reagenzien.....	21
4. Ergebnisse	23
4.1 Patientengut und Patientencharakteristika.....	23
4.1.1 Patientenalter	23
4.1.2 Body Mass Index (BMI).....	24
4.1.3 Hepatosplenomegalie	25
4.2 Genetik	25
4.2.1 <i>GBA</i> -Gen	26
4.2.1.1 p.N370S.....	26
4.2.1.2 p.L444P	26
4.2.2 <i>LIPA</i> -Gen.....	26

4.3 Enzymatik.....	27
4.3.1 Chitotriosidase.....	28
4.3.2 β -Glukozerebrosidase	30
4.3.3 Saure Lipase	32
5. Diskussion	36
6. Literaturverzeichnis.....	40
Danksagung.....	43
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCa	Bias-corrected and accelerated
BMI	Body Mass Index
CBE	Conduritol- β -epoxid
CESD	Cholesterol Ester Storage Disease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E8SJ	Exon 8 Splice-junction
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
H ₀	Nullhypothese
HDL	High Density Lipoprotein
KASP	allelspezifische Gen-Amplifikation
KS-Test	Kolmogorov-Smirnov-Test
LAL, <i>LIPA</i>	Lysosomale saure Lipase
LDL	Low Density Lipoprotein
M	molar (mol/l)
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
VIC	VIC-Fluoreszenzfarbstoff

1. Zusammenfassung – Summary

Morbus Gaucher und Cholesterinester-Speicherkrankheit sind möglicherweise unterdiagnostizierte lysosomale Lipidspeicherkrankheiten, bei denen es aufgrund von Mutationen zum Ausfall eines lysosomalen Enzyms kommt. Beim Morbus Gaucher ist die β -Glukozerebrosidase, bei der Cholesterinester-Speicherkrankheit die lysosomale saure Lipase betroffen. Beide Krankheiten gehen mit einer Hepato- und/oder Splenomegalie einher und führen zu einer Erhöhung des Screening-Parameters Chitotriosidase, eines Makrophagen-Aktivitätsparameters. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter den 201 getesteten Patienten mit unklarer Hepatosplenomegalie in der universitären, hepatologischen Spezialambulanz keine Patienten mit Morbus Gaucher oder Cholesterinester-Speicherkrankheit übersehen wurden. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Aktivität der Chitotriosidase physiologischerweise mit dem Patientenalter zunimmt. Die Aktivität der β -Glukozerebrosidase scheint mit dem Patientenalter abzunehmen. Zur Identifizierung von bisher unerkannten Patienten mit Morbus Gaucher- und der Cholesterinester-Speicherkrankheit muss das Screening bei unklarer Hepatosplenomegalie über die hepatologische Spezialambulanz hinaus auf die Kliniken für Pädiatrie, Kardiologie und Orthopädie ausgeweitet werden. Weiterhin ist die Einführung eines Neugeborenen-Screenings auf Gaucher- und Cholesterinester-Speicherkrankheit zu diskutieren.

Gaucher's and cholesterol ester storage disease probably are underdiagnosed lysosomal lipid storage diseases. On the basis of deleterious mutations the resulting lysosomal enzymes lack activity. In Gaucher's disease β -glucocerebrosidase and in cholesterol ester storage disease the lysosomal acid lipase is affected. Both diseases are associated with hepatomegaly and/or splenomegaly and lead to an increase of the screening parameter chitotriosidase, a macrophage activity parameter. The present study showed that among 201 tested patients with unexplained hepatosplenomegaly no patients with Gaucher's disease or cholesterol ester storage disease were missed in the liver outpatient clinic. Furthermore, it was demonstrated that the activity of chitotriosidase physiologically increases with age. The activity of β -glucosidase appears to decrease with the age of the patients. In order to identify hitherto unrecognized patients with Gaucher's and cholesterol ester storage disease the screening in case of nonspecific hepatosplenomegaly has to be expanded to the pediatrics, cardiology and orthopedics. Furthermore, the introduction of a newborn screening for Gaucher's and cholesterol ester storage disease has to be discussed.

2. Einleitung

Lysosomale Lipidspeicherkrankheiten wie der Morbus Gaucher (M. Gaucher) und die Cholesterinester-Speicherkrankheit (Cholesterol Ester Storage Disease, CESD) sind autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselstörungen, bei denen es durch einen lysosomalen Enzymdefekt zur Akkumulation des entsprechenden Enzymsubstrats kommt. Ursächlich sind häufig Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single Nukleotid Polymorphism, SNP), bei denen es sich um Variationen einzelner Basenpaare in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) handelt. Die Folge der Akkumulation ist eine Zell- und Organvergrößerung mit konsekutivem Zelluntergang und Funktionsverlust in unterschiedlichen Organsystemen [1]. Unbehandelt verlaufen diese Krankheiten progredient und führen meist frühzeitig zum Tod. Eine adäquate Therapie kann, wenn sie rechtzeitig eingeleitet wird, die Prognose aber deutlich verbessern. Als kausaler Therapieansatz steht seit zwei Jahrzehnten die Enzymersatztherapie zur Behandlung des M. Gaucher zur Verfügung [2]. Eine ähnliche Therapie befindet sich derzeit bezüglich der CESD in klinischen Studien [3].

Bei klinischem Verdacht kann als erste Screeningmethode zur Detektion lysosomaler Speicherkrankheiten die zwar wenig spezifische, aber sensitive Bestimmung des Enzyms Chitotriosidase, eines Makrophagen-Aktivitätsparameters, durchgeführt werden [4-6]. Für den M. Gaucher zeigt sich mit einer etwa 600-fachen Erhöhung dieses Markers im Vergleich zur Normalbevölkerung die mit Abstand größte Abweichung von der Norm. Erste Verdachtsmomente ergeben sich ab Werten > 1000 nmol/ml/h. Gleichzeitig kann die Chitotriosidase als Marker für den Therapieerfolg herangezogen werden. Bei erfolgreicher Behandlung des M. Gaucher fällt die Chitotriosidase-Enzymaktivität im Plasma regelhaft und signifikant ab [7]. Aber auch bei der CESD und anderen Lipidspeicherkrankheiten mit gesteigerter Makrophagen-Aktivität ist mit einer deutlichen Erhöhung zu rechnen. Bei der CESD sollten die Messwerte jenseits von 250 nmol/ml/h liegen [6, 8, 9]. Um eine so gestellte Verdachtsdiagnose zu beweisen, wird als Goldstandard in einem weiteren Schritt die verminderte Aktivität des bei der jeweiligen Krankheit betroffenen lysosomalen Enzyms nachgewiesen. Im Falle des M. Gaucher geschieht dies durch Messung der Aktivität der sauren β -Glukozerebrosidase aus Leukozyten. Für die CESD und die Aktivitätsbestimmung der lysosomalen sauren Lipase (lysosomal acid lipase, LAL) sind Trockenbluttests, welche mit Vollblut zu beimpfen sind, erhältlich. Zusätzlich sollte zur Bestätigung eine genetische Untersuchung erfolgen. Histologische Untersuchungen können optional folgen, sind aber zur Diagnosestellung nicht erforderlich [10].

Der M. Gaucher, der erstmals 1882 vom gleichnamigen Medizinstudenten in seiner Dissertationsarbeit beschrieben wurde, ist mit einer Häufigkeit von etwa 1:40.000 die häufigste lysosomale Lipidspeicherkrankheit in Zentraleuropa [11, 12]. Durch die fehlende oder herabgesetzte Aktivität der sauren β -Glukozerebrosidase bleibt die hydrolytische Spaltung der Glukozerebroside in Glukose und

Ceramid aus. Dies führt zur Anreicherung der Glukozerebroside hauptsächlich in den Lysosomen der Zellen des retikuloendothelialen Systems von Milz und Leber, in Osteoklasten, im Knochenmark, seltener auch in Nieren, Herz, Lungen, Konjunktiven und dem Nervensystem [13]. Durch massive Anhäufung des Glukozerebrosids kommt es über bisher noch unklare Mechanismen zu einer ungerichteten Inflammation, welche zusammen mit den sich vergrößernden Makrophagen (Gaucher-Speicherzellen) für die resultierende Organomegalie verantwortlich ist. Im Falle der Milz, welche bei nahezu allen betroffenen Patienten vergrößert ist, kann dies neben Oberbauchschmerzen und der Gefahr einer Milzruptur zu einem Hypersplenismus mit Anämie, Thrombozytopenie und Blutungsneigung führen [14]. Die Verdrängung des fettreichen Knochenmarks resultiert in Knochenschmerzen bis hin zu Schmerzkrisen und vermehrter Knochenbrüchigkeit, wodurch die Lebensqualität der Patienten in unterschiedlichem Maße stark beeinträchtigt wird [15, 16]. Weiterhin gehört zum klinischen Bild der Krankheit häufig eine Fatigue-Symptomatik mit Antriebslosigkeit und Leistungsminderung [17].

Der M. Gaucher kann in drei unterschiedlichen Formen auftreten. Die häufigste Krankheitsmanifestation ist in Europa mit 90-95% der Patienten die nicht-neuronopathische Verlaufsform. Obwohl bei allen Patienten, welche diese Form der Krankheit aufweisen, mindestens eine der aufgeführten Krankheitsmanifestationen nachgewiesen werden kann, fühlen sich weit mehr als die Hälfte subjektiv gesund, was die Diagnosestellung erschwert [14]. Dies ist insbesondere deshalb relevant, da nachgewiesen ist, dass eine frühzeitige Diagnose maßgeblich dazu beiträgt schwerwiegende Krankheitsmanifestationen zu verhindern oder wenigstens langfristig zu reduzieren [18]. Im Falle der akut- (mittleres Überleben 9 Monate [19]) und der chronisch-neuronopathischen Verlaufsform (variabler Verlauf mit Überleben bis ins Erwachsenenalter möglich [20]) kommen neurologische Symptome wie die myoklonische Epilepsie hinzu, was die Prognose wesentlich verschlechtert und bereits in den ersten Lebenswochen bis -monaten zur Diagnose führt [10]. Für die unterschiedlichen Krankheitsmanifestationen sind mehr als 200 verschiedene Punktmutationen im *GBA*-Gen auf Chromosom 1q21 verantwortlich [21]. Es ist hervorzuheben, dass mehr als 70% der Patienten mindestens eine der beiden in der europäischen Bevölkerung häufigsten Mutationen p.N370S oder p.L444P aufweisen [22, 23]. Bei der p.N370S Mutation handelt es sich um einen Austausch der Base Adenin zu Guanin mit der Folge, dass an Aminosäureposition 370 des resultierenden Enzyms Asparagin zu Serin ausgetauscht wird. Diese Mutation gilt als benigne; insbesondere wenn sie homozygot vorliegt, verursacht sie einen milden Verlauf der nicht-neuronopathischen Krankheitsform. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 30 Jahre, wobei auch Fälle von Diagnosen bei über 80-jährigen Patienten beschrieben werden. Es ist davon auszugehen, dass ein nicht unerheblicher Anteil der homozygot Erkrankten nicht diagnostiziert wird [22, 24]. Bei der p.L444P Mutation führt ein Thymin nach Cytosin-Austausch zu einem Protein, welches an Position 444 die Aminosäure Leucin statt Prolin trägt. Diese Mutation ist häufig, aber nicht immer, mit dem

schwerer verlaufenden neuronopathischen Typ der Krankheit assoziiert [22, 25]. Etwa 16kb hinter dem aktiven Gen befindet sich ein Pseudogen, welches sich vom aktiven Gen nur in wenigen Basen unterscheidet und zu 96% homolog ist, was bei der genetischen Diagnostik berücksichtigt werden muss [26].

Insbesondere für die nicht-neuronopathische Verlaufsform des M. Gaucher steht seit Einführung der intravenösen Enzymersatztherapie, welche alle zwei Wochen zu verabreichen ist, eine effektive Möglichkeit zur Behandlung der Krankheit bereit. Unter der in der Regel nebenwirkungsfreien, aber sehr teuren Therapie mit der modifizierten β -Glukozerebrosidase bilden sich zumeist alle Symptome der Krankheit in unterschiedlichem Ausmaß zurück [17]. Zumindest für die extraneuronopathischen Symptome der chronisch-neuronopathischen Verlaufsform gilt eine Symptombesserung unter Enzymersatztherapie ebenfalls als gesichert [27].

Bei der CESD, welche erstmals 1956 und 1963 von Wolman und Fredrickson beschrieben wurde [28, 29], handelt es sich um eine ebenfalls autosomal rezessiv vererbte lysosomale Lipidspeicherkrankheit mit Ablagerungen von Cholesterinestern und Triglyceriden in Leber, Milz und anderen Organen [30]. Sie wird durch über 40 Mutationen im lysosomale saure Lipase-Gen (lysosomal acid lipase, *LIPA*) auf Chromosom 10q23.2-23.3, welches für die LAL kodiert, verursacht [31, 32]. Bei fehlender Enzymrestaktivität manifestiert sich die Krankheit bereits im Kleinkindesalter, wobei man dann von der stets fatal verlaufenden Wolman-Krankheit spricht, welche meist innerhalb des ersten Lebensjahres zum Tode führt. Bei teilweise erhaltener Enzymrestaktivität manifestiert sich die Krankheit häufig erst im Erwachsenenalter. In diesem Fall wird die Krankheit als CESD bezeichnet. Auch die CESD geht mit einer eingeschränkten Lebenserwartung einher, die Patienten erreichen häufig aber das fünfzigste Lebensjahr [33]. Der Mangel an LAL bewirkt eine verminderte Hydrolyse von lysosomal gespeicherten Triglyceriden und Cholesterinestern, was primär einen intrazellulären Cholesterinmangel verursacht [34]. Gegenregulatorisch werden die Cholesterinsynthese und die Low Density Lipoprotein (LDL)-Rezeptoraktivität gesteigert, was sekundär in einer Cholesterinüberladung der Zelle resultiert und zur Bildung von sogenannten Lipidvakuolen führt. In der Folge kommt es zu einem Funktionsverlust der Hepatozyten und konsekutiv zu Zelluntergang und Fibrose [35]. Bei nahezu allen bisher beschriebenen Patienten (99%) ist die Leber vergrößert, eine Splenomegalie wurde in drei Viertel der Fälle (74%) gefunden. Die Hepatomegalie kann einziges Symptom sein. Ein Drittel der beschriebenen Patienten zeigt in der Leberbiopsie eine feinknotige Zirrhose [30, 36]. Weiterhin ist die Krankheit durch Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie und einen High density lipoprotein (HDL)-Mangel gekennzeichnet, wodurch sich das kardiovaskuläre Risiko erhöht [37, 38]. Das erhöhte kardiovaskuläre Risiko ist im Falle der CESD bereits bei heterozygot Erkrankten relevant [39]. In der Literatur sind aktuell nur 135 CESD-Patienten beschrieben worden [30]. Damit handelt es sich bei der CESD um eine Stoffwechselstörung, die aufgrund ihrer Seltenheit meist nicht als Differentialdiagnose in Betracht gezogen wird. Die Lebermanifestationen werden möglicherweise fälschlich als nicht-

alkoholische Steatohepatitis (NASH) oder kryptogene Zirrhose eingestuft [40]. In circa 50% der Fälle ist eine Exon 8 splice-junction (E8SJ)-Mutation auf einem oder auf beiden Allelen des *LIPA*-Gens zu detektieren. In einer großen deutschen Studie wurde die Heterozygotenfrequenz für diese Mutation mit 1:200 bestimmt [41]. Alleine in Deutschland wären demnach etwa 100 homozygote Träger dieser Mutation zu erwarten. Unter Einbeziehung aller Mutationen und der Compound heterozygoten Patienten erhöht sich diese Zahl auf bis zu 400 [41]. Die E8SJ-Mutation führt zu einem Austausch der Base Guanin zu Adenin an Position -1 der Spleiß-Donor Stelle des Exons 8, wodurch das gesamte Exon herausgespleißt wird [42]. Das resultierende Protein ist daher 24 Aminosäuren kürzer und hat keine enzymatische Aktivität. Dennoch wird eine Restenzymaktivität von 2-8% beobachtet, da neben den inkorrekt gespleißten messenger-Ribonukleinsäuren (mRNA) auch einige Wildtyp mRNAs entstehen [30, 33, 42].

Da die Enzymersatztherapie bislang noch nicht zugelassen ist, stehen therapeutisch die Minimierung der rezeptorvermittelten Cholesterinaufnahme durch medikamentöse Maßnahmen wie auch diätetische Bestrebungen im Sinne einer Substratreduktionstherapie im Vordergrund.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu überprüfen, ob in einer hepatologischen Spezialambulanz unter den Patienten mit unklarer Hepato- und/oder Splenomegalie Fälle von M. Gaucher oder CESD vorhanden, aber bislang nicht diagnostiziert sind, da es hierzu derzeit keine Daten gibt. Weiterhin sollte erfasst werden, wie sich dieses Patientenkollektiv bezüglich biometrischer Merkmale sowie genetischer und biochemischer Parameter zusammensetzt. Hinsichtlich der biochemischen Untersuchung galt der Chitotriosidase als möglichem Screening-Parameter in diesem Patientenkollektiv das besondere Interesse. Darüber hinaus sollte überprüft werden, wie sich die Enzymaktivitäten des Screening-Parameters Chitotriosidase und auch die Werte der krankheitsursächlichen Enzyme β -Glukozerebrosidase und saure Lipase mit dem Alter der Probanden verändern. Zu diesem Zwecke sollten im untersuchten Zeitraum möglichst alle Patienten, welche das Einschlusskriterium einer unklaren Hepato- und/oder Splenomegalie erfüllen, untersucht werden.

3. Patienten und Methodik

3.1 Patientenkollektiv

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben entstammen Patienten, die in der Zeit von April 2010 bis Januar 2014 eine Ultraschalluntersuchung der Bauchorgane in der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg erhalten haben. Die Ultraschalldiagnostik wurde mit dem Ultraschall Diagnostic Scanner EUB-8500 der Firma Hitachi Medical Corporation Tokyo, Japan unter Verwendung der zugehörigen Software (Version: V16-03A Step6) durchgeführt.

Das Patientenkollektiv umfasste hierbei sowohl die Patienten, die sich mit unklarer Splenomegalie, unklarer Hepatomegalie oder unklarer Hepatosplenomegalie vorstellten. Die Diagnose einer Splenomegalie wurde ab einem Messwert der Milz von ≥ 110 Millimetern im größten Durchmesser vergeben, wobei jeder Untersucher die Milzgröße im Anschluss an die Messung als „leicht“, „mittelgradig“ oder „ausgeprägt“ klassifiziert hat. Die Größe der Leber wurde anhand klinischer Erfahrung in der Sonografie eingeschätzt. Um von einer unklaren Organvergrößerung sprechen zu können, wurden folgende Ausschlusskriterien definiert:

- ◆ nutritiv-toxische Leberzirrhose
- ◆ Infektionskrankheiten (insbesondere chronische Virushepatitiden)
- ◆ Malignome
- ◆ metabolische Leberkrankheiten (Hämochromatose, α -1-Antitrypsin-Mangel, Morbus Wilson)
- ◆ portale Hypertension anderer Ursache
- ◆ chronische entzündliche Gallenwegserkrankungen (primär biliäre Zirrhose, sklerosierende Cholangitis)
- ◆ Budd-Chiari-Syndrom

Die Durchführung dieser Studie wurde von der Ethikkommission der Universität des Saarlandes genehmigt (Kennnummer des Ethikantrags 271/11). Allen in dieser Zeit untersuchten Patienten, welche die Einschlusskriterien der unklaren Hepato- und/oder Splenomegalie erfüllten, wurde unabhängig von der Indikation zur Sonografie die Teilnahme an der Studie angeboten. Die 201 Teilnehmer wurden über den wissenschaftlichen Hintergrund der Studie, über das geplante Vorgehen bei Einwilligung und über Konsequenzen eines positiven Befundes informiert. Eine genetische Beratung wurde bei entsprechend positivem Befund angeboten und unter Beachtung der Anforderungen des Gendiagnostikgesetzes durchgeführt.

3.2 Genetisches Screening

3.2.1. Probengewinnung

Zum Zwecke der Genotypisierung wurde allen in die Studie eingeschlossenen Patienten eine EDTA-Monovette Blut entnommen. Das Blut wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Aus diesen Proben wurde die DNA isoliert, um im Anschluss die zwei Varianten im *GBA*-Gen sowie die Mutation im *LIPA*-Gen zu bestimmen.

3.2.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Isolierung erfolgte unter Verwendung des DNA Blood Mini Kits der Firma Qiagen. Das Verfahren basiert auf der Bindung der DNA an Silika-Gelmembranen und auf der Verwendung von Puffern zur Entfernung von Salzurückständen. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

Tabelle 1: Protokoll für die DNA-Isolierung

Schritte	Durchführung
Lyse	20 µl QIAGEN Protease in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettieren 200 µl Blut und 200 µl Puffer AL hinzugeben 15 sec vortexen 10 min bei 56 °C inkubieren 5 sec bei 8000 U/min zentrifugieren 200 µl 96-100%igen Ethanol hinzufügen erneut 15 sec vortexen anschließend 5 sec bei 8000 U/min zentrifugieren
Bindung	Gemisch in 2 ml QIAamp Mini Zentrifugenröhrchen (beinhaltet Trennsäule) überführen 1 min bei 8000 U/min zentrifugieren Trennsäule in ein neues 2ml Auffangröhrchen setzen Durchfluss verwerfen
1. Waschen	500 µl AW1 Puffer zumischen 1 min bei 8000 U/min zentrifugieren Trennsäule in ein neues 2 ml Auffangröhrchen setzen Durchfluss verwerfen
2. Waschen	500 µl AW2 Puffer zumischen 3 min bei 13000 U/min zentrifugieren Trennsäule in ein neues 2ml Auffangröhrchen setzen Durchfluss verwerfen Im Anschluss erneut 1 min bei 13000 U/min zentrifugieren
Elution	Trennsäule in 1,5 ml Reaktionsgefäß setzen 100 µl AE Puffer auf die Säule pipettieren 1 min bei Raumtemperatur inkubieren 1 min bei 8000 U/min zentrifugieren
Lagerung	Reaktionsgefäß mit DNA-Lösung im Kühlschrank bei 4 °C lagern

3.2.3 Ermittlung der DNA-Quantität und -Qualität

Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop ND/1000 Spektralphotometers der Firma PeqLab unter Zuhilfenahme der zugehörigen Software ermittelt. Der NanoDrop misst die Absorption durch die Probe bei unterschiedlichen Wellenlängen. Die Nulllinie wird durch den Absorptionswert der Probe bei 340 nm festgelegt. Die Konzentration der DNA-Lösung wird bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Aus der Absorption (A) der Lösung kann die DNA-Konzentration errechnet werden. Für doppelsträngige DNA gilt:

$$A_{260} = 1 \hat{=} 50 \mu\text{g/ml DNA}$$

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde die DNA-Konzentration gegen den AE Puffer aus dem DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen bei einer Wellenlänge von 260 nm (Nukleinsäure Absorption) und 280 nm (Protein Absorption) gemessen. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gilt dementsprechend als Maß für die Reinheit der DNA und sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Deutlich höhere Werte deuten beispielsweise auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolen hin. Diese Messungen wurden stets unmittelbar nach der Gewinnung der DNA durchgeführt und protokolliert. Hierzu wurde der NanoDrop mittels H₂O dest. initialisiert und zur Leerwert-Bestimmung der AE Puffer verwendet. Zur Messung wurden im Anschluss jeweils 1 µl einer Patienten-Probe auf die Messfläche des Spektralphotometers pipettiert und die Messung gestartet.

3.2.4 Allelische Diskriminierung

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation von definierten DNA Abschnitten. Es handelt sich um eine enzymatisch katalysierte temperaturgesteuerte Kettenreaktion, die neben einer DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotiden und einer DNA-Matrize auch Oligonukleotide (Primer) benötigt. Diese Primer müssen eine zu dem 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Stücks komplementäre Sequenz besitzen. Die PCR gliedert sich in drei Schritte, die bis zu 40-mal hintereinander durchlaufen werden.

Denaturierung: Die doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen auf 95°C in ihre Einzelstränge aufgetrennt.

Anlagerung: Die Temperatur wird auf 50-60°C (primerabhängig) abgesenkt, damit sich die Primer komplementär an die einzelsträngige Matrizen-DNA anlagern können.

Elongation: Verlängerung der hybridisierten Primer komplementär zum Matrizen-Strang durch die hitzestabile DNA-Polymerase bei 72°C.

Die allelische Diskriminierung mittels *TaqMan*-PCR vereint die Methode der herkömmlichen PCR mit der Möglichkeit, SNPs durch fluoreszenzbasierte Echtzeitanalyse zu detektieren. Zusätzlich zu den PCR-Primern benötigt man spezifisch markierte Sonden, welche komplementär zum jeweiligen SNP-Bereich sind (Abb. 1). Diese Sonden besitzen am 5'-Ende einen fluoreszierenden Detektorfarbstoff (D) und am 3'-Ende einen so genannten Quencher (Q). Die räumliche Nähe des Quenchers zum Detektorfarbstoff verhindert ein vorzeitiges Fluoreszenzsignal, indem er die vom Farbstoff freigesetzte Energie absorbiert. Wird nun im Laufe der PCR die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase abgebaut, befindet sich der Quencher nicht mehr in räumlicher Nähe zum Fluoreszenzfarbstoff, und es entsteht eine messbare Fluoreszenz (Abb. 2). Die Messung des Fluoreszenzsignals findet am Ende jeder Elongationsphase statt, wobei die Intensität des Signals proportional zum entstehenden PCR-Produkt ansteigt. Um normale von mutierten Allelen unterscheiden zu können, werden zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sonden verwendet: VIC-Fluoreszenzfarbstoff der Firma ABI (VIC) und 6-Carboxy-Fluorescein (FAM).

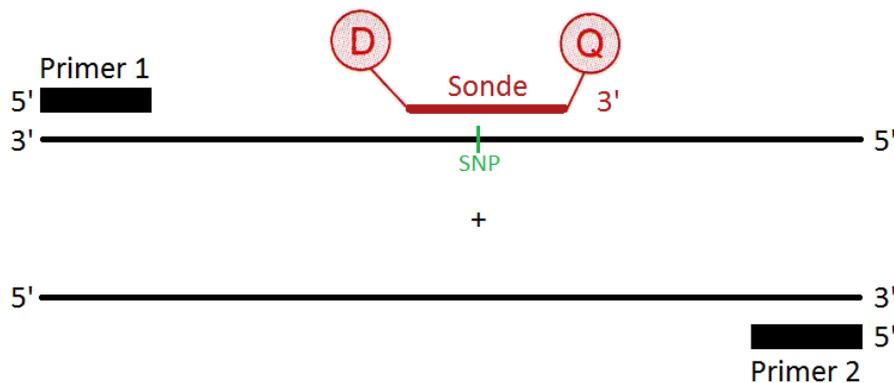


Abb. 1:Primer/Sonden-Bindung (Abbildung modifiziert nach Lottspeich, Engels: *Bioanalytik 2.*

Auflage, S. 708)

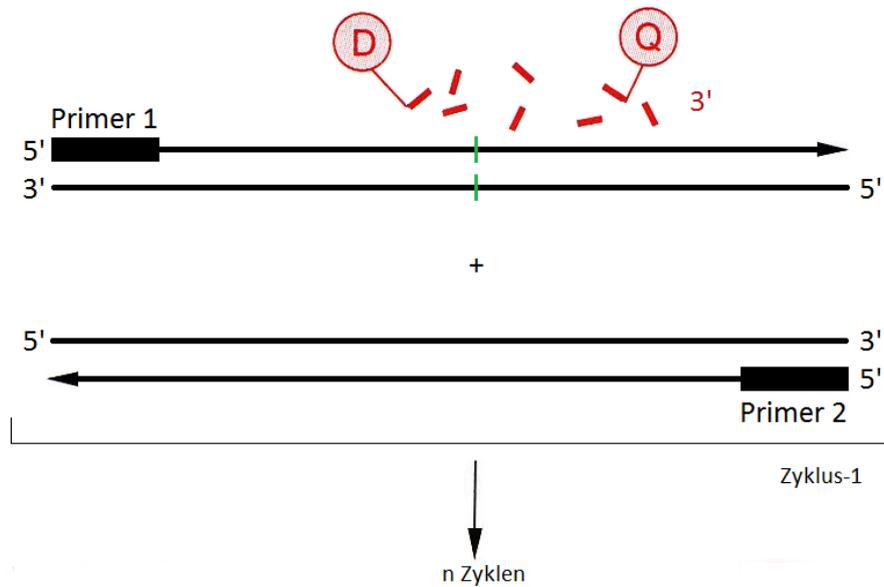


Abb.2: Elongationsabschluss (Abbildung modifiziert nach Lottspeich, Engels: *Bioanalytik* 2. Auflage, S. 708)

Für die vorliegende Studie wurde die aus dem Vollblut der Studienteilnehmer extrahierte DNA mittels *TaqMan*-Analyse auf zwei Mutationen hin untersucht, einerseits die p.N370S Mutation des *GBA*-Gens und zum anderen die E8SJ-Mutation im *LIPA*-Gen. Aus diesen Mutationen ergeben sich folgende Sequenzen für die verwendeten Sonden:

<i>GBA</i> -N370S WT	5'- <u>FAM</u> -CTT ACC CTA GAA CCT CCT G-3'
<i>GBA</i> -N370S MUT	5'- <u>VIC</u> -CTT ACC CTA GAG CCT CCT G-3'
<i>LIPA</i> -E8SJ WT	5'- <u>VIC</u> -TGG AGC CAG GTA GGC-3'
<i>LIPA</i> -E8SJ MUT	5'- <u>FAM</u> -TGG AGC CAA GTA GGC-3'

Zur Amplifikation der DNA wurden nachstehende Primer verwendet:

<i>GBA</i> -N370S F	5'-GTG ACC CTT ACC TAC ACT CTC T-3'
<i>GBA</i> -N370S R	5'-GGT TCA GGG CAA GGT TCC-3'
<i>LIPA</i> -E8SJ F	5'-CTG GAA CTT CTG TGC AAA ACA TGT-3'
<i>LIPA</i> -E8SJ R	5'-CCC CAA ATG CAC TCC TGG AA-3'

Die *TaqMan*-PCR wurde in 96 well fast PCR Platten durchgeführt. Ein Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 2: Pipettierschema zur TaqMan-PCR

	<i>GBA</i> p.N370S	<i>LIPA</i> p.E8SJ
	Menge [μ l]	Menge [μ l]
2x GTXpressMastermix (fast)	5	5
Sonde VIC (10 μ M)	0,2	0,2
Sonde FAM (10 μ M)	0,2	0,2
Primer F (10 μ M)	0,9	0,9
Primer R (10 μ M)	0,9	0,9
H ₂ O	0,8	0,8
DNA (5-50 ng)	2	2

Folgender Temperaturverlauf wurde verwendet:

Tabelle 3: PCR Programm zur TaqMan-PCR

Primäre Denaturierung	95 °C	10 min	1 Zyklus
Denaturierung	92 °C	15 s	40 Zyklen
Anlagerung/Elongation	60 °C	1 min	

Die Ergebnisse der allelischen Diskriminierung wurden mit der SDS Software (Applied Biosystems, Version 2.0.6) ausgewertet (Abb. 3).

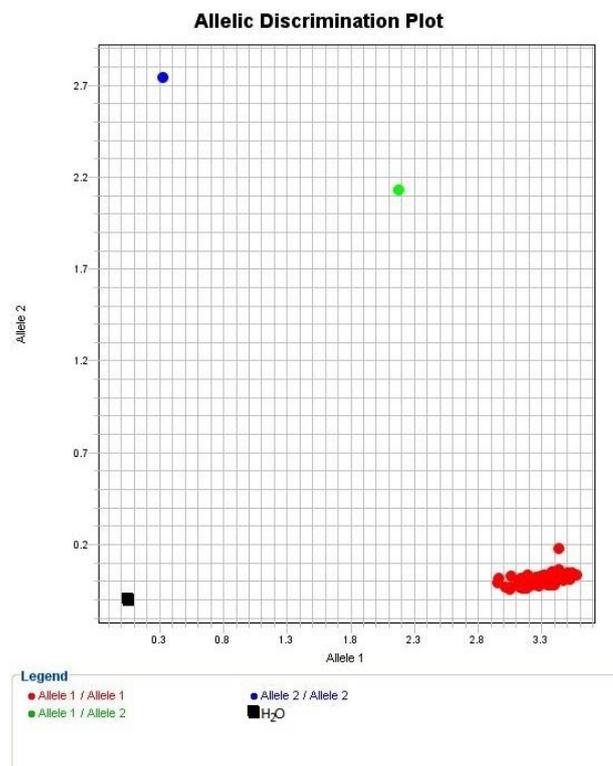


Abb. 3:Ergebnisdiagramm der allelischen Diskriminierung. Das Diagramm zeigt beispielhaft die Ergebnisse der SNP-Genotypisierung der E8SJ Mutation im *LIPA*-Gen. In blau ist die Mutante (FAM), in grün ist eine heterozygote Probe (VIC/FAM) und in rot sind mehrere Wildtypen (VIC) zu erkennen.

3.2.5. Bestimmung des *GBA*-Polymorphismus p.L444P SNP

Da das Gaucher-Pseudogen an der Stelle des p.L444P SNPs die gesuchte Mutation trägt (Abb. 4) erscheinen in der *TaqMan*-Analyse alle Patienten als heterozygot. Die Analyse des *GBA* p.L444P SNPs wurde deshalb mittels kompetitiver allelspezifischer Gen-Amplifikation (KASP) durchgeführt. Der Nachweis der Nukleinsäurevariante erfolgte hierbei mittels fluoreszenzbasierter Endpunkt-Genotypisierung. Hierfür wurden zwei kompetitive allelspezifische *forward*- und ein gemeinsamer *reverse*-Primer verwendet. Aufgrund der oben beschriebenen Gen/Pseudogen Problematik wurde vor der Analyse ein vergleichsweise großes genspezifisches PCR-Produkt von ca. 1700 Basenpaaren amplifiziert. Die Fluoreszenz- beziehungsweise Lichtsignale wurden rechnergestützt analysiert und klassifiziert. Die Analyse der DNA erfolgte im Zentrum für Humangenetik in Frankfurt am Main (bio.logis).

GBA-Gen

```
GCTGGTTGCCAGTCAGAAGAACGACCTGGACGCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTCCTGTTGT
GGTCGTGCTAAACCGGTGAGGGCAATGGTGAGGTCTGGGAA
```

GBAP-Gen

```
GCTGGTTGCCAGTCAGAAGAACGACCCGGACGCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTCCTGTTGT
GGTCGTGCTAAACCGGTGAGGGCAATGGTGAGGTCTGGGAA
```

Abb. 4: Dargestellt ist die Basensequenz um den p.L444P SNPs im *GBA*-Gen (oben) und der entsprechende Bereich im Pseudogen (unten). In rot markiert sind die Unterschiede zwischen Gen und Pseudogen. Es fällt auf, dass das markierte Thymin im *GBA*-Gen, welches die p.L444P SNP-Stelle darstellt, im Pseudogen gegen ein Cytosin ausgetauscht ist. Im *GBA*-Gen entspricht diese Base der Mutation.

3.3 Biochemisches Screening

Bei 146 Studienteilnehmern wurde zusätzlich zum genetischen Screening ein biochemisches Screening durchgeführt.

3.3.1 Chitotriosidase-Enzymaktivität

146 Patienten wurde eine EDTA-Blutmonovette zur Bestimmung der Chitotriosidase-Aktivität abgenommen. Zur Aktivitätsmessung wurden 5 µl EDTA-Blut mit 100 µl 4 MU-Chitotriosidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) als Substrat in einem Citrat- / Phosphat-Puffer (0,1 / 0,2

mol/l) bei einem pH von 5,2 und einer Temperatur von 37°C inkubiert. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Hinzugabe von 2 ml eines Glycin- / Natriumhydroxid-Puffers bei pH 10,6 gestoppt und die Substrataktivität mittels Fluorimeter bei 445 nm gemessen. Hierbei galt es zu beachten, dass 6% der Bevölkerung dieses Enzym aufgrund einer Mutation nicht exprimieren und deshalb keine Enzymaktivität aufweisen [43]. Diese sogenannten Nullmutanten wurden zusammen mit denen, die auffällig hohe Werte aufwiesen, nachkontrolliert. Hierzu wurde entweder die Bestimmung der Chitotriosidase wiederholt oder die Enzymaktivitäten der entsprechend vermuteten Stoffwechselstörung direkt gemessen.

Die Bestimmung der Chitotriosidase-Enzymaktivität wurde durch die Universitätskinderklinik in Mainz durchgeführt.

3.3.2 Saure Lipase-Enzymaktivität

Bei 101 Patienten wurde die Aktivität der LAL mittels Trockenblutanalyse (Whatman 903 Trockenblutkarten) ermittelt. Hierzu wurde Frischblut auf die vorgesehenen Filterpapier-Felder der Analysekarte aufgebracht und bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss wurde ein 3,2 mm großer Abschnitt aus dem Filterpapier entnommen und mit 200 µl Aqua dest. für eine Stunde bei Raumtemperatur gemischt. Für jede Probe wurde jeweils ein Doppelwert einer nicht-inhibierten und einer inhibierten Reaktion gemessen (vier Ansätze pro Probe). Dazu wurden 40 µl des Gemisches in einer 96 well Platte mit 10 µl H₂O (nicht-inhibiert) oder 10 µl 30 µM Lalistat 2 (inhibiert) gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Substrat-Puffer Lösung (14 ml 0,15 M Acetat-Puffer (pH 4,0), 1% Triton X-100, vorgeheizt auf 37°C + 1 ml 0,5% (w/v) Cardiolipin in Methanol, 400 µl 13,3 mM 4mU Palmitat in Dimethylsulfoxid) hinzugegeben und nach kurzem Mischvorgang drei Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 100 µl 15 mM HgCl₂ hinzugegeben. Die Fluoreszenz (Excitation 355nm, Emission 460nm) wurde mittels Wallac Victor 2 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, Cambridge, Cambridgeshire, UK) gemessen. Die LAL Aktivität (nmol/spot*3h) ergibt sich aus dem Subtraktionsprodukt aus nicht-inhibierter Reaktion (Gesamt-Lipase) und inhibierter Reaktion (alle Lipase-Isoformen mit Ausnahme der LAL). Auffällige Ergebnisse wurden mittels erneuter Trockenblutanalyse überprüft.

Die Enzymaktivität wurde durch das Stoffwechsellabor der Universitätskinderklinik Hamburg-Eppendorf gemessen.

3.3.3 β -Glukozerebrosidase-Enzymaktivität

In aus heparinisiertem Blut gewonnenen Leukozyten wurde bei 32 Patienten die saure β -Glukozerebrosidase bestimmt. Zur Abgrenzung der β -Glukozerebrosidase von der unspezifischeren β -Glukosidase wurde parallel zum normalen Enzymassay ein inhibierter Ansatz mitgeführt. Dieser inhibierte Ansatz enthält Conduritol- β -epoxid (CBE), das die β -Glukozerebrosidase spezifisch hemmt. Die β -Glukozerebrosidaseaktivität ergibt sich durch die Differenz der beiden Reaktionen.

Zur Isolation der Leukozyten wurden 50 μ l des heparinisierten Blutes mit 5 ml einer hypotonen NaCl-Lösung (0,2 g/ 100 ml) versetzt und mehrere Male durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurden 1,5 ml einer weiteren NaCl-Lösung (3,6 g/ 100 ml) hinzugegeben und erneut invertiert, um wieder isotonische Bedingungen herzustellen. Durch diese Prozedur wurden die meisten Erythrozyten lysiert. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Die Leukozyten sammeln sich dabei als festes Pellet an der Seite des Reaktionsgefäßes, während die noch intakten Erythrozyten ein großes loses Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes bilden. Sowohl der hämoglobinhaltige Überstand als auch das lose Erythrozytenpellet wurden vorsichtig mittels einer Pasteurpipette abgesaugt. Die so erhaltenen Leukozyten wurden zur Messung der β -Glukozerebrosidaseaktivität eingesetzt.

Zu den Leukozyten wurden 100 μ l einer Lösung, bestehend aus 10 mM 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glukopyranosid, 1,2 % (w/v) Natriumtaurocholat und 20 mM Natriumacetat (pH 5,5) und im Fall der inhibierten Reaktion 6,2 mM CBE, hinzugegeben und mittels Vortexer gemischt. Der Ansatz wurde unter leichtem Schütteln eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml 0,2 M Glycin-Ammoniumhydroxid-Puffer (pH 10,5) abgestoppt. Nach Mischen wurde die Lösung in ein 10 x 75 mm Borosilikatglas-Reaktionsgefäß überführt. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Fluorometers, der Firma Turner Associates, California, USA mit der Modellnummer 111 ermittelt. Für jede Patientenprobe wurde eine Doppelmessung durchgeführt. Die β -Glukozerebrosidaseaktivität wurde in nmol/mg/h angegeben.

Die β -Glukozerebrosidase-Enzymaktivität wurde durch die Universitätskinderklinik in Mainz gemessen.

3.4 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen für die vorliegenden Daten wurden mittels IBM SPSS Statistics (Version 20) der Firma IBM, New York, USA durchgeführt. Zur Überprüfung einer möglichen Assoziation zwischen den gemessenen Enzymaktivitäten und dem Lebensalter, wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests (KS-Test) wurden die abhängigen Variablen auf Normalverteilung hin überprüft. Die Nullhypothese (H_0) wurde in der Art

formuliert, als dass die getestete Variable aus der normalverteilten Grundgesamtheit stammt. Ab einem $p < 0,05$ wurde H_0 abgelehnt. Waren die Enzymaktivitäten nicht normalverteilt wurde die lineare Regression mithilfe von Bootstrapping (Anzahl der Bootstrap-Stichproben: 5000) im Hinblick auf die Unsicherheit der Regressionsschätzung korrigiert (Bias-corrected and accelerated (BCa)-Konfidenzintervalle). Auch hier wurde ein Signifikanzniveau von 5% ($p < 0,05$) verwendet.

Zur statistischen Auswertung wurde eine Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und medizinische Informatik der Universität des Saarlandes, Homburg in Anspruch genommen.

3.5 Geräte und Reagenzien

DNA-Extraktion:

QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
- Qiagen Protease	
- Puffer AL	
- Puffer AW1	
- Puffer AW2	
- Puffer AE	
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf
Pulse Vortexer Vibra Mix	Denley
Pipetten 2, 5, 10, 20, 100, 200 μ l	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
2 ml Collection Tubes	Qiagen
Spin Columns	Qiagen

TaqMan-PCR:

TaqMan Real Time PCR 7500 fast	Applied Biosystems
--------------------------------	--------------------

3. Patienten und Methodik

96 well fast PCR Platten	Sarstedt
MicroAMP Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
<i>TaqMan</i> GTXpress Master Mix	Applied Biosystems
Sonden VIC und FAM	Applied Biosystems
Primer	Thermo Fisher Scientific
Aqua bidest. „LiChrosolv“	Merck

Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit:

NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	peQLab Biotechnologie GmbH
Pulse Vortexer Vibra Mix	Denley
Pipette 2,5 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
Präzisionswischtücher Kimtech science	Kimberly-Clark Professional

4. Ergebnisse

4.1 Patientengut und Patientencharakteristika

Insgesamt konnten 201 Patienten mit unklarer Hepato- und/oder Splenomegalie entsprechend der Ausschlusskriterien in die Studie aufgenommen werden. Die Ansprechrate auf die Einladung zur Teilnahme an der Studie betrug circa 45%.

4.1.1 Patientenalter

Das Alter der Patienten im Gesamtkollektiv lag zwischen 21 und 83 Jahren (Abb. 4), entsprach annähernd der Normalverteilung und betrug durchschnittlich 54,1 Jahre (Median 55 Jahre) mit einer Standardabweichung von 15,5 Jahren. Das Patientengut setzte sich aus 132 Männern (65,7%) und 69 Frauen (34,3%) zusammen. Das Alter der männlichen Patienten reichte bei einem durchschnittlichen Alter von $52,4 \pm 15,4$ Jahren von 21 bis 81 Jahre. Die Altersspannweite bei den weiblichen Patienten betrug 21 bis 83 Jahre (Durchschnitt $57,3 \pm 15,3$ Jahre).

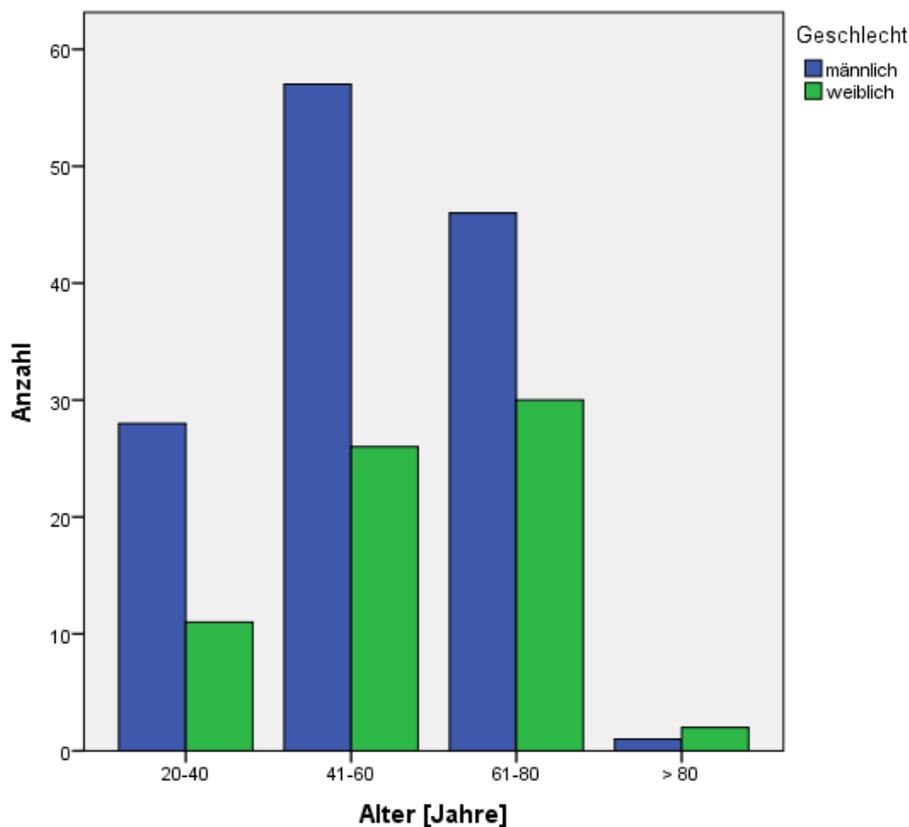


Abb. 4: Balkendiagramm: Altersverteilung im Patientenkollektiv, aufgetrennt nach Männern und Frauen

4.1.2 Body Mass Index (BMI)

Der BMI im Kollektiv (Abb. 5) wies einen Mittelwert von 29,2 kg/m² bei einer Standardabweichung von 5,7 kg/m² auf und entsprach, bei einem Median von 28,0 kg/m², annähernd der Normalverteilung. Der Minimalwert betrug 15,2 kg/m² und der Maximalwert 50,0 kg/m², woraus sich eine Spannweite von 34,8 kg/m² ergibt. Getrennt nach Männern und Frauen resultieren folgende Werte in Tabelle 4.

Tabelle 4: BMI aufgeteilt nach Männern und Frauen

	Männer	Frauen
Mittelwert	29,4	28,8
Standardabweichung	5,9	5,2
Minimum	15,2	16,6
Maximum	50,0	46,1
Spannweite	34,8	29,5

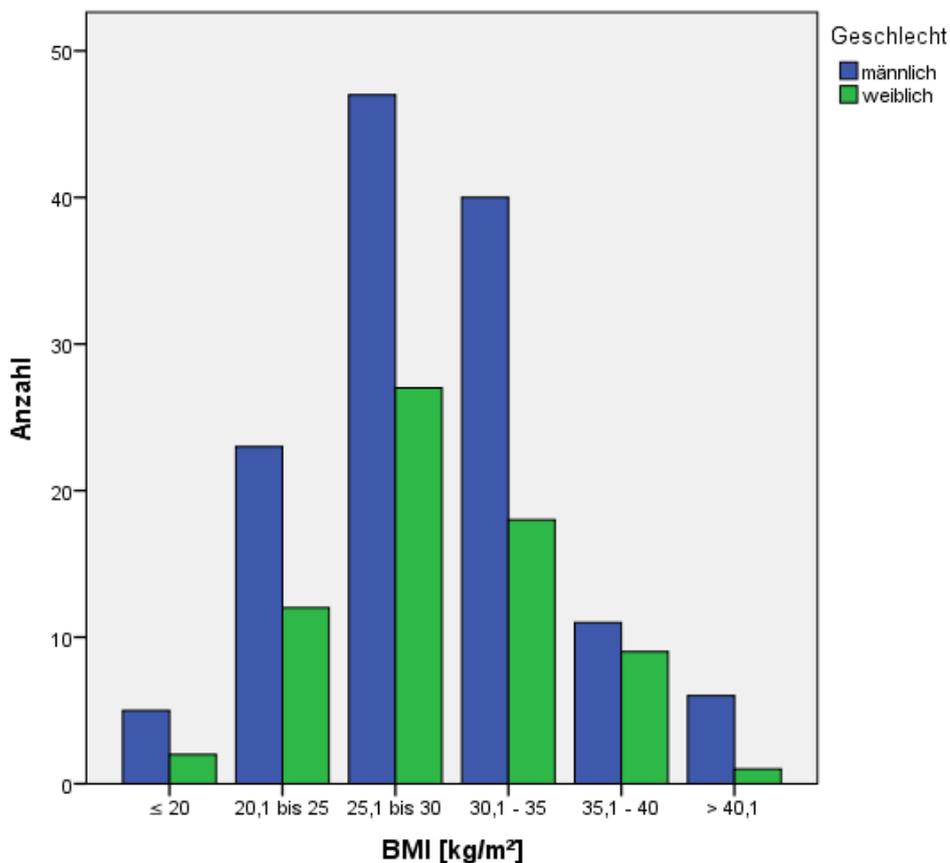


Abb. 5: Balkendiagramm: BMI, aufgetrennt nach Männern und Frauen

4.1.3 Hepatosplenomegalie

Tabelle 6 fasst die Daten zur Hepatosplenomegalie zusammen. Im untersuchten Patientenkollektiv wiesen insgesamt 136 Patienten (67,7%) eine Milzgröße von mehr als 110 mm im größten Durchmesser auf und erhielten deshalb die Diagnose einer Splenomegalie. Entsprechend hatten 65 Studienteilnehmer (32,3%) eine normal große Milz. Die Splenomegalie wurde von den Untersuchern wie folgt näher eingestuft (Tabelle 5).

Tabelle 5: Ausmaß der Splenomegalie

	Häufigkeit	Prozent
Keine	65	32,3
Leicht	95	47,3
Mittelschwer	38	18,9
Ausgeprägt	3	1,5

Die Diagnose einer Hepatomegalie vergaben die Untersucher an 100 Patienten (49,8%), wohingegen 101 Teilnehmer (50,1%) hier normale Werte aufwiesen. Eine kombinierte Hepatosplenomegalie wurde bei 35 der Untersuchten (17,4%) diagnostiziert, eine isolierte Splenomegalie wiesen 101 Patienten (50,1%) auf, und eine isolierte Hepatomegalie wurde bei 65 Patienten (32,3%) beschrieben.

Tabelle 6: Verteilung Hepatosplenomegalie

	Häufigkeit	Prozent
Splenomegalie	136	67,7
Hepatomegalie	100	49,8
Hepatosplenomegalie	35	17,4
Isolierte Splenomegalie	101	50,1
Isolierte Hepatomegalie	65	32,3

4.2 Genetik

Tabelle 7 fasst die Ergebnisse der Genetik zusammen. Dieser sind die Häufigkeitsverteilungen der untersuchten SNPs hinsichtlich der Ausprägungen homozygoter Wildtyp, heterozygot und homozygote Mutante zu entnehmen.

Tabelle 7: Genetische Untersuchungen

	Homozygot Wildtyp	Heterozygot	Homozygot Mutante
p.N370S	200 (99,5%)	1 (0,5%)	0 (0%)
p.L444P	201 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
E8SJ	201 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

4.2.1 *GBA*-Gen

4.2.1.1 p.N370S

Unter allen Studienteilnehmern konnte bei 200 Patienten (99,5%) der homozygote Wildtyp für die Mutation p.N370S und einmal (0,5%) eine heterozygote Variante gefunden werden. Eine homozygot mutierte Ausprägung konnte unter den Studienteilnehmern nicht nachgewiesen werden.

Bei der heterozygoten Variante handelte es sich um einen männlichen 69-jährigen Patienten mit einem BMI von 24,7 kg/m². Der Patient fiel durch eine isolierte mittelgradige Splenomegalie bei stets um mindestens das Doppelte der oberen Norm erhöhter γ -Glutamyltransferase, sowie erhöhte Bilirubin-Werte auf. Hinsichtlich der Enzymbestimmungen ergaben sich keine Auffälligkeiten (Chitotriosidase: 194 nmol/ml/h, saure Lipase: 0,24 nmol/spot*3h bei einem Referenzbereich von 0,1-2 nmol/spot*3h). Im Zusammenhang mit einem Rektumkarzinom machte der Patient weiterhin durch Wundheilungsstörungen im Sinne einer postoperativen Anastomoseninsuffizienz nach Rektumresektion auf sich aufmerksam. Im weiteren postoperativen Verlauf entwickelte sich eine symptomatische Narbenhernie. Die adjuvante Chemotherapie musste aufgrund von Unverträglichkeitsreaktionen vorzeitig beendet werden.

4.2.1.2 p.L444P

Alle Studienteilnehmer (100%) zeigten einen homozygoten Wildtyp. Es konnte für die p.L444P Mutation weder eine heterozygote noch eine homozygot mutierte Variante festgestellt werden.

4.2.2 *LIPA*-Gen

Für die E8SJ-Mutation im *LIPA*-Gen wurde im Kollektiv ebenfalls weder eine heterozygote noch eine homozygot veränderte Variante nachgewiesen. Alle Studienteilnehmer (100%) wiesen auf beiden Allelen die Wildtyp-Sequenz auf.

4.3 Enzymatik

In Tabelle 8 sind die relevanten Ergebnisse zur Enzymatik zusammengefasst. Zu sehen sind die auffälligen Messwerte bezüglich der Chitotriosidase sowie die zugehörigen Messungen der β -Glukozerebrosidase- und der sauren Lipase-Aktivität.

Tabelle 8: Messungen der Enzymaktivitäten

Laufende Nummer	Chitotriosidase	β - Glukozerebrosidase	saure Lipase
	[nmol/ml/h]	[nmol/mg/h]	[nmol/spot*3h]
1	275	12,54	0,10 ¹
2	421	14,81	0,87 ²
3	0	11,23	0,93 ²
4	269	9,11	0,58 ²
8	0	8,23	1,40 ²
10	534	6,72	0,62 ²
33	323	10,7	0,61 ²
74	607	6,29	0,49 ²
80	522	-	0,67 ²
86	274	-	0,96 ²
87	281	-	0,60 ²
89	288	-	0,67 ²
92	1110	6,78	1,63 ²
95	382	-	0,50 ²
99	296	-	0,61 ²
110	361	-	0,21 ¹
111	0	8,3	0,61 ³
112	297	-	0,38 ²
115	253	-	1,46 ²
116	0	7,51	0,27 ¹
117	0	4,74	0,41 ¹
128	384	-	0,46 ³
129	268	-	0,39 ¹
132	393	-	0,32 ¹
134	499	-	0,33 ¹
135	0	9,46	0,18 ¹
143	0	12,3	0,22 ¹
144	275	-	0,27 ¹
146	355	-	0,32 ¹
151	529	-	0,15 ¹
154	0	5,48	0,48 ¹
157	580	-	0,37 ¹
158	518	-	0,09 ¹
162	0	Ø	0,95 ¹
163	0	4,7	0,23 ¹
166	316	-	0,24 ¹
168	270	-	0,15 ¹
170	430	-	0,15 ¹
174	530	-	0,15 ¹

176	556	-	0,18 ¹
177	589	-	0,15 ¹
180	312	8,82	0,14 ¹
181	354	9,44	0,17 ¹
185	253	-	0,42 ¹
186	0	5,76	0,17 ¹
188	395	-	0,18 ¹
192	0	6,77	0,17 ¹
198	0	Ø	0,19 ¹
200	250	-	0,24 ¹

¹ = Referenzbereich 0,1-0,58 nmol/spot*3h

² = Referenzbereich 0,1-2 nmol/spot*3h

³ = Referenzbereich 0,35-4 nmol/spot*3h

- = Wert nicht bestimmt

Ø = Patient lehnt weitere Kontrolluntersuchung ab

4.3.1 Chitotriosidase

Bei 146 Patienten wurde in Ergänzung zum genetischen Screening die Enzymaktivität der Chitotriosidase gemessen. Eine Zusammenfassung der Daten ist der Tabelle 9 zu entnehmen. Das Histogramm in Abb. 6. zeigt die Verteilung der Absolutwerte. Bei 13 Patienten (8,9%) wurde keinerlei enzymatische Aktivität festgestellt. 97 Studienteilnehmer (66,4%) zeigten Werte ≤ 250 nmol/ml/h, und 36 Patienten (24,7%) wiesen Messergebnisse ≥ 250 nmol/ml/h auf.

Tabelle 9: Zusammenfassung Chitotriosidase-Enzymatik

	Messwert 0 nmol/ml/h	Messwert < 250 nmol/ml/h	Messwert ≥ 250 nmol/ml/h
Anzahl (n = 146)	13 (8,9%)	97 (66,4%)	36 (24,7%)

Die Überprüfung auf Normalverteilung in der Grundgesamtheit mittels KS-Test ergab bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$, dass H_0 abzulehnen ist; die Messwerte der Chitotriosidase sind nicht normalverteilt. Der Median wurde mit 136,5 nmol/ml/h bei einem Interquartilbereich von 182,8 nmol/ml/h bestimmt. Das Alter als unabhängige Variable liefert unter Verwendung der Chitotriosidase-Enzymaktivität als abhängiger Variable mittels linearer Regression signifikante Ergebnisse (Tabelle 10). Die Werte der Chitotriosidase-Enzymaktivitäten nehmen mit steigendem Alter entsprechend folgender Schätzgleichung zu:

$$y = 35,72 \text{ nmol/ml/h} + 2,66 \text{ nmol/ml/h} * x$$

Pro Jahr nimmt die Aktivität der Chitotriosidase also um durchschnittlich 2,66 nmol/ml/h (95%-BCa-Konfidenzintervall: 1,07 – 4,29) zu. In Abb. 7 werden die statistisch signifikanten Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse inklusive Regressionsgerade grafisch dargestellt.

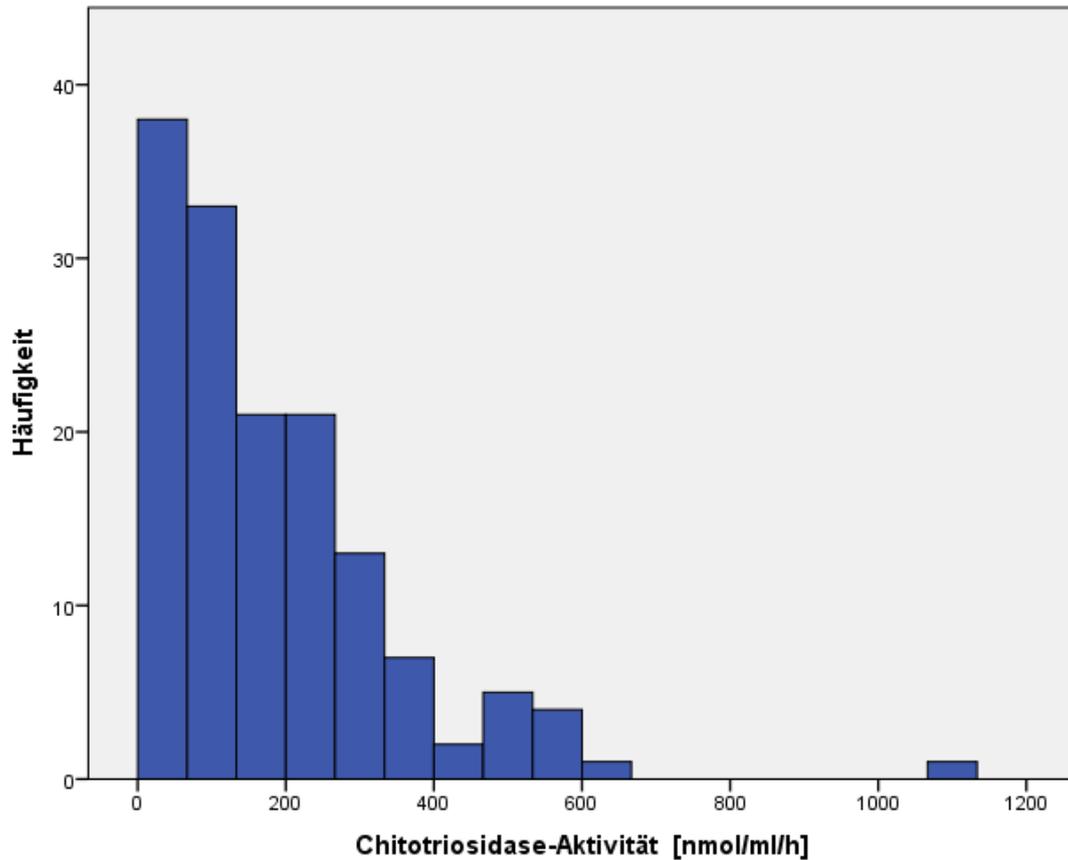


Abb. 6: Histogramm: Häufigkeitsverteilung der Messwerte der Chitotriosidase-Aktivität

Tabelle 10: lineare Regessionsanalyse für das Chitotriosidase-Verhalten im Alter

	Regressionskoeffizient	Signifikanzniveau	95% - BCa-Konfidenzintervall
Alter	2,658	0,003	1,069 - 4,291

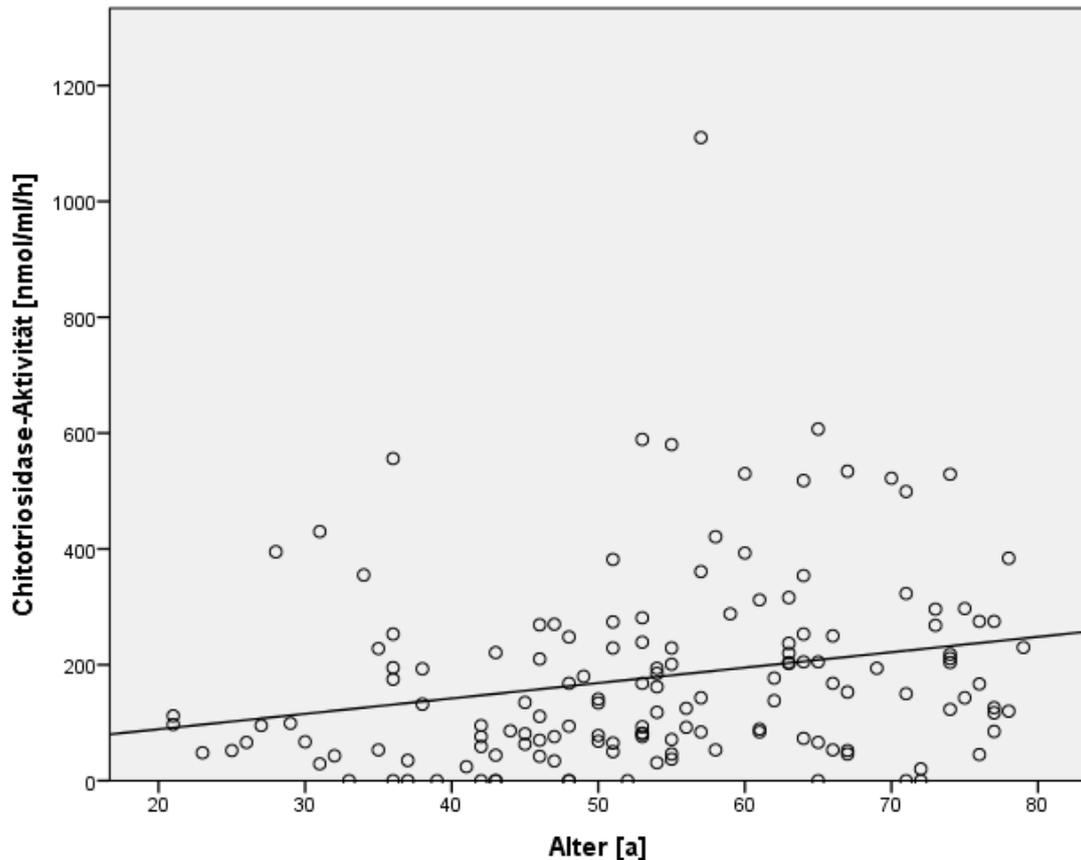


Abb. 7: Streudiagramm: Chitotriosidase-Aktivitäten im Alter: Eingezeichnet sind alle Chitotriosidase Werte ($n = 146$) mit dem zugehörigen Patientenalter sowie die mit zunehmendem Alter ansteigende Regressionsgerade.

4.3.2 β -Glukozerebrosidase

Bei 32 Patienten wurde die Aktivität der sauren β -Glukozerebrosidase bestimmt. Zwei Patienten lehnten die erneut notwendige Blutentnahme zur Aktivitätsbestimmung ab. Wie Abb. 8 zu entnehmen ist, war in allen durchgeführten Bestimmungen (100%) eine normale Enzymaktivität nachweisbar. Sowohl der KS-Test ($p = 0,143$) als auch der Vergleich von Mittelwert und Median (9,0 / 8,7) sprechen für eine Normalverteilung der Messergebnisse. Bei einem Mittelwert von 9,0 nmol/mg/h und einer Standardabweichung von 2,7 nmol/mg/h ergab sich aus dem Minimalwert von 4,7 nmol/mg/h und dem Maximalwert von 16,8 nmol/mg/h eine Spannweite von 12,1 nmol/mg/h. Für die Regressionsanalyse bezüglich des Enzymverhaltens im Alter zeigte sich ein statistisch nicht signifikanter, leicht negativer Zusammenhang (Tabelle 11). In Abb. 9 sind die nicht signifikanten Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse inklusive der Regressionsgeraden grafisch dargestellt.

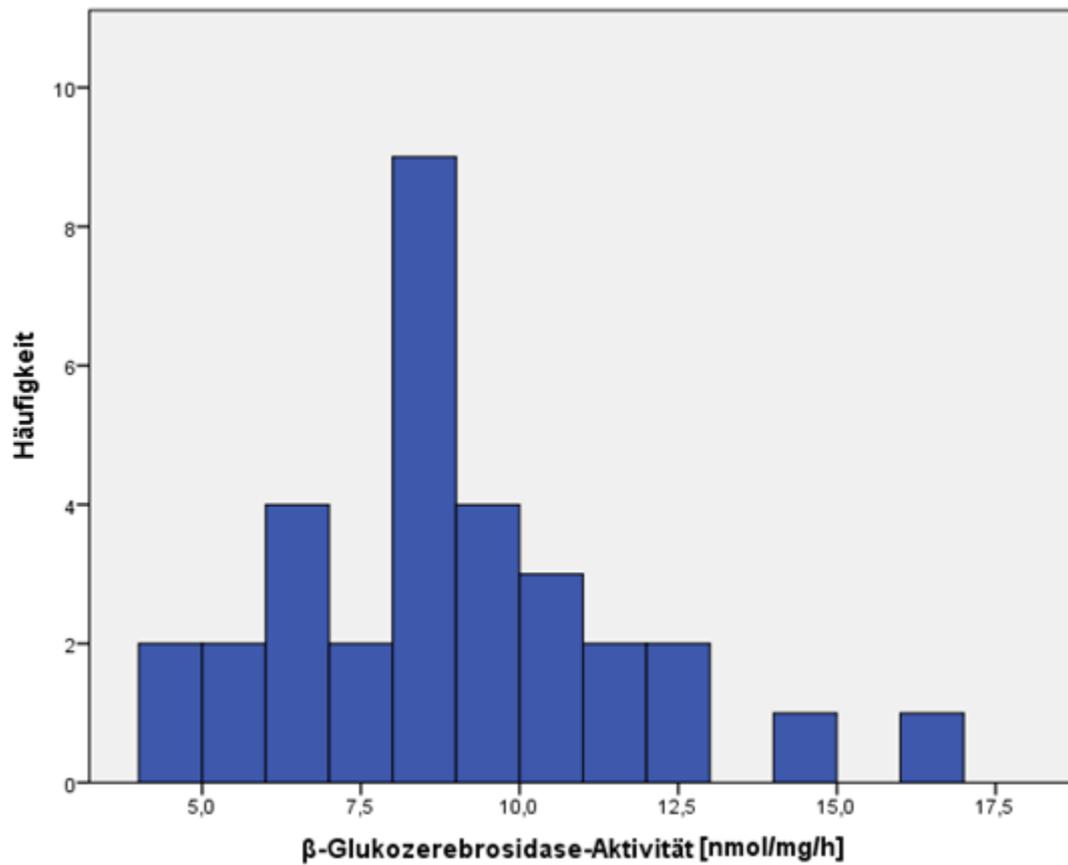


Abb. 8: Histogramm: Häufigkeitsverteilung der Messwerte der β -Glukozerebrosidase-Aktivität

Tabelle 11: lineare Regessionsanalyse für die β -Glukozerebrosidase im Alter (n = 32)

	Regressionskoeffizient	Signifikanzniveau	95% - BCa-Konfidenzintervall
Alter	-0,015	0,639	-0,084 – 0,053

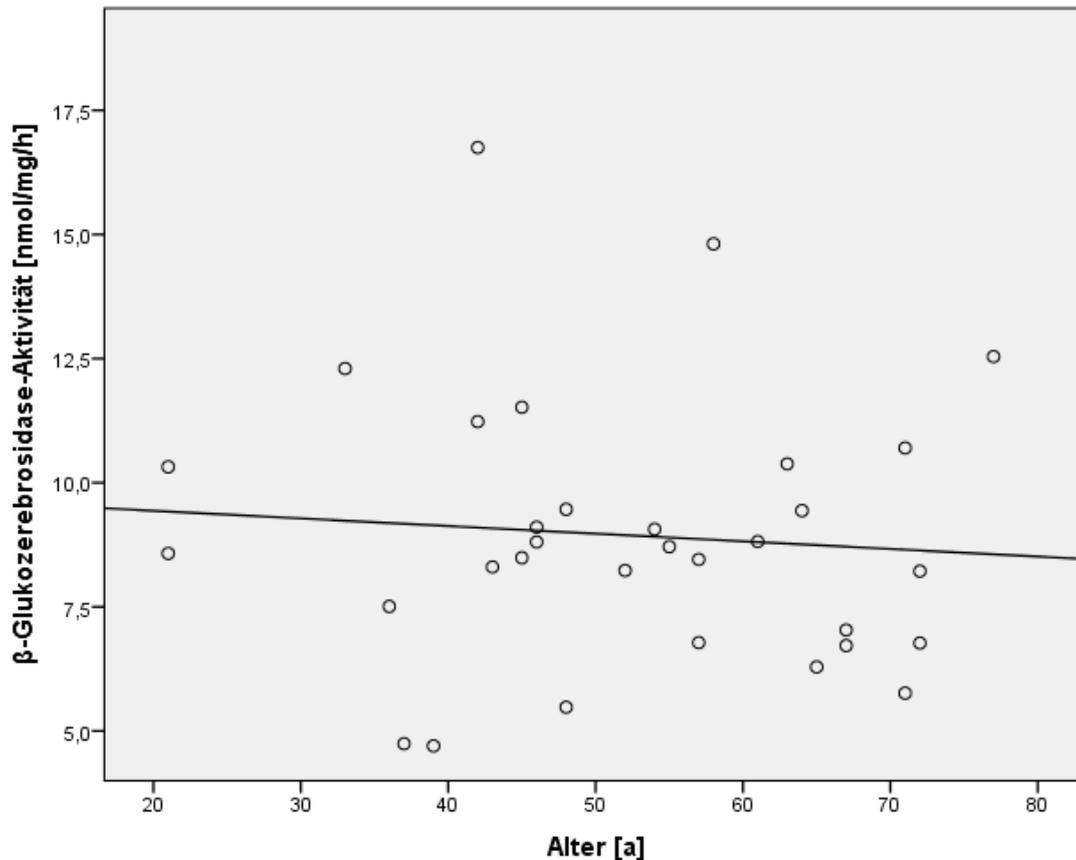


Abb. 9: Streudiagramm: β -Glukozerebrosidase-Aktivitäten im Alter: Eingezeichnet sind alle Werte ($n = 32$) für die β -Glukozerebrosidase mit dem zugehörigen Patientenalter sowie die mit zunehmendem Alter leicht abfallende Regressionsgerade.

4.3.3 Saure Lipase

Bei 102 Patienten wurde die Aktivität der sauren Lipase bestimmt. Alle 102 Studienteilnehmer (100%) wiesen Messwerte innerhalb der jeweiligen Referenzbereiche auf. Aufgrund labortechnischer Verfahrensänderungen ergaben sich bei der Messung der sauren Lipase teilweise unterschiedliche Referenzbereiche (Tabelle 8). Für die statistische Analyse mussten die Ergebnisse in zwei Gruppen unterteilt werden. Sechs Proben mussten gänzlich ausgeschlossen werden, da sich deren Referenzbereich deutlich von den anderen beiden Gruppen unterschied und der Umfang dieser Subgruppe für eine sinnvolle Regressionsanalyse nicht ausreichend war. Die statistisch signifikanten Daten für die größte Gruppe ($n = 77$) sind in Abb. 9 zusammengefasst. Mittels KS-Test wurde in dieser Gruppe bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$ ermittelt, dass H_0 abzulehnen ist und die Messwerte der sauren Lipase nicht normalverteilt sind. Der Median wurde mit $0,20 \text{ nmol/spot} \cdot 3\text{h}$ bei

einem Interquartilbereich von 0,16 nmol/spot*3h bestimmt. Das Alter als unabhängige Variable lieferte unter Verwendung der Enzymaktivität der sauren Lipase als abhängiger Variable mittels linearer Regression einen signifikanten negativen Zusammenhang (Tabelle 12). Bei einem Regressionskoeffizienten von -0,003 kann man annehmen, dass die Enzymaktivität der sauren Lipase entsprechend der folgenden Formel mit dem Alter geringfügig abnimmt.

$$y = 0,392 \text{ nmol/spot*3h} - 0,003 \text{ nmol/spot*3h} * x$$

Pro Jahr fällt der Wert der sauren Lipase also um durchschnittlich 0,003 nmol/spot*3h (95%-BCa-Konfidenzintervall: -0,005 – 0,001) ab. In Abb. 10 sind die statistisch signifikanten Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse inklusive der Regressionsgeraden grafisch dargestellt.

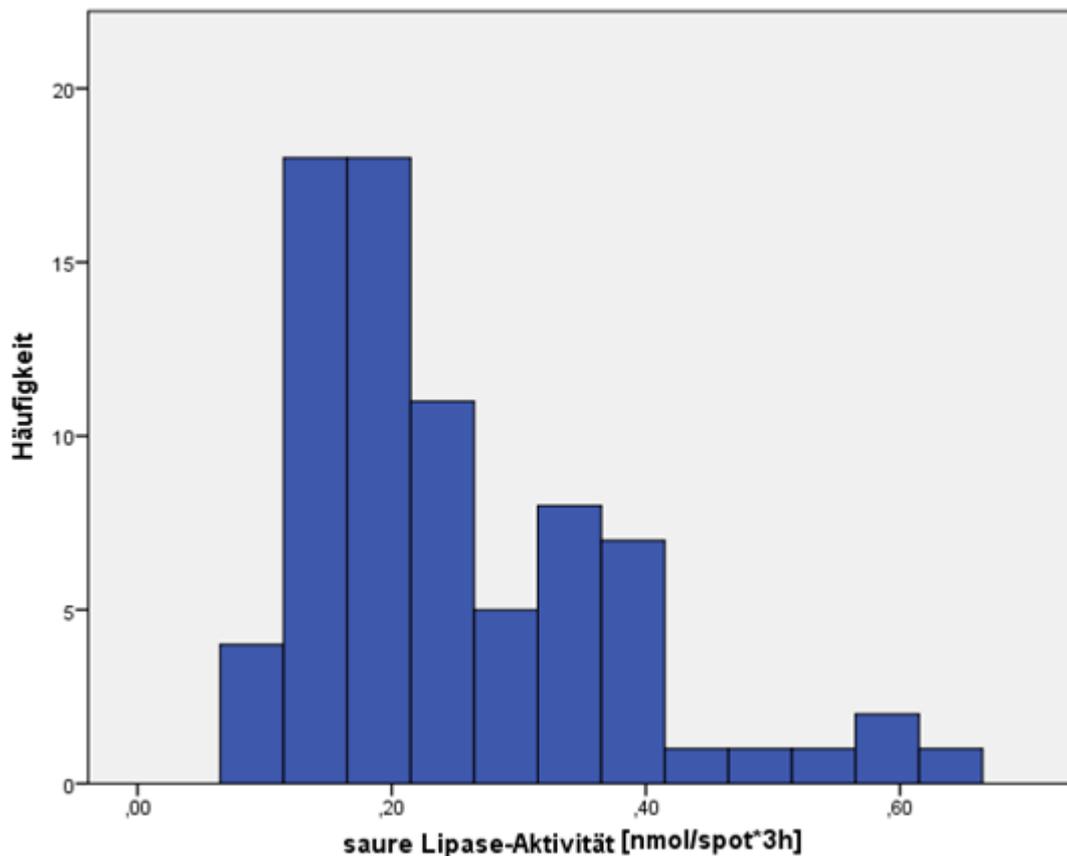


Abb. 9: Histogramm: Häufigkeitsverteilung der Messwerte der sauren Lipase-Aktivität für n = 77 Proben

Tabelle 12: lineare Regressionsanalyse für das saure Lipase-Verhalten im Alter (n = 77)

	Regressionskoeffizient	Signifikanzniveau	95% - BCa-Konfidenzintervall
Alter	-0,002	0,005	-0,005 – 0,001

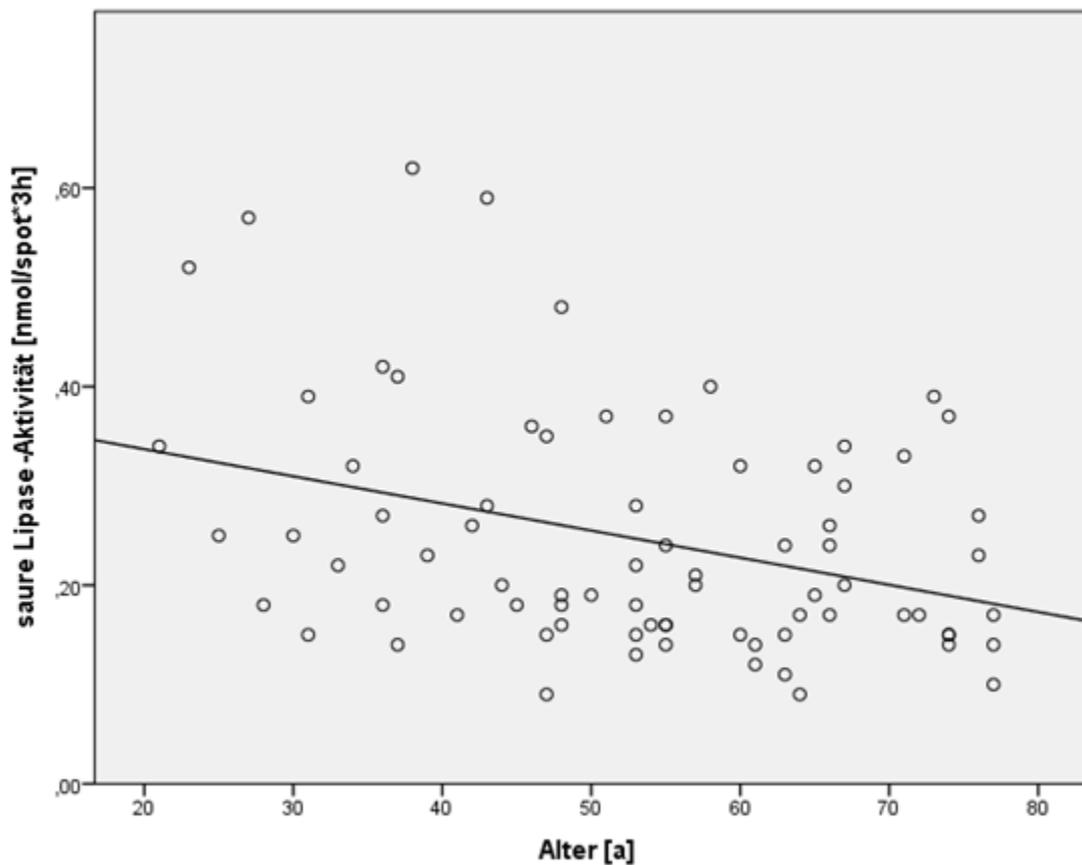


Abb. 10: Streudiagramm: Aktivität der sauren Lipase in Abhängigkeit vom Lebensalter: Eingezeichnet sind n = 77 Messergebnisse für die saure Lipase mit dem zugehörigen Patientenalter sowie die mit zunehmendem Alter abfallende Regressionsgerade.

Hinsichtlich der zweiten Gruppe ergab sich für die saure Lipase (n = 19) mittels KS-Test bei einem Signifikanzniveau von $p = 0,001$, dass H_0 abzulehnen ist und die Messwerte der sauren Lipase auch in dieser Gruppe nicht normalverteilt sind. Der Median wurde hier mit 0,62 nmol/spot*3h ermittelt, und der Interquartilbereich betrug 0,38 nmol/spot*3h. Das Alter als unabhängige Variable liefert unter Verwendung der Enzymaktivität der sauren Lipase als abhängiger Variable mittels linearer Regression in dieser kleineren Stichprobe einen nicht signifikanten negativen Zusammenhang (Tabelle 13). Bei

einem Regressionskoeffizienten von -0,014 und unter Einbeziehung der größeren Stichprobe zeigt der Trend, dass die Enzymaktivität der sauren Lipase entsprechend der folgenden Formel mit dem Alter abnimmt.

$$y = 0,1609 \text{ nmol/spot*3h} - 0,014 \text{ nmol/spot*3h} * x$$

Pro Jahr fiele der Wert der sauren Lipase also um durchschnittlich 0,014 nmol/spot*3h (95%-BCa-Konfidenzintervall: -0,033 – 0,002) ab.

Tabelle 13: lineare Regressionsanalyse für das saure Lipase-Verhalten im Alter (n = 19)

	Regressionskoeffizient	Signifikanzniveau	95% - BCa-Konfidenzintervall
Alter	-0,002	0,12	-0,033 – 0,002

5. Diskussion

Die autosomal rezessiv vererbten lysosomalen Lipidspeicherkrankheiten M. Gaucher und CESD sind bisher unterdiagnostizierte, aber gut behandelbare Leiden [23, 30]. Beim M. Gaucher führt ein Mangel am lysosomalen Enzym β -Glukozerebrosidase zum Anstau des entsprechenden Enzymsubstrats insbesondere in den Zellen des retikuloendothelialen Systems von Milz und Leber, aber auch in Osteoklasten und im Knochenmark. Die Folgen sind neben den Beschwerden durch Verdrängung im Oberbauch ein Hypersplenismus, leichte bis krisenhafte Knochenschmerzen und eine Fatigue-Symptomatik [44]. Bei der CESD verursacht ein Mangel an LAL Ablagerungen von Cholesterinestern und Triglyceriden in Leber, Milz und anderen Organen. Neben einer fast obligaten Hepatomegalie mit starker Tendenz zur frühzeitigen Fettleber und Organdysfunktion führt dies häufig zu einer Splenomegalie und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko [45]. Beide Krankheiten zeigen einen progressiven Verlauf und führen unbehandelt häufig zu einem vorzeitigen Tod [33, 46, 47]. Für den M. Gaucher konnte die klinische Wirksamkeit der Enzymersatztherapie eindeutig nachgewiesen werden [2]. Bezüglich CESD befindet sich die Enzymersatztherapie derzeit in klinischer Erprobung, wobei die Studienergebnisse auf einen vielversprechenden Behandlungsansatz hindeuten [3], welcher die bisherige Therapie in Form der Substratreduktion mittels nutritiver und medikamentöser Maßnahmen demnächst ergänzen oder ablösen könnte.

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob sich unter den Patienten mit unklarer Hepatosplenomegalie bisher nicht diagnostizierte Fälle von seltenen Stoffwechselkrankheiten, insbesondere M. Gaucher oder CESD, befinden. Hierzu wurden alle Akten der Patienten, welche in der Zeit von April 2010 bis Januar 2014 in der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg eine Ultraschalluntersuchung der Bauchorgane erhalten haben, auf eine unklare Hepato- und/oder Splenomegalie hin untersucht. Die Patienten wurden schriftlich umfassend zur geplanten Studie informiert und eingeladen. Es konnten 201 Patienten rekrutiert werden. Bei allen eingeschlossenen Patienten wurden die jeweils häufigsten Mutationen bezüglich M. Gaucher und CESD mittels allelischer Diskriminierung (*TaqMan*-PCR Verfahren) untersucht. Ein Großteil der Patienten wurde im Anschluss daran biochemisch weiter untersucht.

Trotz des langen Untersuchungszeitraums und der Anzahl an getesteten Probanden konnte weder im genetischen noch im biochemischen Screening ein Fall von M. Gaucher und CESD unter den Patienten mit unklarer Hepatosplenomegalie ausfindig gemacht werden. Bei den genetischen Untersuchungen konnte lediglich eine heterozygote Variante für M. Gaucher detektiert werden. Da daher davon ausgegangen werden kann, dass in der universitären Spezialambulanz mit hepatologischem Schwerpunkt keine Fälle dieser seltenen Stoffwechselkrankheiten übersehen werden, sollte das Screening ausgeweitet werden.

Bei unklaren Fällen von Splenomegalie kann im Sinne eines Screenings die Enzymaktivität der Chitotriosidase gemessen werden. Befindet sich diese im Normalbereich oder ist sie unwesentlich erhöht, ist ein M. Gaucher in aller Regel ausgeschlossen [5]. Um die Frage zu beantworten, wo sich weitere Gaucher Patienten befinden, könnte das Screening auf die orthopädische Schmerzsprechstunde ausgeweitet werden, wobei auch hier nur Patienten mit Splenomegalie zu screenen sind, da diese eine *Conditio sine qua non* für die Diagnose zu sein scheint [48, 49]. Besonderes Augenmerk ist hier auf das breite Spektrum an Symptomen zu legen, die von leichten unspezifischen Knochenschmerzen der unteren Extremität über immer wiederkehrende Gelenkschmerzen bis hin zu Schmerzkrisen mit schwerem Krankheitsgefühl bei fieberhaften Knochenschmerzen reichen können. Daneben kann der M. Gaucher sich auch durch pathologische Frakturen der Röhrenknochen oder durch chronische Knochen- und Gelenkveränderungen, beispielsweise im Sinne von erlenmeyerkolbenähnlichen Verbeerungen im Bereich der Metaphysen von distalem Femur oder proximaler Tibia, manifestieren [50].

Bezüglich CESD wäre insbesondere bei unklarer Hepatomegalie, aber auch bei der Diagnose einer kryptogenen Zirrhose, einer NASH oder einer unklaren Splenomegalie die einfach durchzuführende Messung der sauren Lipase in der differentialdiagnostischen Abklärung einer unklaren chronischen Hepatopathie sinnvoll. Darüber hinaus könnte die Suche nach Patienten mit CESD auf die Lipidsprechstunden ausgeweitet werden. Ausschau gehalten werden sollte nach Patienten mit Hepatomegalie, die zusätzlich eine Kombination aus folgenden Parametern aufweisen: Splenomegalie, erhöhte Transaminasen (nahezu 100% der bisher gefundenen CESD-Patienten), erhöhte Triglycerid- und LDL-Cholesterin-Konzentrationen (95%) sowie erniedrigtes HDL-Cholesterin (90%) im Serum [30].

Weiterhin sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, wie sich das Patientenkollektiv mit unklarer Hepatosplenomegalie hinsichtlich biometrischer Parameter zusammensetzt. Drei Viertel der untersuchten Patienten wiesen einen BMI von mehr als 25 kg/m² auf und waren demnach übergewichtig. Das ist knapp ein Viertel mehr als im saarländischen Durchschnitt [51]. Im Mittel waren unsere Patienten knapp zehn Jahre älter als der saarländische Durchschnitt [52]. Die Parameter Alter und BMI waren in der Studienpopulation annähernd normalverteilt. Der jüngste Patient war 21 Jahre alt. Es war im Kontext der vorliegenden Dissertationsarbeit nicht möglich, ein entsprechendes Screening in der Kinderklinik des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg zu etablieren. Obwohl sich das Alter bei Erstdiagnose der CESD aktuell in das mittlere Lebensalter verschiebt, wird der Großteil dieser Patienten immer noch vor dem zwanzigsten Lebensjahr diagnostiziert [30]. Auch für den M. Gaucher gilt zwar, dass immer mehr Patienten erst im Erwachsenenalter symptomatisch werden, aber auch in diesem Fall werden noch über die Hälfte der Betroffenen vor dem zwanzigsten Lebensjahr der Diagnose zugeordnet [53].

Auch wenn eine definitive Aussage bei einer Fallzahl von 201 Patienten aktuell noch nicht möglich ist, muss die Frage gestellt werden, ob ein populationsbasiertes Screening im Sinne eines Neugeborenen-Screenings dem hier durchgeführten gezielten Screening vorzuziehen wäre. Dies wurde beispielsweise bereits von Whittle *et al.* [54] für den M. Gaucher und weitere lysosomale Stoffwechselkrankheiten vorgeschlagen. M. Gaucher und CESD erfüllen die wichtigsten Kriterien für ein solches Neugeborenen-Screening [55]: Zum einen handelt es sich bei diesen Krankheiten um ein wichtiges Gesundheitsproblem in dem Sinne, dass eine effektive Behandlung lebensverlängernd sein kann. Zum anderen gibt es für den M. Gaucher bereits heute ein anerkanntes und effektives Behandlungsregime; bezüglich CESD ist dieses in den nächsten Jahren zu erwarten. Außerdem sind beide Leiden sicher zu diagnostizieren. Gegen ein Neugeborenen-Screening spricht die nicht ganz einheitliche Penetranz beider Krankheiten; insbesondere beim M. Gaucher scheint es auch sehr milde Verläufe zu geben. Andererseits haben schwere Verläufe beider Krankheiten eine sehr schlechte Prognose, sodass Kosten-Nutzen-Argumente eher für als gegen das Screening anzuführen sind. Das generelle Recht auf Nichtwissen und die Freiheit von jeglicher Therapie gilt für das gesamte Neugeborenen-Screening und kann deshalb nicht als Gegenargument bei M. Gaucher und CESD herangezogen werden.

Darüber hinaus wurde überprüft, wie sich die untersuchten Enzymaktivitäten von Chitotriosidase, β -Glukozerebrosidase und saurer Lipase mit dem Patientenalter verändern. Wie bereits zuvor publiziert, konnte bestätigt werden, dass die Messwerte der Chitotriosidase mit dem Alter signifikant zunehmen [9, 56]. Dieser Umstand ist bei der Interpretation der Messergebnisse ebenso zu berücksichtigen wie die Tatsache, dass 5-6% der Bevölkerung keine Chitotriosidase-Enzymaktivität aufweisen [43]. Ergänzend sollte beachtet werden, dass die Chitotriosidase bei einer ganzen Anzahl weiterer Erkrankungen, aber auch unspezifisch zum Beispiel im Rahmen einer entzündlichen Reaktion, erhöht sein kann [9, 57]. In jedem Fall ist bei einer Erhöhung dieses Parameters weitere Diagnostik erforderlich. Bei Verdacht auf M. Gaucher sollte die verminderte Aktivität der β -Glukozerebrosidase, bei CESD-Verdacht die verminderte Aktivität der sauren Lipase ermittelt werden. Hinsichtlich der β -Glukozerebrosidase ergeben sich Hinweise darauf, dass die Aktivität dieses Enzyms mit dem Alter leicht abnimmt. Bei einer kleinen Stichprobenanzahl konnte hier allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies müsste in einer größeren Stichprobe reevaluiert werden. Bezüglich der sauren Lipase konnte nachgewiesen werden, dass sich deren Enzymaktivität mit dem Alter vermindert. Da die Referenzbereiche im Verlauf unserer Studie aufgrund labortechnischer Anforderungen modifiziert werden mussten, ergaben sich zwei Gruppen: In der größeren Gruppe ($n = 77$) konnte eine statistisch signifikante leichte Verminderung der Enzymaktivität über das Alter ermittelt werden; bei der kleineren Gruppe ($n = 19$) konnte dieser Trend bestätigt werden, allerdings ergab sich hier aufgrund der geringeren Probenanzahl kein signifikanter Zusammenhang.

Zur Detektion seltener Stoffwechselkrankheiten könnte das Screening in vielerlei Hinsicht erweitert werden. Einerseits muss auf Grund der Seltenheit dieser Erkrankungen die Fallzahl erhöht werden. Bestenfalls würde das Screening multizentrisch auf Standorte mit hohem Aufkommen von Patienten mit Hepatosplenomegalie und auf die genannten Fachdisziplinen ausgeweitet werden. Obwohl lysosomale Speicherkrankheiten für sich genommen alle sehr selten vorkommen, wird die Prävalenz der gesamten Gruppe dieser Krankheiten auf etwa 1:8000 geschätzt [12]. Deshalb könnte das Screening auch auf weitere Krankheiten aus dieser Gruppe, welche als Leitsymptom die Hepatosplenomegalie zeigen, erweitert werden. Zu denken ist hier beispielsweise an den Morbus Niemann-Pick, bei dem ein autosomal-rezessiv vererbter Gendefekt auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 zu einer verminderten Aktivität des lysosomalen Enzyms saure Sphingomyelinase und einer konsekutiven Akkumulation von Sphingomyelinen, Cholesterin und anderen Lipiden in Lysosomen und Zellmembranen führt. Auch bei Patienten mit Morbus Niemann-Pick ist die Chitotriosidase-Aktivität im Serum regelmäßig erhöht [57, 58].

6. Literaturverzeichnis

1. Vellodi, A., *Lysosomal storage disorders*. British journal of haematology, 2005. **128**(4): p. 413-31.
2. Barton, N.W., et al., *Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease*. The New England journal of medicine, 1991. **324**(21): p. 1464-70.
3. Balwani, M., et al., *Clinical effect and safety profile of recombinant human lysosomal acid lipase in patients with cholesteryl ester storage disease*. Hepatology, 2013. **58**(3): p. 950-7.
4. Lammert, F., *Hepatosplenomegalie und erhöhte Transaminasen*. Vom Dahl, S., Lammert, F., Ullrich, K., Wendel, U. (Hrsg.). Angeborene Stoffwechselkrankheiten beim Erwachsenen. Springer, Berlin 2014. S. 76-80.
5. Hollak, C.E., et al., *Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease*. The Journal of clinical investigation, 1994. **93**(3): p. 1288-92.
6. Arash, L., et al. *Chitotriosidase as screening parameter for diagnosis of LSDs*. Journal of inherited metabolic disease, 2011. p. S197-S197.
7. Van Dussen, L., et al., *Value of plasma chitotriosidase to assess non-neuronopathic Gaucher disease severity and progression in the era of enzyme replacement therapy*. Journal of inherited metabolic disease, 2014. **37**(6): p. 991-1001.
8. Wajner, A., et al., *Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann-Pick diseases*. Clinical biochemistry, 2004. **37**(10): p. 893-7.
9. Guo, Y., et al., *Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders*. Journal of inherited metabolic disease, 1995. **18**(6): p. 717-22.
10. Niederau, C., et al., *Diagnose und Therapie des Morbus Gaucher. Aktuelle Empfehlungen der deutschen Therapiezentren im Jahr 2000*. Medizinische Klinik, 2001. **96**(1): S. 32-9.
11. Dionisi-Vici, C., et al., *Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: a national retrospective survey*. The Journal of pediatrics, 2002. **140**(3): p. 321-7.
12. Meikle, P.J., et al., *Prevalence of lysosomal storage disorders*. JAMA: the journal of the American Medical Association, 1999. **281**(3): p. 249-54.
13. Brady, R.O., et al., *Glucosylceramide lipidosis: Gaucher's disease*. Metabolic basis of inherited disease, edited by John B. Stanbury, et al., 1983.
14. Balwani, M., et al., *Type I Gaucher disease: significant disease manifestations in "asymptomatic" homozygotes*. Archives of internal medicine, 2010. **170**(16): p. 1463-9.
15. Goldblatt, J., *Type I Gaucher disease*. Journal of medical genetics, 1988. **25**(6): p. 415-8.
16. Stowens, D.W., et al., *Skeletal Complications of Gaucher Disease*. Medicine, 1985. **64**(5): p. 310-322.
17. Niederau, C., et al., *Glucocerebrosidase for treatment of Gaucher's disease: first German long-term results*. Journal of hepatology, 1994. **21**(4): p. 610-7.
18. Cassinerio, E., et al., *Gaucher disease: a diagnostic challenge for internists*. European journal of internal medicine, 2014. **25**(2): p. 117-24.
19. Fredrickson, D., et al., *Glucosyl ceramide lipidoses: Gaucher's disease*. The metabolic basis of inherited disease, 1972: p. 730-759.
20. Patterson, M.C., et al., *Isolated horizontal supranuclear gaze palsy as a marker of severe systemic involvement in Gaucher's disease*. Neurology, 1993. **43**(10): p. 1993-7.
21. Barneveld, R.A., et al., *Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies*. Human genetics, 1983. **64**(3): p. 227-31.
22. Beutler, E., et al., *Gaucher Disease*. The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 2001. **8**: p. 3635-3668.
23. Erdos, M., et al., *Genetic and clinical features of patients with Gaucher disease in Hungary*. Blood cells, molecules & diseases, 2007. **39**(1): p. 119-23.
24. Sibille, A., et al., *Phenotype/genotype correlations in Gaucher disease type I: clinical and therapeutic implications*. American journal of human genetics, 1993. **52**(6): p. 1094-101.

25. Tylki-Szymanska, A., et al., *Neuronopathic Gaucher disease: demographic and clinical features of 131 patients enrolled in the International Collaborative Gaucher Group Neurological Outcomes Subregistry*. Journal of inherited metabolic disease, 2010. **33**(4): p. 339-46.
26. Horowitz, M., et al., *The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution*. Genomics, 1989. **4**(1): p. 87-96.
27. Carrozzi, M., et al., *Enzyme replacement therapy for Gaucher's disease types 1, 2 and 3*. Metabolic Encephalopathies, Therapy and Prognosis, 1995. **4**: p. 121.
28. Fredrickson, D. S., *Newly Recognized Disorders of Cholesterol Metabolism*. Ann Intern Med., 1963. **58**(4):718.
29. Abramov, A., et al., *Generalized xanthomatosis with calcified adrenals*. A.M.A. journal of diseases of children, 1956. **91**(3): p. 282-6.
30. Bernstein, D.L., et al., *Cholesteryl ester storage disease: review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease*. Journal of hepatology, 2013. **58**(6): p. 1230-43.
31. Anderson, R.A., et al., *In situ localization of the genetic locus encoding the lysosomal acid lipase/cholesteryl esterase (LIPA) deficient in Wolman disease to chromosome 10q23.2-q23.3*. Genomics, 1993. **15**(1): p. 245-7.
32. Reynolds, T., *Cholesteryl ester storage disease: a rare and possibly treatable cause of premature vascular disease and cirrhosis*. Journal of clinical pathology, 2013. **66**(11): p. 918-23.
33. Aslanidis, C., et al., *Genetic and biochemical evidence that CESD and Wolman disease are distinguished by residual lysosomal acid lipase activity*. Genomics, 1996. **33**(1): p. 85-93.
34. Sando, G.N., et al., *Intercellular transport of lysosomal acid lipase mediates lipoprotein cholesteryl ester metabolism in a human vascular endothelial cell-fibroblast coculture system*. Cell regulation, 1990. **1**(9): p. 661-74.
35. Ganten, D., *Handbuch der molekularen Medizin*. 2010: S. 361.
36. Freudenberg, F., et al., *Cholesterinester-Speicherkrankheit: eine leicht versäumte Diagnose bei oligosymptomatischen Kindern*. Zeitschrift für Gastroenterologie, 2013. **51**(10): S. 1184-7.
37. Anderson, K.M., et al., *Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 1987. **257**(16): p. 2176-80.
38. Cummings, M.H. et al., *Increased hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in cholesteryl ester storage disease*. Clinical chemistry, 1995. **41**(1): p. 111-4.
39. Muntoni, S., et al., *Heterozygosity for lysosomal acid lipase E8SJM mutation and serum lipid concentrations*. Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD, 2013. **23**(8): p. 732-6.
40. Lohse, P., et al., *Compound heterozygosity for a Wolman mutation is frequent among patients with cholesteryl ester storage disease*. Journal of lipid research, 2000. **41**(1): p. 23-31.
41. Muntoni, S., et al., *Prevalence of cholesteryl ester storage disease*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2007. **27**(8): p. 1866-8.
42. Klima, H., et al., *A splice junction mutation causes deletion of a 72-base exon from the mRNA for lysosomal acid lipase in a patient with cholesteryl ester storage disease*. The Journal of clinical investigation, 1993. **92**(6): p. 2713-8.
43. Boot, R.G., et al., *The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(40): p. 25680-5.
44. Vom Dahl, S., et al., *Gaucher-Krankheit*. Vom Dahl, S., Lammert, F., Ullrich, K., Wendel, U. (Hrsg.). Angeborene Stoffwechselkrankheiten beim Erwachsenen. Springer, Berlin 2014. S. 414-417.
45. Seedorf, U., *Cholesterinesterspeicherkrankheit*. Vom Dahl, S., Lammert, F., Ullrich, K., Wendel, U. (Hrsg.). Angeborene Stoffwechselkrankheiten beim Erwachsenen. Springer, Berlin 2014. S. 362-365.
46. Hollak, C.E., et al., *The attenuated/late onset lysosomal storage disorders: Therapeutic goals and indications for enzyme replacement treatment in Gaucher and Fabry disease*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2014. p. 1-14.

47. Weinreb, N.J., et al., *Life expectancy in Gaucher disease type 1*. American journal of hematology, 2008. **83**(12): p. 896-900.
48. Oi, S.S., et al., *Gaucher disease in a family from Maranhao*. Revista brasileira de hematologia e hemoterapia, 2014. **36**(5): p. 373-8.
49. Souza, A.M., et al., *Study of enzyme replacement therapy for Gaucher Disease: comparative analysis of clinical and laboratory parameters at diagnosis and after two, five and ten years of treatment*. Revista brasileira de hematologia e hemoterapia, 2014. **36**(5): p. 345-50.
50. Wenstrup, R.J., et al., *Skeletal aspects of Gaucher disease: a review*. The British journal of radiology, 2002. **75 Suppl 1**: p. A2-12.
51. Rheinland-Pfalz, Statistisches Landesamt, *Körpergröße und -gewicht*. 2009.
52. Ertl, D., *Demografischer Wandel im Saarland und in den saarländischen Regionen bis 2030*. Statistisches Quartalsheft Saarland, 2010. **III**: p. 42.
53. Grabowski, G.A., *Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease*. Lancet, 2008. **372**(9645): p. 1263-71.
54. Meikle, P.J., et al., *Newborn screening for lysosomal storage disorders*. Molecular genetics and metabolism, 2006. **88**(4): p. 307-14.
55. Andermann, A., et al., *Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years*. Bulletin of the World Health Organization, 2008. **86**(4): p. 317-9.
56. Giraldo, P., et al., *Chitotriosidase genotype and plasma activity in patients type 1 Gaucher's disease and their relatives (carriers and non carriers)*. Haematologica, 2001. **86**(9): p. 977-84.
57. Michelakakis, H., et al., *The expanding spectrum of disorders with elevated plasma chitotriosidase activity: an update*. Journal of inherited metabolic disease, 2004. **27**(5): p. 705-6.
58. Vom Dahl, S., et al., *Gaucher-Krankheit*. Vom Dahl, S., Lammert, F., Ullrich, K., Wendel, U. (Hrsg.). Angeborene Stoffwechselkrankheiten beim Erwachsenen. Springer, Berlin 2014. S. 419-420.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg erstellt.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Frank Lammert möchte ich für die Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung aller notwendigen Ressourcen aus seiner Klinik danken. Darüber hinaus gilt ihm mein herzlicher Dank für eine exzellente Betreuung, welche unter anderem durch eine stets prompte Gesprächsbereitschaft mit hilfreichen Tipps, Anregungen und Hilfestellungen sowie die Korrektur der Arbeit in verschiedenen Entwicklungsstufen deren Entstehung überhaupt erst möglich gemacht hat.

Weiterhin gilt mein großer Dank dem Studententeam der Klinik, das mich in erheblichem Maße bei der Probenentnahme und organisatorischen Hilfestellungen unterstützt und vorangebracht hat.

Den Mitarbeitern des Labors der Klinik für Innere Medizin II möchte ich für die Unterstützung beim Erlernen praktischer Methoden und die Hilfe bei der Durchführung und Interpretation der Experimente sowie die nette Atmosphäre bei der Arbeit danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Lisa, welche mich grundsätzlich in allen Lebenslagen unterstützt und im konkreten Fall beim Korrekturlesen einen weiteren wertvollen Blickwinkel mit eingebracht hat.

Nicht zuletzt geht mein herzlichster Dank an meine Eltern, die mich stets bestärkt und mir den Rücken freigehalten haben.