

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Humangenetik

Institutsdirektor Prof. Dr. med. Christian Kubisch

**Charakterisierung einer neuartigen *TXNIP*-assoziierten  
Glukose- und Lipidstoffwechselstörung**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Sharlaine Yun Lan Piel  
aus Hamburg

Hamburg 2024

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.02.2025**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Jörg Heeren**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Christian Kubisch**

# Inhaltsverzeichnis

|   |            |
|---|------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b> .....   | <b>III</b> |
| <b>1 Einleitung</b> .....   | <b>1</b>   |
| 1.1 Arbeitshypothese und Fragestellung .....  | 1          |
| 1.2 Glykogen.....   | 2          |
| 1.2.1 Glykogenstoffwechsel .....  | 3          |
| 1.2.1.1 Regulation im Muskel.....   | 4          |
| 1.2.1.2 Regulation in der Leber.....  | 4          |
| 1.2.2 Glykogenstoffwechselerkrankungen .....  | 5          |
| 1.3 Lipide .....  | 9          |
| 1.3.1 Lipidklassen .....  | 9          |
| 1.3.2 Lipidstoffwechsel.....  | 11         |
| 1.3.2.1 Exogener Lipid-Stoffwechselweg.....   | 12         |
| 1.3.2.2 Endogener Lipid-Stoffwechselweg.....  | 13         |
| 1.3.2.3 Reverser Cholesterintransport .....   | 14         |
| 1.3.3 <i>De novo</i> Lipogenese .....   | 14         |
| 1.3.3.1 Fettsäure-Synthese.....   | 15         |
| 1.3.3.2 Regulation .....  | 16         |
| 1.4 TXNIP .....   | 18         |
| 1.4.1 TXNIP im Redoxstoffwechsel .....  | 19         |
| 1.4.2 TXNIP im Glukose- und Lipidstoffwechsel.....  | 20         |
| 1.4.2.1 TXNIP-Defizienz im Mausmodell: Regulation des Glukose-<br>und Lipidstoffwechsels .....  | 23         |
| 1.4.2.2 TXNIP und Diabetes mellitus im Mausmodell .....   | 25         |
| 1.4.3 Assoziation von <i>TXNIP</i> Varianten zu metabolischen<br>Erkrankungen in Menschen ..... | 26         |
| <b>2 Material</b> .....   | <b>29</b>  |
| 2.1 Patientendaten und Patientenproben .....  | 29         |
| 2.2 Zellen .....  | 29         |
| 2.3 Primer .....  | 30         |
| 2.4 Taqman-Assays.....  | 30         |
| 2.5 Antikörper .....  | 31         |
| 2.6 Chemikalien.....  | 32         |
| 2.6.1 Reagenzien.....   | 32         |
| 2.6.2 Kulturmedien und Seren .....  | 34         |
| 2.6.3 Puffer .....  | 34         |
| 2.6.4 Kits .....  | 35         |
| 2.7 Verbrauchsmaterial.....   | 36         |
| 2.8 Geräte.....   | 37         |
| 2.9 Software.....   | 38         |

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>3</b> | <b>Methoden</b> .....   | <b>39</b> |
| 3.1      | Zellkultur .....  | 39        |
| 3.1.1    | Behandlung mit unterschiedlichen Glukose- und FCS-Konzentrationen ..... | 39        |
| 3.1.2    | Behandlung mit MG-132 .....   | 40        |
| 3.1.3    | Behandlung zur nativen Glykogenmessung .....                            | 40        |
| 3.1.4    | Behandlung mit Ritonavir .....  | 40        |
| 3.1.5    | Behandlung zur Lipidmessung .....                                       | 41        |
| 3.1.6    | Behandlung zur Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung .....                | 41        |
| 3.2.     | RNA-Analysen .....  | 41        |
| 3.2.1    | RNA-Extraktion .....  | 41        |
| 3.2.2    | cDNA-Synthese / Reverse Transkription .....                             | 42        |
| 3.2.3    | qPCR .....  | 42        |
| 3.3      | Protein-Analysen .....  | 43        |
| 3.3.1    | Protein-Extraktion .....  | 43        |
| 3.3.2    | Western-Blot .....  | 43        |
| 3.4      | Glykogenmessung .....   | 44        |
| 3.5      | Lipidom-Analyse .....   | 44        |
| 3.5.1    | Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) .....                         | 44        |
| 3.5.2    | Lipidmessung im Lipidzyzer™ .....                                       | 45        |
| 3.6      | Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung .....                               | 45        |
| 3.7      | Statistische Auswertung .....   | 46        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b> .....   | <b>47</b> |
| 4.1      | Beschreibung der Patienten mit Varianten in <i>TXNIP</i> .....          | 47        |
| 4.1.1    | Charakterisierung der <i>TXNIP</i> Varianten .....                      | 47        |
| 4.1.2    | Patientenvorstellung .....  | 48        |
| 4.2      | <i>TXNIP</i> Genexpressions-Analysen in Fibroblasten .....              | 51        |
| 4.2.1    | <i>TXNIP</i> RNA-Analyse in Fibroblasten .....                          | 52        |
| 4.2.2    | <i>TXNIP</i> Protein-Analyse in Fibroblasten .....                      | 56        |
| 4.3      | Glykogen-Messungen in Fibroblasten .....                                | 58        |
| 4.3.1    | Native Glykogenmessung .....  | 58        |
| 4.3.2    | Glykogenmessung nach Behandlung mit Ritonavir .....                     | 59        |
| 4.4      | Analysen des Lipidstoffwechsels in Patientenproben .....                | 60        |
| 4.4.1    | Blutplasma .....  | 60        |
| 4.4.2    | Muskel .....  | 62        |
| 4.4.3    | Leber .....   | 64        |
| 4.5      | Fibroblasten als Modell für den Lipidstoffwechsel .....                 | 66        |
| 4.5.1    | Lipidom .....   | 66        |
| 4.5.2    | Genexpression .....   | 67        |
| 4.5.3    | Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung .....                               | 68        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b> .....   | <b>70</b> |
| 5.1      | Vergleich der <i>TXNIP</i> Varianten und Patientencharakteristika ..... | 71        |
| 5.2      | <i>TXNIP</i> Genexpression .....  | 72        |

---

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 5.2.1     | RNA-Analysen .....  | 72         |
| 5.2.2     | Protein-Analysen.....                                       | 73         |
| 5.3       | Glykogenstoffwechsel.....                                   | 74         |
| 5.4       | Lipidstoffwechsel .....                                     | 75         |
| 5.4.1     | Blutplasma .....  | 75         |
| 5.4.2     | Muskel.....   | 76         |
| 5.4.3     | Leber.....  | 77         |
| 5.4.4     | Fibroblasten als Modell für den Lipidstoffwechsel .....     | 78         |
| 5.5       | Limitationen und weiterführende Forschung.....              | 79         |
| 5.6       | Folgerung und Ausblick .....                                | 80         |
| <b>6</b>  | <b>Zusammenfassung (deutsch) .....</b>                      | <b>82</b>  |
| <b>7</b>  | <b>Zusammenfassung (englisch) .....</b>                     | <b>83</b>  |
| <b>8</b>  | <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>                           | <b>84</b>  |
| <b>9</b>  | <b>Abbildungsverzeichnis.....</b>                           | <b>89</b>  |
| <b>10</b> | <b>Tabellenverzeichnis.....</b>                             | <b>91</b>  |
| <b>11</b> | <b>Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>               | <b>92</b>  |
| <b>12</b> | <b>Anhang.....</b>  | <b>98</b>  |
| 12.1      | DNA- und Protein-Sequenz von TXNIP .....                    | 98         |
| 12.2      | DNA- und Protein-Sequenzen der <i>TXNIP</i> Varianten ..... | 99         |
| 12.2.1    | Patient mit TXNIP <sup>Asn203Tyr</sup> Variante .....       | 99         |
| 12.2.2    | Patient mit TXNIP <sup>Asn86Lysfs*2</sup> Variante .....    | 100        |
| 12.2.3    | Patient mit TXNIP <sup>Ile215Tyrf*59</sup> Variante .....   | 101        |
| <b>13</b> | <b>Danksagung .....</b>                                     | <b>102</b> |
| <b>14</b> | <b>Lebenslauf .....</b>                                     | <b>103</b> |
| <b>15</b> | <b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>                       | <b>104</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Arbeitshypothese und Fragestellung

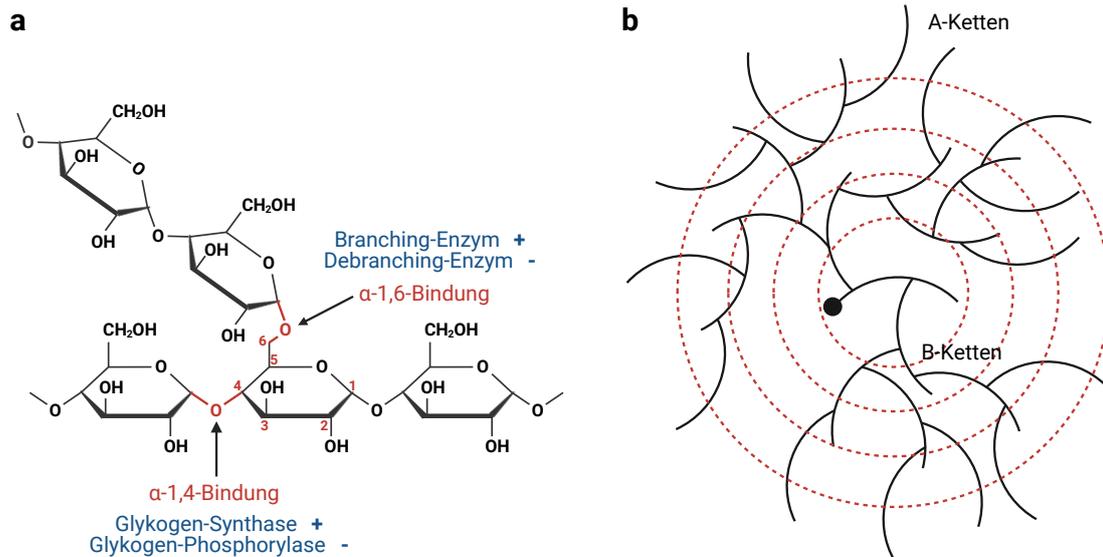
Glykogenosen sind erbliche Stoffwechselerkrankungen, bei denen eine Störung im Metabolismus des Glukose-Speichers Glykogen vorliegt. Es gibt 11 bekannte Formen der Glykogenosen, welche hauptsächlich durch Enzymdefekte des Glykogenabbaus oder der Glukosesekretion verursacht werden. Da der Glukose- und der Lipidstoffwechsel hormonell und intrazellulär eng miteinander verknüpft sind, entwickeln zahlreiche Glykogenose-Patienten infolgedessen auch Dyslipidämien. Ein bekannter Pathomechanismus hierfür ist die *de novo* Lipogenese (DNL), bei der Lipide aus Glukose neu synthetisiert werden (Bandsma et al. 2008). Bei einem 31-jährigen Patienten, der sich klinisch mit einer hypertrophen Kardiomyopathie, Muskelschwäche und rezidivierender Hypoglykämie vorstellte, zeigte sich elektronenmikroskopisch in Muskel- und Leberbiopsien eine vermehrte Glykogen- und Lipideinlagerung. Laborchemisch präsentierte sich eine Hypertriglyceridämie. Eine Exom-Sequenzierung erbrachte den molekulargenetischen Nachweis einer homozygoten *Missense*-Variante im Gen *TXNIP* (*Thioredoxin interacting protein*). Darüber hinaus wurden zwei weitere Patienten mit Varianten in *TXNIP* und ähnlichen Symptomen identifiziert. Bislang wurde *TXNIP* im Menschen jedoch nicht mit Glykogenose-artigen Erkrankungen in Verbindung gebracht.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass das metabolische Krankheitsbild der Patienten mit Beeinträchtigung des Glukose- und Lipidstoffwechsels durch die molekulargenetisch gesicherten Varianten im Gen *TXNIP* verursacht wird. Als Pathomechanismus wird eine unregelmäßige Glukoseaufnahme durch die *TXNIP*-Defizienz angenommen. Zudem wird vermutet, dass die Hyperlipidämie der Patienten durch eine erhöhte DNL mitverursacht werden könnte. Folgende Fragestellungen werden bearbeitet: Zunächst sollen die klinischen Charakteristika der Patienten mit wahrscheinlich pathogenen Varianten im Gen *TXNIP* dargestellt und verglichen werden. Nachfolgend soll dargelegt werden, wie sich die Varianten in *TXNIP* auf Gen- und Proteinexpressionsebene in Patientenfibroblasten auswirken. Überdies soll der Glykogengehalt der Fibroblasten von Patienten mit *TXNIP* Varianten vor und nach der Gabe von Ritonavir als Hemmstoff von Glukosetransportern untersucht werden. Abschließend soll der Lipidstoffwechsel der Patienten in Blutplasma, Muskel- und Leberproben sowie Patientenfibroblasten charakterisiert werden.

## 1.2 Glykogen

Glykogen ist ein verzweigtes Polymer aus Glukose und dient als Energiespeicher. Im menschlichen Körper befindet sich Glykogen hauptsächlich in Leber und im Muskelgewebe (Roach 2002). Bei Bedarf kann Glykogen abgebaut und als Glukose verstoffwechselt werden. Während der Glykogenspeicher der Leber hauptsächlich genutzt wird, um den Blutzuckerspiegel aufrechtzuerhalten, ist der Glykogenspeicher im Muskelgewebe zur Deckung des Energiebedarfs der Muskeln zuständig (Kanungo et al. 2018). Die Fähigkeit des menschlichen Körpers zur Speicherung von Glykogen ist begrenzt: In der Leber können ca. 100 g und in den Skelettmuskeln 350 – 700 g Glykogen gespeichert werden (Knuiman et al. 2015). Auf zellulärer Ebene liegt Glykogen in Form von Glykogen-Partikeln frei im Zytoplasma vor. Die Speicherung von Glukose in Form von Glykogen ist vorteilhaft, da die osmotische Aktivität von Glykogen im Vergleich zur gleichen Menge reiner Glukose geringer ist. Hohe intrazelluläre Glukosekonzentrationen können über die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten über die Zellmembran einen Wassereinstrom in die Zelle bewirken, welcher Zellstress verursacht (osmotischer Stress). Durch die Polymerisation von Glukose zu Glykogen kann die osmotische Aktivität jedoch verringert werden. In Form von Glykogen kann somit ein Vielfaches der Glukosemenge, die als einzelne Glukosemoleküle im Zytoplasma vorliegen kann, gespeichert werden.

Ein Glykogenpartikel besteht aus langen verzweigten Ketten aus Glukosemolekülen, die um einen Kern aus Glykogenin (in Abbildung 1 durch einen schwarzen Punkt dargestellt) organisiert sind. Glykogenin ist das Initiator-Protein der Glykogensynthese, welches die Ausbildung der ersten Glukosekette katalysiert. Nachfolgend wird die Kette durch die Glykogen-Synthase verlängert. Die Glukosemoleküle werden hierbei vor allem  $\alpha$ -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft. Das Branching-Enzym schafft über  $\alpha$ -1,6-glykosidische Verbindungen Verzweigungen der Ketten (s. Abbildung 1a). Hierbei wird zwischen inneren B-Ketten mit zumeist zwei Verzweigungen sowie äußeren unverzweigten A-Ketten unterschieden. Die durchschnittliche Kettenlänge wird mit 12 - 14 Glukosemolekülen angegeben. Durch jede Verzweigung der B-Ketten entstehen neue Ebenen des Glykogenpolymers (in der Abbildung durch rote Kreise dargestellt) (s. Abbildung 1b). Die letzte Ebene besteht aus unverzweigten A-Ketten und ist für Enzyme des Glykogenabbaus zugänglich (Roach et al. 2012). Die auf diese Weise konfigurierten Glykogenpolymere werden als  $\beta$ -Partikel bezeichnet, haben eine Größe von 30 - 50 nm und sind in Skelettmuskelzellen zu finden. In der Leber sind mehrere  $\beta$ -Partikel zu größeren  $\alpha$ -Partikel zusammengelagert (Sullivan et al. 2010).



**Abbildung 1: Struktur und Aufbau von Glykogen.** (a) Verlängerung der Glukose-Ketten über  $\alpha$ -1,4-glykosidische Bindungen und Verzweigung der Ketten über  $\alpha$ -1,6-glykosidische Verbindungen. Die Glykogen-Synthase katalysiert den Aufbau (+), die Glykogen-Phosphorylase den Abbau (-) der  $\alpha$ -1,4-glykosidische Bindungen. Das Branching-Enzym katalysiert den Aufbau (+), das Debranching-Enzym den Abbau (-) der  $\alpha$ -1,6-glykosidische Bindungen. (b) Glykogen-Modell mit mehreren Ebenen aus zweifach verzweigten B-Ketten in Inneren und äußeren unverzweigten A-Ketten. Der schwarze Punkt stellt Glykogenin dar.

Quelle: Modifiziert nach (Roach et al. 2012)

### 1.2.1 Glykogenstoffwechsel

Der Aufbau von Glykogen wird über die Glykogen-Synthase und das Branching-Enzym reguliert. Die Glykogen-Synthase katalysiert hierbei die  $\alpha$ -1,4-glykosidische Bindung von UDP-Glukose an das Glykogen-Polymer und das Branching-Enzym die  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Bindungen der Verzweigungen. Der Abbau von Glykogen findet durch die Glykogen-Phosphorylase und das Debranching-Enzym statt. Während die Glykogen-Phosphorylase an den terminalen  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindungen ansetzt, ist das Debranching-Enzym für die  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Bindungen zuständig (Roach 2002) (s. Abbildung 1a). Im Folgenden werden die Haupt-Regulationsmechanismen des Glykogenstoffwechsels aufgeführt.

### **1.2.1.1 Regulation im Muskel**

Im Muskel wird der Aufbau von Glykogen hauptsächlich hormonell durch Insulin reguliert. Hierbei wirkt Insulin zum einen direkt aktivierend auf die Glykogen-Synthase, welche den Glykogen-Aufbau katalysiert (Nielsen und Wojtaszewski 2004). Zudem führt Insulin durch die Insulin-vermittelte Translokation von GLUT4 Glukosetransportern an die Zellmembran zu einem Einstrom von Glukose (Rodnick et al. 1992). Die Glukose wird durch die Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt. Glukose-6-Phosphat dient als allosterischer Aktivator für die Glykogen-Synthase (Bouskila et al. 2010) und fördert somit die Synthese von Glykogen.

Der Abbau von Glykogen im Muskelgewebe wird durch muskuläre Aktivität und die Ausschüttung von Adrenalin ausgelöst. Sowohl das bei muskulärer Kontraktion freigesetzte Kalzium als auch der durch Verbrauch von Adenosin-Triphosphat (ATP) steigende Spiegel an Adenosin-Monophosphat (AMP) führen über eine Aktivierungskaskade zur Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase. Auch die Signaltransduktion über Adrenalin führt zur Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase und damit zum Abbau von Glykogen zur Bereitstellung von Glukose-6-Phosphat im Muskelgewebe (Hargreaves und Richter 1988, Jensen und Richter 2012).

### **1.2.1.2 Regulation in der Leber**

Das in der Leber gespeicherte Glykogen dient in erster Linie als Glukose-Reserve zur Stabilisierung des Blutzuckerspiegels und der Versorgung extrahepatischer Gewebe. Die Leber agiert hierzu als Sensor für den Blutzuckerspiegel und kann je nach Bedarf Glykogen aufbauen oder abbauen und in den Blutkreislauf abgeben (Bollen et al. 1998). Als Transportprotein steht hierfür der GLUT2 Glukosetransporter zur Verfügung, welcher einen Insulin-unabhängigen bidirektionalen Fluss von Glukose ermöglicht (Mueckler 1994). Auf diesem Weg stellt sich in Blut und Hepatozyten die gleiche Glukosekonzentration ein. Durch die geringe Affinität der leberspezifischen Glukokinase zu Glukose wird die Glukose erst bei relativ hohen Konzentrationen zu Glukose-6-Phosphat umgesetzt. Auf diesem Wege akkumuliert nur bei ausreichend hohem Blutzuckerspiegel Glukose-6-Phosphat, welches ein allosterischer Aktivator der Glykogen-Synthase ist. Die Glykogen-Synthase unterliegt außerdem der hormonellen Regulation durch Insulin, welches die postprandiale Glykogensynthese aktiviert. So kann bei ausreichendem Angebot an Glukose ein Glukosespeicher in der Leber aufgebaut werden (Bollen et al. 1998).

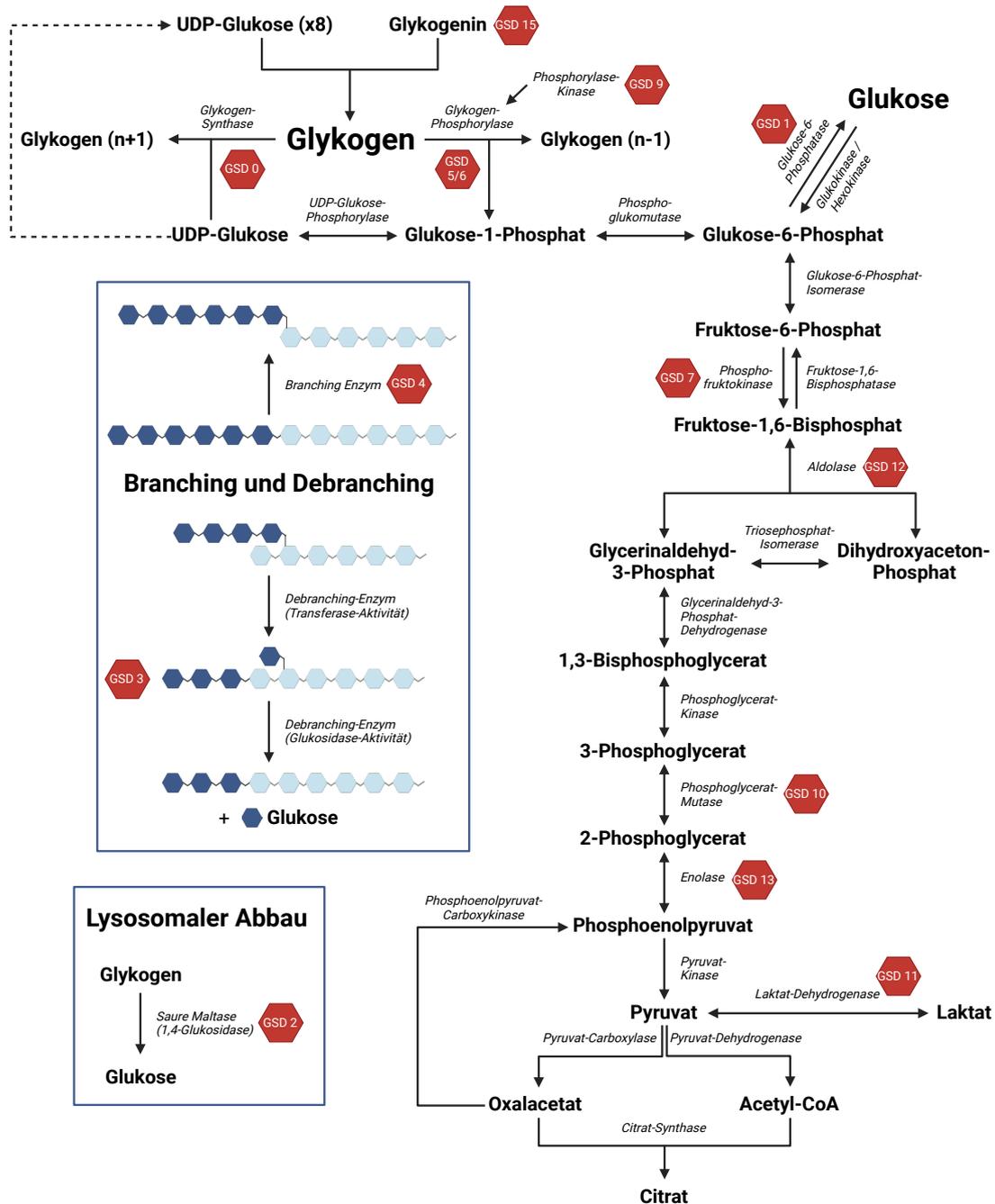
Die wichtigsten Stimuli für den Abbau von Leberglykogen und die Freisetzung von Glukose in den Blutkreislauf sind Glukagon und Adrenalin. Diese Mediatoren, welche in

Fastenperioden bzw. bei körperlicher Betätigung oder Stress freigesetzt werden, führen über eine cAMP-vermittelte Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase zur Induktion des Glykogen-Abbaus. Durch die Aktivität der Glykogen-Phosphorylase wird Glukose-1-Phosphat bereitgestellt, welches durch die Phosphoglukomutase zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt werden kann. Durch die Glukose-6-Phosphatase kann Glukose-6-Phosphat in Glukose und Phosphat gespalten werden, und Glukose kann über den GLUT2 Glukosetransporter ins Blut abgegeben werden, um den Blutzuckerspiegel zu erhöhen (Bollen et al. 1998). Defekte im Gen *SLC2A2*, welches für GLUT2 codiert, sind daher unter anderem mit einer Glykogen-Akkumulation in der Leber assoziiert (Santer et al. 1997).

### **1.2.2 Glykogenstoffwechselerkrankungen**

Glykogenosen sind erbliche Stoffwechselerkrankungen, bei denen eine Störung im Metabolismus des Glukose-Speichers Glykogen vorliegt. Bislang sind mehr als zehn verschiedene Glykogenose-Formen bekannt, deren Inzidenz zusammen bei 1:20.000 bis 1:43.000 Geburten liegt (Ozen 2007). Krankheitsursächlich sind meist Enzymdefekte im Auf- und Abbau von Glykogen oder bei Zwischenschritten in der Metabolisierung des Glykogens. Auch eine gestörte Glukose-Sekretion durch fehlerhafte Transportproteine kann Glykogenosen verursachen. Bei den meisten Formen der Glykogenosen resultiert dies in einer abnorm gesteigerten Speicherung von Glykogen im Gewebe und einem gestörten Glukosestoffwechsel. Die Symptome sind je nach Glykogenose-Form unterschiedlich; betreffen aber in der Regel metabolisch hochaktive Organe wie Leber, Skelett- und Herzmuskel (Kanungo et al. 2018).

Die klinische Manifestation ist hierbei abhängig von den spezifischen Enzym- bzw. Proteindefekten und deren relativer Expression in den unterschiedlichen Geweben. So gibt es im Glykogenstoffwechsel bei einigen Enzymen wie z.B. der Glykogen-Synthase oder auch der Glykogen-Phosphorylase eine Muskel- und eine Leberspezifische Isoform. Zudem kommen einige Enzyme generell nur in bestimmten Geweben vor, beispielsweise die Glukose-6-Phosphatase in der Leber. Im Gegensatz dazu werden unter anderem das Branching- und das Debranching-Enzym in allen Geweben exprimiert, in denen Glykogenstoffwechsel stattfindet. Je nach Mutation und Lokalisation des betroffenen Enzyms bzw. Proteins ergeben sich hierdurch organspezifische Symptome. Klassischerweise unterscheidet man hierbei zwischen Leber- und Muskel-Glykogenosen, wobei es auch Mischformen gibt.



**Abbildung 2: Übersicht über den Glykogenstoffwechsel samt einiger Glykogenosen sowie ihrer charakteristischen Enzymdefekte.** Die betroffenen Enzyme sind kursiv und die daraus entstehenden Glykogenosen rot umrissen dargestellt. GSD = Glycogen storage disorder = Glykogenspeichererkrankung.

Quelle: Modifiziert nach (Kanungo et al. 2018)

Sind Enzyme oder Proteine des Glykogenstoffwechsels in der Leber betroffen, stehen Hypoglykämien unter Fastenbedingungen mit oder ohne Hepatomegalie im Vordergrund. Die Hypoglykämien haben je nach Glykogenose-Form unterschiedliche molekulare Ursachen; gemeinsam ist jedoch, dass bei Leber-Glykogenosen die endogene Glukoseproduktion und Freisetzung von Glukose aus der Leber ins Blut gestört ist. Die Hepatomegalie wird durch eine Glykogen-Akkumulation in der Leber verursacht, tritt aber nicht bei jeder Leber-Glykogenose auf. Bei der häufigsten Glykogenose-Form Glykogenose Typ 1 (Morbus von Gierke) liegen beispielsweise Defekte der Glukose-6-Phosphatase (Typ 1a) bzw. der Glukose-6-Phosphat-Translokase (Typ 1b) vor (s. Abbildung 2), welche die erfolgreiche Spaltung von Glukose-6-Phosphat in Glukose und Phosphat verhindern (Kanungo et al. 2018). Glukose-6-Phosphat akkumuliert in den Hepatozyten, da nur reine Glukose die Glukosetransporter passieren kann. Laborchemisch weisen Patienten mit Leber-Glykogenosen zudem häufig eine Laktatazidose auf. Auch dies ist darin begründet, dass der Glukose-Stoffwechsel in der Leber gestört ist: In den Leberzellen vermehrt verbleibende Intermediate des Glukose-Metabolismus werden zu Laktat verstoffwechselt, welches ins Blut sezerniert wird (Santer und Ullrich 2020).

Muskel-Glykogenosen treten durch muskuläre Belastungsintoleranz und Muskelschwäche mit oder ohne Rhabdomyolyse in Erscheinung. Die muskuläre Belastungsintoleranz bzw. Muskelschwäche kommt hierbei zum einen durch pathologische Glykogeneinlagerungen in die Muskelzellen, zum anderen durch einen gestörten Glykogenmetabolismus mit folgender mangelhafter Energieproduktion zustande. So liegt beispielsweise bei der Glykogenose Typ 5 (McArdle-Erkrankung) ein Defekt der Myophosphorylase (Muskelspezifische Isoform der Glykogen-Phosphorylase) vor (s. Abbildung 2), welcher den erfolgreichen Abbau von Glykogen zu Glukose-1-Phosphat verhindert (Kanungo et al. 2018). Die mangelhafte Energieproduktion durch unzureichende Spiegel an Glukose-Intermediaten führt zu einer ungenügenden Menge an ATP, welches für die Aufrechterhaltung der zellulären Prozesse im Muskel notwendig ist. Hierbei wird ATP unter anderem benötigt, um nach einer Muskelkontraktion die Kalzium-Konzentration in der Muskelzelle zu senken. Dies ist notwendig, damit die Zelle erneut kontrahieren kann. Ohne ausreichende Mengen an ATP kommt es zu einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration, welche über verschiedene Mechanismen letztlich zum Zelltod und damit zur Rhabdomyolyse führt (Tarnopolsky 2018). Neben Skelettmuskelzellen können auch Herzmuskelzellen von der Glykogenose betroffen sein. Glykogenakkumulationen können hierbei sowohl in den glatten Muskelzellen als auch in den erregungsleitenden Zellen auftreten (Austin et al. 2012) und daher die Ausbildung von Kardiomyopathien und Arrhythmien fördern.

Überdies können Glykogenosen generell durch die Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels Gedeihstörungen, Wachstums- und Entwicklungseinschränkungen hervorrufen. Alle diese Symptome führen häufig zu starken Leistungseinschränkungen sowie teilweise zu einer reduzierten Lebenserwartung (Kanungo et al. 2018).

Für diese Arbeit ist von besonderem Interesse, dass Patienten mit Glykogenstoffwechselerkrankungen auch vermehrt Lipidstoffwechselstörungen aufweisen, welche sich als Hyperlipidämien zeigen. Die Mechanismen für diese sekundären Dyslipidämien sind nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch bei Patienten mit Glykogenose Typ 1a gezeigt werden, dass im Rahmen der Glykogenstoffwechselerkrankung eine erhöhte hepatische *de novo* Lipogenese (DNL) stattfindet, bei der aus überschüssigen Kohlenhydraten Fettsäuren synthetisiert und ins Blut abgegeben werden (Bandsma et al. 2002, Bandsma et al. 2008).

## 1.3 Lipide

Der Begriff Lipide umfasst eine heterogene Gruppe organischer Verbindungen und beinhaltet unter anderem Triglyceride, Cholesterin, Fettsäuren, Phospholipide und Sphingolipide. Lipide haben die gemeinsame Eigenschaft, in apolaren organischen Lösungsmitteln löslich und in Wasser ganz oder größtenteils unlöslich zu sein. Während Cholesterin, Phospholipide und Sphingolipide die Hauptbestandteile biologischer Membranen darstellen, dienen Triglyceride vor allem als Energiespeicher. Triglyceride, welche aus Glycerin und drei veresterten Fettsäureresten bestehen, können sowohl über die Nahrung aufgenommen als auch vom menschlichen Körper synthetisiert werden (Triglycerid-Synthese). Die bei der Triglycerid-Synthese genutzten Fettsäuren sind hierbei entweder aus der Nahrung aufgenommen oder neu synthetisiert (*de novo* Lipogenese). Die Triglyceride werden vor allem im Fettgewebe gespeichert; bei Bedarf können freie Fettsäuren in den Blutkreislauf freigesetzt werden. Durch mitochondriale oder peroxisomale Oxidation kann aus den Fettsäuren Energie gewonnen werden. Im Gegensatz zur Energiespeicherung in Form von Glykogen ist die Energiespeicherung in Form von Triglyceriden fast unbegrenzt möglich. Dies liegt zum einen daran, dass Lipide als wasserunlösliche Stoffe generell wenig osmotisch aktiv sind und daher problemlos in Zellen gelagert werden können. Zum anderen weist Fettgewebe mit 33,5 kJ (8 kcal) / Gramm (BNID 110216, Milo et al. 2010) im Vergleich zu Glykogen mit 4,2 kJ (1 kcal) / Gramm (BNID 110211, Milo et al. 2010) eine deutlich höhere Energiedichte auf und ist daher als Energiespeicher vorteilhaft geeignet.

### 1.3.1 Lipidklassen

Lipide können nach vielen verschiedenen Kriterien klassifiziert werden. Die folgende Beschreibung begrenzt sich hierbei auf die im menschlichen Körper vorkommenden Lipidklassen, die sich mithilfe der Lipidzyzer™ Platform (s. 3.5.2 Lipidmessung im Lipidzyzer) messen lassen (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1: Im Lipidyzer™ messbare Lipidklassen**

| <b>Lipidklasse</b>              | <b>Akronym</b> | <b>Gruppe</b>                                   |
|---------------------------------|----------------|---|
| Diacylglycerole = Diglyceride   | DAG            | Acylglycerine                                   |
| Triacylglycerole = Triglyceride | TAG            | Acylglycerine                                   |
| Cholesterinester                | CE             | Ester des Cholesterins;<br>Cholesterin: Sterole |
| Freie Fettsäuren                | FFA            | Fettsäuren                                      |
| Lysophosphatidylcholine         | LPC            | Phospholipide                                   |
| Lysophosphatidylethanolamine    | LPE            | Phospholipide                                   |
| Phosphatidylcholine             | PC             | Phospholipide                                   |
| Phosphatidylethanolamine        | PE             | Phospholipide                                   |
| Sphingomyeline                  | SM             | Phospholipide, Sphingolipide                    |
| Ceramide                        | CER            | Sphingolipide                                   |
| Dihydroceramide                 | DCER           | Sphingolipide                                   |
| Hexosylceramide                 | HCER           | Sphingolipide                                   |
| Lactosylceramide                | LCER           | Sphingolipide                                   |

Diacylglycerole oder auch Diglyceride (DAG) und Triacylglycerole oder auch Triglyceride (TAG) gehören zur Gruppe der Acylglycerine. Sie bestehen aus Glycerol mitsamt mehreren veresterten Fettsäuren. Die Bezeichnung richtet sich nach der Anzahl der veresterten Fettsäuren. Zu der Gruppe der Acylglycerine gehören überdies noch die Monoacylglyceride (MAG), welche aus Glycerol und einer einzigen veresterten Fettsäure bestehen. Während DAG hauptsächlich als intrazelluläre Botenstoffe fungieren, dienen TAG vor allem als Speicher- und Baufett.

Cholesterinester (CE) bestehen aus Cholesterin mitsamt einer veresterten Fettsäure. Sie kommen ausschließlich in tierischen Organismen als Zwischenprodukte im Lipidstoffwechsel vor. Cholesterin gehört zur Gruppe der Sterole und dient sowohl als Membranlipid als auch als Substrat für die Bildung von Hormonen, Gallensäuren und Vitaminen. Cholesterin kann sowohl mit der Nahrung aufgenommen werden als auch neu synthetisiert werden. Im menschlichen Blut liegt ca. 75 % des zirkulierenden Cholesterins als Cholesterinester vor, da die Veresterung den Transport des Cholesterins im Inneren der Lipoproteine erleichtert (s. 1.3.2 Lipidstoffwechsel). Das reine Cholesterin lagert sich aufgrund seiner Struktur hingegen hauptsächlich in der Membran und nur zu einem geringen Anteil im Kern der Lipoproteine ab.

Freie Fettsäuren (FFA) gehören zur Gruppe der Fettsäuren, welche sich durch eine Carboxygruppe sowie eine zumeist unverzweigte Kohlenstoffkette auszeichnen. Man unterscheidet gesättigte Fettsäuren (SFA), deren Kohlenstoffketten nur Einfach-Bindungen aufweisen, von ungesättigten Fettsäuren, deren Kohlenstoffketten eine (MFA) oder mehrere (PUFA) Doppelbindungen aufweisen. Im menschlichen Körper

findet man Fettsäuren vor allem an Glycerin oder Cholesterin verestert. Wird Energie benötigt, erfolgt im Fettgewebe die Lipolyse, durch welche Fettsäuren aus den Triglyceriden abgespalten und ins Blut freigesetzt werden. Die freien Fettsäuren binden an Albumin und werden so zu den Zielorganen wie zum Beispiel der Leber transportiert und können zur Energiegewinnung oder zur Synthese von Triglyceriden zur Synthese von very low density lipoproteins (VLDL) (s. 1.3.2 Lipidstoffwechsel) genutzt werden.

Phospholipide sind Lipide, die eine Veresterung mit Phosphorsäure aufweisen. Hierdurch erhalten sie amphiphile Eigenschaften und sind daher Hauptbestandteile biologischer Membranen. Zur Gruppe der Phospholipide gehören Lysophosphatidylcholine (LPC), Lysophosphatidylethanolamine (LPE), Phosphatidylcholine (PC) und Phosphatidylethanolamine (PE), welche aus einem Glycerin-Grundgerüst sowie zwei veresterten Fettsäuren und einem veresterten Phosphatrest bestehen. Auch Sphingomyeline (SM) zählen zur Gruppe der Phospholipide. Sie weisen statt Glycerin Sphingosin als Grundgerüst auf und gehören daher auch zu den Sphingolipiden.

Die Gruppe der Sphingolipide umfasst Ceramide (CER), Dihydroceramide (DCER), Hexosylceramide (HCER), Lactosylceramide (LCER) und Sphingomyeline (SM). Sphingolipide leiten sich von Sphingosin ab und sind vor allem in Membranen der Haut und des Nervengewebes zu finden, wo sie unter anderem Funktionen in der Signaltransduktion innehaben. Sphingolipide dienen hierbei gemeinsam mit Cholesterin zum einen als strukturgebende Domänen innerhalb von spezialisierten Bereichen in Membranen, sogenannten Lipid Rafts, die als funktionelle Membran-Bereiche für Signaltransduktion dienen. Außerdem nehmen Sphingolipide als intrazelluläre Signalmoleküle an der Signaltransduktion von Prozessen wie Apoptose, Zellproliferation der Zellmigration teil (Hannun und Obeid 2018).

### **1.3.2 Lipidstoffwechsel**

Da alle Lipide die Eigenschaft gemein haben, ganz oder größtenteils unlöslich in Wasser zu sein, müssen sie zum Transport im Blut in Lipoproteine verpackt werden. Diese bestehen aus einem hydrophoben Kern aus Triglyceriden und Cholesterinestern, welcher von einer hydrophilen Membran aus Phospholipiden und Cholesterin umgeben ist, die mit Apolipoproteinen durchsetzt ist.

Apolipoproteine zeichnen sich durch ihre amphipatischen Regionen aus. Hierdurch können sie sowohl mit dem hydrophoben Inneren der Lipoproteine als auch dem hydrophilen Blut interagieren und regulieren somit den Lipoprotein-Metabolismus. Man unterscheidet aktuell elf verschiedene Apolipoproteine, welche vier Hauptfunktionen

erfüllen: Sie lenken die Synthese von Lipoproteinen, geben Lipoproteinen Struktur, dienen als Liganden für Lipoprotein-Rezeptoren und interagieren mit Enzymen des Lipoprotein-Metabolismus (Mahley et al. 1984, Breslow 1985, Feingold 2022).

Die Lipoproteine werden anhand ihrer Größe und ihres Gehalts an Apolipoproteinen und Lipiden in sieben Klassen eingeteilt (s. Tabelle 2): Chylomikronen, Chylomikronen-Remnants, very low density lipoproteins (VLDL), intermediate density lipoproteins (IDL), low density lipoproteins (LDL), high density lipoproteins (HDL) und Lipoprotein (a) (Lp (a)).

**Tabelle 2: Lipoproteinklassen**

| <b>Lipoprotein</b>     | <b>Dichte (g / mL)</b> | <b>Größe (nm)</b> | <b>Hauptanteil Lipide</b> | <b>Hauptanteil Apolipoproteine</b>          |
|------------------------|------------------------|-------------------|---------------------------|---|
| Chylomikronen          | < 0,930                | 75-1200           | TAG                       | Apo B-48, Apo C, Apo E, Apo A-I, A-II, A-IV |
| Chylomikronen-Remnants | 0,930 - 1,006          | 30-80             | TAG<br>CE                 | Apo B-48, Apo E                             |
| VLDL                   | 0,930 - 1,006          | 30-80             | TAG                       | Apo B-100, Apo E, Apo C                     |
| VLDL-Remnants / IDL    | 1,006 - 1,019          | 25-35             | TAG<br>CE                 | Apo B-100, Apo E, Apo C                     |
| LDL                    | 1,019 - 1,063          | 18-25             | CE                        | Apo B-100                                   |
| HDL                    | 1,063 - 1,210          | 5-12              | CE<br>Phospholipide       | Apo A-I, A-II, Apo C, Apo E                 |
| Lp (a)                 | 1,055 - 1,085          | Ca. 30            | CE                        | Apo B-100, Apo (a)                          |

Quelle: Übersetzt und modifiziert nach (Feingold 2022).

### 1.3.2.1 Exogener Lipid-Stoffwechselweg

Der exogene Lipid-Stoffwechselweg beschreibt die Resorption und Distribution von Nahrungsfetten. Triglyceride (TAG) aus der Nahrung (ca. 100 g täglich) werden im Dünndarm von intestinalen Lipasen zu freien Fettsäuren (FFA) und Monoacylglyceriden (MAG) hydrolysiert. Diese werden mit Gallenflüssigkeit emulgiert; es bilden sich Mizellen, welche von den Enterozyten resorbiert werden können. Die Aufnahme von Cholesterin und Pflanzensterolen aus der Nahrung bzw. des Cholesterins aus der Galle erfolgt über den Steroltransporter Niemann-Pick C1-like 1 Protein (NPC1L1) (Altmann et al. 2004). Ein Teil des resorbierten Cholesterins wird jedoch über den ATP-Binding Cassette Transporter G5/G8 (ABCG5/G8), auch Sterolin genannt, zurück ins intestinale Lumen befördert (Berge et al. 2000). Die resorbierten FFA werden mit MAG zu TAG und

mit Cholesterin zu Cholesterinestern (CE) verestert. Gemeinsam mit Apolipoproteinen, in diesem Fall ApoB-48, werden TAG und CE zu Chylomikronen verpackt. Die Chylomikronen werden in die Lymphe sezerniert und erreichen über den Ductus thoracicus den Blutstrom. Hierbei nehmen Chylomikronen weitere Apolipoproteine aus den high density lipoproteins (HDL) (s. 1.3.2.3 Reverser Cholesterintransport) auf. An den Endothelzellen kleiner Blutgefäße im Muskel- und Fettgewebe erfolgt durch die Lipoproteinlipase (LPL) die Lipolyse der TAG zu FFA und MAG, welche durch Fettsäure-Transportproteine (FATP) und Transmembran Rezeptoren wie den cluster of differentiation 36 (CD36) ins Gewebe aufgenommen werden. Die FFA und MAG können zu TAG resynthetisiert und in Form von Lipidtröpfchen gespeichert oder direkt zur Energiegewinnung in Mitochondrien genutzt werden. Durch die Lipolyse entstehen Chylomikronen Remnants, welche eine hohe Konzentration an CE enthalten und über den LDL-Rezeptor in die Leber aufgenommen werden können.

### 1.3.2.2 Endogener Lipid-Stoffwechselweg

Über den endogenen Lipid-Stoffwechselweg erfolgt während Fastenperioden die Versorgung peripherer Gewebe mit Cholesterin und Triglyceriden. Hierzu werden in der Leber very low density lipoproteins (VLDL) synthetisiert, welche als Apolipoproteine hauptsächlich ApoB-100 sowie Apo E und als Lipide TAG und CE tragen. Nachdem die VLDL über die Lymphe den Blutstrom erreicht haben, nehmen sie ähnlich den Chylomikronen aus den HDL weitere Apolipoproteine (Apo E und Apo C-II) auf. Die Lipolyse im peripheren Gewebe erfolgt ebenfalls durch die LPL. Die aus den TAG freigesetzten FFA werden ins Gewebe aufgenommen. Es entstehen VLDL-Remnants oder auch IDL, die hauptsächlich CE und nur noch wenig TAG enthalten. Etwa die Hälfte dieser Remnants wird über den LDL-Rezeptor in die Leber aufgenommen. Der anderen Hälfte der VLDL-Remnants werden über Interaktion mit der hepatischen Lipase die restlichen TAG entzogen, was zur Bildung von LDL führt. Zirkulierende LDL werden über den LDL-Rezeptor zum Großteil in die Leber und zu einem kleinen Teil auch in periphere Gewebe aufgenommen. Die Rate, zu der LDL in die Leber aufgenommen werden, hängt vom Cholesteringehalt der Hepatozyten ab. Je niedriger der Cholesteringehalt, desto höher die LDL-Aufnahme und *vice versa*. Ein niedriger Cholesteringehalt erhöht die Aktivität des Transkriptionsfaktors Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 (SREBP-2). SREBP-2 stimuliert die Genexpression des LDL-Rezeptors und andere Gene des Fettsäure- und Cholesterin-Stoffwechsels, u.a. die HMG-CoA-Reduktase, die für die Synthese von Cholesterin zuständig ist. Hohe LDL-Spiegel im Blut stehen mit der Pathogenese von Atherosklerose in Verbindung: Oxidierte LDL, welche im oxidativen Milieu entzündeter Bereiche von Arterien entstehen können, können über Scavenger-

Rezeptoren von Makrophagen aufgenommen werden. Durch die Überladung der Makrophagen mit Cholesterin entstehen Schaumzellen, welche die Pathogenese von Atherosklerose fördern.

### 1.3.2.3 Reverser Cholesterintransport

In peripheren Zellen kommt es durch Aufnahme von Cholesterin aus zirkulierenden Lipoproteinen sowie Neusynthese von Cholesterin zu einer Cholesterin-Akkumulation. Da nur wenige Zellen selbst ihren Cholesteringehalt reduzieren können, wird über den reversen Cholesterintransport Cholesterin zurück zur Leber transportiert, wo es in die Galle sezerniert werden kann. Der Transport erfolgt über HDL, welche eine heterogene Klasse von Lipoproteinen unterschiedliche Größe und Dichte sind. Die Formation reifer HDL erfordert mehrere Schritte, von denen der erste die Synthese von Apo A-1 in der Leber und im Dünndarm ist. Apo A-1 wird ins Blut sezerniert, und bildet mit über ATP-Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) sezernierten Phospholipiden und Cholesterin Vorläufer-HDL. Die Vorläufer-HDL reifen, indem durch die Lecithin-Cholesterin Acyltransferase (LCAT) die Veresterung des aufgenommenen Cholesterins zu Cholesterinestern erfolgt. Die reifen HDL können dann von peripheren Zellen mithilfe der ATP-Binding Cassette Transporter G1 (ABCG1) sezerniertes Cholesterin aufnehmen. Auch dieses Cholesterin wird zu CE verestert. Zudem können HDL Cholesterin aus Chylomikronen und VLDL aufnehmen. Der Transport von HDL-Cholesterin zur Leber erfolgt zum einen indirekt über die Interaktion mit Apo B-haltigen Lipoproteinen (LDL und VLDL), bei dem über das Cholesterinester-Transportprotein (CETP) CE der HDL gegen TAG aus den LDL und VLDL getauscht wird. Die in die HDL aufgenommenen TAG können durch die hepatische Lipase gespalten werden und es entstehen kleine HDL. Die cholesterinhaltigen VLDL und LDL können dann über den LDL-Rezeptor der Leber aufgenommen werden. Der Großteil des HDL-Cholesterins wird jedoch direkt in die Leber aufgenommen, wo über den Scavenger-Rezeptor B1 (SR-B1), auch HDL-Rezeptor genannt, eine selektive Aufnahme des Cholesterins der HDL möglich ist. Die nun vom Cholesterin befreiten HDL zirkulieren wieder in den Blutstrom.

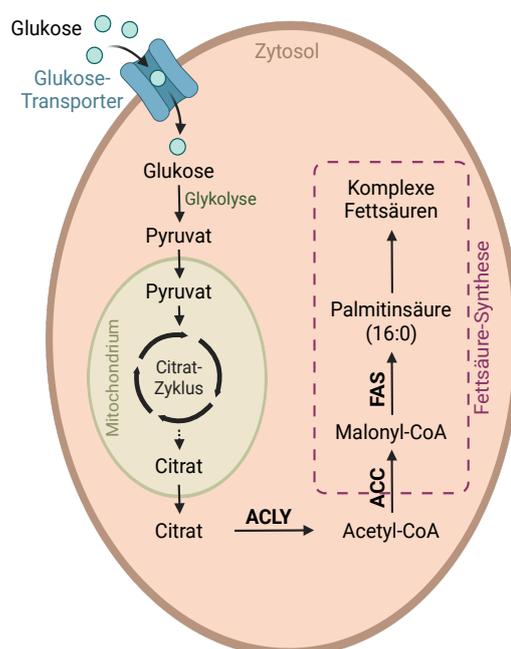
### 1.3.3 *De novo* Lipogenese

*De novo* Lipogenese (DNL) beschreibt die Neu-Synthese von Lipiden, genauer gesagt Fettsäuren, aus Nicht-Lipid-Vorstufen wie z.B. Intermediaten des Kohlenhydrat-Stoffwechsels. Diese Fettsäuren können im Rahmen der Triglycerid-Synthese mit Glycerin zu Triglyceriden verestert und als Energiespeicher eingelagert werden, um bei Bedarf Energie zu liefern. DNL findet vor allem in der Leber und im Fettgewebe statt

(Ameer et al. 2014). In der Leber wird ein Großteil der neu synthetisierten Fettsäuren als TAG in VLDL verpackt und dient als Energielieferant für peripheres Gewebe (s. 1.3.2.2 endogener Lipidstoffwechsel) (Sanders und Griffin 2016). Im Fettgewebe werden die Fettsäuren als TAG eingelagert und können bei Bedarf freigesetzt werden. Experimentell konnte gezeigt werden, dass bei stark erhöhter Kohlenhydrat-Zufuhr die Kohlenhydrate im menschlichen Körper zum einen als Glykogen gespeichert (ca. 500 g insgesamt möglich) und zum anderen zu Lipiden umgewandelt werden (Acheson et al. 1988).

### 1.3.3.1 Fettsäure-Synthese

Ausgangsstoff für die DNL ist Citrat aus dem Citratzyklus, welches durch die ATP-Citrat-Lyase (ACLY) im Zytosol zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und Oxalacetat umgewandelt wird. Danach wird Acetyl-CoA über die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) zu Malonyl-Coenzym-A (Malonyl-CoA) carboxyliert. Malonyl-CoA ist das Substrat für die Fettsäure-Synthese (FAS), welches das Schlüsselenzym der DNL ist. Die FAS ist ein Multienzymkomplex, welche durch Verknüpfung von Kohlenhydrat-Fragmenten aus Malonyl-CoA unter Verbrauch von Nicotinamidadeninindinukleotidphosphat (NADPH) Palmitinsäure (16:0) herstellen kann (s. Abbildung 3). Palmitinsäure ist eine ungesättigte Fettsäure (SFA) mit 16 Kohlenstoff-Atomen. Da Palmitinsäure in größeren Mengen zytotoxisch wirken kann (Lee et al. 1994, Malhi et al. 2006), wird Palmitinsäure üblicherweise durch die Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) zur einfach ungesättigten Fettsäure (MUFA) Palmitoleinsäure (16:1) desaturiert. Palmitinsäure kann auch durch Fettsäure-Elongasen zu Stearinsäure (18:0) verlängert werden, welche konsekutiv von der SCD zu Ölsäure (18:1) desaturiert werden kann.



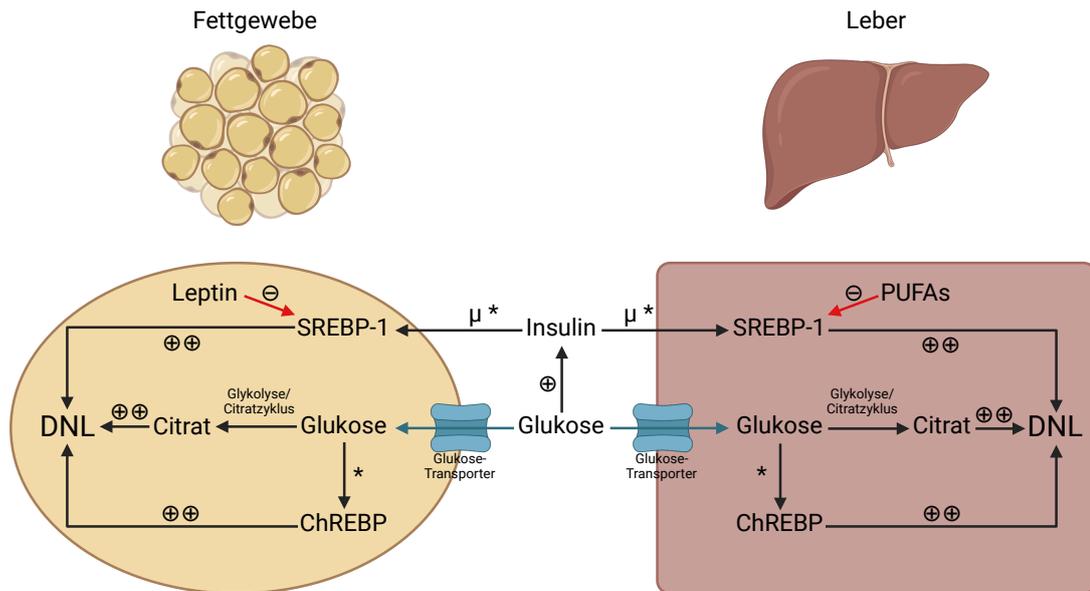
**Abbildung 3: Molekularer Mechanismus der *de novo* Lipogenese.** Über Glukosetransporter aufgenommene Glukose wird über die Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt. Pyruvat wird zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches in den Citratzyklus eintritt, in dem Citrat produziert wird. Citrat tritt ins Zytosol ein und wird dort durch ACLY zu Acetyl-CoA umgewandelt. Mithilfe der ACACA entsteht aus Acetyl-CoA Malonyl-CoA, welches als Substrat für die FAS dient, um Palmitinsäure herzustellen.

Quelle: Modifiziert nach (Ameer et al. 2014)

### 1.3.3.2 Regulation

Die DNL ist auf vielfältige Weisen reguliert. Generell ist die DNL im anabolen Metabolismus aktiv, der durch hohe Glukose- und Insulinspiegel die DNL fördert. Es konnte gezeigt werden, dass kohlenhydratreiche Ernährung die hepatische DNL aktiviert (Schwarz et al. 1995) und zur gesteigerten Synthese und Sekretion von VLDL führt (Barrows und Parks 2006).

Der Glukosespiegel im Plasma stimuliert die DNL über verschiedene Wege. Zum einen wird über den Glukosestoffwechsel das Substrat für die Fettsäuresynthese bereitgestellt (Kersten 2001). Zum anderen induziert Glukose über den Transkriptionsfaktor Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) die Expression lipogener Gene. Intermediate der Glykolyse aktivieren ChREBP, welches nachfolgend mit Max-like protein x (Mlx) ein Heterodimer bildet. Der Komplex transloziert in den Nukleus und bindet dort an Kohlenhydrat-Response-Elemente lipogener Gene, wie z.B. *ACACA* und *FASN*, welche für die ACC bzw. FAS kodiert (Ma et al. 2005). Überdies beeinflusst der Glukosespiegel die Insulin-Sekretion, welche die Expression lipogener Gene stimuliert. Insulin aktiviert den Transkriptionsfaktor Sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) (Foretz et al. 1999), welcher an Sterol regulatory Elements in den Promotoren lipogener Gene wie *ACACA* und *FASN* binden (Magaña und Osborne 1996, Magaña et al. 1997). Im Gegenzug wird die Aktivität von SREBP-1 in der Leber durch PUFAs (Jump et al. 1994) und im Fettgewebe durch Leptin (Swierczynski 2006) gehemmt. Die Regulation der DNL in Leber und Fettgewebe sind in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Regulation der DNL in Fettgewebe (links) und Leber (rechts).** Der Glukosestoffwechsel stellt über die Glykolyse eine Kohlenstoffquelle für die DNL bereit. Der Effekt von Glukose auf die Expression lipogener Gene ist vor allem über die posttranslationale Modifikation von ChREBP reguliert. Glukose stimuliert Insulin, welches die Expression von SREBP-1 und damit die DNL erhöht. SREBP-1 wird in der Leber durch PUFAs und im Fettgewebe durch Leptin gehemmt. Symbole: +, leichtere Stimulation; ++, höhere Stimulation; -, transkriptionelle Hemmung; μ, transkriptionelle Stimulation, \*, post-translationale Aktivierung.

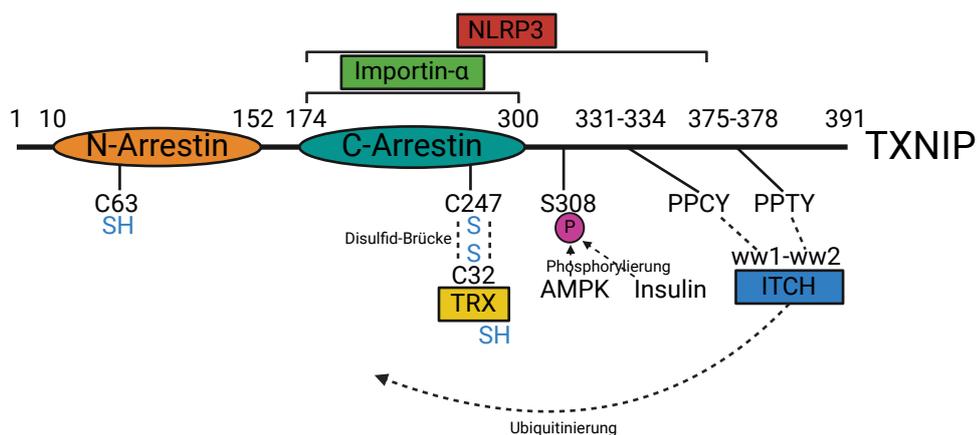
Quelle: Modifiziert nach (Ameer et al. 2014)

## 1.4 TXNIP

Thioredoxin interacting protein (TXNIP) ist ein Molekül mit einer molekularen Masse von ~ 46 kDA. Namensgebend ist seine Interaktion mit Thioredoxin (TRX), in welcher TXNIP die Aktivität von TRX negativ reguliert (Nishiyama et al. 1999, Junn et al. 2000). TRX ist ein Thiol-Oxireduktase-System, welches durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oxidierte Proteine reduziert (Yodoi et al. 2001). Auf diese Weise beeinflusst TXNIP die zelluläre Redox-Balance in Richtung eines oxidierten Zustandes.

Ursprünglich wurde TXNIP in mit Vitamin D3 stimulierten HeLa-Zellen entdeckt, weshalb es zunächst als „vitamin D upregulated protein-1“ (VDUP-1) bezeichnet wurde (Chen und DeLuca 1994). Als später die Interaktion zwischen VDUP-1 und TXN bekannt wurde, erfolgte die Namensgebung zu „Thioredoxin Binding Protein-2“ (TBP-2) (Nishiyama et al. 1999). Nachdem in der Publikation von Bodnar et al. (2002) eine Mauslinie mit kombinierter Hyperlipidämie (Hcb-19) samt ursächlicher TBP-2 *Nonsense*-Mutation in beschrieben wurde, erfolgte die Umbenennung in TXNIP.

TXNIP gehört zur Familie der  $\alpha$ -Arrestine (Alvarez 2008) und enthält zwei Arrestin-Domänen. Die funktionstragenden Proteinregionen liegen hauptsächlich in der C-terminalen Arrestin-Domäne sowie in der C-terminalen Region: Über das Cystein247 im C-Arrestin interagiert TXNIP mit TRX (Patwari et al. 2006) (s. 1.4.1 TXNIP im Redoxstoffwechsel). Das C-Arrestin kann an Importin- $\alpha$  binden, welches den Transport in den Nukleus ermöglicht (Nishinaka et al. 2004). Über das C-Arrestin und die C-terminale Region bindet TXNIP an NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) und aktiviert das Inflammasom (Zhou et al. 2010). Am C-terminalen Ende von TXNIP liegen weitere wichtige Sequenzen: Über zwei PPxY Motive (PPCY und PPTY) in TXNIP können die vier WW Domänen der E3 Ubiquitin-Ligase ITCH binden (Zhang et al. 2010). Die Phosphorylierung an Serin308 über die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) und Insulin-Signaling fördert die Proteindegradation (s. 1.4.2 TXNIP im Glukose- und Lipidstoffwechsel) (Wu et al. 2013, Waldhart et al. 2017). In Abbildung 5 sind die Struktur und die funktionellen Domänen des TXNIP Proteins dargestellt.



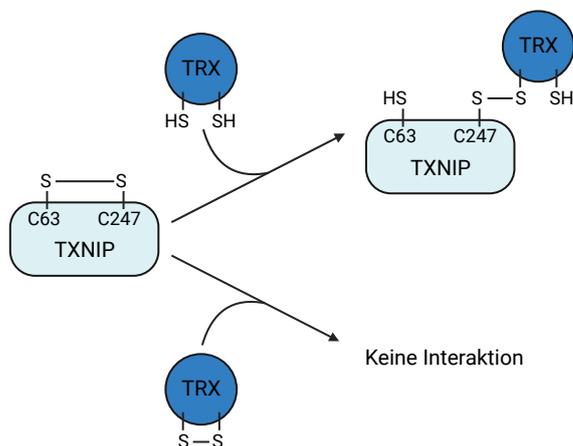
**Abbildung 5: TXNIP Protein: Struktur und Domänen.** TXNIP Protein enthält eine N-terminale und eine C-terminale Arrestin-Domäne. Über das Cystein247 im C-Arrestin interagiert TXNIP mit TRX. Das C-Arrestin kann an Importin- $\alpha$  binden, welches den Transport in den Nukleus ermöglicht. Über das C-Arrestin und die C-terminale Region bindet TXNIP an NLRP3 und aktiviert das Inflammasom. Am C-terminalen Ende von TXNIP liegen weitere wichtige Sequenzen: Über zwei PPxY Motive (PPCY und PPTY) in TXNIP können die vier WW Domänen der E3 Ubiquitin-Ligase ITCH binden. Die Phosphorylierung an Serin308 über die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) und Insulin-Signaling fördert die Proteindegradation.

Quelle: Modifiziert nach (Yoshihara 2020)

### 1.4.1 TXNIP im Redoxstoffwechsel

Die Interaktion zwischen TXNIP und TRX findet nur zwischen der oxidierten Form von TXNIP und der reduzierten Form von TRX statt. Hierbei liegt in TXNIP an den Cystein-Resten Cys63 und Cys247 eine Disulfidbrücke vor, während in TRX an den Cystein-Resten Cys32 und Cys35 Thiolgruppen vorliegen.

Die Interaktion ist durch den Austausch der Disulfidbrücke von TXNIP hin zu einer neuen, gemeinsamen Disulfidbrücke zwischen TXNIP und TRX gekennzeichnet. Die neue gemeinsame Disulfidbrücke wird hierbei zwischen Cys247 von TXNIP und Cys32 von TRX gebildet.



**Abbildung 6: Mechanismus der Interaktion zwischen TXNIP und TRX.** TXNIP enthält eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cys63 und Cys247, über welche die Interaktion mit TRX erfolgt. Über einen Disulfid-Austausch bildet TXNIP über Cys247 eine neue Disulfidbrücke mit TRX.

Quelle: Modifiziert nach (Patwari et al. 2006)

Auf diese Weise hemmt TXNIP die Aktivität von TRX (Patwari et al. 2006) (s. Abbildung 6). Zum einen wird dadurch die TRX Reduktase-Aktivität gehemmt, was unter Einfluss von oxidativem Stress zu einem vermehrten Anfall von oxidierten Proteinen und konsekutiver Apoptose-Einleitung führen kann (Spindel et al. 2012). Zum anderen kann durch die Bindung von TXNIP an TRX die Interaktion zwischen TRX und anderen Proteinen wie z.B. ASK1 (Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1) beendet werden, was sich in diesem Beispiel proinflammatorisch und proapoptotisch auswirken kann (Yamawaki et al. 2005, Saxena et al. 2010). Auf diesen und weiteren Signalwegen (vgl. Chen et al. 2020) kann TXNIP Apoptose induzieren und Zellwachstum inhibieren, weshalb *TXNIP* als Tumorsuppressorgen gilt.

#### 1.4.2 TXNIP im Glukose- und Lipidstoffwechsel

Es konnte gezeigt werden, dass TXNIP neben seinen Redox-abhängigen Funktionen Redox-unabhängige Funktionen besitzt, die von seiner Struktur als  $\alpha$ -Arrestin rühren (Patwari et al. 2009). Im Einzelnen sind u.a. Effekte auf Zellwachstum, Karzinogenese, kardiale Funktionen und den Metabolismus beschrieben (Spindel et al. 2012). Hervorzuheben sind die Funktionen von TXNIP in der Stoffwechsel-Regulation und hierbei insbesondere im Glukose- und Fettstoffwechsel, in denen TXNIP in den letzten Jahren als Schlüssel-Regulator bekannt wurde (Alhawiti et al. 2017).

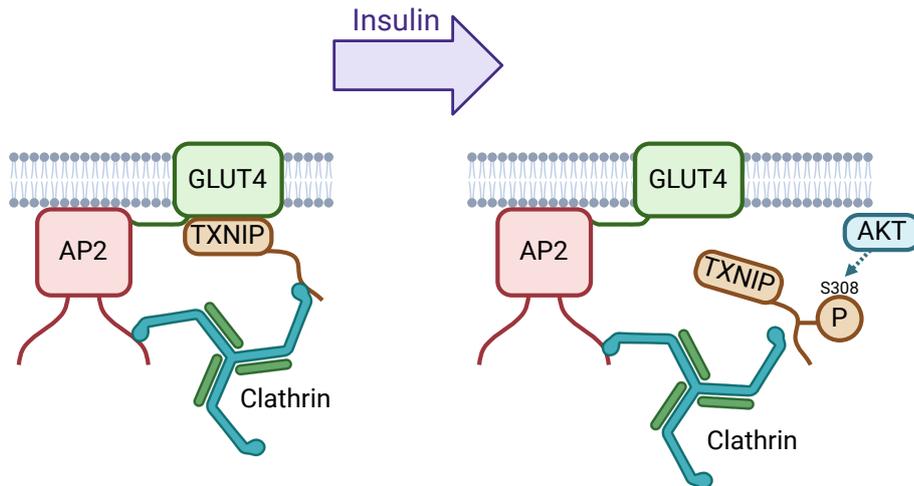
Die Expression von TXNIP unterliegt der Kontrolle durch den Glukose-Haushalt der Zellen. In Betazellen ist TXNIP hierbei eines der Gene, dessen Transkription am stärksten durch Glukose induziert wird (Shalev et al. 2002). Bei erhöhten Glukosekonzentrationen innerhalb der Zelle steigen konsekutiv die Intermediate der Glykolyse. Diese aktivieren die paralogen Transkriptionsfaktoren MondoA bzw. ChREBP. MondoA ist auch als MLXIP (Max-like protein x – interacting protein) bekannt und wird vor allem in Skelettmuskeln (Billin et al. 2000) exprimiert, während ChREBP auch als MondoB oder MLXIPL (Max-like protein x – interacting protein – like) bekannt ist und vor allem in Adipozyten (Herman et al. 2012) und Hepatozyten (Yamashita et al. 2001) vorkommt. In Betazellen ist sowohl das Vorkommen von ChREBP (Minn et al. 2005) als auch MondoA (Richards et al. 2018) beschrieben. MondoA bzw. ChREBP bilden nachfolgend mit Mlx (Max-like protein x) ein Heterodimer. Der Komplex transloziert in den Nukleus und bindet dort an ein Kohlenhydrat-Response-Element im *TXNIP* Gen, um die Genexpression von *TXNIP* zu fördern (Stoltzman et al. 2008, Chamolstad et al. 2009). Die Aktivität von ChREBP kann unter anderem über seinen Phosphorylierungs-Status reguliert werden. Unter Fasten-Bedingungen wird ChREBP durch die Proteinkinase A und die AMPK phosphoryliert, was zum Verbleib von ChREBP

im Zytosol bzw. einer verminderten Bindungsaffinität von ChREBP an die Promotoren der Zielgene führt (Ortega-Prieto und Postic 2019). Es konnte gezeigt werden, dass TXNIP die Phosphorylierung von ChREBP durch AMPK hemmen kann, wodurch die nukleäre Translokation von ChREBP gefördert wird (Chen et al. 2014). Auf diese Weise fördert TXNIP seine eigene Genexpression im Sinne eines positiven Feedbacks.

Während Glukose die Genexpression von *TXNIP* induziert, wirkt Insulin reziprok inhibierend. Parikh und Kollegen (2007) konnten diese Effekte sowohl *in vivo* in humanen Muskelbiopsien vor und nach euglykämischer Insulin-Clamp als auch *in vitro* in einer humanen Adipozyten-Zelllinie zeigen. Die Arbeiten von Nagaraj et. al (2018) sowie Panse et. al (2018) legen nahe, dass dieser Insulin-Effekt über den Insulin-like Growth Factor (IGF1) vermittelt wird.

Die Glukose-Aufnahme in periphere Zellen ist im Sinne eines negativen Feedbacks über TXNIP reguliert. In murinen 3T3-L1 Adipozyten und humanen primären Myozyten wurde gezeigt, dass TXNIP die Glukoseaufnahme hemmt (Parikh et al. 2007). Wu et al. (2013) konnten später zeigen, dass TXNIP die Glukose-Aufnahme sowohl direkt durch Bindung an membrangebundene GLUT1 und konsekutiver Endozytose über clathrinbeschichtete Vertiefungen als auch indirekt durch Reduktion der GLUT1 mRNA-Menge hemmt. Zudem wurde dargestellt, dass TXNIP unter energiearmen Bedingungen (niedriges ATP/ADP Verhältnis) durch die AMPK phosphoryliert wird, was zu einem akuten Funktionszuwachs von GLUT1 und Anstieg der GLUT1 mRNA-Menge führt. Der genaue Mechanismus, über den TXNIP die GLUT1 Genexpression beeinflusst, konnte allerdings noch nicht ermittelt werden. Es wurde jedoch entdeckt, dass die Phosphorylierung an Serin308 zu einer Dissoziation der Bindung zwischen TXNIP und GLUT1 an der Plasmamembran und überdies zu einer verstärkten Degradation von TXNIP über Ubiquitin-Protein-Ligasen führt. Durch den nunmehr vermehrten Glukose-Einstrom über GLUT1 können die Energiereserven der Zellen wiederaufgefüllt und das ATP/ADP Verhältnis verbessert werden. Sobald die Energie-Homöostase wiederhergestellt ist, wird zuletzt durch die ansteigenden Glukosekonzentrationen die Genexpression von *TXNIP* induziert, um den Glukoseeinstrom über die Endozytose von GLUT1 wiederum zu begrenzen.

Schon lange ist bekannt, dass die akute Glukose-Aufnahme in Fett- (Cushman und Wardzala 1980) und Muskelzellen (Klip et al. 1987) über die Insulin-vermittelte Translokation von intrazellulären GLUT4-Vesikeln an die Plasmamembran stattfindet.



**Abbildung 7: Interaktion zwischen TXNIP und GLUT4.** TXNIP ist an membrangebundene GLUT4 assoziiert und dient gemeinsam mit dem AP2 Adaptor Complex als Adapterprotein für deren Clathrin-vermittelte Endozytose. Unter Insulineinfluss erfolgt die AKT-abhängige Phosphorylierung von TXNIP an Serin 308, welche zur Dissoziation der Bindung zwischen TXNIP und GLUT4 und konsekutivem Glukoseeinstrom über GLUT4 führt.

Quelle: modifiziert nach (Waldhart et al. 2017)

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass auch TXNIP einen Teil zum schnellen Insulin-vermittelten Glukoseeinstrom beiträgt: Waldhart et al. (2017) konnten zeigen, dass TXNIP als direktes Substrat der Proteinkinase K (AKT) für den nach Wachstumsfaktor-Stimulation durch AKT vermittelten Glukoseeinstrom verantwortlich ist. Es wurde gezeigt, dass TXNIP für membrangebundenes GLUT4 analog wie bereits gezeigt für GLUT1 (s.o.) als Adapterprotein zur Endozytose dient. Auch hier erfolgt die Dissoziation der Bindung zwischen TXNIP und GLUT4 durch eine Phosphorylierung an Serin 308 von TXNIP, welche jedoch Insulin-abhängig durch AKT (und nicht durch AMPK) erfolgt. Die daraus resultierende Funktionssteigerung von sich bereits an der Plasmamembran befindenden GLUT4 trägt zum schnellen Glukoseeinstrom nach Insulinausschüttung bei (s. Abbildung 7). Im Mausmodell führte der globale Knockout von TXNIP unter Fasten-Bedingungen zu einem vermehrten Verbleib von GLUT4 an der Plasmamembran, was vermehrte Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebe hervorrief. Die Autoren folgern, dass dies die in den TXNIP Knockout Mäusen beobachteten Hypoglykämien unter Fasten-Bedingungen hervorruft.

Das Zusammenspiel von Glukose und Insulin in Verbindung mit TXNIP bildet somit ein ausgeklügeltes Regulationssystem, um den Glukosehaushalt in den peripheren Zellen in Balance zu halten. Nach Nahrungsaufnahme mit Angebot von Glukose in Kombination mit dem anabolen Signal des Insulins trägt die Insulinvermittelte Phosphorylierung von

TXNIP zu einer Bereitstellung von GLUT4 an der Plasmamembran bei. Zudem erfolgt über IGF1 eine Hemmung der TXNIP Genexpression. Der Glukoseeinstrom in die Zellen nimmt zu, die TXNIP-abhängige Endozytose von Glukosetransportern wird gestoppt. Wenn die Zellen genug Glukose aufgenommen haben, steigt die intrazelluläre Glukosekonzentration. Dies steigert wiederum über ChREBP bzw. MondoA die Genexpression von *TXNIP*, was die Assoziation von TXNIP an die Glukosetransporter und konsekutiver Hemmung des Glukoseeinstroms zur Folge hat. Unabhängig von Insulin erfolgt die Regulierung des basalen Glukosehaushaltes über den gleichen Mechanismus, nur dass die Phosphorylierung von TXNIP durch die AMPK und der Glukoseeinstrom durch GLUT1 erfolgt. Aus diesem Grund wird TXNIP als Schlüsselregulator für Glukosetransporter angesehen.

#### **1.4.2.1 TXNIP-Defizienz im Mausmodell: Regulation des Glukose- und Lipidstoffwechsels**

Mit der Entdeckung der spontanen *TXNIP Nonsense*-Mutation in der rekombinanten Inzucht-Mauslinie Hcb-19 durch Bodnar et al. (2002) wurde die essenzielle Rolle von TXNIP für einen physiologischen Glukose- und Lipidmetabolismus bekannt (Yoshihara 2020): Die Hcb-19 Mäuse zeigten ähnlich einer familiären kombinierten Hyperlipidämie erhöhte Plasmalipide sowie einen gestörten Glukosemetabolismus mit hyperinsulinämischer Hypoglykämie und Ketose während Fastenperioden. Viele Merkmale der Hcb-19 Mäuse konnten auch in späteren Experimenten an Mäusen mit gentechnisch erzeugtem globalem TXNIP Knockout beobachtet werden: *TXNIP<sup>-/-</sup>* (C57B/6) Mäuse entwickelten unter Fasten-Bedingungen hyperinsulinämische Hypoglykämien und Ketosen, sowie eine abnorme Fettleber (Oka et al. 2006, Oka et al. 2009). In einer weiteren Studie mit *TXNIP<sup>-/-</sup>* (C3H/DiSnA) Mäusen konnten diese metabolischen Auffälligkeiten auch unter normalen Fütterungsbedingungen beobachtet werden. Daher schlossen die Autoren, dass die TXNIP-Defizienz den Übergang zwischen katabolem und anabolem Stoffwechsel verhindert (Sheth et al. 2005). Interessanterweise zeigten in einer anderen Studie *TXNIP<sup>-/-</sup>* (C57B/6) Mäuse im Gegensatz zu vorherigen Ergebnissen weder Hyperinsulinämie noch Hyperlipidämie (Chutkow et al. 2008). Da sich diese Beobachtung in der Literatur jedoch nicht wiederholt, werden im Folgenden Hyperinsulinämie und Hyperlipidämie als Charakteristika aller TXNIP-defizienten Mäuse (Hcb-19, *TXNIP<sup>-/-</sup>* (C57B/6) sowie *TXNIP<sup>-/-</sup>* (C3H/DiSnA) angenommen (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3: Eigenschaften TXNIP-defizienter Mäuse

|                               |           | <b>Hcb-19<br/>(TXNIP<br/>Nonsense)</b>                                      | <b>TXNIP<sup>-/-</sup><br/>(C57B/6)</b>                 | <b>TXNIP<sup>-/-</sup><br/>(C3H/DiSnA)</b> |
|-------------------------------|-----------|---|---|--|
| <b>Hypertriglyceridämie</b>   | Fasten    | ✓   | ✓ / -   | ✓  |
|                               | Fütterung | ✓   | ✓ / -   | -  |
| <b>Hypercholesterinämie</b>   | Fasten    | ✓   | ✓   | ✓  |
|                               | Fütterung | ?   | -   | -  |
| <b>Hypoglykämie</b>           | Fasten    | ✓   | ✓   | ✓  |
|                               | Fütterung | -   | ✓   | ✓  |
| <b>Hyperinsulinämie</b>       | Fasten    | ✓   | ✓ / -   | ✓  |
|                               | Fütterung | ✓   | -   | ✓  |
| <b>Erhöhte Ketonkörper</b>    | Fasten    | ✓   | ✓   | ✓  |
|                               | Fütterung | ✓   | ✓ / -   | ✓  |
| <b>Erhöhter Laktatspiegel</b> | Fasten    | ✓   | -   | -  |
|                               | Fütterung | ?   | ✓   | ✓  |
| <b>Verstärkte DNL</b>         | Fasten    | ✓   | -   | ✓  |
|                               | Fütterung | -   | -   | ✓  |
| <b>Quellen</b>                |           | (Bodnar et al. 2002, Donnelly et al. 2004, Hui et al. 2004, Xu et al. 2013) | (Oka et al. 2006, Chutkow et al. 2008, Oka et al. 2009) | (Sheth et al. 2005)                        |

✓ = vorhanden, - = nicht vorhanden, ? = nicht durchgeführt. Dargestellt sind signifikante Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.

Die Hyperinsulinämien der TXNIP-defizienten Mäuse führen Forscher auf den Einfluss von TXNIP auf die Insulinproduktion und -sekretion zurück: Xu et al. (2013) zeigten, dass TXNIP die Insulinproduktion hemmt. Hierbei induziert TXNIP die Expression der Mikro-RNA miR-204, welche den für die Transkription von Insulin wichtigen Transkriptionsfaktor MafA stört. Passend dazu konnte in den primären Inselzellen TXNIP-defizienter Hcb-19 Mäuse ein erhöhter Insulingehalt nachgewiesen werden. Die Überexpression von miR-204 in diesen Zellen reduzierte den Insulingehalt auf Werte ähnlich zu den bei Wildtyp-Mäusen gemessenen Werten. Zudem konnten Oka und Kollegen (2009) zeigen, dass TXNIP<sup>-/-</sup> (C57B/6) Mäuse eine erhöhte Insulinsekretion aufweisen. Während intraperitonealer Glukosetoleranz-Tests waren die Insulinwerte im Serum sowohl vor als auch nach der Injektion von Glukose höher als bei den Wildtyp-Mäusen.

Die Hyperinsulinämie der TXNIP-defizienten Mäuse hat unter anderem eine Steigerung der Genexpression Insulin-abhängiger Gene zur Folge. Es konnte gezeigt werden, dass u.a. die Expression von SREBP-1c, einem lipogenen Transkriptionsfaktor, steigt. Dies führt zu einer erhöhten Expression der FAS in der Leber, welche für *de novo* Lipogenese zuständig ist (s. 1.3.3 *De novo* Lipogenese). Die Hyperlipidämie der Hcb-19 (Hui et al. 2004) und *TXNIP*<sup>-/-</sup> (C3H/DiSnA) Mäuse (Sheth et al. 2005) wird auf diese Veränderungen zurückgeführt. In anderen Experimenten konnte bestätigt werden, dass Hcb-19 Mäuse eine höhere Rate an *de novo* Lipogenese sowie eine erhöhte Aktivität der FAS in der Leber aufweisen (Donnelly et al. 2004).

Die Hypoglykämien der TXNIP-defizienten Mäuse erklären die Forscher neben der Wirkung der Hyperinsulinämie durch den Einfluss von TXNIP auf die Glukoseproduktion in der Leber und auf die periphere Glukoseaufnahme: Chutkow et al. (2008) zeigten, dass TXNIP für die hepatische Glukoseproduktion essenziell ist. *TXNIP*<sup>-/-</sup> (C57B/6) Mäuse wiesen unter Glukagon-Stimulation im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen nur eine geringe Glukose-Produktion auf. In den primären Hepatozyten der *TXNIP*<sup>-/-</sup> Mäuse konnte passend dazu eine verringerte Glukose-Freisetzung festgestellt werden. Die Reexpression von TXNIP in diesen Zellen konnte die Glukoseproduktion wiederherstellen. Interessanterweise war für diesen Effekt das Vorhandensein des Cystein-247 in TXNIP, über das TXNIP an TRX bindet, notwendig. Überdies konnte auch im Mausmodell gezeigt werden, dass TXNIP die Glukose-Aufnahme in periphere Gewebe reguliert. Während sich die Glukose Clearance bei Mäusen mit leberspezifischem *TXNIP* Knockout nicht von der bei Wildtyp-Mäusen unterschied, sank der Blutzuckerspiegel nach Glukosebolus-Gabe bei den Mäusen mit globalem TXNIP Knockout schneller ab. Die Autoren folgerten daraus, dass TXNIP die Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebe reguliert (Chutkow et al. 2008). Auch Waldhart et. al. (2017) führten an *TXNIP*<sup>-/-</sup> (C57B/6) Mäusen und Wildtyp Mäusen Messungen der Glukoseaufnahme durch: Die Forscher konnten hierbei zeigen, dass Mäuse mit globalem *TXNIP* Knockout im Vergleich mit Wildtyp Mäusen einen vermehrten Glukoseeinstrom in Muskel- und Fettgewebe aufweisen.

#### 1.4.2.2 TXNIP und Diabetes mellitus im Mausmodell

In der Entstehung von Diabetes mellitus wird TXNIP eine Schlüsselrolle zugeschrieben. Es ist schon länger bekannt, dass in Betazellen TXNIP eines der Gene ist, dessen Transkription am stärksten durch Glukose induziert wird (Shalev et al. 2002). In den primären Inselzellen verschiedenen Mausmodellen von Diabetes Typ 1 und 2 war die Genexpression von *TXNIP* erhöht (Minn et al. 2005). Neben den o.g. Effekten von TXNIP

auf Glukoseaufnahme, Glukoneogenese, Insulinproduktion und -sekretion konnten mehrere Studien zeigen, dass über TXNIP die Verbindung zwischen Glukotoxizität und Betazell-Apoptose vermittelt wird (Minn et al. 2005, Chen et al. 2008b, Shalev 2008). Die Apoptose wird durch Aktivierung der ASK1 durch TXNIP induziert. Hierbei wird TXNIP in die Mitochondrien rekrutiert und bindet an TRX, wodurch die Interaktion zwischen TRX und ASK1 beendet und ASK1 freigegeben wird. Es folgt die Freisetzung von Cytochrom C und Aktivierung von Caspase-3 (Saxena et al. 2010). Primäre Inselzellen TXNIP-defizienter HcB-19 Mäuse waren jedoch gegen Glukose-induzierte Apoptose geschützt (Chen et al. 2008b). In Mausmodellen konnte sogar gezeigt werden, dass TXNIP-Defizienz vor Streptozotocin- und Adipositas-induziertem Diabetes mellitus schützt, indem Betazell-Apoptose verhindert und Betazellen erhalten werden (Chen et al. 2008a). In einer Studie mit einem Small Molecule Inhibitor von TXNIP namens SRI-37330 konnte gezeigt werden, dass die medikamentöse Inhibition von TXNIP im Mausmodell vor Streptozotocin- und Adipositas-induziertem Diabetes mellitus schützt (Thielen et al. 2020).

### **1.4.3 Assoziation von *TXNIP* Varianten zu metabolischen Erkrankungen in Menschen**

Ferreira et al. (2012) konnten in einer Querschnittstudie der brasilianischen Bevölkerung zeigen, dass Polymorphismen in *TXNIP* mit Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie assoziiert sind. Die Quantifizierung der Genexpression mittels RT-PCR aus primären glatten Muskelzellen von Probanden mit ausgewählten Polymorphismen zeigte eine erhöhte TXNIP Genexpression. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass vermehrte *TXNIP* Genexpression durch Polymorphismen mit der Entstehung von Diabetes mellitus und dem metabolischen Syndrom in Verbindung stehen könnten. Überdies wurden auch epigenetische Veränderungen in *TXNIP* mit Diabetes mellitus in Verbindung gebracht. Chambers et al. (2015) verglichen u.a. das Auftreten von DNA-Methylierungsmarkern zwischen Probanden mit Diabetes Typ 2 und gesunden Kontrollen und zeigten, dass DNA-Methylierungsmarker in *TXNIP* und vier weiteren Genen in der Gruppe der Probanden mit Diabetes Typ 2 vermehrt waren. Ein kombinierter Score aus den Ergebnissen aller fünf untersuchten Loci konnte retrospektiv mit der Inzidenz von neuauftretenden Fällen von Diabetes Typ 2 im Follow-Up assoziiert werden.

Katsu-Jimenez et.al. (2019) beschrieben die erste *TXNIP Loss-of-function* Variante beim Menschen: Sie identifizierten eine Familie mit drei betroffenen Geschwistern, die eine homozygote Punktmutation in *TXNIP* tragen. Diese Variante führt zu einem vorzeitigen Stopp-Codon und resultierendem kompletten Fehlen von TXNIP Protein in

Patientenfibroblasten. Die Eltern der drei betroffenen Geschwister sind libyscher Herkunft, und über ihre Verwandtschaft als Cousine und Cousin ersten Grades besteht eine Konsanguinität. Die Eltern sind als heterozygote Merkmalsträger klinisch symptomfrei. Das vierte Kind der Familie ist bis auf eine kompensierte Transposition der großen Gefäße des Herzens gesund. Klinisch stehen bei allen drei betroffenen Geschwistern eine angeborene Laktatazidose sowie niedrige Methioninspiegel im Vordergrund, welche dauerhaft mit Dichloressigsäure bzw. Methionin-Supplementation behandelt werden. Die Erkrankung wird als Mitochondriopathie mit Störungen in der Atmungskette beschrieben. Das älteste betroffene Geschwisterkind (Jahrgang 2005) zeigte in der Neonatalperiode hypoglykämische Episoden, welche jedoch danach nicht wieder auftraten. Die anderen beiden Geschwister hatten anamnestisch keine Hypoglykämien erfahren. Zusätzlich wurde bei zuerst genanntem Geschwisterkind im Alter von drei Jahren eine profunde Hepatomegalie mit leicht erhöhten Transaminase-Werten festgestellt. Die Leberbiopsie zeigte vermehrte Glykogeneinlagerungen. Zum Zeitpunkt der Publikation 10 Jahre später hatte sich die Lebergröße normalisiert. Das zweite betroffene Geschwisterkind (Jahrgang 2009) wies von den genannten Symptomen nur die Laktatazidose und niedrige Methioninspiegel auf. Das dritte betroffene Geschwisterkind (Jahrgang 2014) zeigte in der Neonatalperiode eine Gedeihstörung, einen muskulären Hypotonus und eine generelle Entwicklungsverzögerung. Die Laktatazidose und die niedrigen Methioninspiegel manifestierten sich analog wie bei seinen Geschwistern. Mittels Exomsequenzierung konnte die auslösende Mutation in *TXNIP* als zwei homozygote nebeneinander liegende Einzel-Nukleotid-Varianten c.174G>T, p.Gln58His und c.175G>T, p.Gly59\* identifiziert werden. Diese Mutationen führen zu einem verkürzten TXNIP Protein mit 59 Aminosäuren und einem Aminosäureaustausch an Position 58. In der Zellkultur konnte in Fibroblasten und Myoblasten der Patienten gezeigt werden, dass die o.g. Mutation zu einem kompletten Mangel an TXNIP Protein führt. Da eine Laktatazidose auf eine Mitochondriopathie hinweisen kann, führten Katsu-Jimenez et. al. Untersuchungen der Mitochondrien durch. Die Anzahl und die Struktur der Mitochondrien in Patientenzellen unterschieden sich nicht von der in Kontroll-Zellen. In Analysen der mitochondrialen Funktion zeigte sich jedoch in den Patientenzellen eine Schwäche der oxidativen Phosphorylierung bei Inkubation mit Glukose und Pyruvat. Die Laktatsekretion als Endstrecke der anaeroben Glykolyse war im Sinne eines Kompensationsmechanismus für den Ausfall der aeroben Energieproduktion erhöht. Durch Inkubation mit Malat konnte die respiratorische Rate der Patientenzellen normalisiert werden. Malat kann im Gegensatz zu Pyruvat ohne weitere Verstoffwechslung in den Citratzyklus der Mitochondrien eintreten und zur mitochondrialen Energiegewinnung beitragen. Da die

Patientenzellen bei Gabe von Malat normale respiratorische Raten zeigten, folgerten die Autoren, dass es in den Patientenzellen nicht zu einer globalen mitochondrialen Einschränkung, sondern viel mehr zu einer spezifischen Schwäche in der Nutzung von Pyruvat für die mitochondriale Respiration kommt. Die Autoren vermuteten als Mechanismus eine reduzierte Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase, die Pyruvat zu Acetyl-CoA zur Einschleusung in den Citratzyklus umwandelt. Da die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase in den Patientenzellen jedoch normal hoch gemessen wurde, konnten die Autoren den Mechanismus der gestörten Respiration unter Gabe von Pyruvat und Glukose nicht vollständig erklären. Die Autoren sehen jedoch die TXNIP-Defizienz der Patienten als ursächlich an, da die Schwäche der mitochondrialen Respiration mittels TXNIP-Rekonstitution via stabiler retroviraler Transduktion behoben werden konnte. Abschließend folgern Katsu-Jimenez et.al. aus den klinischen und experimentellen Daten, dass TXNIP im menschlichen Energiehaushalt spezifische regulatorische Funktionen innehat. Als klinische Hauptmerkmale der TXNIP-Defizienz im Menschen stellten sich Laktatazidose und niedrige Methionin-Spiegel im Serum heraus. Auf zellulärer Ebene ergaben sich Hinweise auf eine gestörte mitochondriale Respiration.

Weitere Fälle von Patienten mit Varianten in *TXNIP* sind bis dato noch nicht publiziert.

## 2 Material

### 2.1 Patientendaten und Patientenproben

Die Verwendung von Patientendaten und Patientenproben erfolgt mit Genehmigung der zuständigen lokalen Ethikkommissionen. Die Genehmigung für die Patienten in Hamburg liegt im Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf vor. Alle Patienten stimmten der Verwendung ihrer Daten und Proben zu.

Die Patientendaten und Patientenfibroblasten stammen von einem Patienten mit einer Variante im Gen *TXNIP* aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf aus Hamburg in Deutschland ( $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$ ) und von zwei Patienten mit Varianten im Gen *TXNIP* von der medizinischen Universität in Salzburg ( $\text{TXNIP}^{\text{Asn86Lysfs*2}}$ ) bzw. Innsbruck ( $\text{TXNIP}^{\text{Ile215Tyrfs*59}}$ ) in Österreich.

Das verwendete Blutplasma stammt von den Patienten mit Varianten im Gen *TXNIP* aus Hamburg und Salzburg. Das Blutplasma gesunder Kontrollen wurde vom Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bereitgestellt.

Die Muskelbiopsie stammt vom Patienten mit einer Variante im Gen *TXNIP* aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Die Kontrollen für die Genexpressions- und Lipidom-Analysen wurden von Prof. Benedikt Schoser aus dem Friedrich-Baur-Institut München zur Verfügung gestellt.

Die Leberbiopsie stammt vom Patienten mit einer Variante im Gen *TXNIP* aus Hamburg in Zusammenarbeit mit den Kollegen der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Kontrollen für die Genexpressions-Analysen stammen aus einer Kohorte aus dem Universitätsklinikum Ulm in Zusammenarbeit mit Dr. Ludger Scheja.

### 2.2 Zellen

Die untersuchten primären humanen Fibroblasten stammen aus Hautbiopsien von drei gesunden Kontrollen sowie drei Patienten mit Varianten im Gen *TXNIP*.

Die Fibroblasten der gesunden Kontrollen sowie des Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$  Variante wurden am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der diagnostischen Abteilung des Instituts für Humangenetik aufbereitet und in Passage zwei übernommen. Die Fibroblasten der Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn86Lysfs*2}}$  bzw.  $\text{TXNIP}^{\text{Ile215Tyrfs*59}}$  Variante

wurden in kryokonservierter Form in Passage fünf aus Innsbruck bzw. Salzburg übernommen und in Kultur genommen.

## 2.3 Primer

Tabelle 4: Selbst gelegte SYBR-Primer

| Gen            | Forward 5'→3'        | Reverse 5'→3'         |
|----------------|----------------------|-----------------------|
| <i>FASN</i>    | CACTGCCGTGGAGAACATGC | GGATGCGGGAATACAGGTGAC |
| <i>HK2</i>     | ACCAACTTCCGTGTGCTTTG | GAAGTTAGCCAGGCATTCGG  |
| <i>MONDO-A</i> | TTGGCCTACAGTGGGAAGTT | GGATTCTTGCCTTCTCCAG   |
| <i>TAF1</i>    | TCATTGATGCCTATGTGCGC | TTGGGCTTCTTCTCAGGAGG  |
| <i>TXNIP</i>   | TTCTATCCTGGGCTGCAACA | TCATCTCAGAGCTGGTTCGG  |

Hersteller: Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, USA

## 2.4 Taqman-Assays

Tabelle 5: Genutzte Taqman-Assays

| Gen-Symbol               | Gen-Name   | Assay ID      |
|--------------------------|--|---------------|
| <i>ACACA</i>             | Acetyl-CoA Carboxylase A / 1   | Hs01046047_m1 |
| <i>ACLY</i>              | ATP-Citrat-Lyase   | Hs00153764_m1 |
| <i>CD36</i>              | Cluster of differentiation 36  | Hs00169627_m1 |
| <i>CHREBP-a / MLXIPL</i> | Carbohydrate responsive element binding protein alpha / MLX interacting protein-like | Hs00263027_m1 |
| <i>CHREBP-b</i>          | Carbohydrate responsive element binding protein beta                                 | AIT9559       |
| <i>CYP7A1</i>            | cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1  | Hs00167982_m1 |
| <i>CYP7B1</i>            | cytochrome P450 family 7 subfamily B member 1  | Hs00191385_m1 |
| <i>FADS2</i>             | Fettsäure-Desaturase 2   | Hs00188654_m1 |
| <i>FASN</i>              | Fettsäuresynthase  | Hs00188012_m1 |
| <i>FGF21</i>             | Fibroblasten-Wachstumsfaktor 21  | Hs00173927_m1 |
| <i>GCK</i>               | Glukokinase (Hexokinase 4)   | Hs01564555_m1 |
| <i>HMGCR</i>             | 3-Hydroxy-3-Hethylglutaryl-Coenzym-A Reduktase                                       | Hs00168352_m1 |
| <i>HNF4A</i>             | hepatocyte nuclear factor 4 alpha  | Hs00604435_m1 |
| <i>INSR</i>              | Insulinrezeptor  | Hs00169631_m1 |
| <i>LDLR</i>              | Low Density Lipoprotein Rezeptor   | Hs00181192_m1 |
| <i>LPL</i>               | Lipoprotein-Lipase   | Hs00173425_m1 |
| <i>NR1H3</i>             | Leber-X-Rezeptor alpha   | Hs00172885_m1 |
| <i>PID1</i>              | Phosphotyrosine Interaction Domain Containing 1                                      | Hs00952182_m1 |
| <i>SCD</i>               | Stearoyl-CoA Desaturase  | Hs01682761_m1 |

|                |   |               |
|----------------|---|---------------|
| <i>SLC2A4</i>  | Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 4 = GLUT4 | Hs00168966_m1 |
| <i>SREBP-1</i> | Sterol Regulatory Element Binding Protein 1                                 | Hs01088691_m1 |
| <i>SREBP1C</i> | Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 c                               | AI70MDO       |
| <i>TAF1</i>    | TATA-Box Binding Protein Associated Factor 1                                | Hs00270322_m1 |

## 2.5 Antikörper

### Primäre Antikörper

Tabelle 6: Genutzte primäre Antikörper

| Name       | Organismus | Produktnr. | Hersteller  | Verdünnung                   | Inkubation         |
|------------|------------|------------|---|------------------------------|--------------------|
| Anti-GADPH | Maus       | #8295      | Abcam plc.,<br>Cambridge,<br>UK                   | 1:1000 in 1 %<br>BSA-TBS-T   | Über Nacht<br>4 °C |
| Anti-TXNIP | Kaninchen  | #14715S    | Cell Signaling<br>Technology,<br>Cambridge,<br>UK | 1:1000 in 1 %<br>Milch-TBS-T | Über Nacht<br>4 °C |

### Sekundäre Antikörper

Tabelle 7: Genutzte sekundäre Antikörper

| Name            | Organismus | Produktnr.       | Hersteller  | Verdünnung                   | Inkubation |
|-----------------|------------|------------------|---|------------------------------|------------|
| HRP-Anti-Rabbit | Ziege      | GtxRb-003-EHRPX  | Immuno Reagents Inc.,<br>Raleigh, North Carolina, USA | 1:2500 in 5 %<br>Milch-TBS-T | 1 h RT     |
| HRP-Anti-Mouse  | Ziege      | GtxMu-003-E2HRPX | Immuno Reagents Inc.,<br>Raleigh, North Carolina, USA | 1:2500 in 5 %<br>Milch-TBS-T | 1 h RT     |

## 2.6 Chemikalien

### 2.6.1 Reagenzien

Tabelle 8: Genutzte Reagenzien

| Name                               | Anwendung                           | Hersteller   |
|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Acetyl-CoA                         | Fettsäuresynthase-Aktivitätsmessung | Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA                    |
| Bolt™ LDS Sample Buffer            | Protein-Analysen                    | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA   |
| Bradford Reagent                   | Fettsäuresynthase-Aktivitätsmessung | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA                      |
| Chlorophorm                        | RNA-Analysen                        | Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland              |
| Complete mini (Protease-Inhibitor) | Protein-Analysen                    | Roche Holding AG, Basel, Schweiz                             |
| Dimethylsulfoxid                   | Zellkultur                          | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland               |
| DTT                                | Protein-Analysen                    | AppliChem, Darmstadt, Deutschland                            |
| EDTA (pH 8,0)                      | Fettsäuresynthase-Aktivitätsmessung | Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA              |
| Ethanol                            | RNA-Analysen                        | Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland              |
| Fettsäure-freies BSA               | Lipidom-Analyse                     | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA                      |
| Glutathion                         | Fettsäuresynthase-Aktivitätsmessung | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA                      |
| Glycin                             | Puffer                              | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland               |
| Kaliumphosphat                     | Fettsäuresynthase-Aktivitätsmessung | Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA              |
| Lipidyzer™ Internal Standards      | Lipidom-Analyse                     | AB Sciex, Framingham, Massachusetts, USA                     |
| Malonyl-CoA                        | Fettsäuresynthase-Aktivitätsmessung | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA                      |
| Methanol                           | Protein-Analysen                    | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland               |
| Methanol                           | Lipidom-Analyse                     | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA                      |
| Methyl-tert-butylether             | Lipidom-Analyse                     | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA                      |
| MG-132 InSolution 10 mM in DMSO    | Zellkultur                          | Calbiochem / Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA |
| Milchpulver                        | Protein-Analysen                    | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland               |

|   |                                     |   |
|---|-------------------------------------|---|
| NADPH                                     | Fettsäuresynthase-Aktivitätsmessung | Roche Holding AG, Basel, Schweiz  |
| Natriumchlorid                            | Puffer                              | Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland                                 |
| PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder | Protein-Analysen                    | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA                      |
| Penicillin-Streptomycin                   | Zellkultur                          | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA   |
| Phosphate buffered saline (PBS) Tabletten | Zellkultur                          | gibco / Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA              |
| PhosStop™ (Phosphatase-Inhibitor)         | Protein-Analysen                    | Roche Holding AG, Basel, Schweiz  |
| Pierce™ ECL Western Blotting Substrate    | Protein-Analysen                    | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA                      |
| PowerUP™ SYBR™ Green Master Mix           | RNA-Analysen                        | Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA |
| Propanol                                  | Zellkultur                          | Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland                                 |
| Ritonavir                                 | Zellkultur                          | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA   |
| RNAse-freies Wasser                       | RNA-Analysen                        | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA   |
| Taqman™ Universal Master Mix II, no UNG   | RNA-Analysen                        | Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA |
| Trizma-Base                               | Puffer                              | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA   |
| Trizol                                    | RNA-Analysen                        | Life Technologies / Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA  |
| Trypanblau                                | Zellkultur                          | Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA                                 |
| Trypsin-EDTA-Lösung                       | Zellkultur                          | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA   |
| Tween-20                                  | Puffer                              | Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA                                 |

## 2.6.2 Kulturmedien und Seren

Tabelle 9: Genutzte Kulturmedien und Seren

| Name                      | Anwendung  | Produktnr. | Hersteller                                 |
|---------------------------|------------|------------|--|
| DMEM 1 g / L<br>Glukose   | Zellkultur | D6046      | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>USA |
| DMEM 4,5 g / L<br>Glukose | Zellkultur | D5796      | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>USA |
| DMEM 4,5 g / L<br>Glukose | Zellkultur | D6429      | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>USA |
| Fetales<br>Kälberserum    | Zellkultur | F7524      | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>USA |

## 2.6.3 Puffer

Tabelle 10: Genutzte Puffer und deren Zusammensetzung

| Name                    | Anwendung                               | Komponenten   |
|-------------------------|---|---|
| Assaypuffer             | Fettsäuresynthese-<br>Aktivitätsmessung | 0,1 M Kaliumphosphat<br>2,3 mM EDTA<br>4,6 mM Glutathion<br>57 µM Acetyl-CoA<br>0,4 mg/ml NADPH<br>pH 7,0 |
| Blockierlösung          | Protein-Analysen                        | 5 % Milchpulver in TBS-T  |
| Extraktionspuffer       | Fettsäuresynthese-<br>Aktivitätsmessung | 0,1 M Kaliumphosphat<br>0,1 mM EDTA<br>2 mM Glutathion<br>pH 7,0  |
| FPLC-Puffer             | Lipidom-Analyse                         | 100 mM Tris pH 8,0<br>1,5 M NaCl<br>100 mM EDTA   |
| Lipidzyzer-Laufpuffer   | Lipidom-Analyse                         | 50 % Dichlormethan<br>50 % Methanol<br>10 mM Ammoniumacetat   |
| Lysepuffer              | Protein-Analysen                        | 10 mM Tris-HCl<br>150 mM NaCl<br>2 mM EDTA<br>1 % TX-100<br>10 % Glycerol<br>pH 7,5                       |
| MOPS-SDS-<br>Laufpuffer | Protein-Analysen                        | 50 mM MOPS<br>50 mM Tris base<br>0,1 % SDS<br>1 mM EDTA<br>pH 7,7   |

|                    |                  |  |
|--------------------|------------------|--|
| Proteinlyse-Puffer | Protein-Analysen | Lysepuffer<br>1 x Complete mini Proteinase-Inhibitor<br>1 x PhosStop Phosphatase-Inhibitor<br>1 mM DTT |
| TBS-T              | Protein-Analysen | 20 mM Tris<br>150 mM NaCl<br>0,1 % Tween-20<br>pH 7,4  |

## 2.6.4 Kits

Tabelle 11: Genutzte Kits

| Name   | Anwendung        | Produktnr. | Hersteller   |
|--|------------------|------------|--|
| Cholesterol Assay Kit<br>(Cholesterol CHOD-PAP)                        | Lipidom-Analyse  |            | Roche Diagnostics,<br>Mannheim, Germany  |
| Glycogen Colorimetric /<br>Fluorometric Assay Kit                      | Glykogen-Messung | K646       | BioVision Inc., Waltham,<br>Massachusetts, USA   |
| High-Capacity cDNA<br>Reverse Transcription<br>Kit mit RNase-Inhibitor | RNA-Analysen     | #4374967   | Applied Biosystems /<br>Thermo Fisher Scientific<br>Inc., Waltham,<br>Massachusetts, USA |
| Nucleospin TriPrep<br>DNA, RNA, Protein<br>Purification Kit            | RNA-Analysen     | 740966.50  | Macherey-Nagel, Düren,<br>Deutschland  |
| Pierce™ BCA Protein<br>Assay Kit                                       | Protein-Analysen | 23225      | Thermo Fisher Scientific<br>Inc., Waltham,<br>Massachusetts, USA                         |
| RNA-to-cDNA™ Kit mit<br>hoher Kapazität                                | RNA-Analysen     | #4388950   | Applied Biosystems /<br>Thermo Fisher Scientific<br>Inc., Waltham,<br>Massachusetts, USA |
| Trans-Blot Turbo RTA<br>Midi 0.2 µm PVDF<br>Transfer Kit               | Protein-Analysen | #1704273   | Bio-Rad Laboratories, Inc.,<br>Hercules, Kalifornien, USA                                |
| Triglyceride Assay Kit<br>(Triglycerides GPO-PAP)                      | Lipidom-Analyse  |            | Roche Diagnostics,<br>Mannheim, Germany  |

## 2.7 Verbrauchsmaterial

Tabelle 12: Genutztes Verbrauchsmaterial

| Name   | Anwendung        | Hersteller  |
|--|------------------|---|
| 12-well Platte (steril)                                      | Zellkultur       | SARSTEDT AG & Co. KG,<br>Nümbrecht, Deutschland                                       |
| 6-well Platte (steril)                                       | Zellkultur       | SARSTEDT AG & Co. KG,<br>Nümbrecht, Deutschland                                       |
| 8er PCR-Streifen   | RNA-Analysen     | SARSTEDT AG & Co. KG,<br>Nümbrecht, Deutschland                                       |
| 96-well Platte   | Diverse          | Thermo Fisher Scientific Inc.,<br>Waltham, Massachusetts, USA                         |
| Bolt™ Bis-Tris Plus<br>Gele 4-12 %                           | Protein-Analysen | Thermo Fisher Scientific Inc.,<br>Waltham, Massachusetts, USA                         |
| CellScraper  | Protein-Analysen | SARSTEDT AG & Co. KG,<br>Nümbrecht, Deutschland                                       |
| CryoPure 1,8 mL<br>(Einfrier-Röhrchen)                       | Zellkultur       | SARSTEDT AG & Co. KG,<br>Nümbrecht, Deutschland                                       |
| Falcons (15, 50 mL)  | Diverse          | Greiner Bio-One GmbH,<br>Kremsmünster, Österreich                                     |
| MicroAmp™ Optical 96-<br>well Reaction Plate                 | RNA-Analysen     | Applied Biosystems / Thermo<br>Fisher Scientific Inc., Waltham,<br>Massachusetts, USA |
| MicroAmp™ Optical<br>Adhesive Film<br>(Selbstklebende Folie) | RNA-Analysen     | Applied Biosystems / Thermo<br>Fisher Scientific Inc., Waltham,<br>Massachusetts, USA |
| Pipettenspitzen mit<br>Filter                                | RNA-Analysen     | SARSTEDT AG & Co. KG,<br>Nümbrecht, Deutschland                                       |
| Pipettenspitzen ohne<br>Filter                               | Diverse          | SARSTEDT AG & Co. KG,<br>Nümbrecht, Deutschland                                       |
| Reaktionsgefäße<br>(1,5 mL, 2 mL)                            | Diverse          | Eppendorf AG, Hamburg,<br>Deutschland   |
| Safe Seal<br>Reaktionsgefäße<br>(1,5 mL, 2mL)                | Diverse          | Eppendorf AG, Hamburg,<br>Deutschland   |
| Serologische Pipetten<br>(5, 10, 25 mL)                      | Diverse          | SARSTEDT AG & Co. KG,<br>Nümbrecht, Deutschland                                       |
| Superose™ 6 Increase<br>10/300 GL Säule                      | Lipidom-Analyse  | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,<br>USA  |
| t-75 Zellkulturflasche<br>(steril)                           | Zellkultur       | SARSTEDT AG & Co. KG,<br>Nümbrecht, Deutschland                                       |

## 2.8 Geräte

Tabelle 13: Genutzte Geräte

| Gerät                                | Name                               | Hersteller  |
|--------------------------------------|------------------------------------|---|
| Blotting-Kammer                      | Trans-Blot® Turbo™ Transfer System | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA              |
| FPLC Gerät                           | FPLC UPC-900 P920 Module           | General Electric, Boston, Massachusetts, USA                        |
| Gefrierbehälter                      | Mr. Frosty™                        | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA          |
| Gelelektrophorese-Kammer             | Bolt™ Mini Gel Tank System         | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA          |
| Inkubator                            | MCO-19AIC-PE                       | Panasonic Corporation, Osaka, Japan                                 |
| Klasse II Sicherheitswerkbank        | HERAsafe                           | Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland                            |
| LC-MS                                | QTRAP® 5500                        | AB Sciex, Framingham, Massachusetts, USA                            |
| Mikroplatten Multi-Detektions-Reader | Synergy H1                         | BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA                     |
| Mikroplatten-Spektralphotometer      | Epoch 2                            | BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA                     |
| Mikroskop                            | Axiovert 40 Cfl                    | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland                       |
| Mikrovolumen-Platte                  | Take-3 Platte                      | BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA                     |
| Neubauer-Zählkammer                  | BLAUBRANDT Zählkammer              | Brandt GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland                          |
| PCR-Cycler                           | SensoQuest Labcycler               | Sensoquest GmbH, Göttingen, Deutschland                             |
| qPCR-Cycler                          | QuantStudio™ 3 Realtime PCR System | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA          |
| Schüttler                            | Mini Rocker- Shaker MR-1           | LFT Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg am Bodensee, Deutschland |
| Thermomixer                          | Thermomixer F1.5                   | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                                  |
| Tischzentrifuge                      | VWR Mini Star                      | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland                      |
| TissueLyser                          | TissueLyser II                     | Qiagen N.V., Venlo, Niederlande                                     |
| Ultraschallbad                       | Ultrasonic Cleaner USC100T         | VWR International, Leuven, Belgien                                  |
| Verschiedene Pipetten (elektrisch)   | XplorerPlus                        | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                                  |
| Verschiedene Pipetten (mechanisch)   | ResearchPlus                       | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                                  |

|                                |                             |  |
|--------------------------------|-----------------------------|--|
| Vortexer Mixer                 | MS2 Minishaker              | Greiner Bio-One GmbH,<br>Kremsmünster, Österreich            |
| Wasserbad                      | Thermolab GFL 1083          | GFL Gesellschaft für Labortechnik,<br>Burgwedel, Deutschland |
| Western Blot Entwickler System | ChemiDoc™ MP Imaging System | Bio-Rad Laboratories, Inc.,<br>Hercules, Kalifornien, USA    |
| Zentrifuge (groß)              | Multifuge X3R               | Heraeus Holding GmbH, Hanau,<br>Deutschland                  |
| Zentrifuge (klein)             | Centrifuge 5424             | Eppendorf AG, Hamburg,<br>Deutschland                        |

## 2.9 Software

**Tabelle 14: Genutzte Software**

| <b>Name</b>  | <b>Anwendung</b>    | <b>Hersteller</b>   |
|--|---------------------|---|
| BioRender  | Grafiken            | Science Suite Inc., Toronto,<br>Ontario, Kanada               |
| GraphPad Prism9  | Statistik, Grafiken | GraphPad Software, San Diego,<br>Kalifornien, USA             |
| Image Lab 6.0.1  | Western Blot        | Bio-Rad Laboratories, Inc.,<br>Hercules, Kalifornien, USA     |
| Lipidyzer™ Software<br>(Lipidomics Workflow<br>Manager software) | Lipidom-Analyse     | AB Sciex, Framingham,<br>Massachusetts, USA                   |
| QuantStudio™ Design<br>& Analysis Desktop<br>Software            | qPCR                | Thermo Fisher Scientific Inc.,<br>Waltham, Massachusetts, USA |

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Klasse-II-Werkbank durchgeführt. Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden in steriler Ausführung erworben oder vor Benutzung autoklaviert. Die Inkubation im Zellkulturschrank erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Die Kultivierung der Fibroblasten erfolgte standardmäßig in T-75 Kulturflaschen in DMEM 4,5 g / L Glukose (Sigma-Aldrich #D5796) versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die Fibroblasten wurden bei 100 % Konfluenz passagiert und 1 : 2 bis 1 : 4 gesplittet. Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und danach mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung 5 - 10 min bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wurden 9 ml DMEM 4,5 g / L Glukose mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugegeben.

Zur Ermittlung der Zellzahl zum Auslegen einer bestimmten Zellmenge wurde die Zellsuspension einer T-75 Flasche für 5 min bei 150 rcf bei Raumtemperatur pelletiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 2 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. 50 µl dieser Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl Trypanblau versetzt. Nach ca. 2 min Inkubationszeit wurde diese Flüssigkeit in eine Neubauer-Zählkammer geladen und acht Eckquadrate ausgezählt. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren sowie der Kammertiefe.

#### **3.1.1 Behandlung mit unterschiedlichen Glukose- und FCS-Konzentrationen**

Es wurden 35.000 Fibroblasten je Well in 12-Well Platten ausgelegt. Als Kulturmedium wurde DMEM 4,5 g / L Glukose mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Das Experiment wurde bei ca. 80 – 90 % Konfluenz gestartet. Vor der Behandlung wurden die Zellen je zweimal mit angewärmtem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel auf folgende vier unterschiedliche Kulturbedingungen:

4,5 g / L Glukose (DMEM Sigma-Aldrich #D6429) 10 % FCS (Standard)

4,5 g / L Glukose (DMEM Sigma-Aldrich #D6429) 0,1 % FCS

1 g / L Glukose (DMEM Sigma-Aldrich #D6046) 10 % FCS

1 g / L Glukose (DMEM Sigma-Aldrich #D6046) 0,1 % FCS

Die Zellen wurden für vier Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend zur RNA-Analyse geerntet (s. 3.2 RNA-Analysen).

### **3.1.2 Behandlung mit MG-132**

Es wurden 180.000 Fibroblasten je Well in 6-Well Platten ausgelegt. Als Kulturmedium wurde DMEM 4,5 g / L Glukose mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Das Experiment wurde zwei Tage später bei ca. 90 % Konfluenz gestartet. Frisches Kulturmedium wurde mit MG-132 bzw. demselben Volumen DMSO versetzt und auf die Zellen gegeben. Die Endkonzentration von MG-132 lag bei 20 µM und die Behandlung erfolgte für acht Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden zur Protein-Analyse geerntet (s. 3.3 Protein-Analysen).

### **3.1.3 Behandlung zur nativen Glykogenmessung**

Es wurden 180.000 Fibroblasten je Well in 6-Well Platten ausgelegt. Als Kulturmedium wurde DMEM 4,5 g / L Glukose mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Die Kultur erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden 48 Stunden nach dem Auslegen zur Glykogenmessung geerntet (s. 3.4 Glykogenmessung).

### **3.1.4 Behandlung mit Ritonavir**

Es wurden 180.000 Fibroblasten je Well in 6-Well Platten ausgelegt. Als Kulturmedium wurde DMEM 4,5 g / L Glukose mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Das Experiment wurde am nächsten Tag bei ca. 75 % Konfluenz gestartet. Ritonavir wurde in DMSO gelöst. Frisches Kulturmedium wurde mit Ritonavir-Lösung bzw. demselben Volumen DMSO versetzt und auf die Zellen gegeben. Die Endkonzentration von Ritonavir lag bei 50 µM. Die Endkonzentration von DMSO lag bei 0,5 %. Die Behandlung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 48 Stunden. Die Zellen wurden zur Glykogenmessung geerntet (s. 3.4 Glykogenmessung).

### 3.1.5 Behandlung zur Lipidmessung

Es wurden 850.000 Fibroblasten je 10 cm Schale ausgelegt. Als Kulturmedium wurde DMEM 4,5 g / L Glukose mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Die Kultur erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden 48 Stunden nach dem Auslegen zur Lipidmessung geerntet (s. 3.5.2 Lipidmessung im Lipidzyzer).

### 3.1.6 Behandlung zur Fettsäuresynthase-Aktivitätsmessung

HepG2 wurden in 10 cm Schalen und Kontrollfibroblasten in 15 cm Schalen ausgesät. Die Kultur erfolgte unter Standard-Kulturbedingungen (DMEM 4,5 g / L Glukose mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin). Die Zellen wurden bei 100 % Konfluenz zur FAS-Aktivitätsmessung (s. 3.6 Fettsäuresynthase-Aktivitätsmessung) geerntet.

## 3.2. RNA-Analysen

Alle Experimente zur RNA-Analyse an Fibroblasten wurden selbstständig im Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Die Aufbereitung und Messung von Leber- und Muskelgewebe des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante für die RNA-Analysen erfolgte als Kooperation im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Zur RNA-Extraktion erfolgte eine Homogenisierung des Gewebes in Trizol im TissueLyser, eine Phenol-Chlorophorm-Extraktion aus Trizol und eine anschließende Aufreinigung mittels NucleoSpin Säulen (Machery-Nagel). Die RNA-Konzentration wurde am NanoDrop bestimmt. Zur cDNA-Synthese wurden jeweils 400 ng RNA mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit mit RNase Inhibitor (Applied Biosystems #4374967) umgeschrieben. Die quantitative PCR wurde unter Verwendung von Taqman-Assays (s. 2.4 Taqman-Assays) und dem Taqman Mastermix bzw. für die Gene *TXNIP*, *HK2* und *MondoA* mit SYBR™ Green Mastermix und selbst gelegten Primern (s. 2.3 Primer) in einem QuantStudio 5 Real-Time-PCR-System durchgeführt. Zur Auswertung erfolgte die Normierung der Daten auf die Genexpressions-Level des Housekeeping-Gens *TAF1*.

### 3.2.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus Fibroblasten erfolgte mittels Phenol-Chlorophorm-Extraktion aus Trizol und anschließender Aufreinigung mittels NucleoSpin Säulen (Machery-Nagel). Die Zellen wurden direkt in den Kulturplatten für 5 min bei Raumtemperatur in

Trizol lysiert. Die Lysate wurden im Verhältnis von 5 : 1 mit Chlorophorm versetzt und mittels Vortexens homogenisiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rcf bei 4 °C wurden die farblosen wässrigen Phasen in 70 % Ethanol aufgenommen. Diese Flüssigkeit wurde auf die RNA-Säulen des Nucleo-Spin Kits geladen und die RNA nach Manual isoliert. Zur Aufreinigung erfolgte ein Verdau mit DNase nach Manual. Nach Eluierung der RNA in RNase-freiem Wasser erfolgte eine Konzentrationsbestimmung. Hierfür wurde die RNA in Doppelbestimmung auf eine Take-3 Platte aufgetragen und die Konzentration mit Hilfe des Quantifikationsprogramms für Nukleinsäuren im Epoch 2 Mikroplatten-Spektralphotometer (Biotek) bestimmt.

### 3.2.2 cDNA-Synthese / Reverse Transkription

Zur cDNA-Synthese wurden je nach RNA-Konzentration 300 oder 400 ng RNA eingesetzt. Es wurden das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit mit RNase Inhibitor (Applied Biosystems #4374967) und das RNA-to-cDNA™ Kit mit hoher Kapazität (Applied Biosystems #4388950) nach Manual im Format mit 20 µl verwendet. Mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit mit RNase Inhibitor (Applied Biosystems #4374967) wurden je Well 2 µl RT Buffer, 0,8 µl dNTPs Mix, 2 µl Random Primers, 1 µl Reverse Transcriptase, 1 µl RNase-Inhibitor, 2,7 µl H<sub>2</sub>O und 10,5 µl RNA eingesetzt. Mit dem RNA-to-cDNA™ Kit mit hoher Kapazität (Applied Biosystems #4388950) wurden je Well 10 µl RT Buffer Mix, 1 µl RT Enzyme Mix und 9 µl RNA eingesetzt. Die PCR wurde mit den jeweils im Manual empfohlenen Programmen im SensoQuest Labcycler durchgeführt. Zum weiteren Gebrauch wurde die fertige cDNA 1 : 9 (bei Einsatz von 300 ng RNA) bzw. 1 : 12 (bei Einsatz von 400 ng RNA) mit H<sub>2</sub>O verdünnt.

### 3.2.3 qPCR

Die quantitative PCR wurde mit Hilfe des SYBR Green Systems und selbst gelegten Primern (s. 2.3 Primer) in einem QuantStudio 3 Real-Time-PCR-System durchgeführt. Die Primer wurden so gelegt, dass Single Nucleotide Polymorphismen möglichst vermieden wurden und das PCR Produkt zwei Exons mit mindestens 200 Basenpaaren Intron dazwischen umspannt. Die PCR wurde in einer 96-Well Platte im Format mit 10 µl durchgeführt. Je Well wurden 5 µl PowerUp™ SYBR™ Green Mastermix, 0,5 µl H<sub>2</sub>O, 0,5 µl 10 µMol Primer-Arbeitslösung (Mix aus Forward- und Reverse-Primer sowie H<sub>2</sub>O) und 4 µl cDNA eingesetzt. Zur Auswertung erfolgte die Normierung der Daten auf die Genexpressions-Level des Housekeeping-Gens *TAF1*.

### 3.3 Protein-Analysen

Alle Protein-Analysen wurden selbstständig im Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

#### 3.3.1 Protein-Extraktion

Das Ernten der Zellen für die Protein-Extraktion erfolgte auf Eis, um dem Abbau von Proteinen durch Proteasen vorzubeugen. Die Zellen wurden je zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und der Zellrasen mithilfe eines Cellscrapers in PBS gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 650 rcf bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet sofort auf Trockeneis eingefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert oder sofort lysiert. Die Lyse erfolgte in jeweils 50 µl Proteinlyse-Puffer für mindestens 20 min auf Eis. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rcf bei 4 °C wurde der Überstand zur weiteren Analyse verwendet.

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher) nach dem Microplate Procedure Protokoll des Herstellers verwendet. Es wurden jeweils 10 µl Standard und 2-5 µl Probe eingesetzt. Die Extinktion wurde bei 562 nm im Epoch 2 Mikroplatten-Spektralphotometer (Biotek) gemessen.

#### 3.3.2 Western-Blot

Es wurde das Bolt™ Mini Gel Tank System (ThermoFisher) mit Bolt™ Bis-Tris Plus Gelen und MOPS-SDS-Laufpuffer verwendet. Je nach Proteinkonzentration wurden 10 - 20 µg Protein pro Tasche in Bolt™ LDS Sample Buffer aufgenommen, die Proben 10 min bei 70 °C erhitzt und auf das Gel geladen. Die Elektrophorese wurde für 35 min bei 200 Volt durchgeführt. Das Blotting wurde im Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) unter Verwendung des Trans-Blot Turbo RTA Midi 0.2 µm PVDF Transfer Kits (Bio-Rad) durchgeführt. Das Blocking erfolgte standardmäßig für eine Stunde bei Raumtemperatur in 1 x TBS-T versetzt mit 5 % Milchpulver. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag folgte nach drei Waschschritten für je fünf Minuten in 1 x TBS-T die Inkubation mit dem passenden sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach weiteren drei Waschschritten für je fünf Minuten in 1 x TBS-T folgte die Entwicklung der Membran mittels Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (ThermoFisher) und Detektion am ChemiDoc™ MP (Bio-Rad). Zur quantitativen Auswertung wurde das Programm Image Lab (Bio-Rad) verwendet.

### 3.4 Glykogenmessung

Alle Glykogenmessungen wurden selbstständig im Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Zum Ernten für die Glykogenmessung wurden die Zellen je zweimal mit eiskaltem PBS auf Eis gewaschen und der Zellrasen mithilfe eines Cellscrapers in 500 µl PBS gelöst. Die Zellsuspension wurde gleichmäßig auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und 5 min bei 650 rcf bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Pellets sofort auf Trockeneis eingefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

Aus dem einen Pellet erfolgte eine Proteinextraktion mit anschließender BCA-Messung (s. 3.3.1 Proteinextraktion), aus dem anderen Pellet erfolgte die Glykogenextraktion. Hierzu wurde das Pellet in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und 15 min bei 85 °C im Thermomixer erhitzt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 18.000 rcf bei 4 °C wurde der Überstand zur weiteren Analyse verwendet.

Zur Glykogenmessung wurde das Glycogen Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision) nach Fluoreszenz-Protokoll verwendet. Die Detektion erfolgte bei Ex/Em 535/587 nm im Synergy H1 Multi-Detektions-Reader (Biotek). Zur Messung wurden je 10 µl einer 1 : 2,5 Verdünnung der Proben eingesetzt. Es wurde für jede Probe eine Messung des Glukose-Hintergrundes durchgeführt, welche später als individueller Hintergrund jeder Probe von dem gemessenen Signal subtrahiert wurde. Die Auswertung des Glykogen-Signals erfolgte in Bezug auf die eingesetzte Proteinmenge.

### 3.5 Lipidom-Analyse

Die Kultivierung und das Ernten der Fibroblasten für die Lipidmessung erfolgten eigenständig im Institut für Humangenetik. Die Aufbereitung der Blutplasmen und der Proben aus Muskelbiopsien sowie die Lipidom-Analysen erfolgten als Kooperation im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

#### 3.5.1 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Die Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) wurde verwendet, um in Blutplasma-Proben Lipoproteine aufzutrennen und Lipoprotein-Profile zu erstellen. Zunächst wurden die Blutplasmen jeweils mit FPLC-Puffer verdünnt. Mithilfe einer Superose<sup>TM</sup> 6 Increase 10/300 GL Säule wurde das Plasma in 40 Fraktionen von je 500 µl aufgetrennt. Aus

jeder Fraktion wurden 100 µl verwendet, um unter Verwendung des Cholesterol bzw. Triglycerid Assay Kits nach Manual die Cholesterin- und Triglycerid-Konzentrationen zu bestimmen.

### **3.5.2 Lipidmessung im Lipidyzer™**

Zum Ernten für die Lipidmessungen wurden die Zellen auf Eis einmal mit eiskaltem PBS und je zweimal mit 33 mg / mL Fettsäure-freiem BSA in PBS (pH 7-8) gewaschen. Der Zellrasen wurde mithilfe eines Cellscrapers in 1 mL 33 mg / mL Fettsäure-freiem BSA in PBS (pH 7-8) gelöst. Die Zellsuspension wurde in zwei Ansätze aufgeteilt: 100 µl in einem normalen Reaktionsgefäß für die Proteinextraktion plus BCA-Messung und 900 µl in einem Eppendorf 2 mL SafeLock Reaktionsgefäß für die Lipidmessung. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 650 rcf bei 4 °C wurden die Überstände abgesaugt. Das Pellet für die Proteinextraktion wurde zusätzlich in BSA-freiem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden anschließend auf Trockeneis eingefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

Die Lipidom-Analysen wurden mithilfe der Lipidyzer™ Platform von SCIEX durchgeführt. Zellpellets und Blutplasmen konnten direkt verwendet werden. Das Gewebe aus Muskelbiopsien wurde zunächst mithilfe des TissueLysers homogenisiert. Danach wurden die Proben mit Lipidyzer™ Internal Standards versetzt. Die Lipidextraktion erfolgte mit Methyl-tert-butylether und Methanol. Die extrahierten Lipide wurden in einem Lipidyzer-Laufpuffer rekonstituiert und konzentriert. Die Auftrennung und Charakterisierung der Lipide wurde mittels differentieller Mobilitätsspektrometrie und Flüssigkeitschromatographie (LC-MS, QTRAP® 5500) im multiple reaction monitoring (MRM) Modus durchgeführt. Die Quantifizierung der Lipide erfolgte mithilfe der Lipidyzer™ Software (Lipidomics Workflow Manager software). Die Auswertung der gemessenen Werte erfolgte in Bezug auf die eingesetzte Proteinmenge.

## **3.6 Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung**

Die Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung erfolgte eigenständig im Institut für Humangenetik und wurde in Anlehnung an die Methoden von Chakravarthy et. al. (2005) und Uchiyama et. al. (2000) durchgeführt.

Zum Ernten für die FAS-Aktivitätsmessung wurden die Zellen je zweimal mit eiskaltem PBS auf Eis gewaschen und der Zellrasen mithilfe eines Cellscrapers in 1 ml PBS gelöst. Es wurden jeweils zwei Platten je Zelllinie gepoolt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 650 rcf bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Pellets in 100 µl

Extraktionspuffer homogenisiert. Die Lyse der Zellen folgte mithilfe eines Ultraschallbads in 3 Zyklen mit je 30 s Ultraschallbehandlung und 30 s auf Eis. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rcf bei 4°C mit Sicherung der Überstände auf Eis. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Test nach dem Microplate Procedure Protokoll des Herstellers mit Anpassung der Reaktionsvolumina bestimmt. Es wurden jeweils 2 µl Standard und 2 µl Probe (1:10 Verdünnung) eingesetzt und jeweils 100 µl Bradford Reagenz hinzugegeben. Nach 30 s Mischen auf einem Plattenschüttler erfolgte die Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Die Extinktion wurde bei 595 nm im Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (Biotek) gemessen. Die Proben wurden entweder unverdünnt verwendet oder auf die gewünschten Konzentrationen eingestellt. Für die FAS-Aktivitätsmessung wurde eine 96-well Platte verwendet. In Doppelbestimmung wurden je well 20 µl Probe und 70 µl Assaypuffer zugegeben. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 10 µl H<sub>2</sub>O bzw. 1 mM Malonyl-CoA und das Mischen mittels Pipette/Mix Funktion der elektrischen Multikanalpipette. Im Synergy H1 Multi-Mode Reader wurde die Extinktion bei 340 nm über 30 min bei 37 °C aufgezeichnet. Die Differenz der Extinktionswerte der wells mit H<sub>2</sub>O bzw. Malonyl-CoA als Substrat der Fettsäuresynthese entspricht der NADPH-Oxidation bei Aktivität der Fettsäuresynthese. Die Fettsäuresynthese-Aktivität wird mit dem NADPH-Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 6300 \text{ L} / (\text{mol} \cdot \text{cm})$  (Bergmeyer 1975) als NADPH-Oxidation in nmol / L / min quantifiziert.

### 3.7 Statistische Auswertung

Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mittels Student's T-Test bzw. multiplen Student's T-Tests analysiert. Die Korrektur für multiples Testen erfolgte mittels des Holm-Šidák-Tests. Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen wurden mittels ANOVA mit Korrektur für multiples Testen von Holm-Šidák bzw. Tukey analysiert. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Signifikanzen werden als p-Wert mit \* =  $p \leq 0,05$  angegeben. Zur statistischen Analyse und Erstellung der Grafiken wurde GraphPad Prism™ verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Beschreibung der Patienten mit Varianten in *TXNIP*

Im Folgenden werden die Patienten mit Varianten im Gen *TXNIP* bezüglich ihrer genetischen Varianten sowie klinischer Erscheinung beschrieben.

#### 4.1.1 Charakterisierung der *TXNIP* Varianten

Tabelle 15: Charakterisierung der *TXNIP* Varianten hinsichtlich Position und Art der Variante sowie resultierender Proteinlänge

| Variante in <i>TXNIP</i>                      | Art der Variante   | Proteinlänge |
|---|--|--------------|
| c. 607A>T, homozygot<br>p. Asn203Tyr          | Punktmutation: Substitution<br><i>Missense-Variante</i>  | 391 AS       |
| c. 257dupA, homozygot<br>p. Asn86Lysfs*2      | Punktmutation: Duplikation<br><i>Frameshift-Variante</i> | 86 AS        |
| c. 642_643insT, homozygot<br>p. Ile215Tyrf*59 | Punktmutation: Insertion<br><i>Frameshift-Variante</i>   | 272 AS       |

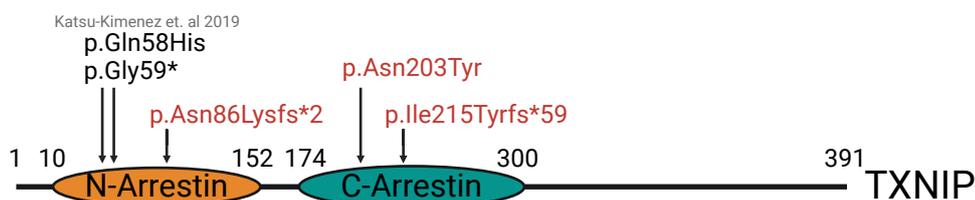


Abbildung 8: Proteinstruktur von *TXNIP* mit den bisher bekannten Varianten (schwarz) und den Varianten der Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup>, *TXNIP*<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. *TXNIP*<sup>Ile215Tyrf\*59</sup> Varianten (rot).

Der erste Patient mit Variante im Gen *TXNIP* trägt eine homozygote Variante mit Punktmutation, die zu einem Basenaustausch von Adenin zu Thymin an Position 607 des *TXNIP* Gens führt. Diese Variante führt zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin zu Tyrosin an Position 203 im *TXNIP* Protein und gilt daher als *Missense*-Variante. Das resultierende Protein hat eine unveränderte Länge von 391 Aminosäuren. Der Patient wird fortan als Patient mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante bezeichnet.

Die genetische Variante des zweiten Patienten liegt an Position 257 des *TXNIP* Gens. Hier findet sich eine homozygote Duplikation (dup) der Base Adenin. Dies führt zunächst zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin zu Lysin an Position 86 des *TXNIP* Proteins und nachfolgend zu einer Verschiebung des Leserasters (*Frameshift*, fs) durch die Duplikation. Der *Frameshift* wiederum ruft eine fehlerhafte Aminosäuresequenz und

folgend einen vorzeitigen Stopp der Translation an Aminosäure-Position 2 nach der Mutation hervor, weshalb das entstehende Protein auf eine Länge von 86 Aminosäuren verkürzt ist. Der Patient wird fortan als Patient mit TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> Variante bezeichnet.

Der dritte Patient trägt eine homozygote Insertion (ins) der Base Thymin nach Position 642 des *TXNIP* Gens. Dies führt zunächst zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Tyrosin an Position 215 des TXNIP Proteins und nachfolgend zu einer Verschiebung des Leserasters (*Frameshift*, fs) durch die Insertion. Der *Frameshift* führt zu einer fehlerhaften Aminosäuresequenz und folgend zu einem vorzeitigen Stopp der Translation an Aminosäure-Position 59 nach der Mutation, weshalb das resultierende Protein auf eine Länge von 272 Aminosäuren verkürzt ist. Der Patient wird fortan als Patient mit TXNIP<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante bezeichnet.

Eine genaue Darstellung der Varianten auf DNA-Ebene sowie ihrer Auswirkungen auf die Aminosäuren-Abfolge der resultierenden Proteine ist im Anhang dargestellt. In Abbildung 8 sind die bisher bekannten Varianten TXNIP<sup>Gln58His</sup> und TXNIP<sup>Gly59\*</sup> (Katsu-Jimenez et al. 2019) und die Varianten der Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup>, TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. TXNIP<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante auf TXNIP Proteinebene eingezeichnet.

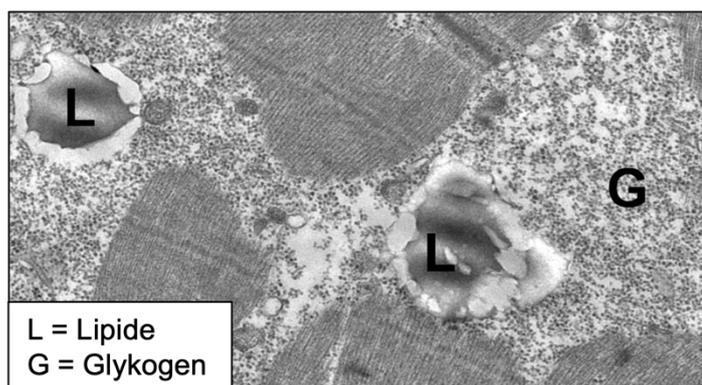
#### 4.1.2 Patientenvorstellung

##### **Patient mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante**

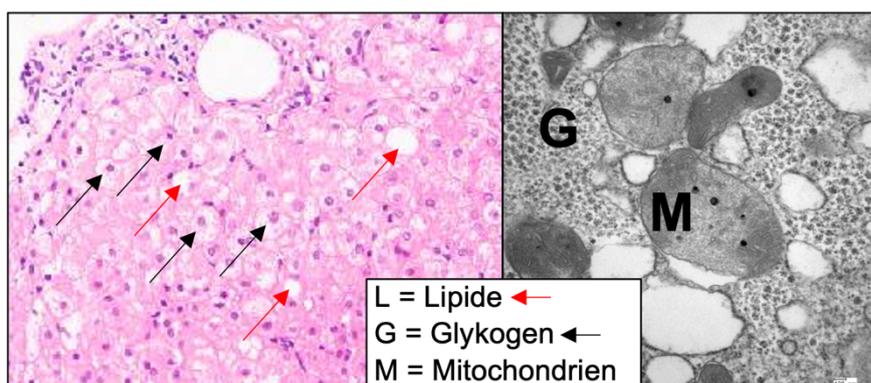
Ein 31-jähriger Mann stellte sich klinisch mit progredienter Muskelschwäche und Leistungsminderung in Kombination mit rezidivierenden Hypoglykämien vor. Der Patient hatte bereits zweimal hypoglykämische Krampfanfälle erlitten und zuvor war eine hypertrophe Kardiomyopathie diagnostiziert worden. In der körperlichen Untersuchung zeigte sich der Patient in gutem Allgemein- und Ernährungszustand. Auffällig waren schlanke Extremitäten bei leichter stammbetonter Adipositas. Bis auf eine Vergrößerung der Leber war die restliche körperliche Untersuchung unauffällig. Laborchemisch waren eine hypoinsulinämische Hypoglykämie, eine Hypertriglyceridämie, sowie erhöhte Werte von Laktat sowie  $\gamma$ -Glutamyltransferase auffällig. Die Transaminasen waren unauffällig. In einer diagnostisch durchgeführten Muskel- und Leberbiopsie zeigten sich vermehrte Glykogen- und Lipideinlagerungen.

In der vorliegenden elektronenmikroskopischen Aufnahme einer Muskelbiopsie des Patienten (Abbildung 9) fällt eine große Ansammlung von Glykogen-Granula (G) zwischen den Muskelfasern auf. Des Weiteren sind zwei prominente Lipidtropfen (L) zu erkennen. Durch die Einlagerungen ist die normale Muskelfaserstruktur fast gänzlich aufgehoben.

Abbildung 10 zeigt eine Leberbiopsie des Patienten. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) stellen sich die Hepatozyten balloniert und mit Glykogen-Granula gefüllt dar (schwarze Pfeile). Die leeren Vakuolen zeigen an, dass sich hier zuvor Lipide befanden, die jedoch während der Färbung ausgewaschen wurden (rote Pfeile). Dies entspricht einer Steatosis hepatis (= Fettleber). In der elektronenmikroskopischen Aufnahme lässt sich eine große Ansammlung von Glykogen-Granula (G) im gesamten Zytoplasma erkennen. Zudem stellen sich die Mitochondrien (M) mit wenigen und irregulären Cristae dar.



**Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Muskelbiopsie des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante.** L = Lipide, G = Glykogen.



**Abbildung 10: Leberbiopsie des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante in HE-Färbung (links) und in elektronenmikroskopischer Aufnahme (rechts).** L = Lipide, G = Glykogen, M = Mitochondrien.

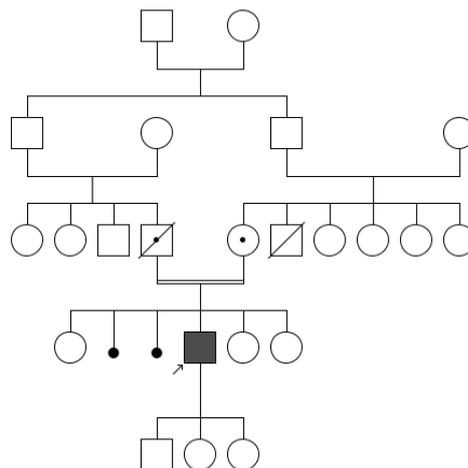


Abbildung 11: Stammbaum des Patienten mit  $TXNIP^{Asn203Tyr}$  Variante.

Die vermehrten Glykogen-Einlagerungen in Muskel und Leber legten den Verdacht auf eine Glykogenspeichererkrankung nahe. Da jedoch alle gängigen Glykogenose-Formen ausgeschlossen werden konnten, wurde eine Single-Exom-Sequenzierung durchgeführt. Hier wurde eine homozygote *Missense*-Variante im Gen *TXNIP* (*Thioredoxin interacting protein*) gefunden. Der Patient trägt eine bisher nicht beschriebene  $TXNIP^{Asn203Tyr}$  Variante. Der Patient ist eines von vier Kindern konsanguiner Eltern russlanddeutscher Herkunft. Die Konsanguinität besteht über das Verwandtschaftsverhältnis der Eltern als Cousine und Cousin ersten Grades (s. Abbildung 11). Der Vater des Patienten war bereits im Alter von 60 Jahren an einer Kardiomyopathie gestorben. Die Mutter war gesund, hatte jedoch zwei Fehlgeburten im dritten bzw. achten Schwangerschaftsmonat. Die drei Schwestern des Patienten waren beschwerdefrei. Der Patient hat drei Kinder, welche gesund sind.

#### Patient mit $TXNIP^{Asn86Lysfs*2}$ Variante

Der Patient mit  $TXNIP^{Asn86Lysfs*2}$  Variante ist ein Kind, welches in der medizinischen Universität in Salzburg in Österreich vorgestellt wurde. Initial war der Patient in der Neonatalperiode mit einer Laktatazidose von bis zu 9 mmol/L auffällig geworden. Die Laktatwerte gingen später zurück, blieben aber mit 3-4 mmol/L weiterhin erhöht. Es traten jedoch keine Hypoglykämien auf. Klinisch präsentierte sich der Patient mit Hepatomegalie, muskulärer Hypotonie und einer generalisierten Entwicklungsverzögerung. Laborchemisch zeigte sich ein erhöhter Alanin-Wert im Serum bei normalen Methionin-Spiegeln. Die Transaminasen waren nicht erhöht. Ein Therapieversuch mit ketogener Diät musste aufgrund der Entwicklung einer massiven Hypertriglyceridämie abgebrochen werden. Die genetische Untersuchung zeigte eine

homozygote *Frameshift*-Variante im Gen TXNIP. Der Patient trägt eine bisher nicht beschriebene TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> Variante.

#### Patient mit TXNIP<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante

Der Patient mit TXNIP<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante ist ein Kind, welches in der medizinischen Universität in Innsbruck in Österreich vorgestellt wurde. In der Neonatalperiode wurde der Patient mit einer Laktatazidose sowie Hypoglykämien auffällig; beides ging später zurück. Klinisch präsentierte sich der Patient mit muskulärer Hypotonie, einer generalisierten Entwicklungsverzögerung sowie Epilepsie. Er wies keine Hepatomegalie auf. Die genetische Untersuchung ergab eine homozygote *Frameshift*-Variante im Gen TXNIP. Der Patient trägt eine bisher nicht beschriebene TXNIP<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante.

Tabelle 16: Klinische Charakteristika der Patienten mit TXNIP Varianten

|   | Patient mit TXNIP <sup>Asn203Tyr</sup> Variante | Patient mit TXNIP <sup>Asn86Lysfs*2</sup> Variante | Patient mit TXNIP <sup>Ile215Tyrfs*59</sup> Variante | Summe |
|---|---|--|--|-------|
| <b>Erkrankungsbeginn</b>                        | Ca. 18 Jahre                                    | Neonatalperiode                                    | Neonatalperiode                                      | -     |
| <b>Muskuläre Hypotonie / Muskelschwäche</b>     | ✓   | ✓  | ✓  | 3 / 3 |
| <b>Entwicklungsverzögerung</b>                  | -   | ✓  | ✓  | 2 / 3 |
| <b>Epilepsie</b>                                | -   | -  | ✓  | 1 / 3 |
| <b>Hepatomegalie</b>                            | ✓   | ✓  | -  | 2 / 3 |
| <b>Hypertrophe Kardiomyopathie</b>              | ✓   | ?  | ?  | 1 / 1 |
| <b>Glykogen-einlagerung in Leber und Muskel</b> | ✓   | ?  | ?  | 1 / 1 |
| <b>Hypoglykämie</b>                             | ✓   | -  | ✓  | 2 / 3 |
| <b>Laktatazidose</b>                            | ✓   | ✓  | ✓  | 3 / 3 |
| <b>Hypertriglyceridämie</b>                     | ✓   | ✓<br>(unter ketogener Diät)                        | -  | 2 / 3 |
| <b>Erhöhte Alanin-Konzentration im Serum</b>    | -   | ✓  | -  | 1 / 3 |
| <b>Erhöhte Transaminasen im Serum</b>           | ✓   | -  | -  | 1 / 3 |

✓ = vorhanden, - = nicht vorhanden, ? = unbekannt

## 4.2 TXNIP Genexpressions-Analysen in Fibroblasten

Die beschriebenen Patienten tragen jeweils unterschiedliche Varianten in *TXNIP*, deren Mechanismus der Dysfunktion nicht einheitlich ist. Für eine erste Charakterisierung der Auswirkungen der Varianten erfolgte eine vergleichende Analyse der *TXNIP* Genexpression der Patienten untereinander und mit geeigneten Kontrollen. Als Modellorganismus für die Analysen wurden primäre Fibroblasten aus Hautbiopsien der Patienten sowie geeigneter Kontrollen gewählt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der *TXNIP* RNA-Analysen mittels quantitativer PCR sowie der *TXNIP* Protein-Analysen mittels Western-Blot dargestellt.

Die Experimente wurden zunächst nur mit Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante und Kontroll-Fibroblasten durchgeführt. Die Fibroblasten der Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. *TXNIP*<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante konnten erst im späteren Verlauf genutzt werden. Aus diesem Grund werden in den folgenden Abschnitten jeweils zunächst die Ergebnisse der Experimente mit den Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante und anschließend die Ergebnisse der Experimente mit den Fibroblasten aller drei Patienten mit *TXNIP* Varianten dargestellt.

### 4.2.1 *TXNIP* RNA-Analyse in Fibroblasten

Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante sowie zweier Kontrollen wurden unter Standard-Kulturbedingungen (4,5 g / L Glukose 10 % FCS) inkubiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante grundsätzlich *TXNIP* RNA produzieren. Hierbei zeigte sich die *TXNIP* Genexpression im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten erniedrigt (s. Abbildung 12).

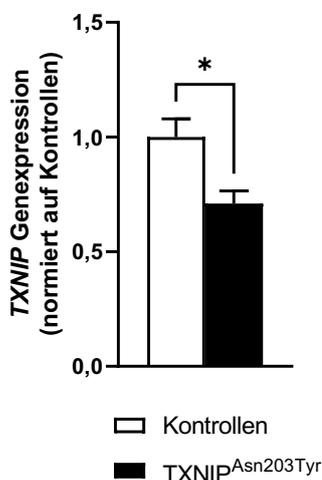
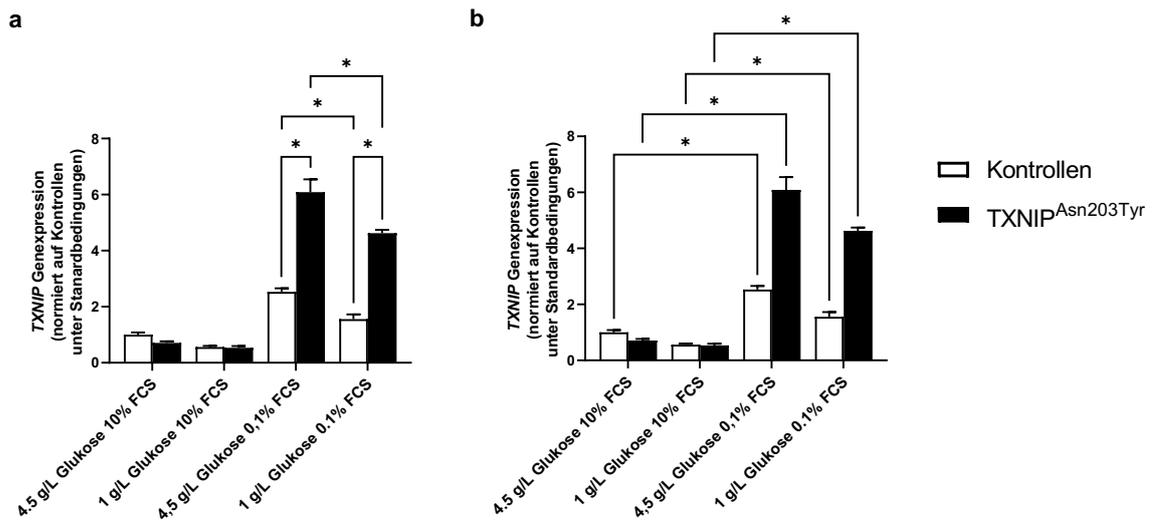
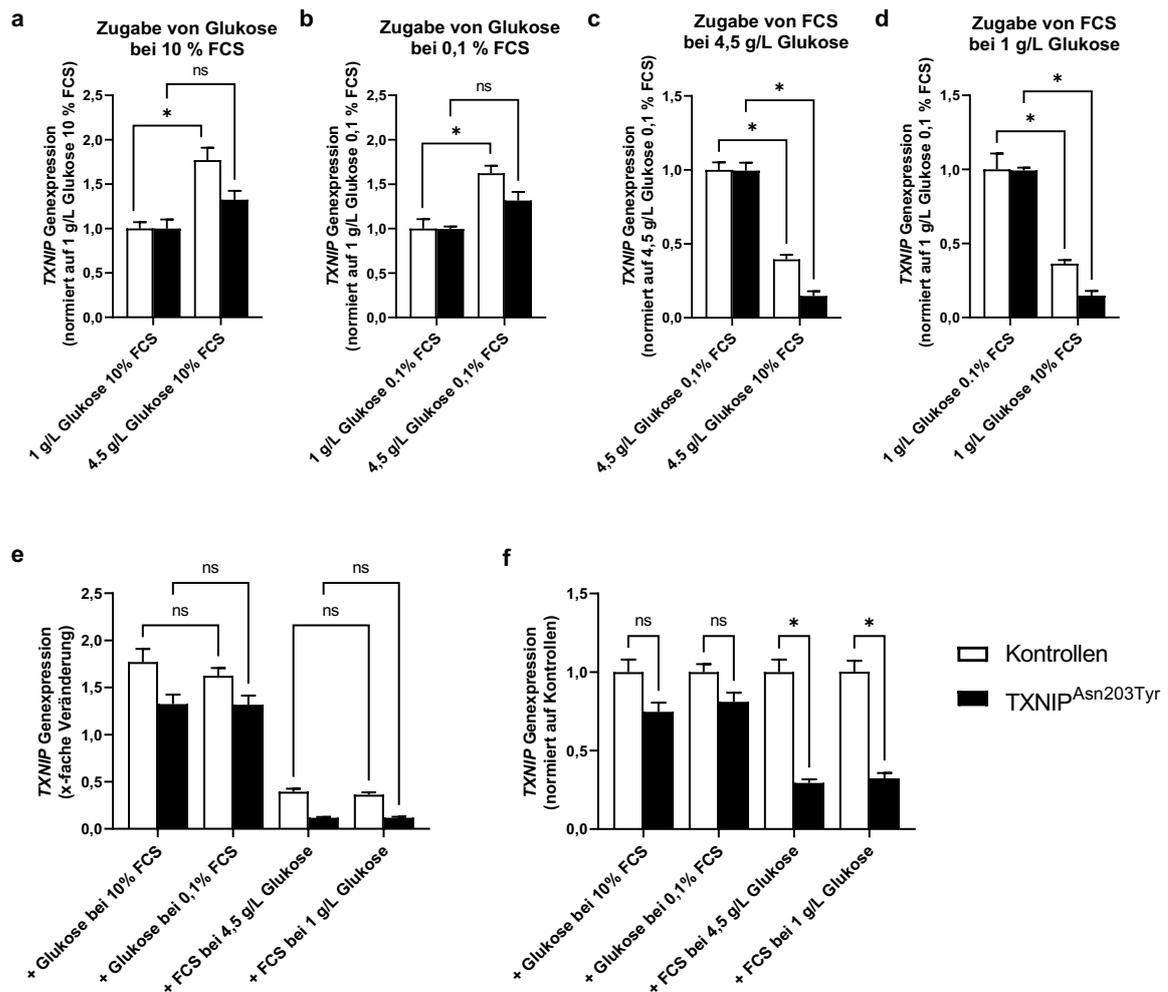


Abbildung 12: qPCR Analyse der *TXNIP* Genexpression von Fibroblasten zweier Kontrollen und des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante unter Standard-Kulturbedingungen (4,5 g / L Glukose 10 % FCS). Kontrollen jeweils n=3, Patient mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante n=3. \* = p ≤ 0,05, Student's T-Test.



**Abbildung 13: qPCR Analyse der *TXNIP* Genexpression von Fibroblasten zweier Kontrollen und des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante unter verschiedenen Kulturbedingungen.** Kontrollen jeweils n=3, Patient mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante n=3. (a) *TXNIP* Genexpression bei Reduktion der Glukosekonzentration von 4,5 g / L auf 1 g / L Glukose bei 10 % bzw. 0,1 % FCS. (b) *TXNIP* Genexpression bei Reduktion der FCS-Konzentration von 10 % auf 0,1 % FCS bei 4,5 g / L bzw. 1 g / L Glukose. \* =  $p \leq 0,05$ , 2-way ANOVA mit Korrektur nach Tukey.

Nachfolgend wurde der Einfluss unterschiedlicher Glukose- und FCS-Konzentrationen auf die Genexpression von *TXNIP* in den Fibroblasten der Kontrollen und des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante untersucht. Nach vier Stunden Inkubation mit Senkung der Glukosekonzentration von 4,5 g / L Glukose auf 1 g / L Glukose bei gleichbleibend 10 % FCS ließ sich in den Fibroblasten der Kontrollen sowie des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante eine Tendenz Richtung Reduktion der *TXNIP* Genexpression erkennen (s. Abbildung 13a). Im gleichen Versuchsaufbau mit 0,1 % FCS statt 10 % FCS bewirkte die Reduktion der Glukosekonzentration in beiden Gruppen eine Reduktion der *TXNIP* Genexpression. Hierbei ließen sich zwischen den beiden Gruppen Unterschiede feststellen: Die Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante zeigten im Vergleich zu Kontrollfibroblasten unter beiden Kulturbedingungen mehr als doppelt so viel *TXNIP* Genexpression. Die stärkste *TXNIP* Genexpression konnte in diesem Experiment in den Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante unter 4,5 g / L Glukose und 0,1 % FCS beobachtet werden. Nach vier Stunden Inkubation mit Senkung der FCS-Konzentration von 10 % FCS auf 0,1 % FCS ließen sich sowohl bei 4,5 g / L Glukose als auch 1 g / L Glukose deutliche Änderungen der *TXNIP* Genexpression erkennen (s. Abbildung 13b): In allen Gruppen bewirkte die Reduktion der FCS-Menge eine starke Zunahme der *TXNIP* Genexpression.



**Abbildung 14: qPCR Analyse *TXNIP* Genexpression von Fibroblasten zweier Kontrollen und des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante unter verschiedenen Kulturbedingungen: Einfluss von Glukose und FCS auf die *TXNIP* Genexpression.** Kontrollen jeweils n=3, Patient mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante n=3. (a) – (d) *TXNIP* Genexpression bei Zugabe von Glukose bzw. FCS bei verschiedenen FCS- bzw. Glukosekonzentrationen. (e) *TXNIP* Genexpression bei Zugabe von Glukose bzw. FCS bei verschiedenen FCS- bzw. Glukosekonzentrationen: Vergleich der Effekte innerhalb der Genotypen. (f) *TXNIP* Genexpression bei Zugabe von Glukose bzw. FCS bei verschiedenen FCS- bzw. Glukosekonzentrationen: Vergleich der Effekte zwischen den Genotypen. ns = nicht signifikant, \* = p ≤ 0,05, 2-way ANOVA mit Korrektur nach Tukey.

Folgend werden die Effekte von Glukose und FCS im Hinblick auf ihre Modulation der *TXNIP* Genexpression im Einzelnen betrachtet. Wurden im vorherigen Abschnitt die Entwicklungen bei Reduktion von Glukose und FCS betrachtet, wurden nun rechnerisch die Effekte bei Zugabe von Glukose und FCS bestimmt. Hierzu wurden einzelne Kulturbedingungen hinsichtlich der *TXNIP* Genexpression miteinander verglichen.

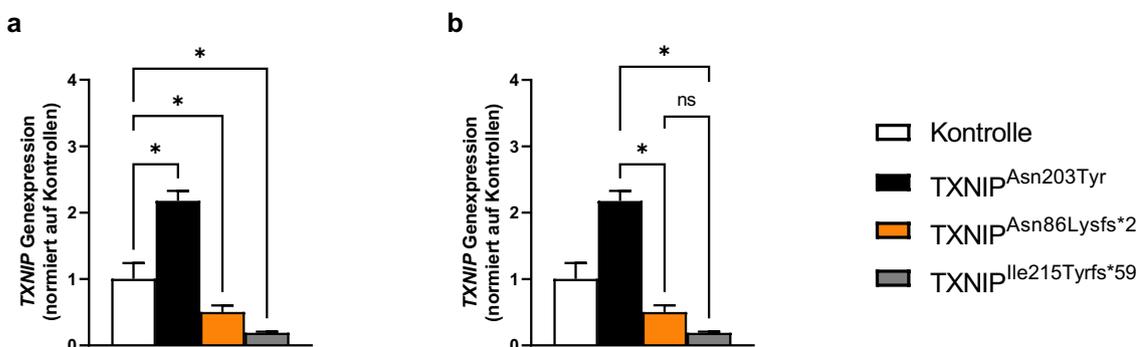
Bei allen Fibroblasten ergab sich bei Zugabe von Glukose eine höhere *TXNIP* Genexpression (s. Abbildung 14a und b). Hierbei gab es zwischen Kontrollfibroblasten und Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante in den einzelnen Gruppen

keine signifikanten Unterschiede (s. Abbildung 14f). Der Effekt von Glukose, die *TXNIP* Genexpression zu erhöhen, zeigte sich unabhängig von der FCS-Konzentration (s. Abbildung 14e).

Bei Zugabe von FCS ergab sich eine Reduktion der *TXNIP* Genexpression (s. Abbildung 14c und d). Innerhalb der einzelnen Gruppen zeigten sich ebenfalls Unterschiede: Die Reduktion der *TXNIP* Genexpression bei Zugabe von FCS war in den Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante stärker ausgeprägt als in den Kontrollfibroblasten (s. Abbildung 14f). Der Effekt von FCS, die *TXNIP* Genexpression zu senken, zeigte sich unabhängig von der Glukose-Konzentration (s. Abbildung 14e).

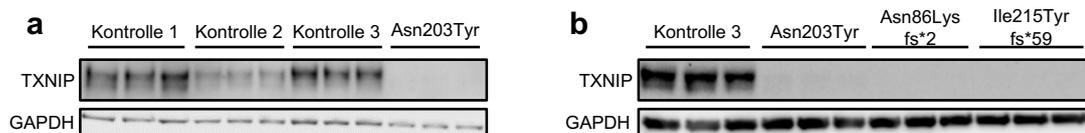
Des Weiteren wurden alle Patientenfibroblasten gemeinsam bezüglich der *TXNIP* Genexpression untersucht. Da sich im vorigen Experiment die *TXNIP* Genexpression in der Gruppe mit 4,5 g / L Glukose und 0,1 % FCS am höchsten zeigte, wurde diese Kulturbedingung gewählt.

Nach 24 Stunden Inkubation bei 4,5 g / L Glukose und 0,1 % FCS zeigten sich Unterschiede der *TXNIP* Genexpression zwischen Kontroll- und Patientenfibroblasten (s. Abbildung 15a): Die Genexpression von *TXNIP* war in Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante um mehr als das Doppelte erhöht, während die Werte der Fibroblasten der Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. *TXNIP*<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante nur die Hälfte bzw. ein Fünftel des Kontrollwerts erreichten. Damit lag die *TXNIP* Genexpression der Fibroblasten der Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. *TXNIP*<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante niedriger als die der Kontrollfibroblasten und niedriger als die der Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante. Die Fibroblasten der Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. *TXNIP*<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante unterschieden sich bezüglich ihrer *TXNIP* Genexpression jedoch nicht signifikant voneinander (s. Abbildung 15b).



**Abbildung 15: qPCR Analyse der *TXNIP* Genexpression von Fibroblasten einer Kontrolle sowie aller Patienten mit *TXNIP* Varianten nach 24h Inkubation bei 4,5 g / L Glukose 0,1 % FCS.** Kontrolle n=4, Patienten mit *TXNIP* Varianten jeweils n=4. (a) *TXNIP* Genexpression der Patientenfibroblasten im Vergleich mit den Kontrollfibroblasten. (b) *TXNIP* Genexpression im Vergleich zwischen den verschiedenen Patientenfibroblasten. ns = nicht signifikant, \* = p ≤ 0,05, One-way ANOVA mit Korrektur nach Tukey.

## 4.2.2 TXNIP Protein-Analyse in Fibroblasten

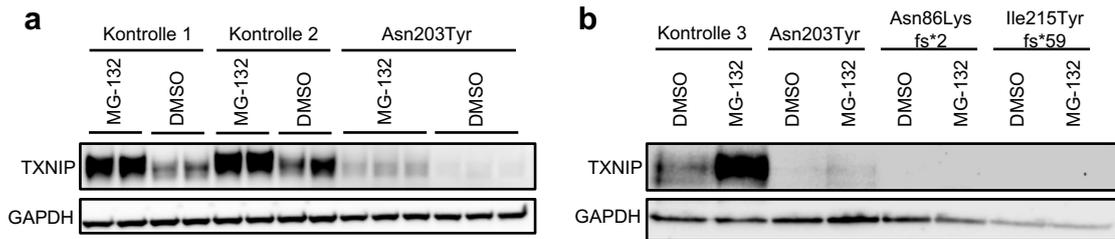


**Abbildung 16: Western Blot Analyse von Fibroblasten der Kontrollen sowie der Patienten mit *TXNIP* Varianten unter Verwendung von Antikörpern gegen *TXNIP* und *GAPDH*.** (a) Analyse von Lysaten der Fibroblasten dreier Kontrollen sowie des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante nach Kultur unter Standard-Kulturbedingungen (4,5 g / L Glukose 10 % FCS). (b) Analyse von Lysaten der Fibroblasten einer Kontrolle sowie aller Patienten mit *TXNIP* Varianten nach 24h Inkubation in 4,5 g / L Glukose 0,1 % FCS.

Im nächsten Schritt wurden *TXNIP* Protein-Analysen in Fibroblasten durchgeführt. Unter Standard-Kulturbedingungen (4,5 g / L Glukose 10 % FCS) ließ sich im Proteinlysat der Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante im Gegensatz zu Fibroblasten dreier Kontrollpersonen kein *TXNIP* Protein nachweisen (s. Abbildung 16a). Die drei Kontrollen unterschieden sich hinsichtlich der Menge an *TXNIP* Protein; der Unterschied zu den Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante war jedoch klar zu erkennen.

Nachfolgend wurden die Fibroblasten aller drei Patienten mit *TXNIP* Varianten in Bezug auf ihre Expression von *TXNIP* Protein miteinander und mit einer Kontrolle verglichen (s. Abbildung 16b). Da sich auf RNA-Ebene unter der Kulturbedingung mit 4,5 g / L Glukose und 0,1 % FCS die höchste Genexpression von *TXNIP* darstellte, wurde diese Bedingung für den folgenden Versuch gewählt. Nach 24 Stunden Inkubation unter diesen Bedingungen ließ sich bei keinem der Fibroblasten-Proteinlysate der Patienten mit *TXNIP* Varianten *TXNIP* Protein nachweisen.

Es ist bekannt, dass *TXNIP* Protein proteasomal degradiert wird (Shao et al. 2010, Zhang et al. 2010). Deshalb wurde im nachfolgenden Experiment untersucht, ob in den Fibroblasten der Patienten mit *TXNIP* Varianten *TXNIP* Protein gebildet, jedoch anschließend proteasomal degradiert wird. Hierfür wurden die Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 behandelt.



**Abbildung 17: Western Blot Analyse von Fibroblasten der Kontrollen sowie der Patienten mit *TXNIP* Varianten nach 8 h Inkubation mit 20  $\mu$ M MG-132 bzw. DMSO als Kontrolle unter Standard-Kulturbedingungen (4,5 g / L Glukose 10 % FCS). (a) Analyse von Lysaten der Fibroblasten zweier Kontrollen sowie des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante. (b) Analyse von Lysaten der Fibroblasten einer Kontrolle sowie aller Patienten mit *TXNIP* Varianten.**

Die Kontrollfibroblasten zeigten im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit DMSO nach der MG-132 Behandlung eine Akkumulation von TXNIP Protein (s. Abbildung 17a). Die Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante wiesen eine geringe Proteinoxpression auf, die durch die Behandlung mit MG-132 akkumulierte.

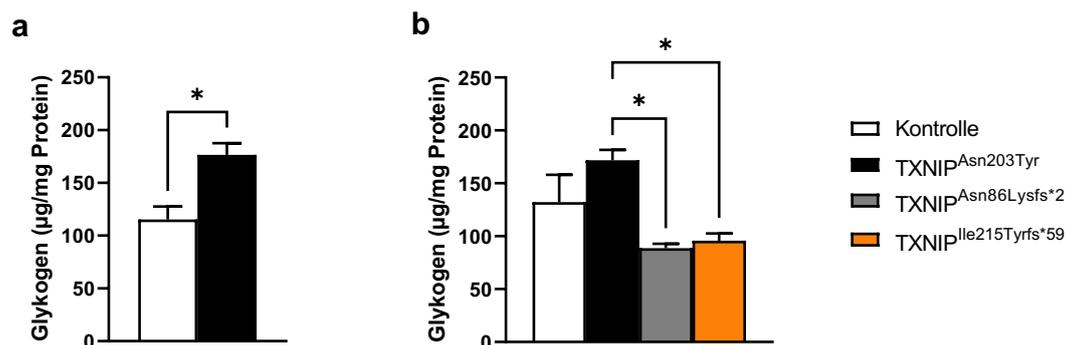
Diese Ergebnisse konnten in einem Experiment mit den Fibroblasten aller drei Patienten mit *TXNIP* Varianten reproduziert werden (s. Abbildung 17b). In den Kontrollfibroblasten ließ sich nach der Behandlung mit MG-132 eine starke Akkumulation von TXNIP Protein nachweisen, in den Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante zeigte sich wie zuvor nach der Behandlung mit MG-132 ein minimales Signal. Die Fibroblasten der Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. *TXNIP*<sup>Ile215Tyrf\*59</sup> Variante zeigten unabhängig von der Behandlung keine Expression von TXNIP.

### 4.3 Glykogen-Messungen in Fibroblasten

In den histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Muskel- und Leberbiopsien des Patienten mit  $TXNIP^{Asn203Tyr}$  Variante zeigten sich vermehrte Glykogeneinlagerungen. Es ist bekannt, dass sich bei einigen Formen von Glykogenspeichererkrankungen die Glykogenakkumulation in Patientenfibroblasten darstellen lässt (Seiter und Summer 1975). Um den Mechanismus der Glykogeneinlagerung herauszuarbeiten und eventuelle Therapiemöglichkeiten zu evaluieren, wurde daher der Glykogengehalt von Fibroblasten der Patienten untersucht. Aufgrund der bekannten Wirkung von  $TXNIP$  auf die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 (s. 1.4.2  $TXNIP$  im Glukose- und Lipidstoffwechsel) soll zudem untersucht werden, welchen Einfluss Ritonavir als Hemmstoff der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 (Hresko und Hruz 2011) auf den Glykogenstoffwechsel der Patienten mit Varianten in  $TXNIP$  hat.

#### 4.3.1 Native Glykogenmessung

Zunächst wurden die Fibroblasten für 48 Stunden in Standard-Kulturmedium (4,5 g / L Glukose 10 % FCS) inkubiert. Im ersten Experiment (s. Abbildung 18a) mit Fibroblasten von Kontrollen und Fibroblasten des Patienten mit  $TXNIP^{Asn203Tyr}$  Variante konnte nach 48 Stunden Inkubation in Standard-Kulturmedium ein Unterschied bezüglich der Glykogenmenge festgestellt werden: Die Patientenfibroblasten enthielten im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten ca. die 1,5-fache Menge an Glykogen.

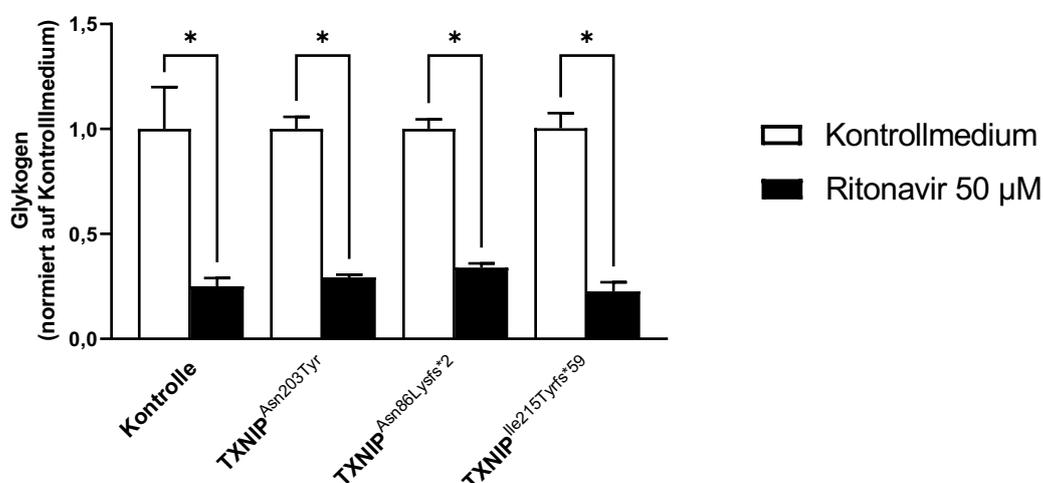


**Abbildung 18: Messung des Glykogengehalts in Fibroblasten einer Kontrolle sowie der Patienten mit  $TXNIP$  Varianten unter Standard-Kulturbedingungen (4,5 g / L Glukose 10 % FCS).** (a) Messung des Glykogengehalts in Fibroblasten einer Kontrolle und des Patienten mit  $TXNIP^{Asn203Tyr}$  Variante nach 48 h Inkubation in Standard-Kulturmedium (4,5 g / L Glukose 10 % FCS). Kontrolle n=3, Patient mit  $TXNIP^{Asn203Tyr}$  Variante n=3. (b) Messung des Glykogengehalts in Fibroblasten einer Kontrolle sowie aller Patienten mit  $TXNIP$  Varianten nach 48 h Inkubation in Standard-Kulturmedium (4,5 g / L Glukose 10 % FCS) mit 0,5 % DMSO. Kontrolle n=2, Patienten mit  $TXNIP$  Varianten jeweils n=3. \* =  $p \leq 0,05$ , Student's T-Test (a) bzw. One-way ANOVA mit Korrektur nach Tukey (b).

Im nachfolgenden Experiment (s. Abbildung 18b) mit Kontroll- und allen Patientenfibroblasten zeigte sich nach 48 Stunden Inkubation im Kontrollmedium mit 0,5 % DMSO bezüglich der Glykogenmenge folgendes: Wie bereits im Vorversuch enthielten die Fibroblasten des Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$  Variante erneut eine Tendenz zu mehr Glykogen als die Kontrollfibroblasten. Bei den Fibroblasten der Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn86Lysfs*2}}$  bzw.  $\text{TXNIP}^{\text{Ile215Tyrfs*59}}$  Variante ließ sich ein Trend zu einem niedrigeren Glykogengehalt feststellen: Im Vergleich zu den Fibroblasten des Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$  Variante enthielten die Fibroblasten der anderen beiden Patienten mit  $\text{TXNIP}$  Varianten weniger Glykogen.

#### 4.3.2 Glykogenmessung nach Behandlung mit Ritonavir

Nach 48 Stunden Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Ritonavir nahm die Glykogenmenge in allen Fibroblasten stark ab. Zwischen den verschiedenen Genotypen unterschied sich das Ausmaß der Reduktion der Glykogenmenge jedoch nicht; in allen Fibroblasten reduziert die Behandlung mit Ritonavir die Glykogenmenge in ähnlichem Umfang (s. Abbildung 19).



**Abbildung 19: Messung des Glykogengehalts in Fibroblasten einer Kontrolle sowie aller Patienten mit  $\text{TXNIP}$  Varianten ohne und mit Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Ritonavir für 48 Stunden: Glykogenmengen normiert auf Werte unter Kontrollmedium.** Kontrolle n=2, Patienten mit  $\text{TXNIP}$  Varianten jeweils n=3. \* =  $p \leq 0,05$ , 2-way ANOVA mit Korrektur nach Tukey.

## 4.4 Analysen des Lipidstoffwechsels in Patientenproben

In Mausexperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass eine TXNIP-Defizienz über eine erhöhte Rate an *de novo* Lipogenese sowie eine erhöhte Aktivität der FAS in der Leber zu Hypertriglyceridämien führt (Donnelly et al. 2004). Daher wurden die verfügbaren Patientenproben schwerpunktmäßig im Hinblick auf den Lipidstoffwechsel ausgewertet, um die Fragestellung zu bearbeiten, ob bei den Patienten mit TXNIP Varianten eine erhöhte DNL nachweisbar ist. Hierzu werden Blutplasma, eine Muskel- sowie eine Leberbiopsie ausgewertet.

### 4.4.1 Blutplasma

Um die systemischen Auswirkungen der TXNIP Varianten auf den Lipidstoffwechsel zu untersuchen, wurden zunächst Lipidanalysen mit Blutplasma der Patienten sowie geeigneter Kontrollen durchgeführt.

#### Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Der Patient mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante wies laborchemisch eine kombinierte Hyperlipidämie auf. Die Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) des Patienten zeigte im Vergleich zu Kontrollen stark erhöhte triglyceridreiche Lipoproteine (TRL) und erhöhte Glycerolwerte als Ausdruck einer vermehrten Lipolyseaktivität. Auch das Cholesterin war im Vergleich zu den Kontrollen stark erhöht. Das gemessene Cholesterin lag vor allem als LDL-Cholesterin vor (s. Abbildung 20).

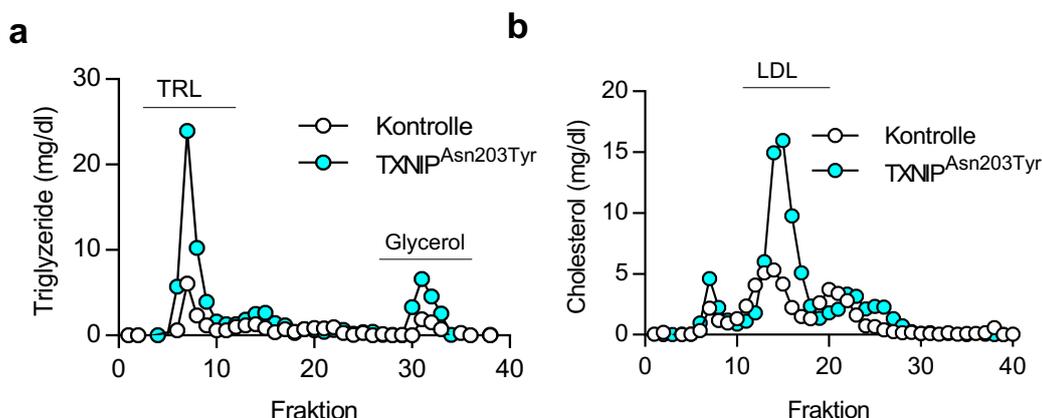
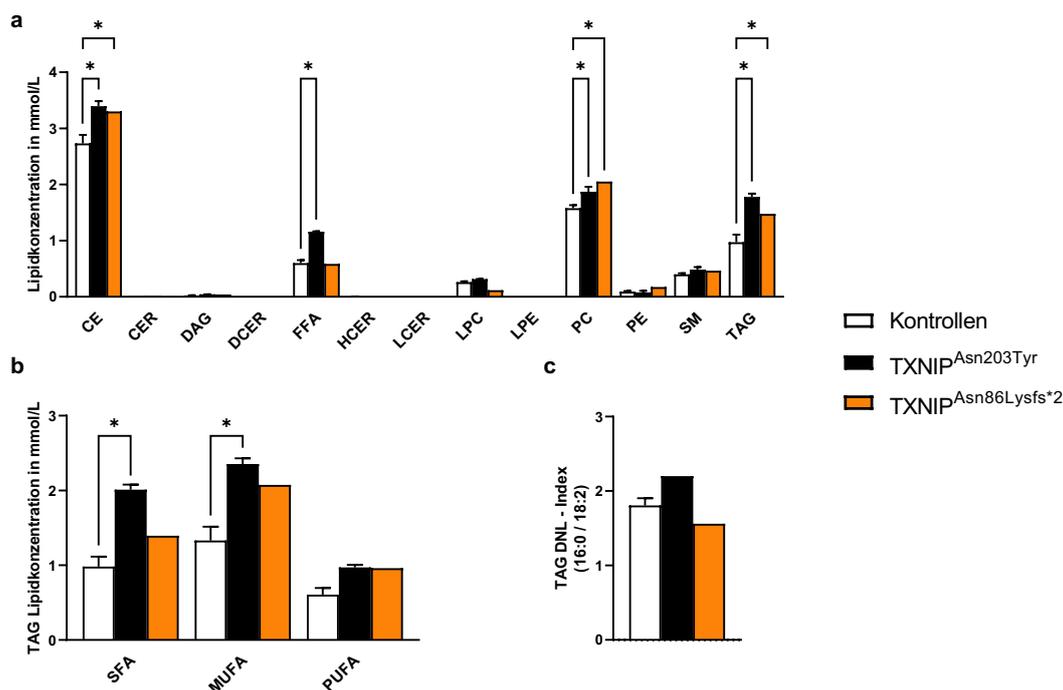


Abbildung 20: Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) aus Blutplasma des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante (n=1) sowie einer geeigneten gesunden Kontrolle (n=1).

## Lipidom



**Abbildung 21: Plasma Lipidom aus dem Blutplasma mehrerer Kontrollen sowie der Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> bzw. TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> Variante.** Kontrollen n=9, Patient mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante (in technischem Replikat), Patient mit TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> Variante. (a) Lipidkonzentrationen in mmol/L; aufgetragen nach Lipidklassen. (b) Lipidkonzentrationen in mmol/L in den Triglyceriden; aufgetragen nach Sättigungsgrad der Fettsäuren. (c) *De novo* Lipogenese – Index (Fettsäuren 16:0 / Fettsäuren 18:2) in Triglyceriden. \* =  $p \leq 0,05$ , 2-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Šidák (a+b) bzw. One-way ANOVA (c).

In der Lipidom-Analyse von Plasmen gesunder Kontrollen sowie der Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> bzw. TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> Variante zeigten sich Cholesterinester, freie Fettsäuren, Phosphatidylcholine und Triglyceride als am häufigsten vorkommende Lipidklassen. Bei beiden Patienten mit TXNIP Varianten wurden erhöhte Konzentrationen von Cholesterinestern und Triglyceriden gemessen. Zusätzlich waren im Plasma des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante die freien Fettsäuren und im Plasma des Patienten mit TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> Variante die Phosphatidylcholine erhöht (s. Abbildung 21a). Innerhalb der Gruppe der Triglyceride zeigten sich im Fettsäureprofil folgende Unterschiede: Im Plasma des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante wurden sowohl mehr gesättigte Fettsäuren (saturated fatty acids = SFA) als auch einfach ungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids = MUFA) gemessen. Die Menge an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids = PUFA) war bei beiden Patienten leicht erhöht (s. Abbildung 21b). Bezüglich des *de novo* Lipogenese Index (DNL-Index) innerhalb der Gruppe der Triglyceride zeigten sich keine Unterschiede. Im Vergleich zum Plasma gesunder Kontrollen zeigte sich jedoch beim Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante eine Tendenz zu einem höheren und beim

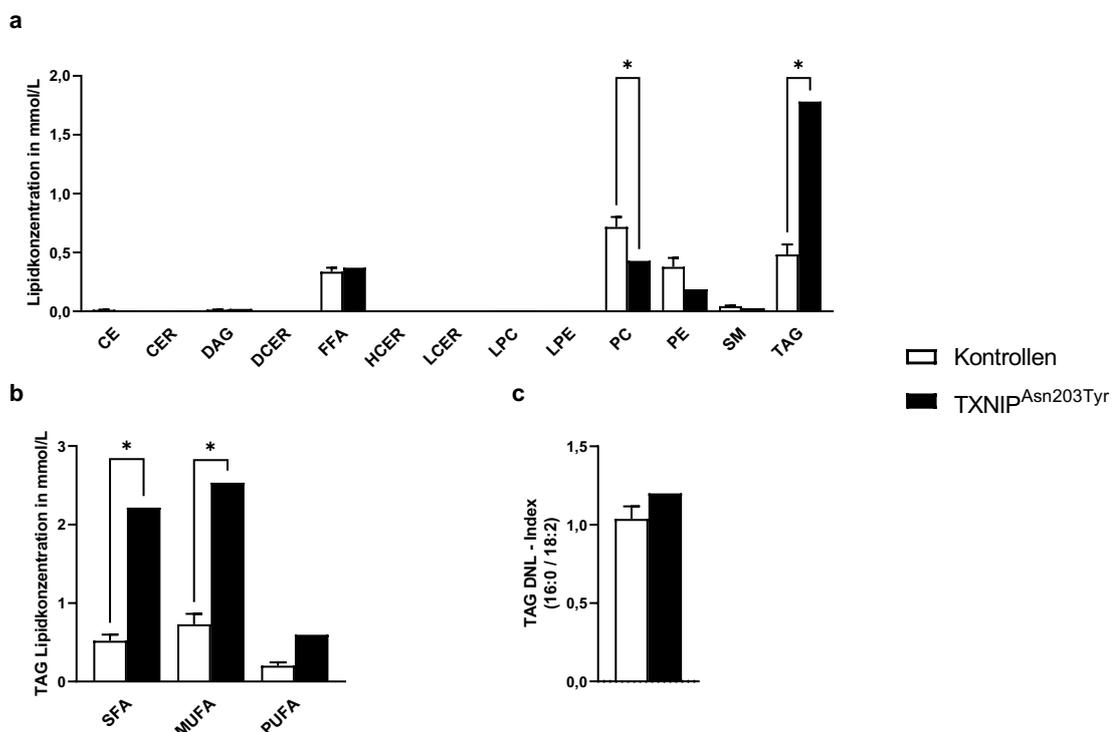
Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn86Lysfs}^*2}$  Variante zu einem niedrigen DNL-Index (s. Abbildung 21c).

#### 4.4.2 Muskel

Anamnestisch sind alle drei Patienten mit  $\text{TXNIP}$  Varianten von Muskelschwäche betroffen. Da jedoch nur die Probe aus der Muskelbiopsie des Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$  Variante zur Verfügung stand, werden im Folgenden nur die Untersuchungen an Muskelgewebe des Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$  Variante dargestellt.

#### Lipidom

In den Muskelproben gesunder Kontrollen und des Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$  Variante stellten sich freie Fettsäuren, Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine und Triglyceride als am häufigsten vorkommende Lipidklassen dar. Während die Konzentration der Phosphatidylcholine im Muskel des Patienten geringer als bei den Kontrollen war, ließ sich bei der Konzentration der Triglyceride eine starke Erhöhung feststellen: In der Muskelprobe des Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$  Variante fanden sich im Vergleich zu den Kontrollen fast viermal so viele Triglyceride (s. Abbildung 22a).



**Abbildung 22: Muskel Lipidom aus Muskelproben mehrerer Kontrollen sowie des Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$  Variante.** Kontrollen n=3, Patient mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$  Variante n=1. (a) Lipidkonzentrationen in mmol/L; aufgetragen nach Lipidklassen. (b) Lipidkonzentrationen in mmol/L in den Triglyceriden; aufgetragen nach Sättigungsgrad der Fettsäuren. (c) *De novo* Lipogenese – Index (Fettsäuren 16:0 / Fettsäuren 18:2) in Triglyceriden. \* =  $p \leq 0,05$ , multiple Student's T-Tests mit Korrektur nach Holm-Šidák (a+b) bzw. Student's T-Test (c).

In der Betrachtung des Fettsäureprofils innerhalb der Gruppe der Triglyceride fiel eine starke Erhöhung der SFAs und der MUFAs in der Muskelprobe des Patienten auf (s. Abbildung 22b). Innerhalb der Gruppe der Triglyceride zeigte sich in der Muskelprobe des Patienten eine Tendenz zu einer Erhöhung des DNL-Index (s. Abbildung 22c).

### Genexpression

In den Genexpressions-Analysen wurden Gene aus den Bereichen Transkriptionsfaktoren, Glukose- und Lipidstoffwechsel betrachtet (s. Abbildung 23). Die Transkriptionsfaktoren des Lipidstoffwechsels des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante zeigten folgende Besonderheiten: Während die Transkriptionsfaktoren *ChREBP-alpha* und *SREBP1c* kaum nachzuweisen waren, war die Expression von *ChREBP-beta* sowie *MLXIP (MondoA)* im Vergleich zu den Kontrollen ähnlich. Bezüglich des Glukosestoffwechsels im Muskel des Patienten zeigten sich in den RNA-Analysen mehrere Aspekte: Die Expression des Insulinrezeptors (*INSR*) sowie des Glukosetransporters GLUT4 (*SCL2A4*) war in der Muskelprobe des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante moderat verringert. Zudem war keinerlei Expression der Hexokinase 2 (*HK2*) nachweisbar. Die Endozytose-Adapterproteine *TXNIP* und *PID1* zeigten sich transkriptionell um etwas mehr als das Doppelte erhöht, wohingegen *FGF21* im Vergleich zu den Kontrollen auf über das 15fache erhöht gemessen wurde.

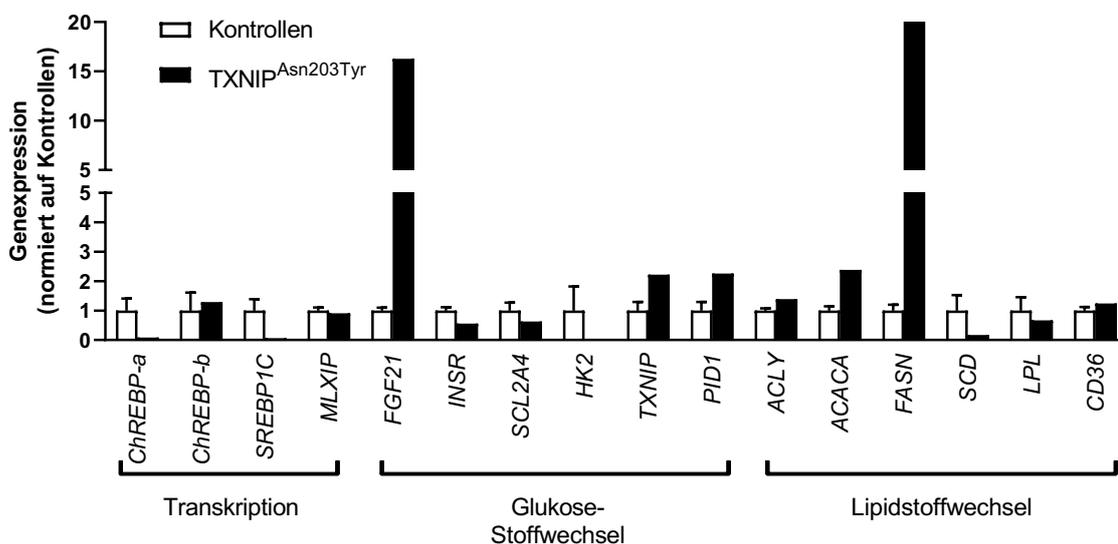


Abbildung 23: RNA-Analysen aus Muskelgewebe mehrerer Kontrollen sowie des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante. Kontrollen n=3, Patient mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante n=1.

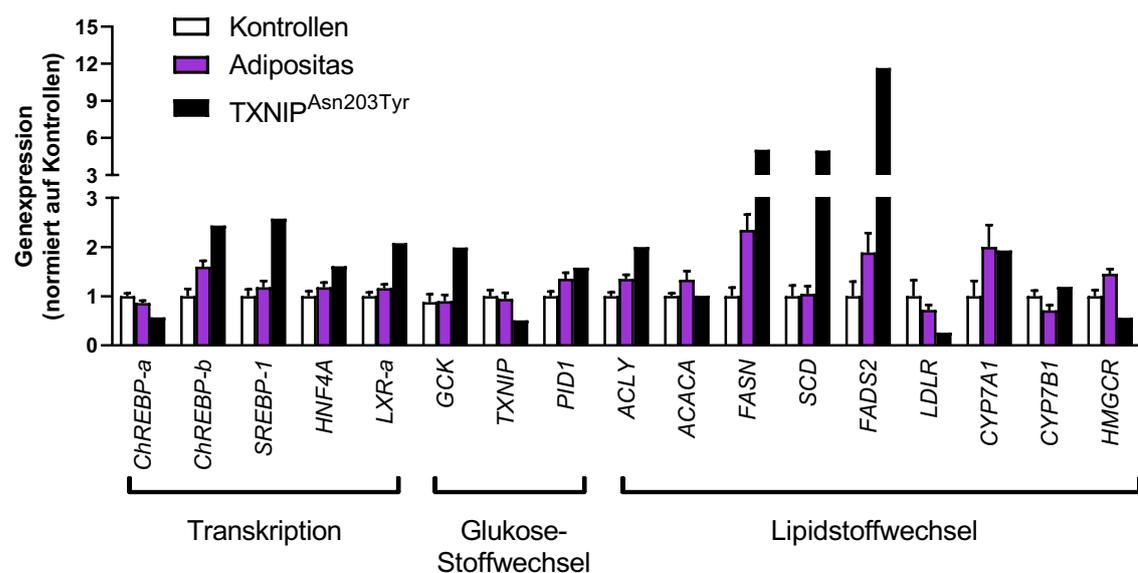
In der Betrachtung des Lipidstoffwechsels im Muskel des Patienten mit  $TXNIP^{Asn203Tyr}$  Variante fällt vor allem die ca. 20fache transkriptionelle Erhöhung der Fettsäuresynthase (*FASN*) auf. Aber auch andere Gene der Lipogenese wie *ACLY* und *ACACA* zeigten sich (wenn auch weniger stark) erhöht. Während die Expression der Desaturase *SCD* im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt war, gab es bei der Expression der Lipoproteinlipase (*LPL*) und des Fettsäureimport-Membranproteins *CD36* keine großen Unterschiede zu den Kontrollen.

#### 4.4.3 Leber

Laut den vorliegenden Untersuchungsprotokollen liegt bei zwei von drei der Patienten mit *TXNIP* Varianten eine Vergrößerung der Leber vor. Da nur vom Patienten mit  $TXNIP^{Asn203Tyr}$  Variante eine Leberbiopsie vorliegt, sind im Folgenden die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Leberprobe dargestellt.

#### Genexpression

In den RNA-Analysen aus Leberproben des Patienten mit  $TXNIP^{Asn203Tyr}$  Variante, gesunder Kontrollen sowie einer Kohorte mit Adipositas wurden Transkriptionsfaktoren und Gene des Glukose- sowie des Lipidstoffwechsels untersucht. Bei den Transkriptionsfaktoren der Lipogenese im Lebergewebe des Patienten fällt zunächst die Erhöhung von *ChREBP-beta* und *SREBF1* auf. Auch *HNF4A* und *LXR-alpha* waren leicht erhöht, während *ChREBP-alpha* leicht erniedrigt war.



**Abbildung 24: RNA-Analyse aus Lebergewebe gesunder Kontrollen, einer Kohorte mit Adipositas sowie des Patienten mit  $TXNIP^{Asn203Tyr}$  Variante.** Kontrollen n=8, Adipositas-Kohorte n=9, Patient mit  $TXNIP^{Asn203Tyr}$  Variante n=1.

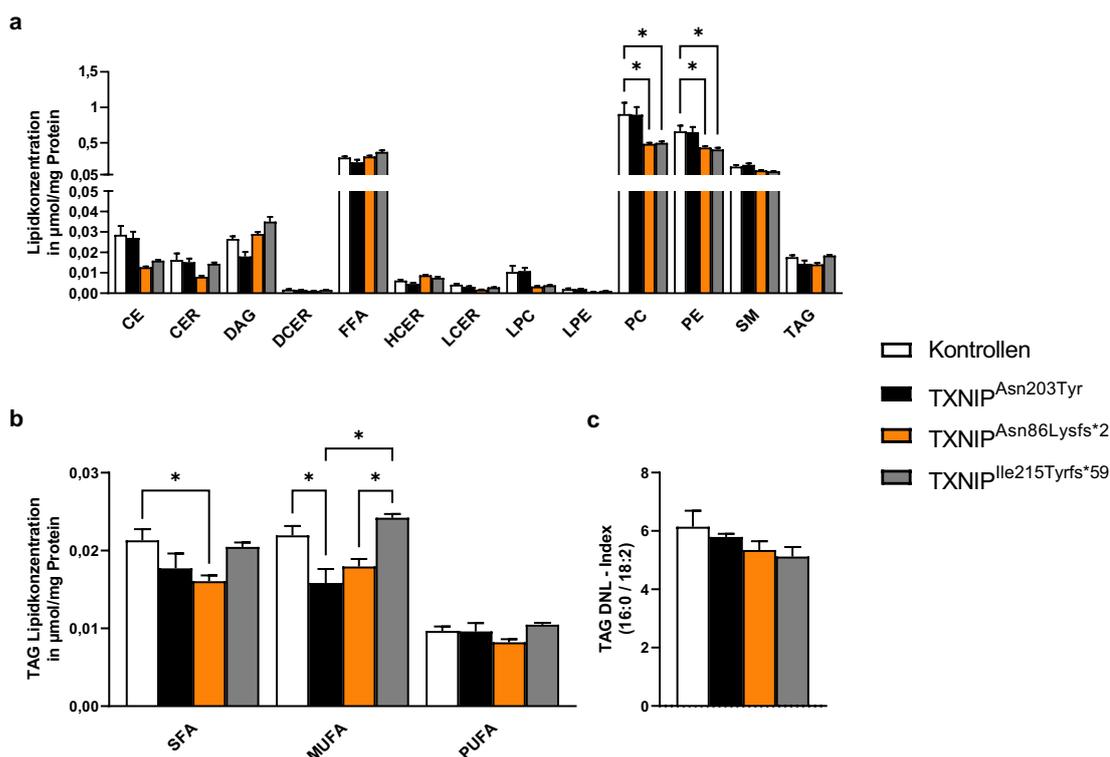
Bezüglich des Glukosestoffwechsels lässt sich beim Patienten eine Erhöhung der Expression der Glukokinase (*GCK*) auf etwa das Doppelte feststellen. Die Expression von *TXNIP* war leicht erniedrigt, während die Expression von *PID1* im Vergleich zu den Kontrollen leicht erhöht gemessen wurde. In der Betrachtung der Transkriptionsanalysen des Lipidstoffwechsels in der Leberprobe des Patienten ist analog zu den Ergebnissen aus den Muskelproben eine Erhöhung der Expression der Fettsäuresynthase (*FASN*) zu erkennen. Auch die Expression von *ACLY* war sichtbar erhöht, während es in der Expression von *ACACA* zwischen Patienten- und Kontrollproben keine Unterschiede gab. Die Transkription der Desaturasen *SCD* und *FADS2* war jedoch im Vergleich zu den Kontrollen beim Patienten auch stark erhöht. Die Expression des LDL-Rezeptors (*LDLR*) sowie der HMG-CoA-Reduktase (*HMGCR*) als Vertreter des Cholesterinstoffwechsels waren beim Patienten stark erniedrigt. Die gemessenen Enzyme des Gallensäurestoffwechsels (*CYP7A1* und *CYP7B1*) zeigten sich hingegen transkriptionell nicht verändert (s. Abbildung 24).

## 4.5 Fibroblasten als Modell für den Lipidstoffwechsel

Im Folgenden wurden Experimente mit Fibroblasten der Patienten sowie geeigneter Kontrollen durchgeführt, um zu untersuchen, ob und inwiefern die in Patientenproben beobachteten Effekte auf die *de novo* Lipogenese auch in Fibroblasten nachweisbar sind.

### 4.5.1 Lipidom

Der Großteil der in den Fibroblasten gemessenen Lipide lässt sich den freien Fettsäuren (FFA), Phosphatidylcholinen (PC), Phosphatidylethanolaminen (PE) und Sphingomyelinen (SM) zuordnen. Im Vergleich zur Analyse von Plasma und Muskelgewebe machen Cholesterinester und Triglyceride in Fibroblasten jedoch nur einen minimalen Anteil aus (s. Abbildung 25a).

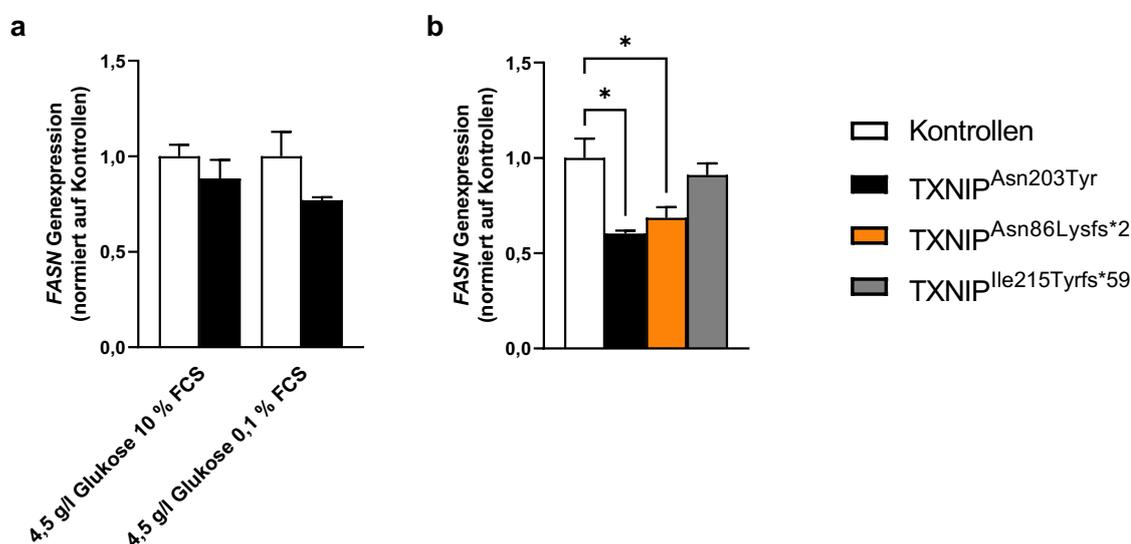


**Abbildung 25: Fibroblasten Lipidom aus Fibroblasten einer Kontrolle sowie der Patienten mit *TXNIP* Varianten.** Kontrolle n=6, Patienten mit *TXNIP* Varianten jeweils n=3. (a) Lipidkonzentrationen in  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Protein; aufgetragen nach Lipidklassen. (b) Lipidkonzentrationen in  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Protein in den Triglyceriden; aufgetragen nach Sättigungsgrad der Fettsäuren. (c) *De novo* Lipogenese – Index (Fettsäuren 16:0 / Fettsäuren 18:2) in Triglyceriden. \* =  $p \leq 0,05$ , 2-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Šidák (a+b) bzw. One-way ANOVA (c).

Im Fettsäureprofil in der Triglycerid-Fraktion zeigten sich zwischen Kontrollen und Patienten mit *TXNIP* Varianten folgende Unterschiede: Die Patientenfibroblasten zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine Tendenz zu weniger SFAs. Dieser Unterschied war jedoch nur bei den Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> Variante signifikant. In der Klasse der MUFAs wiesen die Fibroblasten der Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> bzw. *TXNIP*<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> Variante weniger MUFAs und die Fibroblasten des Patienten mit *TXNIP*<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante mehr MUFAs als die Kontrollfibroblasten auf. Hinsichtlich der Konzentrationen der PUFAs gab es keine Unterschiede zwischen den Fibroblasten der Patienten und der Kontrollen (s. Abbildung 25b). Auch bezüglich des DNL-Index ergaben sich keine Unterschiede. Tendenziell zeigte sich der DNL-Index bei den Patienten jedoch niedriger als bei den Kontrollen (s. Abbildung 25c).

#### 4.5.2 Genexpression

Um zu untersuchen, warum die Lipidomdaten der Fibroblasten der Patienten mit *TXNIP* Varianten im Gegensatz zu Blutplasma, Muskel- und Leberproben keine Hinweise auf eine erhöhte *de novo* Lipogenese zeigten, wurden RNA-Analysen bezüglich des Lipidstoffwechsels der Fibroblasten durchgeführt.

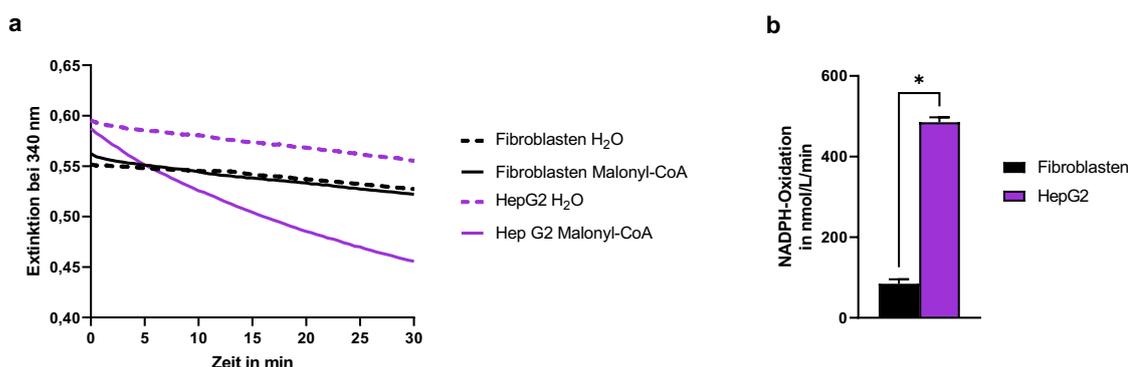


**Abbildung 26: qPCR Analyse der *FASN* Genexpression von Fibroblasten mehrerer Kontrollen sowie der Patienten mit *TXNIP* Varianten.** (a) Fibroblasten zweier Kontrollen und des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante nach 4 h Inkubation bei 4,5 g / L Glukose und 10 % bzw. 0,1 % FCS. Kontrollen jeweils n=3, Patient mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante n=3. (b) Fibroblasten einer Kontrolle und aller Patienten mit *TXNIP* Varianten nach 24 h Inkubation bei 4,5 g / L Glukose und 0,1 % FCS. Kontrolle n=3, Patienten mit *TXNIP* Varianten jeweils n=3. \* =  $p \leq 0,05$ , multiple Student's T-Tests mit Korrektur nach Holm-Šidák (a) bzw. One-way ANOVA (b).

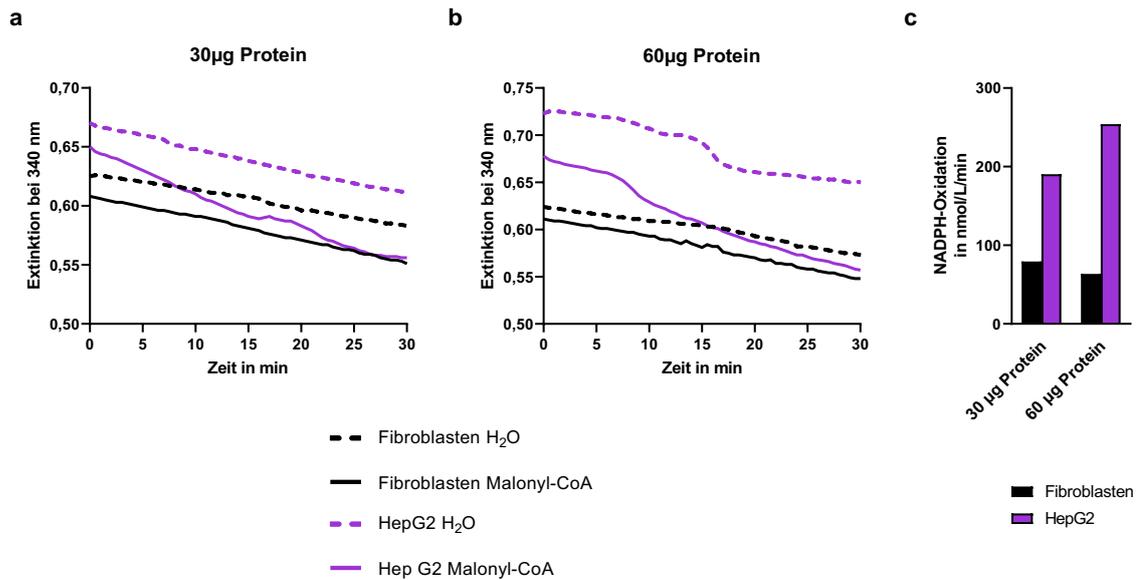
Unter Standard-Kulturbedingungen sowie nach 24 Stunden Inkubation bei 4,5 g / L Glukose und 0,1 % FCS ergab sich zwischen den Fibroblasten des Patienten mit  $TXNIP^{Asn203Tyr}$  Variante und den Fibroblasten zweier Kontrollen kein signifikanter Unterschied bezüglich der Transkription der Fettsäuresynthese (*FASN*) (s. Abbildung 26a). Im Experiment mit Fibroblasten von allen drei Patienten mit *TXNIP* Varianten und Fibroblasten einer Kontrolle, bei dem die Inkubation für 24 Stunden bei 4,5 g / L Glukose und 0,1 % FCS erfolgte, zeigte sich die *FASN* Genexpression bei den Fibroblasten von zwei von drei Patienten mit *TXNIP* Varianten niedriger als bei der Kontrolle (s. Abbildung 26b).

### 4.5.3 Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung

Zusätzlich zu den RNA-Analysen wurde eine Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung durchgeführt, in der die FAS-Enzymaktivität indirekt durch die Abnahme der Extinktion bei 340 nm durch NADPH-Oxidation durch die Fettsäuresynthese gemessen wurde. Hierzu wurden zwei 15 cm Platten Kontrollfibroblasten gepoolt. Als Vergleichs-Zelllinie dienten zwei 10 cm Platten HepG2-Zellen, die ebenfalls gepoolt wurden. In der Auftragung der Extinktion bei 340 nm gegen die Zeit zeigte sich eindeutig, dass die Abnahme der Extinktion nach Zugabe von Malonyl-CoA (Substrat der FAS) bei den HepG2 viel stärker ausfiel als bei den Fibroblasten (s. Abbildung 27a). Die mit dem NADPH-Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 6300 \text{ l} / (\text{mol} \cdot \text{cm})$  (Bergmeyer 1975) berechnete NADPH-Oxidation in  $\text{nmol} / \text{L} / \text{min}$  fällt dementsprechend bei den HepG2 deutlich größer aus als bei den Fibroblasten (s. Abbildung 27b).



**Abbildung 27: Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung von Fibroblasten und HepG2-Zellen.** Fibroblasten = zwei 15 cm Platten gepoolt n=3, HepG2 = zwei 10 cm Platten gepoolt n=3. (a) Bei 340 nm gemessene Extinktion aufgetragen gegen die Zeit in min. (b) Indirekte Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung: Mit dem NADPH-Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 6300 \text{ l} / (\text{mol} \cdot \text{cm})$  (Bergmeyer 1975) berechnete NADPH-Oxidation in  $\text{nmol} / \text{L} / \text{min}$ . \* =  $p \leq 0,05$ , Student's T-Test.



**Abbildung 28: Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung von Fibroblasten und HepG2-Zellen; jeweils 30 (a) bzw. 60 µg (b) Protein eingesetzt.** Fibroblasten und HepG2-Zellen jeweils n=1. (a) und (b) Bei 340 nm gemessene Extinktion aufgetragen gegen die Zeit in min. (c) Indirekte Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung mit Einsatz von jeweils 30 bzw. 60 µg Protein: Mit dem NADPH-Extinktionskoeffizienten mit  $\epsilon = 6300 \text{ L} / (\text{mol} \cdot \text{cm})$  (Bergmeyer 1975) berechnete NADPH-Oxidation in  $\text{nmol} / \text{L} / \text{min}$ .

Unter standardisierten Bedingungen mit Einsatz von je 30 bzw. 60 µg Protein aus Fibroblasten und HepG2 für die Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung konnten die oben gezeigten Ergebnisse validiert werden (s. Abbildung 28a und b). Für beide Proteinmengen zeigte sich die NADPH-Oxidation in den HepG2 größer als in den Fibroblasten (s. Abbildung 28c).

## 5 Diskussion

TXNIP ist ein alpha-Arrestin, welches neben seiner Funktion im Redox-Stoffwechsel auch regulatorische Funktionen im Glukose- und Lipidstoffwechsel übernimmt. Im Mausmodell ist die TXNIP-Defizienz weitreichend erforscht; Charakteristika von TXNIP Knockout-Mäusen sind u.a. eine kombinierten Hyperlipidämie, Hypoglykämien und eine Hepatosteatose (Oka et al. 2006, Oka et al. 2009). Kürzlich wurde erstmals eine TXNIP-Defizienz im Menschen beschrieben (homozygote TXNIP<sup>Gln58His;Gly59\*</sup> Variante), die sich als Mitochondriopathie mit Störungen in der Atmungskette und Laktatazidose manifestiert. Ein Hamburger Patient mit einer homozygoten TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante zeigt mit Hypoglykämien, Hypertriglyceridämie und einer Fettleber ähnliche Symptome wie die TXNIP Knockout-Mäuse. Überdies leidet der Patient an Muskelschwäche und progredienter Kardiomyopathie. In einer Muskel- sowie Leberbiopsie waren vermehrte Glykogen- und Lipideinlagerungen erkennbar, weshalb in Zusammenschau mit der Dyslipidämie und Muskelschwäche der Verdacht auf eine Glykogenspeichererkrankung gestellt wurde. Da jedoch alle gängigen Glykogenose-Formen ausgeschlossen werden konnten, lautet die Hypothese, dass die *TXNIP* Variante mit der Glykogenspeichererkrankungs-ähnlichen Symptomatik in Verbindung steht. Zudem wird vermutet, dass die Hyperlipidämie des Patienten durch eine erhöhte DNL verursacht wird, welche ebenfalls ein Charakteristikum vieler Glykogenspeichererkrankungen darstellt.

Zunächst wurden Patientendaten des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante sowie zwei weiterer Patienten mit Varianten in *TXNIP* (TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. TXNIP<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup>) dargestellt und Gemeinsamkeiten und Unterschiede erarbeitet. In Patientenfibroblasten wurde mittels qPCR und Western Blot die *TXNIP* Gen- und Proteinexpression untersucht, um die Auswirkungen der verschiedenen Varianten auf molekularer Ebene aufzuzeigen. Zudem wurde der Glykogengehalt von Fibroblasten von Patienten mit *TXNIP* Varianten gemessen, um zu ergründen, ob und inwieweit die Fibroblasten ein geeignetes Modell für diese Erkrankung darstellen und Störung des Glykogenstoffwechsels aufweisen. Um die Frage zu beantworten, ob die Hyperlipidämie der Patienten durch eine erhöhte DNL verursacht wird, wurde der Lipidstoffwechsel der Patienten mit *TXNIP* Varianten in Blutplasma, Muskel- und Leberproben sowie Patientenfibroblasten charakterisiert. Hierbei wurden Lipidmessungen mittels FPLC und Lipidzyzer™ sowie Genexpressionsanalysen mittels qPCR durchgeführt. Zuletzt erfolgten Lipidmessungen mittels Lipidzyzer™, Genexpressionsanalysen mittels qPCR sowie eine Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung in Patientenfibroblasten, um zu evaluieren, inwieweit sich die Patientenfibroblasten als Modell für den Lipidstoffwechsel eignen.

## 5.1 Vergleich der TXNIP Varianten und Patientencharakteristika

Der Hamburger Patient mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante trägt eine *Missense*-Variante, die zu einem veränderten TXNIP Protein voller Länge führt. Im Gegensatz dazu tragen die beiden Patienten mit TXNIP Varianten aus Österreich mit den Varianten TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. TXNIP<sup>Ile215Tyrf\*59</sup> *Frameshift*-Varianten, die zu einer fehlerhaften Aminosäuresequenz sowie einem vorzeitigen Abbruch der Translation nach 86 bzw. 272 Aminosäuren führen. Die von Katsu-Jimenez et. al. beschriebene TXNIP<sup>Gln58His;Gly59\*</sup> Variante ist eine *Nonsense*-Variante, die ebenfalls zu einem verkürzten TXNIP Protein (mit 59 Aminosäuren) führt. Betrachtet man die TXNIP Proteinebene, lassen sich die Varianten nach ihrer Lokalisation unterscheiden: Während die TXNIP<sup>Gln58His;Gly59\*</sup> und TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> Variante im N-Arrestin liegt, sind die TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> und TXNIP<sup>Ile215Tyrf\*59</sup> Variante im C-Arrestin lokalisiert. Das für die Interaktion mit TRX nötige Cystein247 im C-Arrestin ist dementsprechend nur bei der TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante erhalten und könnte dazu beitragen, dass sich der Phänotyp des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante von dem der anderen Patienten unterscheidet.

Die gemeinsamen Symptome aller Patienten mit TXNIP Varianten sind Laktatazidose (sechs von sechs Patienten mit TXNIP Varianten) und Muskelschwäche bzw. muskuläre Hypotonie (vier von sechs Patienten mit TXNIP Varianten). In der Muskelbiopsie des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante wurden vermehrte Glykogeneinlagerungen gesehen, die die Muskelschwäche begründen können. Bei einem Geschwisterkind der Familie mit TXNIP<sup>Gln58His;Gly59</sup> Variante wurde eine diagnostische Muskelbiopsie durchgeführt, die bis auf eine fast komplette Dominanz von Typ I Muskelfasern keine Auffälligkeiten zeigte. Von den anderen Patienten mit Varianten in TXNIP sind keine Informationen aus Muskelbiopsien veröffentlicht bzw. vorliegend, aus denen hervorgehen könnte, ob auch diese Patienten vermehrte Glykogeneinlagerungen im Muskel aufweisen, die ihre Muskelschwäche begründen könnten.

Ansonsten sind die Symptome der Patienten mit TXNIP Varianten je nach Variante sehr variabel. Während der Patient mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante erst mit ca. 18 Jahren erkrankte und relativ mild betroffen ist, wurden die anderen Patienten mit TXNIP Varianten schon in der Neonatalperiode auffällig und sind teilweise entwicklungsverzögert. Einige Patienten boten Hypoglykämien, einige nie. Nur der Patient mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante und ein Geschwisterkind der Familie mit TXNIP<sup>Gln58His;Gly59</sup> Variante wiesen in der Leber vermehrte Glykogeneinlagerungen auf. Die Ähnlichkeit zu allen Symptomen der TXNIP Knockout-Mäuse mit Hypoglykämien, Hypertriglyceridämie und Fettleber weist nur der

Patient mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$  Variante auf. All dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die Auswirkungen der Varianten in *TXNIP* je nach Lokalisation und Art der Variante in *TXNIP* unterscheiden könnten.

Vergleicht man die Symptome der Patienten mit *TXNIP* Varianten mit den Charakteristika der klassischen Glykogenosen, fallen folgende Aspekte auf: Die Laktatazidose, die alle Patienten mit *TXNIP* Varianten aufweisen, findet sich auch bei einigen Leber-Glykogenosen. Glykogeneinlagerungen in der Leber, wie sie beim Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$  Variante und einem  $\text{TXNIP}^{\text{Gln58His;Gly59}}$  Patienten gesehen wurden, sind typisch für Leber-Glykogenosen. Auch die für Leber-Glykogenosen charakteristischen Symptome Hypoglykämie und Hepatomegalie betreffen einige, wenn auch nicht alle Patienten mit *TXNIP* Varianten. Von den für Muskel-Glykogenosen typischen Symptomen Muskelschwäche bzw. muskulärer Hypotonie sind über die Hälfte der Patienten mit *TXNIP* Varianten betroffen. Auch die Glykogeneinlagerungen im Muskel des Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$  Variante sind mit einer Muskel-Glykogenose vereinbar. In Zusammenschau dieser Aspekte ist es passend, das durch Varianten in *TXNIP* verursachte metabolische Krankheitsbild thematisch den Glykogenosen mit Leber- und Muskelbeteiligung zuzuordnen, wenngleich die klinischen Manifestationen variabel sind. Diese Variabilität könnte zum einen von der Lokalisation und Art der *TXNIP* Varianten, aber auch von dem Alter der Patienten beeinflusst werden.

## 5.2 *TXNIP* Genexpression

### 5.2.1 RNA-Analysen

Zur Analyse der *TXNIP* Genexpression wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Die genutzten *TXNIP* Primer liegen in Exon fünf und sechs des *TXNIP* Gens und umspannen eine DNA-Sequenz an Position 786 - 952 von insgesamt 1176 Basen des *TXNIP* Gens. Die Primer liegen also im hinteren Teil des Gens, von daher kann mit der Messung nur *TXNIP* RNA erfasst werden, die o.g. Sequenzen enthält, also (fast) vollständiger Länge ist.

In den Fibroblasten des Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn203Tyr}}$  Variante ist eine Genexpression von *TXNIP* nachweisbar; hierbei ist die Genexpression unter Standardbedingungen deutlich geringer als bei den Kontrollen. Es ist bekannt, dass die *TXNIP* Genexpression in Skelettmuskelzellen und Adipozyten durch Glukose gesteigert und durch Insulin gehemmt wird (Parikh et al. 2007). Daher wurden Experimente mit unterschiedlichen Glukose- und FCS-Konzentrationen durchgeführt (FCS enthält Insulin), um die Modulation der *TXNIP* Genexpression in Fibroblasten zu erforschen. Der Effekt ließ sich

in den Fibroblasten abbilden, sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Fibroblasten des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante. Es konnte gezeigt werden, dass mit steigender FCS Konzentration die TXNIP Genexpression sinkt. Weitere Untersuchungen mit Konzentrationsreihen von Insulinzugabe wären nötig, um einen direkten Effekt von Insulin bestätigen zu können.

Mit steigender Glukose-Konzentration steigt die TXNIP Genexpression. Interessanterweise übersteigt hierbei die TXNIP Genexpression der Fibroblasten des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante bei Kultur unter 0,1 % FCS unabhängig vom Glukosegehalt des Kulturmediums die TXNIP Genexpression der Kontrollen um mehr als das Doppelte. Bei Kultur unter 10 % FCS ist die TXNIP Genexpression der Fibroblasten des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante etwas niedriger als die der Kontrollfibroblasten. In der einzelnen Betrachtung der Effekte von Glukose und FCS ergibt sich, dass der Glukose-Effekt beim Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante weniger stark ausgeprägt ist als bei den Kontrollen. Die Stimulierung der TXNIP Expression durch Wegfall von FCS hingegen ist stärker ausgeprägt. Die Fibroblasten des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante reagieren also stärker auf FCS als auf Glukose. Dies kann als Hinweis für eine erhöhte Insulinsensitivität interpretiert werden. Um diese Hypothese experimentell zu validieren, würden sich insbesondere Western Blot Analysen von Phosphorylierungen des Insulin-Signalwegs (z.B. phospho-AKT) bei unterschiedlichen Insulinkonzentrationen anbieten.

Die Fibroblasten der anderen Patienten, die beide *Frameshift*-Varianten in TXNIP tragen, zeigen hingegen unter der Bedingung, unter der die Fibroblasten des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> *Missense*-Variante die höchste Genexpression zeigen, nur eine sehr geringe TXNIP Genexpression. Zwischen den Fibroblasten der Patienten mit TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. TXNIP<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante gibt es hierbei keinen signifikanten Unterschied. Die niedrige TXNIP Genexpression dieser Patientenfibroblasten lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass beide Varianten zu vorzeitigen Stopps führen, welche einen Abbau der RNA mittels mRNA *nonsense* mediated decay hervorrufen können.

### 5.2.2 Protein-Analysen

Die Analyse der TXNIP Proteinexpression wurde mittels Western Blot durchgeführt. Der genutzte TXNIP Antikörper bindet an die Region um Valin337 in TXNIP von insgesamt 391 Aminosäuren in TXNIP. Dementsprechend können mit dem Antikörper nur TXNIP Proteine (fast) vollständiger Länge erfasst werden.

Unter Standard-Kulturbedingungen ist beim Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante im Vergleich zu drei Kontrollen kein TXNIP Protein nachweisbar. Auch unter der Bedingung, unter der der Patient mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante auf Genexpressionsebene die höchsten TXNIP-Level zeigte, lässt sich sowohl beim Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante als auch bei den Patienten mit TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. TXNIP<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante kein TXNIP Protein nachweisen. Der Antikörper bindet jedoch wie oben genannt an die Region um Valin337 in TXNIP, und diese ist nur beim Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante erhalten, da die beiden anderen Varianten verkürzte und veränderte Proteine hervorrufen. Da in den Fibroblasten der Patienten mit TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. TXNIP<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante nur niedrige Genexpressionslevel vorhanden waren, ist es folgerichtig, dass bei diesen Patienten kein Protein detektierbar ist. Diese Ergebnisse passen zu den Beobachtungen von Katsu-Jiménez et. al., die in den Fibroblasten der Patienten mit TXNIP<sup>Gln58His;Gly59\*</sup> Variante, welche als *Nonsense*-Variante ebenfalls zu einem verkürzten TXNIP Protein führt, kein TXNIP Protein detektieren konnten. In den Fibroblasten des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante wäre jedoch TXNIP Protein zu erwarten gewesen, da das TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Protein volle Länge haben sollte.

Da bekannt ist, dass TXNIP Protein proteasomal degradiert wird, bestand die Vermutung, dass bei den Patienten (bzw. zumindest bei dem Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante) zwar TXNIP Protein gebildet, jedoch proteasomal degradiert wird. Deshalb wurden die Fibroblasten mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 behandelt. Nach dieser Behandlung war im Western Blot beim Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante TXNIP Protein nachweisbar. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Protein unter normalen Umständen proteasomal degradiert wird. Bei den anderen beiden Patienten hingegen lässt sich nach der MG-132 Behandlung keine Akkumulation von TXNIP Protein nachweisen. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Patienten mit *Frameshift*-Varianten kein (vollständiges) TXNIP Protein produzieren, während beim Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante, wenn auch wenig, TXNIP Protein entsteht, das jedoch proteasomal degradiert wird.

### 5.3 Glykogenstoffwechsel

Es ist bekannt, dass der Glykogenstoffwechseldefekt von Patienten mit Glykogenosen in Patientenfibroblasten dargestellt werden kann und die Patientenfibroblasten vermehrt Glykogen akkumulieren können (DiMauro et al. 1973). Um den Glykogenstoffwechsel der Patienten mit TXNIP Varianten zu untersuchen, wurden Glykogenmessungen in Patientenfibroblasten durchgeführt. Kongruent zu den vermehrten Glykogeneinlagerungen in Leber- und Muskelbiopsie zeigen die Fibroblasten des

Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten einen höheren Glykogengehalt. Daher scheint sich der Glykogenspeicher-Effekt gut in den Fibroblasten abbilden zu lassen. Die Fibroblasten der anderen beiden Patienten enthalten jedoch nach gleicher Inkubationszeit nur etwa die Hälfte des Glykogengehaltes der Fibroblasten des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante. Die Fibroblasten der Patienten mit TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. TXNIP<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante zeigen also nicht die gleiche Glykogenstoffwechselstörung, wie die Fibroblasten des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante. Denkbar ist, dass dieser Effekt auf bisher unbekanntem Mechanismen beruht, der durch eine Restfunktion des TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Proteins hervorgerufen wird. Dies kann ein Hinweis dafür sein, dass sich der Phänotyp der Patienten mit TXNIP Varianten je nach Art der Variante unterscheidet oder dass Fibroblasten nicht das geeignete Modell zur Nachbildung der Glukosestoffwechsel-Störung darstellen. Zur weiteren Beurteilung fehlen unter anderem noch Erkenntnisse darüber, inwieweit die veränderten TXNIP Proteine der unterschiedlichen Varianten funktionell aktiv sind und welche Auswirkungen dies auf den Glykogenstoffwechsel und insbesondere auf die Glukoseaufnahme über die Glukosetransporter hat.

Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Ritonavir den Glykogengehalt in allen Fibroblasten um ca. 70-80 % reduziert. Hierdurch wird die Hypothese, dass Ritonavir den Glykogengehalt in Fibroblasten reduzieren kann, bestätigt. Dies kann als Hinweis auf eine Wirksamkeit von Ritonavir als Medikament zur Reduktion der Glykogenakkumulation gesehen werden. In diesem Zusammenhang wurden jedoch nur Fibroblasten *in vitro* untersucht, weshalb für eine weitere Beurteilung Untersuchungen *in vivo* angeschlossen werden müssten.

## 5.4 Lipidstoffwechsel

Da in Mausexperimenten bereits gezeigt werden konnte, dass eine TXNIP-Defizienz über eine erhöhte Rate an *de novo* Lipogenese sowie eine erhöhte Aktivität der FAS in der Leber zu Hypertriglyceridämien führt (Donnelly et al. 2004), wurde der Lipidstoffwechsel der Patienten mit TXNIP Varianten auf Hinweise für eine erhöhte DNL untersucht.

### 5.4.1 Blutplasma

In der FPLC zeigten sich im Blutplasma des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante analog zu den vorliegenden Laborergebnissen erhöhte Werte an Triglyceriden und Cholesterin. Hierbei lagen auch erhöhte Glycerolspiegel vor, was als Marker für eine erhöhte Lipolyse

verstanden werden kann. Dies könnte an den niedrigen Insulinspiegeln des Patienten liegen. In der Betrachtung des Cholesterins fällt auf, dass das Cholesterin vor allem als LDL-Cholesterin vorliegt. Da LDL aus VLDL entstehen, welche auch Lipide aus der DNL enthalten, kann dies zusammen mit den erhöhten Triglycerid-Werten als Hinweis auf eine erhöhte DNL gedeutet werden.

Analog zu den Ergebnissen der FPLC zeigen sich im Plasma Lipidom der Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> bzw. TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> Variante im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöhte TAG und CE. Da die SFA und MFAs, die bei der DNL entstehen, in den TAG erhöht sind, wird die Erhöhung der TAGs am ehesten durch eine erhöhte DNL verursacht. Die PUFAs, die hauptsächlich über die Nahrung aufgenommen werden, sind passend dazu nicht signifikant erhöht. Im Lipidom des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante sind zudem die FFA erhöht, was sich durch eine erhöhte Lipolyse klären ließe. Passend hierzu waren in der FPLC die Glycerolspiegel erhöht.

#### 5.4.2 Muskel

Im Lipidom der Muskelbiopsie des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante wurden die TAG fast viermal so hoch gemessen, wie bei den gesunden Kontrollen. Die in den TAG enthaltenen Fettsäuren sind hauptsächlich SFA und MUFA, daher ergibt sich auch hier ein Hinweis auf eine erhöhte DNL. Die Betrachtung der Genexpression in der Muskelbiopsie bestärkt die Hypothese, dass im Muskel des Patienten mit TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup> Variante eine erhöhte DNL stattfindet: Die Expression von *FASN*, welches für das Schlüsselenzym der DNL, FAS, kodiert, ist ca. 20-fach erhöht. Interessanterweise sind die lipogenen Transkriptionsfaktoren *ChREBP-a* und *-b*, *SREBP1c* und *MLXIP* nicht passen dazu erhöht, weshalb von einer posttranskriptionellen Regulation oder einem bislang unbekanntem Transkriptionsfaktor ausgegangen werden muss. Ein möglicher Mechanismus könnte die Stabilisierung der *FASN* mRNA durch Glukose sein, welcher bereits in HepG2 Zellen gezeigt werden konnte (Semenkovich et al. 1993). Bei der DNL wird Palmitinsäure (16:0) produziert, welche normalerweise über die Desaturase SCD zu Palmitoleinsäure detoxifiziert wird. Auf Genexpressionsebene findet sich jedoch ein transkriptioneller Verlust von *SCD*. Es ist möglich, dass die DNL im Muskel anders als in der Leber oder im Fettgewebe reguliert ist; es ist denkbar, dass der transkriptionelle Verlust von *ChREBP-a* und *SREBP1c* das Fehlen von *SCD1* bedingt, oder dass die Proteinexpression wesentlich von der Genexpression abweicht. Interessanterweise zeigt sich ein kompletter transkriptioneller Verlust der Hexokinase 2, welche den Schlüsselschritt zur Glykogensynthese im Muskel katalysiert. Da die elektronenmikroskopischen Aufnahmen jedoch eine vermehrte Glykogeneinlagerung im

Muskel zeigen, wäre es möglich, dass es sich um einen bisher unverstandenen negativen Feedback-loop handelt. Überdies ist *FGF21*, welches ein Stress-induziertes Myokin codiert, im Muskel des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante stark erhöht. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der ersten drei Patienten mit Varianten in *TXNIP* von Katsu-Jiménez et al. muss von einer mitochondrialen Stressantwort im Muskel des Patienten ausgegangen werden (Katsu-Jimenez et al., 2019).

### 5.4.3 Leber

Auch in der Leberbiopsie des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante zeigen sich auf Genexpressionsebene starke Hinweise auf eine erhöhte DNL: Die lipogenen Transkriptionsfaktoren *ChREBP-b* und *SREBP-1* sind erhöht (ca. 2,5-fach), ebenso die Fettsäuresynthese *FASN* (ca. 5-fach). Dies ist eine ungewöhnlich starke Regulation, insbesondere im Vergleich zu den Adipositas-Patienten, welche eine bekannte erhöhte DNL aufweisen. Die Erhöhung von *ChREBP-b* lässt sich hierbei durch die erhöhten Glukosekonzentrationen im Muskel des Patienten erklären. Die Erhöhung von *SREBP-1* ist jedoch bemerkenswert, da *SREBP-1* hauptsächlich über Insulin aktiviert wird (Foretz et al. 1999), und der Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante niedrige Insulinspiegel aufweist. Allerdings gibt es Hinweise dafür, dass auch Glukose *SREBP-1* aktivieren kann (Cheng et al. 2015). Abgesehen davon passt die Erhöhung von *SREBP-1* und *FASN* zu den Ergebnissen der *TXNIP* Knockout-Mäuse, bei denen die Aktivierung von *SREBP-1* jedoch auf die Hyperinsulinämie zurückgeführt wird (Hui et al. 2004, Sheth et al. 2005). Die Desaturasen *SCD* und *FADS2* sind transkriptionell erhöht, was sich durch die Notwendigkeit erklären lässt, die durch die erhöhte DNL vermehrt anfallenden Palmitinsäure (16:0) zu Palmitoleinsäure (16:1) zu detoxifizieren. In der Betrachtung des Cholesterinstoffwechsels, der sich hauptsächlich in der Leber abspielt, zeigt sich hingegen, dass der LDL-Rezeptor, sowie das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese (HMG-CoA-Reduktase) auf Genexpressionsebene im Patienten stark erniedrigt ist. Dies sind Surrogatmarker eines hohen intrazellulären Cholesterinspiegels. Diese Ergebnisse sind kongruent zu den im Blutplasma erhöhten Cholesterinwerten. Enzyme des Gallensäurestoffwechsels (*CYP7A1*, *CYP7B1*) sind hingegen nicht verändert. Sowohl die veränderten Genexpressionslevel der DNL als auch des Cholesterinstoffwechsel legen eine Dysregulation des Lipidstoffwechsels nahe.

In Zusammenschau der Ergebnisse, die mechanistisch sehr den Ergebnissen der Mausexperimente ähneln, kann man davon ausgehen, dass zumindest ein Teil der

Hyperlipidämie des Patienten auf eine erhöhte DNL in Leber und Muskel zurückzuführen ist.

#### 5.4.4 Fibroblasten als Modell für den Lipidstoffwechsel

Im Lipidom aus Fibroblasten zeigt sich zunächst, dass die Lipidkonzentrationen in Fibroblasten im Vergleich zu Muskel und Plasma relativ gering sind. Zudem machen TAG nur einen geringen Anteil der gemessenen Lipide aus. Der Großteil der in Fibroblasten gemessenen Lipide sind Phospholipide, die in Membranen vorkommen. Im Unterschied zu den Lipiddaten aus Muskel und Plasma, bei denen vermehrte DNL gezeigt werden konnten, gibt es keine signifikanten Unterschiede bei den Konzentrationen an CE und TAGs zwischen den Patienten mit Varianten in *TXNIP* und der Kontrolle. Es gibt zwar vereinzelt Unterschiede bei den SFA und MUFA in den TAG, beim DNL-Index zeigen sich jedoch niedrige Werte in den Patientenfibroblasten. Daraus kann geschlossen werden, dass in den Fibroblasten der Patienten keine erhöhte DNL stattfindet.

In der Genexpression zeigt sich, dass alle Fibroblasten der Patienten mit *TXNIP* Varianten weniger *FASN* Genexpression als die Kontrollen aufweisen. Dies steht in Kontrast zu den Ergebnissen aus der Muskel- und Leberbiopsie des Patienten mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante, passt aber zu den Lipidom-Daten aus den Fibroblasten. Daher lässt sich schließen, dass die Fibroblasten bei dieser neuartigen *TXNIP*-assoziierten Glukose- und Lipidstoffwechselstörung kein geeigneter Modellorganismus zur Analyse der DNL sind.

Diese Beobachtungen werden durch die Ergebnisse der FAS-Aktivitätsmessung gestützt, bei der die FAS-Aktivität bei gleicher Proteinmenge in HepG2 Zellen viel höher ist, als in Fibroblasten. Dies könnte daran liegen, dass Fibroblasten gemessen an ihrer Proteinmenge relativ wenig FAS exprimieren oder dass die FAS in Fibroblasten weitgehend inaktiv ist. In jedem Fall ist davon auszugehen, dass Fibroblasten im Fall der Patienten mit *TXNIP* Varianten keinen geeigneten Modellorganismus darstellen, um die Akkumulation von Speicherfett durch DNL zu untersuchen.

## 5.5 Limitationen und weiterführende Forschung

Die größte Limitation dieser Arbeit besteht in der kleinen Patientenkohorte mit  $n = 3$ , in der zudem nicht von allen Patienten jedes Patientenmaterial vorhanden ist. Dies liegt vor allem daran, dass einige Proben nur mit erheblichem Aufwand und nur in kleiner Menge zu gewinnen sind (z.B. Muskel- und Leberbiopsie). So fehlen zur Vervollständigung der Experimente Muskel- und Leberbiopsien der Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Asn86Lysfs}^*2}$  bzw.  $\text{TXNIP}^{\text{Ile215Tyrfs}^*59}$  Variante sowie Blutplasma des Patienten mit  $\text{TXNIP}^{\text{Ile215Tyrfs}^*59}$  Variante. Sowohl klinisch als auch experimentell zeigen sich teilweise große Unterschiede zwischen den Patienten mit *TXNIP* Varianten, weshalb für valide Ergebnisse eine größere Kohorte nötig wäre. Deshalb können die Ergebnisse dieser Arbeit nur als (wenn auch deutliche) Hinweise gewertet werden.

Die Patientenfibroblasten, welche von allen drei Patienten verfügbar waren, eigneten sich gut zur Charakterisierung der Auswirkungen der *TXNIP* Varianten auf RNA- und Proteinebene. In der Glykogenmessung zeigten sich jedoch zwischen den Patientenfibroblasten divergente Werte. Die Gründe hierfür konnten nicht geklärt werden, hierzu müssten sich weitere Experimente anschließen. Der Effekt von Ritonavir auf den Glykogengehalt der Fibroblasten war gut zu erkennen, der Nutzen für die Patienten sollte jedoch weitergehend untersucht werden. Für die Modellierung der in den Patientenproben gesehenen erhöhten DNL zeigten sich die Fibroblasten ungeeignet. Um diese Effekte abzubilden, müsste entweder eine andere primäre Zelllinie (z.B. primäre Myoblasten) oder ein transgenes murines Konzept etabliert werden. Generell könnte zur weiteren Forschung ein Mausmodell mit den *TXNIP* Varianten der Patienten von Vorteil sein, um die Effekte der *TXNIP*-Defizienz tiefgreifender als im Menschen möglich zu erforschen. Auf diesem Wege könnte auch der Pathomechanismus der *TXNIP*-assoziierten Glukose- und Lipidstoffwechselstörung genauer beleuchtet werden, was in dieser Arbeit gänzlich fehlt. So muss bearbeitet werden, inwieweit der Glukosetransport in die Zellen durch die *TXNIP*-Defizienz beeinflusst wird und auf welchem Wege es zur Glykogenakkumulation kommt. Ritonavir sollte als mögliche Therapieoption im Mausmodell evaluiert werden, um die systemischen Effekte der Reduzierung der Glykogenakkumulation auf den Krankheitsverlauf und den Lipidstoffwechsel zu untersuchen.

## 5.6 Folgerung und Ausblick

Bisher ist die TXNIP-Defizienz im Menschen nur als Mitochondriopathie mit Störungen in der Atmungskette und Laktatazidose bekannt (Katsu-Jimenez et al. 2019). In dieser Arbeit konnte erstmals ein Patient mit TXNIP-Defizienz und Phänotyp einer Glykogenose-artigen Erkrankungen mit Leber- und Muskelbeteiligung beschrieben werden. Es wurden Hinweise darauf gefunden, dass im Rahmen einer Glykogenakkumulation eine erhöhte *de novo* Lipogenese in Muskel und Leber stattfindet, welche zur Hyperlipidämie des Patienten beitragen kann. Es konnten zwei weitere Patienten mit Varianten in *TXNIP* identifiziert werden, welche Symptome ähnlich einer Muskel-Glykogenose zeigen. Es ergaben sich Anzeichen dafür, dass die Art und Lokalisation der Mutationen in *TXNIP* den Phänotyp beeinflussen können. Aufgrund von Materialmangel konnte die Erkrankung dieser Patienten jedoch nur unvollständig charakterisiert werden. Da bis jetzt nur wenige Patienten mit TXNIP-Defizienz untersucht wurden (insgesamt sechs) und sich diese Patienten mit inhomogenen Erkrankungsbildern präsentieren, sollten weitere Patienten mit TXNIP-Defizienz rekrutiert werden und die bisher bekannten Patienten weiterführend untersucht werden.

Aus den Forschungen dieser Arbeit haben sich zur Charakterisierung der TXNIP-Defizienz folgende Aspekte als relevant und sinnvoll erwiesen: Klinische und laborchemische Untersuchung der Patienten, Sequenzierung der *TXNIP* Varianten, Bestätigung der TXNIP-Defizienz in Patientenfibroblasten, Analyse des Glykogenstoffwechsels in Patientenfibroblasten sowie Muskel- und Leberbiopsie mit Histologie, Lipidom und Genexpressions-Analyse. Lipidom-Analysen hinsichtlich TXNIP-assoziiertes Dysregulation des Lipidstoffwechsels sollten eher nicht in Patientenfibroblasten durchgeführt werden. Aus der Arbeit von Katsu-Jimenez et al. (2019) ergibt sich die Notwendigkeit funktioneller Analysen in Mitochondrien TXNIP-defizienter Patienten sowie der laborchemischen Bestimmung des Laktat- und Methioninspiegels im Serum. Außerdem sollten Studien zur Ergründung des Pathomechanismus TXNIP-Defizienz-assoziiertes Erkrankungen angeschlossen werden, um später passende Therapieoptionen evaluieren zu können. So könnte die Lebensqualität der Patienten mit TXNIP-Defizienz verbessert werden.

Überdies ist die Erforschung TXNIP-assoziiertes Erkrankungen auch für die breite Bevölkerung relevant, da TXNIP ein Schlüsselregulator des Glukose- und Lipidstoffwechsels ist und eine erhöhte *TXNIP* Genexpression mit der Entstehung von Diabetes mellitus und dem metabolischen Syndrom in Verbindung steht (Minn et al. 2005, Chen et al. 2008b, Ferreira et al. 2012). Es konnte auch gezeigt werden, dass die

medikamentöse Inhibition von TXNIP im Mausmodell vor Diabetes mellitus schützt (Thielen et al. 2020). TXNIP scheint also ein attraktives Ziel zur medikamentösen Therapie von Diabetes mellitus zu sein. Während TXNIP im Mausmodell schon gut charakterisiert ist, fehlen reproduzierbare Ergebnisse aus Studien an Menschen. Es ist daher essenziell, die Funktionen von TXNIP und die Auswirkungen von Über- und Unter-Expression von TXNIP im menschlichen Körper zu erforschen. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass sich eine TXNIP-Defizienz im Menschen neben der bereits beschriebenen Mitochondriopathie mit Störungen in der Atmungskette und Laktatazidose auch als Glykogenose-artige Erkrankung mit Leber- und Muskelbeteiligung mit Hypoglykämien und Muskelschwäche manifestieren kann. Auch wenn bedacht werden muss, dass von den Auswirkungen eines genetisch bedingten Mangels an TXNIP nicht direkt auf mögliche Effekte und Nebeneffekte einer medikamentösen Inhibition von TXNIP geschlossen werden kann, stellt die Forschung an Proben TXNIP-defizienter Patienten wertvolle Informationen zur Verfügung. Aus dieser Arbeit ergibt sich, dass ein möglicher gewünschter Effekt einer TXNIP Inhibition zur Therapie von Diabetes mellitus im Menschen eine Senkung des Blutzuckerspiegels sein kann. Mögliche Nebeneffekte könnten eine Akkumulation von Glykogen in Muskel und Leber sowie eine verstärkte *de novo* Lipogenese mit konsekutiver Hypertriglyceridämie beinhalten.

## 6 Zusammenfassung (deutsch)

Thioredoxin interacting protein (TXNIP) ist ein Protein des Redoxstoffwechsels, welches überdies regulatorische Funktionen im Glukose- und Lipidstoffwechsel innehat. Biallelische genetische *Loss of Function* Varianten von TXNIP im Menschen führen zu einer mitochondrialen Stoffwechselstörung mit Ausprägung einer Laktatazidose. Polymorphismen in TXNIP, die mit einem *Gain of Function* einhergehen, sind mit der Entstehung von Diabetes mellitus assoziiert. Präklinische Modelle zeigen, dass sowohl die genetische Ablation als auch die medikamentöse Inhibition von TXNIP vor der Entwicklung eines Diabetes mellitus schützen kann. TXNIP-defiziente Mäuse entwickeln hierbei eine kombinierte Hyperlipidämie, Hypoglykämien und eine Hepatosteatose.

Diese Dissertation beschreibt drei Patienten mit TXNIP-Defizienz bei biallelischen *TXNIP* Varianten, welche ein metabolisches Krankheitsbild mit Glukose- und Lipidstoffwechselstörung aufweisen. Bei den beschriebenen Varianten handelt es sich um eine *Missense*-Variante (TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup>) sowie zwei *Frameshift*-Varianten (TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> bzw. TXNIP<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup>). Interessanterweise traten bei den Patienten mit *Frameshift*-Varianten bereits neonatal Symptome auf, während der Patient mit *Missense*-Variante erst als Erwachsener Beschwerden entwickelte. Als gemeinsame klinische Charakteristika konnten hierbei Muskelschwäche und Laktatazidose identifiziert werden, während die Ausprägung von Hypoglykämien und Hyperlipidämie variierte. Die früh betroffenen Patienten zeigten zudem eine Entwicklungsverzögerung.

In Leber- und Muskelbiopsien eines Patienten ließen sich vermehrte Glykogen- und Lipid-Einlagerungen nachweisen. Genexpressionsanalysen sowie Lipidanalysen zeigten eine erhöhte *de novo* Lipogenese in beiden Organsystemen, welche zu pathologischen Lipid-Ablagerungen und Lipidstoffwechselstörungen beitragen kann. Lipidanalysen aus Patientenfibroblasten bildeten diese Ergebnisse nicht ab. Die Glykogenbestimmung ergab zudem nur in der Fibroblasten-Kultur eines Patienten erhöhte Glykogenwerte.

In allen Patientenfibroblasten konnte mittels Western Blot eine TXNIP-Defizienz bestätigt werden. In den Patientenfibroblasten mit TXNIP *Frameshift*-Varianten war die Genexpression schon auf mRNA Ebene reduziert, während in Patientenfibroblasten mit TXNIP *Missense*-Variante Protein gebildet, jedoch proteasomal degradiert wurde. Diese unterschiedlichen Pathomechanismen könnten zur Entstehung der unterschiedlichen Phänotypen zwischen TXNIP *Missense*- und *Frameshift*-Varianten beitragen.

Die gewonnenen Erkenntnisse geben wertvolle Hinweise auf die Funktion von TXNIP im Menschen und ein durch biallelische *TXNIP* Varianten verursachtes metabolisches Krankheitsbild mit Beeinträchtigung des Glukose- und Lipidstoffwechsels.

## 7 Zusammenfassung (englisch)

Thioredoxin interacting protein (TXNIP) is a protein of redox metabolism, that also holds regulatory functions in glucose and lipid metabolism. Biallelic genetic loss-of-function variants of TXNIP in humans lead to a mitochondrial metabolic disorder with development of lactic acidosis. *Gain of function* polymorphisms in TXNIP are associated with the development of diabetes mellitus. Preclinical models show that both genetic ablation and pharmaceutical inhibition of TXNIP can protect against diabetes mellitus. TXNIP-deficient mice develop combined hyperlipidaemia, hypoglycaemia and hepatosteatosis.

This dissertation describes three patients with TXNIP deficiency caused by biallelic *TXNIP* variants, which show a metabolic clinical picture with glucose and lipid metabolism disorders. The variants described are a *missense* variant (TXNIP<sup>Asn203Tyr</sup>) and two *frameshift* variants (TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> and TXNIP<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup>). Interestingly, the patients with *frameshift* variants developed symptoms neonatally, whereas the patients carrying a *missense* variant only developed symptoms in adulthood. Muscle weakness and lactic acidosis were identified as common clinical characteristics, while the occurrence of hypoglycaemia and hyperlipidaemia varied. The patients affected at an early age also displayed developmental delay.

Increased glycogen and lipid deposits were detected in liver and muscle biopsies from one patient. Gene expression analyses and lipid analyses showed increased *de novo* lipogenesis in both organ systems, which can contribute to pathological lipid deposits and lipid metabolism disorders. These results could not be reproduced in lipid analyses from patient fibroblasts. Moreover, glycogen determination revealed elevated glycogen levels in only one of three patient fibroblast cultures.

TXNIP deficiency was confirmed in all patient fibroblasts by Western blotting. In patient fibroblasts carrying TXNIP *frameshift* variants, gene expression was already reduced at the mRNA level, whereas in patient fibroblasts carrying TXNIP *missense* variant, protein was produced but proteasomally degraded. These different pathomechanisms could contribute to the development of different phenotypes between TXNIP *missense* and *frameshift* variants.

The findings of this dissertation provide valuable insights into the function of TXNIP in humans and a metabolic disease with impaired glucose and lipid metabolism caused by biallelic TXNIP variants.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Zusätzlich zu den unten genannten Abkürzungen wurden SI-Einheiten sowie chemische Formeln genutzt.

|                          |  |
|--------------------------|--|
| 3T3-L1                   | Zell-Linie muriner Fibroblasten, die zu Adipozyten differenziert werden können                             |
| ABCA1                    | ATP-Binding Cassette Transporter A1  |
| ABCG1                    | ATP-Binding Cassette Transporter G1  |
| ABCG5/G8                 | ATP-Binding Cassette Transporter G5/G8   |
| ACACA                    | Acetyl-CoA Carboxylase A / 1   |
| ACC                      | Acetyl-CoA-Carboxylase   |
| Acetyl-CoA               | Acetyl-Coenzym A   |
| ACLY                     | ATP-Citrat-Lyase   |
| ADP                      | Adenosindiphosphat   |
| AKT                      | Proteinkinase K  |
| AMP                      | Adenosinmonophosphat   |
| AMPK                     | AMP-abhängige Proteinkinase  |
| AS                       | Aminosäuren  |
| ASK-1                    | Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1   |
| Asn                      | Asparagin  |
| ATP                      | Adenosintriphosphat  |
| BCA                      | Bicinchoninsäure   |
| BSA                      | Bovines Serumalbumin, Rinderalbumin  |
| CCL2                     | CC-Chemokin-Ligand-2   |
| CD36                     | Cluster of differentiation 36  |
| cDNA                     | Complementary DNA = komplementäre DNA  |
| CE                       | Cholesterinester   |
| CER                      | Ceramide   |
| CETP                     | Cholesterinester-Transportprotein  |
| ChREBP / MondoB / MLXIPL | Carbohydrate responsive element binding protein / MondoB / Max-like protein x – interacting protein – like |
| CYP7A1                   | Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1  |
| CYP7B1                   | Cytochrome P450 family 7 subfamily B member 1  |
| DAG                      | Diacylglycerole = Diglyceride  |

---

|            |  |
|------------|--|
| DCER       | Dihydroceramide  |
| DDIT3      | DNA damage inducible transcript 3                            |
| DMEM       | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                           |
| DMSO       | Dimethylsulfoxid   |
| DNase      | Desoxyribonuklease   |
| DNL        | De novo Lipogenese   |
| dNTP       | Desoxy-Nukleosidtriphosphat                                  |
| DTT        | Dithiothreitol   |
| dup        | Duplikation  |
| EDTA       | Ethylendiamintetraacetat                                     |
| FADS2      | Fatty acid desaturase 2 = Fettsäure-Desaturase 2             |
| FAS / FASN | Fettsäuresynthase  |
| FATP       | Fettsäure-Transportprotein                                   |
| FCS        | Fetal Calf Serum = Fetales Kälberserum                       |
| FFA        | Free Fatty Acids = Freie Fettsäuren                          |
| FGF21      | Fibroblasten-Wachstumsfaktor 21                              |
| FPLC       | Fast protein liquid chromatography                           |
| fs         | Frameshift = Verschiebung des Leserasters                    |
| G          | Guanin   |
| GAPDH      | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                     |
| GCK        | Glukokinase  |
| Gln        | Glutamin   |
| GLUT       | Glukosetransporter   |
| Gly        | Glycin   |
| Hcb-19     | Mauslinie mit kombinierter Hyperlipidämie, Mutation in TXNIP |
| HCER       | Hexosylceramide  |
| HDL        | High Density Lipoprotein                                     |
| HeLa       | Zell-Linie aus einem humanen Zervixkarzinom                  |
| HepG2      | Zell-Linie aus einem humanen hepatozellulärem Karzinom       |
| His        | Histidin   |
| HK1        | Hexokinase 1   |
| HK2        | Hexokinase 2   |

---

|                |   |
|----------------|---|
| HMGCR          | 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase                |
| HNF4A          | Hepatocyte nuclear factor 4 alpha                             |
| HRP            | Horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase                |
| IDL            | Intermediate Density Lipoprotein                              |
| IGF-1          | Insulin-like Growth Factor                                    |
| Ile            | Isoleucin   |
| ins            | Insertion   |
| INSR           | Insulinrezeptor   |
| LCAT           | Lecithin-Cholesterin Acyltransferase                          |
| LCER           | Lactosylceramide  |
| LDL            | Low Density Lipoprotein                                       |
| LDLR           | Low Density Lipoprotein Rezeptor                              |
| Lp (a)         | Lipoprotein a   |
| LPC            | Lysophosphatidylcholine                                       |
| LPE            | Lysophosphatidylethanolamine                                  |
| LPL            | Lipoproteinlipase   |
| Lys            | Lysin   |
| MAG            | Monoacylglycerid  |
| Malonyl-CoA    | Malonyl-Coenzym-A   |
| Mlx            | Max-like protein x  |
| MondoA / MLXIP | MondoA / Max-like protein x – interacting protein             |
| MOPS           | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure                             |
| MRM            | Multiple reaction monitoring                                  |
| mRNA           | Messenger RNA   |
| MUFA           | Monounsaturated fatty acids = einfach ungesättigte Fettsäuren |
| NADPH          | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat                          |
| NLRP3          | NLR family pyrin domain containing 3                          |
| NPC1L1         | Niemann-Pick C1-like 1 Protein                                |
| NR1H3          | Leber-X-Rezeptor alpha  |
| PBS            | Phosphate-buffered saline = Phosphatgepufferte Salzlösung     |
| PC             | Phosphatidylcholine   |
| PCR            | Polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion         |

---

|                |  |
|----------------|--|
| PE             | Phosphatidylethanolamine   |
| PID1           | Phosphotyrosine Interaction Domain Containing 1                                    |
| PPxY-Motiv     | Aminosäuresequenz mit P = Prolin, x = eine Aminosäure, Y = Tyrosin                 |
| PUFA           | Polyunsaturated fatty acids = mehrfach ungesättigte Fettsäuren                     |
| PVDF           | Polyvinylidenfluorid   |
| qPCR           | Quantitative polymerase chain reaction<br>= Quantitative Polymerase-Kettenreaktion |
| rcf            | Relative Zentrifugalkraft  |
| RNA            | Ribonukleinsäure   |
| RNAse          | Ribonuklease   |
| ROS            | Reaktive Sauerstoff-Spezies  |
| RT             | Raumtemperatur   |
| SCD            | Stearoyl-CoA-Desaturase  |
| SDS            | Sodium Lauryl Sulfate  |
| SFA            | Saturated fatty acids = gesättigte Fettsäuren                                      |
| SLC2A1 / GLUT1 | Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 1 = GLUT2        |
| SLC2A4 / GLUT4 | Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 4 = GLUT4        |
| SM             | Sphingomyeline   |
| SR-B1          | Scavenger-Rezeptor B1  |
| SREBP          | Sterol Regulatory Element-Binding Protein  |
| SREBP-1        | Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1  |
| SREBP-1c       | Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c                                       |
| SREBP-2        | Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2  |
| T              | Thymin   |
| TAF1           | TATA-Box Binding Protein Associated Factor 1                                       |
| TAG            | Triacylglycerole = Triglyceride  |
| TBP-2          | Thioredoxin Binding Protein-2  |
| TBS-T          | Tris-buffered saline with Tween20  |
| Tris           | Tris(hydroxymethyl)aminomethan   |
| TRL            | Triglyceridreiche Lipoproteine   |
| TXN            | Thioredoxin  |

|        |  |
|--------|--|
| TXNIP  | Thioredoxin interacting protein        |
| Tyr    | Tyrosin                                |
| UDP    | Uridindiphosphat                       |
| UKE    | Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf |
| VDUP-1 | Vitamin D upregulated protein-1        |
| VLDL   | Very Low Density Lipoprotein           |

## 9 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Struktur und Aufbau von Glykogen .....  | 3  |
| Abbildung 2: Übersicht über den Glykogenstoffwechsel samt einiger Glykogenosen sowie ihrer charakteristischen Enzymdefekte .....   | 6  |
| Abbildung 3: Molekularer Mechanismus der <i>de novo</i> Lipogenese .....   | 15 |
| Abbildung 4: Regulation der DNL in Fettgewebe und Leber.....   | 17 |
| Abbildung 5: TXNIP Protein: Struktur und Domänen.....  | 19 |
| Abbildung 6: Mechanismus der Interaktion zwischen TXNIP und TRX .....  | 19 |
| Abbildung 7: Interaktion zwischen TXNIP und GLUT4 .....  | 22 |
| Abbildung 8: Proteinstruktur von TXNIP mit den bisher bekannten Varianten und den Varianten der Patienten mit TXNIP <sup>Asn203Tyr</sup> , TXNIP <sup>Asn86Lysfs*2</sup> und TXNIP <sup>Ile215Tyrfs*59</sup> Variante.....   | 47 |
| Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Muskelbiopsie des Patienten mit TXNIP <sup>Asn203Tyr</sup> Variante .....   | 49 |
| Abbildung 10: Leberbiopsie des Patienten mit TXNIP <sup>Asn203Tyr</sup> Variante in HE-Färbung und in elektronenmikroskopischer Aufnahme.....  | 49 |
| Abbildung 11: Stammbaum des Patienten mit TXNIP <sup>Asn203Tyr</sup> Variante.....   | 50 |
| Abbildung 12: qPCR Analyse der <i>TXNIP</i> Genexpression von Fibroblasten zweier Kontrollen und des Patienten mit TXNIP <sup>Asn203Tyr</sup> Variante unter Standard-Kulturbedingungen (4,5 g / L Glukose 10 % FCS).....  | 52 |
| Abbildung 13: qPCR Analyse der <i>TXNIP</i> Genexpression von Fibroblasten zweier Kontrollen und des Patienten mit TXNIP <sup>Asn203Tyr</sup> Variante unter verschiedenen Kulturbedingungen .....   | 53 |
| Abbildung 14: qPCR Analyse der <i>TXNIP</i> Genexpression von Fibroblasten zweier Kontrollen und des Patienten mit TXNIP <sup>Asn203Tyr</sup> Variante unter verschiedenen Kulturbedingungen: Einfluss von Glukose und FCS auf die <i>TXNIP</i> Genexpression .... | 54 |
| Abbildung 15: qPCR Analyse der <i>TXNIP</i> Genexpression von Fibroblasten einer Kontrolle sowie aller Patienten mit <i>TXNIP</i> Varianten nach 24h Inkubation bei 4,5 g / L Glukose 0,1 % FCS .....  | 55 |

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 16: Western Blot Analyse von Fibroblasten der Kontrollen sowie der Patienten mit <i>TXNIP</i> Varianten unter Verwendung von Antikörpern gegen <i>TXNIP</i> und <i>GAPDH</i> .....  | 56 |
| Abbildung 17: Western Blot Analyse von Fibroblasten der Kontrollen sowie der Patienten mit <i>TXNIP</i> Varianten nach 8 h Inkubation mit 20 µM MG-132 bzw. DMSO als Kontrolle unter Standard-Kulturbedingungen (4,5 g / L Glukose 10 % FCS)..... | 57 |
| Abbildung 18: Messung des Glykogengehalts in Fibroblasten einer Kontrolle sowie der Patienten mit <i>TXNIP</i> Varianten unter Standard-Kulturbedingungen (4,5 g / L Glukose 10 % FCS).....   | 58 |
| Abbildung 19: Messung des Glykogengehalts in Fibroblasten einer Kontrolle sowie aller Patienten mit <i>TXNIP</i> Varianten ohne und mit Behandlung mit 50 µM Ritonavir für 48 Stunden .....   | 59 |
| Abbildung 20: Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) aus Blutplasma des Patienten mit <i>TXNIP</i> <sup>Asn203Tyr</sup> Variante sowie einer geeigneten gesunden Kontrolle .....   | 60 |
| Abbildung 21: Plasma Lipidom aus dem Blutplasma mehrerer Kontrollen sowie der Patienten mit <i>TXNIP</i> <sup>Asn203Tyr</sup> bzw. <i>TXNIP</i> <sup>Asn86Lysfs*2</sup> Variante.....   | 61 |
| Abbildung 22: Muskel Lipidom aus Muskelproben mehrerer Kontrollen sowie des Patienten mit <i>TXNIP</i> <sup>Asn203Tyr</sup> Variante .....  | 62 |
| Abbildung 23: RNA-Analysen aus Muskelgewebe mehrerer Kontrollen sowie des Patienten mit <i>TXNIP</i> <sup>Asn203Tyr</sup> Variante .....  | 63 |
| Abbildung 24: RNA-Analyse aus Lebergewebe gesunder Kontrollen, einer Kohorte mit Adipositas sowie des Patienten mit <i>TXNIP</i> <sup>Asn203Tyr</sup> Variante .....  | 64 |
| Abbildung 25: Fibroblasten Lipidom aus Fibroblasten einer Kontrolle sowie der Patienten mit <i>TXNIP</i> Varianten .....  | 66 |
| Abbildung 26: qPCR Analyse der <i>FASN</i> Genexpression von Fibroblasten mehrerer Kontrollen sowie der Patienten mit <i>TXNIP</i> Varianten.....   | 67 |
| Abbildung 27: Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung von Fibroblasten und HepG2-Zellen.....  | 68 |
| Abbildung 28: Fettsäuresynthese-Aktivitätsmessung von Fibroblasten und HepG2-Zellen; jeweils 30 bzw. 60 µg Protein eingesetzt .....   | 69 |

## 10 Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Im Lipidyzer™ messbare Lipidklassen.....  | 10 |
| Tabelle 2: Lipoproteinklassen .....  | 12 |
| Tabelle 3: Eigenschaften TXNIP-defizienter Mäuse .....   | 24 |
| Tabelle 4: Selbst gelegte SYBR-Primer.....   | 30 |
| Tabelle 5: Genutzte Taqman-Assays.....   | 30 |
| Tabelle 6: Genutzte primäre Antikörper .....   | 31 |
| Tabelle 7: Genutzte sekundäre Antikörper .....   | 31 |
| Tabelle 8: Genutzte Reagenzien .....   | 32 |
| Tabelle 9: Genutzte Kulturmedien und Seren.....  | 34 |
| Tabelle 10: Genutzte Puffer und deren Zusammensetzung .....  | 34 |
| Tabelle 11: Genutzte Kits.....   | 35 |
| Tabelle 12: Genutztes Verbrauchsmaterial.....  | 36 |
| Tabelle 13: Genutzte Geräte.....   | 37 |
| Tabelle 14: Genutzte Software .....  | 38 |
| Tabelle 15: Charakterisierung der <i>TXNIP</i> Varianten hinsichtlich Position und Art<br>der Variante sowie resultierender Proteinlänge ..... | 47 |
| Tabelle 16: Klinische Charakteristika der Patienten mit <i>TXNIP</i> Varianten.....  | 51 |

## 11 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Acheson K J, Schutz Y, Bessard T, Anantharaman K, Flatt J P, Jéquier E. (1988). Glycogen storage capacity and de novo lipogenesis during massive carbohydrate overfeeding in man. *Am J Clin Nutr*, 48(2): 240-247.
- Alhawiti N M, Al Mahri S, Aziz M A, Malik S S, Mohammad S. (2017). TXNIP in Metabolic Regulation: Physiological Role and Therapeutic Outlook. *Curr Drug Targets*, 18(9): 1095-1103.
- Altmann S W, Davis H R, Jr., Zhu L J, Yao X, Hoos L M, Tetzloff G, Iyer S P, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano M P. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 303(5661): 1201-1204.
- Alvarez C E. (2008). On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol Biol*, 8: 222.
- Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, 63(7): 895-902.
- Austin S L, Proia A D, Spencer-Manzon M J, Butany J, Wechsler S B, Kishnani P S. (2012). Cardiac Pathology in Glycogen Storage Disease Type III. *JIMD Rep*, 6: 65-72.
- Bandsma R H, Prinsen B H, van Der Velden M de S, Rake J P, Boer T, Smit G P, Reijngoud D J, Kuipers F. (2008). Increased de novo lipogenesis and delayed conversion of large VLDL into intermediate density lipoprotein particles contribute to hyperlipidemia in glycogen storage disease type 1a. *Pediatr Res*, 63(6): 702-707.
- Bandsma R H, Rake J P, Visser G, Neese R A, Hellerstein M K, van Duyvenvoorde W, Princen H M, Stellaard F, Smit G P, Kuipers F. (2002). Increased lipogenesis and resistance of lipoproteins to oxidative modification in two patients with glycogen storage disease type 1a. *J Pediatr*, 140(2): 256-260.
- Barrows B R, Parks E J. (2006). Contributions of different fatty acid sources to very low-density lipoprotein-triacylglycerol in the fasted and fed states. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(4): 1446-1452.
- Berge K E, Tian H, Graf G A, Yu L, Grishin N V, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs H H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*, 290(5497): 1771-1775.
- Bergmeyer H U. (1975). [New values for the molar extinction coefficients of NADH and NADPH for the use in routine laboratories (author's transl)]. *Z Klin Chem Klin Biochem*, 13(11): 507-508.
- Billin A N, Eilers A L, Coulter K L, Logan J S, Ayer D E. (2000). MondoA, a novel basic helix-loop-helix-leucine zipper transcriptional activator that constitutes a positive branch of a max-like network. *Mol Cell Biol*, 20(23): 8845-8854.
- Bodnar J S, Chatterjee A, Castellani L W, Ross D A, Ohmen J, Cavalcoli J, Wu C, Dains K M, Catanese J, Chu M, Sheth S S, Charugundla K, Demant P, West D B, de Jong P, Lusic A J. (2002). Positional cloning of the combined hyperlipidemia gene *Hyplip1*. *Nat Genet*, 30(1): 110-116.
- Bollen M, Keppens S, Stalmans W. (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J*, 336(Pt 1): 19-31.
- Bouskila M, Hunter R W, Ibrahim A F, Delattre L, Peggie M, van Diepen J A, Voshol P J, Jensen J, Sakamoto K. (2010). Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle. *Cell Metab*, 12(5): 456-466.
- Breslow J L. (1985). Human apolipoprotein molecular biology and genetic variation. *Annu Rev Biochem*, 54: 699-727.
- Cha-Molstad H, Saxena G, Chen J, Shalev A. (2009). Glucose-stimulated expression of *Txnip* is mediated by carbohydrate response element-binding protein, p300,

- and histone H4 acetylation in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, 284(25): 16898-16905.
- Chakravarthy M V, Pan Z, Zhu Y, Tordjman K, Schneider J G, Coleman T, Turk J, Semenkovich C F. (2005). "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab*, 1(5): 309-322.
- Chambers J C, Loh M, Lehne B, Drong A, Kriebel J, Motta V, Wahl S, Elliott H R, Rota F, Scott W R, Zhang W, Tan S T, Campanella G, Chadeau-Hyam M, Yengo L, Richmond R C, Adamowicz-Brice M, Afzal U, Bozaoglu K, Mok Z Y, Ng H K, Pattou F, Prokisch H, Rozario M A, Tarantini L, Abbott J, Ala-Korpela M, Albetti B, Ammerpohl O, Bertazzi P A, Blancher C, Caiazzo R, Danesh J, Gaunt T R, de Lusignan S, Gieger C, Illig T, Jha S, Jones S, Jowett J, Kangas A J, Kasturiratne A, Kato N, Kotea N, Kowlessur S, Pitkäniemi J, Punjabi P, Saleheen D, Schafmayer C, Soinen P, Tai E S, Thorand B, Tuomilehto J, Wickremasinghe A R, Kyrtopoulos S A, Aitman T J, Herder C, Hampe J, Cauchi S, Relton C L, Froguel P, Soong R, Vineis P, Jarvelin M R, Scott J, Grallert H, Bollati V, Elliott P, McCarthy M I, Kooner J S. (2015). Epigenome-wide association of DNA methylation markers in peripheral blood from Indian Asians and Europeans with incident type 2 diabetes: a nested case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 3(7): 526-534.
- Chen J, Hui S T, Couto F M, Mungrue I N, Davis D B, Attie A D, Lusis A J, Davis R A, Shalev A. (2008a). Thioredoxin-interacting protein deficiency induces Akt/Bcl-xL signaling and pancreatic beta-cell mass and protects against diabetes. *FASEB J*, 22(10): 3581-3594.
- Chen J, Jing G, Xu G, Shalev A. (2014). Thioredoxin-interacting protein stimulates its own expression via a positive feedback loop. *Mol Endocrinol*, 28(5): 674-680.
- Chen J, Saxena G, Mungrue I N, Lusis A J, Shalev A. (2008b). Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes*, 57(4): 938-844.
- Chen K S, DeLuca H F. (1994). Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim Biophys Acta*, 1219(1): 26-32.
- Chen Y, Ning J, Cao W, Wang S, Du T, Jiang J, Feng X, Zhang B. (2020). Research Progress of TXNIP as a Tumor Suppressor Gene Participating in the Metabolic Reprogramming and Oxidative Stress of Cancer Cells in Various Cancers. *Front Oncol*, 10: 568574.
- Cheng C, Ru P, Geng F, Liu J, Yoo J Y, Wu X, Cheng X, Euthine V, Hu P, Guo J Y, Lefai E, Kaur B, Nohturfft A, Ma J, Chakravarti A, Guo D. (2015). Glucose-Mediated N-glycosylation of SCAP Is Essential for SREBP-1 Activation and Tumor Growth. *Cancer Cell*, 28(5): 569-581.
- Chutkow W A, Patwari P, Yoshioka J, Lee R T. (2008). Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a critical regulator of hepatic glucose production. *J Biol Chem*, 283(4): 2397-2406.
- Cushman S W, Wardzala L J. (1980). Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem*, 255(10): 4758-4762.
- DiMauro S, Rowland L P, Mellman W J. (1973). Glycogen metabolism of human diploid fibroblast cells in culture. I. Studies of cells from patients with glycogenosis types II, 3, and V. *Pediatr Res*, 7(9): 739-744.
- Donnelly K L, Margosian M R, Sheth S S, Lusis A J, Parks E J. (2004). Increased lipogenesis and fatty acid reesterification contribute to hepatic triacylglycerol stores in hyperlipidemic Txnip<sup>-/-</sup> mice. *J Nutr*, 134(6): 1475-1480.
- Feingold K R. (2022). Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 51(3): 437-458.
- Ferreira N E, Omae S, Pereira A, Rodrigues M V, Miyakawa A A, Campos L C, Santos P C, Dallan L A, Martinez T L, Santos R D, Mill J G, Krieger J E, Pereira A C.

- (2012). Thioredoxin interacting protein genetic variation is associated with diabetes and hypertension in the Brazilian general population. *Atherosclerosis*, 221(1): 131-136.
- Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, Le Lièvre X, Berthelie-Lubrano C, Spiegelman B, Kim J B, Ferré P, Foufelle F. (1999). ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol*, 19(5): 3760-3768.
- Hannun Y A, Obeid L M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(3): 175-191.
- Hargreaves M, Richter E A. (1988). Regulation of skeletal muscle glycogenolysis during exercise. *Can J Sport Sci*, 13(4): 197-203.
- Herman M A, Peroni O D, Villoria J, Schön M R, Abumrad N A, Blüher M, Klein S, Kahn B B. (2012). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature*, 484(7394): 333-338.
- Hresko R C, Hruz P W. (2011). HIV protease inhibitors act as competitive inhibitors of the cytoplasmic glucose binding site of GLUTs with differing affinities for GLUT1 and GLUT4. *PLoS One*, 6(9): e25237.
- Hui T Y, Sheth S S, Diffley J M, Potter D W, Lusic A J, Attie A D, Davis R A. (2004). Mice lacking thioredoxin-interacting protein provide evidence linking cellular redox state to appropriate response to nutritional signals. *J Biol Chem*, 279(23): 24387-24393.
- Jensen T E, Richter E A. (2012). Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *J Physiol*, 590(5): 1069-1076.
- Jump D B, Clarke S D, Thelen A, Liimatta M. (1994). Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*, 35(6): 1076-1084.
- Junn E, Han S H, Im J Y, Yang Y, Cho E W, Um H D, Kim D K, Lee K W, Han P L, Rhee S G, Choi I. (2000). Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol*, 164(12): 6287-6295.
- Kanungo S, Wells K, Tribett T, El-Gharbawy A. (2018). Glycogen metabolism and glycogen storage disorders. *Ann Transl Med*, 6(24): 474.
- Katsu-Jimenez Y, Vazquez-Calvo C, Maffezzini C, Halldin M, Peng X, Freyer C, Wredenberg A, Gimenez-Cassina A, Wedell A, Arner E S J. (2019). Absence of TXNIP in Humans Leads to Lactic Acidosis and Low Serum Methionine Linked to Deficient Respiration on Pyruvate. *Diabetes*, 68(4): 709-723.
- Kersten S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*, 2(4): 282-286.
- Klip A, Ramlal T, Young D A, Holloszy J O. (1987). Insulin-induced translocation of glucose transporters in rat hindlimb muscles. *FEBS Lett*, 224(1): 224-230.
- Knuiman P, Hopman M T, Mensink M. (2015). Glycogen availability and skeletal muscle adaptations with endurance and resistance exercise. *Nutr Metab (Lond)*, 12: 59.
- Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson J H, McGarry J D, Unger R H. (1994). Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(23): 10878-10882.
- Ma L, Tsatsos N G, Towle H C. (2005). Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes. *J Biol Chem*, 280(12): 12019-12027.
- Magaña M M, Lin S S, Dooley K A, Osborne T F. (1997). Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins. *J Lipid Res*, 38(8): 1630-1638.
- Magaña M M, Osborne T F. (1996). Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J Biol Chem*, 271(51): 32689-32694.

- Mahley R W, Innerarity T L, Rall S C, Jr., Weisgraber K H. (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*, 25(12): 1277-1294.
- Malhi H, Bronk S F, Werneburg N W, Gores G J. (2006). Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem*, 281(17): 12093-12101.
- Milo R, Jorgensen P, Moran U, Weber G, Springer M. (2010). BioNumbers--the database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucleic Acids Res*, 38(Database issue): D750-753.
- Minn A H, Hafele C, Shalev A. (2005). Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta-cell apoptosis. *Endocrinology*, 146(5): 2397-2405.
- Mueckler M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem*, 219(3): 713-725.
- Nagaraj K, Lapkina-Gendler L, Sarfstein R, Gurwitz D, Pasmanik-Chor M, Laron Z, Yakar S, Werner H. (2018). Identification of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) as a downstream target for IGF1 action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(5): 1045-1050.
- Nielsen J N, Wojtaszewski J F. (2004). Regulation of glycogen synthase activity and phosphorylation by exercise. *Proc Nutr Soc*, 63(2): 233-237.
- Nishinaka Y, Masutani H, Oka S, Matsuo Y, Yamaguchi Y, Nishio K, Ishii Y, Yodoi J. (2004). Importin alpha1 (Rch1) mediates nuclear translocation of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3)-up-regulated protein 1. *J Biol Chem*, 279(36): 37559-37565.
- Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, Hirota K, Masutani H, Nakamura H, Takagi Y, Sono H, Gon Y, Yodoi J. (1999). Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem*, 274(31): 21645-21650.
- Oka S, Liu W, Masutani H, Hirata H, Shinkai Y, Yamada S, Yoshida T, Nakamura H, Yodoi J. (2006). Impaired fatty acid utilization in thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)-deficient mice: a unique animal model of Reye syndrome. *FASEB J*, 20(1): 121-123.
- Oka S, Yoshihara E, Bizen-Abe A, Liu W, Watanabe M, Yodoi J, Masutani H. (2009). Thioredoxin binding protein-2/thioredoxin-interacting protein is a critical regulator of insulin secretion and peroxisome proliferator-activated receptor function. *Endocrinology*, 150(3): 1225-1234.
- Ortega-Prieto P, Postic C. (2019). Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP. *Front Genet*, 10: 472.
- Ozen H. (2007). Glycogen storage diseases: new perspectives. *World J Gastroenterol*, 13(18): 2541-2553.
- Panse M, Kluth O, Lorza-Gil E, Kaiser G, Muhlbauer E, Schurmann A, Haring H U, Ullrich S, Gerst F. (2018). Palmitate and insulin counteract glucose-induced thioredoxin interacting protein (TXNIP) expression in insulin secreting cells via distinct mechanisms. *PLoS One*, 13(5): e0198016.
- Parikh H, Carlsson E, Chutkow W A, Johansson L E, Storgaard H, Poulsen P, Saxena R, Ladd C, Schulze P C, Mazzini M J, Jensen C B, Krook A, Bjornholm M, Tornqvist H, Zierath J R, Ridderstrale M, Altshuler D, Lee R T, Vaag A, Groop L C, Mootha V K. (2007). TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PLoS Med*, 4(5): e158.
- Patwari P, Chutkow W A, Cummings K, Verstraeten V L, Lammerding J, Schreiter E R, Lee R T. (2009). Thioredoxin-independent regulation of metabolism by the alpha-arrestin proteins. *J Biol Chem*, 284(37): 24996-25003.
- Patwari P, Higgins L J, Chutkow W A, Yoshioka J, Lee R T. (2006). The interaction of thioredoxin with Txnip. Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. *J Biol Chem*, 281(31): 21884-21891.
- Richards P, Rachdi L, Oshima M, Marchetti P, Bugliani M, Armanet M, Postic C, Guilmeau S, Scharfmann R. (2018). MondoA Is an Essential Glucose-

- Responsive Transcription Factor in Human Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Diabetes*, 67(3): 461-472.
- Roach P J. (2002). Glycogen and its metabolism. *Curr Mol Med*, 2(2): 101-120.
- Roach P J, Depaoli-Roach A A, Hurley T D, Tagliabracci V S. (2012). Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J*, 441(3): 763-787.
- Rodnick K J, Slot J W, Studelska D R, Hanpeter D E, Robinson L J, Geuze H J, James D E. (1992). Immunocytochemical and biochemical studies of GLUT4 in rat skeletal muscle. *J Biol Chem*, 267(9): 6278-6285.
- Sanders F W, Griffin J L. (2016). De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 91(2): 452-468.
- Santer R, Schneppenheim R, Dombrowski A, Götze H, Steinmann B, Schaub J. (1997). Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Nat Genet*, 17(3): 324-326.
- Santer R, Ullrich K. (2020). Glykogenspeicherkrankheiten. In: Pädatrie. Hoffmann G F, Lentze, M.J., Spranger, J., Zepp, F., Berner, R. (Hrg.), Springer Reference Medizin, Springer, Berlin, Heidelberg, 769-782.
- Saxena G, Chen J, Shalev A. (2010). Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem*, 285(6): 3997-4005.
- Schwarz J M, Neese R A, Turner S, Dare D, Hellerstein M K. (1995). Short-term alterations in carbohydrate energy intake in humans. Striking effects on hepatic glucose production, de novo lipogenesis, lipolysis, and whole-body fuel selection. *J Clin Invest*, 96(6): 2735-2743.
- Seiter C W, Summer G K. (1975). Glycogen metabolism in human skin fibroblasts. Influence of maltose on the activity of acid alpha-1, 4-glucosidase. *Proc Soc Exp Biol Med*, 149(4): 945-949.
- Semenkovich C F, Coleman T, Goforth R. (1993). Physiologic concentrations of glucose regulate fatty acid synthase activity in HepG2 cells by mediating fatty acid synthase mRNA stability. *J Biol Chem*, 268(10): 6961-6970.
- Shalev A. (2008). Lack of TXNIP protects beta-cells against glucotoxicity. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 5): 963-965.
- Shalev A, Pise-Masison C A, Radonovich M, Hoffmann S C, Hirshberg B, Brady J N, Harlan D M. (2002). Oligonucleotide microarray analysis of intact human pancreatic islets: identification of glucose-responsive genes and a highly regulated TGFbeta signaling pathway. *Endocrinology*, 143(9): 3695-3698.
- Shao W, Yu Z, Fantus I G, Jin T. (2010). Cyclic AMP signaling stimulates proteasome degradation of thioredoxin interacting protein (TxNIP) in pancreatic beta-cells. *Cell Signal*, 22(8): 1240-1246.
- Sheth S S, Castellani L W, Chari S, Wagg C, Thipphavong C K, Bodnar J S, Tontonoz P, Attie A D, Lopaschuk G D, Lusis A J. (2005). Thioredoxin-interacting protein deficiency disrupts the fasting-feeding metabolic transition. *J Lipid Res*, 46(1): 123-134.
- Spindel O N, World C, Berk B C. (2012). Thioredoxin interacting protein: redox dependent and independent regulatory mechanisms. *Antioxid Redox Signal*, 16(6): 587-596.
- Stoltzman C A, Peterson C W, Breen K T, Muoio D M, Billin A N, Ayer D E. (2008). Glucose sensing by MondoA:Mix complexes: a role for hexokinases and direct regulation of thioredoxin-interacting protein expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(19): 6912-6217.
- Sullivan M A, Vilaplana F, Cave R A, Stapleton D, Gray-Weale A A, Gilbert R G. (2010). Nature of alpha and beta particles in glycogen using molecular size distributions. *Biomacromolecules*, 11(4): 1094-1100.

- Swierczynski J. (2006). Leptin and age-related down-regulation of lipogenic enzymes genes expression in rat white adipose tissue. *J Physiol Pharmacol*, 57 Suppl 6: 85-102.
- Tarnopolsky M A. (2018). Myopathies Related to Glycogen Metabolism Disorders. *Neurotherapeutics*, 15(4): 915-927.
- Thielen L A, Chen J, Jing G, Moukha-Chafiq O, Xu G, Jo S, Grayson T B, Lu B, Li P, Augelli-Szafran C E, Suto M J, Kanke M, Sethupathy P, Kim J K, Shalev A. (2020). Identification of an Anti-diabetic, Orally Available Small Molecule that Regulates TXNIP Expression and Glucagon Action. *Cell Metab*, 32(3): 353-365.e358.
- Uchiyama N, Yamamoto A, Kameda K, Yamaguchi H, Ito M. (2000). The activity of fatty acid synthase of epidermal keratinocytes is regulated in the lower stratum spinosum and the stratum basale by local inflammation rather than by circulating hormones. *J Dermatol Sci*, 24(2): 134-141.
- Waldhart A N, Dykstra H, Peck A S, Boguslawski E A, Madaj Z B, Wen J, Veldkamp K, Hollowell M, Zheng B, Cantley L C, McGraw T E, Wu N. (2017). Phosphorylation of TXNIP by AKT Mediates Acute Influx of Glucose in Response to Insulin. *Cell Rep*, 19(10): 2005-2013.
- Wu N, Zheng B, Shaywitz A, Dagon Y, Tower C, Bellinger G, Shen C H, Wen J, Asara J, McGraw T E, Kahn B B, Cantley L C. (2013). AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Mol Cell*, 49(6): 1167-1175.
- Xu G, Chen J, Jing G, Shalev A. (2013). Thioredoxin-interacting protein regulates insulin transcription through microRNA-204. *Nat Med*, 19(9): 1141-1146.
- Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick R K, Henzel W J, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K. (2001). A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(16): 9116-9121.
- Yamawaki H, Pan S, Lee R T, Berk B C. (2005). Fluid shear stress inhibits vascular inflammation by decreasing thioredoxin-interacting protein in endothelial cells. *J Clin Invest*, 115(3): 733-738.
- Yodoi J, Masutani H, Nakamura H. (2001). Redox regulation by the human thioredoxin system. *Biofactors*, 15(2-4): 107-111.
- Yoshihara E. (2020). TXNIP/TBP-2: A Master Regulator for Glucose Homeostasis. *Antioxidants (Basel)*, 9(8): 765.
- Zhang P, Wang C, Gao K, Wang D, Mao J, An J, Xu C, Wu D, Yu H, Liu J O, Yu L. (2010). The ubiquitin ligase itch regulates apoptosis by targeting thioredoxin-interacting protein for ubiquitin-dependent degradation. *J Biol Chem*, 285(12): 8869-8879.
- Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*, 11(2): 136-140.

## 12 Anhang

### 12.1 DNA- und Protein-Sequenz von TXNIP

#### DNA:

ATGGTGATGTTCAAGAAGATCAAGTCTTTTGAGGTGGTCTTTAACGACCCTGAAAAGGTGTACGGCAGTG  
 GCGAGAAGGTGGCTGGCCGGGTGATAGTGGAGGTGTGTGAAGTTACTCGTGTCAAAGCCGTTAGGATCCT  
 GGCTTGCGGAGTGGCTAAAGTGCTTTGGATGCAGGGATCCCAGCAGTGCAAACAGACTTCGGAGTACCTG  
 CGCTATGAAGACACGCTTCTTCTGGAAGACCAGCCAACAGGTGAGAATGAGATGGTGATCATGAGACCTG  
 GAAACAAATATGAGTACAAGTTCGGCTTTGAGCTTCCCTCAGGGGCCTCTGGGAACATCCTTCAAAGGAAA  
 ATATGGGTGTGTAGACTACTGGGTGAAGGCTTTTCTTGACCGCCCCGAGCCAGCCAACACTCAAGAGACAAA  
 AAAAAGTTGAAGTAGTGGATCTGGTGGATGTCAATACCCCTGATTTAATGGCACCTGTGTCTGCTAAAA  
 AAAAAAGAAAAGTTTCCATGATGTTTCCATTCCTGATGGGCGGGTGTCTGTCTCTGCTCGAATTGACAGAAA  
 AGGATTCTGTGAAGGTGATGAGATTTCCATCCATGCTGACTTTGAGAATACATGTTCCCGAATTGTGGTC  
 CCCAAAGCTGCCATTGTGGCCCGCCACACTTACCTTGCCAATGGCCAGACCAAGGTGCTGACTCAGAAGT  
 TGTCATCAGTCAGAGGCAATCATATTATCTCAGGGACATGCGCATCATGGCGTGGCAAGAGCCTTCGGGT  
 TCAGAAGATCAGGCCTTCTATCCTGGGCTGCAACATCCTTCGAGTTGAATATTCCTTACTGATCTATGTT  
 AGCGTTCCTGGATCCAAGAAGGTCATCCTTGACCTGCCCCTGGTAATTGGCAGCAGATCAGGTCTAAGCA  
 GCAGAACATCCAGCATGGCCAGCCGAACCAGCTCTGAGATGAGTTGGGTAGATCTGAACATCCCTGATAC  
 CCCAGAAGCTCCTCCCTGCTATATGGATGTCATTCCCTGAAGATCACCGATTGGAGAGCCCAACACTCCT  
 CTGCTAGATGACATGGATGGCTCTCAAGACAGCCCTATCTTTATGTATGCCCCTGAGTTCAAGTTCATGC  
 CACCACCGACTTATACTGAGGTGGATCCCTGCATCCTCAACAACAATGTGCAGTGA

#### Protein:

MVMFKIKSFEVVFNDPEKVYGSGEKVAGRIVIVEVCEVTRVKAVRILACGVAKVLWMQGSQQCKQTSEYLRVED  
 TLLLEDQPTGENEMVIMRPGNKYEYKFGFELPQGPLGTSFKGKYGCVDYWKAFLDLDRPSQPTQETKKNFEVVDL  
 VDVNTPDLMAPVSAKKEKKVSCMFI PDGRVSVSARIDRKGFCGEDEISIHADFENTCSRIVVPKAAIVARHTYL  
 ANGQTKVLTQKLSSVRGNHII SGTCASWRGKSLRVQKIRPSILGCNILRVEYSLLIYVSVPGSKKVILDLPLVI  
 GSRGLSSRTSSMASRTSSEMSWDLNIPDTPEAPPCYMDVIPEDHRLESPTPLLDMDGSDSPIFMYAPEF  
 KFMPPPTYTEVDPCILNNVQ

391 AS

## 12.2 DNA- und Protein-Sequenzen der *TXNIP* Varianten

### 12.2.1 Patient mit *TXNIP*<sup>Asn203Tyr</sup> Variante

DNA: *TXNIP* c.607A>T homozygot

```

ATGGTGATGTTCAAGAAGATCAAGTCTTTTGAGGTGGTCTTTAACGACCCTGAAAAGGTGTACGGCAGTG
GCGAGAAGGTGGCTGGCCGGGTGATAGTGGAGGTGTGTGAAGTTACTCGTGTCAAAGCCGTTAGGATCCT
GGCTTGCGGAGTGGCTAAAGTGCTTTGGATGCAGGGATCCCAGCAGTGCAAACAGACTTCGGAGTACCTG
CGCTATGAAGACACGCTTCTTCTGGAAGACCAGCCAACAGGTGAGAATGAGATGGTGATCATGAGACCTG
GAAACAAATATGAGTACAAGTTCGGCTTTGAGCTTCTCAGGGGCCTCTGGGAACATCCTTCAAAGGAAA
ATATGGGTGTGTAGACTACTGGGTGAAGGCTTTTCTTGACCGCCCCGAGCCAGCCAACCTCAAGAGACAAA
AAAAACTTTGAAGTAGTGGATCTGGTGGATGTCAATACCCCTGATTTAATGGCACCTGTGTCTGCTAAAA
AAGAAAAGAAAGTTTCTGCATGTTTCCATCCATGCTGACTTTGAGATACATGTTCCCGAATTGTGGTC
CCCAAAGCTGCCATTGTGGCCCGCCACACTTACCTTGCCAATGGCCAGACCAAGGTGCTGACTCAGAAGT
TGTCATCAGTCAGAGGCAATCATATTATCTCAGGGACATGCGCATCATGGCGTGGCAAGAGCCTTCGGGT
TCAGAAGATCAGGCCTTCTATCCTGGGCTGCAACATCCTTCGAGTTGAATATTCCTTACTGATCTATGTT
AGCGTTCCTGGATCCAAGAAGGTCATCCTTGACCTGCCCCTGGTAATTGGCAGCAGATCAGGTCTAAGCA
GCAGAACATCCAGCATGGCCAGCCGAACCAGCTCTGAGATGAGTTGGGTAGATCTGAACATCCCTGATAC
CCCAGAAGCTCCTCCCTGCTATATGGATGTCATTCTGAAGATCACCGATTGGAGAGCCCAACCACTCCT
CTGCTAGATGACATGGATGGCTCTCAAGACAGCCCTATCTTTATGTATGCCCTGAGTTCAAGTTCATGC
CACCACCGACTTATACTGAGGTGGATCCCTGCATCCTCAACAACAATGTGCAGTGA

```

Protein: *TXNIP* p.Asn203Tyr

```

MVMFKKIKSFEVVFNDPEKVYGSGEKVAGRVI VEVCEVTRVKAVRILACGVAKVLWMQGSQQCKQTSEYLRVED
TLLLEDQPTGENEMVIMRPGNKYEYKFGFELPQGPLGTSFKGKYGCVDYWKAF LDRPSQPTQETKKNFEVVDL
VDVNTPDLMAPVSAKKEKKVSCMFI PDGRVSVSARIDRKGFCGDEISIHADFENITCSRIVVPKAAIVARHTY
LANGQTKVLTQKLSSVRGNHI ISGTCASWRGKSLRVQKIRPSILGCNILRVEYSLLIYVSVPGSKKVILDPLV
IGSRSGLSSRTSSMASRTSSEM SWVDLNI PDTP EAPPCYMDVIPEDHRLESPTTPLLDDMDGSQDSPIFMYAPE
FKFMPPTTYTEVDPCILNNNVQ

```

391 AS

## 12.2.2 Patient mit TXNIP<sup>Asn86Lysfs\*2</sup> Variante

DNA: *TXNIP* c.257dupA homozygot

```

ATGGTGATGTTCAAGAAGATCAAGTCTTTTGAGGTGGTCTTTAACGACCCTGAAAAGGTGTACGGCAGTG
GCGAGAAGGTGGCTGGCCGGGTGATAGTGGAGGTGTGTGAAGTTACTCGTGTCAAAGCCGTTAGGATCCT
GGCTTGCGGAGTGGCTAAAGTGCTTTGGATGCAGGGATCCCAGCAGTGCAAACAGACTTCGGAGTACCTG
CGCTATGAAGACACGCTTCTTCTGGAAGACCAGCCAACAGGTGAGAAATGA-
GATGGTGATCATGAGACCTGGAAACAAATATGAGTACAAGTTCGGCTTTGAGCTTCCTCAGGGCCTCTG
GGAACATCCTTCAAAGGAAAATATGGGTGTGTAGACTACTGGGTGAAGGCTTTTCTTGACCGCCCGAGCC
AGCCAACCTCAAGAGACAAAGAAAAAATTTGAAGTAGTGGATCTGGTGGATGTCAATACCCCTGATTTAAT
GGCACCTGTGTCTGCTAAAAAAGAAAAGAAAGTTTCTGCATGTTTCCATCCATGCTGACTTTGAGAATA
TCTGCTCGAATTGACAGAAAAGGATTCTGTGAAGGTGATGAGATTTCCATCCATGCTGACTTTGAGAATA
CATGTTCCCGAATTGTGGTCCCCAAAGCTGCCATTGTGGCCCGCCACACTTACCTTGCCAATGGCCAGAC
CAAGGTGCTGACTCAGAAGTTGTCATCAGTCAGAGGCAATCATATTATCTCAGGGACATGCGCATCATGG
CGTGGCAAGAGCCTTCGGGTTTCAAGAGATCAGGCCTTCTATCCTGGGCTGCAACATCCTTCGAGTTGAAT
ATTCCTTACTGATCTATGTTAGCGTTTCTGGATCCAAGAAGGTATCCTTGACCTGCCCCTGGTAATTGG
CAGCAGATCAGGTCTAAGCAGCAGAACATCCAGCATGGCCAGCCGAACCAGCTCTGAGATGAGTTGGGTA
GATCTGAACATCCCTGATACCCAGAAAGCTCCTCCCTGCTATATGGATGTCATTCTGAAGATCACCAGAT
TGGAGAGCCCAACCCTCTGCTAGATGACATGGATGGCTCTCAAGACAGCCCTATCTTTATGTATGC
CCCTGAGTTCAAGTTCATGCCACCACCGACTTATACTGAGGTGGATCCCTGCATCCTCAACAACAATGTG
CAGTGA

```

Protein: TXNIP p. Asn86Lysfs\*2

```

MVMFKKIKSFEVVFNDPEKVYGSGEKVAGRIVIVEVCEVTRVKAVRILACGVAKVLWMQGSQQCKQTSEYLRVED
TLLLEDQPTGENK-

```

86 AS

### 12.2.3 Patient mit TXNIP<sup>Ile215Tyrfs\*59</sup> Variante

DNA: *TXNIP* c.642\_643insT homozygot

```

ATGGTGATGTTCAAGAAGATCAAGTCTTTTGAGGTGGTCTTTAACGACCCTGAAAAGGTGTACGGCAGTG
GCGAGAAGGTGGCTGGCCGGGTGATAGTGGAGGTGTGTGAAGTTACTCGTGTCAAAGCCGTTAGGATCCT
GGCTTGCGGAGTGGCTAAAGTGCCTTTGGATGCAGGGATCCCAGCAGTGCAAACAGACTTCGGAGTACCTG
CGCTATGAAGACACGCTTCTTCTGGAAGACCAGCCAACAGGTGAGAATGAGATGGTGATCATGAGACCTG
GAAACAAATATGAGTACAAGTTCGGCTTTGAGCTTCTCAGGGGCCTCTGGGAACATCCTTCAAAGGAAA
ATATGGGTGTGTAGACTACTGGGTGAAGGCTTTTCTTGACCGCCCCGAGCCAGCCAACCTCAAGAGACAAAG
AAAAACTTTGAAGTAGTGGATCTGGTGGATGTCAATACCCCTGATTTAATGGCACCTGTGTCTGCTAAAA
AAGAAAAGAAAGTTTCTGCATGTTTCATTCCTGATGGGCGGGTGTCTGTCTCTGCTCGAATTGACAGAAA
AGGATTCTGTGAAGGTGATGAGATTTCCATCCATGCTGACTTTGAGAATACATGTTCCCGAATTGTGGTC
CCCAAAGCTGCCATTGTGGCCCCCACACTTACCTTGCCAATGGCCAGACCAAGGTGCTGACTCAGAAG
TTGTCATCAGTCAGAGGCAATCATATTATCTCAGGGACATGCGCATCATGGCGTGGCAAGAGCCTTCGGG
TTCAGAAGATCAGGCCTTCTATCCTGGGCTGCAACATCCTTCGAGTTGA-
ATATTCCTTACTGATCTATGTTAGCGTTCCTGGATCCAAGAAGGTCATCCTTGACCTGCCCTGGTAATT
GGCAGCAGATCAGGTCTAAGCAGCAGAACATCCAGCATGGCCAGCCGAACCAGCTCTGAGATGAGTTGGG
TAGATCTGAACATCCCTGATACCCAGAAAGCTCCTCCCTGCTATATGGATGTCATTCCTGAAGATCACCG
ATTGGAGAGCCCAACCCTCTGCTAGATGACATGGATGGCTCTCAAGACAGCCCTATCTTTATGTAT
GCCCTGAGTTCAAGTTCATGCCACCACCGACTTATACTGAGGTGGATCCCTGCATCCTCAACAACAATG
TGCAGTGA

```

Protein: TXNIP p.Ile215Tyrfs\*59

```

MVMFKKIKSFEVVFNDPEKVYGSGEKVAGRIVIVEVCEVTRVKAVRILACGVAKVLWMQGSQQCKQTSEYLRVED
TLLLEDQPTGENEMVIMRPGNKYEYKFGFELPQGPLGTSFKGKYGCVDYWVKAFDRPSQPTQETKKNFEVVDL
VDVNTPDLMAPVSAKKEKKVSCMFI PDGRVSVSARIDRKGFCGEDEISIHADFENTCSRIVVPKAAIYCGPPHL
PCQWPDQADSEVVISQRQSYLLRDMRIMAWQEPGSEDQAFYPGLQHPS-

```

272 AS

## 13 Danksagung

Mein erster und größter Dank gilt meinem Betreuer Christian Schlein und meinem Doktorvater Christian Kubisch für die großartige wissenschaftliche Betreuung und die Möglichkeit, am Institut für Humangenetik zu promovieren. Herzlichen Dank für das spannende Thema und die Unterstützung sowohl im Labor als auch darüber hinaus!

Ich möchte Jörg Heeren und Anna Worthmann, sowie Birgit Henkel und Sandra Ehret aus dem IBMZ für unsere gelungene Kooperation danken. Vielen Dank auch an unsere Kooperationspartner an der der medizinischen Universität in Salzburg und Innsbruck, an Prof. Benedikt Schoser aus dem Friedrich-Baur-Institut München sowie an die Kollegen der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

An dieser Stelle bedanke ich mich zudem bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung des Projekts.

Danke an alle Mitglieder des Instituts für Humangenetik für die herzliche Aufnahme und den wissenschaftlichen Diskurs. Mein Dank gilt insbesondere Katrin Rading und Verena Rickassel, deren exzellente technische Assistenz und Unterricht diese Arbeit möglich gemacht haben. Kira und Rieke, ich danke euch für eure Gesellschaft und unsere schönen Mittagspausen während meiner aktiven Zeit im Labor. Danke Giannis, Hassib, Jasmin, Josefine, Julius, Melina und Valentin für eure technische, intellektuelle und emotionale Unterstützung sowie die gemeinsamen Späße in der AG Schlein. Extra viel Dank gebührt Josefine für die erfolgreiche Weiterführung des Projektes sowie die enge Zusammenarbeit.

Vielen Dank an das gesamte IBMZ für den gelungenen Start in meine Promotion und die großartigen Feiern. Ich danke euch allen für die Einführung in das experimentelle Arbeiten. Wenngleich meine Zeit bei euch kurz war, habe ich viel gelernt.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner für die bedingungslose Unterstützung während meiner zahllosen Prüfungen und auf dem Weg meiner Promotion. Ihr habt mir die Kraft gegeben, um meine Studien erfolgreich abzuschließen. Danke Finn, dass du immer für mich da bist und mich in allem unterstützt.

## **14 Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## 15 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....