

Aus dem
CharitéCentrum 17 für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
mit Perinatalzentrum und Humangenetik
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie
Direktor: Professor Dr. med. Ch. Hübner

Habilitationsschrift

Die spinale Muskelatrophie mit Atemnot (SMARD1)

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Katja von Au
(geb. Grohmann)
aus Diez

Eingereicht: Mai 2012

Dekanin: Professor Dr. med. A. Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Professor Dr. med. V. Straub, Newcastle upon Tyne, England

2. Gutachter: Professor Dr. med. H. Amthor, Paris, Frankreich

Inhaltsverzeichnis

	SEITE
Abkürzungen	3
1. Einleitung	4
2. Eigene Arbeiten	6
PUBLIKATION 1: Grohmann K, Wienker TF, Saar K, Rudnik-Schöneborn S, Stoltenburg-Didinger G, Rossi R, Novelli G, Nürnberg G, Pfeufer A, Wirth B, Reis A, Zerres K, Hübner C (1999) Diaphragmatic spinal muscular atrophy with respiratory distress is heterogeneous, and one form is linked to chromosome 11q13-q21. <i>Am J Hum Genet</i> 65:1459-1462	6
PUBLIKATION 2: Grohmann K, Schuelke M, Diers A, Hoffmann K, Lucke B, Adams C, Bertini E, Leonhardt-Horti H, Muntoni F, Ouvrier R, Pfeufer A, Rossi R, Van Maldergem L, Wilmshurst JM, Wienker TF, Sendtner M, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Hübner C (2001) Mutations in the gene encoding immunoglobulin μ -binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. <i>Nat Genet</i> 29:75-77	7
PUBLIKATION 3: Grohmann K, Varon R, Stolz P, Schuelke M, Janetzki C, Bertini E, Bushby K, Muntoni F, Ouvrier R, Van Maldergem L, Goemans NMLA, Lochmüller H, Eichholz S, Adams C, Bosch F, Grattan-Smith P, Navarro C, Neitzel H, Polster T, Topaloglu H, Steglich S, Guenther UP, Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Hübner C (2003) Infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). <i>Ann Neurol</i> 54:719-724	8
PUBLIKATION 4: Guenther UP, Schuelke M, Bertini E, D'Amico A, Goemans N, Grohmann K, Hübner C, Varon R (2004) Genomic rearrangements at the <i>IGHMBP2</i> gene locus in two patients with SMARD1. <i>Hum Genet</i> 115:319-326	9
PUBLIKATION 5: Grohmann K, Rossoll W, Kobsar I, Holtmann B, Jablonka S, Wessig C, Stoltenburg-Didinger G, Fischer U, Hübner C, Martini R, Sendtner M (2004) Characterization of <i>Ighmbp2</i> in motor neurons and implications for the pathomechanism in a mouse model of human spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. <i>Hum Mol Genet</i> 13:2031-2042	10
PUBLIKATION 6: Diers A, Kaczinski M, Grohmann K, Hübner C, Stoltenburg-Didinger G (2005) The ultrastructure of peripheral nerve, motor end-plate and skeletal muscle in patients suffering from spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). <i>Acta Neuropathol</i> 110:289-297	11
PUBLIKATION 7: Guenther U-P, Varon R, Schlicke M, Dutrannoy V, Volk A, Hübner C, von Au K, Schuelke M (2007) Clinical and mutational profile in spinal muscular atrophy with respiratory distress (SMARD): Defining novel phenotypes through hierarchical cluster analysis. <i>Hum Mutat</i> 28:808-815	12
PUBLIKATION 8: Guenther U-P, Handoko L, Varon R, Stephani U, Tsao C-Y, Mendell JR, Lützkendorf S, Hübner C, von Au K, Jablonka S, Dittmar G, Heinemann U, Schuetz A, Schuelke M (2009) Clinical variability in distal spinal muscular atrophy type 1 (DSMA1): determination of steady-state IGHMBP2 protein levels in five patients with infantile and juvenile disease. <i>J Mol Med</i> 87:31-41	13
PUBLIKATION 9: Guenther U-P, Handoko L, Lagerbauer B, Jablonka S, Chari A, Alzheimer M, Ohmer J, Plöttner O, Gehring N, Sickmann A, von Au K, Schuelke M, Fischer U (2009) IGHMBP2 is a ribosome-associated helicase inactive in the neuromuscular disorder distal SMA type 1 (DSMA1). <i>Hum Mol Genet</i> 18:1288-1300	14
PUBLIKATION 10: Eckart M, Guenther U-P, Idkowiak J, Varon R, Grolle B, Boffi P, Van Maldergem L, Hübner C, Schuelke M, von Au K (2012) The natural course of infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). <i>Pediatrics</i> 129:1-9	15
3. Diskussion	16
4. Zusammenfassung	27
5. Literaturangaben aus dem freien Text	30
Danksagung	36
Erklärung	38

Abkürzungen

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMA1	Distale spinale Muskelatrophie Typ 1
HMN	Hereditäre motorische Neuropathie
IGHMBP2	Immunoglobulin μ -bindendes Protein 2
LCL	durch EBV-Viren transformierte, immortalisierte lymphoblastoide Zelllinie
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PEG	Perkutane endoskopische Gastrostomie
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
SF1	Superfamilie 1 der Helikasen
SMA	Spinale Muskelatrophie
SMARD1	Spinale Muskelatrophie mit Atemnot („respiratory distress“) Typ 1
SMN	„Survival motor neuron“-Protein

1. Einleitung

1974 beschrieb die Arbeitsgruppe um Mellins erstmals eine „ungewöhnliche Form“ der spinalen Muskelatrophie: „Two infants with Werdnig-Hoffmann disease presented with respiratory distress after an initial asymptomatic interval of one to two months. The initial evidence of muscle weakness was confined to the diaphragm.“ (Mellins et al. 1974). Anders als Patienten mit einer klassischen spinalen Muskelatrophie (SMA) zeigten die von Mellins beschriebenen Patienten bereits zu Beginn der Erkrankung eine schwere Atemnot, die durch eine Lähmung des Zwerchfells verursacht wurde. Heute wissen wir, dass es sich bei beiden Erkrankungen um klinisch ähnliche, aber genetisch distinkte Formen einer spinalen Muskelatrophie handelt.

Eine Form der diaphragmalen SMA ist die spinale Muskelatrophie mit Atemnot Typ 1 („Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1, SMARD1“ oder auch „distale SMA1, DSMA1“, OMIM #604320). Die Erkrankung wird durch autosomal-rezessive Mutationen in einem Gen verursacht, welches die Helikase „Immunoglobulin μ -bindendes Protein 2“ (IGHMBP2, OMIM *600502) kodiert. Innerhalb der ersten 13 Lebensmonate, aber nicht kongenital, tritt bei infantilen SMARD1-Patienten eine plötzliche, schwere Atemnot auf, die zu einer lebenslangen Beatmungspflicht führt. Zeitnah kommt es zu einer generalisierten Muskelschwäche, die distal betont beginnt und an den unteren Extremitäten anfangs stärker ausgeprägt ist als an den oberen. Nur wenige Patienten erlernen das freie Sitzen, kein Patient das freie Laufen. Gelegentlich wird von einer vorübergehenden leichten Besserung der motorischen Funktionen im Verlauf der Erkrankung berichtet. In der Regel kommt es innerhalb der ersten Lebensmonate zu einem akuten Krankheitsbeginn mit rascher Progredienz der Erkrankung innerhalb der ersten zwei Jahre und im Anschluss daran zu einer über Jahre anhaltenden stabilen Phase, in der die Kinder mit professioneller Hilfe zuhause betreut werden können. Die meist normale Intelligenz erlaubt es vielen Patienten, sprechen zu lernen und eine Schule zu besuchen und eine den Krankheitsumständen entsprechende gute soziale Integration zu erleben.

Im Krankheitsverlauf kann neben dem motorischen Nervensystem auch das sensorische und das autonome Nervensystem einbezogen werden. Dies zeigt sich in einer Reduktion der Sensibilität, in Blasenentleerungsstörungen, Obstipation, Temperaturregulationsproblemen und kardialen Arrhythmien sowie durch

Blutdruckprobleme. Auch kann es zu einer Schwäche der mimischen Muskulatur kommen und zu Zungenfaszikulationen. Nur bei wenigen SMARD1-Patienten bleibt die Fähigkeit zur ausreichenden oralen Nahrungsaufnahme erhalten, meist ist eine frühe Ernährung über eine Nahrungssonde/PEG nötig. Aufgrund der Immobilisation und der Muskelatrophie kommt es zu Lymphödemen und es fallen sog. „fatty finger pads“ auf. In etwa der Hälfte der Patienten werden Krampfanfälle beschrieben und diese häufig als sekundäres Phänomen, z.B. im Rahmen einer ernährungsbedingten Hypoglykämie oder nach einer kardiorespiratorischen Notfallsituation aufgetreten, beurteilt. Eine Frühgeburtlichkeit oder eine intrauterine Wachstumsverzögerung können erste Hinweise auf die Erkrankung sein und manche Mütter berichten über verminderte Kindsbewegungen. Von der infantilen SMARD1 lässt sich eine mildere Form der Erkrankung mit einem späteren Manifestationsalter, die juvenile SMARD1, abgrenzen.

Auf den folgenden Seiten werden die wichtigsten Veröffentlichungen zur spinalen Muskelatrophie mit Atemnot vorgestellt. Die Kartierung des Genortes, eine damit ermöglichte erste Einengung des Phänotyps, die Identifikation des verantwortlichen Gens, die Beschreibung des seiner Zeit unbekanntes Krankheitsbildes, die Pathophysiologie der SMARD1, die Funktion des betreffenden Genproduktes IGHMBP2 und erste Langzeitverläufe von Patienten sind die Studienthemen.

2. Eigene Arbeiten

Mit Hilfe einer großen konsanguinen Familie gelang es uns 1999, den Genort der Erkrankung SMARD1 durch eine genomweite Kopplungsanalyse zu kartieren. In der ersten Arbeit wird gezeigt, dass die diaphragmale Form der SMA genetisch heterogen ist und dass eine Form, die wir spinale Muskelatrophie mit Atemnot („with respiratory distress“), SMARD, genannt haben, in eine 31 cM große Region auf Chromosom 11q13-q21 kartiert. Die SMARD ist ebenfalls klinisch heterogen, da die Patienten einer Familie, die keine genetische Kopplung zu dem Genort auf Chromosom 11 zeigte, einen kongenitalen Beginn der Atemnot, die Patienten der anderen beiden Familien hingegen einen Beginn der Atemnot mit 6-12 Lebenswochen hatten. Im Vorfeld schlossen wir sowohl eine Kopplung der drei untersuchten Familien zum Genort der klassischen SMA auf Chromosom 5q11.2-q13.3 aus, als auch zu den humanen orthologen Genorten, die dem der *pnn* („progressive motor neuronopathy“)-Maus (Brunialti et al. 1995), einem klinisch der diaphragmalen SMA ähnelnden Mausmodell, entsprachen. Die SMARD wird klinisch und histopathologisch vorgestellt und erste pathophysiologische Konzepte werden diskutiert.

PUBLIKATION 1: Grohmann K, Wienker TF, Saar K, Rudnik-Schöneborn S, Stoltenburg-Didinger G, Rossi R, Novelli G, Nürnberg G, Pfeufer A, Wirth B, Reis A, Zerres K, Hübner C (1999)
Diaphragmatic spinal muscular atrophy with respiratory distress is heterogeneous, and one form is linked to chromosome 11q13-q21.
Am J Hum Genet 65:1459-1462

Durch eine Haplotypanalyse weiterer Familien mit einer SMARD konnten wir den Genort der Erkrankung eingrenzen und anschließend das verantwortliche Gen identifizieren. Einen Hinweis auf das Gen erhielten wir durch ein zweites Mausmodell, die *nmd* („neuromuscular degeneration“)-Maus (Cook et al. 1995), deren krankheitsverursachendes Gen, das Immunoglobulin μ -bindende Protein 2 (*IGHMBP2*)-Gen, im Genort der SMARD lag. Die Form der SMARD, die durch Mutationen im *IGHMBP2*-Gen verursacht wird, nannten wir spinale Muskelatrophie mit Atemnot („with respiratory distress“) Typ 1 (SMARD1). In der Arbeit beschreiben wir die ersten sieben *IGHMBP2*-Mutationen beim Menschen und zeigen, dass die Missense-Mutationen in hoch-konservierten Regionen liegen.

PUBLIKATION 2: Grohmann K, Schuelke M, Diers A, Hoffmann K, Lucke B, Adams C, Bertini E, Leonhardt-Horti H, Muntoni F, Ouvrier R, Pfeufer A, Rossi R, Van Maldergem L, Wilmshurst JM, Wienker TF, Sendtner M, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Hübner C (2001)
Mutations in the gene encoding immunoglobulin μ -binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1.
Nat Genet 29:75-77

In der folgenden Arbeit werden weitere *IGHMBP2*-Mutationen von 29 SMARD1-Patienten aus Afrika, Australien, Europa, dem Nahen Osten und Asien vorgestellt, deren klinische Daten wir über einen ausführlichen Fragebogen erfasst und analysiert haben. Mit Hilfe der Genotypisierung können erstmals die Krankheitssymptome der SMARD1 zum Zeitpunkt der Manifestation der Erkrankung übersichtlich dargestellt werden. Da die Mutationen im gesamten *IGHMBP2*-Gen liegen, beinhaltet eine genetische SMARD1-Diagnostik immer eine Sequenzierung aller 15 Exons sowie der flankierenden Intronsequenzen des *IGHMBP2*-Gens, welches eine Größe von fast 3.000 bp besitzt.

PUBLIKATION 3: Grohmann K, Varon R, Stolz P, Schuelke M, Janetzki C, Bertini E, Bushby K, Muntoni F, Ouvrier R, Van Maldergem L, Goemans NMLA, Lochmüller H, Eichholz S, Adams C, Bosch F, Grattan-Smith P, Navarro C, Neitzel H, Polster T, Topaloglu H, Steglich S, Guenther UP, Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Hübner C (2003)
Infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1).
Ann Neurol 54:719-724

Bei zwei SMARD1-Patienten, bei denen compound heterozygote Mutationen im *IGHMBP2*-Gen vorlagen, wiesen wir unterschiedliche, komplexe genomische Veränderungen nach. Damit zeigten wir, dass bei der Sequenzierung des *IGHMBP2*-Gens mitunter große Deletionen oder komplexe „Rearrangements“ mit Deletionen und Inversionen übersehen werden können, die zu einem falsch-negativen Ergebnis der SMARD1-Diagnostik führen.

Wir beschreiben in dieser Veröffentlichung erstmals einen milderen Phänotyp einer SMARD1 mit spätem Manifestationsalter, weswegen wir seitdem zwischen einer infantilen SMARD1, die bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten auftritt, und einer sehr seltenen juvenilen Verlaufsform der SMARD1 unterscheiden.

PUBLIKATION 4: Guenther UP, Schuelke M, Bertini E, D'Amico A, Goemans N, Grohmann K, Hübner C, Varon R (2004)
Genomic rearrangements at the *IGHMBP2* gene locus in two patients with SMARD1.
Hum Genet 115:319-326 (*Koautorenschaft*)

Neben der ausführlichen klinischen und genetischen Beschreibung der SMARD1 untersuchten wir die der Erkrankung zugrunde liegende Pathophysiologie und die zelluläre Funktion des IGHMBP2-Proteins. Die *nmd*-Mausmutante trägt eine Mutation im Intron 4 des *Ighmbp2*-Gens und ähnelt klinisch der SMARD1. Während die Skelettmuskelschwäche bei ihr wie erwartet primär neurogen ist, ist die Zwerchfellschwäche überraschend myogen. Wir generierten Antikörper gegen *Ighmbp2* und wiesen das Protein im Zytoplasma des Zellkörpers (und zu einem geringeren Anteil auch im Nukleus, nicht aber in den Nukleoli), den Axonen und den motorischen Endplatten der Motoneurone nach. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen des *N. ischiadicus* der Mausmutanten zeigten sich axonopathische Veränderungen mit axonaler Degeneration und sekundärer Destruktion der Myelinscheide, welche sich elektrophysiologisch in einer Amplitudenreduktion des Muskelaktionspotentials und in einer Spontanaktivität äußerten. Ab dem 10. Lebensstag einer Mutante kommt es zu einem signifikanten Verlust von Vorderhornzellen und im Muskel finden sich bereits denervierte motorische Endplatten, wohingegen der axonale Verlust noch nicht signifikant ist. Die Degeneration der Motoneurone beginnt somit an den Vorderhornzellen und zieht sich rasch entlang des Axons. Das Ergebnis, dass kultivierte Motoneurone von Mutanten und gesunden Mäusen keinen Unterschied in Axonwachstum und Überleben in Zellkultur zeigen, legt den Schluss nahe, dass fehlendes *Ighmbp2*-Protein noch keinen Einfluss auf die frühe embryonale Entwicklung der Motoneurone hat.

PUBLIKATION 5: Grohmann K, Rossoll W, Kobsar I, Holtmann B, Jablonka S, Wessig C, Stoltenburg-Didinger G, Fischer U, Hübner C, Martini R, Sendtner M (2004) Characterization of *Ighmbp2* in motor neurons and implications for the pathomechanism in a mouse model of human spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Hum Mol Genet* 13:2031-2042

Parallel zu den Untersuchungen an der Mausmutante wurde die Histologie der SMARD1-Patienten aufgearbeitet. In der folgenden Arbeit wird eine ausführliche Übersicht über die Axon- und Myelinpathologie der peripheren Nerven, über charakteristische Veränderungen an den motorischen Endplatten sowie über die Muskelpathologie bei SMARD1-Patienten gegeben. In gemischten Nerven der SMARD1-Patienten zeigten sich axonale Atrophie und Waller'sche Degeneration, in rein sensorischen Nerven wiesen wir - im Unterschied zu den Mausmutanten - ebenfalls eine axonale Degeneration nach. Alle untersuchten muskulären Endplatten waren dysmorph und ihnen fehlte das terminale Axon. Außerdem ließen sich auch histologische Auffälligkeiten, die typischerweise bei peripheren Neuropathien auftreten, wie Hypo- und Hypermyelinisierungen, nachweisen. Die Muskelfasern waren als Ausdruck einer schweren neurogenen Atrophie klein und Anzeichen einer Reinnervation, welche sich histologisch in einer Fasertypengruppierung ausdrückt, fehlten.

PUBLIKATION 6: Diers A, Kaczinski M, Grohmann K, Hübner C, Stoltenburg-Didinger G (2005)
The ultrastructure of peripheral nerve, motor end-plate and skeletal muscle in patients suffering from spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1).
Acta Neuropathol 110:289-297 (*Koautorenschaft*)

Neben weiteren *IGHMBP2*-Mutationen werden erstmals prädiktive Symptome und deren Konstellationen für die Diagnosestellung der SMARD1 definiert. Wir werteten retrospektiv die klinischen und genetischen Daten von 141 uns zugesandten Fragebögen und DNA-Proben von Patienten mit einem SMARD-Phänotyp aus. In 33% der Patienten konnten wir die SMARD1 genetisch sichern. Mittels „Hierarchischer Clusteranalyse“ definierten wir eine Voraussage, dass *IGHMBP2*-Mutationen bei einem Patienten mit der Befundkonstellation „Manifestation der Ateminsuffizienz zwischen 6 Lebenswochen und 6 -monaten“ UND („Vorhandensein einer Zwerchfelleventration“ ODER „Frühgeburtlichkeit“) mit 98% Sensitivität und 92% Spezifität nachgewiesen werden können. Eine kongenitale Manifestation der Atemnot schließt die Diagnose einer SMARD1 weitestgehend aus.

Wir untersuchten die *IGHMBP2*-Synthese einer neuen Splice-Site-Mutante, um herauszufinden, ob es eine „kritische“ Gendosis an korrekt gespleißtem *IGHMBP2*-Transkript gibt, bei deren Unterschreitung die SMARD1 klinisch manifest wird. Die Splice-Donor-Site-Mutation c.1235+3A>G unterdrückt ein korrektes Spleißen der *IGHMBP2*-mRNA nicht vollständig. Bei dem infantilen SMARD1-Patienten, der diese Mutation auf dem einen und eine Missense-Mutation (c.1334A>C, p.H445P) auf dem zweiten Allel trägt, reicht eine residuelle Steady-state-Menge an Wildtyp-*IGHMBP2*-mRNA von $24,4 \pm 6,9\%$ nicht aus, die Erkrankung zu verhindern oder abzumildern.

PUBLIKATION 7: Guenther U-P, Varon R, Schlicke M, Dutrannoy V, Volk A, Hübner C, von Au K, Schuelke M (2007)
Clinical and mutational profile in spinal muscular atrophy with respiratory distress (SMARD): Defining novel phenotypes through hierarchical cluster analysis.
Hum Mutat 28:808-815 (*Koautorenschaft*)

Die infantile und die juvenile Form der SMARD1 unterscheiden sich hauptsächlich im Zeitpunkt des Krankheitsbeginns. In der nun folgenden Arbeit wird der Unterschied beider Verlaufsformen auch auf Proteinebene herausgearbeitet. Bei einer juvenilen SMARD1-Patientin identifizierten wir die compound heterozygote, bereits bekannte Missense-Mutation c.1082T>C (p.L361P) und die neue Missense-Mutation c.1478C>T (p.T493I), die wir auch bei einem infantilen SMARD1-Patienten fanden (neben einer Nonsense-Mutation auf dem anderen Allel). Wir untersuchten die IGHMBP2-Proteinmengen in LCL-Zelllinien der beiden Patienten und deren Eltern, von weiteren SMARD1-Patienten und von gesunden Kontrollen und fanden heraus, dass die IGHMBP2-Proteinmengen bei infantilen SMARD1-Patienten mit $12 \pm 10\%$ ($n = 3$) signifikant geringer waren als bei juvenilen SMARD1-Patienten ($33 \pm 13\%$, $n = 2$). Desweiteren wiesen wir nach, dass die p.T493I-Mutation die Steady-state-IGHMBP2-Proteinmenge um etwa 50% reduziert. Um differenzieren zu können, ob diese Reduktion der Proteinmenge bereits auf mRNA-Transkript-Ebene oder auf Proteinebene entsteht, ermittelten wir die *IGHMBP2*-mRNA-Transkriptmenge mittels RT-PCR und fanden bei beiden Patienten leicht, aber nicht signifikant erhöhte Transkriptmengen. Weiterhin zeigte das p.T493I-mutante IGHMBP2-Protein eine erhöhte Tendenz hochmolekulare Aggregate zu bilden, sowie, spontan zu degradieren. Daraus schließen wir, dass die verminderte IGHMBP2-Proteinmenge bei den Patienten mit p.T493I-Mutation durch verminderte Translation oder vermehrte Proteindegradation verursacht wird.

PUBLIKATION 8: Guenther U-P, Handoko L, Varon R, Stephani U, Tsao C-Y, Mendell JR, Lützkendorf S, Hübner C, von Au K, Jablonka S, Dittmar G, Heinemann U, Schuetz A, Schuelke M (2009)
Clinical variability in distal spinal muscular atrophy type 1 (DSMA1):
determination of steady-state IGHMBP2 protein levels in five patients with
infantile and juvenile disease.
J Mol Med 87:31-41 (Koautorenschaft)

Die enzymatische Aktivität und die Funktion des IGHMBP2-Proteins sind Inhalt der folgenden Arbeit, in der erstmals die biochemische Grundlage der SMARD1-Pathologie definiert wird. IGHMBP2 gehört zur Superfamilie 1 (SF1) der Helikasen. Wir zeigen, dass IGHMBP2 eine aktive, ATP-abhängige 5' - 3' Helikase ist, die RNA und DNA-Duplices *in vitro* entwinden kann. Mutantes IGHMBP2 zeigt in den meisten Fällen einen vollständigen Verlust der ATPase- und Helikase-Aktivität. Die p.D565N-Mutante jedoch zeigt eine bestehende ATPase- bei fehlender Helikase-Aktivität und die p.T493I-Mutante beide Aktivitäten.

Ighmbp2 befindet sich im Zytoplasma der Zellen und eine nachgewiesene Kolo-kalisation des Proteins mit dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF4G2 und ribosomaler RNA weist auf eine Rolle bei der Translation hin. Mittels Glycerolgradienten von Zellextrakten wurde endogenes Ighmbp2 in großen zytosolischen Ribonukleoproteinkomplexen (RNP) *in vivo* nachgewiesen. In diesen Komplexen wurden neben anderen Bestandteilen des Translationsapparates Komponenten gefunden, die entweder zur großen (60S) oder kleinen (40S) ribosomalen Untereinheit gehören. IGHMBP2 interagiert weiterhin mit 80S-Ribosomen, was darauf hinweist, dass IGHMBP2 zu einem frühen Zeitpunkt der Translation, möglicherweise bei der Translationsinitiation, eine Rolle spielt.

PUBLIKATION 9: Guenther U-P, Handoko L, Laggerbauer B, Jablonka S, Chari A, Alzheimer M, Ohmer J, Plöttner O, Gehring N, Sickmann A, von Au K, Schuelke M, Fischer U (2009)
IGHMBP2 is a ribosome-associated helicase inactive in the neuromuscular disorder distal SMA type 1 (DSMA1).
Hum Mol Genet 18:1288-1300 (*Koautorenschaft*)

In der letzten Arbeit werden Langzeitverläufe von Patienten mit einer infantilen Form der SMARD1 beschrieben. Die älteste Patientin, die wir kennen, wird dieses Jahr 16 Jahre alt. Nach einer innerhalb der ersten zwei Jahre rasch progredienten Verschlechterung der Erkrankung erreichen alle Patienten eine anhaltende Plateauphase ihrer erhaltenen Restfunktionen. Das Niveau dieser Plateauphase differiert jedoch, so lernten einige der Patienten sprechen und können den Kindergarten oder die Schule besuchen, andere hingegen können nur durch Blinzeln mit den Augenlidern kommunizieren. Eine Patientin vermag es, bis zu 12 Stunden täglich spontan zu atmen, alle anderen SMARD1-Patienten werden dauerhaft beatmet. Einige Patienten können einen Stift halten und die Hand zum Mund führen, andere sind vollständig gelähmt. Die Restfunktionen im Alter von drei Monaten lassen vorsichtig eine Vorhersage auf Restfunktionen im Alter von einem und vier Jahren zu.

Bisher gelang noch keine nähere Aussage zur Genotyp-Phänotyp-Relation der SMARD1, so dass wir uns dem Thema in dieser Arbeit erneut zuwandten. Wir wählten *IGHMBP2*-Mutationen aus, die bei SMARD1-Patienten mit unterschiedlichem klinischen Verlauf der Erkrankung auftraten und untersuchten die *IGHMBP2*-Mutanten hinsichtlich ihrer enzymatischen Restaktivität. Wir konnten zeigen, dass Patienten mit einem milderem Phänotyp einer infantilen SMARD1 Mutationen tragen, die eine enzymatische Restfunktion des *IGHMBP2* zulassen.

PUBLIKATION 10: Eckart M, Guenther U-P, Idkowiak J, Varon R, Grolle B, Boffi P, Van Maldergem L, Hübner C, Schuelke M, von Au K (2012)
The natural course of infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1).
Pediatrics 129:1-9

3. Diskussion

Klassifikation der SMARD1

Anhand der unterschiedlichen Nomenklatur erkennt man bereits, dass eine genaue Klassifikation der spinalen Muskelatrophie mit Atemnot („respiratory distress“) Typ 1 (SMARD1) anfangs schwierig war, da noch keine Daten zur genetischen Ursache und Pathophysiologie der Erkrankung vorlagen. Allein an der Menge eingesandter DNA-Proben von Patienten mit dem Phänotyp einer spinalen Muskelatrophie (SMA) und einer Ateminsuffizienz, die keine Deletionen im *SMN1*-Gen, welches für die klassische SMA verantwortlich ist (Lefebvre et al. 1995), hatten, konnten wir erkennen, dass es neben der großen Gruppe der SMA weitere, unbekannte Vorderhornkrankungen gibt, die es noch klinisch zu beschreiben und genetisch aufzuklären galt. Zunächst uns auf den Terminus diaphragmale SMA beschränkend, fanden wir rasch heraus, dass die diaphragmale SMA genetisch heterogen ist. Wir konnten eine Form der diaphragmalen SMA auf Chromosom 11q13 kartieren und zwei Jahre später den Gendefekt der Erkrankung, autosomal-rezessive Mutationen im *IGHMBP2*-Gen, identifizieren. Wir bezeichneten die Form der diaphragmalen SMA, die durch Mutationen im *IGHMBP2*-Gen verursacht wird, infantile spinale Muskelatrophie mit Atemnot („respiratory distress“) Typ 1 (SMARD1).

Die Abgrenzung der spinalen Muskelatrophien von den peripheren Neuropathien ist fließend. So benutzt man den Begriff der distalen spinalen Muskelatrophie (dSMA) synonym zur distalen peripheren Neuropathie. Einzelne SMARD1-Patienten wurden unter dem Bild einer infantilen Neuropathie publiziert, z.B. 2001 von Wilmshurst („Severe infantile axonal neuropathy with respiratory failure“) oder Mohan („Inherited early onset severe axonal polyneuropathy with respiratory failure“), 2003 von Pitt („Severe infantile neuropathy with diaphragmatic weakness“) und 2004 von Appleton („Congenital peripheral neuropathy presenting as apnoea and respiratory insufficiency“). Später wurde die SMARD1 auch als „distale hereditäre motorische Neuropathie Typ 6, dHMN VI“ in die Klassifikation der Neuropathien aufgenommen (siehe Rossor et al. 2012). In anderen Arbeitsgruppen wurden im Verlauf noch weitere, klinisch ähnliche Erkrankungen charakterisiert, so dass OMIM sämtliche neu beschriebenen Erkrankungen einschließlich der SMARD1 einer neuen Klassifikation zuführte, den distalen spinalen Muskelatrophien (DSMA1-5), bei denen die SMARD1 in DSMA1 umbenannt wurde. Die DSMA2 wurde 2000 durch Christodoulou und Mitarbeiter auf Chromosom 9p21.1-p12 lokalisiert (Christodoulou et al. 2000). Der

Gendefekt wurde bislang nicht gefunden. Patienten mit einer DSMA2 entwickeln ab dem Alter von 6-10 Jahren zunächst eine Muskelschwäche der unteren Extremitäten, im Verlauf auch der oberen, sowie Pyramidenbahnzeichen. DSMA3 (syn. chronische DSMA) wurde etwas telomer vom *IGHMBP2*-Gen auf Chromosom 11q13.3 kartiert, das verantwortliche Gen aber noch nicht identifiziert (Viollet et al. 2004). Die Patienten entwickeln eine distale Muskelschwäche und später eine diaphragmale Dysfunktion mit einem sehr variablen Manifestationsalter zwischen 6 Monaten und 19 Jahren. Mutationen im „Pleckstrin homology domain-containing protein, family G member 5“ (*PLEKHG5*) verursachen die DSMA4 (Maystadt et al. 2007), eine autosomal-rezessive Erkrankung der Motoneurone, die im Kindesalter beginnt und klinisch zu generalisierter Muskelschwäche und -atrophie mit Denervation führt. 2003 konnte durch Antonellis und Kollegen die Charcot-Marie-Tooth Typ 2D-Erkrankung (CMT2D/DSMA5) mit Mutationen im Glycyl-tRNA-Synthetase-Gen (*GARS*) ursächlich in Verbindung gebracht werden (Antonellis et al. 2003). Die autosomal-dominante Erkrankung führt zu bilateraler Muskelatrophie der Thenar- und der dorsalen Interosseus-Muskulatur der Hände mit einer Manifestation in der Adoleszenz, die zu späterer Einbeziehung der Fuß- und Peronealmuskulatur sowie zu milder Affektion des sensorischen Nervensystems führen kann (Sivakumar et al. 2005).

Die genannten distalen SMA-Erkrankungen werden teilweise ebenfalls in der Klassifikation der distalen hereditären motorischen Neuropathien (dHMN) aufgeführt (Rossor et al. 2012). Rossor gibt eine Übersicht aller Gene und Genloci, die distale HMN verursachen, und merkt an, dass trotz einer großen Zunahme an identifizierten Genen immer noch mehr als 80% aller Patienten mit einer dHMN Mutationen in bislang unbekanntem Genen tragen. Die distalen HMN Typ I, II, V und VII folgen einem autosomal-dominanten Erbgang, die dHMN Typ III, IV und VI sind autosomal-rezessiv und daneben gibt es noch eine X-gebundene dHMN, die durch Mutationen im *ATP7A* („Copper-transporting ATPase 1“)-Gen verursacht wird (Kennerson et al. 2010). Die Zahl der krankheitsverursachenden Gene ist groß. So ordnet Rossor das *GARS*-Gen der dHMN Typ V (entspricht DSMA5, CMT2D) zu, das *IGHMBP2*-Gen, wie bereits oben erwähnt, der dHMN VI. Die von Viollet auf Chromosom 11q13 kartierte DSMA3 entspricht der dHMN III, die von Christodoulou kartierte DSMA2 der „dHMN from the Jerash region of Jordan“. Mutationen im Senataxin (*SETX*)-Gen werden der „dHMN with pyramidal features“ zugeordnet (Moreira et al. 2004, Chen et al. 2004). Wichtige weitere Gene, die distale HMN verursachen, sind das *HSPB1*

(„Heat shock protein B1“)-, das *HSPB3*- und das *HSPB8*-Gen (Evgrafov et al. 2004, Kolb et al. 2010, Irobi et al. 2004). Mutationen im „Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy type 2“ (*BSCL2*)-Gen verursachen die kongenitale generalisierte Lipodystrophie Typ 2 (Agarwal et al. 2003) und die dHMN II und V (Auer-Grumbach et al. 2005). Weitere mit dHMN in Verbindung gebrachte Gene sind das *DCTN1* („p150 subunit of dynactin 1“)-Gen in dHMN VII, das *TRPV4* („Transient receptor vallanoid 4)-Gen in dHMN VII und der „kongenitalen distalen SMA“ und das *DYNC1H1* („Dynein heavy chain 1“)-Gen bei der dHMN I (Puls et al. 2003, Auer-Grumbach et al. 2010, Deng et al. 2010, Landouere et al. 2010, Weedon et al. 2011, siehe auch Rossor et al. 2012, Table 1).

Abgrenzung der SMARD1 von der SMA

Klinisch ist die SMARD1 der klassischen SMA1 ähnlich, jedoch findet man Unterschiede, die die SMARD1 eindeutig von der SMA1 abgrenzbar macht. Bei der SMARD1 kommt es innerhalb des ersten Lebensjahres nach einem oft initial klinisch unauffälligen Intervall zu einer akut einsetzenden Atemnot aufgrund einer Zwerchfellparese. Zeitnah dazu fällt eine zunächst distal betonte und dann generalisierte Muskelschwäche auf. Der akute, oftmals dramatische Beginn hat zum Versterben von Patienten unter der Verdachtsdiagnose „plötzlicher Kindstod“ geführt, und erst ein weiteres betroffenes Geschwister hat die korrekte Diagnose SMARD1 ermöglicht (wie z.B. Familie 2 in Publikation 2). Die Manifestation einer Ateminsuffizienz führt in den meisten Fällen bereits zu einer Intubation und Dauerbeatmung des Patienten, noch bevor die Muskelschwäche manifest wird und die Verdachtsdiagnose einer SMARD1 gestellt werden kann. Eltern und Ärzte müssen über die Interessen eines Kindes entscheiden, welches psychomental gesund an einer irreversiblen Atemlähmung leidet. Dies stellt ein „ethisches Dilemma“ dar (Bush 2006, Giannini et al. 2006). Bevor sich Eltern für eine Tracheotomie ihres Kindes entscheiden, sollte eine sensible und ausführliche Beratung darüber erfolgen, welche langfristigen Veränderungen auf die Familie zukommen.

Auch bei der klassischen SMA1 stehen die Eltern und die Ärzte im Verlauf der Erkrankung dieser Entscheidung gegenüber. Doch anders als bei der SMARD1 spielt der Faktor Zeit eine andere Rolle. Bei der SMA1 treten die Symptome in einer anderen Reihenfolge auf. Primäres Leitsymptom ist die schwere generalisierte Muskelschwäche. Die respiratorische Funktion verschlechtert sich im Verlauf der Erkrankung aufgrund einer Atrophie der interkostalen Atemmuskulatur, nicht primär

aufgrund einer Zwerchfellparese. Die Entscheidung für oder gegen eine Beatmung wird somit zu einem viel späteren Zeitpunkt im Krankheitsverlauf getroffen, welcher für die SMA1 bei $8,6 \pm 12,8$ Lebensmonaten angegeben wird (Bach et al. 2007). Auch haben SMA1-Patienten eine residuelle Zwerchfellfunktion, welche bei vielen Patienten eine primär nicht-invasive Beatmung, z.B. eine nächtliche Maskenbeatmung, möglich macht. Anders bei der SMARD1, bei der aufgrund der vollständigen Zwerchfelllähmung eine Maskenbeatmung langfristig nicht zu einer stabilen Beatmungssituation führen kann. Noch deutlicher wird der klinische Unterschied zur SMA, wenn man die SMARD1 mit der etwas mildereren Verlaufsform SMA2 vergleicht. Zu dem Zeitpunkt, bei dem SMA2-Patienten sitzen gelernt haben, haben sie in der Regel noch keine respiratorischen Probleme. Patienten mit einer infantilen SMARD1 hingegen sind bereits alle dauerhaft über ein Tracheostoma beatmet, bevor sie den Meilenstein des freien Sitzens überhaupt erreichen können. Vergangenes Jahr lernten wir eine SMARD1-Patientin kennen, die teilweise von der Beatmung entwöhnt werden konnte und tagsüber spontan atmet (Publikation 10, Patientin 9). Sie wurde ab ihrem 9. Lebensmonat bis zum 4. Lebensjahr dauerhaft beatmet, dann gelang eine Entwöhnung von der Beatmung für 8 Stunden, später für bis zu 12 Stunden täglich. Dies war eine erstaunliche Nachricht für uns, da wir bislang davon ausgingen, dass eine Wiedererlangung der Spontanatmung bei SMARD1-Patienten nicht möglich sei. Mittels Ultraschalluntersuchung im M-Mode ließ sich bei der 6,5 Jahre alten Patientin eindeutig zeigen, dass ihr Zwerchfell keine Restfunktion besitzt und sie ihre Atemarbeit ausschließlich über die akzessorische Atemmuskulatur leistet. Ihr im Vergleich zu anderen infantilen SMARD1-Patienten milderer Krankheitsverlauf, wie in unserem letzten Artikel (Publikation 10) beschrieben, wird durch eine ausreichende enzymatische Restfunktion des IGHMBP2-Proteins erklärt.

Klinische Heterogenität der SMARD1

Nach wie vor haben wir noch keine genaue Vorstellung von der Prävalenz der SMARD1. Weltweit wurden bislang etwa 65 genetisch gesicherte SMARD1-Patienten publiziert, doch die eigentliche Zahl der Erkrankten wird weitaus höher sein. In ihrer Veröffentlichung 1996 schätzten Rudnik-Schöneborn und Zerres, dass etwa 1% aller Kinder mit einem SMA1-Phänotyp eine Zwerchfellparese aufweisen (Rudnik-Schöneborn et al. 1996). 2011 wurde gar die Diagnose SMARD1 bei einem 20-jährigen Patienten gestellt (Pierson et al. 2011). Klinisch zeigt er einen klassischen

Krankheitsverlauf wie bei der infantilen SMARD1. Er wird seit dem 4. Lebensmonat dauerhaft beatmet und hat außer einer leichten motorischen Restfunktion im Bereich der Schultern und einer wachen Mimik eine vollständige Lähmung. Sicherlich noch weitaus mehr SMARD1-Patienten könnten identifiziert werden, wenn man die Suche nach Patienten mit einer juvenilen SMARD1 intensivieren könnte (Publikation 4 und 8). Da zum Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation das eigentliche Leitsymptom der SMARD1, die Atemnot aufgrund einer Zwerchfellparese, noch nicht ausgeprägt ist, ist die Diagnosefindung bei den juvenilen SMARD1-Patienten schwieriger. So entwickelte eine Patientin, bei der im Alter von 6 Monaten eine Zwerchfellelevation rechts im Röntgen-Thorax diagnostiziert und eine SMARD1 genetisch gesichert werden konnte, bis zum Zeitpunkt der Publikation im Alter von 38 Monaten keine Ateminsuffizienz (Messina et al. 2012). Das Mädchen erreichte den Meilenstein des freien Sitzens mit 14 Monaten und konnte ab dem 27. Lebensmonat mit Hilfe einer Gehhilfe, welche sie am Rumpf stützt, laufen. Sie trägt eine homozygote Splice-Site-Mutation und vermutlich kommt es bei ihr durch diese Mutation ebenfalls nicht, wie bei einer anderen Splice-Site-Mutation gezeigt (Publikation 7), zu einer vollständigen Suppression des Spleißens korrekter Wildtyp-*IGHMBP2*-mRNA, so dass eine Restmenge an normalem, funktionsfähigem IGHMBP2-Protein den Phänotyp der SMARD1 bei dieser Patientin abmildert.

2009 wurde eine intrafamiliäre klinische Heterogenität der SMARD1 beschrieben (Joseph et al. 2009). Joseph stellt Geschwister mit zwei identischen Mutationen im *IGHMBP2*-Gen vor, von denen der Bruder im Rahmen einer akuten Ateminsuffizienz im Alter von 6 Monaten verstarb und die Schwester im Alter von 12 Jahren nur eine milde nächtliche Hypoventilation zeigt. Das Mädchen hatte eine zunächst zeitgerechte frühkindliche motorische Entwicklung mit gehaltenem Stand im Alter von 12 Monaten. Ab dem 19. Lebensmonat manifestierte sich eine distale Muskelschwäche und der Meilenstein des freien Laufens wurde erst mit 27 Monaten erreicht. Ab dem 4. Lebensjahr kam es zu häufigen pulmonalen Infekten, ab dem 8. Lebensjahr traten Essschwierigkeiten auf, die die Anlage einer Ernährungs (PEG)-Sonde nötig machten, und seit dem 8. Lebensjahr ist die Patientin auf den Rollstuhl angewiesen. Dieser intrafamiliäre Unterschied in der Krankheitsausprägung lässt verschiedene Überlegungen zu. Die erste Frage, die sich stellt, ist, ob es einen Einfluss des Geschlechts auf den Phänotyp der SMARD1 gibt. Aus den bisherigen Daten lässt sich erkennen, dass die Geschlechterverteilung etwa 1:1 ist und es keine Unterschiede im klinischen Bild der SMARD1 zwischen weiblichen und männlichen

Patienten gibt. Allerdings muss man anmerken, dass sowohl die von Guenther und Kollegen (Publikation 8) vorgestellte juvenile SMARD1-Patientin, die ihre Gehfähigkeit im Alter von 4 Jahren verlor und ab dem Alter von 11 Jahren eine nächtliche Maskenbeatmung benötigte, als auch die oben beschriebene infantile SMARD1-Patientin, die ab ihrem 7. Lebensjahr täglich 12 Stunden spontan atmen kann (Publikation 10), beide weiblichen Geschlechts sind, was noch keine gültige Aussage erlaubt. Die zweite Möglichkeit, die die unterschiedliche Krankheitsausprägung der beiden Geschwister erklären könnte, ist der Einfluss eines modifizierenden Gens auf den klinischen Verlauf der Erkrankung. Diese Möglichkeit wurde bereits anhand der aus dem Tiermodell der SMARD1 gewonnenen Daten diskutiert (Cox et al. 1998, de Planell-Saguer et al. 2009). Die *nmd* („neuromuscular degeneration“-Maus trägt eine Mutation im Intron 4 des *Ighmbp2*-Gens, die eine Splice-Donor-Site entstehen lässt (Cook et al. 1995), und de Planell-Saguer und Kollegen charakterisierten durch Mapping in eine 0,3 cM große Region auf Maus-Chromosom 13 und anschließendes positionelles Klonieren einen noch nicht identifizierten genetischen Faktor, der den Beginn und die Progression der SMARD1-ähnlichen Erkrankung bei den Mutanten modifiziert. Interessanterweise unterdrückt der Faktor die Motoneurondegeneration in einer semidominanten Weise, hat aber keine Auswirkung auf den Beginn und die Progression einer dilatativen Kardiomyopathie, die bei den *nmd*-Mäusen beobachtet wurde (Maddatu et al. 2004). Die zu der Region synthetisierte genomische Region auf dem menschlichen Chromosom 6 enthält vier tRNA^{Tyr}-Gene und das *ABT1*-Gen, ein wichtiger Faktor für Prä-rRNA-Prozessierung und Maturation von Ribosomen. Die Mechanismen, mit denen der Modifier auf die Motoneurone wirkt, sind unklar. Ausschließen konnten de Planell-Saguer und Kollegen sowohl, dass der Modifier den bei den *nmd*-Mäusen vorliegenden Splicingdefekt repariert, als auch, dass er die IGHMBP2-Proteinmenge anhebt.

Genotyp-Phänotyp-Relation

Anfangs kannten wir nur den schwereren Verlauf der infantilen SMARD1 im Vergleich zum leichteren Phänotyp der juvenilen SMARD1, bei der die respiratorische Problematik gegenüber der Muskelschwäche im Hintergrund steht. In Verlaufsbeobachtungen von infantilen SMARD1-Patienten entdeckten wir, dass auch innerhalb dieser Gruppe mildere und schwerere Krankheitsverläufe auftraten (Publikation 10), so dass wir uns noch einmal mit einer möglichen Genotyp-

Phänotyp-Relation bei der SMARD1 beschäftigten. Der „klassische Verlauf“ der infantilen SMARD1 ist durch den Beginn einer akuten Atemnot innerhalb der ersten 13 Lebensmonate und einer sich parallel dazu entwickelnden Muskelschwäche charakterisiert. Die Krankheit ist bei allen Patienten in den ersten zwei Lebensjahren rasch progredient und stabilisiert sich dann auf einem über Jahre gleich bleibenden Plateau körperlicher Restfunktionen. Wir beobachteten, dass diese Plateauphase innerhalb der infantilen SMARD1-Patienten in ihrem Niveau recht heterogen ist. So haben z.B. Patienten sprechen gelernt und können eine Schule besuchen, andere können nur durch Blinzeln der Augenlider kommunizieren. Manche Patienten können malen und die Hand zum Mund führen, andere sind vollständig gelähmt.

Die Mutationen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese führen (Nonsense-Mutationen), liegen alle weit über das gesamte *IGHMBP2*-Gen verstreut, die meisten Missense-Mutationen hingegen liegen innerhalb der großen Helikase-Domäne. Von der Position der Mutationen innerhalb des *IGHMBP2*-Gens können wir nicht auf den Phänotyp der Patienten schließen. Daher haben wir Missense-Mutationen funktionell untersucht, die wir bei infantilen SMARD1-Patienten mit milderem und schwererem Erkrankungsverlauf identifiziert hatten. Wir konnten zeigen, dass bei den milder betroffenen Patienten eine enzymatische Restaktivität des IGHMBP2-Proteins besteht, entweder eine reine ATPase-Funktion oder eine kombinierte ATPase- und Helikasefunktion, die den Phänotyp abmildert (Publikation 9 und 10). Bei der p.T493I-Mutation, die wir heterozygot bei einer juvenilen SMARD1-Patientin fanden, konnten wir nicht nur eine Restaktivität der ATPase und Helikase nachweisen, sondern auch, dass durch die Mutation die intrazelluläre Menge des IGHMBP2-Proteins reduziert ist (Publikation 8). Nach diesen Experimenten konnten wir erstmals eine Genotyp-Phänotyp-Relation zwischen biochemischen Daten der Mutanten und dem klinischen Bild der Erkrankung herstellen.

Funktion des IGHMBP2

Da das IGHMBP2-Protein von einem Housekeeping-Gen kodiert und ubiquitär synthetisiert wird (Fukita et al. 1993, Publikation 5), überraschen neuere Berichte kaum, dass im Krankheitsverlauf neben den Motoneuronen auch andere Organe betroffen sein können. So leidet ein Patient aus Sardinien unter einer „Giant cell hepatitis“ (Fanos et al. 2010), und in unserem Patientenkollektiv wurden immer wieder unklare Transaminasenerhöhungen beobachtet. Bei der *nmd*-Maus konnten Maddatu und wir bereits zeigen, dass IGHMBP2 eine wichtige Rolle nicht nur in den

Motoneuronen, sondern ebenfalls im Muskel, und hier besonders im Herzmuskel und im Zwerchfell, spielt. Lebensbegrenzend für die Mausmutanten waren eine dilatative Kardiomyopathie und respiratorische Insuffizienz aufgrund der Zwerchfelllähmung (Maddatu et al. 2005, Publikation 5). Eine Kardiomyopathie wurde in SMARD1-Patienten bislang noch nicht beobachtet, und insbesondere der oben beschriebene, 20-jährige SMARD1-Patient wird jährlich echokardiographisch ohne pathologischen Befund untersucht (Pierson et al. 2011).

Weshalb die Funktionsverluste der Motoneurone das Krankheitsbild primär bestimmen, ist nach wie vor ein Diskussionspunkt. IGHMBP2 wird der Superfamilie 1 (SF1) der Helikasen zugeordnet. Zu der SF1 gehören Helikasen mit einer DExxQ-Helikase/ATPase Domäne, die aus 7-9 konservierten Sequenzmotiven besteht, einschließlich der sogenannten Walker A- und B-Motive, die mit ATP-Bindung und -Hydrolyse in Verbindung gebracht werden (Cheng et al. 2007). In früheren Arbeiten wurde berichtet, dass IGHMBP2 vorwiegend im Zellkern nachzuweisen sei, und man hat eine Funktion des Proteins in der DNA-Replikation oder -Transkription angenommen (Biswas et al. 2001). Auch eine Rolle bei der mRNA-Prozessierung wurde vermutet (Molnar et al. 1997). Defekte im RNA-Metabolismus werden seit vielen Jahren als ursächlich für Motoneuronerkrankungen diskutiert. Motoneurone sind die längsten und am stärksten polarisierten Zelltypen, die einen effizienten axonalen Transport diverser Zellkomponenten wie Mitochondrien, zytoskeletale und synaptische Vesikelkomponenten und andere Zellorganellen benötigen. Ebenfalls haben sie offenbar eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber veränderter oder reduzierter lokaler Proteinsynthese. Bei Störungen in diesem System kommt es zur axonalen Degeneration und klinischen Ausprägung einer peripheren Neuropathie.

2004 konnten wir Ighmbp2 hauptsächlich im Zytoplasma von Maus-Vorderhornzellen, in den Axonen und den motorischen Endplatten der Motoneurone nachweisen und 2009 eine Kollokalisierung von Ighmbp2 mit dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF4G2 und mit ribosomaler RNA feststellen (Publikation 5 und 9). Ighmbp2 wurde experimentell in großen, zytosolischen Ribonukleoproteinkomplexen (RNP) aufgefunden, und somit eine Assoziation von Ighmbp2 und Ribosomen nachgewiesen. Die Daten weisen auf eine Rolle des Ighmbp2 in der Translation und dort wahrscheinlich in der Translationsinitiation hin. Desweiteren konnte von unserer Arbeitsgruppe erstmals gezeigt werden, dass IGHMBP2 eine aktive, 5'-3'-RNA(/DNA)-Helikase ist (Publikation 9). Der neuronspezifische Phänotyp der SMARD1 ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass IGHMBP2

insbesondere in Motoneuronen benötigt wird, um effizient gewisse mRNAs, z.B. solche mit ausgeprägten Sekundär- und Tertiärstrukturen, zu translatieren. Alternativ könnte es neben der Funktion von IGHMBP2 in allen Körperzellen noch eine zusätzliche, neuronenspezifische Funktion des Proteins geben, wie z.B. in der mRNA-Lokalisation oder der lokalisierten Proteinsynthese, z.B. - in Analogie zur klassischen spinalen Muskelatrophie - in den motorischen Endplatten (Rossoll et al. 2003).

Fast zeitgleich veröffentlichte die Arbeitsgruppe um de Planell-Saguer, dass IGHMBP2 mit tRNAs, und von ihnen insbesondere mit tRNA^{Tyr} assoziiert, sowie mit TFIIIC220, einem Transkriptionsfaktor für die RNA-Polymerase III, die eine wichtige Rolle bei der Transkription von tRNA-Genen spielt (de Planell-Saguer et al. 2009). Die Verbindung zwischen Defekten in Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und Neuropathien stellte erstmals Antonellis her, der fand, dass Mutationen in der Glycyl-tRNA-Synthetase für die Charcot-Marie-Tooth Typ 2D (CMT2D/DSMA5/dHMNV)-Erkrankung verantwortlich sind (Antonellis et al. 2003). Glycyl-tRNA-Synthetase katalysiert die Aminoacetylierung von Glycyl-tRNA und ist somit für die korrekte Translation durch Insertion von Glycin in die Aminosäurekette verantwortlich. Antonellis diskutiert, dass der Phänotyp dieser Erkrankungen durch einen generellen Effekt in der Translationseffizienz verursacht sein kann. Zellen mit langen Axonen würden möglicherweise vulnerabler auf eine allgemeine Reduktion der Proteinprodukte in den Axonterminalen reagieren als andere Körperzellen. Da manche Proteine, die eine Rolle im axonalen Transport spielen, hochkonservierte glycinreiche CAP-Gly (Cytoskeleton-assoziierte Proteine)-Motive besitzen, die verantwortlich für die Bindung der Proteine an die Mikrotubuli während ihres axonalen Transportweges sind, könnten Motoneurone auch einen erhöhten Bedarf speziell an glycinreichen Proteinen haben. 2006 konnte Antonellis in weiterführenden Experimenten GARS, an Granula assoziiert, in Axonen von Maus-Motoneuronen lokalisieren (Antonellis et al. 2006). Er diskutiert, dass die GARS-assoziierten Granula (deren Struktur bzw. Inhalt noch nicht genauer identifiziert werden konnten) die lokale Translation erleichtern könnten. Da *GARS*-Mutationen die Assoziation von GARS und Granula aufheben können, ist es möglich, dass die richtige Lokalisation von GARS in den Granula und der Transport der Granula in die Peripherie der Axone essentiell für deren Erhalt sind. Diese Theorie wird unterstützt durch ähnliche Beobachtungen von Jordanova, die Mutationen im *YARS*- (Tyrosyl-tRNA-Synthetase)-Gen bei der dominanten intermediären CMT Typ C (DI-CMTC) identifiziert hat

(Jordanova et al. 2006). Und auch die rRNA-Synthetasen AARS (Alanyl-tRNA-Synthetase) und die KARS (Lysyl-tRNA-Synthetase) werden mit den peripheren Neuropathien CMT2N und RI-CMTB in Verbindung gebracht (Latour et al. 2010, McLaughlin et al. 2010).

Mutationen im *Senataxin* (*SETX*)-Gen verursachen die autosomal-rezessive „Ataxia-Oculomotor-Apraxia 2“ (AOA2) und die dominante juvenile amyotrophe Lateralsklerose Typ 4 (ALS4) (bzw. „dHMN with pyramidal features“) (Moreira et al. 2004, Chen et al. 2004). Das Senataxin ist interessant, da es eine C-terminale Helikasedomäne besitzt, die 42% Homologie zu der des IGHMBP2 zeigt. Anders als IGHMBP2 wurde Senataxin neben einer diffusen zytoplasmatischen Lokalisation hauptsächlich in den Nukleoli der Zellkerne nachgewiesen, was eine Rolle des Proteins in der rRNA-Maturation und Ribosomenbiogenese wahrscheinlich macht (Chen et al. 2006). Kürzlich sind Mutationen im *SETX*-Gen ebenfalls bei der autosomal-dominanten proximalen spinalen Muskelatrophie (ADSMA) mit juvenilem oder adulten Beginn nachgewiesen worden (Rudnik-Schöneborn et al. 2012).

Therapie der SMARD1

Bisher gibt es keine kurative Therapie der Erkrankung SMARD1, wohl aber vielversprechende experimentelle Ansätze. Corti und Kollegen konnten zeigen, dass eine Transplantation multipotenter Stammzellen aus embryonalem Mausrückenmark wirkungsvoll den Phänotyp der SMARD1 bei *nmd*-Mäusen abmildert (Corti et al. 2006, 2009). Ein anderer Ansatz wurde von Ruiz und Kollegen 2005 vorgestellt. Die Behandlung von *nmd*-Mäusen mit einem monoklonalen Antikörper mit agonistischen Effekten auf den Tyrosinkinase-Rezeptor C (trkC, dem Rezeptor für Neurotrophin 3, NT-3) hatte einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf. Die trkC-Antikörper wurden den Mäusen ab dem Alter von 3 Wochen (postnataler Tag 20) zweimal wöchentlich intraperitoneal appliziert. Meines Erachtens nach ist der Beginn der Therapie zeitlich zu spät. Im Alter von 3 Wochen hat die *nmd*-Maus bereits einen 40%-igen Verlust von Vorderhornzellen und befindet sich damit bereits in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, obgleich erst ab diesem Zeitpunkt die Muskelschwäche klinisch relevant wird (Publikation 5, Figure 2C).

Eine erste Veröffentlichung zu einer möglichen Gentherapie der SMARD1 erfolgte 2004 von Maddatu und Kollegen, die einen transgenen „Rescue“ der neuromuskulären Degeneration bei *nmd*-Mutanten erzielten (Maddatu et al. 2004).

Transgene Mausmutanten, die full-length *Ighmbp2*-cDNA in Neuronen exprimierten, zeigten einen vollständigen Erhalt ihrer Motoneurone.

Kürzlich fand ein internationales Treffen von Ärzten und Wissenschaftlern statt, die sich mit der SMARD1 beschäftigten (190th ENMC- International Workshop: SMA-RD Type 1, 11.-13.05.12, Naarden, Niederlande). Wir tauschten uns über den klinischen Verlauf der SMARD1, Therapieoptionen und die neuesten Forschungsergebnisse aus. Mit ihnen zusammen plane ich, eine internationale Datenbank für SMARD1-Patienten einzurichten, um neue Patienten aus allen Ländern erfassen und die Langzeitverläufe weiterführend studieren zu können. Wir besprachen den aktuellen Stand der Forschung zur SMARD1 und verständigten uns auf neue Kooperationen mit dem Ziel, spezifische Strategien für die Behandlung der SMARD1 zu entwickeln.

4. Zusammenfassung

Bei neuromuskulären Erkrankungen des frühen Kindesalters, die mit einer Zwerchfellparese einhergehen, muss der Kliniker differentialdiagnostisch an verschiedene Erkrankungen denken. Zu ihnen gehören unter anderen die kongenitalen Myopathien mit früher Ateminsuffizienz, darunter insbesondere die Nemale- und die X-gebundene myotubuläre Myopathie, die „Myopathie mit Areflexie, Atemnot und Dysphagie“ (Logan et al. 2011), die kongenitale myotone Dystrophie, die kongenitalen Myasthenien und die spinale Muskelatrophie mit Atemnot Typ 1 (SMARD1).

In den vergangenen Jahren ist es uns gelungen, die letztgenannte Erkrankung umfassend zu charakterisieren. In Kontakt mit der SMARD1 kamen wir 1997, als wir eine Patientin in der Klinik betreuten, die ab dem Alter von 6 Wochen eine Ateminsuffizienz entwickelte, dann eine Muskelschwäche und seit dem Alter von 8 Wochen dauerhaft beatmet wird. Das Mädchen ist das vierte Kind konsanguiner Eltern. Der älteste Bruder verstarb unter dem klinischen Bild eines „plötzlichen Kindstodes“, und nach der Indexpatientin wurden weitere drei erkrankte Geschwister geboren. Wir untersuchten diese Familie sowie zwei weitere Familien mit einem ähnlichen Krankheitsbild mittels einer genomweiten Kopplungsanalyse und konnten die diaphragmale SMA, die wir spinale Muskelatrophie mit Atemnot („with respiratory distress“) (SMARD) nannten, in eine 31 cM große Region auf Chromosom 11q13-q21 kartieren und später den Gendefekt, Mutationen im Immunoglobulin μ -bindenden Protein 2 (*IGHMBP2*)-Gen, identifizieren. Wir nannten die SMARD, die durch Mutationen im *IGHMBP2*-Gen verursacht wird, SMARD Typ 1 (SMARD1). Findet sich bei Patienten nach Sequenzierung aller Exons und der Exon-Intron-Grenzen des *IGHMBP2*-Gens nur auf einem Allel eine compound heterozygote Mutation, sollte das zweite Allel auf große Deletionen oder genomische „Rearrangements“ überprüft werden. Eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass *IGHMBP2*-Mutationen bei einem Patienten mit einem SMARD-Phänotyp nachgewiesen werden können, besteht bei einer Befundkonstellation: „Manifestation der Ateminsuffizienz zwischen 6 Lebenswochen und 6 -monaten“ UND („Vorhandensein einer Zwerchfelleventration“ ODER „Frühgeburtlichkeit“).

Hauptsymptom der infantilen SMARD1 ist eine Ateminsuffizienz aufgrund einer Zwerchfellparese, die innerhalb der ersten 13 Lebensmonate auftritt und bei allen

Kindern eine Tracheotomie und Langzeitbeatmung erforderlich macht. Bisher konnte nur eine uns bekannte Patientin bis zu 12 Stunden täglich von der Beatmung entwöhnt werden. Erste klinische Anzeichen der SMARD1 können eine Trinkschwäche, ein schwaches Schreien und ein inspiratorischer Stridor sein. Eine intrauterine Wachstumsretardierung, eine Frühgeburtlichkeit und schwache Kindsbewegungen können bereits früh auf die Erkrankung hinweisen. Die Patienten entwickeln eine zunächst distal betonte, dann generalisierte Muskelschwäche, die meist an den unteren Extremitäten beginnt. Die Hirnnerven können betroffen sein, welches sich in Form von Zungenfaszikulationen und mimischer Schwäche zeigt. Auch die Sensibilität kann beeinträchtigt sein, ebenfalls zeigt das autonome Nervensystem Auffälligkeiten im Sinne exzessiven Schwitzens, Obstipation, Blasenentleerungsstörungen und kardialen Arrhythmien. Nach einer innerhalb der ersten zwei Jahre rasch progredienten Verschlechterung der Erkrankung erreichen alle Patienten eine anhaltende Plateauphase ihrer erhaltenen körperlichen Restfunktionen, die aber interindividuell differiert.

Neben der klassischen Verlaufsform der SMARD1 beobachten wir eine mildere Variante der Erkrankung, die hauptsächlich durch eine deutlich spätere Manifestation der Atemnot charakterisiert ist und die wir als juvenile SMARD1 von der infantilen Verlaufsform abgrenzen. Bei juvenilen SMARD1-Patienten konnte eine höhere restliche IGHMBP2-Proteinmenge nachgewiesen werden.

Histologisch finden wir bei den Patienten eine Degeneration der Vorderhornzellen im Rückenmark, eine axonale Atrophie und Waller'sche Degeneration in gemischten Nerven und Auffälligkeiten, die typischerweise bei peripheren Neuropathien auftreten, wie Hypo- und Hypermyelinisierungen. Die motorischen Endplatten sind denerviert und die Muskelfasern klein als Ausdruck einer schweren neurogenen Atrophie.

Für Studien zur Pathophysiologie haben wir auf das Tiermodell der SMARD1, die *nmd* (neuromuscular degeneration)-Mausmutante zurückgegriffen. Aus dem Tiermodell konnten wir unter anderem lernen, dass der Motoneuronenuntergang auf Höhe des Zellkörpers im Vorderhorn des Rückenmarks beginnt und sich rasch entlang des Axons ausbreitet. Kultivierte Motoneurone von Mutanten und gesunden Mäusen zeigten keinen Unterschied im Axonwachstum und Überleben in Zellkultur, was darauf hindeutet, dass fehlendes Ighmpb2 noch keinen Einfluss auf die frühe embryonale Entwicklung der Motoneurone hat und diese erst, nachdem sie schon

einen Axon-Muskel-Kontakt hergestellt haben, im Verlauf, wenn auch früh, ab Maus-Postnataltag 10, degenerieren.

IGHMBP2 gehört zur Superfamilie 1 der Helikasen. Wir konnten zeigen, dass IGHMBP2 eine aktive, ATP-abhängige 5'-3'-Helikase ist, die RNA und DNA-Duplices *in vitro* entwinden kann. Mutantes IGHMBP2 zeigt in den meisten Fällen einen vollständigen Verlust der ATP-ase und Helikase-Aktivität und bei Patienten mit einem milderem Phänotyp einer infantilen SMARD1 oder einer juvenilen SMARD1 konnte eine enzymatische Restaktivität des IGHMBP2 nachgewiesen werden. Weiterhin konnten wir zeigen, dass IGHMBP2 eine Rolle bei der Translation und dort wahrscheinlich zu einem frühen Zeitpunkt, möglicherweise bei der Translationsinitiation, spielt.

Insbesondere die Langzeitverlaufsbeobachtungen zur SMARD1, die wir in unserem letzten Artikel beschreiben, zeigten uns noch einmal deutlich, dass die Kinder eine den Krankheitsumständen entsprechende gute soziale Integration erleben können. Die vorgestellten Studien geben uns die Möglichkeit einer konkreten Beratung und Hilfestellung für Eltern und Ärzte betroffener SMARD1-Patienten.

5. Literaturangaben aus dem freien Text

- Agarwal AK, Simha V, Oral EA et al. (2003) Phenotypic and genetic heterogeneity in congenital generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4840-4847
- Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N et al. (2003) Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am J Hum Genet* 72:1293-1299
- Antonellis A, Lee-Lin S-Q, Wasterlain A, Leo P et al. (2006) Functional analyses of Glycyl-tRNA synthetase mutations suggest a key role for tRNA-charging enzymes in peripheral axons. *J Neurosci* 26:10397-10406
- Appleton RE, Hubner C, Grohmann K, Varon R (2004) Congenital peripheral neuropathy presenting as apnoea and respiratory insufficiency: spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Dev Med Child Neurol* 46:576
- Auer-Grumbach M, Schlotter-Weigel B, Lochmuller H et al. (2005) Phenotypes of the N88S Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 mutation. *Ann Neurol* 57:415-424
- Auer-Grumbach M, Olschewski A, Papic L et al. (2010) Alterations in the ankyrin domain of TRPV4 cause congenital distal SMA, scapulooperoneal SMA and HMSN2C. *Nat Genet* 42:160-164
- Bach JR, Saltstein K, Sinquee D, Weaver B, Komaroff E (2007) Long-term survival in Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Phys Med Rehabil* 86:339-345
- Bertini E, Gadiisseux JL, Palmieri G et al. (1989) Distal infantile spinal muscular atrophy associated with paralysis of the diaphragm: a variant of infantile spinal muscular atrophy. *Am J Med Genet* 33:328-335
- Biswas EE, Nagele RG, Biswas S (2001) A novel human hexameric DNA helicase: expression purification and characterization. *Nucleic Acids Res* 29:1733-1740
- Brunialti AL, Poirier C, Schmalbruch H, Guénet J-L (1995) The mouse mutation progressive motor neuronopathy (*pnn*) maps to chromosome 13. *Genomics* 29:131-135

- Bush A (2006) Spinal muscular atrophy with respiratory disease (SMARD1): an ethical dilemma. *Intensive Care Med* 32:1691-1693
- Chen Y-Z, Bennett CL, Huynh HM et al. (2004) DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet* 74:1128-1135
- Chen Y-Z, Hashemi SH, Anderson SK et al. (2006) Senataxin, the yeast Sen1p orthologue: Characterization of a unique protein in which recessive mutations cause ataxia and dominant mutations cause motor neuron disease. *Neurobiology of Disease* 23:97-108
- Cheng Z, Muhlrads D, Lim MK, Parker R, Song H (2007) Structural and functional insights into the human Upf1 helicase core. *EMBO J* 26:253-264
- Christodoulou K, Zamba E, Tsingis M et al. (2000) A novel form of distal hereditary motor neuropathy maps to chromosome 9p21.1-p12. *Ann Neurol* 48:877-884
- Cook SA, Johnson KR, Bronson RT, Davisson MT (1995) Neuromuscular degeneration (*nmd*): a mutation on mouse chromosome 19 that causes motor neuron degeneration. *Mamm Genome* 6:187-191
- Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D et al. (2006) Transplanted $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ neural stem cells generate motor neurons and delay disease progression of *nmd* mice, an animal model of SMARD1. *Hum Mol Genet* 15:167-187
- Corti S, Nizzardo M, Nardini M et al. (2009) Motoneuron transplantation rescues the phenotype of SMARD1 (spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1). *J Neurosci* 29:11761-11771
- Cox GA, Mahaffey CL, Frankel WN (1998) Identification of the mouse neuromuscular degeneration gene and mapping of a second site suppressor allele. *Neuron* 21:1327-1337
- Deng HX, Klein CJ, Yan J et al. (2010) Scapuloperoneal spinal muscular atrophy and CMT2C are allelic disorders caused by alterations in TRPV4. *Nat Genet* 42:165-169
- De Planell-Saguer M, Schroeder DG, Rodicio MC, Cox GA, Mourelatos Z (2009) Biochemical and genetic evidence for a role of IGHMBP2 in the translational machinery. *Hum Mol Genet* 18:2115-2126

- Evgrafov OV, Mersiyanova I, Irobi J et al. (2004) Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet* 36:602-606
- Fanos V, Cuccu A, Nemolato S, Marinelli V, Faa G (2010) A new nonsense mutation of the IGHMBP2 gene responsible for the first case of SMARD1 in a Sardinian patient with giant cell hepatitis. *Neuropediatrics* 41:132-134
- Giannini A, Pinto AM, Rossetti G et al. (2006) Respiratory failure in infants due to spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Intensive Care Med* 32:1851-1855
- Irobi J, Van Impe K, Seeman P et al. (2004) Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet* 36:597-601
- Jordanova A, Irobi J, Thomas FP et al. (2006) Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nat Genet* 38:197-202
- Joseph S, Robb SA, Mohammed S et al. (2009) Interfamilial phenotypic heterogeneity in SMARD1. *Neuromuscul Disord* 19:193-195
- Kennerson ML, Nicholson GA, Kaler SG et al. (2010) Missense mutations in the copper transporter gene ATP7A cause X-linked distal hereditary motor neuronopathy. *Am J Hum Genet* 86:343-352
- Kolb SJ, Snyder PJ, Poi EJ et al. (2010) Mutant small heat shock protein B3 causes motor neuropathy: utility of a candidate gene approach. *Neurology* 74:502-506
- Landoure G, Zdebik AA, Martinez TL et al. (2010) Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C. *Nat Genet* 42:170-174
- Latour P, Thauvin-Robinet C, Baudalet-Mery C et al. (2010) A major determinant for binding and aminoacylation of tRNA(Ala) in cytoplasmic Alanyl-rRNA synthetase is mutated in dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet* 86:77-82
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80:155-165

- Logan CV, Lucke B, Pottinger C et al. (2011) Mutations in *MEGF10*, a regulator of satellite cell myogenesis, cause early onset myopathy, areflexia, respiratory distress and dysphagia (EMARDD). *Nat Genet* 43:1189-1192
- Maddatu TP, Garvey SM, Schroeder DG, Hampton TG, Cox GA (2004) Transgenic rescue of neurogenic atrophy in the *nmd* mouse reveals a role for *lghmbp2* in dilated cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 13:1105-1115
- Maddatu TP, Garvey SM, Schroeder DG et al. (2005) Dilated cardiomyopathy in the *nmd* mouse: transgenic rescue and QTLs that improve cardiac function and survival. *Hum Mol Genet* 14:3179-3189
- Maystadt I, Rezsöházy R, Barkats M et al. (2007) The nuclear factor kappaB-activator gene PLEKHG5 is mutated in a form of autosomal recessive lower motor neuron disease with childhood onset. *Am J Hum Genet* 81:67-76
- McLaughlin HM, Sakaguchi R, Liu C et al. (2010) Compound heterozygosity for loss-of-function lysyl-rRNA synthetase mutations in a patient with peripheral neuropathy. *Am J Hum Genet* 87:560-566
- Mellins RB, Hays AP, Gold AP, Berdon WE, Bowdler JD (1974) Respiratory distress as the initial manifestation of Werdnig-Hoffmann disease. *Pediatrics* 53:33-40
- Messina MF, Messina S, Gaeta M et al. (2012) Infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type I (SMARD1): An atypical phenotype and review of the literature. *Eur J Ped Neurol* 16:90-94
- Mohan U, Misra VP, Britto J et al. (2001) Inherited early onset severe axonal polyneuropathy with respiratory failure and autonomic involvement. *Neuromuscul Disord* 11:395-399
- Molnar GM, Crozat A, Kraeft SK et al. (1997) Association of the mammalian helicase MAH with the pre-mRNA splicing complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7831-7836
- Moreira MC, Klur S, Watanabe M et al. (2004) Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat Genet* 36:225-227

- Pierson TM, Tart G, Adams D et al. (2011) Infantile-onset spinal muscular atrophy with respiratory distress-1 diagnosed in a 20-year-old man. *Neuromuscul Disord* 21:353-355
- Pitt M, Houlden H, Jacobs J et al. (2003) Severe infantile neuropathy with diaphragmatic weakness and its relationship to SMARD1. *Brain* 126:2682-2692
- Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH et al. (2003) Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 33:455-456
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C et al. (2003) Smn the spinal muscular atrophy-determining gene product modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 163:801-812
- Rossor AM, Kalmar B, Greensmith L, Reilly MM (2012) The distal hereditary motor neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83:6-14
- Rudnik-Schöneborn, Forkert R, Hahnen E, Wirth B, Zerres K (1996) Clinical spectrum and diagnostic criteria of infantile spinal muscular atrophy: further delineation on the basis of SMN gene deletion findings. *Neuropediatrics* 27:8-15
- Rudnik-Schöneborn S, Arning L, Epplen JT, Zerres K (2012) SETX gene mutation in a family diagnosed autosomal dominant proximal spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 22:258-262
- Ruiz R, Lin J, Forgie A et al. (2005) Treatment with trkC agonist antibodies delays disease progression in neuromuscular degeneration (*nmd*) mice. *Hum Mol Genet* 14:1825-1837
- Sivakumar K, Kyriakides T, Puls I et al. (2005) Phenotypic spectrum of disorders associated with glycyl-tRNA synthetase mutations. *Brain* 128:2304-2314
- Viollet L, Zarhrate M, Maystadt I et al. (2004) Refined genetic mapping of autosomal recessive chronic distal spinal muscular atrophy to chromosome 11q13.3 and evidence of a linkage disequilibrium in European families. *Eur J Hum Genet* 12:483-488
- Weedon MN, Hastings R, Caswell R et al. (2011) Exome sequencing identifies a DYNC1H1 mutation in a large pedigree with dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet* 89:308-312

Wilmshurst JM, Bye A, Rittey C et al. (2001) Severe infantile axonal neuropathy with respiratory failure. *Muscle Nerve* 24:760-768

Danksagung

Mein großer Dank gilt allen, die mich auf meinem beruflichen und privaten Weg begleitet haben. Vorneweg danke ich Herrn Prof. Dr. Christoph Hübner aus der Kinderneurologie der Charité Berlin, mit dem ich seit 1997 Seite an Seite die Erkrankung SMARD1 verfolge, der mir immer wieder freie Zeit für die Forschung einräumte und der mich wunderbar zu motivieren vermag. Meine ersten Kenntnisse in der Genetik der SMARD1 verdanke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Wienker, Frau Dr. Kathrin Saar und Frau Prof. Dr. Katrin Hoffmann, sowie den Aachenern Genetikern Frau Prof. Dr. Sabine Rudnik-Schöneborn und Herrn Prof. Dr. Klaus Zerres, denen ich allen von Herzen danke. Mit Herrn Prof. Dr. Markus Schülke und Herrn Dr. Alexander Diers zusammen fand ich die ersten SMARD1-Patientenmutationen und mit Herrn Prof. Dr. Schülke entwickelte sich eine sehr gute, anhaltende Zusammenarbeit. Die Mutationsanalyse wurde im Laufe der Zeit dankenswerterweise von Frau Dr. Raymonda Varon aus dem Institut für Humangenetik der Charité übernommen. Die Methoden der Histologie und deren Auswertung lernte ich von der Pieke auf von Frau Prof. Dr. Gisela Stoltenburg-Didinger (Neuropathologie Berlin), Herrn Prof. Dr. Rudolf Martini und Herrn Dr. Igor Kobsar (die Mauthistologie in der Neurologie, Würzburg).

Mein Weg führte mich von Berlin nach Würzburg in das Labor für Klinische Neurobiologie in eine für mich neue Welt voller Mausmutanten, Zellkulturen und Kaninchen zur Antikörpergeneration. Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael Sendtner für anregende, interessante und ausfüllende Jahre in seinem Labor und meinen engen Kollegen Herrn Dr. Wilfried Rossoll, Frau Dr. Paraskevi Zisimopoulou, Frau Dr. Bettina Holtmann und Frau PD Dr. Sibylle Jablonka für eine wunderschöne, kollegiale Zeit. Weiter zog es mich noch in die Bereiche tiefster Biochemie in das Labor von Herrn Prof. Dr. Utz Fischer, in dem wir uns ganz dem IGHMBP2-Protein widmeten und hartnäckig seine vielen Seiten erforschten. Ich danke für eine schöne Zeit dort Herrn Prof. Dr. Utz Fischer, Frau Dr. Lusy Handoko, Herrn Dr. Bernhard Laggerbauer und Herrn Dr. Bastian Linder.

Zurück in Berlin ging es (neben der weiteren Facharztausbildung) im Rahmen meines Rahel-Hirsch-Stipendiums im Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum (NWFZ) der Charité weiter, dort mit zwei tollen Arbeitskollegen Herrn Dr. Ulf-Peter Günther und Frau Susanne Lützkendorf. Insbesondere Herrn Dr. Günther danke ich für seine großartigen Arbeiten zur SMARD1, siehe oben!

Für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungstätigkeit danke ich der Charité, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Elternselbsthilfegruppe „Helft dem muskelkranken Kind, Hamburg e.V.“.

Und zuletzt danke ich noch meiner Doktorandin Frau Maria Eckart für die gute gemeinsame Zeit auf unseren Reisen zu den Patienten. Und diesen und ihren Familien möchte ich von Herzen für die jahrelange Zusammenarbeit danken und ihnen alles Gute für die Zukunft wünschen!

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 28. Mai 2012

Dr. med. Katja von Au