

1 Einleitung

1.1 Die Ceroidlipofuscinosen

1.1.1 Einführung

Die neuronalen Ceroidlipofuscinosen (CLN) sind eine heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen mit intrazellulärer Speicherung eines biochemisch und morphologisch definierten Materials (Ceroid und Lipofuscin). Mit einer ungefähren weltweiten Inzidenz von 1:12.500 gehören sie zu den häufigeren progressiven, autosomal-rezessiven, neurodegenerativen Erkrankungen im Kindesalter (Dyken et al. 1983).

Die ersten klinischen Beschreibungen erfolgten durch Stengel (1826), Batten (1903), Vogt (1905) und andere im 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts. Damals wurde die familiäre Erkrankung, die mit Blindheit, kirschrotem Macula-Fleck, Lipidspeicherung und Anfallsleiden einherging zusammen mit den Gangliosidosen als „Familiäre amaurotische Idiotie“ bezeichnet (Sachs, 1896). Die Bezeichnung neuronale Ceroidlipofuscinose (CLN oder englisch NCL) wurde eingeführt durch Zeman und Dyken (1969), um die Untergruppe der „amaurotischen Idiotien“, bei der das Speichermaterial biochemisch und ultrastrukturell Ähnlichkeit mit den Lipopigmenten Ceroid und Lipofuscin hatte, von den Gangliosidosen abzugrenzen. Der Name „*neuronale* Ceroidlipofuscinose“ ist irreführend, da die Akkumulation des Speichermaterials nicht nur in den Neuronen erfolgt, sondern auch in allen anderen Körperzellen. Der Zusatz „neuronal“ hat allerdings eine klinische Berechtigung, da die vorherrschenden Symptome durch die Neurodegeneration bedingt sind. Die morphologischen, ultrastrukturellen und klinischen Besonderheiten der neuronalen Ceroidlipofuscinosen sind seit langem bekannt, die zugrunde liegenden genetischen Defekte konnten aber erst innerhalb der letzten Jahre aufgedeckt werden.

1.1.2 Klassifikation

Bei der Erstbeschreibung der neuronalen Ceroidlipofuscinosen folgte die Klassifikation vor allem nach dem klinischen Erscheinungsbild, dem Manifestationsalter und den

histologischen Besonderheiten. Nach Entdeckung der ultrastrukturellen Einschlusskörper (curvilineäre Membranen bzw. der Fingerabdruck-Profile durch Zeman et al. 1969) konnte die spätinfantile auch morphologisch von der juvenilen Form der CLN abgegrenzt werden. Nach der Aufdeckung der Gendefekte für verschiedene Unterformen der CLN kann die klinische Klassifikation nun einer molekulargenetischen Klassifikation Platz machen. Zurzeit werden in der Literatur vier Hauptformen der Ceroidlipofuscinose beschrieben (Goebel et al. 1999). Die Unterteilung erfolgte auch hier zunächst nach dem Manifestationsalter: **Infantile** Form (INCL, CLN1, MIM 256730, Santavuori-Haltia), **spät-infantile** Form (LINCL, CLN2, MIM 204500, Jansky-Bielschowsky), **juvenile** Form (JNCL, CLN3, MIM 204200, Spielmeyer-Sjögren-Vogt, Batten disease) und **adulte** Form (CLN4, MIM 204300, Morbus Kufs). Mit Ausnahme der adulten Form sind die zugrunde liegenden Gendefekte der Hauptformen inzwischen bekannt.

Im Kindes- und Jugendalter gibt es noch weitere CLN-Formen, die genetisch und hinsichtlich des Speichermaterials von den bereits erwähnten klassischen Hauptformen abweichen. Sie werden als variante Typen bezeichnet: Finnisch-variante spätinfantile Form (CLN5), variant-spätinfantile Form (CLN6), Türkisch-variante spätinfantile Form (CLN7) und Northern Epilepsy Form (CLN8, EPMR).

Typ, Erkrankungsalter und Phänotyp	Ultrastruktur des Speichermaterials	Genlokus, chromosomale Position, Genprodukt und Funktion
Infantile , 6-18 Monate; früher geistiger Abbau, früher Sehverlust, späte Epilepsie (Santavuori et al. 1973)	GROD	<i>CLN1</i> ; 1p32 (Vesa et al. 1995); lysosomale PPT1, welches Lipide beim Proteinabbau entfernt
Juvenile mit GRODs , 4-8 Jahre; später kognitiver Abbau, früher Sehverlust und späte Epilepsie	GROD und/oder CVB und/oder FPP	<i>CLN1</i> ; 1p32; lysosomales PPT
Spätinfantile (klassisch) , 2-4 Jahre; früher kognitiver Abbau, später Sehverlust und frühe Epilepsie (Duffy et al. 1968 und Gonatas et al.	CVB	<i>CLN2</i> ; 11p15 (Sleat et al. 1997); lysosomale <i>CLN2p/TPP1</i> , Pepstatin-insensitive Protease, spaltet Peptidbin-

1968)		dungen, genaues Substrat bisher unbekannt
Juvenile , 4-8 Jahre; später kognitiver Abbau, variabler Sehverlust und späte Epilepsie (Batten, 1903)	FPP	<i>CLN3</i> ; 16p12 (The International Batten Disease Consortium, 1995); Battenin - ein neues Membranprotein unbekannter Funktion
Morbus Kufs , 20+ Jahre; früher geistiger Abbau, kein Sehverlust und entweder frühe Epilepsie oder keine Epilepsie	FPP oder CVB oder GROD	<i>CLN4</i> (Berkovic et al. 1988); unbekannter Genlocus; Funktion unbekannt
Finnisch-spätinfantile , 2-4 Jahre, früher kognitiver Abbau, früher Sehverlust und späte Epilepsie (Pamplione et al. 1977)	FPP und CVB	<i>CLN5</i> ; 13q21.1-q32 (Savukoski et al. 1998); neues Membranprotein unbekannter Funktion
Variante spätinfantile , 2-6 Jahre, früher kognitiver Sehverlust, späte Epilepsie (Lake et al. 1978)	FPP und CVB	<i>CLN6</i> ; 15q21-23 (Sharp et al. 1997); unbekannt
Türkisch-variante spätinfantile , 2-4 Jahre, früher kognitiver Abbau, variabler Sehverlust und variabler Beginn der Epilepsie (Williams et al. 1999)	FPP oder CVB	<i>CLN7</i> (Wheeler et al. 1999) ; Genlocus unbekannt; Funktion unbekannt
Progressive Epilepsie mit mentaler Retardierung , 5-10; später kognitiver Abbau, kein Sehverlust und frühe Epilepsie (Hirvasniemi et al. 1994)	GROD und CVB	<i>CLN8</i> ; 8p23 (Ranta et al. 1999); neues Membranprotein unbekannter Funktion

Tabelle 1: Übersicht der phänotypischen und genetischen Besonderheiten der verschiedenen CLN Unterformen (modifiziert nach L. Bate und M. Gardiner, 1999)

1.1.3 Histopathologie und Biochemie

Ein auffälliges pathologisches Merkmal der an CLN verstorbenen Patienten ist die generalisierte Hirnatrophie mit bis zu 30% reduziertem Gesamtgewicht. Der Grad der Atrophie des zerebralen Kortex und in manchen Fällen des Zerebellums variiert bei den jeweiligen Untergruppen. Der Neuronenverlust ist am ausgeprägtesten bei Patienten mit infantiler und am geringsten bei Patienten adulter Manifestation.

Der Begriff Ceroidlipofuscinose wurde geprägt, da die gespeicherten Substanzen den Lipopigmenten Ceroid und Lipofuscin hinsichtlich ihrer Färbekarakteristik als auch ihrer Autofluoreszenz ähnelten (Zeman und Dyken, 1969). Das am Axonhügel abgelagerte lamellär strukturierte Pigment unterscheidet sich dabei deutlich von dem mehr diffusen Lipofuscin bei physiologischen Alterungsprozessen. Bei starker Anhäufung der Speichersubstanz, die PAS- und Sudanschwarz-positiv und autofluoreszierend ist, kann der Zellkern der Pyramidenzellen an den Rand gedrängt oder sogar das proximale Axon davon aufgetrieben werden. Dabei entstehen sogenannte „nonspiny meganeurites“ (Williams et al. 1977) im Gegensatz zu „spiny meganeurites“, die bei anderen Speichererkrankungen gefunden werden (Purpura und Suzuki, 1976; Walkley et al. 1996). Im zentralen Nervensystem (ZNS) akkumuliert das Lipopigment auch in den Astrozyten und Makrophagen (Jolly et al. 1999), was reaktive Gliosen und inflammatorische Reaktionen hervorruft.

Auch in anderen Geweben wie Knochenmark (Levine et al. 1968), Myocard, Leber, Milz und Sammelrohrethelien der Niere (Zeman et al. 1970), Fibroblasten, Muskulatur (Carpenter et al. 1972), Rektumbiopsien (Schwendemann et al. 1978), Lymphozyten (Aguas et al. 1980) und in Konjunktivalbiopsien (Ceuterik et al. 1984; Cervós-Navarro und Perez-Cantó, 1987) finden sich charakteristische Lipopigmentablagerungen. Der Nachweis dieses Lipopigments in den Chorionzotten betroffener Feten konnte zur Pränataldiagnostik genutzt werden (McLeod et al. 1988), bevor direkte molekulargenetische Methoden zum Mutationsnachweis eingesetzt werden konnten.

In den 60er Jahren haben Zeman und Mitarbeiter durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Hirngewebe pleomorphe Ablagerungen in den Neuronen der Patienten festgestellt. Diese bestanden aus granulärer Struktur bzw. Membranen, die lamellär bzw. fingerabdruckartig angeordnet waren (Zeman et al. 1963, 1969). Auf-

grund der elektronenmikroskopischen Befunde wurde eine Zuordnung der charakteristischen ultrastrukturellen Erscheinungen zu den klinischen Verlaufsformen möglich. Bei der infantilen Ceroidlipofuscinose sind granuläre osmophile Ablagerungen (GRODs) sowohl intra- als auch extraneuronal vorhanden, die sich wie zusammengepackte „Schneebälle“ präsentieren (Haltia et al. 1973). Duffy et al. und Gonatas et al. beschrieben 1968 die curvilineären Einschlusskörperchen bei Patienten mit spätinfantiler CLN. In der juvenilen Form, dem einzigen Subtyp mit lichtmikroskopisch nachweisbaren Vakuolen in den peripheren Lymphozyten (van Bagh und Hortling, 1948), ergibt die ultrastrukturelle Untersuchung des Lipopigments charakteristische Fingerabdruck-Profile (Zeman et al. 1970).

Die elektronenmikroskopischen Studien von Zeman und Mitarbeitern deuteten auf eine Zugehörigkeit der CLN zu den lysosomalen Speicherkrankheiten (Zeman und Siakotos, 1973). Diese Vermutung erhärtete sich durch die positive Darstellung der Lipopigmente mittels PAS- und Sudanschwarz und der Nachweis hoher Aktivität saurer Phosphatasen – typischer lysosomaler Enzyme – in den Lipopigmentgranula (Haltia et al. 1973). Das Speichermaterial besteht zu 40% aus Protein und zu 35% aus Lipiden (Tyynelä et al. 1993). Es wurde nachgewiesen, dass es sich bei dem Hauptprotein um Saposin A und D handelt, welches bei lysosomalen Speichererkrankungen in Geweben vermehrt abgelagert wird (Tayama et al. 1992). Saposine aktivieren lysosomale Hydrolasen, die am Abbau von Glycosphingolipid beteiligt sind. Zusätzlich fand man, dass die Untereinheit C der ATP-Synthase in den Speichergranula der spätinfantilen und juvenilen CLN-Patienten akkumulierte (Palmer et al. 1992; Elleder et al. 1997) wie man das schon von einigen anderen lysosomalen Erkrankungen kannte (z.B. bei Untergruppen der Mucopolysaccharidosen, Morbus Niemann-Pick, Gangliosidosen). Die Untereinheit C – auch bekannt als Ductin – ist eine essentielle Komponente des Protonenkanals des mitochondrialen ATP-Synthase-Komplexes. Der Nachweis von Mutationen in lysosomalen Proteinen als Ursache verschiedener CLN-Unterformen bestätigte die Zugehörigkeit der CLN zu den lysosomalen Speichererkrankungen. Bei zwei Typen der CLN wurde das Genprodukt durch molekulargenetische und Proteomuntersuchungen schon charakterisiert. Es handelt sich in beiden Fällen um lysosomale Enzyme. *CLN1* kodiert für die Palmitoyl Protein Thioesterase 1 (PPT1) (Vesa et al. 1995) und *CLN2* für *CLN2p/TPP1* (Sleat et al. 1997; Vines und Warburton, 1998, 1999). PPT1 ist eine lösliche lysosomale

Thioesterase, die von Lipoproteinen beim Proteinabbau Fettsäuren abspaltet (Verkruyse und Hoffmann, 1996). Die beste Methode zur Bestätigung der Diagnose einer infantilen CLN ist ein enzymatisches Assay zur Bestimmung der PPT1-Aktivität (Cho et al. 1998; van Diggelen et al. 1999).

Initial war das bei der *CLN2* betroffene Genprodukt ein bis dahin unbekanntes Protein (Sleat et al. 1997). Später stellte man fest, dass es sich dabei um die Tripeptidyl Peptidase 1 (TPP1) handelte, welches aus Rattenmilz gereinigt werden konnte (Rawlings und Barrett, 1999; Vines und Warburton, 1998, 1999). Das gereinigte *CLN2p/TPP1* weist eine weit gefächerte Substratpräferenz auf, wobei es *in vitro* Peptidbindungen angrenzend an neutralen, sauren und basischen Resten proteolytisch spaltet. Das natürliche Substrat für *CLN2p/TPP1* wurde bisher nicht identifiziert. Die Diagnose einer *CLN2* kann durch die enzymatische Messung der Pepstatin-insensitiven Peptidase-Aktivität in Leukozyten oder Hautfibroblasten gesichert werden (Sleat et al. 1997).

Die Funktion des *CLN3*-Proteins ist bisher ungeklärt. Bekannt ist, dass das Translationsprodukt ein Protein von 483 Aminosäuren ist (The International Batten Disease Consortium, 1995). Zur funktionellen Charakterisierung fehlt bisher ein guter Antikörper. Die subzelluläre Lokalisation wird in den Lysosomen (Jarvelä et al. 1998), dem Golgi-Apparat (Kremmidotis et al. 1999) und den Mitochondrien (Katz et al. 1997) vermutet. Für eine lysosomale Lokalisation spricht, dass das dem *CLN3*-Genprodukt orthologe *btn1*-Protein in Vakuolen der Hefe nachweisbar ist. Hefevakuolen entsprechen den Lysosomen der Säugerzellen (Croopnick et al. 1998). Das *btn1*-Protein der Hefe reguliert den lysosomalen pH-Wert (Pearce et al. 1999).

1.1.4 Pathophysiologie

Ein konstantes Merkmal der neuronalen Ceroidlipofuscinosen ist die progressive Neurodegeneration. Unbekannt ist, ob der Zelltod durch das Speichermaterial selbst oder durch Sekundäreffekte hervorgerufen wird. Auch sind die Mechanismen unbekannt, die zu einer selektiven Neurodegeneration führen, obwohl die Speichersubstanz ubiquitär vorkommt. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Zelltod die direkte Konsequenz der enzymatischen Dysfunktion ist, die infolge eines gestörten Abbaus zur lysosomalen Speicherung kleiner Peptide führt (Vines und Warburton, 1999). Das

et al. (1999) haben einen Mangel an mitochondrialer ATP-Synthase sowohl in den verschiedenen CLN-Formen als auch im Schafsmodell festgestellt. Eine mangelnde ATP-Versorgung der Neurone, die einen hohen Energieumsatz haben, könnte eine mögliche Ursache für die präferentielle Neurodegeneration bei CLN sein. Bezüglich der CLN3 existieren weitere Hypothesen zur Pathogenese: Wildtyp CLN3 Protein erhöht den pH-Wert in Lysosomen der HEK293-Zellen, wo hingegen die Unterdrückung der CLN3 Protein-Synthese zu einer Azidifikation der lysosomalen Kompartimente führt (Golabek et al. 2000). Die biologische Aktivität des wildtyp-CLN3 Proteins beeinflusst die intrazelluläre Prozessierung des β -Amyloid-Protein-Vorläufers und des Cathepsin D. Der Metabolismus beider Proteine ist vom intrazellulären pH-Wert abhängig. Kitaguchi und Mitarbeiter (1990) vermuteten eine schädigende Akkumulation von Amyloid in Hirngewebe der CLN3-Patienten. Ferner zeigten Puranam et al. (1999), dass CLN3 Protein einen neurotrophischen und anti-apoptotischen Effekt *in vitro* hat. Der Mangel an funktionstüchtigem CLN3 Protein bei der CLN3 könnte daher Trigger apoptotischer Signalwege sein (Puranam et al. 1999).

1.1.5 Klinik

Aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes der Ceroidlipofuscinosen unterscheidet man verschiedene Verlaufsformen. Die vier klassischen Hauptformen ähneln sich in ihrer Symptomatik, allerdings ist das Voranschreiten der Erkrankung umso langsamer je später der Krankheitsbeginn.

Bei der infantilen Form (CLN1) beginnt die Erkrankung zwischen dem 6. Lebensmonat und dem 2. Lebensjahr. Es kommt zum Verlust bereits erworbener Fähigkeiten. Der Verlauf ist rasch progredient mit Symptomen wie Krampfanfälle, Demenz und Blindheit. Innerhalb von zwei bis drei Jahren werden die Kinder vollkommen hilflos, steif und reglos. CLN1-Patienten versterben üblicherweise im Kleinkindalter.

CLN2 beginnt bei vorher normal entwickelten Kindern zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr. Schwere, kaum beherrschbare myoklonische Krampfanfälle, Erblindung, Verlust der Muskelkoordination, kognitiver Abbau und Demenz treten in rascher Folge auf. Der Tod tritt meist zwischen dem 8. und 12. Lebensjahr ein.

Auch bei der juvenilen CLN (CLN3) entwickeln sich die Kinder zunächst normal.

Manchmal berichten die Eltern retrospektiv über eine gewisse Ungeschicklichkeit und einen etwas langsameren Spracherwerb. Die Krankheit manifestiert sich in der Regel in der Kindheit zwischen dem 5. und 9. Lebensjahr. Meist fällt zu Beginn der Schulzeit eine Sehschwäche auf, die mit einer Brille nicht zu korrigieren ist. Der Visus nimmt schnell weiter ab bis zur Erblindung mit durchschnittlich zehn Jahren. Hinzu kommen Myoklonien und epileptische Anfälle. Über die folgenden ca. 10 Jahre verlieren die Kinder schließlich alle mentalen und motorischen Fähigkeiten bis zur schweren Pflegebedürftigkeit und vorzeitigem Tod in der zweiten bis dritten Lebensdekade.

Die adulte Form (CLN4) manifestiert sich meist vor dem 40. Lebensjahr. Die Symptome sind milder als bei den kindlichen Formen der CLN. Das Alter bei Todeseintritt ist variabel, aber die Lebenserwartung ist generell reduziert. Nur diese CLN-Form wird autosomal dominant vererbt.

1.1.6 Vererbung

Bis auf die adulte Form der CLN, die sowohl einen autosomal rezessiven als auch einen autosomal-dominanten Vererbungsmodus aufweisen kann, werden alle anderen Formen der Neuronalen Ceroidlipofuscinose autosomal-rezessiv vererbt. D.h. ein Kind erkrankt nur, wenn es zwei Kopien des mutierten Gens – ein defektes Allel von jedem Elternteil – vererbt bekommt. Wenn beide Eltern gesunde heterozygote Träger eines defekten Allels sind, so trägt jedes ihrer Nachkommen ein Risiko von 1:4, die Krankheit zu entwickeln. Zurzeit werden acht genetisch unterschiedliche Formen der Ceroidlipofuscinose unterschieden. Bei sechs Unterformen konnten die Genloci bzw. bei vieren auch die Gene bereits identifiziert werden.

Die Inzidenz der infantilen CLN ist am höchsten in Finnland, wo die Genträgerfrequenz auf 1:70 und die Inzidenz in der Bevölkerung auf 1:20.000 geschätzt wird (Vesa et al. 1995). Der Genort des *CLN1*-Gens wurde durch Genkartierung finnischer Familien mit infantiler neuronaler Ceroidlipofuscinose in der Nähe der Marker D1S57 und D1S7 auf Chromosom 1p32 gefunden (Järvelä et al. 1991). Weiterführende Analysen dieser Region zeigten, dass ein Gen, welches für das Protein Palmitoyl Protein Thioesterase 1 (PPT1) codiert und in dem verschiedene Mutationen bei Patienten mit infantiler CLN gefunden wurden, dem *CLN1*-Gen entspricht (Vesa et al. 1995). Das

CLN1-Gen hat neun Exons und nimmt 25 kbp auf dem Chromosom 1p32 ein (Schriener et al. 1996).

1997 wurde das *CLN2*-Gen mit Hilfe einer Homozygoten-Kartierung fünf konsanguiner Familien auf dem Chromosom 11p15 lokalisiert (Sharp et al. 1997). Weitere Untersuchungen von Mikrosatelliten-Markern an 60 betroffenen Familien aus 14 verschiedenen Ländern erlaubten eine Genlokalisierung zwischen den Markern D11S4181 und D11S1997. Die Frequenz von der Mutation des *CLN2*-Gens ist nicht eindeutig bekannt. Durch biochemische Analysen fanden Sleat und et al. (1997) heraus, dass das Genprodukt des *CLN2*-Gens eine lysosomale Protease ist, die durch Pepstatin nicht zu hemmen ist und die Homologien zu bakteriellen Carboxypeptidasen aufweist. Die Aminosäuresequenz des *CLN2p/TPP1* ist zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert (siehe z.B. GenBank AJ011912 und AF111172).

Mittels einer genomweiten Kartierung konnte *CLN3* in 58 europäischen und kanadischen Familien einem Locus auf Chromosom 16p12 zugeordnet werden (Gardiner et al. 1990). Das International Batten Disease Consortium identifizierte 1995 das dem Krankheitsbild der juvenilen CLN zugrunde liegende Gen. Das Gen umfasst 15 kbp genomischer DNA und enthält 15 Exons. Durch Sequenzvergleich unterschiedlicher Spezies wurde eine starke Konservierung der Gensequenz festgestellt. Dies spricht für eine in der Evolution wichtige Funktion des *CLN3*-Proteins (Taschner et al. 1997). Der Genort der *CLN4*, der adulten CLN, konnte bisher gefunden werden.

Der Locus der *CLN5*, einer in Finnland auftretenden spätinfantilen Variante, wurde mittels einer genomweiten Kopplungsanalyse 14 finnischer Familien auf Chromosom 13q21-32 gefunden (Savukoski et al. 1994). Einige Jahre später konnte das Krankheitsgen identifiziert werden, das sich über 13 kbp erstreckt und aus vier Exons besteht. Aufgrund der Hydrophobie geht man davon aus, dass es sich hierbei möglicherweise um ein Membranprotein mit zwei transmembranösen Domänen handelt (Savukoski et al. 1998).

Der Locus der *CLN6* wurde durch Homozygotenkartierung konsanguiner Familien auf dem Chromosom 15p21 identifiziert (Sharp et al. 1997).

CLN8 tritt wie *CLN5* fast ausschließlich in Finnland auf. Das Gen dieser Erkrankung mit progressiver Epilepsie und mentaler Retardierung (Northern Epilepsy) konnte auf dem Chromosom 8p23 lokalisiert und bestimmt werden. Es kodiert für ein mögliches

Membranprotein mit mindestens fünf transmembranären Domänen und bisher unbekannter Funktion (Ranta et al. 1999).

1.1.7 Diagnostik

Bei allen Kindern, die an einer progressiven neurodegenerativen Erkrankung mit Verlust bereits erworbener Fähigkeiten und einer Epilepsie leiden, sollte der Arzt an eine neuronale Ceroidlipofuscinose denken. Die Leitsymptome der beiden in Deutschland am häufigsten vorkommenden CLN-Formen sind im Falle der juvenilen CLN die initiale Retinitis pigmentosa, im Falle der spätinfantilen CLN die im Kleinkindalter auftretende schwere (Myoklonus)epilepsie.

Bei der Diagnostik der Ceroidlipofuscinosen kommen verschiedene diagnostische Methoden zum Einsatz:

Neurophysiologie: Vor einem klinisch manifesten Sehverlust kann man die Retinopathie mittels elektrophysiologischer Untersuchungen diagnostizieren. Ein niedrigamplitudiges ERG (Horiguchi und Miyake, 1992) und abnehmende VEPs (Tackmann und Kuhlendahl, 1979) können hinweisend auf eine CLN3 sein. Im Gegensatz dazu sind besonders die hochamplitudigen VEPs bei der CLN2 auffällig, deren Amplitude bis zu 355-375 μV kann. Die abnorm erhöhten VEP-Amplituden lassen sich bis in spätere Erkrankungsstadien nachweisen. Sie nehmen erst im präterminalen Stadium ab (Harden et al. 1973). Die Ableitung von EEGs ist zur Verlaufsbeurteilung der oft mit der neuronalen Ceroidlipofuscinosen einhergehenden Epilepsie indiziert.

Histologie, Elektronenmikroskopie: In der Elektronenmikroskopie von Haut- bzw. Rektumbiopsien lassen sich krankheitsspezifische Lipopigmente in den Epithelzellen mit hoher diagnostischer Zuverlässigkeit nachweisen. Aus EDTA-Blut isolierte Lymphozyten weisen elektronenmikroskopisch Einschlusskörperchen auf, deren Form für die klinische Subtypisierung der Ceroidlipofuscinose herangezogen werden kann. Hierbei finden sich typischerweise bei der CLN1 granuläre kompakte Lipopigmente (GRODs, granular osmophilic deposits), für die CLN2 kompakte curvilineäre Einschlusskörperchen (CVB, curvilinear bodies) und für die klassische CLN3 membranbegrenzte Vakuolen mit Fingerabdruckprofilen (FPP, fingerprint profiles). In einigen varianten Formen der Ceroidlipofuscinose kommen Mischformen der unterschiedlichen ultrastrukturellen Ein-

schlusskörperchen vor. Neben Haut, Rektum und zirkulierenden Lymphozyten werden gelegentlich auch Konjunktiva und Skelettmuskulatur bioptisch erfolgreich analysiert.

Molekulargenetik: Zurzeit sind acht verschiedene CLN-Formen bekannt. Die der CLN1-3, 5 und 8 zugrunde liegenden Gendefekte wurden identifiziert und mindestens zahlreiche Mutationen wurden als krankheitsauslösend identifiziert. Für die CLN6 und 7 sind nur die Genorte bekannt. Die molekulargenetische Untersuchung mittels Sequenzierung ermöglicht bei bekanntem Gen nicht nur eine Bestätigung der klinischen und morphologischen Diagnose, sondern sie wird auch zur Pränataldiagnostik herangezogen.

Biochemie: Beim Auftreten eines Entwicklungsstillstands mit schweren epileptischen Krampfanfällen im Kleinkindesalter wird unter dem Verdacht auf eine Ceroidlipofuscinose zunächst ein enzymatisches Assay zur Abklärung bzw. zum Ausschluss der CLN1 und CLN2 empfohlen. Es sind Assays mit radioaktiv- (Cho und Dawson, 1998) bzw. fluoreszenzmarkierten (van Diggelen et al. 1999) Palmitoylpeptiden als Substrat der PPT1 etabliert. Dadurch ist es möglich, sowohl CLN1-Patienten als auch heterozygote Träger zu identifizieren. Ein hochspezifischer biochemischer Assay für CLN2 wurde von Junaid und et al. (1999) beschrieben und misst die CLN2p/TPP1-Proteaseaktivität in Patienten und heterozygoten Trägern. Der Test basiert auf der CLN2p/TPP1-Aktivität gegen ein synthetisches Tetrapeptid, welches an 7-Amino-4-Coumarin gebunden ist.

Pränatal-Diagnostik: Vor der Ära der Molekulargenetik wurde eine pränatale CLN-Diagnose auf der Basis elektronenmikroskopischer Befunde an fetalem Gewebe (Chorionzotten bzw. unkultivierten Amnionzellen) durchgeführt (Rapola et al. 1988; MacLeod et al. 1988). Heutzutage erfolgt die Pränatal-Diagnostik mittels direkter DNA-Testung aus Chorionzotten und Amnionzellen, die im ersten Trimester der Schwangerschaft gewonnen werden. Momentan ist die molekulare Testung spezifischer Mutationen möglich für die *CLN1* (de Vries et al. 1999), die *CLN2* (Berry-Kravis et al. 2000), die *CLN3* (Munroe et al. 1996) und die *CLN5* (Syvanen et al. 1997). Ebenso kann anderes fetales Gewebe wie gereinigtes Blut, Haut und Leber zur pränatalen Diagnostik benutzt werden (Chow et al. 1993).

1.1.8 Therapie

Bisher ist keine spezifische Behandlung bekannt, welche den natürlichen Verlauf der Erkrankung aufhält oder gar zu einer Besserung der Symptome führt. Die Behandlung ist rein supportiv. Die rechtzeitige Anlage einer PEG zur enteralen Ernährung der Patienten mit Ernährungsschwierigkeiten und Schluckstörungen erhöht die Lebensqualität der Betroffenen und der Pflegeperson(en). Neuroleptika werden häufig zur Beruhigung und Anxiolyse eingesetzt. Die Parkinson-ähnlichen Symptome, die vor allem bei der CLN3 ausgeprägt sind, werden mit Antiparkinsonmittel, z.B. L-DOPA/Carbidopa oder Selegilin, behandelt. Schwierig ist die Behandlung der häufig therapieresistenten Myoklonusepilepsie, da Phenytoin und Carbamazepin in diesen Fällen kontraindiziert sind (Aicardi et al, 1994). Die Epilepsie bedarf meistens einer kombinierten antiepileptischen Therapie, z.B. mit Valproat und Lamotrigin (Aberg et al. 1997).

Kurative Behandlungsstrategien, die noch vor kurzem utopisch schienen, nähern sich allmählich der versuchsweisen Anwendung beim Menschen im Rahmen einer klinischen Studie. Gegenwärtig werden an CLN-Tiermodellen und an gezüchteten Zellen von CLN-Patienten verschiedene therapeutische Ansätze erforscht. Enzympräparate, die injiziert werden sollen, befinden sich in der Entwicklungsphase. Neuroprotektive Substanzen, die die Zellen vor der Neurogeneration schützen sollen, werden erprobt. Hierzu gehören Substanzen, die von der Behandlung anderer Speicherkrankheiten bekannt sind. Zum Beispiel führt Cystagon *in vitro* zu einer Verminderung des Speichermaterials in CLN1-Zellen (NIH, 2001). Eine Zulassung solch neuroprotektiver Substanzen für Behandlungsversuche am Menschen wurde noch nicht erteilt.

Trotz des Fehlens kausaler Therapien ist die langjährige Auseinandersetzung mit allen Problemen medizinischer, pädagogischer, psychischer und genetischer Art eine wichtige Aufgabe aller beteiligten Fachleute. Sowohl die Erkrankten als auch deren näheres Umfeld brauchen Unterstützung, die ihnen hilft die Erkrankung und die sich daraus ergebenden Konsequenzen zu tragen. Die Vermittlung von Selbsthilfegruppen und psychologischer Begleitung zur Verarbeitung des Schicksalsschlages sind oft hilfreich. Wurde in einer Familie eine CLN-Erkrankung diagnostiziert, so ist eine genetische Beratung wichtig. Den betroffenen Eltern sollte die genetische Grundlage und das Wiederholungsrisiko der Erbkrankheit erörtert und sie sollten über die Möglichkeiten zur pränatal Diagnostik aufgeklärt werden.

1.1.9 Prognose

Alle Formen der CLN reduzieren die Lebenserwartung. Allerdings unterscheiden sich die Subtypen hinsichtlich der Geschwindigkeit der Progression und der Lebenserwartung. Kohlschütter (1988) entwickelte einen klinischen Beurteilungsscore, mit dem die motorischen und intellektuellen Fähigkeiten der Patienten semiquantitativ erfasst werden können. Die Funktionen, die dabei beurteilt werden, sind Sehfähigkeit, Intelligenz, Sprache, epileptische Symptome und Motorik. Die Scala reicht von 0 bis 3. Wobei 0 absolut fehlender Funktion und 3 normaler Funktion entspricht. Anhand dieser Einstufung ist eine Verlaufsbeurteilung möglich, was insbesondere bei zukünftigen Therapieversuchen von großer Bedeutung sein wird. Je niedriger der Gesamt-Score, desto kürzer ist die Lebenserwartung.

Die infantile CLN ist charakterisiert durch einen frühen Beginn und eine rasche Progression der klinischen Symptome. Schließlich verbleiben die betroffenen Kinder einige Jahre in einem vegetativen Stadium bevor sie zwischen dem achten und dreizehnten Lebensjahr versterben (Boustany et al. 1988). Das Manifestationsalter der spätinfantilen Form liegt um das zweite und vierte Lebensjahr. Der kognitive Abbau ist meist das erste Symptom und wird gefolgt von Krampfanfällen sowie schwerer motorischer Regression. Die retinale Degeneration führt zur Erblindung. Wie bei der infantilen Form durchlaufen die Kinder mit CLN2 auch ein Vegetativstadium bevor sie am Ende der ersten Lebensdekade versterben (Wisniewski et al. 1988). Von den kindlichen Formen setzen die Symptome der CLN3 am spätesten ein, zwischen dem fünften und siebten Lebensjahr. In den meisten Fällen ist das initiale Symptom der Sehverlust. Später entwickeln sich verschiedene Epilepsieformen und Bewegungsstörungen. Der kognitive Abbau verläuft langsamer als bei den früher beginnenden CLNs. Dennoch werden die betroffenen Kinder in den späten Teenager-Jahren vegetativ und der Tod tritt in der zweiten oder dritten Dekade ein (Wisniewski et al. 1988).

Morbus Kufs (CLN4) beginnt meistens um das 30. Lebensjahr, aber es existieren auch Berichte einer Manifestation im Jugendalter (Berkovic et al. 1988). Die Hauptsymptome sind Verhaltensauffälligkeiten, epileptische Anfälle, Ataxie, abnorme Bewegungsmuster, extrapyramidale Symptome, Spastik und Demenz. Die Durchschnittsdauer der

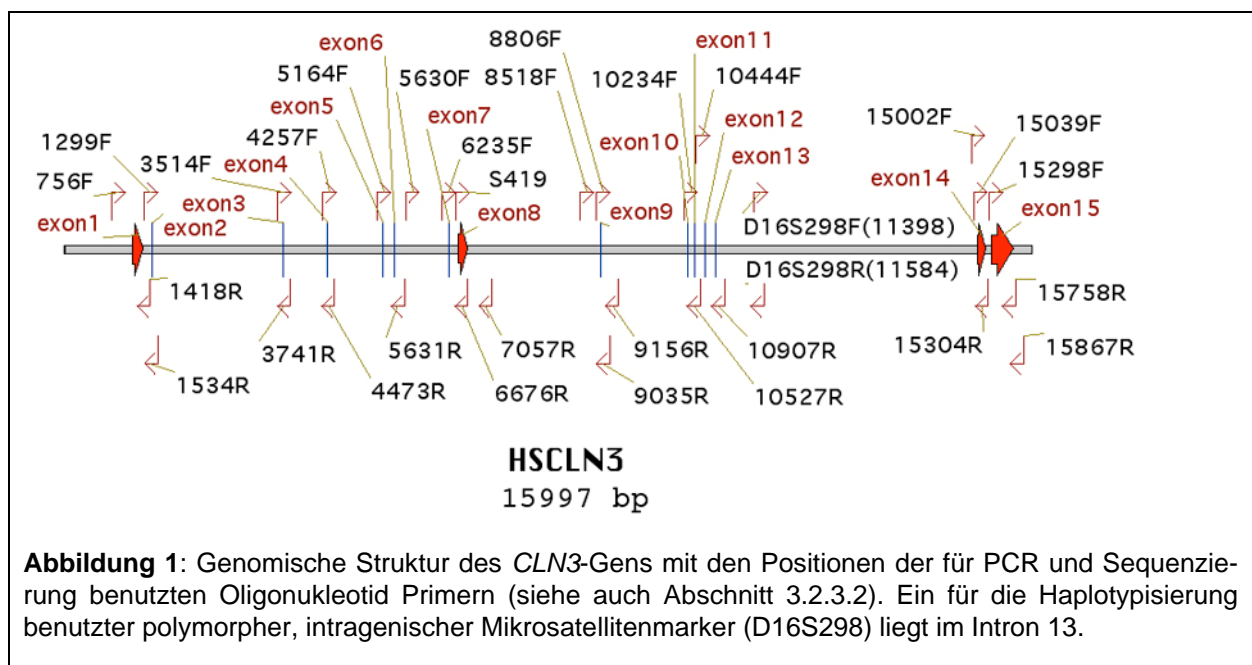
Erkrankung beträgt $12,5 \pm 8,1$ Jahre (Berkovic et al. 1988). Der Verlauf ist langsam fortschreitend und führt meist im Alter von 40-50 Jahren zum Tod.

1.2 Die juvenile Ceroidlipofuscinose (CLN3, Spielmeyer-Vogt, Batten Disease)

1.2.1 Die Struktur des *CLN3*-Gens

Durch Sequenzierung und Restriktionsanalysen der DNA eines Cosmid-Klons wurden die genomische Struktur und die komplette Intron-Exon-Nucleotid-Sequenz des *CLN3*-Gens ermittelt (Mitchinson et al. 1997a, b). Das Gen liegt auf Chromosom 16p12, besteht aus 15 kodierenden Exons und hat ein offenes Leseraster von 1314 bp (Batten Disease Consortium, 1995). Die 15 Exons, welche ca. 15 kbp der genomischen DNA einnehmen, haben Größen zwischen ca. 47 und 356 bp. Die Größen der Introns reichen von 80 bis 4227 bp. Der Mikrosatellitenmarker D16S298, der zur Identifikation des *CLN3*-Gens herangezogen wurde, liegt im Intron 13 (Mitchinson et al. 1997).

Die Analysen der Promoterregion und des Expressionsmusters des *CLN3*-Transkripts weisen darauf hin, dass *CLN3* konstitutiv exprimiert wird und eine „Housekeeping-Funktion“ in der Zelle ausübt (Goebel et al. 1999).



1.2.2 Das Batten Disease Protein (Battenin, CLN3p)

Das *CLN3*-Gen kodiert für ein Protein (Battenin) von 438 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 48 kDa. Die Aminosäuresequenz des Polypeptids zeigt keine Homologie zu anderen bekannten Proteinen. Computergestützte Strukturanalysen haben das Vorkommen vieler hydrophober Regionen vorhergesagt, welches die Vermutung nahe legt, dass es sich dabei um ein integrales Membranprotein handelt (The Internationales Batten Disease Consortium, 1995; Janes et al. 1996). Das Vorkommen orthologer Gene in *Saccharomyces cerevisiae* (*btn1*), *Caenorhabditis elegans*, Maus und Hund spricht für eine evolutionäre Konservierung dieses für Eukaryonten anscheinend wichtigen Proteins. (Pearce et al. 1997; Lee et al. 1996).

Weitere Analysen bezüglich der intrazellulären Synthese und Reifung des CLN3-Proteins zeigen eine Glykosylierung an Asparagin-Resten im endoplasmatischen Retikulum. Immunfluoreszenzstudien haben gezeigt, dass das Polypeptid mit LAMP1 colocalisiert, welches ein integrales lysosomales Membranprotein ist. Daher handelt es sich beim CLN3-Proteins wahrscheinlich um ein lysosomales Protein (Järvelä et al. 1998). Weitere Lokalisationen des CLN3-Proteins im Golgi-Apparat (Kremmidiotis et al. 1999) sowie in den Mitochondrien (Katz et al. 1995) werde ebenfalls vermutet.

Die Funktion des CLN3-Proteins ist bisher unbekannt. Am einfachen Hefemodell analysierten Pearce und et al. (1999) die Funktion des Proteins. Die Zerstörung des homologen Gens, *btn1* der Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) führte zu keiner Veränderung des Phänotyps. Allerdings waren die mutierten Zellen, die vor allem bei niedrigem pH-Wert resistent gegen Aminonitrophenyl-Propanediol (ANP). Der Grad der ANP-Resistenz bedingt durch spezifische Missense-Mutationen korrelierte sehr gut mit dem Schweregrad der menschlichen Erkrankung mit den orthologen Mutationen (Pearce et al. 1998). Außerdem schien die lysosomale pH-Regulierung vom *btn1*-Protein abhängig zu sein. Hefezellen ohne *btn1* wiesen einen abnorm sauren pH ihrer Vakuolen auf (Pearce et al. 1999). Nach Hinzugabe von Chloroquin in das Kulturmedium, das in saurer Umgebung den pH erhöht, war dieser Zustand teilweise reversibel (Pearce et al. 1999). Es bleibt Gegenstand der Forschung, ob Chloroquin die Symptome der humanen CLN3 rückgängig machen und therapeutisch genutzt werden könnte.

Mittels zielgerichteter Zerstörung des orthologen Gens wurden knockout-Mäuse generiert, die teilweise ähnliche Charakteristika – autofluoreszierendes Speichermaterial in

verschiedenen Zellarten, kortikaler Neuronenverlust - aufweisen wie CLN-Patienten (Mitchinson et al. 1999; Katz et al. 1999).

1.2.3 Mutationen und Polymorphismen im *CLN3*-Gen

Die klinische Variabilität der juvenilen Ceroidlipofuscinose kann auf die multiplen unterschiedlichen Mutationen und Polymorphismen zurückgeführt werden. Bisher wurden 31 mit *CLN3* assoziierte Mutationen und 5 Polymorphismen publiziert (Mole et al. 2001). Bei 81% aller *CLN3*-Patienten liegt eine große 1,02 kbp Deletion vor, die mit dem Verlust der Exone 7 und 8 einhergeht. Diese umfassen zusammen 217 bp und führen somit zu einer Verschiebung des Leserasters. Die Deletion führt zu einem Stopcodon 84 bp in 3'-Richtung hinter dem Deletionsbruchpunkt (The International Batten Disease Consortium, 1995). Das resultierende Translationsprodukt besteht aus 181 Aminosäuren und verbleibt im endoplasmatischen Retikulum (Järvelä *et al.* 1999). Patienten mit einer Homozygotie für diese Deletion weisen die vorab beschriebenen Symptome in schwerer Ausprägung auf. Abgesehen von der häufigen großen Deletion wurden 24 weitere Mutationen bei gemischt (compound) Heterozygoten beschrieben (Munroe et al. 1997).

1.2.4 Genotyp-Phänotyp Relation

Patienten mit einer homozygoten 1,02 kbp Deletion haben einen recht homogenen Phänotyp. Dennoch gibt es einige Variationen der Klinik und der Progression der Symptome. Zum Beispiel beschreiben Aberg et al. (1998) einen Patienten, der als homozygoter Träger der großen Deletion einen atypisch langsamen Erkrankungsverlauf sowohl hinsichtlich der neuropsychiatrischen Symptome als auch des MRT aufwies (Aberg et al. 1998).

Die bisher gesammelten Daten deuten darauf hin, dass einige seltene Punktmutationen im *CLN3*-Gen zu einem milderem Phänotyp führen als die große 1,02 kbp Deletion. In einer Studie zur Bestimmung der Genotyp-Phänotyp Relation wurden 36 Patienten untersucht, die entweder homozygote oder compound heterozygote Träger der 1,02 kbp Deletion waren. Der Beginn des Sehverlustes und der Epilepsie war in beiden Gruppen sehr konkordant. Es wurden aber auch – unabhängig von der Art der Mutation – Unterschiede festgestellt, wie z.B. eine inter- und intrafamiliäre Heterogenität bezüglich des Zeitablaufes des geistigen physischen Abbaus. Alle Homozygoten entwickelten einen intellektuellen und körperlichen Abbau. Dem gegenüber zeigten einige compound heterozygote Patienten mit einer Punktmutation auf einem Allel einen benigneren Verlauf ohne Einschränkung der intellektuellen Fähigkeiten (Järvelä et al. 1997).

1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Promotionsarbeit war die Aufdeckung der Krankheitsursache in einer konsanguinen libanesischen Familie, in der fünf Personen an Symptomen erkrankt waren, die eine *CLN3* vermuten ließen. Der sehr milde Verlauf der Erkrankung in dieser Familie stellte die klinische Diagnose aber in Frage. Meine Aufgabe war es, den Genort mittels Haplotypanalyse zu sichern, die übliche Deletion auszuschließen und ein Protokoll zu entwickeln, um mittels direkter automatischer Sequenzierung nach Mutationen im *CLN3*-Gen zu suchen.