

Aus dem CharitéCentrum
für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und Humangenetik
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie
Direktor: Prof. Dr. Christoph Hübner

Habilitationsschrift

Klinische und genetische Aspekte bei Muskeldystrophie Duchenne und Becker und hypomyelinisierenden Leukodystrophien

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Birgit Uhlenberg

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Korinthenberg
2. Gutachter: Prof. Dr. Tiemo Grimm
Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 2009

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Häufig benutzte Abkürzungen | 4 |
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1. Muskeldystrophien | 5 |
| 1.1.1. Muskeldystrophie Duchenne und Becker | 5 |
| 1.2. Hypomyelinisierende Leukodystrophien | 8 |
| 1.2.1. Pelizaeus-Merzbacher- und Pelizaeus-Merzbacher-ähnliche Leukodystrophien | 8 |
| 2. Originalarbeiten | 12 |
| 2.1. Kerst B, Mennerich D, Schuelke M, Stoltenburg-Didinger G, von Moers A, van Landeghem FKH, Speer A, Braun T, Hübner C 2000. Heterozygous myogenic factor 6 mutation associated with myopathy and severe course of Becker muscular dystrophy. Neuromuscul Disord 10(8): 572-577. | 12 |
| 2.2. Sifringer M*, Uhlenberg B*, Lammel S, Hanke R, Neumann B, von Moers A, Koch I, Speer A 2004. *equal contribution Identification of transcripts from a subtraction library which might be responsible for the mild phenotype in an intrafamilially variable course of Duchenne muscular dystrophy. Hum Genet 114(2): 149-156. | 20 |
| 2.3. Uhlenberg B, Schuelke M, Rüschen-dorf F, Ruf N, Kaindl AM, Henneke M, Thiele H, Stoltenburg-Didinger G, Aksu F, Topaloglu H, Nürnberg P, Hübner C, Weschke B, Gärtner J 2004. Mutations in the gene encoding gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. Am J Hum Genet. 75(2): 251-260. | 29 |
| 2.4. Ruf N, Martelli M, Weschke B, Uhlenberg B 2007. Oligodendroglial transcription factor (OLIG1 and OLIG2) mutations are not associated with Pelizaeus-Merzbacher-like leukodystrophy. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 144(3): 365-366. | 40 |
| 2.5. Ruf N, Uhlenberg B 2008. Analysis of human alternative first exons and copy number variation of the GJA12 gene in patients with Pelizaeus-Merzbacher-like disease. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. Jun 2, Epub ahead of print. | 43 |
| 2.6. Wolf NI, Hartung I, Boltshauser E, Wiegand G, Koch J, Schmitt-Mechelke T, Martin E, Zschocke J, Uhlenberg B, Hoffmann GF, Weber L, Ebinger F, Rating D 2005. Leukencephalopathy with ataxia, hypodontia and hypomyelination. Neurology 64: 1461-1464. | 66 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3. | Diskussion | 71 |
| 3.1. | MYF6 ist ein modifizierender Faktor bei der Muskeldystrophie Becker | 71 |
| 3.2. | Unterschiedlich exprimierte Gene bei einem intrafamiliär variablen Verlauf einer Muskeldystrophie Duchenne als mögliche Ursache für den milderen Phänotyp | 72 |
| 3.3. | Eine Untergruppe der Pelizaeus-Merzbacher-ähnlichen Erkrankung ist mit Mutationen im <i>Gap junction protein alpha 12 (Connexin 46.6)</i> Gen assoziiert | 74 |
| 3.4. | Veränderungen der <i>GJA12</i> -Kopienanzahl sowie Mutationen in den oligodendrogialen Transkriptionsfaktoren <i>OLIG1</i> und <i>OLIG2</i> sind nicht mit dem PMLD-Phänotyp assoziiert | 77 |
| 3.5. | Die Leukenzephalopathie mit Ataxie, Hypodontie und Hypomyelinisierung ist eine neue, klinisch definierte Entität | 79 |
| 4. | Zusammenfassung | 82 |
| 5. | Literaturverzeichnis | 84 |
| 6. | Danksagung | 92 |
| | Erklärung gemäß Habilitationsordnung der Charité | 94 |

Häufig benutzte Abkürzungen

| | |
|------|--|
| BMD | Muskeldystrophie Becker |
| DMD | Muskeldystrophie Duchenne |
| GJA | Gap junction protein alpha |
| GJB | Gap junction protein beta |
| MRT | Magnetresonanztomogramm |
| OMIM | Online Mendelian inheritance in man |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PLP | Proteolipidprotein |
| PMD | Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung |
| PMLD | Pelizaeus-Merzbacher-ähnliche Erkrankung |
| RACE | rapid amplification of cDNA ends |
| SNP | single nucleotide polymorphism |
| SPG2 | Spastische Paraplegie Typ 2 |
| RT | Reverse Transkriptase |
| UTR | untranslatierte Region |

1. Einleitung

1.1. Muskeldystrophien

Muskeldystrophien sind eine heterogene Gruppe hereditärer Erkrankungen, die durch progrediente Muskelschwäche gekennzeichnet sind und deren primärer Defekt in der Muskelzelle zu finden ist. Allen Muskeldystrophien gemeinsam sind eine Muskelfaserdegeneration und -regeneration sowie eine endo- und perimysiale Fibrose, die bereits im frühen Stadium auftritt. Viele Muskeldystrophien werden durch einen Defekt in einem hochspezialisierten Zelladhäsionskomplex, dem Sarkoglykan-Dystroglykan-Komplex, verursacht. Dieser Komplex ist für die mechanische Verbindung des Zytoskeletons mit der extrazellulären Matrix verantwortlich (siehe Übersichtsarbeiten Lapidos et al. 2004, Haenggi und Fritschy 2006). Mutationen, die diese strukturelle Verbindung beeinträchtigen, resultieren in einer Vielzahl von Muskeldystrophien, unter ihnen die Muskeldystrophie Duchenne (DMD) und Becker (BMD), die Muscle-eye-brain-disease, das Walker-Warburg-Syndrom, die kongenitalen Muskeldystrophien 1 C und 1 D und die Gliedergürtelmuskeldystrophie 2 I (siehe Übersichtsarbeit Davies und Nowak 2006). Bei allen diesen Erkrankungen kommt es in der Regel zu einer Degeneration des Skelettmuskels, einer Kardiomyopathie sowie zu einer eingeschränkten Lebenserwartung.

1.1.1. Muskeldystrophie Duchenne und Becker

Ätiopathogenese

Die Muskeldystrophie Typ Duchenne (DMD, OMIM #310200) ist die häufigste vererbte Muskelerkrankung im Kindesalter. Die Inzidenz liegt bei 1:3.500 männlichen Neugeborenen, bei der Muskeldystrophie Becker (BMD, OMIM #300376) bei 1:17.000. Das für die DMD und BMD verantwortliche *Dystrophin*-Gen liegt auf Chromosom Xp21.1 und ist mit 79 Exons und einer Länge von 2,4 Megabasen eines der größten humanen Gene (Koenig et al. 1988). Das Protein ist an der inneren Zellmembran gelegen und über den N-Terminus (Exons 1-8) mit Actin und damit mit dem submembranösen Zytoskeletton der Muskelzelle verbunden. Der C-Terminus (Exons

68-79) hat verschiedene Bindungsdomänen, die cystinreiche Domäne bindet über beta-Dystroglykan an die Glykoproteine des Sarkoglykan-Dystroglykan-Komplexes der Zellmembran, auch Dystrophin-Glykoprotein-Komplex genannt.

Die häufigsten Mutationen im *Dystrophin*-Gen sind Deletionen (~65 Prozent), gefolgt von Duplikationen (~8 Prozent) und Punktmutationen. Die Mutationen sind über das ganze Gen, jedoch ungleich, verteilt, und so werden die meisten in den Abschnitten der Exons 15 bis 20 und 45 bis 50 beobachtet. Der Phänotyp ist davon abhängig, ob das Leseraster unterbrochen wird (out-of-frame-Mutationen) oder erhalten bleibt (in-frame-Mutationen). Wird das Leseraster unterbrochen, resultiert daraus ein falsch zusammengesetztes Protein, das zu einem schweren Phänotyp - DMD - führt. Bleibt das Leseraster erhalten, ist das Protein verkürzt, aber in den übrigen Domänen korrekt translatiert, so dass der Phänotyp - BMD - in der Regel milder ist. Die Schwere des Phänotyps ist auch von der Lokalisation innerhalb des Gens abhängig; so verursachen Mutationen, bei denen C- und N- Terminus erhalten bleiben, einen wenig schweren Phänotyp. Ausnahmen der Zuordnungen out-of-frame-Mutation mit schwerem Phänotyp und in-frame-Mutation mit leichtem Phänotyp sind vielfach beschrieben worden (Malhotra et al. 1988, Prior et al. 1997, Hattori et al. 1999). Eine mögliche Erklärung hierfür ist das exon skipping, bei dem eine Verschiebung des Leserasters durch die Transkription wieder korrigiert wird. Wie generell auch für andere Erkrankungen denkbar, ist der Einfluss weiterer mutierter Gene i.S. oligogener Erkrankungen zu diskutieren (Badano und Katsanis 2002).

Histopathologisch kommt es an der quergestreiften Muskulatur und der Herzmuskulatur zu einer progredienten fibrotischen Degeneration, deren Genese nicht genau bekannt ist. Der Dystrophinmangel führt sekundär ebenfalls zu einer Defizienz von Proteinen des Sarkoglykan-Dystroglykan-Komplexes, so dass die Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix und dem Zytoskeletton geschädigt wird. In der Muskelbiopsie fallen eine erhöhte Faserkalibervariabilität, vermehrt zentral gelegene Kerne, eine zelluläre Infiltration durch Makrophagen sowie de- und regenerierende Fasern auf. Bei der DMD ist Dystrophin in weniger als 5 Prozent der Fasern nachweisbar, bei der BMD ist Dystrophin entweder in 10 bis 20 Prozent der Fasern negativ oder generell abgeschwächt. Kompensatorisch findet sich eine Hochregulation des dem Dystrophin hoch homologen Proteins Utrophin.

Symptomatik

Die Symptomatik bei Mutationen im *Dystrophin*-Gen kann erheblich variieren und reicht von der asymptomatischen Erhöhung der Serumcreatininkinase über belastungsabhängige Myalgien bis zur schwersten Verlaufsform der DMD.

Bei der DMD werden die betroffenen Jungen im Kleinkindalter auffällig. Die statomotorische Entwicklung verläuft in der Hälfte der Fälle verzögert, die Kinder fallen durch Schwierigkeiten beim Rennen, häufige Stürze und ein pendelndes Gangbild mit zunehmender Hyperlordose auf. Die Muskelschwäche ist symmetrisch, proximal und beinbetont. Das Gowers-Zeichen ist Ausdruck einer Schwäche der Hüft- und Kniestrecker, welche dazu führt, dass sich Kinder beim Aufrichten in den Stand mit den Armen auf den Oberschenkeln abstützen. Charakteristischerweise kommt es im Rahmen einer progredienten Muskelfibrose zunächst zu einer Pseudohypertrophie der Waden - und weniger deutlich und selten - der Oberschenkelmuskulatur, des M. masseter und des M. deltoideus, die schließlich in einer ausgeprägten Muskelatrophie endet. Schon im Vorschulalter finden sich häufig leichte Kontrakturen im Bereich des M. rectus femoris und der ischiokruralen Muskulatur; die Muskeleigenreflexe sind in diesem Alter in der Regel noch gut auszulösen. Der Herzmuskel ist fast immer mitbetroffen (O'Orsogna et al. 1988). Dies äußert sich in einer Sinustachykardie, später in einer Veränderung des Myokards, die zu einer eingeschränkten Kontraktilität führt. Die Sprachentwicklung ist häufig verzögert, und der durchschnittliche Intelligenzquotient liegt eine Standardabweichung unter dem Normalkollektiv.

Bei der BMD ist der Erkrankungsbeginn variabel, die ersten Symptome treten zwischen dem 6. und 20. Lebensjahr auf, durchschnittlich mit 11 Lebensjahren. Auch bei diesem Phänotyp kann der eigentlichen Manifestation eine Verzögerung der statomotorischen Entwicklung vorausgehen. Die Patienten werden durch eine symmetrische Muskelschwäche auf ihre Erkrankung aufmerksam, die sich durch Schwierigkeiten beim Rennen bemerkbar macht, oder aber durch Myalgien und Muskelkrämpfe. Eine kardiale Beteiligung, die den ersten Symptomen einer Muskelschwäche vorausgehen kann, ist ebenfalls die Regel. Eine mentale Retardierung kommt in einem Viertel der Fälle vor.

Aufgrund der X-chromosomalen Vererbung sind die Mütter in der Regel Konduktorinnen der Erkrankung, von diesen haben 5 bis 10 Prozent Symptome einer Muskelschwäche, die in der Kindheit auffällt und dem Muster einer Gliedergürteldystrophie entspricht. Auch bei ihnen kann es zu einer Wadenhypertrophie, zu Muskelschmerzen sowie einer kardialen Beteiligung

kommen. Die Variabilität der Schwere der Symptomatik beruht vor allem auf der ungleichen Inaktivierung beider X Chromosome.

1.2. Hypomyelinisierende Leukodystrophien

Leukodystrophien werden durch zumeist angeborene Störungen der weißen Substanz im zentralen Nervensystem verursacht. Der zugrunde liegende pathophysiologische Prozess kann hypo-, de- oder dysmyelinisierend sein. Der Ausdruck „Hypomyelinisierung“ bezieht sich auf die Tatsache, dass ein signifikantes und permanentes Defizit an Myelin im Vergleich zum Gesunden vorliegt. Es gibt eine Vielzahl an Erkrankungen mit einer diffusen Hypomyelinisierung; hierzu gehören die Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung (Boulloche und Aicardi 1986), die Pelizaeus-Merzbacher-ähnliche Erkrankung (Begleiter und Harris 1989), der M. Salla (Sonninen et al. 1999), das Cockayne-Syndrom Typ II (Nishio et al. 1988), die Trichothiodystrophie (Ostergaard und Christensen 1996) und das Wardenburg-Hirschsprung-Syndrom (Inoue et al. 2002). Die Hypomyelinisierung mit kongenitaler Katarakt (Zara et al. 2006) ist eine klinisch definierte, die Hypomyelinisierung mit Atrophie der Basalganglien und des Zerebellums (H-ABC, van der Knaap et al. 2002) eine neuroradiologisch definierte Entität.

1.2.1. Pelizaeus-Merzbacher- und Pelizaeus-Merzbacher-ähnliche Leukodystrophien

Ätiopathogenese

Die Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung (PMD) ist der Prototyp der hypomyelinisierenden Leukodystrophien. Sie und ihre allelische Variante Spastische Paraplegie Typ 2 (SPG2) werden durch Mutationen im *PLP1*-Gen verursacht. Dieses kodiert das sehr hydrophobe Strukturprotein Proteolipidprotein 1 (Saugier-Veber et al. 1994), welches das vorherrschende Protein des zentralen Nervensystems ist. Die Besonderheit des Gens wird durch seine extreme Konservierung deutlich; bislang ist kein einziger Polymorphismus in der kodierenden Region beschrieben worden (Stecca et al. 2000, siehe auch SNP Datenbank des National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). *PLP1* besteht aus 7 Exons und ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Im dritten Exon liegt eine interne Spleißstelle, welche für die kleinere Isoform DM20 verantwortlich ist. Beide Proteine, das Proteolipidprotein 1 und das

DM20, werden hauptsächlich von Oligodendrozyten und Schwannzellen synthetisiert. Dabei favorisieren unreife Oligodendrozyten und Schwannzellen die Synthese von DM20, reife Oligodendrozyten dagegen Proteolipidprotein 1 (Pham-Din et al. 1991).

Der größte Anteil der Erkrankungen, nämlich 60 bis 70 Prozent der Fälle, wird durch Duplikationen des *PLP1*-Gens verursacht (Sisternans et al. 1998). Die Größe der duplizierten Region variiert und kann bis zu drei Megabasen umfassen, so dass in der Regel weitere Gene dupliziert sind (Inoue et al. 1999). Von den betroffenen Genen ist offensichtlich das *PLP1*-Gen das einzige, das einem Gen-Dosis-Effekt unterliegt. Klinisch zeigt sich, dass drei Kopien des Gens zu einem schwereren Phänotyp führen (Harding et al. 1995), während fünf Kopien - im Vergleich zu dreien - nicht mit einer deutlicheren Ausprägung des Phänotyps einhergehen (Wolf et al. 2005). Das reziproke Rekombinationsereignis, nämlich die Deletion des *PLP1*-Lokus, ist selten und umfasst ein sehr viel kleineres Segment als bei der Duplizierung; möglicherweise sind Deletionen größerer Abschnitte häufiger letal. Punktmutationen finden sich bei etwa 20 Prozent der Patienten mit PMD. Ein Häufung von Mutationen (~50 Prozent), die missense-, nonsense-, frameshift- und Spleißmutationen umfassen, findet sich im Bereich der extrazellulär gelegenen Schleife. PLP1-Spleißvarianten wurden kürzlich in Fibroblasten einer Kohorte von 20 PMD-Patienten ausgeschlossen, so dass intronische Mutationen mit größerem Abstand zum Exon-Intron-Übergang als Ursache eher unwahrscheinlich sind (Bonnet-Dupeyron et al. 2008b). Die Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp ist komplex. Inoue und Mitarbeiter (1999) fanden in zwanzig Familien mit *PLP1*-Duplikation eine positive Korrelation zwischen Größe der Duplikation und Schweregrad der klinischen Symptomatik (konnatale und klassische Form, siehe unten). Cailloux und Kollegen (2000) verglichen 33 Familien mit Punktmutationen im *PLP1*-Gen und fanden, dass Punktmutationen in evolutionsbedingt konservierten Regionen mit dem schwersten Phänotyp assoziiert sind, während Mutationen, die in nicht-konservierten Regionen liegen bzw. zu einem verkürzten Protein führen, einen leichteren Phänotyp nach sich ziehen. Patienten mit Null-Mutationen, bei denen also kein PLP1-Protein produziert wird, haben ebenfalls einen relativ leichten Verlauf der Erkrankung, die von einer peripheren Neuropathie begleitet wird (Garbern et al. 1997, Garbern et al. 2002).

Liegt ein PMD-Phänotyp ohne Nachweis einer Alteration am *PLP1* Locus vor - was bei 20 Prozent der PMD-Patienten der Fall ist (Schiffmann und Boespflug-Tanguy 2001) -, handelt es sich um die Pelizaeus-Merzbacher-ähnliche Erkrankung (PMLD).

Symptomatik

Das klinische Bild und der Verlauf sind von der Art der PLP1-Mutation abhängig. Dabei hat es sich bewährt, die Erkrankung in drei Typen einzuteilen. Allen gemein ist die Symptomkonstellation aus Nystagmus, spastischer Paraparese und Ataxie sowie ein X-chromosomaler Vererbungsmodus und eine diffuse Hypomyelinisierung des zentralen Nervensystems im kranialen Magnetresonanztomogramm (cMRT).

Bei der schwersten Form der Erkrankung, der konnatalen PMD, treten die Symptome bereits während der ersten Lebenswochen auf; die Kinder fallen mit muskulärer Hypotonie, Stridor, Ateminsuffizienz und Nystagmus auf, so dass eine Verwechslung mit einer Motoneuronerkrankung möglich ist (Kaye et al. 1994). Diese Patienten entwickeln rasch eine schwere Spastik, so dass freies Sitzen und Gehen nicht erlernt wird. Der Tod tritt meist vor dem 30. Lebensjahr ein. Die häufigste Form, die klassische PMD, hat ihren Beginn ebenfalls im Neugeborenenalter, jedoch ohne respiratorische Symptome. Die Kinder haben einen Nystagmus und eine Hypotonie im Bereich der unteren Extremitäten, die im Kindesalter in eine Spastik übergeht. Die motorischen Meilensteine werden verspätet, freies Gehen gar nicht erreicht. Patienten mit einer klassischen PMD erlernen Sprachfähigkeiten, die Sprache ist jedoch dysarthrisch und verlangsamt; in der Regel besteht auch eine Einschränkung der kognitiven Fähigkeiten. Die Patienten können bis ins 6. Lebensjahrzehnt überleben.

Die mildeste Form der PMD geht über in den Formenkreis der Spastischen Paraplegie Typ 2 (SPG2). Diese Erkrankung beginnt innerhalb der ersten fünf Lebensjahre und ist mit einer leichten bis mittelschweren spastischen Paraplegie verbunden; es kann ebenfalls zu einer Extremitäten- und Gangataxie kommen. Die Patienten können frühzeitig durch einen Nystagmus auffallen (Bonneau et al. 1993). Die motorischen Meilensteine werden verspätet erlernt, und die Patienten lernen im Kindesalter laufen; meistens wird die Lauffähigkeit im weiteren Verlauf wieder verloren. Die kognitive Entwicklung ist leicht eingeschränkt, die Sprache eher nicht; die Lebenserwartung ist normal.

Eine periphere demyelinisierende Neuropathie ist bei Patienten mit PMD beobachtet worden; sie ist meistens klinisch irrelevant. Elektrophysiologisch findet sich eine milde Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeiten, die nicht uniform verteilt ist (Gabern et al. 1999).

Die cMRT-Diagnostik nimmt einen zentralen Stellenwert bei der Evaluation der Patienten mit klinischen Symptomen einer PMD bzw. SPG2 ein (Ono et al. 1994). Nahezu alle Patienten haben im Verlauf Veränderungen in der MRT-Diagnostik, die mit einer Leukodystrophie vereinbar sind und eine diffuse Signalintensitätsanhebung der zentralen weißen Substanz der Hemisphären,

des Kleinhirns und des Hirnstamms umfassen. Diese sind am besten in der T2-Wichtung und in Sequenzen der fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) darzustellen. Während die weiße Substanz, insbesondere der Balken, volumengemindert sein kann, sind die übrigen Hirnstrukturen unauffällig. Patienten mit einer milden SPG2-Form haben gewöhnlich ungleichmäßige und weniger deutlich ausgeprägte MRT-Veränderungen (Hodes et al. 1999). Frauen mit *PLP1*-Veränderungen können neurologisch auffällig sein. Wiederholt wurde eine inverse Beziehung zwischen Schwere der Erkrankung bei verwandten Jungen und der Ausprägung der Symptomatik bei heterozygot betroffenen Frauen beobachtet (Bond et al. 1997).

2. Originalarbeiten

2.1.

Kerst B, Mennerich D, Schuelke M, Stoltenburg-Didinger G, von Moers A, van Landeghem FKH, Speer A, Braun T, Hübner C 2000. **Heterozygous myogenic factor 6 mutation associated with myopathy and severe course of Becker muscular dystrophy.** Neuromuscul Disord 10(8): 572-577.

Wir beschreiben eine Familie, bei der der Sohn im Alter von 9 Jahren erhöhte Creatinkinase-Werte (300-560 U/l, Normalbereich < 80 U/l) aufwies, im Alter von 12 Jahren klagte er über Muskelkrämpfe und -schwäche im Bereich der Beine während und nach starker Anstrengung. In der Muskelbiopsie fanden sich myopathische Veränderungen mit Ringfasern und einem erhöhten Anteil zentral gelegener Kerne. Beim Vater des Indexpatienten lag eine Kardiomyopathie vor, er hatte aufgrund einer schweren Muskeldystrophie im 21. Lebensjahr die Lauffähigkeit verloren. Histologisch waren eine massive Fibrose und eine unregelmäßige Dystrophinfärbung auffällig, im *DMD*-Gen konnte eine den Leseraster nicht verschiebende Deletion der Exons 45-47 nachgewiesen werden. Diese Mutation ist die häufigste bei BMD-Patienten und geht - im Gegensatz zu unserem Patienten - gewöhnlich mit einem leichten bis mittelschweren Phänotyp einher (Koenig et al. 1989, Morandi et al. 1995).

Um eine Erklärung für die Myopathie des Jungen sowie den ungewöhnlich schweren Verlauf der BMD des Vaters zu finden, haben wir ein Mutationsscreening durchgeführt, das die basic-helix-loop-helix-Region der myogenen Transkriptionsfaktoren MYF3 bis MYF6 umfasste. Diese myogenen Faktoren werden ausschließlich im Muskel exprimiert und haben - bei einem zeitlich genau definierten Expressionsmuster - unterschiedliche Funktionen sowohl bei der Spezifizierung und Differenzierung als auch bei der Regeneration des Skelettmuskels. Per single strand conformation polymorphism (SSCP)-Analyse und Sequenzierung haben wir im *MYF6*-Gen eine heterozygote 387G→T Nukleotidtransversion gefunden (A112S). Um die Funktionalität dieser Mutation zu überprüfen, haben wir die Dimerisierung der Mutante mit ihrem Bindungspartner E2-2, die Bindung an die DNA-Sequenz der consensus E-box des Myosin light chain MLC1/3 Enhancer sowie die Transaktivierungskapazität untersucht. Das Heterodimerisierungspotential der MYF6-Mutante an E2-2 war signifikant reduziert und die DNA-Bindungskapazität des Heterodimers MYF6mut/E2-2 an die consensus E-box war

hochgradig eingeschränkt. Die Transaktivierung artifiziieller Promotoren (Thymidin Kinase und Myosin light chain Promotor) durch die Bindung an vier Kopien der E-box war durch die Mutante komplett aufgehoben. Wir postulieren, dass der pathologische Effekt der MYF6-Mutation auf einer Haploinsuffizienz beruht, die für die milde Myopathie des Indexpatienten sowie für die Aggravierung des Phänotyps bei BMD verantwortlich gemacht werden kann.

2.2.

Sifringer M*, Uhlenberg B*, Lammel S, Hanke R, Neumann B, von Moers A, Koch I, Speer A 2004. **Identification of transcripts from a subtraction library which might be responsible for the mild phenotype in an intrafamilially variable course of Duchenne muscular dystrophy.** Hum Genet 114(2): 149-156. *equal contribution

In dieser Arbeit haben wir uns der Frage gewidmet, warum bei zwei Geschwistern mit einer Duchenne Muskeldystrophie (DMD) ein sehr unterschiedlicher Grad der Schwere des Phänotyps vorliegt. Wir beschreiben eine Familie, in der der ältere Bruder deutlich stärker von der Muskelschwäche sowie der Progredienz der Erkrankung betroffen ist. Während der ältere Bruder im vierten Lebensjahr mit einer Muskelschwäche auffällig wurde, die bei steter Progredienz in eine Rollstuhlabhängigkeit im Alter von 11 Jahren mündete, ist der jüngere Bruder im vergleichbaren Alter mit einer Muskelschwäche aufgefallen, die jedoch nicht deutlich progredient war - eine Rollstuhlpflichtigkeit des jüngeren Bruders war zur Nachuntersuchung im Alter von neun Jahren nicht zu erwarten. Bei beiden Brüdern war die Dystrophinfärbung des Skelettmuskels negativ, obwohl Deletionen und Punktmutationen im *Dystrophin*-Gen ausgeschlossen werden konnten. Wir haben postuliert, dass der jüngere Bruder bei leichterem Phänotyp bessere Kompensationsmechanismen für die Muskeldystrophie haben muss und haben über eine PCR-basierte Subtraktionshybridisierung (Diatchenko et al. 1996) aus dem Skelettmuskel der beiden Patienten eine cDNA-Bank erstellt, in der sich die Transkripte befinden, die beim jüngeren Jungen deutlich stärker exprimiert werden als bei seinem älteren Bruder. Für zwölf Klone haben wir die Sequenz durch Datenbank-Analyse (BLAST) identifiziert. Durch real-time RT-PCR konnten wir den Unterschied im Expressionsgrad von sechs cDNAs, die im Kontext der Fragestellung eine Rolle spielen könnten, bestätigen. Zu den Kandidatengen gehören *Casein kinase 1 alpha 1 (CSNK1A1)*, *RAP2B*, *Dynactin 3 light chain (DCTN3)*, *Core binding factor beta (CBFB)* sowie *Myosin light polypeptide 2 (MYL2)*. In microarray Studien, bei denen die Expression verschiedener Gene aus DMD-Muskelbiopsien der von gesunden Kontrollpersonen gegenübergestellt wurde, wurde ebenfalls ein Unterschied für die Expression von *CSNK1A1*, *DCTN3*, *CBFB* sowie *MYL2* gefunden (Noguchi et al. 2003). Für die Funktionalität der differentiell exprimierten Kandidatengene erscheint von Interesse, dass *CSNK1A1* und *CBFB* eine Rolle in der Regulation des G₁ Checkpoints des Zellzyklus spielen. Wir postulieren daher, dass diese Gene über die Regulation von Proliferation und Differenzierung einen Einfluss auf den dystrophen Prozess bei DMD haben können.

2.3.

Uhlenberg B, Schuelke M, Rüschemdorf F, Ruf N, Kaindl AM, Henneke M, Thiele H, Stoltenburg-Didinger G, Aksu F, Topaloglu H, Nürnberg P, Hübner C, Weschke B, Gärtner J 2004. **Mutations in the gene encoding gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease.** Am J Hum Genet. 75(2): 251-260.

Die Pelizaeus-Merzbacher-ähnliche Erkrankung (PMLD) ist eine autosomal rezessiv vererbare Erkrankung mit primärer Hypomyelinisierung des zentralen Nervensystems, bei der - im Gegensatz zur Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung (PMD) - keine Veränderungen im *PLP1*-Gen vorliegt. Wir beschreiben eine konsanguine Indexfamilie aus der Türkei, bei der insgesamt drei Familienmitglieder - zwei Jungen und ein Mädchen - von einer PMLD betroffen sind. Mittels einer genomweiten Kopplungsanalyse mit der Affymetrix® GeneChip Methode (SNP Typisierung) bei insgesamt 16 Familienmitgliedern konnten wir den zugrunde liegenden Genort auf Chromosom 1q41 - q42 identifizieren. Unter den positionellen Genen in der 10 cM großen chromosomalen Region war das *Gap junction protein alpha 12 (GJA12, Connexin46.6)* das am ehesten in Frage kommende Gen. Im kodierenden Bereich dieses Gens fanden wir eine mit der Erkrankung in der Indexfamilie segregierende Punktmutation. Die Gap junction Proteine gehören zu einer homologen Familie interzellulärer Kanäle, und GJA12 wird durch Oligodendrozyten, die myelinbildenden Zellen des zentralen Nervensystems, exprimiert.

In drei von weiteren sechs Familien mit PMLD-Phänotyp konnten wir ebenfalls Mutationen im *GJA12*-Gen nachweisen, dazu gehören missense-, nonsense- und frameshift-Mutationen.

Unsere Hypothese, dass *GJA12*-Mutationen die Ursache für eine Subgruppe der PMLD ist, wird unterstützt durch die Tatsache, dass die missense-Mutationen nicht in 220 Kontrollallelen gefunden werden konnten und alle gefundenen Mutationen in den Familien mit der Erkrankung segregierten und in konservierten Regionen liegen. Da wir bei mehreren Familien mit PMLD keine Mutation im kodierenden Bereich des *GJA12*-Gens nachweisen konnten, muss davon ausgegangen werden, dass es sich um eine heterogene Erkrankung handelt.

Weil bei mehreren Patienten ebenfalls eine periphere Neuropathie vorlag, haben wir die *GJA12*-Expression in verschiedenen humanen Geweben untersucht und fanden diese - im Gegensatz zum murinen *Gja12* - auch im N. ischiadicus und N. suralis.

2.4.

Ruf N, Martelli M, Weschke B, Uhlenberg B 2007. **Oligodendroglial transcription factor (OLIG1 and OLIG2) mutations are not associated with Pelizaeus-Merzbacher-like leukodystrophy.** Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 144(3): 365-366.

Aufgrund der Tatsache, dass wir in unserem Kollektiv von 6 Familien mit PMLD-Phänotyp nur bei 3 Familien Mutationen im kodierenden Bereich des *GJA12*-Gens gefunden haben, stellte sich die Frage, welche Gene möglicherweise bei den übrigen Familien alteriert sein könnten. In einer anderen Arbeitsgruppe waren in einer Kohorte von acht PMLD-Patienten bereits Mutationen im *M6B*-Gen, das mit dem bei PMD alterierten *PLP1*-Gen interagiert, ausgeschlossen worden (Henneke et al. 2004).

Wir postulierten, dass ein primärer Defekt bei der Differenzierung der Oligodendrozyten zu einem Mangel an weißer Substanz - wie er bei PMD und PMLD vorkommt - führen kann, da erst der reife, ausdifferenzierte Oligodendrozyt in der Lage ist, Myelin zu bilden. Als Kandidatengene sahen wir die oligodendroglialen Transkriptionsfaktoren OLIG1 und OLIG2 an. Die Bedeutung dieser beiden Gene für die Oligodendrozytenentwicklung wird bei der *Olig1/Olig2*-Doppelknock-out Maus deutlich, bei der in allen Hirnregionen nahezu gar keine Oligodendrozyten Vorläuferzellen sowie reife Oligodendrozyten nachgewiesen werden konnten (Lu et al. 2002).

Für das Mutationsscreening, das die kodierende Region sowie die angrenzenden 5' und 3' untranslatierten Regionen der *OLIG1* und *OLIG2* Gene einschloss, haben wir eine Kohorte von 13 Patienten aus 12 unverwandten Familien mit dem PMLD-Phänotyp definiert, die keine Mutation im *GJA12*-Gen aufwiesen. In diesen Bereichen fanden wir - außer den zwei schon bekannten und einem neuen synonymen Polymorphismus - keine Mutationen.

Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass OLIG1- und OLIG2-Mutationen eher nicht mit dem PMLD-Phänotyp assoziiert sind. Da die Erkrankung selten ist, keine weiteren konsanguinen Familien vorliegen und Hirnschnitte nur äußerst selten zur Verfügung stehen, ist die Mutationsanalyse in anderen Kandidatengenen weiterhin ein geeigneter Ansatz.

2.5.

Ruf N, Uhlenberg B 2008. **Analysis of human alternative first exons and copy number variation of the *GJA12* gene in patients with Pelizaeus-Merzbacher-like disease.** Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. Jun 2, Epub ahead of print.

Auch in dieser Arbeit haben wir uns der Frage gewidmet, welche genetischen Veränderungen bei Patienten mit PMLD, die keine Mutation im kodierenden Bereich des *GJA12*-Gens haben, für den Phänotyp verantwortlich gemacht werden könnten. Während wir in der ersten Arbeit bei drei von sechs Familien Veränderungen im *GJA12*-Gen gefunden haben, wurde in der Zwischenzeit in einer sehr viel größeren Kohorte von 193 PMLD-Patienten gezeigt, dass lediglich 16 Patienten, also weniger als 10 Prozent, von *GJA12*-Mutationen betroffen sind (Henneke et al. 2008).

Da der Transkriptionsstart für das humane *GJA12*-Gen bisher lediglich theoretisch vorhersagbar ist und bei der Maus alternative erste Exons beschrieben worden sind (Anderson et al. 2005), haben wir die Hypothese verfolgt, dass das humane *GJA12*-Gen möglicherweise viel größer als ursprünglich angenommen ist bzw. in verschiedenen Isoformen vorliegen könnte. Mutationen in diesen Bereichen könnten dann für einen weiteren Anteil von Patienten mit PMLD-Phänotyp verantwortlich sein. Wir haben daher das 5' Ende des *GJA12*-Gens im humanen adulten Hirn und Rückenmark per RACE bestimmt und fanden ein einziges erstes Exon in einer Länge von 79 Basenpaaren - im Gegensatz zur theoretischen Vorhersage von 156 Basenpaaren; der Transkriptionsstart liegt damit weiter distal als zuvor angenommen (NCBI GenBank: EU433401). Bei der Sequenzanalyse des nun experimentell bestimmten vollständigen *GJA12*-Gens sowie der Promotorregion fanden wir allerdings bei 14 PMLD-Patienten keine Mutationen.

Des Weiteren haben wir untersucht, ob Variationen in der Anzahl der *GJA12*-Genkopien - PMD wird am häufigsten durch *PLP1*-Duplikationen verursacht - für einen Anteil der Patienten mit PMLD-Phänotyp verantwortlich gemacht werden können. Per real-time PCR TaqMan® konnten wir bei der gleichen PMLD-Kohorte keine Veränderungen in der Anzahl der *GJA12*-Kopien im Vergleich zur gesunden Kohorte nachweisen.

Der größte Anteil der PMLD-Patienten ist somit nicht mit Mutationen in kodierenden und regulatorischen Bereichen des *GJA12*-Gens als auch nicht mit Veränderungen in der Anzahl der *GJA12*-Genkopien assoziiert. Andere Gap junction Proteine sowie der Kir4.1-Kaliumkanal sind aufgrund der Veränderungen im knock-out Mausmodell weitere Kandidaten, die - wenn mutiert - den PMLD-Phänotyp erklären könnten.

2.6.

Wolf NI, Hartung I, Boltshauser E, Wiegand G, Koch J, Schmitt-Mechelke T, Martin E, Zschocke J, Uhlenberg B, Hoffmann GF, Weber L, Ebinger F, Rating D 2005. **Leukencephalopathy with ataxia, hypodontia and hypomyelination**. Neurology 64: 1461-1464.

Neben der Gruppe genetisch klar charakterisierter Leukodystrophien existieren auch solche, die aufgrund klinischer und magnetresonanztomographischer Kriterien als eigenständige Entität beschrieben worden sind und deren genetische Ursache bislang nicht geklärt werden konnte. Hierzu gehört z.B. die zystische Leukenzephalopathie mit Normo- oder Mikrozephalie (Henneke et al. 2005). Die Aufklärung der zugrunde liegenden genetischen Veränderungen bietet sich dann - bei ausreichender Patientenanzahl bzw. bei Vorliegen von konsanguinen Familien - durch genomweite Kopplungsanalysen an.

Wir beschreiben vier unverwandte Mädchen mit einer langsam progredienten Ataxie, einem bestimmten Muster der Hypodontie sowie mit diffusen Auffälligkeiten im Bereich der weißen Substanz, vereinbar mit einer hypomyelinisierenden Störung.

Die Mädchen, deutscher und Schweizer Herkunft, erreichten die motorischen Meilensteine zeitgerecht bzw. leicht verzögert, die kognitive Entwicklung war ebenfalls leicht verzögert. Eine milde Ataxie - vornehmlich des Ganges - entwickelte sich im zweiten Lebensjahr und war langsam progredient. Die Körperlänge entwickelte sich auf oder unterhalb der dritten Perzentile. Allen Patientinnen gemein ist eine Störung und Verzögerung der Dentition. Die bei den Mädchen zuerst durchstoßenden Milchzähne waren die Molaren, die unteren Schneidezähne brachen verspätet durch, und die oberen medialen Schneidezähne sind bei drei Mädchen bis ins Alter von acht Jahren nicht durchgebrochen. Die ausführliche Stoffwechseldiagnostik - auch wenn nicht bei allen Patienten durchgeführt - ergab keine Auffälligkeiten.

Im cMRT fand sich bei allen Patientinnen ein diffus hyperintensives Signal der weißen Substanz in der T2-Wichtung, passend zu einer leicht- bis mittelgradigen Hypomyelinisierung, sowie eine progrediente Atrophie des Kleinhirns, ausgeprägter im Kleinhirnwurm als in den -hemisphären. Zusammenfassend handelt es sich aufgrund der typischen Symptomenkonstellation am ehesten um eine neue Krankheitsentität. Da keine der Patientinnen aus einer konsanguinen Familie stammt, ist für die Aufklärung der genetischen Veränderungen die Charakterisierung weiterer Patienten mit der genannten Symptomatik erforderlich.

3. Diskussion

3.1. MYF6 ist ein modifizierender Faktor bei der Muskeldystrophie Becker

Der Phänotyp bei Dystrophinopathien ist davon abhängig, ob die zugrundeliegende Veränderung im *Dystrophin*-Gen das Leseraster verschiebt oder erhält. Ausnahmen zu dieser Korrelation sind in beide Richtungen - schwerer Phänotyp bei Leseraster erhaltenen Veränderungen bzw. leichter Phänotyp bei Leseraster verschiebenden Mutationen - beschrieben worden (Prior et al. 1997, Hattori et al. 1999), und die Autoren postulieren, dass hierbei modifizierende Gene eine Rollen spielen könnten.

Wir beschreiben eine Familie, in der der Sohn sowie der Vater von einer heterozygoten Mutation im myogenen Transkriptionsfaktor MYF6 betroffen ist. Der Sohn zeigte typische klinische und neuropathologische Zeichen einer milden Myopathie. Der - im Vergleich mit Befunden anderer, gleichaltriger BMD-Patienten (Kaido et al. 1991) - signifikant erhöhte Anteil an Fasern mit zentral gelegenen Kernen weist auf eine Stimulation der De- und Regenerationszyklen im Skelettmuskel hin (Bhagwati et al. 1996, Megeney et al. 1996). Die histologischen Veränderungen beim Sohn sind vergleichbar mit denen bei *Myf6*^{-/-}-Mäusen; bei letzteren ist eine Fehlorganisation der Fasern sowie eine signifikante Reduktion in der Faseranzahl beschrieben worden (Arnold und Winter 1998, Patapoutian et al. 1995).

Der Vater des Indexpatienten hatte eine Kielbrust und war aufgrund einer progredienten Muskelschwäche mit 21 Jahren rollstuhlabhängig; bei ihm wurde eine Leseraster erhaltende Deletion der Exons 45-47 des *Dystrophin*-Gens nachgewiesen, die gewöhnlich mit einem leichten bis mittelschweren BMD-Verlauf einhergeht (Koenig et al. 1989, Bushby et al. 1993, Comi et al. 1994, Morandi et al. 1995). Auch bei ihm haben wir eine heterozygote *MYF6*-Mutation nachgewiesen. Da bei keinem der bislang publizierten Patienten mit einer Exon 45-47 Deletion ein so schwerer Phänotyp beschrieben worden ist (Koenig et al. 1989, Piccolo et al. 1994, Zeitoun et al. 1997), gehen wir davon aus, dass die *MYF6*-Mutation einen modifizierenden Faktor für die Dystrophinopathie darstellt. Andere Mutationen in den humanen myogenen Transkriptionsfaktoren sind bis heute nicht beschrieben worden (Tseng et al. 1999, siehe auch The Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

Einen vergleichbaren Effekt eines myogenen Transkriptionsfaktors auf den DMD-/BMD-Phänotyp findet sich bei der *Myod*^{-/-}/*mdx*-Doppel-knock-out-Maus. Führt eine Dystrophin-

Defizienz beim Jungen zu einer DMD, so leidet die dystrophindefiziente *mdx*-Maus an der milderen BMD, was durch die besseren Regenerationsmechanismen des murinen Skelettmuskels erklärt werden kann. So ist vor allem Myod in regenerierenden und nicht in reifen Muskelzellen zu finden (Baghwati et al. 1996). Bei der *Myod*^{-/-}/*mdx*-knock-out-Maus findet man eine gestörte Muskelregeneration und eine sekundäre Kardiomyopathie (Megeney et al. 1996, Megeney et al. 1999), so dass der Phänotyp mit der humanen DMD vergleichbar ist. Die *Myf6*^{-/-}/*mdx*-knock-out-Maus ist bislang nicht generiert worden, so dass ein modifizierender Effekt von Myf6 auf den murinen *mdx*-Phänotyp noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Ob die Kielbrust des Vaters aufgrund der *MYF6*-Mutation vorliegt, ist unklar. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass bei *Myf6*^{-/-}-knock-out-Mäusen die distalen Rippen nicht bis an das Sternum heranreichen (Olson et al. 1996). Gegen einen ursächlichen Zusammenhang zwischen *MYF6*-Mutation und dem Symptom der Kielbrust spricht die Beobachtung, dass der Sohn von derselben *MYF6*-Mutation betroffen ist und keine Sternummalformation aufweist.

Aufgrund der In-vitro-Studien konnten wir zeigen, dass durch die *MYF6*-Mutation die Protein-Protein-Interaktion erheblich reduziert und die DNA-Bindung aufgehoben wurde, so dass erwartungsgemäß mutantes *MYF6*-Protein keine Transaktivierungskapazität mehr aufwies. Da wir in Kotransfektionsstudien keinen Hinweis auf einen dominant negativen Effekt der Mutante hatten, gehen wir davon aus, dass eine Loss-of-function-Situation vorliegt und der pathogene Effekt auf einer Haploinsuffizienz des betroffenen Allels beruht.

3.2. Unterschiedlich exprimierte Gene bei einem intrafamiliär variablen Verlauf einer Muskeldystrophie Duchenne als mögliche Ursache für den milderen Phänotyp

Das Vorliegen von genetisch modifizierenden Faktoren wird dann postuliert, wenn bei gleichem Genotyp ein divergierender Phänotyp vorliegt. Prinzipiell können diese modifizierenden Faktoren die Penetranz der Erkrankung, die Art der Vererbung (dominant versus rezessiv), das Expressionsniveau anderer Gene sowie die Pleiotropie (ein Gen beeinflusst zwei oder mehrere voneinander unabhängige Merkmale) beeinflussen (siehe Übersichtsarbeit Nadeau et al. 2001). Wir beschreiben eine Familie, in der beide Söhne unter einer Muskeldystrophie Duchenne leiden, der jüngere Bruder jedoch von einem deutlichen milderen Verlauf betroffen ist. Die

Unterschiede im Verlauf können nicht durch Medikation oder Behandlungsart erklärt werden; die gleiche Vaterschaft zu beiden Kindern haben wir durch Mikrosatellitenanalysen nachgewiesen. Während wir keine Deletionen oder Punktmutationen im *Dystrophin*-Gen nachweisen konnten, fanden wir bei beiden Brüdern eine negative Dystrophinfärbung (dys1-3) in der Muskelbiopsie.

Wir haben postuliert, dass der jüngere, weniger stark betroffene Bruder bessere Kompensationsmechanismen für den dystrophen Prozess haben muss, und haben mittels PCR-basierter Subtraktionshybridisierung aus dem Skelettmuskel eine cDNA-Bank generiert, in der sich die Transkripte befinden, die durch den jüngeren Bruder signifikant stärker exprimiert werden und damit einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben könnten. Wir haben mindestens fünf Gene identifiziert, die durch den jüngeren Bruder mit dem milderen Verlauf überexprimiert werden: *Casein kinase 1 alpha 1 (CSNK1A1)*, *RAP2B*, *Dynactin 3 light chain (DCTN3)*, *Core binding factor beta (CBFB)* sowie *Myosin light polypeptide 2 (MYL2)*. Die Überexpression haben wir per real-time TaqMan PCR bestätigt. Unterschiedliche mRNA-Konzentrationen von CSNK1A1, DCTN3, CBFB und MYL2 wurden ebenfalls in einer Studie nachgewiesen, in der die Expression bestimmter Gene bei sechs DMD-Patienten und unbetreffenen Kontrollen untersucht worden ist (Noguchi et al. 2003). MYL2 war hier durch DMD-Patienten deutlich niedriger exprimiert als in der Kontrollgruppe, allerdings lagen ebenfalls interindividuelle Unterschiede vor. Die differentielle Expression von MYL2 korrelierte hierbei sehr gut mit dem Voranschreiten regenerativer Prozesse, so dass die Autoren MYL2 als einen sehr sensitiven Marker für Muskelregeneration erachten. Zu diesen Ergebnissen passend fanden wir eine erhöhte Expression von MYL2 beim jüngeren Bruder mit milderem Phänotyp, vergleichbar mit unserer Kontrollgruppe. Vor dem Hintergrund der Daten von Noguchi und Mitarbeitern (2003) wird daher unsere Annahme bestätigt, dass der jüngere, weniger stark betroffene Bruder von besseren regenerativen Fähigkeiten profitiert. Unterschiede in der MYL2-Expression wurden ebenfalls in einer kürzlich publizierten Studie von Baker und Mitarbeitern (2006) gefunden, diese verglichen *Utrophin/Dystrophin*-knock-out-Mäuse mit der *mdx*-Maus. Bei der *mdx*-Maus ist aufgrund einer nonsense-Mutation im Exon 23 des *Dystrophin*-Gens kein funktionelles Dystrophin nachweisbar - wie beim humanen DMD-Phänotyp -, sie weist aber einen deutlich milderen klinischen Phänotyp auf. Das dem Dystrophin paraloge Utrophin hat eine kompensatorische Funktion, und die *Utrophin/Dystrophin*-knock-out-Maus, der die Kompensation fehlt, zeigt den klinischen Phänotyp von DMD-Patienten (Deconinck et al. 1997). Die Autoren der Studie fanden MYL2 bei

der *Utrophin/Dystrophin*-knock-out-Maus deutlich höher exprimiert als bei der *mdx*-Maus. Da diese beiden Mäuse jedoch ein vergleichbares Ausmaß an Dystrophie und Regenerationsphänomenen zeigen, kann die Überexpression von *MYL2* im Zusammenhang mit anderen Eigenschaften der *Utrophin/Dystrophin*-knock-out-Maus stehen. Diese weist fast ausschließlich langsame oxidative Fasern sowie ein Fehlen der postsynaptischen Fältelung an der Endplatte auf (Rafael et al. 2000).

CSNK1A1, *DCTN3* und *CBFB*, die wir beim jüngeren Bruder mit dem milderen Phänotyp überexprimiert fanden, waren in der Studie von Noguchi und Mitarbeitern (2003) bei DMD-Patienten weniger stark exprimiert als in der Kontrollgruppe. Diese Konstellation ist mit unseren Ergebnissen konkordant und spricht für hohe mRNA-Konzentrationen der genannten Gene bei weniger schwerer Dystrophie. Da für diese Gene keine patientenindividuelle Korrelation mit histologischen Veränderungen vorgenommen worden ist, bleibt die Bedeutung z.B. für regeneratorsche Prozesse unklar.

Interessanterweise kodieren vier der beim Bruder mit dem milderen Phänotyp überexprimierten Gene - *CSNK1A1*, *RAP2B*, *DCTN3* und *CBFB* - Proteine, die eine Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung spielen. *CSNK1A1* und *CBFB* sind beteiligt an der Regulation des G₁ checkpoints. Für ein weiteres Kandidatengen, welches den zyklinabhängigen Kinase Inhibitor p21 und bei DMD-Patienten und *mdx*-Mäusen im Vergleich zu gesunden Kontrollen und Wildtyp Mäusen erhöht gefunden wurde (Endesfelder et al. 2000), fanden wir auch eine erhöhte Expression bei dem Bruder mit dem schwereren Phänotyp.

3.3. Eine Untergruppe der Pelizaeus-Merzbacher-ähnlichen Erkrankung ist mit Mutationen im *Gap junction protein alpha 12 (Connexin 46.6)* Gen assoziiert

In einer informativen konsanguinen Familie mit PMLD-Phänotyp haben wir eine genomweite Kopplungsanalyse mit der GeneChip 10K Affymetrix[®] Technologie durchgeführt und einen einzigen Genort auf Chromosom 1q41-q42 identifiziert. In dieser Region haben wir neben sechs weiteren in Frage kommenden - weil potentiell an der Myelinisierung beteiligten - Genen das *GJA12*-Gen, welches das Gap junction protein alpha 12 kodiert, als Kandidatengen erachtet. In der kodierenden Region dieses Gens fanden wir bei drei von sechs Familien mit PMLD-Phänotyp verschiedene Sequenzalterationen, die missense-, nonsense- und frameshift-Mutationen einschlossen.

Die Tatsache, dass drei der sechs PMLD-Familien nicht von Mutationen im *GJA12*-Gen betroffen sind, spricht für genetische Heterogenität und wurde schon in früheren Studien postuliert (Lazzarini et al. 1997, Schiffmann und Boespflug-Tanguy 2001). Die Assoziation von *GJA12*-Mutationen mit dem PMLD-Phänotyp ist dann in weiteren Arbeiten bestätigt worden (Bugiani et al. 2006, Salviati et al. 2007, Wolf et al. 2007).

Zusätzlich zu den typischen PMLD-Symptomen zeigten unsere Patienten mit *GJA12*-Mutationen mehrheitlich eine periphere Neuropathie und einfache sowie komplex fokale Krampfanfälle. Diese Symptomatik ist nur ganz sporadisch bei PMD Patienten beschrieben worden (Garbern et al. 1997, Cailloux et al. 2000, Koeppen und Robitaille 2002).

Bei einigen PMLD-Patienten war - vor allem im Bereich der unteren Extremitäten - die Nervenleitgeschwindigkeit verlangsamt, so dass ebenfalls eine demyelinisierende Komponente im Bereich des peripheren Nervensystems vorzuliegen scheint. Wir haben daher per RT-PCR untersucht, ob *GJA12* auch im humanen peripheren Nerven exprimiert ist - im Gegensatz zu murinem N. ischiadicus, für den keine Expression von *Gja12* nachgewiesen worden ist (Teubner et al. 2001, Odermatt et al. 2003). Wir fanden *GJA12*-Transkripte im humanen N. ischiadicus und N. suralis, jedoch in geringerer Konzentration als im Rückenmark und im Hirn. Der Nachweis minimaler Konzentrationen von *GJA12* im humanen Skelettmuskel ist am ehesten auf das Vorhandensein geringer Mengen Nervenfasern im Muskelgewebe zurückzuführen.

Unter Krampfanfällen litten vier von fünf Patienten mit *GJA12*-Veränderungen; diese waren fokalen Ursprungs und begannen im Schulalter. Diese Beobachtung kann durch Ergebnisse von Samoilova und Mitarbeitern (2003) untermauert werden, die eine Abhängigkeit der epileptiformen Aktivität in hippocampalen Schnittkulturen von der interzellulären Kommunikation nachwiesen.

Die Häufigkeit von *GJA1*-Mutationen sowie das klinische Spektrum ist kürzlich in einer sehr großen PMLD-Kohorte untersucht worden (Henneke et al. 2008). Die Autoren fanden lediglich bei 14 der 182 PMLD-Familien eine Mutation im kodierenden Bereich des *GJA12*-Gens und konnten somit zeigen, dass in vorangegangenen Studien mit kleineren Kohorten die Häufigkeit von *GJA12*-Alterationen als zu hoch angenommen worden war. Das klinische Bild wird als homogen beschrieben: Lauffähigkeiten, Sprache und kognitive Leistungen sind vergleichbar mit Patienten, die an der klassischen Form der PMD bzw. an der mildesten Form, der Spastischen Paraplegie Typ 2 (SPG2), leiden. Während die intellektuellen Fähigkeiten bei Patienten mit *GJA12*-Veränderungen besser sind, tritt die Verschlechterung motorischer Fähigkeiten in einem

früheren Alter auf als bei Patienten mit *PLP1*-Alterationen. Zerebrale Krampfanfälle und eine periphere Neuropathie wurden bei weniger als 20 Prozent der Patienten gefunden.

Interessanterweise zeigt die *Gja12*-defiziente Maus klinisch keine Auffälligkeiten, ultrastrukturell findet sich eine Vakuolisierung im Bereich des Sehnervs (Odermatt et al. 2003, Menichella et al. 2003). Bei Defizienz des *Gjb1*-Gens (Connexin 32), das durch Oligodendrozyten und Schwannsche Zellen exprimiert wird, entsteht im fortgeschrittenen Alter - wie bei der humanen Charcot-Marie-Tooth-Typ 1-Erkrankung - eine periphere Neuropathie (Bergoffen et al. 1993, Scherer et al. 1998, Hahn et al. 2000). Erst bei der kombinierten Defizienz von *Gja12* und *Gjb1* kommt es zu einem Tremor und tonischen Krampfanfällen, so dass bei diesen Connexinen von einer funktionellen Redundanz ausgegangen werden kann (Odermatt et al. 2003, Menichella et al. 2003). Aus diesem Grund haben wir bei allen Patienten mit *GJA12*-Mutation Veränderungen in der kodierenden Region des *GJB1*-Gens ausgeschlossen.

Bei *GJB1*-Mutationen sind wiederholt Fälle beschrieben worden, bei denen die Patienten neben der peripheren Neuropathie von transienten demyelinisierenden Läsionen im zentralen Nervensystem betroffen sind (Paulson et al. 2002, Hanemann et al. 2003, Takashima et al. 2003). Da Patienten mit *GJB1*-Deletion diese Veränderung hingegen nicht aufweisen, ist es denkbar, dass andere oligodendrozytär exprimierte Connexine - wie *GJA12* - die Funktion von *GJB1* kompensieren können. Auffällig ist, dass die zentralnervösen Symptome bei *GJB1*-Mutationen lediglich transient und deutlich milder als bei PMLD-Patienten ausfallen und die *Gjb1*-defiziente Maus keine strukturellen Veränderungen des zentralen Myelins aufweist (Scherer et al. 1998), so dass *GJA12* möglicherweise für die Homöostase der myelinisierenden Funktion des Oligodendrozyten bedeutender ist als *GJB1*.

Für die Funktionalität des mutierten *GJA12* ist auf der einen Seite erwähnenswert, dass der Phänotyp für alle beschriebenen Mutationen relativ homogen ist; dies spräche für eine loss-of-function-Situation des mutierten Proteins. Auf der anderen Seite ist für Connexine in Koexpressionsstudien gezeigt worden, dass mutierte Connexine im Sinne eines toxic-gain-of-function die Funktionalität anderer Connexine beeinträchtigen können (Rouan et al. 2001, Lagree et al. 2003). Für die *GJA12*-missense-Mutanten P90S, Y272D und M286T haben Orthmann-Murphy und Mitarbeiter (2007a) gezeigt, dass eine loss-of-function-Situation vorliegt. Sie wiesen nach, dass keine der Mutanten in der Lage ist, funktionelle interzelluläre Kanäle auszubilden. Dass die Mutanten im endoplasmatischen Retikulum retiniert anstelle an die Plasmamembran transportiert zu werden, kann ein Aspekt des Funktionsverlustes des Kanals sein. In diesem Zusammenhang ist auch bedeutend, dass Oligodendrozyten nur

sporadisch miteinander gekoppelt sind, während Astrozyten untereinander und Oligodendrozyten mit Astrozyten extensiv verbunden sind. Während GJB1 in Myelinschichten miteinander Kanäle ausbildet, konnte dies für GJA12 nicht nachgewiesen werden (Kamasawa et al. 2005). GJA12 ist jedoch mit GJA1 an der Ausbildung interzellulärer Kanäle zwischen Oligodendrozyten und Astrozyten beteiligt (Kleopa et al. 2004, Kamasawa et al. 2005). Darüber hinaus darf man aufgrund des PMLD-Phänotyps davon ausgehen, dass die myelinbildende Kapazität des Oligodendrozyten maßgeblich von der Kopplung zu Astrozyten abhängig ist.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine Untergruppe der PMLD durch Mutationen im *GJA12*-Gen verursacht wird. Dass *GJA12* beim Menschen auch im peripheren Nervensystem exprimiert ist, erklärt die Beobachtung, dass ein Teil der Patienten auch von einer demyelinisierenden Neuropathie betroffen ist.

3.4. Veränderungen der *GJA12*-Kopienanzahl sowie Mutationen in den oligodendroglialen Transkriptionsfaktoren *OLIG1* und *OLIG2* sind nicht mit dem PMLD-Phänotyp assoziiert

Durch die Untersuchung einer sehr großen PMLD-Kohorte auf Mutationen im kodierenden Bereich des *GJA12*-Gens ist deutlich geworden, dass diese Genalterationen lediglich für eine kleine Untergruppe (~8 Prozent der PMLD-Patienten) verantwortlich gemacht werden können (Henneke et al. 2008). Wir haben daher zunächst die Analyse des *GJA12*-Gens um die Sequenzierung der nichtkodierenden Region ausgeweitet. Hierfür haben wir den bislang nicht identifizierten Transkriptionsstart sowie das potentielle Vorliegen alternativer erster Exons in humanem Hirn und Rückenmark per 5' RACE untersucht. Während bei der Maus im Hirn drei unterschiedliche Isoformen des ersten Exons vorliegen (Anderson et al. 2005), fanden wir in humanem Hirn und Rückenmark ein einziges erstes Exon. Für zwei von drei der bei der Maus beschriebenen Isoformen konnten wir per Datenbankanalyse keine humane orthologe Region identifizieren, so dass spekuliert werden kann, dass diese keine funktionelle Bedeutung haben. Die nun experimentell bestimmte nichtkodierende Region haben wir daraufhin bei 14 PMLD-Patienten ohne Mutation im kodierenden Bereich des *GJA12*-Gens untersucht, fanden jedoch keine Sequenzalteration, so dass funktionell bedeutsame Veränderungen im nichtkodierenden Bereich des *GJA12*-Gens als Ursache für die PMLD eher unwahrscheinlich sind.

Zur Vervollständigung der *GJA12*-Analysen haben wir auch die *GJA12*-Kopienanzahl (z.B. Duplikationen) bei PMLD-Patienten untersucht. Dass Duplikationen mit dem PMLD-Phänotyp einhergehen könnten, führten wir auf folgende Zusammenhänge zurück: Die PMD wird am häufigsten durch *PLP1*-Duplikationen verursacht; pathophysiologisch kommt es durch die *PLP1*-Überexpression zu einer Anhäufung von Cholesterin und PLP1 in Lysosomen (Simons et al. 2002). Diese Akkumulation wiederum stört den Transport anderer Proteine zur Plasmamembran, dessen Ausstülpungen die Myelinschichten bilden. Einen vergleichbaren Mechanismus sahen wir potentiell für das Vorliegen bei überexprimiertem *GJA12*, das ebenfalls zur oligodendrozytären Plasmamembran gelangen muss. In der selben Kohorte von 14 PMLD-Patienten fanden wir jedoch keine Abweichung in der *GJA12*-Kopienanzahl. Zusammen mit den Ergebnissen von Henneke und Mitarbeitern (2008) kommen wir daher zu dem Schluss, dass für die Mehrzahl der PMLD-Patienten mindestens ein anderes Gen involviert sein muss.

Ein weiterer Genort ist auf Chromosom Xq identifiziert worden (Lazzarini et al. 1997), ohne dass bislang das zugrunde liegende Gen gefunden wurde. Durch Henneke und Mitarbeiter (2004) wurden ebenfalls Mutationen im *M6B*-Gen, das mit dem bei der PMD alterierten *PLP1*-Gen interagiert, als Ursache für die PMLD ausgeschlossen.

Auf der Suche nach neuen Kandidatengenen für den PMLD-Phänotyp ließen wir uns von der folgenden Überlegung leiten: Während *PLP1*-Alterationen in der pathophysiologischen Kaskade zu einem Untergang des reifen Oligodendrozyten und damit zu einem Myelinisierungsdefizit führen (Kagawa et al. 1994, Inoue et al. 1996), ist prinzipiell für einen vergleichbaren Phänotyp auch eine Störung in der Differenzierung der oligodendroglialen Zellreihe denkbar. Da der *Olig1/Olig2*-Doppel-knock-out-Maus nahezu alle oligodendrozytären Vorläuferzellen und reife Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem fehlen (Lu et al. 2002), sahen wir die beiden oligodendroglialen Transkriptionsfaktoren *OLIG1* und *OLIG2* als potentielle Kandidatengene an. In einer Kohorte von 13 Patienten aus 12 unverwandten Familien fanden wir in der kodierenden Region und den angrenzenden untranslatierten Bereichen der *OLIG1*- und *OLIG2*-Gene - mit Ausnahme von zwei bekannten und einem neuen synonymen Polymorphismus - keine Mutationen. Mutationen im *OLIG2*-Gen wurden bei schwerem PMLD-Phänotyp später auch durch Bonnet-Dupeyron und Mitarbeitern ausgeschlossen (2008a).

Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass *OLIG1*- und *OLIG2*-Mutationen als Ursache für eine größere Untergruppe des PMLD-Phänotyps nicht in Frage kommen. Da die Erkrankung selten ist und damit das Vorliegen weiterer informativer Familien nicht wahrscheinlich ist, muss die

Mutationsanalyse in anderen Kandidatengenen weiterhin als geeigneter Ansatz angesehen werden.

Als weiteres Kandidatengen unter den Gap junction Proteinen kommt - weil ebenfalls durch Oligodendrozyten exprimiert - *GJE1* in Frage. *Gje1*-defiziente Mäuse zeigen jedoch klinisch als auch ultrastrukturell keine Auffälligkeiten (Eiberger et al. 2006); interessanterweise bildet dieses Protein nur Hemikanäle und keine kompletten interzellulären Kanäle aus (Ahn et al. 2007). Ein anderes Gap junction Protein erscheint wiederum für die Homöostase der Oligodendrozyten wichtig, obwohl astrozytär exprimiert: Für GJA1 ist gezeigt worden, dass dieses Protein der interagierende Hemikanal für GJA12 ist (Kleopa et al. 2004). Bestimmte *GJA12*-missense-Mutanten führen dann auch zu einer Störung der GJA12-GJA1-Kopplung (Orthmann-Murphy et al. 2007b), so dass denkbar ist, dass der PMLD-Phänotyp ebenfalls durch Mutationen im *GJA1*-Gen repräsentiert wird.

Für den Kir4.1-Kaliumkanal ist ebenfalls gezeigt worden, dass er eine wichtige Rolle für die Entwicklung des Oligodendrozyten spielt (Neusch et al. 2001). *Kir4.1*-defiziente Mäuse zeigen eine gestörte Motorik bei Hypomyelinisierung des Rückenmarks mit spongiformer Vakuolenbildung. Dieser Phänotyp erinnert an *Gja12*-defiziente Mäuse, bei denen die Vakuolisierung des Sehnervs das auffälligste Merkmal ist.

3.5. Die Leukenzephalopathie mit Ataxie, Hypodontie und Hypomyelinisierung ist eine neue, klinisch definierte Entität

Wir beschreiben vier Patientinnen deutscher und Schweizer Herkunft mit der bei allen Betroffenen wiederkehrenden typischen Symptomkonstellation aus progredienter Ataxie, Minderwuchs, einem spezifischen Muster der Hypodontie, Hypomyelinisierung und zerebellärer Atrophie. Die Frequenz der Zahnungsabnormalität mit verspätetem Durchbrechen der Zähne, Auffälligkeiten in der Zahnungsreihenfolge sowie Fehlen bleibender Zähne in der Bevölkerung ist unklar. Da auch Angaben zur Häufigkeit von Leukenzephalopathien nicht vorliegen, diese aber ebenfalls selten sind, ist eine zufällige Kombination aus Hypodontie und Leukenzephalopathie unwahrscheinlich.

Zur Differentialdiagnose gehören die ektodermalen Dysplasien, die mit Zahnungsauffälligkeiten einhergehen können. Für einige Patienten ist die Kombination mit einer zerebellären Ataxie beschrieben worden (OMIM 212835); dass dies jedoch eine Krankheitsentität darstellt, ist

aufgrund der sehr variablen klinischen Symptomatik (Klingmüller und Kirchhof 1954, Rushton und Genel 1981, Baraitser et al. 1993) bei unbekanntem zugrunde liegenden Gendefekt eher unwahrscheinlich. Trotzdem ist denkbar, dass die von uns beschriebenen Patienten mit möglicherweise nur diskreten Veränderungen der Haare und Nägel zu einer Untergruppe der ektodermalen Dysplasien gerechnet werden.

Erkrankungen der weißen Substanz in Kombination mit Zahnanomalien sind bei der okulodentodigitalen Dysplasie (OMIM #164200) beschrieben worden. Die Patienten haben Zahnschmelzanomalien und Fehlbildungen der Augen und Hände; ein Teil fällt durch Tremor, Ataxie und Spastik auf (Gorlin et al. 1963). Im cMRT finden sich eine milde Atrophie und Signalveränderungen der zentralen weißen Substanz (Loddenkemper et al. 2002). Diese Erkrankung wird durch Mutationen im *Gap junction protein alpha 1 (GJA1)* hervorgerufen, die bei einem Teil unserer Patienten jedoch ausgeschlossen wurde. Obwohl *GJA1* durch Astrozyten exprimiert wird, führt diese Erkrankung wie bei Alterationen des *GJA12*-Gens - jedoch oligodendrozytär exprimiert - zu Veränderungen der weißen Substanz (siehe auch 3.4.).

Eine neue Form einer autosomal rezessiven Leukenzephalopathie mit Hypodontie ist in einer großen konsanguinen syrischen Familie beschrieben worden (Atrouni et al. 2003). Im cMRT fanden sich allerdings keine Zeichen einer Hypo-, sondern einer Demyelinisierung, vor allem im Bereich der Pyramidenbahn. Aufgrund der Beobachtung, dass die Ataxie bei diesen Patienten bedeutend später auftrat und die Zahnungsauffälligkeiten andere waren als bei unseren Patienten, ist davon auszugehen, dass es sich um eine andere Krankheitsentität handelt.

Auch Timmons et al. haben 2006 vier Patienten mit einer progredienten hypomyelinisierenden Erkrankung mit zerebellärer Atrophie und Hypodontie beschrieben, die im Unterschied zu unseren Patienten zusätzlich unter einem hypogonadotropen Hypogonadismus leiden. Da unsere Patientinnen im präpubertären Alter charakterisiert worden waren, ist es möglich und aufgrund bislang nicht publizierter Beobachtungen (Dr. Nicole Wolf) wahrscheinlich, dass es sich um die identische Erkrankung handelt.

Die Veränderungen in der Magnetresonanztomographie mit hohem myo-Inositol und niedrignormalem Cholin sind unspezifisch und können auch bei anderen hypomyelinisierenden Erkrankungen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend beschreiben wir mit vier Patientinnen mit einer hypomyelinisierenden Störung und einem spezifischen Zahnungsdefekts eine neue, klinisch definierte Entität. Zur Klärung des genetischen Defekts halten wir es aufgrund der sehr charakteristischen

Zahnauffälligkeiten für wahrscheinlich, mehr Patienten mit gleichem Phänotyp rekrutieren zu können.

4. Zusammenfassung

Auch mit der Entschlüsselung des humanen Genoms ist es eine der großen Herausforderungen geblieben, bekannten Genen das entsprechende Krankheitsbild - und umgekehrt - zuzuordnen. Dennoch kann für eine Vielzahl von Genen die daraus resultierende Erkrankung bis heute nicht benannt werden. Für die Aufklärung des zugrunde liegenden Gendefekts sind prinzipiell einige Ansätze erfolgsversprechend, u.a. Kopplungsanalysen in informativen Familien mit definiertem Phänotyp oder die gezielte Untersuchung von Kandidatengenen, die aufgrund ihrer Funktion, z.B. in Mausmodellen, den Phänotyp erklären könnten. Ausnahmen zu einer eindeutigen Genotyp-Phänotyp-Korrelation können durch modifizierende Faktoren i.S. oligogener Erkrankungen erklärt werden, die eine Intermediärstellung zwischen einfachen und komplexen Vererbungsgängen einnehmen.

In dieser Arbeit widmen wir uns folgenden Konstellationen aus dem Formenkreis der Dystrophinopathien und hypomyelinisierenden Leukodystrophien:

1. Der Phänotyp einer Muskeldystrophie Becker ist nicht vereinbar mit dem zugrunde liegenden Genotyp.
2. Bei identischem Genotyp einer Muskeldystrophie Duchenne leiden zwei Geschwister unter einem sehr unterschiedlichen Verlauf ihrer Erkrankung.
3. Für den lange bekannten und definierten Phänotyp der Pelizaeus-Merzbacher-ähnlichen Erkrankung (PMLD) identifizieren wir den zugrunde liegenden Gendefekt einer Untergruppe.
4. Wir definieren bei Patienten mit Leukenzephalopathie, Ataxie, Hypodontie und Hypomyelinisierung eine neue klinische Entität, ohne bislang den Gendefekt zu kennen.

Bei der ersten Konstellation handelt es sich um einen Patienten, der typische Zeichen einer Myopathie aufweist. Bei ihm fanden wir eine heterozygote missense Mutation im Gen des myogenen Transkriptionsfaktors MYF6. Der Vater dieses Patienten leidet unter einem ungewöhnlich schweren Verlauf einer Muskeldystrophie Becker, und auch bei ihm wiesen wir die identische MYF6-Mutation nach. Da die Funktion des mutierten Proteins erheblich gestört ist, postulieren wir, dass die MYF6-Mutation mit einer Myopathie assoziiert ist und beim Vater als modifizierender, aggravierender Faktor für die Muskeldystrophie fungiert.

Im zweiten Fall berichten wir von zwei Brüdern mit einem intrafamiliär variablen Verlauf einer Muskeldystrophie Duchenne. Aus Muskelgewebe haben wir per PCR-basierter

Subtraktionshybrisierung eine cDNA-Bank mit den Transkripten generiert, die durch den jüngeren, weniger stark betroffenen Bruder überexprimiert werden und möglicherweise für den milderen Phänotyp verantwortlich gemacht werden können. Aufgrund des Expressionsmusters und des Vergleichs mit anderen Studien können wir unsere Hypothese bestätigen, dass der weniger stark betroffene Bruder von einer besseren Regenerationskapazität des Muskels profitiert.

Im dritten Fall haben wir bei einer konsanguinen Familie mit PMLD-Phänotyp per Kopplungsanalyse einen singulären Genort auf Chromosom 1q41-q42 ausgemacht und bei drei von sechs Familien missense Mutationen im kodierenden Bereich des *Gap junction protein alpha 12 (GJA12)*-Gens gefunden. Ein Teil der PMLD-Patienten mit *GJA12*-Mutation leidet unter einer peripheren Neuropathie und zerebralen Krampfanfällen, die bei dem klassischen Pelizaeus-Merzbacher-Phänotyp nur sporadisch beschrieben worden sind. Mutationen in nichtkodierenden Bereichen sowie eine Variation in der *GJA12*-Kopienanzahl (z.B. Duplikationen) sind dagegen nicht mit dem PMLD-Phänotyp assoziiert. Aufgrund des Phänotyps der *Olig1/Olig2*-Doppel-knock-out-Maus erachteten wir auch die Transkriptionsfaktoren *OLIG1* und *OLIG2* als Kandidatengene für Hypomyelinisierung, fanden jedoch in einer Kohorte von 14 PMLD-Patienten keine Veränderungen im kodierenden Bereich.

Im letztgenannten Fall beschreiben wir vier Kinder mit progredienter Ataxie, Kleinwuchs, einem spezifischen Muster der Hypodontie, Hypomyelinisierung und zerebellärer Atrophie. Aufgrund der charakteristischen Kombination gehen wir davon aus, dass es sich um eine neue Krankheitsentität handelt.

Unsere Arbeiten leisten einen Beitrag zum Verständnis klinischer und genetischer Aspekte bei Dystrophinopathien und hypomyelinisierenden Leukodystrophien. Während unsere Ergebnisse derzeit vorrangig von diagnostischer Bedeutung sind, ist für die Zukunft wünschenswert, diese für kausale molekulare Therapien nutzbar zu machen.

5. Literaturverzeichnis

Ahn M, Lee J, Gustafsson A, Enriquez A, Lancaster E, Sul JY, Haydon PG, Paul DL, Huang Y, Abrams CK, Scherer SS 2007. Cx29 and Cx32, two connexins expressed by myelinating glia, do not interact and are functionally distinct. *J Neurosci Res* 86(5): 992-1006.

Anderson CL, Zundel MA, Werner R 2005. Variable promoter usage and alternative splicing in five mouse connexin genes. *Genomics* 85(2): 238-244.

Arnold HH, Winter B 1998. Muscle differentiation: more complexity to the network of myogenic regulators. *Curr Opin Genet Dev* 8: 539-544.

Atrouni S, Daraze A, Tamraz J, Cassia A, Caillaud C, Megarbane A 2003. Leukodystrophy associated with oligodontia in a large inbred family: fortuitous association or new entity? *Am J Med Genet* 118A: 76-81.

Badano JL, Katsanis N 2002. Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. *Nat Rev Genet* 3(10):779-789.

Baker PE, Kearney JA, Gong B, Merriam AP, Kuhn DE, Porter JD, Rafael-Fortney JA 2006. Analysis of gene expression differences between utrophin/dystrophin-deficient vs mdx skeletal muscles reveals a specific upregulation of slow muscle genes in limb muscles. *Neurogenetics* 7(2): 81-91.

Baraitser M, Reardon W, McShane A, Wilson J 1993. Cerebellar ataxia and ectodermal dysplasia in brothers. *J Med Genet* 30(6): 515-517.

Begleiter M; Harris DJ 1989. Autosomal recessive form of connatal Pelizaeus-Merzbacher disease. *Am J Med Genet* 33: 311-313.

Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH 1993. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262: 2039-2042.

Bhagwati S, Ghatpande A, Shafiq SA; Leung B 1996. In situ hybridization analysis for expression of myogenic regulatory factors in regenerating muscle of mdx mouse. *J Neuropath Exp Neur* 55: 509-514.

Bond C, Si X, Crisp M, Wong P, Paulson GW, Boesel CP, Dlouhy SR, Hodes ME 1997. Family with Pelizaeus-Merzbacher disease/X-linked spastic paraplegia and a nonsense mutation in exon 6 of the proteolipid protein gene. *Am J Med Genet* 71: 357-360.

Bonneau D, Rozet JM, Bulteau C, Berthier M, Mettey R, Gil R, Munnich A, Le Merrer M 1993. X linked spastic paraplegia (SPG2): clinical heterogeneity at a single gene locus. *J Med Genet* 30(5): 381-384.

Bonnet-Dupeyron MN, Combes P, Boespflug-Tanguy O, Vaurs-Barrière C 2008a. Absence of OLIG2 mutations in patients presenting with a severe Pelizaeus-Merzbacher-like leukodystrophy associated with motor neuron dysfunction. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(4): 538-539.

Bonnet-Dupeyron MN, Combes P, Santander P, Cailloux F, Boespflug-Tanguy O, Vaurs-Barrière C 2008b. PLP1 splicing abnormalities identified in Pelizaeus-Merzbacher disease and SPG2 fibroblasts are associated with different types of mutations. *Hum Mutat* 29(8): 1028-1036.

Boulloche J, Aicardi J 1986. Pelizaeus-Merzbacher disease: clinical and nosological study. *J Child Neurol* 1: 233-239.

Bugiani M, Al Shahwan S, Lamantea E, Bizzi A, Bakhsh E, Moroni I, Balestrini MR, Uziel G, Zeviani M 2006. GJA12 mutations in children with recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Neurology* 67(2): 273-279.

Bushby KM, Gardner-Medwin D, Nicholson LV, Johnson MA, Haggerty ID, Cleghorn NJ, Harris JB, Bhattacharya SS 1993. The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. II. Correlation of phenotype with genetic and protein abnormalities. *J Neurol* 240(2): 105-112.

Cailloux F, Gauthier-Barichard F, Mimault C, Isabelle V, Courtois V, Giraud G, Dasugue B, Boespflug-Tanguy O 2000. Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations. *Eur J Hum Genet* 8(11): 837-845.

Comi GP, Prelle A, Bresolin N, Moggio M, Bardoni A, Gallanti A, Vita G, Toscano A, Ferro MT, Bordoni A, et al. 1994. Clinical variability in Becker muscular dystrophy. Genetic, biochemical and immunohistochemical correlates. *Brain* 117: 1-14.

Davies KE, Nowak KJ 2006. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(10): 762-773.

Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, Watt DJ, Dickson JG, Tinsley JM, Davies KE 1997. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90(4): 717-727.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov V, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6025-6030.

Eiberger J, Kibschull M, Strenzke N, Schober A, Büssov H, Wessig C, Djahed S, Reucher H, Koch DA, Lautermann J, Moser T, Winterhager E, Willecke K 2006. Expression pattern and functional characterization of connexin29 in transgenic mice. *Glia* 53(6): 601-611.

Endesfelder S, Krahn A, Kreuzer KA, Lass U, Schmidt CA, Jahrmarkt C, von Moers A, Speer A 2000. Elevated p21 mRNA level in skeletal muscle of DMD patients and mdx mice indicates

either an exhausted satellite cell pool or a higher p21 expression in dystrophin-deficient cells per se. *J Mol Med* 78(10): 569-574.

Garbern JY, Cambi F, Tang XM, Sima AA, Vallat JM, Bosch EP, Lewis R, Shy M, Sohi J, Kraft G, Chen KL; Joshi I, Leonard DG; Johnson W, Raskind W, Dlouhy SR; Pratt V, Hodes ME; Bird T, Kamholz J 1997. Proteolipid protein is necessary in peripheral as well as central myelin. *Neuron* 19(1): 205-218.

Garbern JY, Cambi F, Lewis R, Shy M, Sima A, Kraft G, Vallat JM; Bosch EP, Hodes ME, Dlouhy S, Raskind W; Bird T; Macklin W, Kamholz J 1999. Peripheral neuropathy caused by proteolipid protein gene mutations. *Ann NY Acad Sci* 883: 351-365.

Garbern JY, Yool DA; Moore GJ, Wilds IB, Faulk MW, Klugmann M, Nave KA; Sistermans EA, van der Knaap MS, Bird ED, Shy ME, Kamholz JA, Griffiths IR 2002. Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation. *Brain* 125(3): 551-561.

Gorlin RJ, Miskin LH, St Geme JW 1963. Oculodentodigital dysplasia. *J Pediatr* 63: 69-75.

Haenggi T, Fritschy JM 2006. Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cell Mol Life Sci* 63(14): 1614-1631.

Hahn AF, Ainsworth PJ, Naus CC, Mao J, Bolton CF 2000. Clinical and pathological observations in men lacking the gap junction protein connexin 32. *Muscle Nerve Suppl* 9: S39-S48.

Hanemann CO, Bergmann C, Senderek J, Zerres K, Sperfeld AD 2003. Transient, recurrent, white matter lesions in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with novel connexin 32 mutation. *Arch Neurol* 60: 605-609.

Harding B, Ellis D, Malcolm S 1995. A case of Pelizaeus-Merzbacher disease showing increase dosage of the proteolipid protein gene. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21(2): 111-115.

Hattori N, Kaido M, Nishigaki T, Inui K, Fujimura H, Nishimura T, Naka T, Hazama T 1999. Undetectable dystrophin can still result in a relatively benign phenotype of dystrophinopathy. *Neuromuscul Disord* 9(4): 220-226.

Henneke M, Wehner LE, Hennies HC, Preuss N, Gärtner J 2004. Mutation analysis of the M6b gene in patients with Pelizaeus-Merzbacher-like syndrome. *Am J Med Genet A* 128A(2): 156-158.

Henneke M, Preuss N, Engelbrecht V, Aksu F, Bertini E, Bibat G, Brockmann K, Hübner C, Mayer M, Mejaski-Bosnjak V, Naidu S, Neumaier-Probst E, Rodriguez D, Weisz W, Kohlschütter A, Gärtner J 2005. Cystic leukoencephalopathy without megalencephaly: a distinct disease entity in 15 children. *Neurology* 64(8): 1411-1416.

Henneke M, Combes P, Diekmann S, Bertini E, Brockmann K, Burlina AP, Kaiser J, Ohlenbusch A, Plecko B, Rodriguez D, Boespflug-Tanguy O, Gärtner J 2008. GJA12 mutations are a rare cause of Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Neurology* 70: 748-754.

Hodes ME, Zimmermann AW, Aydanian A, Naidu S, Miller NR, Oller JL, Barker B, Aleck KA, Hurley TD, Dlouhy SR 1999. Different mutations in the same codon of proteolipid protein gene, PLP, may help in correlating genotype with phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease/X-linked spastic paraplegia (PMD/SPG2). *Am J Med Genet* 82(2): 132-139.

Inoue Y, Kagawa T, Matsumura Y, Ikenaka K, Mikoshiba K 1996. Cell death of oligodendrocytes or demyelination induced by overexpression of proteolipid protein depending on expressed gene dosage. *Neurosci Res* 25(2): 161-172.

Inoue K, Osaka H, Imaizumi K, Nezu A, Takanashi J, Arii J, Murayama K, Ono J, Kikawa Y, Mito T, Shaffer LG, Lupski JR 1999. Proteolipid protein gene duplications causing Pelizaeus-Merzbacher disease: Molecular mechanism and phenotypic manifestations. *Ann Neurol* 45(5): 624-632.

Inoue K, Chilo K, Boerkoel CF, Crowe C, Sawady J, Lupski JR, Agamanolis DP 2002. Congenital hypomyelination neuropathy, central dysmyelination, and Waardenburg-Hirschsprung disease: phenotypes linked by SOX10 mutation. *Ann Neurol* 52(6): 836-842.

Kagawa T, Ikenaka K, Inoue Y, Kuriyama S, Tsujii T, Nakao J, Nakajima K, Aruga J, Okano H, Mikoshiba K 1994. Glial cell degeneration and hypomyelination caused by overexpression of myelin proteolipid protein gene. *Neuron* 13(2): 427-442.

Kaido M, Arahata K, Hoffman EP, Nonaka I, Sugita H 1991. Muscle histology in Becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 14: 1067-1073.

Kamasawa N, Sik A, Morita M, Yasumura T, Davidson KGV, Nagy JI, Rash JE 2005. Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning. *Neuroscience* 136: 65-86.

Kaye EM, Doll RF, Natowicz MR, Smitz FI 1994. Pelizaeus-Merzbacher disease presenting as spinal muscular atrophy: Clinical and molecular studies. *Ann Neurol* 36(6): 916-919.

Kleopa KA, Orthmann JL, Enriquez A, Paul DL, Scherer SS 2004. Unique distributions of the gap junction proteins connexin29, connexin32 and connexin47 in oligodendrocytes. *Glia* 47: 346-357.

Klingmüller G, Kirchhof JKJ 1954. Über die erbliche ektodermale Dysplasie mit Anhidrosis und cerebellarer Heredoataxie im Sinne einer Friedreichschen Erkrankung. *Der Hautarzt* 5: 351-357.

Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53: 219-226.

Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Müller CR, Lindlöf M, Kaariainen H, et al. 1989. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 45(4): 498-506.

Koeppen AH, Robitaille Y 2002. Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Neuropath Exp Neur* 61: 747-759.

Lagree V, Brunschwig K, Lopez P, Gilula NB, Richard G, Falk MM 2003. Specific amino-acid residues in the N-terminus and TM3 implicated in channel function and oligomerization compatibility of connexin43. *J Cell Sci* 116: 3189-3201.

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM 2004. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 94(8): 1023-1031.

Lazzarini A, Schwarz KO, Jiang S, Stenroos ES, Lehner T, Johnson WG 1997. Pelizaeus-Merzbacher-like disease: exclusion of the proteolipid protein locus and documentation of a new locus on Xq. *Neurology* 49(3): 824-832.

Loddenkemper T, Grote K, Evers S, Oelerich M, Stogbauer F 2002. Neurological manifestations of the oculodentodigital dysplasia syndrome. *J Neurol* 249: 584-595.

Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD, Rowitch DH 2002. Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 109(1): 75-86.

Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NS, Bodrug SE, Burghes AH, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN, et al. 1988. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science* 242(4879): 755-759.

Megeney LA; Kablar B, Garrett K, Anderson JE, Rudnicki MA 1996. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Gene Dev* 10: 1173-1183.

Megeney LA, Kablar B, Perry RLS, Ying C, May L, Rudnicki MA 1999. Severe cardiomyopathy in mice lacking dystrophin and MyoD. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 220-225.

Menichella DM, Goodenough DA, Sirkowski E, Scherer SS, Paul DL 2003. Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *J Neurosci* 23: 5963-5973.

Morandi L, Mora M, Confalonieri V, Barresi R, Di Blasi C, Brugnani R, Bernasconi P, Mantegazza R, Dworzak F, Antozzi C, et al. 1995. Dystrophin characterization in BMD patients: correlation of abnormal protein with clinical phenotype. *J Neurol Sci* 132(2): 146-155.

Nadeau JH 2001. Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet* 2(3): 165-174.

Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P 2001. Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci* 21(15): 5429-5438.

Nishio H, Kodama S, Matsuo T, Ichihashi M, Ito H, Fujiwara Y 1988. Cockayne syndrome: magnetic resonance images of the brain in a severe form with early onset. *J Inherit Metab Dis* 11(1): 88-102.

Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Tachikawa M, Toda T, Tsujimoto A, Arahata K, Nishino I 2003. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 12: 595-600.

Odermatt B, Wellershaus K, Wallraff A, Seifert G, Degen J, Euwens C, Fuss B, Büsow H, Schilling K, Steinhäuser C, Willecke K 2003. Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. *J Neurosci* 23(11): 4549-4559.

Olson EN, Arnold HH, Rigby PWj, Wold BJ 1996. Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* 85: 1-4.

Ono J, Harada K, Sakurai K, Kodaka R, Shimidzu N, Tanaka J, Nagai T, Okada S 1994. MR diffusion imaging in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain & Development* 16(3): 219-223.

O'Orsogna L, O'Shea JP, Miller G 1988. Cardiomyopathy of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Cardiol* 9: 205-213.

Orthmann-Murphy JL, Enriquez AD, Abrams CK, Scherer SS 2007a. Loss-of-function GJA12/Connexin47 mutations cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Mol Cell Neurosci* 34: 629-641.

Orthmann-Murphy JL, Freidin M, Fischer E, Scherer SS; ABrams CK 2007b. Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *J Neurosci* 27(51): 13949-13957.

Ostergaard JR, Christensen T 1996. The central nervous system in Tay syndrome. *Neuropediatr* 27: 326-330.

Patapoutian A, Yoon JK, Miner JH, Wang S, Stark K, Wold B 1995. Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development* 121: 3347-3358.

Paulson HL, Garbern JY, Hoban TF, Krajewski KM, Lewis RA, Fischbeck KH, Grossman RI, Lenkinski R, Kamholz JA, Shy ME 2002. Transient central nervous system white matter abnormality in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann Neurol* 52: 429-434.

Pham-Din D, Birling MC, Roussel G, Dautigny A, Nussbaum JL 1991. Proteolipid DM-20 predominates over PLP in peripheral nervous system. *Neuroreport* 2(2): 89-92.

Piccolo G, Azan G, Tonin P, Arbustini E, Gavazzi A, Banfi P, Mora M, Morandi L, Tedeschi S 1994. Dilated cardiomyopathy requiring cardiac transplantation as initial manifestation of Xp21 Becker type muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 4(2): 143-146.

Prior TW, Bartolo C, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Burghes AHM, Kissel JT, Luquette MH, Tsao CY, Mendell JR 1997. Dystrophin expression in a Duchenne muscular dystrophy patient with a frame shift deletion. *Neurology* 48: 486-488.

Rafael JA, Townsend ER, Squire SE, Potter AC, Chamberlain JS, Davies KE 2000. Dystrophin and utrophin influence fiber type composition and post-synaptic membrane structure. *Hum Mol Genet* 9(9): 1357-1367.

Rouan F, White TW, Brown N, Taylor AM, Lucke TW, Paul DL, Munro CS, Uitto J, Hodgins MB, Richard G 2001. Trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26:

implications for dominant connexion disorders affecting epidermal differentiation. *J Cell Sci* 114: 2105-2113.

Rushton AR; Genel M 1981. Hereditary ectodermal dysplasia, olivopontocerebellar degeneration, short stature and hypogonadism. *J Med Genet* 18: 335-339.

Salviati L, Trevisson E, Baldoïn MC, Toldo I, Sartori S, Calderone M, Tenconi R, Laverda A 2007. A novel deletion in the GJA12 gene causes Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Neurogenetics* 8(1): 57-60.

Samoilova M, Li J, Pelletier MR, Wentlandt K, Adamchik Y, Naus CC, Carlen PL 2003. Epileptiform activity in hippocampal slice cultures exposed chronically to bicuculline: increased gap junctional function and expression. *J Neurochem* 86: 687-699.

Saugier-veber P, Munnich A, Bonneau D, Rozet JM, Le Merrer M, Gil R, Boespflug-Tanguy O 1994. X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nat Genet* 6(3): 257-262.

Scherer SS, Xu YT, Nelles E, Fischbeck K, Willecke K, Bone LJ 1998. Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy. *Glia* 24: 8-20.

Schiffmann R, Boespflug-Tanguy O 2001. An update on leukodystrophies. *Curr Opin Neurol* 14: 789-794.

Simons M, Kramer EM; Macchi P, Rathke-Hartlieb S, Trotter J, Nave KA, Schulz JB 2002. Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: implications for Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol* 157(2): 327-336.

Sistmans EA, de Coö RF, de Wijs IJ, van Oost BA 1998. Duplication of the proteolipid protein gene is the major cause of Pelizaeus-Merzbacher-disease. *Neurology* 50(6): 1749-1754.

Sonninen P, Autti T, Varho T, Hamalainen M, Raininko R 1999. Brain involvement in Salla disease. *Am J Neuroradiol* 20(3): 433-443.

Stecca B, Southwood CM, Gragerov A, Kelley KA, Friedrich VL, Gow A 2000. The evolution of lipophilin genes from invertebrates to tetrapods: DM20 cannot replace proteolipid protein in CNS myelin. *J Neurosci* 20(11): 4002-4010.

Takashima H, Nakagawa M, Umehara F, Hirata K, Suehara M, Mayumi H, Soshishige K, Matsuyama W, Saito M, Jonosono M, Arimura K, Osame M 2003. Gap junction protein beta 1 (GJB1) mutations and central nervous system symptoms in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neuro Scand* 107: 31-37.

Teubner B, Odermatt B, Guldenagel M, Sohl G, Degen J, Bukauskas F, Kronengold J, Verselis VK, Jung YT, Kozak CA, Schilling K, Willecke K 2001. Functional expression of the new gap junction gene connexin47 transcribed in mouse brain and spinal cord neurons. *J Neurosci* 21(4): 1117-1126.

Timmons M, Tsokos M, Asab MA, Seminara SB, Zirzow GC, Kaniski CR, Heiss JD, van der Knaap MS, Vanier MT, Schiffmann R, Wong K 2006. Peripheral and central hypomyelination with hypogonadotropic hypogonadism and hypodontia. *Neurology* 67(11): 2066-2069.

Tseng BS, Cavin ST, Hoffman EP, Iannaccone ST, Mancias P, Booth FW, Butler IJ 1999. Human bHLH transcription factor gene myogenin (MYOG): genomic sequence and negative mutation analysis in patients with severe congenital myopathies. *Genomics* 57(3): 419-423.

van der Knaap MS; Naidu S, Pouwels PJ, Bonavita S, van Coster R, Lagae L, Sperner J, Surtees R, Schiffmann R, Valk J 2002. New syndrome characterized by hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *Am J Neuroradiol* 23(9): 1466-1474.

Wolf NI, Sistermanns EA, Cundall M, Hobson GM, Davis-Williams AP, Palmer R, Stubbs P, Davies S; Endziniene M, Wu Y, Chong WK, Malcolm S, Surtees R, Garbern JY, Woodward KJ 2005. Three or more copies of the proteolipid protein gene PLP1 cause severe Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain* 128(4): 743-751.

Wolf NI, Cundall M, Rutland P, Rosser E, Surtees R, Benton S, Chong WK, Malcolm S, Ebinger F, Bitner-Glindzicz M, Woodward KJ 2007. Frameshift mutation in GJA12 leading to nystagmus, spastic ataxia and CNS dys-/demyelination. *Neurogenetics* 8(1): 39-44.

Zara F, Biancheri R, Bruno C, Bordo L, Assereto S, Gazzero E, Sotgia F, Wang XB, Gianotti S, Stringara S, Pedemonte M, Uziel G, Rossi A, Schenone A, Tortori-Donati P, van der Knaap MS, Lisanti MP, Minetti C 2006. Deficiency of hyccin, a newly identified membrane protein, causes hypomyelination and congenital cataract. *Nat Genet* 38(10): 1111-1113.

Zeitoun O, Ketelsen UP, Wolff G, Müller CR, Korinthenberg R 1997. Rare combination of Becker muscular dystrophy and Klinefelter's syndrome in one patient. *Brain Dev* 19(5): 359-361.

6. Danksagung

Mein allererster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christoph Hübner, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstanden ist. Ihm danke ich für seine Unterstützung, hilfreiche und kritische Diskussionen sowie seine Neugier an wissenschaftlichen Fragestellungen. Für meine Projekte hat er mir immer die nötige Freiheit gewährt und mich bei meinen Vorhaben unermüdlich motiviert. Herrn Prof. Dr. Roland Wauer danke ich sehr für seinen selbstlosen Einsatz um die Nachwuchsförderung an der Charité. Durch sein Engagement ist das Rahel-Hirsch-Stipendium, in dessen Genuss ich 2003-2005 gekommen bin, ins Leben gerufen worden. Frau Prof. Dr. Astrid Speer verdanke ich einen 6-monatigen Forschungsaufenthalt in ihrem Labor an der Technischen Fachhochschule Berlin, hier habe ich die ersten molekulargenetischen Techniken erlernt. Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Braun, in dessen Labor (Technische Universität Braunschweig) ich 1998 die MYF6-in-vitro Studien durchgeführt habe. Er hat im Vorfeld maßgeblich dazu beigetragen, dass ich durch ein Boehringer-Ingelheim-Stipendium finanziert werden konnte. Herrn Dr. Detlev Mennerich danke ich für die außerordentlich gute Betreuung bei den Laborarbeiten. Herrn Prof. Dr. Markus Schülke danke ich für seine Unterstützung bei allen wissenschaftlichen und methodischen Fragestellungen. Unter seiner Regie ist nach dem *GJA12*-Genfund auch die manchmal mühsame Sequenzierung und Klonierung vorangetrieben worden - für diese Arbeiten danke ich ebenfalls Catrin Janetzki, Barbara Lucke und Angelika Zwirner. Ich danke Herrn Prof. Dr. Peter Nürnberg für sein Wissen um die Genkartierung, das er in das PMLD-Projekt eingebracht hat. Durch den frühzeitigen Einsatz der SNP-Chip-Hybridisierung konnte 2003 überraschend schnell der Genort identifiziert werden. Auch seinen Mitarbeitern Christian Becker, Dr. Franz Rüschemdorf, Dr. Holger Thiele und Gudrun Nürnberg sei herzlich gedankt. Herrn Dr. Nico Ruf möchte ich für die gute Zusammenarbeit während meines Gastaufenthaltes am Genkartierungszentrum in Berlin-Buch und danach danken. Uns verbindet mittlerweile eine Freundschaft, und mit ihm zusammen sind die zwei letzten Arbeiten entstanden. Frau Prof. Dr. Jutta Gärtner danke ich für Familien mit PMLD-Phänotyp, die sie über Jahre phänotypisiert und meinem Projekt zur Verfügung gestellt hat. Ich danke Herrn Marco Sifringer für das nette, freundschaftliche Zusammenarbeiten in den Laboren der Neuropädiatrie. Herrn Prof. Dr. Christoph Bühner danke ich für praktische Tipps in der Karriereplanung; er hat für mich 2007 den offiziellen Part als Mentor im Mentoringprogramm der Charité übernommen. Ich danke Herrn Prof. Dr. Klaus-Armin Nave für kritische

Kommentare zu meinem ersten großen Drittmittelprojekt; seither habe ich eine Literaturrecherche gerne damit abgeschlossen, einen Blick auf seine in der Zwischenzeit entstandenen Publikationen zu werfen. Frau Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich danke ich sehr für ihre Unterstützung bei der manchmal schwierigen Vereinbarkeit von Wissenschaft und Klinik. Zu meinen klinischen Vorbildern gehören Herr Dr. Bernhard Weschke und Herr Dr. Arpad von Moers, denen ich sehr herzlich für das Vermitteln ihres Wissens und Könnens danken möchte. Herrn Dr. Weschke danke ich ganz ausdrücklich dafür, dass er mir die konsanguine Familie mit PMLD-Phänotyp aus seiner Sprechstunde für weitere wissenschaftliche Fragestellungen zur Verfügung gestellt hat. Frau Dr. Nicole Wolf bin ich für anregende Diskussionen und Anmerkungen zu dieser Schrift dankbar. Ich danke außerdem allen Mitarbeitern der Neuropädiatrie, mit denen immer ein konstruktives und kollegiales Zusammenarbeiten möglich war.

Meinem Vater und meiner Stiefmutter danke ich sehr herzlich für die immerwährende Unterstützung; meine Mutter hat meinen Schulabschluss, Studium und meinen beruflichen Werdegang leider nicht mehr miterlebt, hierfür aber sicherlich schon einige Weichen gestellt gehabt. Ganz besonders danke ich meinem Mann Gerald, der mich - oftmals durch seine unabhängige Sichtweise - im Projekt Habilitation immer bestärkt, motiviert und unterstützt hat, zuletzt bei der Betreuung von Philipp, damit ich diese Schrift verfassen konnte.

Erklärung gemäß Habilitationsordnung der Charité

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

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. 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.