

**Molekulargenetik der autosomal rezessiven
Charcot-Marie-Tooth Neuropathie
mit fokal gefalteten Myelinscheiden**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Susanne Margarete Schreiber

aus Bitburg

Berichter: Universitätsprofessor Dr. med. K. Zerres
 Universitätsprofessor Dr. med. J. Weis

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juni 2009

**Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek
online verfügbar.**

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Hereditäre motorische und sensible Neuropathien	2-10
2.1	Geschichte, Klassifikation und Epidemiologie der HMSN	2
2.2	Klinisches Erscheinungsbild, Elektrophysiologie und Morphologie	3-4
2.3	Genetik der HMSN	4-5
2.4	Differentialdiagnosen und Therapie	5-6
2.5	Autosomal rezessive HMSN	6-7
2.6	AR-HMSN mit fokal gefalteten Myelinscheiden	8-9
2.7	Genomische Organisation der untersuchten Gene <i>MTMR2</i> , <i>SBF2</i> und <i>KIAA1985</i>	9-10
2.7.1	Das <i>MTMR2</i> -Gen	9
2.7.2	Das <i>SBF2</i> -Gen	9
2.7.3	Das <i>KIAA1985</i> -Gen	9-10
3.	Ziele der Arbeit	11
4.	Material und Methoden	12-16
4.1	Patientenkollektiv und Untersuchungsstrategie	12-13
4.2	Molekulargenetische Untersuchungen	13-16
4.2.1	Polymerasekettenreaktion	13
4.2.2	DNA-Sequenzierung	13
4.2.3	Analyse von Mikrosatelliten-Markern	14
4.2.4	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP)	14
4.2.5	Kopplungsanalyse und Homozygotiekartierung	14-15
4.2.6	Mutationsanalyse	15
4.2.7	Charakterisierung einer Spleißstellenmutation	16
5.	Ergebnisse	17-24
5.1	Haplotypisierung und Homozygotiekartierung	17-18
5.2	Mutationsanalyse	29-21
5.2.1	<i>SBF2</i> -Gen	19-20
5.2.2	<i>MTMR2</i> -Gen	20-21
5.2.3	<i>KIAA1985</i> -Gen	21
5.3	Der Phänotyp der CMT4B- und CMT4C-Patienten	22-24
6.	Diskussion	25-29
7.	Zusammenfassung und Ausblick	30
8.	Literaturverzeichnis	31-35
9.	Elektronische Datenbankinformationen	35
10.	Anhang	36-42
11.	Danksagung	43
12.	Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung	44
13.	Lebenslauf	45

1. Einleitung

Die hereditären motorischen und sensiblen Neuropathien (HMSN) / Charcot-Marie-Tooth-Neuropathien (CMT) bilden eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe von Erkrankungen des peripheren Nervensystems. Sie gehören mit einer Prävalenz von 1 zu 2.500 zu den häufigsten Erbkrankheiten des Menschen (Skre 1974). Gemeinsames Merkmal aller HMSN-Formen ist ein zunehmender Funktionsverlust der peripheren Nerven. Klinisch zeigt sich ein charakteristisches Bild aus symmetrischer, distal betonter progredienter Muskelschwäche und Muskelatrophie, die zunächst die Fuß- und Wadenmuskulatur betreffen und später auch die obere Extremität einbeziehen. Sensible Defizite, die einer handschuh- oder strumpfförmigen Verteilung folgen, sind meist geringer ausgeprägt (Harding und Thomas 1980). Der sehr variable Krankheitsverlauf reicht von frühzeitiger Immobilisation mit Ateminsuffizienz im Kleinkindalter bis zu langsam progredienten, distal betonten schlaffen Paresen im späten Erwachsenenalter. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung kann es zu körperlichen Einschränkungen kommen (insbesondere der Gehfähigkeit). Die Lebenserwartung ist in der Regel nicht herabgesetzt.

Die Klassifikation der HMSN erfolgt nach klinischen, morphologischen und neurophysiologischen Gesichtspunkten (Dyck et al. 1993). Charakteristisch für die demyelinisierende Form, die HMSN I, sind deutlich reduzierte Nervenleitgeschwindigkeiten (NLG) sensibler und motorischer Nerven mit Werten < 38 m/s für den motorischen Nervus medianus. Histopathologisch finden sich Zeichen einer anhaltenden De- und Remyelinisierung bei segmentalem Markscheidenzerfall. Anhand dieser Veränderungen kann die HMSN I von der axonalen Neuropathie HMSN II, bei der die NLG normale bis subnormale Werte aufweisen, unterschieden werden. In der Histopathologie findet man einen Ausfall der Axone, ohne dass die Markscheiden primär betroffen sind.

Die HMSN kann allen bekannten Mendel'schen Erbgängen folgen. Dabei ist die autosomal dominante Vererbung bei weitem am häufigsten. Auch aus molekulargenetischer Sicht ist die HMSN sehr heterogen. So sind heute über 30 Gene bzw. Genorte bekannt (Niemann et al. 2006).

2. Hereditäre motorische und sensible Neuropathien

2.1 Geschichte, Klassifikation und Epidemiologie der HMSN

Erstmals beschrieben Charcot und Marie 1886 ein Syndrom der „peronealen Muskelatrophie“ mit langsam progredienten, distal symmetrischen, schlaffen Paresen mit begleitenden sensiblen Ausfällen (Charcot und Marie 1886). Zeitgleich wurde dieses Syndrom auch von dem englischen Neurologen Tooth beschrieben (Tooth 1886). Heute wird die nach den Erstbeschreibern als Charcot-Marie-Tooth Syndrom bezeichnete Erkrankung zu den hereditären motorischen und sensiblen Neuropathien (HMSN) gezählt (Dyck et al. 1993).

Die HMSN sind eine heterogene Gruppe von Neuropathien mit unterschiedlicher Klinik, Pathomorphologie, Elektrophysiologie und Genetik. Die Klassifikation von Dyck und Lambert unterteilt die HMSN in sieben Typen, von denen in der Praxis aber nur die Typen I (demyelinisierende Form, CMT1) und II (axonale Form, CMT2) relevant sind. Die HMSN III wird auch als Dejerine-Sottas Syndrom bezeichnet und stellt nach heutiger Auffassung keine eigene Entität sondern eine schwere Verlaufsform der HMSN I dar. Die Klassifikationseinheiten HMSN IV-VII (Polyneuropathien mit zusätzlichen Symptomen) sind HMSN V mit spastischer Paraparese, HMSN VI mit Optikusatrophie und HMSN VII mit Retinitis pigmentosa, die alle sehr selten sind. Die HMSN IV ist die Refsum-Krankheit, die auf einer Speicherstörung von Phytansäure beruht und heute als eine angeborene Stoffwechselstörung außerhalb der Gruppe der HMSN betrachtet wird.

Periphere Neuropathien sind häufige Erkrankungen und erreichen altersabhängig eine Prävalenz von bis zu 8 % (Hughes 2002). Erbliche Formen machen an der Gesamtheit der Fälle 2-3 % aus, während in Patientenkollektiven, in denen häufige Ursachen für eine Neuropathie (in den USA und Westeuropa v. a. Diabetes mellitus, Alkoholabusus, autoimmunologische oder parainfektöse Genese) ausgeschlossen werden konnten, dieser Anteil auf ca. 10 % steigt (Engelhardt 1994). Im Kindesalter sind erbliche Ursachen für mehr als die Hälfte der Neuropathie-Fälle verantwortlich (Ouvrier et al. 1999). Insgesamt gehört die HMSN mit einer Prävalenz von 1 zu 2.500 Einwohnern zu der häufigsten erblichen Erkrankungen des Menschen (Skre 1974).

2.2 Klinisches Erscheinungsbild, Elektrophysiologie und Morphologie

Die HMSN ist eine vorwiegend motorische Polyneuropathie. Klinisch sind die HMSN I und die HMSN II nicht eindeutig unterscheidbar. Die Erkrankung beginnt in der ersten bis vierten Dekade. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 14,7 Jahren (HMSN I) bzw. 26 Jahren (HMSN II) (Bouche et al. 1983). Erste klinische Symptome sind symmetrisch beginnende atrophische Paresen der Fuß- und Unterschenkelmuskulatur. Dabei kommt es häufig zur Ausbildung von Storchenbeinen mit Steppergang sowie Hohlfüßen mit Krallenzehen (Dyck et al. 1989; Dyck et al. 1994). Schon zu Beginn der Erkrankung fallen die erloschenen Muskeleigenreflexe auf. Im weiteren Verlauf können Paresen der kleinen Handmuskeln auftreten, seltener ist die proximale Extremitätenmuskulatur betroffen (**Abb. 1**). Sensibilitätsstörungen sind im Vergleich zu den motorischen Störungen geringer ausgeprägt und nur vereinzelt klinisch relevant (Ingall und McLeod 1991). Die meisten Patienten zeigen einen langsam progredienten Krankheitsverlauf, wenngleich im Einzelfall auch rasch fortschreitende Verlaufsformen beobachtet werden können. Da die Merkmalsausprägung auch innerhalb von Familien sehr variabel ist, sind Vorhersagen zum individuellen Krankheitsverlauf nur begrenzt möglich. Die Lebenserwartung ist in der Regel nicht beeinträchtigt, während die Lebensqualität in unterschiedlichem Ausmaß eingeschränkt sein kann. Bei 20 % der Betroffenen führt die Erkrankung zu deutlichen Behinderungen (Harding und Thomas 1980). Ein kleiner Teil der Patienten wird rollstuhlpflichtig. In seltenen, schweren Fällen kann die Zwerchfellmuskulatur mit betroffen sein, so dass es zu Einschränkungen der Atemfunktion kommt (Carter 1995).

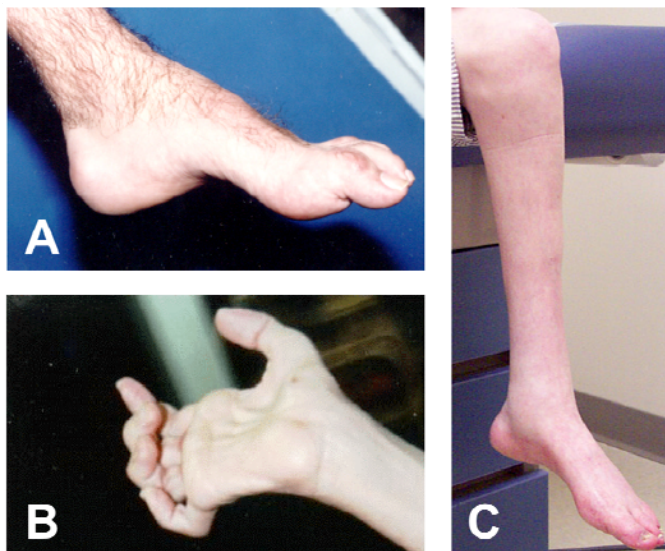


Abbildung 1: Fußdeformität (A), Krallenhand (B) und distale Muskelatrophie (C) bei HMSN-Patienten.

Die Unterscheidung der demyelinisierenden Form HMSN I von der axonalen Form HMSN II ist mit Hilfe von neurophysiologischen und nervenbiopsischen Untersuchungen möglich (Dyck and Lambert 1993). Bei der HMSN I sind die NLG verzögert, wobei der Grenzwert für den motorischen Anteil des N. medianus mit < 38 m/s angegeben wird. Bei allen Betroffenen lässt sich schon vor Auftreten der ersten klinischen Symptome eine reduzierte NLG messen. Im Gegensatz dazu sind bei der axonalen HMSN II die NLG normal bis leicht verzögert, während die Amplituden der motorischen und sensiblen Aktionspotentiale (SNAP und MAP) deutlich erniedrigt sind. In den Nervenbiopsien von HMSN I-Patienten fallen im Verhältnis zum Axondurchmesser zu dünne Myelinscheiden und schalenartig um Axone angeordnete Schwann-Zell-Fortsätze (so genannte Zwiebelschalenformationen) als Zeichen einer chronischen, segmentalen De- und Remyelinisierung auf. Bei der HMSN II sind primär die Axone betroffen, wobei die Degeneration der großen markhaltigen Nervenfasern im Vordergrund steht. Im Nervenbiopsiepräparat finden sich außerdem gruppiert stehende dünn bemerkte kleine Nervenfasern als Zeichen der axonalen Regeneration (sog. Regenerationsgruppen).

2.3 Genetik der HMSN

In den meisten Familien wird die HMSN einem autosomal-dominanten oder einen X-chromosomalen Erbgang folgend vererbt. Dabei kann die Merkmalsausprägung bei Trägern der gleichen Genmutation (auch innerhalb einer Familie) sehr variabel sein. In mehreren HMSN-Genen sind (autosomal-dominante) Neumutationen beschrieben worden. Deshalb sind - auch vor dem Hintergrund der Häufigkeit der HMSN - bei scheinbar sporadischen Formen einer peripheren Neuropathie, die sich keiner Ursache zuordnen lassen, eine autosomal dominante HMSN oder eine X-chromosomale HMSN (letzteres insbesondere bei isoliert betroffenen männlichen Individuen) in Betracht zu ziehen.

Die Erforschung der molekularen Grundlagen der HMSN hat in den letzten 15 Jahren rasche Fortschritte gemacht. Bislang sind über 30 Genorte kartiert und mehr als 20 verantwortliche Krankheitsgene identifiziert worden. Eine ständig aktualisierte Übersicht vermitteln die HMSN-Mutationsdatenbank der Universität Antwerpen (<http://www.molgen.ua.ac.be>) und die Internetseite des

Zentrums für neuromuskuläre Erkrankungen der Universität Washington (<http://neuromuscular.wustl.edu>). Die vier häufigsten Mutationen sind nachfolgend kurz beschrieben:

- *Peripheral Myelin Protein 22-* / *PMP22*-Gen auf Chromosom 17p11.2: Bei ca. 70% der Familien mit autosomal dominant vererbter HMSN I besteht eine Duplikation von 1,5 Megabasenpaaren auf Chromosom 17, die das *PMP22*-Gen umfasst (HMSN IA, CMT1A (Lupski et al. 1991; Raeymaekers et al. 1991)).
- *Myelin protein Zero-* / *MPZ*-Gen auf Chromosom 1q22-23: Bei ca. 5% der Patienten mit autosomal dominant erblicher HMSN I und HMSN II lassen sich Punktmutationen im *MPZ*-Gen nachweisen (HMSN IB, CMT1B (Hayasaka et al. 1993a)).
- *Connexin 32-* / *GJB1-* / *Cx32*-Gen auf Chromosom Xq13.1: Punktmutationen im Gen für das „Gap Junction“-Protein Connexin32 (Cx32) sind für die X-chromosomal vererbte HMSN verantwortlich und lassen sich bei ca. 10% der HMSN I- und HMSN II-Familien nachweisen (Bergoffen et al. 1993)).
- *Mitofusin 2-* / *MFN2*-Gen auf Chromosom 1p36: Punktmutationen im *MFN2*-Gen sind für ca. 30 % der Familien mit autosomal dominant erblicher HMSN II verantwortlich (HMSN IIA, CMT2A (Züchner et al. 2004)).

2.4 Differentialdiagnosen und Therapie

Die Abgrenzung einer hereditären Neuropathie gegenüber kausal therapierbaren Neuropathien anderer Genese ist von besonderer Wichtigkeit. In den westlichen Ländern sind die häufigsten Ursachen für eine Polyneuropathie Diabetes mellitus (25-30%), Alkoholabusus (10-15%) und akute oder chronische immunologische Krankheitsbilder (das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) bzw. die chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)) (Regli und Mumenthaler 1992). Unter den erblichen Erkrankungen ist im Kindesalter insbesondere die Friedreich-Ataxie in Betracht zu ziehen und durch eine molekulargenetische Untersuchung ggf. auszuschließen. Bei klinischem V. a. eine Vaskulitis, eine Amyloidose oder eine Speicherkrankheit (z. B. metachromatische Leukodystrophie) hat die Nervenbiopsie weiterhin einen wichtigen Stellenwert.

Bisher ist keine kausale Therapie der HMSN bekannt. Somit stehen weiterhin präventive Maßnahmen, die der Erhaltung der Muskelkraft und Beweglichkeit dienen, im Vordergrund. So spielt z. B. die Physiotherapie eine wichtige Rolle, um durch regelmäßiges Training die Muskelkraft zu erhalten und Kontrakturen zu vermeiden. Die rechtzeitige Versorgung mit geeigneten Hilfsmitteln wie Einlagen, Peroneusschienen und speziell angefertigten Schuhen dient der Verbesserung des Geh- und Stehvermögens. Im Einzelfall können bei sorgfältiger Indikationsstellung auch operative Eingriffe insbesondere zur Korrektur von Fußfehlstellungen indiziert sein (z. B. Achillessehnenverlängerung). Da Schmerzen ebenfalls zur Symptomatik von Neuropathien gehören können, müssen bei der Therapie Medikamente wie Antidepressiva und Antiepileptika zur Behandlung von neuropathischen Schmerzen in Betracht gezogen werden. Schließlich soll auch auf die Bedeutung einer umfassenden Beratung zu Fragen der Berufswahl und sozialrechtlichen Ansprüchen hingewiesen werden.

2.5 Autosomal rezessive HMSN

Autosomal rezessiv vererbte HMSN-Formen (AR-HMSN) sind im Gegensatz zu den autosomal dominanten und X-chromosomalen Formen in Westeuropa selten. Für Norwegen wurde eine Prävalenz von 1 zu 70.000 angegeben (Skre 1974). In Regionen und ethnischen Gruppen mit einer hohen Prävalenz von Verwandtenehen (z.B. Osttürkei, Nordafrika, „Balkan-Gypsies“) machen autosomal rezessive HMSN-Formen 30-50% der HMSN Fälle aus (European CMT-Consortium - ENMC 1999). Die autosomal rezessive HMSN lässt sich klinisch nicht eindeutig von der dominanten Form unterscheiden. Graduelle Unterschiede zeigen sich vor allem im früheren Krankheitsbeginn, im schwereren Verlauf und der rascheren Progredienz der rezessiven Formen (Gabreels-Festen et al. 1990; Mendell 1998). Andererseits können aber auch dominante (*de novo*)-Mutationen in HMSN-Genen für schwer verlaufende periphere Myelinopathien wie das Dejerine-Sottas-Syndrom (DSS) (Hayasaka et al. 1993b; Roa et al. 1993; Timmerman et al. 1999) und die kongenitale Hypomyelinisierung (CH) (Warner et al. 1996; Warner et al. 1998; Simonati et al. 1999) verantwortlich sein.

Für die autosomal rezessiv erbliche HMSN sind bisher 14 Genorte kartiert und 12 verantwortliche Gene identifiziert worden (s. **Tabelle 1**). Zwei Genorte,

CMT4A und CMT4C, scheinen jeweils für die autosomal rezessive HMSN in einen relevanten Anteil der Fälle verantwortlich zu sein (Vallat et al. 2005). Andere Formen der AR-HMSN treten hingegen nur in bestimmten ethnischen Gruppen auf (z. B. CMT4D). In einigen Fällen lassen sich charakteristische (wenngleich nicht spezifische) morphologische Besonderheiten nachweisen (z. B. CMT4B, CMT4C).

Genort	Lokus	Gen	Neurophysiologie/ Nervenbiopsie	Besonderheit	Bedeutung
CMT1A	17p11	<i>PMP22</i>	dem.	Eine Duplikation des <i>PMP22</i> -Gens ist der häufigste Gendefekt bei AD-HMSN.	selten
CMT1B	1q22	<i>MPZ/P0</i>	dem.	<i>MPZ/P0</i> -Mutationen sind für ca. 5 % aller AD-HMSN-Fälle verantwortlich.	selten
CMT4A	8q21	<i>GDAP1</i>	dem./ax.		10-20 %
CMT4B1	11q22	<i>MTMR2</i>	dem.	fokale Auffaltungen der Myelinscheiden	selten,
CMT4B2	11p15	<i>SBF2/</i> <i>MTMR13</i>	dem.	fokale Auffaltungen der Myelinscheiden, ggf. kongenitales Glaukom	selten
CMT4C	5q32	<i>KIAA1985</i>	dem.	oft ausgeprägte Skoliose, Basallamina-Zwiebelschalenformationen, fokale Myelinauffaltungen	10-20 %
CMT4D	8q24	<i>NDRG1</i>	dem.	Balkan-Gypsies	selten
CMT4E	10q21-q22	<i>EGR2</i>	dem.	auch kongenitale Hypomyelinisierungsneuropathie, in einigen Familien auch AD Vererbung	selten
CMT4F	19q13	<i>PRX</i>	dem.	sensible Ausfälle	selten
CMT4H	12p11-q13	<i>FGD4</i>	dem.	fokale Auffaltungen der Myelinscheiden	unbekannt
CMT4J	6q21	<i>FIG4</i>	dem.		unbekannt
HMSNR	10q23	unbekannt	dem.	Balkan-Gypsies	unbekannt
ARCMT2A	1q21	<i>LMNA</i>	ax.	Foundermutation in Nordafrika	unbekannt
ARCMT2B	19q13	unbekannt	ax.	eine Costa-Ricanische Familie	unbekannt

Tabelle 1: Bekannte AR-HMSN Genorte und Gene. (AD: autosomal dominant, AR: autosomal rezessiv, dem.: demyelinisierend, ax.: axonal)

2.6 AR-HMSN mit fokal gefalteten Myelinscheiden

Bei zwei AR-HMSN-Formen wurden fokale Auffaltungen der Myelinscheiden als prominentes histopathologisches Merkmal beschrieben (CMT4B1 (Bolino et al. 1996), CMT4B2 (Othmane et al. 1999)). Die unregelmäßige Faltung eines Teils der Myelinscheiden führt zu einer irregulären Kontur der einzelnen myelinisierten Nervenfasern, wobei insbesondere die paranodalen Myelinanteile betroffen sind (**Abb. 2**). Dadurch ist eine Abgrenzung zu den regelmäßigen Verdickungen der Myelinscheiden bei der erblichen Neuropathie mit Neigung zu Drucklähmungen (HNPP) möglich (Othmane et al. 1999). Ursache der CMT4B1 sind Mutationen im *MTMR2*-Gen (Bolino et al. 2000), während Mutationen im *SBF2*-Gen zur CMT4B2 führen (Azzedine et al. 2003; Senderek et al. 2003a). Entsprechende Myelinveränderungen sind auch in Mausmodellen der CMT4B1 und der CMT4B2 nachweisbar (Bolino et al. 2004; Tersar et al. 2007).

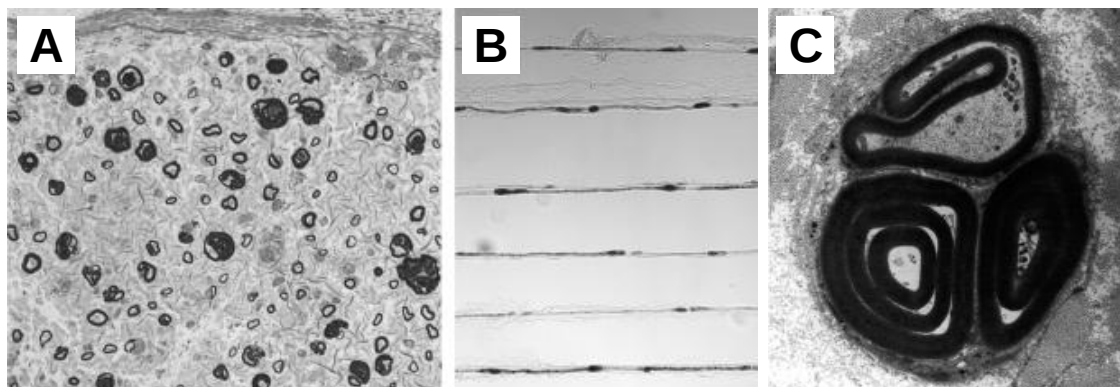


Abbildung 2: Fokale Myelinauffaltungen. Die lichtmikroskopische Untersuchung von Transversalschnitten (A) zeigt irreguläre Verdickungen der Myelinscheiden, die sich an Zupfpräparaten (B) als fokale Veränderungen darstellen lassen. In der Elektronenmikroskopie (C) imponieren abnorme Auffaltungen der Myelinscheide. (Modifiziert nach Stendel et al. 2007)

Auch bei dem AR-HMSN-Typ CMT4C finden sich in den Nervenbiopsien vermehrt fokale Myelinauffaltungen (persönliche Mitteilung Professor Joachim Weis, Aachen), die zumindest in der lichtmikroskopischen Untersuchung den Verdacht auf eine CMT4B lenken können, während die für die CMT4C charakteristischen Auffälligkeiten (Basallamina-Zwiebelschalenformationen und abnorme Fortsätze nicht-myelinisierender Schwann-Zellen (Gabreels-Festen et al. 1999)) nur in der Elektronenmikroskopie erfasst werden können. Auch bei der CMT4H finden sich gehäuft fokale Myelinauffaltungen (persönliche Mitteilung Professor Joachim Weis, Aachen; Stendel et al. 2007). Die CMT4C wird durch Mutationen im *KIAA1985*-Gen verursacht (Senderek et

al. 2003b), während die Ursache der CMT4H zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Studie noch nicht bekannt war. Inzwischen konnten Mutationen im *FGD4*-Gen als Ursache der CMT4H identifiziert werden (Delague et al. 2007; Stendel et al. 2007). Schließlich konnten auch bei einzelnen Patienten mit autosomal-dominanten (*de novo*) *MPZ*-Mutationen fokale Myelin-auffaltungen nachgewiesen werden (Fabrizi et al. 2000), so dass es sich bei dieser Myelinveränderung nicht um ein spezifisches Charakteristikum handelt.

2.7 Genomische Organisation der untersuchten Gene *MTMR2*, *SBF2* und *KIAA1985*

2.7.1 Das *MTMR2*-Gen (Bolino et al. 2000)

Das humane *MTMR2*-Gen liegt zwischen dem centromerischen Marker D11S1757 und dem telomerischen Marker AFM238YH4 auf dem langen Arm des Chromosoms 11 (11q21). Die Transkriptionsrichtung verläuft vom Telomer zum Centromer. Das Gen umfasst auf genomischer Ebene 91 kb und besteht aus 17 Exons, wovon 15 kodierend sind und einen 643 Aminosäuren großen Leserahmen kodieren. Alle Exon-Intron Grenzen folgen der kanonischen GT/AG-Regel.

2.7.2 Das *SBF2*-Gen (Azzedine et al. 2003; Senderek et al. 2003a)

SBF2 liegt zwischen dem centromerischen Marker D11S1904 und dem telomerischen Marker D11S4149 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 (11p15.4). Die Transkriptionsrichtung verläuft vom Centromer zum Telomer. Das Gen umfasst auf genomischer Ebene 515 kb. Durch den Vergleich der genomischen Sequenz mit humanen EST-Sequenzen und die Sequenzierung von RT-PCR Produkten konnten 40 Exone identifiziert werden, die einen 1849 Aminosäuren umfassenden Leserahmen kodieren. Die Größe der Exone reicht von 69 bis 263 bp. Alle Exon-Intron Grenzen folgen der kanonischen GT/AG-Regel. Die Längen der Introns variieren zwischen 446 bp bis 150 kb.

2.7.3 Das *KIAA1985*-Gen (Senderek et al. 2003b)

KIAA1985 liegt zwischen dem centromerischen Marker D5S413 und dem telomerischen STR-Marker 91940 auf dem langen Arm des Chromosoms 5 (5q32). Die Transkriptionsrichtung ist vom Telomer zum Centromer. Dabei

umfasst das Gen auf genomischer Ebene 62 kb. Es konnten 18 Exone identifiziert werden; alle Exon-Intron-Grenzen folgen der kanonischen GT/AG-Regel. Die Größe der identifizierten Exons variiert zwischen 42 und 1695 Basenpaaren, die Länge der Introns liegt zwischen 0,1 und 14 kb. Der längste offene Leserahmen umfasst 1288 Codons und wird von einem 17-Exon-Transkript kodiert.

3. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der genetischen Ursachen bei Patienten mit einer autosomal rezessiv erblichen HMSN (AR-HMSN) mit fokal gefalteten Myelinscheiden. Dazu wurden geeignete Familien bzw. Patienten ausgewählt und auf Kopplung zu den bekannten Genorten und auf Mutationen in den bekannten Genen untersucht.

Durch die Identifizierung des kausalen Gendefekts kann für die betroffenen Familien und Patienten eine exakte Diagnose gestellt werden, die die Voraussetzung für eine gezielte humangenetische Beratung ist. Darüber hinaus können Aussagen über den jeweiligen Anteil eines Gens an der Gesamtheit der Fälle gemacht werden und ggf. Genotyp-Phänotyp Korrelationen etabliert werden. Auf dieser Basis kann eine rationale diagnostische Vorgehensweise entwickelt werden.

Des weiteren sollte mit dieser Studie der Versuch unternommen werden, aus der Art und der Lokalisation der Mutationen Rückschlüsse auf die Struktur und Funktion der kodierten Proteine und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Krankheitsentstehung abzuleiten.

Da die AR-HMSN mit fokal gefalteten Myelinscheiden genetisch heterogen ist, war davon auszugehen, dass nicht bei allen Fällen der Nachweis der verantwortlichen Mutation gelingt. Patienten und Familien, bei denen Mutationen in bekannten Genen durch eine umfassende Untersuchung ausgeschlossen worden sind, können schließlich in zukünftige Studien zur Identifizierung neuer, noch unbekannter Krankheitsgene eingeschlossen werden.

4. Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv und Untersuchungsstrategie

In die vorliegende Studie wurden 17 HMSN-Patienten eingeschlossen, bei denen im untersuchten Nervenbiopsiepräparat fokale Myelinauffaltungen nachgewiesen worden waren (**Tabelle 2**). Bei 12 Patienten war ein autosomal rezessiver Erbgang als gesichert oder sehr wahrscheinlich anzusehen (gesunde Eltern und mindestens ein weiteres betroffenes Geschwisterkind oder gesunde Eltern und elterliche Blutsverwandtschaft), während es sich bei den übrigen 5 Patienten um sporadische Erkrankungsfälle handelte. Von allen in die molekulargenetischen Untersuchungen eingeschlossenen Patienten und Familienmitgliedern lagen bereits DNA-Proben im Archiv des Instituts für Humangenetik vor oder wurden von den jeweiligen Einsendern zur Verfügung gestellt.

Familien-nummer	Blutsver-wandtschaft	Zahl der Betroffenen	Herkunft
P603	+	2	Marokko
AC78	-	2	Deutschland
P186	+	1	Türkei
CMT139	+	2	Türkei
50-5	+	3	Nordafrika
AC70	-	1	Griechenland
NP54	-	1	Pakistan
M1222/01	-	2	Griechenland
M903/01	-	1	Kosovo
M270/02	+	1	Türkei
5080	-	1	Niederlande
IF	+	1	Türkei
112.2	+	1	Türkei
198.1	+	1	Türkei
707	-	1	Tschechien
4045	-	2	Niederlande
NP447	+	1	Türkei

Tabelle 2: Übersicht der untersuchten Familien.

In Familien mit klaren Hinweisen auf einen autosomal rezessiven Erbgang wurden Kopplungsanalysen für die Genorte CMT4A, CMT4B1, CMT4B2, CMT4C, CMT4D und CMT4F durchgeführt. Bei kompatiblen

Kopplungsbefunden wurde eine Mutationsanalyse der jeweiligen Gene angeschlossen, wobei im Rahmen der vorliegenden Studie die Untersuchung auf das *MTMR2*-, *SBF2*- und das *KIAA1985*-Gen beschränkt wurde. Die Untersuchung weiterer Gene erfolgte im Rahmen einer anderen Studie. Bei Patienten, bei denen die Haplotypisierung aufgrund nicht aussagekräftiger Stammbäume nicht durchführbar war, erfolgte direkt eine Mutationsanalyse der Gene *MTMR2*, *SBF2* und *KIAA1985*. Bei diesen Patienten waren bereits im Vorfeld der vorliegenden Studie Mutationen in den Genen *PMP22* (Duplikation und Punktmutationen), *MPZ/P0*, *Cx32* und *EGR2* (Punktmutationen) durch DNA-Sequenzierung ausgeschlossen worden.

4.2 Molekulargenetische Untersuchungen

4.2.1 Polymerasekettenreaktion

Um ausreichende Mengen der Patienten-DNA für die Kopplungs- und Mutationsanalysen zur Verfügung zu haben, wurden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte mittels Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) vervielfältigt. Mit Hilfe der PCR kann ein gewählter Nukleinsäureabschnitt, der von zwei bekannten Sequenzen flankiert wird, *in vitro* exponentiell amplifiziert werden (Mullis und Faloona 1987; Saiki et al. 1985). Die Effizienz und Spezifität der Reaktion können durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel und anschließende Sichtbarmachung der DNA mit Ethidiumbromid unter UV-Licht überprüft werden.

4.2.2 DNA-Sequenzierung

Die Mutationsanalyse erfolgte mittels DNA-Sequenzierung nach der von Sanger eingeführten Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977). Verwendet wurde der Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt), der eine nicht-radioaktive Sequenzierung ermöglicht. Dabei enthält der Sequenzieransatz Didesoxynukleotide (Dye-Terminatoren), nach deren Einbau durch eine thermostabile DNA-Polymerase ein basenspezifischer Kettenabbruch erfolgt (Innis et al. 1988; Prober et al. 1987). Die Didesoxynukleotide sind jeweils mit einem für die entsprechende Base spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der nach Anregung mit einem Laser entsprechend seinem Absorptionsspektrum fluoresziert und eine Aufzeichnung

der Signale ermöglicht. Als Sequenzierprimer diente jeweils einer der beiden Oligonukleotidprimer, der für die PCR verwendet worden war. Die automatisierte Auftrennung der Sequenzierprodukte durch Kapillarelektrophorese und die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte auf einem ABI PRISM 310-Genetic Analyzer (Applied Biosystems), der mit der herstellerseitig zur Verfügung gestellten Software zum Nachweis (Data Collection) und zur Analyse (Sequencing Analysis) der Fluoreszenzsignale ausgestattet war. Die so entstandenen Elektropherogramme wurden visuell auf Abweichungen von den in der Literatur publizierten Wildtyp-Sequenzen überprüft.

4.2.3 Analyse von Mikrosatelliten-Markern

Mikrosatelliten-Marker sind hochpolymorphe DNA-Abschnitte, die aus hintereinander angeordneten repetitiven Sequenzmotiven bestehen. Die einzelnen Allele unterscheiden sich in der Anzahl der Motivwiederholungen und werden nach den Mendelschen Regeln vererbt (Litt und Luty 1989; Tautz 1989; Weber und May 1989). Zur Genotypisierung von Mikrosatelliten-Markern (Short tandem repeats, STR) wurden die gewählten DNA-Bereiche mit PCR amplifiziert. Die „sense“-Primer wurden mit FAM-Fluorophoren (MWG-Biotech, Ebersberg) markiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Fragmente, die Detektion der Fluoreszenzdaten und die Datenauswertung auf einem ABI 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

4.2.4 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP)

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA-Doppelstränge sequenzspezifisch spalten (Arber 1978). Diese Eigenschaft macht man sich bei der RFLP-Analyse zu nutze. So können z. B. Wildtyp- und mutierte Sequenzen voneinander unterschieden werden, wenn infolge einer Punktmutation das Restriktionsenzym entweder nicht mehr schneiden kann oder eine zusätzliche Schnittstelle entsteht. Dazu werden die jeweiligen PCR-Produkte mit einem geeigneten Restriktionsenzym inkubiert und die resultierenden Spaltprodukte anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

4.2.5 Kopplungsanalyse und Homozygotiekartierung

Unter Kopplung versteht man die gemeinsame Vererbung von zwei oder mehr Allelen aufgrund der physikalischen Nachbarschaft ihrer Loci auf einem

Chromosom. Eine Kombination gemeinsam vererbter, gekoppelter Allele wird als Haplotyp bezeichnet. Bei der Kopplungsanalyse wird untersucht, ob ein bestimmter Haplotyp mit dem Auftreten der Erkrankung assoziiert ist (Segregation). Die Kopplungswahrscheinlichkeit an einem Genort wird durch den LOD-Score beschrieben, wobei ein LOD-Score > 3 in der Humangenetik als formaler Beleg für Kopplung gilt.

Die Homozygotiekartierung kann zur Kopplung autosomal rezessiver Krankheitsbilder in blutsverwandten Familien angewendet werden (Lander und Botstein, 1977). Kinder aus konsanguinen Verbindungen haben in Abhängigkeit vom Grad der Verwandtschaft eine größere Wahrscheinlichkeit, für einen Teil des Genoms homozygote (identische) Allele zu tragen. Infolgedessen treten autosomal rezessive Erkrankungen in blutsverwandten Familien in der Regel durch das Homozygotwerden nachteiliger Allele auf, die von einem gemeinsamen Vorfahren in der väterlichen und der mütterlichen Linie vererbt werden (Homozygotie durch gemeinsame Abstammung, *homozygosity by descent*). Entsprechend sind Krankheitsgene für autosomal rezessive Erkrankungen in blutsverwandte Familien hauptsächlich in Bereichen des Genoms lokalisiert, für die die betroffenen Patienten homozygote Haplotypen aufweisen.

Mögliche Kopplung zum CMT4A-, CMT4B1-, CMT4B2-, CMT4C-, CMT4D- und CMT4F-Lokus wurde in den 12 ausgewählten Familien durch Genotypisierung von Mikrosatelliten-Markern überprüft, die die jeweiligen Gene auf der telomerischen und centromerischen Seite flankierten (**Tabelle A1** im Anhang). Die erhobenen Daten wurden im Hinblick auf Vereinbarkeit mit Kopplung zu den jeweiligen Genorten und bei bekannter elterlicher Verwandtschaft auf Homozygotie für die Genorte analysiert.

4.2.6 Mutationsanalyse

Die vollständigen kodierenden Sequenzen der Gene *MTMR2*, *SBF2* und *KIAA1985* wurden auf Sequenzvarianten untersucht. Dazu wurden PCRs mit Primern für Exons und flankierende Intronbereiche durchgeführt (Primer-Sets s. **Tabelle A1** im Anhang). Zur Überprüfung der Segregation gefundener Mutationen wurde die DNA der Eltern und Geschwister eines Patienten ebenfalls sequenziert. Um das Vorhandensein der Sequenzvarianten bei gesunden Kontrollpersonen auszuschließen, erfolgten Restriktionsverdauungen mit

Enzymen, für die durch die Mutation eine neue Schnittstelle entstand bzw. eine in der Wildtyp-Sequenz vorhandene Schnittstelle verloren ging.

4.2.7 Charakterisierung einer Spleißstellenmutation

Zur Charakterisierung der Konsequenz einer Spleißstellenmutation im *MTMR2*-Gen erfolgten Untersuchungen auf der Transkriptebene. Hierzu wurde die RT-PCR, eine modifizierte PCR-Technik verwendet. Die RT-PCR stellt eine Möglichkeit dar, spezifische RNA-Sequenzen nachzuweisen. Dabei wird mRNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die dann als Ausgangspunkt für die Amplifikation dient.

Zunächst wurde mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden) humane gesamt-RNA aus Leukozyten eines Patienten und einer Kontrollperson isoliert. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese mit Oligo-dT Primern und AMV Reverser Transkriptase (Promega, Mannheim). Der betreffende Abschnitt des *MTMR2*-Transkripts wurde an der cDNA-Matrize mit einem exonischen Primerset amplifiziert (**Tabelle A1** im Anhang). Größenunterschiede der Amplifikationsprodukte wurden durch Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Zur Sequenzermittlung der PCR-Produkte erfolgte eine DNA-Sequenzierung.

5. Ergebnisse

5.1 Haplotypisierung und Homozygotiekartierung

In 12 Familien konnten Kopplungsanalysen mit Markern aus der CMT4A-, CMT4B1-, CMT4B2-, CMT4C-, CMT4D- und CMT4F-Region durchgeführt werden. In jeweils vier Familien zeigte sich ein kompatibler Kopplungsbefund bzw. Homozygotie durch gemeinsame Abstammung für den CMT4A-, den CMT4B2- und den CMT4F-Lokus. Eine Familie zeigte mögliche Kopplung zum CMT4B1-Lokus. In keiner Familie konnte ein positiver Kopplungsbefund für die CMT4C- und die CMT4D-Region nachgewiesen werden (s. **Tabelle 3**).

Familien-nummer	CMT4A	CMT4B1	CMT4B2	CMT4C	CMT4D	CMT4F
P603	-	+	-	-	-	-
AC78	-	-	+	-	-	-
P186	+	-	+	-	-	+
CMT139	-	-	+	-	-	-
50-5	+	-	+	-	-	-
M1222/01	-	-	-	-	-	+
M270/02	-	-	-	-	-	-
IF	-	-	-	-	-	-
112.2	+	-	-	-	-	+
198.1	+	-	-	-	-	-
4045	-	-	-	-	-	-
NP447	-	-	-	-	-	+

Tabelle 3: Kopplungsbefunde der AR-HMSN-Familien.

Die Familie mit möglicher Kopplung zum CMT4B1-Genort stammte aus Marokko (P603). In dieser Familie war in zwei konsanguinen Kernfamilien jeweils ein Patient betroffen (**Abb. 3**).

Drei Familien mit compatiblen Kopplungsbefund / Homozygotie für die CMT4B2-Region waren blutsverwandt und stammten aus der Türkei (P186, CMT-139) bzw. aus Nordafrika (50-5). In der Familie CMT-139 waren zwei Kinder erkrankt, während in den Familien P186 und 50-5 aufgrund homozygoter Haplotypen bei den Indexpatienten auf eine mögliche Assoziation mit dem CMT4B2-Genort geschlossen wurde. In der vierten Familie (AC78) waren zwei Kinder nicht-blutsverwandter Eltern betroffen (**Abb. 4**).

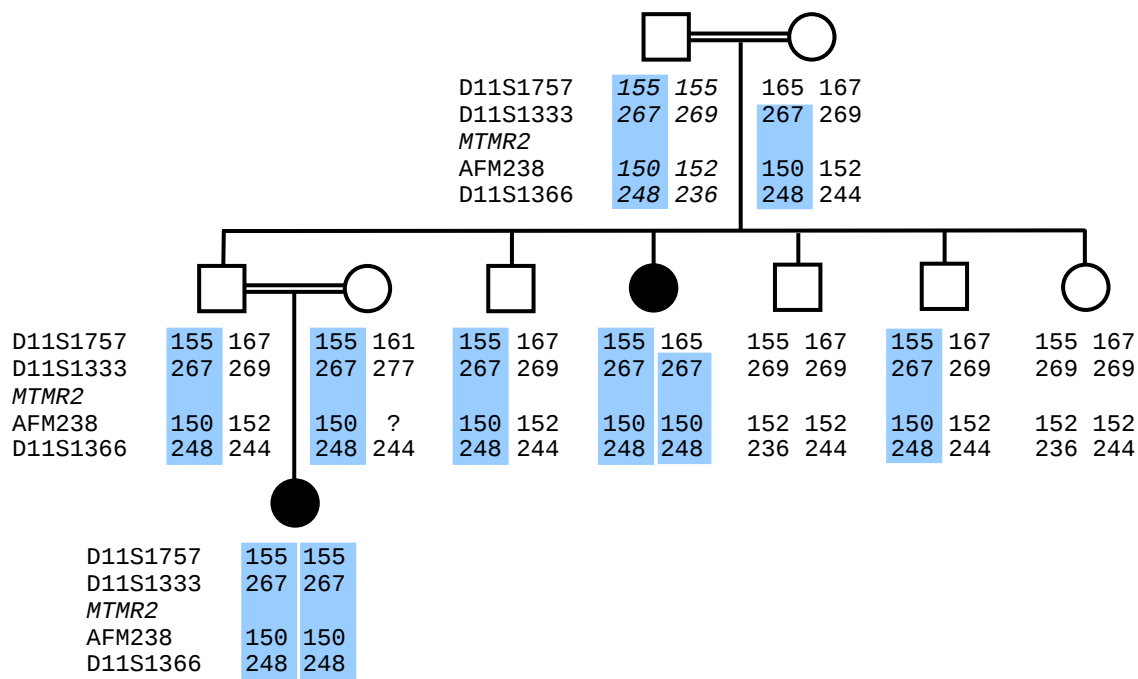


Abbildung 3: Stammbaum und Haplotypen der Familie mit möglicher Kopplung zum CMT4B1-Genort. Männer sind als Quadrate dargestellt, Frauen als Kreise. Erkrankte Personen haben schwarze Symbole. Die STR-Marker sind in ihrer Abfolge vom Centromer zum Telomer wiedergegeben.

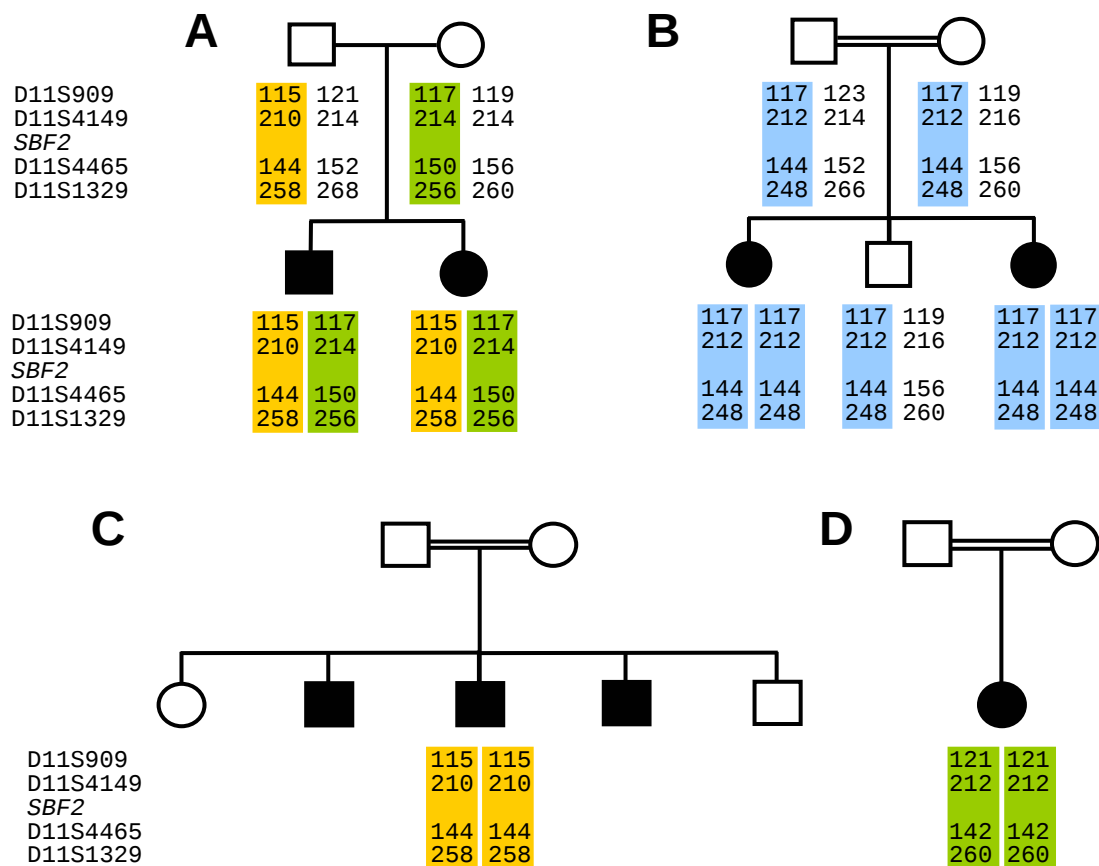


Abbildung 4: Stammbäume und Haplotypen der Familien mit möglicher Kopplung zum CMT4B2-Genort. (A) Familie AC78, (B) Familie CMT139, (C) Familie 50-5 und (D) Familie P186. (Zur Erklärung der Symbole s. Abb. 3.) Die STR-Marker sind in ihrer Abfolge vom Telomer zum Centromer wiedergegeben.

5.2 Mutationsanalyse

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse des *MTMR2*-, *SBF2*- und *KIAA1985*-Gens sind in **Tabelle 4** dargestellt. Alle aufgeführten Mutationen segregierten in den jeweiligen Familien und waren in 60 Kontrollproben nicht nachweisbar.

Mutiertes Gen	Exon / Intron	Mutation	Auswirkung auf die kodierende Sequenz	Veränderte Restriktions-schnittstellen (Untersuchung von Kontrollproben)
<i>MTMR2</i>	4	c.358_376del	D120_L125delD126fs	Verlust: <i>Eco</i> NI
<i>SBF2</i>	14	c.1537C>T	Q513X	Verlust: <i>Bsr</i> I
	21	c.2578C>T	R860X	Verlust: <i>Taq</i> I
	21	c.2596delC	P866fs	Verlust: <i>Ec</i> II
	38	c.5292_5293dupTTTGT	F1765fs	keine *
	IVS 6	c.619+1G>T	Spleißfehler	keine *
<i>KIAA1985</i>	11	c.2860C>T	R954X	Verlust: <i>Taq</i> I
	16	c.3601C>T	Q1201X	Verlust: <i>Pst</i> I

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Studie nachgewiesenen Mutationen. * Untersuchung von Kontrollen mit Sequenzierung

5.2.1 *SBF2*-Gen

Die Haplotypisierung zeigte bei vier Familien mögliche Kopplung zum CMT4B2-Genort (P186, CMT139, 50-5, AC78). Durch DNA-Sequenzierung konnten in diesen Familien Mutationen im *SBF2*-Gen nachgewiesen werden. Bei allen Betroffenen wurden auf beiden elterlichen Allelen homozygote oder compound heterozygote Mutationen identifiziert. Die Eltern trugen jeweils eine der Mutationen im heterozygoten Zustand. Gesunde Geschwisterkinder waren entweder homozygot für das Wildtypallel oder heterozygote Anlageträger.

Bei den beiden betroffenen Geschwistern der Familie AC78 (II.1 und II.2) ließen sich compound heterozygote Mutationen in Exon 21 nachweisen (**Abb. 5**). Hierbei handelte es sich zum einen um eine Deletion des Nukleotids 2596 (c.2596delC), die auf dem mütterlichen Allel nachgewiesen wurde. Diese Mutation führt auf der Proteinebene ab der Position 866 zur Verschiebung des Leserahmens (P866fs). Auf dem väterlichen Allel zeigte sich ein Nukleotidaustausch von Cytosin zu Thymin an Position 2578 (c.2578C>T). Dies führt auf Proteinebene an Position 860 zu einem vorzeitigen Stopcodon (R860X).

Der Patient CMT139 II.1 wies eine homozygote Mutation in Exon 38 des *SBF2*-Gens auf (**Abb. 5**). Hierbei handelte es sich um eine Insertion von fünf Basenpaaren (c.5292_5293insTTTGT), die zu einer Verschiebung des Leserahmes ab der Position 1765 führt (F1765fs).

Bei dem Patienten P186 zeigte die Sequenzanalyse des *SBF2*-Gens eine homozygote Mutation in Exon 14 (**Abb. 5**). An der Position 1537 fand sich ein Einzelnukleotidaustausch von Cytosin zu Thymin. Auf Proteinebene führt dies zu einem vorzeitigen Stopcodon an Position 513 (c.1537C>T, Q513X).

Bei dem Indexpatienten der Familie 50-5 war ein homozygoter Einzelnukleotidaustausch von Guanin zu Thymin an der ersten Nukleotidposition von Intron 6 nachweisbar (c.619+1G>T). Daraus resultiert ein Verlust der Donor-Spleißstelle von Intron 6 (**Abb. 5**). Infolge des angenommenen fehlerhaften Spleißvorgangs (vermutlich Auslassen von Exon 6) tritt eine Verschiebung des Leserasters auf, die zu einem vorzeitigen Stopcodon führt.

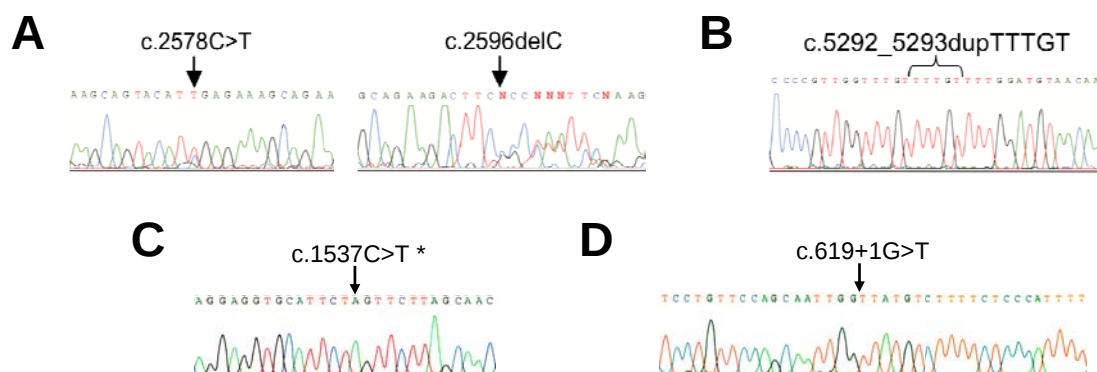


Abbildung 5: Mutationsanalyse des *SBF2*-Gens. (A) Familie AC78, (B) Familie CMT139, (C) Familie P186 und (D) Familie 50-5. Die Positionen der jeweiligen Mutationen sind gekennzeichnet. * Sequenzierung des Antisense-Strangs.

5.2.2 *MTMR2*-Gen

In der Familie P603 ließ sich eine Mutation des Akzeptor-Spleißsignals des Introns 4 im *MTMR2*-Gen nachweisen. Mit Hilfe der Untersuchung auf Transkriptebeune konnte gezeigt werden, dass es infolge dieser Mutation zur Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle in Exon 5 kommt, die zum Verlust der Nukleotide 358-376 des *MTMR2*-Leserahmens führt (**Abb. 6**). Auf der Proteinebene resultieren eine Verschiebung des Leserasters und das Erreichen eines vorzeitigen Stopcodons (c.358_376del, D120_L125delD126fs).

5.3 Der Phänotyp der CMT4B- und CMT4C-Patienten

Die sieben Indexpatienten mit nachgewiesenen Mutationen im *MTMR2*-, *SBF2*- und *KIAA1985*-Gen und die drei ebenfalls in die Studie eingeschlossenen Geschwisterkinder wiesen alle eine distal-symmetrische, sensomotorische Neuropathie auf. In allen durchgeführten Nervenbiopsien zeigten sich fokale gefaltete Myelinscheiden. Der Erkrankungsbeginn, die Progression und der Ausprägungsgrad der Neuropathie variierten erheblich. Die Symptomatik setzte meist im ersten Lebensjahrzehnt ein, wobei ein früher Beginn in der Regel mit einem ungünstigeren Verlauf einherzugehen schien. Einige Patienten waren bereits früh auf einen Rollstuhl angewiesen, während andere bis ins zweite oder dritte Lebensjahrzehnt - meist mit Gehhilfen - mobil waren. In allen untersuchten Fällen war die obere Extremität mit betroffen. Alle Patienten entwickelten eine distale Muskelatrophie und eine diffuse Areflexie. Bis auf eine Patientin zeigten alle Patienten Fußdeformitäten und in variablem Ausmaß Handfehlstellungen. Eine Skoliose lag bei vier Patienten vor. Die Beteiligung der sensorischen Nerven variierte bei den Patienten erheblich. Bei drei Patienten konnte eine Beteiligung der Hirnnerven festgestellt werden. Eine Patientin war als Folge einer ausgeprägten Skoliose und der allgemeinen Muskelhypotonie auf eine nächtliche Beatmung mit einer CPAP-Maske angewiesen, eine weitere Patientin verstarb unter dem Bild einer respiratorischen Insuffizienz. In der elektrophysiologischen Untersuchung zeigten alle Patienten stark herabgesetzte NLG. Bei einer Patientin trat zusätzlich zu der Neuropathie als unabhängige Erkrankung ein Wilms-Tumor der Niere auf.

Die Patientin CMT139 II.1 mit einer Mutation im *SBF2*-Gen zeigte eine unauffällige frühkindliche motorische Entwicklung. Im Alter von 7 Jahren wurden Fußdeformitäten bemerkt, und mit 11 Jahren zeigten sich erstmals Gangunsicherheiten. Der Verlauf war langsam progredient, und im Alter von 22 Jahren war die Patientin auf ebener Strecke auch ohne unterstützende Maßnahmen mobil, während Treppensteigen nur mit der Hilfe von Orthesen möglich war. Bei der klinisch-neurologischen Untersuchung zeigte die Patientin neben einer distal betonten Schwäche und Muskelatrophie Beugedeformitäten der Finger, eine bilaterale Thenar- und Hypothenaratrophie, Pes cavus-Deformitäten und Hammerzehen sowie eine Skoliose. Im Alter von 6 Monaten

entwickelte die Patientin auf dem linken Auge ein Offenwinkelglaukom. Ihr rechtes Auge zeigte außer einer leichten Sehstärkenminderung keinerlei Einschränkungen. Die ebenfalls betroffene Schwester CMT139 II.3 zeigte klinisch ebenfalls eine langsam progrediente Neuropathie mit Beginn in der ersten Lebensdekade. Jedoch kam es bei dieser Patientin nicht zur Ausbildung eines Glaukoms. In der elektrophysiologischen Untersuchung war an den meisten Nerven bzw. Muskeln keine Reizantwort ableitbar (Patientin CMT139 II.1). Die Nervenleitgeschwindigkeit des rechten N. ulnaris betrug 18 m/s.

In der Familie AC78 mit Mutationen im *SBF2*-Gen erreichten beide Kinder die motorischen Meilensteine zeitgerecht. Bei dem betroffenen Mädchen AC78 II.2 fiel im Alter von 6 Jahren ein Steppergang auf. Außerdem entwickelte sich eine ausgeprägte Spitzfußfehlstellung, die im Alter von 15 Jahren operativ korrigiert werden musste. Des Weiteren konnte bei ihr eine ausgeprägte Muskelatrophie der Unterschenkelmuskulatur und der Handmuskeln festgestellt werden. Im Alter von 20 Jahren war sie noch ohne Gehhilfen mobil. Zusätzlich trat bei dem Mädchen im Alter von 8 Jahren ein Wilms-Tumor der rechten Niere (Stadium III) auf, der mit einer Vincristin-Chemotherapie erfolgreich behandelt werden konnte. Der jüngere Bruder AC78 II.1 zeigte seit seinem 5. Lebensjahr ein unsicheres Gangbild. Er entwickelte eine Klumpfußdeformität, die im Alter von 11 Jahren operativ korrigiert werden musste. Außerdem zeigte der Junge eine ausgeprägte Atrophie der Unterschenkelmuskulatur und der Handmuskulatur. Die motorischen NLG der Beinnerven lagen bei beiden Patienten zwischen 8 und 15 m/s.

Zu den Patienten P186 und 50-5 lagen nur unvollständige klinische Daten vor. Beide Patienten wiesen eine langsam progrediente Neuropathie mit Beginn im Vorschulalter auf. Die Nervenleitgeschwindigkeiten waren deutlich verzögert. In der Familie 50-5 waren zwei Brüder ebenfalls betroffen, zu denen aber keine klinischen Angaben verfügbar waren.

Die Patientin P603 mit Mutation im *MTMR2*-Gen zeigte eine verzögerte frühkindliche motorische Entwicklung. Erst im Alter von drei Jahren zeigte das Mädchen Gehbereitschaft; freies Laufen wurde nie erlernt. Sie entwickelte eine ausgeprägte distale Muskelatrophie und Deformitäten aller vier Extremitäten in Form von Klumpfüßen und Krallenhänden. Zusätzlich zeigte sich eine deutliche Skoliose. Seit ihrem 15. Lebensjahr war die Patientin auf einen Rollstuhl

angewiesen. Die neurologische Untersuchung zeigte ausgeprägte Defizite aller sensiblen Modalitäten. Des Weiteren zeigte die Patientin eine Diplegie des N. facialis und Schluckstörungen. In der elektrophysiologischen Untersuchung war die Nervenleitgeschwindigkeit der Nerven der oberen Extremität deutlich herabgesetzt (motorischer Anteil des N. medianus 18 m/s), während bei Reizung der Nerven der unteren Extremität keine Reizantworten erhalten wurden. Bei der zweiten Patientin in der Familie wurde ein sehr ähnlicher Krankheitsverlauf berichtet. In der dritten Lebensdekade entwickelte sie eine progrediente respiratorische Insuffizienz. Sie verstarb im Alter von 33 Jahren an den Komplikationen einer Pneumonie.

Die Patientin AC70 (KIAA1985-Mutation) zeigte eine verzögerte frühkindliche motorische Entwicklung: freies Laufen war mit 21 Monaten möglich, wobei das Gangbild jedoch immer unsicher blieb. In der neurologischen Untersuchung fanden sich eine diffuse Muskelschwäche und –atrophie, die auch rumpfnah deutlich ausgeprägt war. Die Patientin entwickelte des Weiteren eine stark ausgeprägte thorakale Skoliose, die zu respiratorischen Problemen führte, so dass eine nächtliche CPAP-Beatmung eingesetzt werden musste. Seit ihrem 7. Lebensjahr ist die Patientin auf einen Rollstuhl angewiesen. Außerdem zeigten sich diffuse, alle Modalitäten betreffende sensible Ausfälle. Die Nervenleitgeschwindigkeiten waren deutlich verzögert (motorischer Anteil des N. medianus 22 m/s).

Bei dem Patienten NP54, zu dem nur lückenhafte Daten vorlagen, bestand eine relativ milde Neuropathie mit Beginn im Grundschulalter. Darüber hinaus entwickelte der Junge eine ausgeprägte Skoliose. Die Nervenleitgeschwindigkeiten wurden deutlich erniedrigt bestimmt.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten durch die molekulargenetische Untersuchung des *MTMR2*-, *SBF2*- und *KIAA1985*-Gens bei insgesamt sieben von 17 Patienten mit einer HMSN mit fokalen Myelinauffaltungen die krankheitsverursachenden Genmutationen identifiziert werden. Dies belegt, dass die Mutationssuche in diesen Genen, die bislang nicht zur molekulargenetischen Routinediagnostik bei HMSN-Fällen gehört, bei entsprechenden neurohistopathologischen Hinweisen aussichtsreich ist. Fokal gefaltete Myelinscheiden scheinen ein charakteristisches Merkmal von Mutationen im *MTMR2*-, *SBF2*- und *KIAA1985*-Gen zu sein. Allerdings ist dieses Merkmal nicht für diese Gene spezifisch, da auch Mutationen in anderen HMSN-Genen, insbesondere dem *MPZ*-Gen und dem kürzlich erstmalig beschriebenen *FGD4*-Gen, mit fokal gefalteten Myelinscheiden einhergehen können.

Bei zehn Familien konnten in dieser Studie keine pathogenen Mutationen in den untersuchten Genen identifiziert werden. In einigen dieser Familien könnten durchaus Mutationen im *MTMR2*, *SBF2* oder *KIAA1985*-Gen vorliegen, die jedoch durch die gewählten Untersuchungstechniken nicht detektierbar waren. Hierzu gehören zum Beispiel genomische Umbauten wie Deletionen, Duplikationen und Inversionen oder Mutationen in regulatorischen Abschnitten der Gene (z. B. Introns oder Promotorsequenzen). Zumindest im *SBF2*-Gen wurde in der Literatur bereits ein genomischer Umbau als krankheitsverursachende Mutation berichtet (Senderek et al. 2003a). In den untersuchten blutsverwandten Familien erscheinen genomische Deletionen allerdings wenig wahrscheinlich, da bei den Indexpatienten die PCR-Amplifikation aller analysierten genomischen Sequenzen problemlos möglich war. Eine wahrscheinlichere Erklärung für den fehlenden Nachweis von Mutationen bei mehr als der Hälfte der untersuchten Familien ist das Vorliegen von Mutationen in anderen AR-HMSN-Genen. Tatsächlich konnte bei dem Indexfall einer Familie (NP447), bei dem in der vorliegenden Studie keine Mutation nachweisbar war, inzwischen eine homozygote Mutation im *FGD4*-Gen nachgewiesen werden (Stendel et al. 2007). Darüber hinaus ist die Existenz weiterer, bislang unbekannter Gene, anzunehmen, die für einen entsprechenden Phänotyp verantwortlich sein können. Dies belegen auch die

Ergebnisse der für die Genorte CMT4B1, CMT4B2, CMT4C und (im Anschluss an diese Studie) CMT4H durchgeführten Kopplungsanalysen. Bei einem Teil der bislang molekulargenetisch nicht aufgeklärten Familien konnte Kopplung zu den bekannten Genorten formal ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Studie wurden Mutationen im *SBF2*-Gen weitaus häufiger nachgewiesen als Mutationen in den anderen untersuchten Genen. In Anbetracht der kleinen Zahl untersuchter Patienten muss die Bedeutung dieser Beobachtung aber zurückhaltend beurteilt werden. Die vorliegende Studie ist auch nicht der Frage nachgegangen, ob auch bei Patienten, die keine fokal gefalteten Myelinscheiden im Nervenbiopsiepräparat aufweisen, Mutationen in den hier untersuchten Genen auftreten können. Da die Mutationssuche im *MTMR2*-, *SBF2*- und *KIAA1985*-Gen sehr zeit- und kostenaufwändig ist, konnte keine Untersuchung eines größeren, nicht-vorausgewählten Patientenkollektivs erfolgen. Nach der Datenlage in der Fachliteratur und eigenen Beobachtungen erscheint es jedoch sehr wahrscheinlich, dass zumindest nicht alle Patienten mit *KIAA1985*-Mutationen entsprechende Myelinauffaltungen zeigen (Senderek et al. 2003b; Azzedine et al. 2006; Gooding et al. 2005). Allerdings lagen zu diesen Patienten in der Regel keine detaillierten histopathologischen bzw. elektronenmikroskopischen Befunde vor. Insgesamt ist davon auszugehen, dass ca. 20% aller Patienten mit einer demyelinisierenden Form einer autosomal rezessiven HMSN *KIAA1985*-Mutationen aufweisen (persönliche Mitteilung Dr. Jan Senderek, Aachen). Alle bisher in der Fachliteratur berichteten *SBF2*- und *MTMR2*-Mutationen wurden in Verbindung mit fokal gefalteten Myelinscheiden beschrieben. In einem großen Patientenkollektiv ohne entsprechende Myelinauffälligkeiten konnten keine Mutationen im *MTMR2*-Gen nachgewiesen werden (Bolino et al. 2001). Für das *SBF2*-Gen liegen bislang keine entsprechenden Daten vor.

Alle im Rahmen dieser Studie identifizierten Mutationen führen im homozygoten oder im compound heterozygoten Zustand zu einer demyelinisierenden motorischen und sensiblen Neuropathie. Patienten mit *SBF2*-Mutationen zeigten eine unauffällige frühkindliche motorische Entwicklung (zeitgerechtes Erreichen der motorischen Meilensteine). Der Krankheitsbeginn lag in der ersten Lebensdekade. Bei dem Patienten CMT139 II.1 trat die Neuropathie in Verbindung mit einem frühkindlichen Glaukom auf,

während bei der ebenfalls betroffenen Schwester CMT139 II.3 kein Glaukom zu beobachten war. Die Kombination aus HMSN und Glaukom war schon von Azzedine und Mitarbeitern bei Patienten mit *SBF2*-Mutationen beschrieben worden (Azzedine et al. 2003). Von den insgesamt neun bekannten Familien mit *SBF2*-Mutationen (einschließlich der hier beschriebenen Fälle) zeigten betroffene Personen in vier Familien ein frühkindliches Glaukom. Bei Patienten mit *SBF2*-Mutationen kann ein Glaukom das initiale Symptom darstellen und dem Auftreten neurologischer Auffälligkeiten vorausgehen. Bislang ist der Pathomechanismus der Glaukomentstehung in Verbindung mit *SBF2*-Mutationen noch unklar. In diesem Zusammenhang könnte es von Bedeutung sein, dass die Zellen des Trabekelwerks im Kammerwinkel genauso wie die bei der CMT4B2 geschädigten Schwann-Zellen Abkömmlinge der Neuralleiste sind.

Bei den beiden betroffenen Patientinnen mit einer homozygoten *MTMR2*-Spleißstellenmutation zeigte sich eine sehr schwer ausgeprägte, rasch progrediente sensomotorische Neuropathie. Beide Patienten wiesen eine verzögerte frühkindliche motorische Entwicklung auf, wobei das sichere freie Laufen nie erworben wurde. Neben einer Einbeziehung der Hirnnerven in den Krankheitsprozess fand sich bereits zu einem frühen Zeitpunkt eine Beteiligung der Atemmuskulatur, die bei einer der beiden Patientinnen zum Tode führte.

Die beiden Patienten mit *KIAA1985*-Mutationen zeigen beispielhaft die gesamte Spannbreite der mit *KIAA1985*-Mutationen assoziierten Krankheitsverläufe. Die individuellen Krankheitsverläufe reichen von schweren frühkindlichen Neuropathien bis zu milden Krankheitsbildern mit Beginn im Schulalter. Auffällig war bei beiden Patienten die ausgeprägte Skoliose, die bei dem Patienten NP54 mit der milden Neuropathie kontrastierte. Bei vielen CMT4C-Patienten stellt eine Skoliose die initiale Symptomatik dar (Senderek et al. 2003b; Azzedine et al. 2006).

Alle in dieser Studie identifizierten Mutationen führen – sofern die mutierten mRNAs stabil sind und translatiert werden – zu verkürzten Proteinen. Im Falle der Mutationen in den Exons 14 und 21 und an der Intron 6-Spleißstelle des *SBF2*-Gens, der Spleißstellen-Mutation im *MTMR2*-Gen und der *KIAA1985*-Mutation im Exon 11 entstehen entweder erheblich verkürzte und ggf. instabile Proteine, oder die mutierte mRNA unterliegt dem „nonsense mediated decay“

(NMD), so dass die Synthese der abnormen Proteine unterdrückt wird. Leider standen keine geeigneten Gewebeproben und Antikörper für Western-Blot-Analysen und immunhistochemische Untersuchungen zur Verfügung, um diesen Möglichkeiten weiter nachzugehen.

Im Gegensatz dazu könnten die Mutationen im Exon 38 des *SBF2*-Gens und im Exon 16 des *KIAA1985*-Gens durchaus zu stabilen Proteinen führen, da trunkierende Mutationen in den letzten Exons eines Gens dem NMD häufig entgehen. Deshalb könnten Proteine translatiert werden, die gegenüber dem Wildtyp-Molekül nur geringfügig verkürzt sind. Da diese Mutationen dennoch zu einem Neuropathie-Phänotyp führen, der von dem der übrigen Mutationen nicht unterscheidbar ist, ist anzunehmen, dass der C-Terminus des *SBF2*- und des *KIAA1985*-Proteins für die jeweilige Funktion der Proteine von Bedeutung sind. Die Mutation im *SBF2*-Gen führt zum Verlust der C-terminalen Coiled-coil-Domäne, die für die Bildung von Dimeren der *SBF2*-Proteine und für die Bildung von tetrameren Komplexen mit der katalytisch aktiven Phosphatase *MTMR2* verantwortlich ist (Berger et al. 2006). Bei einem Verlust der Coiled-coil-Domäne könnte *SBF2* somit nicht mehr dimerisieren oder mit *MTMR2* interagieren. Die Störung der Funktion von *SBF2* als Adapterprotein oder als Regulator und Aktivator von *MTMR2* könnte dazu führen, dass schließlich *MTMR2* seinerseits seine Funktion nicht mehr ausüben kann. Da Struktur-Funktionsbeziehungen für *KIAA1985* bislang nicht bekannt sind, kann der Effekt der C-terminalen Verkürzung dieses Proteins nicht vorhergesagt werden.

Die pathogenetischen Grundlagen fokal gefalteter Myelinscheiden konnten bislang nicht abschließend geklärt werden. Zum einen treten diese Myelinveränderungen in Verbindung mit Defekten des Myelinstrukturproteins *MPZ* auf, so dass sie Ausdruck einer gestörten Architektur des Myelins der peripheren Nerven sein könnten. Andererseits lässt das Auftreten im Zusammenhang mit Mutationen in Myotubularin-verwandten Proteinen *MTMR2* und *SBF2* vermuten, dass dieser Besonderheit eine Dysregulation der Membransynthese zugrunde liegen könnte. Die Myotubularin-verwandten Proteine sind ubiquitär exprimierte Phosphoinositol-Phosphatasen, deren bevorzugtes Substrat Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat ist (Berger et al. 2002). Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat reguliert vesikuläre Transportprozesse, die auch beim Auf- und Abbau zellulärer Membranen eine

wichtige Rolle spielen (Nicot et al. 2008). Interessant ist auch die Beobachtung, dass MTMR2 mit DLG1 ("discs large 1" / "synapse-associated protein 97") interagiert, einem Protein, das seinerseits eine Rolle beim Auf- und Abbau der Zellmembranen spielt (Bolino et al. 2004; Lee et al. 2003). Darüber hinaus kodiert das erst kürzlich identifizierte Gen für eine weitere HMSN-Form mit fokal gefaltetem Myelin, *FGD4*, ein Protein, dessen zelluläre Lokalisation vermutlich durch seine Interaktion mit Phosphatidylinositolphosphaten reguliert wird (Delague et al. 2007; Stendel et al., 2007). Das FGD4-Protein fungiert als Regulator von Rho GTPasen, die wiederum durch die Regulation des Mikrotubulus-Netzwerks und des Aktin-Zytoskeletts Einfluss auf vesikuläre Transportvorgänge nehmen. Bei der Suche weiterer Gene für HMSN-Formen mit fokalen Myelinauffaltungen könnte es Erfolg versprechend sein insbesondere Gene zu berücksichtigen, deren Genprodukte eine Rolle bei der Membransynthese und -regeneration in Schwann-Zellen spielen könnten.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die hereditäre motorische und sensible Neuropathie (HMSN) oder Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie (CMT) ist die häufigste erbliche neuromuskuläre Erkrankung. In den meisten Familien folgt die HMSN einem autosomal dominanten oder X-chromosomalen Erbgang. Im Gegensatz dazu ist die autosomal rezessive HMSN (AR-HMSN) in Westeuropa selten. In Regionen und Bevölkerungsgruppen mit einem hohen Anteil an Verwandtenehen macht sie aber bis zu 50 % der HMSN-Fälle aus. Die AR-HMSN ist genetisch ausgesprochen heterogen.

Bei einem Teil der AR-HMSN-Patienten finden sich in der Nervenbiopsie charakteristische Markscheidenveränderungen (sog. fokale Myelinauffaltungen, „focally folded myelin“). In der vorliegenden Arbeit wurden Mutationsanalysen für die Gene *SBF2*, *MTMR2* und *KIAA1985* bei AR-HMSN-Patienten durchgeführt. Als Auswahlkriterium wiesen alle betroffenen Patienten fokale Myelinauffaltungen in der Nervenbiopsie auf. Bei sieben der 17 untersuchten Patienten konnten Mutationen nachgewiesen werden. In vier Familien konnten Mutationen im *SBF2*-Gen, bei einer Familie im *MTMR2*-Gen und bei zwei Familien im *KIAA1985*-Gen identifiziert werden.

Der Verlauf und der Schweregrad der Erkrankung scheinen mit dem beteiligten Gen assoziiert zu sein: *MTMR2*-Mutationen führen zu einer schweren, früh beginnenden und rasch progredienten Neuropathie, während *SBF2*-Mutationen mit einem milderem Phänotyp assoziiert zu sein scheinen. Der Verlauf der Neuropathie bei *KIAA1985*-Mutationen ist außerordentlich variabel; als konstantes Merkmal findet sich eine ausgeprägte, früh einsetzende Skoliose.

Die Mutationsanalyse der hier untersuchten Gene ist bei Patienten mit gut charakterisierten Phänotypen Erfolg versprechend. Da jedoch bei mehr als der Hälfte der Patienten keine Veränderungen in den untersuchten Genen nachweisbar waren, müssen weitere Gene für die AR-HMSN mit fokalen Myelinauffaltungen existieren. Die Identifizierung dieser Gene wird weitere Einblicke in die Pathophysiologie des peripheren Nervensystems erlauben.

8. Literaturverzeichnis

Arber W (1978) Restriction endonucleases. *Angew Chem Int Ed Engl* 17:73-9.

Azzedine H, Bolino A, Taieb T, Birouk N, Di Duca M, Bouhouche A, Benamou S, Mrabet A, Hammadouche T, Chkili T, Gouider R, Ravazzolo R, Brice A, Laporte J, LeGuern E (2003) Mutations in MTMR13, a new pseudophosphatase homologue of MTMR2 and Sbf1, in two families with an autosomal recessive demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease associated with early-onset glaucoma. *Am J Hum Genet* 72:1141-53

Azzedine H, Ravisé N, Verny C, Gabrëels-Festen A, Lammens M, Grid D, Vallat JM, Durosier G, Senderek J, Nouioua S, Hamadouche T, Bouhouche A, Guilbot A, Stendel C, Ruberg M, Brice A, Birouk N, Dubourg O, Tazir M, LeGuern E (2006) Spine deformities in Charcot-Marie-Tooth 4C caused by SH3TC2 gene mutations. *Neurology* 67:602-6

Berger P, Bonneick S, Willi S, Wymann M, Suter U (2002) Loss of phosphatase activity in myotubularin-related protein 2 is associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 4B1. *Hum Mol Genet* 11:1569-79

Berger P, Berger I, Schaffitzel C, Tersar K, Volkmer B, Suter U (2006) Multi-level regulation of myotubularin-related protein-2 phosphatase activity by myotubularin-related protein-13/set-binding factor-2. *Hum Mol Genet* 15:569-79

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* 262:2039-42

Bolino A, Brancolini V, Bono F, Bruni A, Gambardella A, Romeo G, Quattrone A, Devoto M (1996) Localization of a gene responsible for autosomal recessive demyelinating neuropathy with focally folded myelin sheaths to chromosome 11q23 by homozygosity mapping and haplotype sharing. *Hum Mol Genet* 5:1051-4

Bolino A, Muglia M, Conforti FL, LeGuern E, Salih MA, Georgiou DM, Christodoulou K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Mandich P, Schenone A, Gambardella A, Bono F, Quattrone A, Devoto M, Monaco AP (2000) Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat Genet* 25:17-9

Bolino A, Lonie LJ, Zimmer M, Boerkoel CF, Takashima H, Monaco AP, Lupski JR (2001) Denaturing high-performance liquid chromatography of the myotubularin-related 2 gene (MTMR2) in unrelated patients with Charcot-Marie-Tooth disease suggests a low frequency of mutation in inherited neuropathy. *Neurogenetics* 3:107-9

Bolino A, Bolis A, Previtali SC, Dina G, Bussini S, Dati G, Amadio S, Del Carro U, Mruk DD, Feltri ML, Cheng CY, Quattrini A, Wrabetz L (2004) Disruption of Mtmr2 produces CMT4B1-like neuropathy with myelin outfoldings and impaired spermatogenesis. *J Cell Biol* 167:711-21

Bouché P, Gherardi R, Cathala HP, Lhermitte F, Castaigne P (1983). Peroneal muscular atrophy. Part 1. Clinical and electrophysiological study. *J Neurol Sci* 61:389-99

- Carter GT (1995) Phrenic nerve involvement in Charcot-Marie-Tooth. *Muscle Nerve* 18:1215-6
- Charcot J, Marie P (1886). Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev Méd Paris* 6:97-138
- Delague V, Jacquier A, Hamadouche T, Poitelon Y, Baudot C, Boccaccio I, Chouery E, Chaouch M, Kassouri N, Jabbour R, Grid D, Mégarbané A, Haase G, Lévy N (2007) Mutations in FGD4 encoding the Rho GDP/GTP exchange factor FRABIN cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4H. *Am J Hum Genet* 81:1-16
- Dyck PJ, Chance P, Lebo R, Carney JA (1993) Hereditary motor and sensory neuropathies. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF (Hrsg.) *Peripheral neuropathy. W. B. Saunders*, Philadelphia, pp 1094-1136
- Dyck PJ, Karnes JL, Lambert EH (1989) Longitudinal study of neuropathic deficits and nerve conduction abnormalities in hereditary motor and sensory neuropathy type 1. *Neurology* 39:1302-8
- Dyck PJ, Litchy WJ, Minnerath S, Bird TD, Chance PF, Schaid DJ, Aronson AE (1994) Hereditary motor and sensory neuropathy with diaphragm and vocal cord paresis. *Ann Neurol* 35:608-15
- Engelhardt A (1994) *Vaskulitische Neuropathien. Theorie und Forschung.* Roderer Verlag, Regensburg
- European CMT-Consortium-ENMC (1999) 4th workshop of the European CMTconsortium-62nd ENMC international workshop: rare forms of Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders. *Neuromuscul Disord* 9:279-287
- Fabrizi GM, Taioli F, Cavallaro T, Rigatelli F, Simonati A, Mariani G, Perrone P, Rizzuto N (2000) Focally folded myelin in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B with Ser49Leu in the myelin protein zero. *Acta Neuropathol* 100:299-304
- Gabreëls-Festen AA, Joosten EM, Gabreëls FJ, Stegeman DF, Vos AJ, Busch HF (1990). Congenital demyelinating motor and sensory neuropathy with focally folded myelin sheaths. *Brain* 113:1629-43
- Gabreëls-Festen A, van Beersum S, Eshuis L, LeGuern E, Gabreëls F, van Engelen B, Mariman E (1999) Study on the gene and phenotypic characterisation of autosomal recessive demyelinating motor and sensory neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease) with a gene locus on chromosome 5q23-q33. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:569-574
- Gooding R, Colomer J, King R, Angelicheva D, Marns L, Parman Y, Chandler D, Bertranpetit J, Kalaydjieva L (2005) A novel Gypsy founder mutation, p.Arg1109X in the CMT4C gene, causes variable peripheral neuropathy phenotypes. *J Med Genet* 42 e69
- Harding AE, Thomas PK (1980) The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 103:259-80
- Hayasaka K, Himoro M, Sato W, Takada G, Uyemura K, Shimizu N, Bird TD, Conneally PM, Chance PF (1993a). Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nat Genet* 5:31-4

Hayasaka K, Himoro M, Sawaishi Y, Nanao K, Takahashi T, Takada G, Nicholson GA, Ouvrier RA, Tachi N (1993b). De novo mutation of the myelin P0 gene in Dejerine-Sottas disease (hereditary motor and sensory neuropathy type III). *Nat Genet* 5:266-8

Hughes RA (2002) Peripheral neuropathy. *BMJ* 324:466-9

Ingall T J, McLeod JG(1991) Autonomic function in hereditary motor and sensory neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease). *Muscle Nerve* 14:1080-3

Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 9436-9440

Lander ES, Botstein D (1987) Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 236:1567-70

Lee OK, Frese KK, James JS, Chadda D, Chen ZH, Javier RT, ho KO (2003) Discs-Large and Strabismus are functionally linked to plasma membrane formation. *Nat Cell Biol* 5:987–93

Litt M, Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene *Am J Hum Genet* 44:397-401

Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, Chakravarti A, Patel PI (1991) DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66:219-32

Mendell JR (1998) Charcot-Marie-Tooth neuropathies and related disorders. *Semin Neurol* 18:41-7

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-50

Nicot AS, Laporte J (2008) Endosomal Phosphoinositides and Human Diseases. *Traffic* 9:12409

Niemann A, Berger P, Suter U (2006) Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* 8:217-42

Ouvrier RA, McLeod JG Pollard JD (1999) Peripheral neuropathy in childhood. Mac Keith Press for the International Child Neurology Association (ICNA), London

Othmane KB, Johnson E, Menold M, Graham FL, Hamida MB, Hasegawa O, Rogala AD, Ohnishi A, Pericak-Vance M, Hentati F, Vance JM (1999) Identification of a new locus for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease with focally folded myelin on chromosome 11p15. *Genomics* 62:344-9

Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-41

Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, Barker DF, Martin JJ, de Visser M, Bolhuis PA, Van Broeckhoven C (1991)

Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord* 1:93-7

Regli F, Mumenthaler M (1992) *Polyneuropathien*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Roa BB, Dyck PJ, Marks HG, Chance PF, Lupski JR (1993) Dejerine-Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Nat Genet* 5:269-73

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7

Senderek J, Bergmann C, Weber S, Ketelsen UP, Schorle H, Rudnik-Schoneborn S, Buttner R, Buchheim E, Zerres K (2003a) Mutation of the SBF2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2/11p15. *Hum Mol Genet* 12:349-56

Senderek J, Bergmann C, Stendel C, Kirfel J, Verpoorten N, De Jonghe P, Timmerman V, Chrast R, Verheijen MH, Lemke G, Battaloglu E, Parman Y, Erdem S, Tan E, Topaloglu H, Hahn A, Muller-Felber W, Rizzuto N, Fabrizi GM, Stuhmann M, Rudnik-Schoneborn S, Zuchner S, Schroder JM, Buchheim E, Straub V, Klepper J, Huehne K, Rautenstrauss B, Buttner R, Nelis E, Zerres K (2003b) Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy. *Am J Hum Genet* 73:1106-19

Simonati A, Fabrizi GM, Pasquinelli A, Taioli F, Cavallaro T, Morbin M, Marcon G, Papini M, Rizzuto N (1999). Congenital hypomyelination neuropathy with Ser72Leu substitution in PMP22. *Neuromuscul Disord* 9:257-61

Skre H (1974) Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* 6:98-118

Stendel C, Roos A, Deconinck T, Pereira J, Castagner F, Niemann A, Kirschner J, Korinthenberg R, Ketelsen UP, Battaloglu E, Parman Y, Nicholson G, Ouvrier R, Seeger J, De Jonghe P, Weis J, Krüttgen A, Rudnik-Schöneborn S, Bergmann C, Suter U, Zerres K, Timmerman V, Relvas JB, Senderek J (2007) Peripheral nerve demyelination caused by a mutant Rho GTPase guanine nucleotide exchange factor, frabin/FGD4. *Am J Hum Genet* 81:158-64

Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17 :6463-71

Tersar K, Boentert M, Berger P, Bonneick S, Wessig C, Toyka KV, Young P, Suter U (2007) Mtmr13/Sbf2-deficient mice: an animal model for CMT4B2. *Hum Mol Genet* 16:2991-3001

Timmerman V, De Jonghe P, Ceuterick C, De Vriendt E, Löfgren A, Nelis E, Warner LE, Lupski JR, Martin JJ, Van Broeckhoven C (1999) Novel missense

mutation in the early growth response 2 gene associated with Dejerine-Sottas syndrome phenotype. *Neurology* 52:1827-32

Tooth H (1886). The peroneal type of progressive muscular atrophy. HK Lewis & Co., London

Vallat JM, Grid D, Magdelaine C, Sturtz F, Levy N, Tazir M (2005) Autosomal recessive forms of Charcot-Marie-Tooth disease. *Bull Acad Natl Med* 189:55-68

Warner LE, Hilz MJ, Appel SH, Killian JM, Kolodry EH, Karpati G, Carpenter S, Watters GV, Wheeler C, Witt D, Bodell A, Nelis E, Van Broeckhoven C, Lupski JR (1996) Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* 17:451-60

Warner LE, Mancias P, Butler IJ, McDonald CM, Keppen L, Koob KG, Lupski JR (1998) Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* 18:382-4

Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44:388-96

Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36:449-51

9. Elektronische Datenbankinformationen

Mutationsdatenbank für hereditäre Neuropathien: <http://www.molgen.ua.ac.be>

Website der University of Washington zu neuromuskulären Erkrankungen: <http://neuromuscular.wustl.edu>

10. Anhang

Tabelle A1

CMT4A-Mikrosatellitenmarker

STR-Marker	Position (Mb)	Repeat-sequenz	Primersequenzen (5'-3')		Produktgröße (kb)	Annealing-Temperatur (°C)
			F-Primer	R-Primer		
Centromer						
D8S286	75,24	CA	GCTGTTTATTTGCCCATGT	GCATGAAACTGTCACTGAGA	0,220-0,238	60
D8S551	75,37	CA	CCACAAAGGACTTTCAGTTACG	ACAGTTACCAAGACATTATAGGCAC	0,253-0,285	58
<i>GDAP1</i>	75,43					
D8S548	75,82	CA	CTACCTCATGCAAGGCCA	CATTGAGCACACCCTCAGT	0,228-0,248	61
D8S1829	75,96	CA	AGCTTCGATCAACCTTTTAA	CGTCAATCAATCAATCAATC	0,101-0,117	57
Telomer						

CMT4B1-Mikrosatellitenmarker

STR-Marker	Position (Mb)	Repeat-sequenz	Primersequenzen (5'-3')		Produktgröße (kb)	Annealing-Temperatur (°C)
			F-Primer	R-Primer		
Centromer						
D11S4118	92,99	CA	TTGGACACCCTCACAATAC	GACAAAACCTCTGCATAGCAA	0,163-0,177	58
D11S1757	94,33	CA	TGCACCTTGCTATCCAACCT	CCCATCCCAGCCTCAG	0,151-0,173	57
D11S1333	94,52	CA	CCTGGGAAGGGACATC	CAATCCTGCAGTGGCC	0,255-0,275	60
<i>MTMR2</i>	95,21					
AFM238YH4	95,40	CA	CAATGACTCTGAGAGGTACTGC	ATTATTTCCATTTAACAGTTTGTGT	0,149-0,163	60
AFM119XH4	95,44	CA	AGTTGCTATGAAAATTGCCC	AGCTAAACCAGGGTTCTTTG	0,280-0,294	60
D11S1366	96,36	ATCT	GCTACAATGATAGGGAAATAATAGA	GGTGGGATCCTTTGCTATTT	0,240-0,264	58
Telomer						

CMT4B2-Mikrosatellitenmarker

STR-Marker	Position (Mb)	Repeat-sequenz	Primersequenzen (5'-3')		Produkt-größe (kb)	Annealing-Temperatur (°C)
			F-Primer	R-Primer		
Telomer						
D11S909	8,73	CA	GATATAACACCAAAAAGCGCG	GGTATTCTTACAGCACAAAAGTTCT	0,113-0,125	60
D11S4149	9,09	CA	TGAATTATACCCCTGACCAA	CCCAGCCAATATCAGCA	0,208-0,226	57
SBFtel1	9,58	CA	ACTCTCAGCTGCCCACTTGT	ATTTGTGTTGCAGACTCCCC	0,180-0,188	60
<i>SBF2</i>	9,82					
D11S4465	10,53	GGAA	TAGCCCAAATATCATGTGCA	TGACTGTCACTTAGTAGATGCTCC	0,140-0,164	58
D11S1329	10,67	CA	TGTGGAACATCAAGCAAG	GGCACTACAGGGACAATC	0,244-0,268	58
D11S1999	10,67	GATA	TACATGGCAGCAGGCATATA	GAGTAAACAAGATTGCTAGATAGGC	0,114-0,130	60
Centromer						

CMT4C-Mikrosatellitenmarker

STR-Marker	Position (Mb)	Repeat-sequenz	Primersequenzen (5'-3')		Produkt-größe (kb)	Annealing-Temperatur (°C)
			F-Primer	R-Primer		
Centromer						
D5S658	140,35	CA	TTTGAAGGGCACTACGAAGATCCTC	ATTCTCTATTGGAGCCAAGCCAAG	0,266-0,282	58
D5S2011	141,20	CA	GCTTGGAACACAAGAGTGG	TCAGCCTCACCCAGAGA	0,138-0,146	60
D5S1360	144,88	ATA	ACAAACAAAACCAAGAGTGC	TGGCTCATGTATCCCTATGT	0,132-0,147	59
D5S2090	147,21	CA	CATGGGCATGTTTCAAAAT	AGTACCTCCTTAGTAACTCTGGGC	0,189-0,205	58
D5S413	148,35	CA	AGTCACCTTCTCTGTCTCCA	AGGCCTCATTCAAAATCTGT	0,264-0,276	60
<i>KIAA1985</i>	148,35					
D5S2015	149,56	CA	TTGGCTAATGGGAGGCAACA	GCTACCTAAAGAACACAGTCATGGC	0,171-0,185	60
D5S636	149,88	CA	AAGGCATATGGGAAATATCTGT	CCACACCATTATGACATTTTCT	0,130-0,152	58
D5S673	151,59	CA	TGGAGAGATAGTGTCCCCG	GGTCTGAGTTCCACATCAT	0,260-0,288	57
Telomer						

CMT4D-Mikrosatellitenmarker

STR-Marker	Position (Mb)	Repeat-sequenz	Primersequenzen (5'-3')		Produkt-größe (kb)	Annealing-Temperatur (°C)
			F-Primer	R-Primer		
Centromer						
D8S378	134,11	CA	TGTTCTGCACATGTATCCCA	CATTCATTAGCCACAGGCC	0,122-0,158	60
D8S529	134,17	CA	TGCCCCTAACCTGTCT	TTAGCCTCCAATATGTCTCT	0,244-0,262	60
<i>NDRG1</i>	134,32					
D8S256	134,51	CA	GTTCAAGGGCTCAGGGTTCT	CTTCCACCTTTAGCCAAGGA	0,210-0,232	58
D8S1990	134,64	GGAA	GGCTGTAGTTGCTGGTGTCT	TGTTTCAAGCTCAAAAAGCC	0,368-0,388	58
Telomer						

CMT4F-Mikrosatellitenmarker

STR-Marker	Position (Mb)	Repeat-sequenz	Primersequenzen (5'-3')		Produkt-größe (kb)	Annealing-Temperatur (°C)
			F-Primer	R-Primer		
Centromer						
D19S47	45,00	CA	GATGTCTCCTTGGTAAGTTA	AATACCTAGGAAGGGGAGGG	0,088-0,102	57
D19S200	45,38	CA	GGAGTTGCTTCGCTTGTAGC	TAAAAAGAAGATAGCCATGTGAGG	0,126-0,152	58
<i>PRX</i>	45,59					
D19S223	46,09	CA	CAAAATCGAGGTGCATAGAA	ACCATGACTGGCTAATTGTG	0,228-0,246	60
D19S718	46,15	GATA	CTGAGGGAACAGCAAGGTAA	AGAGCAAGACTCTGACTCTATAAAT	0,340-0,376	58
Telomer						

Primersets für das *MTMR2*-Gen:

Exon	Primer	Primersequenz 5'-3'	Annealing-temperatur (°C)
1	1F	TCCGTAGCACTCCGCCCTCCGC	60
	1R	AAGGAATTCCGGCGTAGCCTTCAG	
1A	1AF	TTGCCAAAGCATCCTCCCCACCAC	60
	1AR	ACTCATAAGTGCAAATTCATTTGGG	
2	2F	AAGCAGAACTTAGTTGGCTGTGG	60
	2R	AGAATACTCCATCAGTATCTCCTGC	
2A	2AF	TCTCTTGTAAACTCTGACCAATTC	60
	2AR	ATCAGGGTGAGGATACAAGAAGAC	
2B	2BF	TTAAATCAGGCAAACGTGTCTGTC	60
	2BR	ATCAGAAGATCAAGGTCATCCTGGC	
3	3F	TAAC TTCAAGAGCAAGTATACTCAG	58
	3R	AAGACTGCAGGTAAAGAGTTCTGCC	
4	4F	TTGTAGGATTCTGAGGTCTCTGG	55
	4R	ATACTGTCCAATTATAGAGCTGATC	
5	5F	ATTTCAAAAGCATGGAACGG	60
	5R	AAACCAATTTCAAACAGAGGTTC	
6	6F	TGTATCCCACATTCACAGATCTTAAC	60
	6R	TCTGGTTAAATGTCAAAGCAGGGATG	
7	7F	TGCTAATACATAAAATGTTCTTGCAG	60
	7R	ATGTGGTGAATTACTGTGGTATGAG	
8	8F	TAGGAGATGGATAGTAGAGGTCAG	60
	8R	ACCTGCTGCTGTAGCTATTTATATCC	
9	9F	TTCATGGCCAGGCTTGGGATCC	60
	9R	TGTTTACCACTGTAGAGCCTGAGC	
10	10F	TGAGCCATCCACATTTTCCTGTGG	60
	10R	AGAAAGGTACCTTCATGTTGATTGC	
11	11F	TAATGATCCCTGATAAGCTGTATTAG	55
	11R	ACAAGCAAAAACGTTTACCCAC	
12	12F	ATCCCCCTAAGTTCATATAATTCAC	58
	12R	ACCTCTCAGGAGTTATTATCAATGC	
13	13F	TACGAGTAATGCCATAATGGCTTGG	60
	13R	ATGACCCAAAAGAATGACTTCAGTTG	
14	14F	TCCAAGTCCACTTCCTCTAAAGAG	60
	14R	TGCACAGATAATCTTTCCAGCTGC	
15	15F	TGATGGGTTGGAAAGGTGCCATTGG	60
	15R	ACTTAAGCCACCTGCACTGCTACAGTTC	
cDNA	M2F	GCAGAAATGGAAGAACCACC	58
	M2R	CCCCTCAGGTTTATGAGCAA	

Primersets für das *SBF2*-Gen:

Exon	Primer	Primersequenz 5'-3'	Annealing-temperatur (°C)
1	1F	CTCGGTTGTCAAACATGGCT	58
	1R	CTCAGCCCAGCCGAGAAG	
2	2F	TCAAAGATGACCGTACTTGAGGG	55
	2R	TGGATATGGAGGTCCTACTGCAT	
3	3F	TAACATGTTGCTCTCCTCTCCAA	55
	3R	GTTAGGAATTTGTTAAAATGGGC	
4	4F	CAATCTAACAATATTTTCAATCCA	55
	4R	TGAAATAAGTATTCCCGGCTTCA	
5	5F	TGCTATGTGAAAGATGAACCCTG	58
	5R	GGGTTCAAAGAGAAATCGTCCTA	
6	6F	TCTTGATTCATGTGAGGTGATGTC	58
	6R	AGCCACTGAATTTTCTTATGCCA	
7	7F	GTGGTTCAAAACCATTGTGC	58
	7R	GGCAAACTGAAAGTTTGGG	
8	8F	TGCTACAGATCTGAAAATAGTGATGA	58
	8R	AGCAGGCTTGGATTCCATTTATT	
9	9F	CCTGTATGCTGAATGAAGGAAGG	58
	9R	TCGTTTTGAATTAGTCAAGGGAAA	
10	10F	TTGAATTGTATTCATGGAGGGA	55
	10R	TGGGGCACTTTTTACTCTGC	
11	11F	AGAACTGATATCTAACCACACAGAGATT	58
	11R	TGTTTGGTTGTGACTGTAATTGTTTT	
12	12F	AAAAATTATATGTATTTCCAAGGCATC	55
	12R	CATGAAGGGATTTATATAGGCTTTG	
13	13F	CTCACGTAACCACGTAACACCC	58
	13R	GTAACCCCAAGATGGAGGTGAA	
14	14F	AGCTACAGGAGTTTGTTCACTTTG	58
	14R	GTGTCCCTGTAAGCTCCCACTC	
15	15F	GCTGGTAACCTCAGCACGTAAA	58
	15R	CCACGCCCAACCTACAGTCTTA	
16	16F	GCTGTGGTAGGCTCAAGAACTG	58
	16R	AGGATGCGTTTGAATTTTCAGG	
17	17F	GGCATGCTACTAAGAGGACAGGA	58
	17R	AAGAGTACAAACCCCTCCGTCA	
18	18F	CAGGGCTTCCTAAATAAAACCC	58
	18R	TCTATGATTAAGTGTGGCCCT	
19	19F	GTCCAAAGGTGAGGAAAAATGG	58
	19R	TCACCTGAAGTGATGGTTCTCTTT	
20	20F	GCATGGCTGAACTATAATGGAAGA	58
	20R	ACTTTGCTCATGTTTCTGTCTGC	
21	21F	TGTCTGTCAAAGGTTAGGTGAA	58
	21R	TAGAAGTGGAATTGCTGGGTCA	
22	22F	CCAAATACCTGTGTGGCAAAA	55
	22R	TGTATTCTAGGCTGGGCAACAG	
23	23F	TGATCTTCCCCATTCTCATCCT	55
	23R	TGGGCAGTGTCTCTTCAAATA	
24	24F	AATCGCTTACACCTGGACACAA	55
	24R	GTCCCTTTGACCTCCAGTCTTG	
25	25F	GCTGGTAAGTGCTTCCATCTTC	58
	25R	GCTGTGGGAAAGGAGAAGAAAC	
26	26F	TCTATCTCAGGGCTATGGATGC	55
	26R	TACCCTGAAGACCTCAATTGCT	
27	27F	TGTGGAGCCTCACACTATCAAG	55
	27R	TCTCATTTCTTTCCCCTTTTC	

Exon	Primer	Primersequenz 5'-3'	Annealing-temperatur (°C)
28	28F	TCTTGGTGAAGGAACAGTACAA	58
	28R	GGCTGGTTTGTATATTTGGGTG	
29	29F	GCAAAGCTGGTTTGTGATACAGG	58
	29R	GTAGCTCCAGAGCATGCACCTT	
30	30F	TGGGGAGTAGGGGAACAAAGTA	55
	30R	TGGCCCCAAATAACTTTGTCA	
31	31F	GAGCTCATGGTACGGAGTTTTTC	55
	31R	TTATCCAGGGTTGAAAGCAACT	
32	32F	GTTATGACAGGAAGGTACCGGG	58
	32R	GCTATCATCAGAAGGAAGTGCTTT	
33	33F	CAGCTTGTCAGTCTTGGGGATA	55
	33R	TGGTCTCCTGCATGTTTCAGTT	
34	34F	TTTTTGGTATGAAACCTAGTCCAATG	54
	34R	AAGGTTTTTCACACAAATGTTGC	
35	35F	GGGGAGCAAATCTGGTTTCTT	58
	35R	TTCATACTCTTCCTCCCCTGGA	
36	36F	CTTCCTTCTGGCCATAAACCC	58
	36R	CATGTCCACCACTTTCCTCAAC	
37	37F	TGCACAGGCCTAGCTTATTGAG	58
	37R	TGTCCCTAATAATGGACGTGTAGG	
38	38F	AAAAAGCAGTCTGTACATGAGGAA	58
	38R	GCCATTTTTGAATCATCTAGGGG	
39	39F	TCACCACCAATTACTCTGAGGG	55
	39R	TCTTCGAGGCATAGTTCAGCAT	
40	40F	AGGCCCTGGGATAACTTGTTG	55
	40R	GTTCTGGGGCAGTATGGAAAAG	

Primersets für das KIAA1985-Gen:

Exon	Primer	Primersequenz 5'-3'	Annealing-temperatur (°C)
1	1F	GCTGTAGCCGGGATATCAAA	60
	1R	AGCACAATCATCTCCCCATC	
2	2F	CCATGCCACTAATCCTGGAA	60
	2R	TCATCAAGAGGGAAAGAGGG	
3	3F	CACCAGTTGAGGGTTCAGGT	60
	3R	GGACCTACTTTGTTCCAGATGC	
4	4F	TGACGTAAAAATCAATGCCA	60
	4R	TAATTACCAGAGCCAGGCCA	
5	5F	GGTCTGGGAATCAAGCTCAG	60
	5R	ACAGGTGGGTTCATTTGTGA	
6	6F	CCAGGAAGAAAGTACTCCAGC	60
	6R	TCCACACTATGGATGCCCA	
7	7F	TTCTCAATAAACTTTTGCCATCA	60
	7R	TGGCTTCCCTAAATCCAGTT	
8	8F	AGTCTGGGAACCCCTCATTT	60
	8R	GTGCTTTTCTGGCTCCATGT	
9	9F	ATTTGCGGGAAGTTGGTTT	60
	9R	CATGGCCACCCAAATTCAT	
10	10F	TGGAATGCCAAGGCTCCTAAG	60
	10R	TCCAGGTAGGCCACAACTC	
11A	11AF	ACTGGTCAGGAGGAGGAGG	60
	11AR	GGAGGGTGTCCAGAGAGGA	
11B	11BF	AAGCATGAACTCGACGTGGT	60
	11BR	TAAGAGATAGGCCCATGCCA	
11C	11CF	GCCCTGTGTCTCATCCTTTC	60
	11CR	GATGCCTTAAGCCAAACAGC	
11D	11DF	CCTGCAGGCTGTACGACTCT	60
	11DR	CTTCCTTTGGCTGATGAGGA	
13	13F	GCTGTTCTGCTCAGAGCTT	60
	13R	TCCACAGGCTTAGGGTGAAC	
14	14F	GGGGGACTTTAGCAGAGGAT	60
	14R	AGGAGAAGAGGGACTCAGGC	
15	15F	TTTtagTCCACTGCCGTTCC	60
	15R	CACACAGTCTGACTCCAGGG	
16	16F	CAGCACAGTCCCTGACATCT	60
	16R	CTGGTTTTCTCAGCTCCACC	
17	17F	ATGTTGGGCAAACAAACAAA	60
	17R	AGGTAAGGACTCGGACCCTC	

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Klaus Zerres bedanken, der mir mit der Bereitstellung des interessanten Themas meiner Arbeit ermöglicht hat, in die tiefen Sphären der Molekulargenetik zu blicken und meine Doktorarbeit am Institut für Humangenetik durchzuführen.

Ganz herzlich zu Dank verpflichtet bin ich meinem lieben Betreuer Dr. med. Jan Senderek. Dank seiner hervorragenden Betreuung, seiner Diskussionswilligkeit, seiner Hilfsbereitschaft habe ich es „last but not least“ doch noch geschafft, nach langer Zeit meine Doktorarbeit zu beenden. Außerdem möchte ich meiner lieben Laborfreundin und Weggefährtin Claudia Stendel, ohne die mir die Arbeit im Labor nur halb so viel Spaß gemacht hätte, ganz herzlich danken. Unvergesslich werden mir bleiben „Fab-in-the-Lab“ alias Fabian Küpper, „Caiti“ Obermann, Christa Schmidt und „Irmis“ Kalker, unser aller gute Seele. Dem ganzen Laborteam der Molekulargenetik ein Dankeschön. Die Arbeit mit Euch hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Ich danke meiner Mutter, die mich in allen Lebenslagen vor, während und nach dem Studium ermutigt hat, meinen Weg konsequent fortzuführen. Danke für die Geduld.

12. Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, Susanne Margarete Schreiber, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

- bei mir, Susanne Margarete Schreiber, Volmerswerther Str. 385, 40221 Düsseldorf,
- und
- bei meinem Betreuer, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. K. Zerres, Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Aachen,

hinterlegt sind.

Susanne Margarete Schreiber

Düsseldorf, März 2010

13. Lebenslauf

Schullaufbahn

1999 Allgemeine Hochschulreife
Staatliches Eifel Gymnasium Neuerburg

Hochschullaufbahn

1999 – 2006 Humanmedizinstudium
Rheinisch-Westfälische-Technische Hochschule Aachen

02/2003 – 12/2003 Experimentelle Doktorarbeit
Institut für Humangenetik, RWTH Aachen

Juni 2006 Approbation als Ärztin

Nebentätigkeiten

2004-2005 Studentische Hilfskraft
Institut für Humangenetik, RWTH Aachen

Berufstätigkeit

09/2006 – 05/2009 Assistenzärztin
Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und
Schmerztherapie, Universitätsklinikum Regensburg

seit 06/2009 Assistenzärztin
Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum
Düsseldorf

Zu meiner Person

Susanne Margarete Schreiber
Volmerswerther Str. 385
40221 Düsseldorf
email: susanneschreiber@ gmx.de

am 8. April 1980 geboren in Bitburg

ledig

Düsseldorf, März 2010