

Zur Differenzierung hereditärer sensomotorischer Neuropathien
mittels Mutationsanalyse des Genbereichs
für das gap junction-Protein Connexin32
an Paraffin-eingebetteten Suralnervenbiopsien

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

vorgelegt von
Carsten Bergmann
aus
Mönchengladbach

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. J. M. Schröder

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. K. Zerres

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 2000

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen lieben Eltern und Großeltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
2. Hereditäre sensomotorische Neuropathien unter besonderer Beachtung der X-chromosomal dominanten Form CMTX
 - 2.1 Historische Entwicklung
 - 2.2 Klinisches Erscheinungsbild
 - 2.3 Elektrophysiologische Diagnostik
 - 2.4 Morphologie
 - 2.5 Differentialdiagnosen
 - 2.6 Therapie und Prognose
3. Patientenkollektiv
4. Untersuchungsgut
5. Methoden
 - 5.1 Molekulargenetische Untersuchungsmethoden
 - 5.1.1 DNA-Extraktion aus Paraffin-eingebetteten Formalin- oder Glutaraldehyd-fixierten Suralnervenbiopsien
 - 5.1.2 DNA-Extraktion aus Leukozyten
 - 5.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
 - 5.1.4 Elektrophorese der Amplifikationsprodukte auf Agarosegelen
 - 5.1.5 SSCP-Elektrophorese zum Nachweis von Punktmutationen
 - 5.1.6 Automatisierte DNA-Sequenzanalyse
 - 5.1.7 Restriktionsenzym-Analyse
 - 5.2 Morphometrie an Semidünnschnitten
6. Ergebnisse
7. Diskussion
8. Zusammenfassung
9. Literatur
10. Danksagung
11. Anhang

1. Einleitung

Der Begriff „Hereditäre motorisch-sensible Neuropathien“ (HMSN) oder „Charcot-Marie-Tooth“ (CMT) Krankheit umfaßt eine Gruppe nosologisch und genetisch verschiedener Entitäten, die nebst der Erbllichkeit als phänotypische Gemeinsamkeit ein distal akzentuiertes, symmetrisches, primär motorisches Polyneuropathiesyndrom aufweisen [Harding und Thomas, 1980; Hoogendijk und de Visser, 1991]. Obwohl das Krankheitsbild bereits Mitte des letzten Jahrhunderts erstmals beschrieben wurde, gelang erst durch die in den letzten Jahren rapide fortschreitenden molekulargenetischen Erkenntnisse die Bestimmung einer Vielzahl von CMT-Untergruppen mit den jeweils zugrundeliegenden genetischen Defekten.

Eine Differenzierung zwischen Typ 1, der häufigsten und demyelinisierenden Form der Charcot-Marie-Tooth Krankheit, und Typ 2, der axonalen Variante, gelingt durch Messung der Nervenleitungsgeschwindigkeit (NLG) und morphologische Nervenbiopsiefundung. So ist die erstgenannte Form anhand deutlich reduzierter NLGs und einer Degeneration des peripheren Markscheidenmyelins zu erkennen, während Typ 2 durch normale oder lediglich geringgradig verlangsamte NLG-Meßwerte und den Verlust von Nervenfasern charakterisiert ist [Harding und Thomas, 1980; Dyck et al., 1993]. Für CMT1 wurden bereits Genloci identifiziert. So beruht der häufigste molekulare Subtyp CMT1A meist auf einer heterozygoten DNA-Duplikation des Genortes für das periphere Markscheidenprotein 22 (PMP22) auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p11.2) [Lupski et al., 1991; Raeymaekers et al., 1991; Patel et al., 1992; Timmerman et al., 1992; Nelis et al., 1996]. Gelegentlich geht dieser Subtyp jedoch auch mit Punktmutationen im PMP22-Gen einher [Valentijn et al., 1992; Roa et al., 1993], während CMT1B auf Mutationen im Myelinprotein 0-Gen (PO) auf Chromosom 1q22-23 zurückzuführen ist [Hayasaka et al., 1993; Nelis et al., 1994]. Hingegen zeigen CMT2 betreffende, genetische Kopplungsstudien bislang lediglich Hinweise auf Genloci der Chromosomen 1p, 3q und 7p [Othmane et al., 1993; Kwon et al., 1995; De Jonghe et al., 1997], ohne dabei jedoch das molekulargenetische Korrelat genauer verifizieren zu können. Die X-chromosomal dominant vererbte Form CMTX läßt histologisch sowohl demyelinisierende als auch axonale Aspekte erkennen [Rozear et al., 1987; Mostacciuolo et al., 1991; Hahn, 1993; Sander et al., 1998], wodurch zwangsläufig Schwierigkeiten bezüglich der Kategorisierung resultieren, falls diese einzig auf NLG-Messungen und morphologischen Auswertungen basiert. Gemäß dem gonosomalen

Vererbungsmodus neigen männliche CMTX-Patienten zu einer früher einsetzenden und schwerwiegender verlaufenden Krankheit als weibliche, wobei hiermit in der Regel auch deutlicher reduzierte NLG-Meßwerte assoziiert sind. Konduktorinnen erscheinen sogar gelegentlich vollkommen asymptomatisch, können jedoch gewöhnlich mittels elektrophysiologischer Untersuchungstechniken als Allelträgerinnen identifiziert werden [Nicholson und Nash, 1993; De Jonghe et al., 1996].

Kopplungsstudien und Mutationsanalysen belegten den ursächlichen Charakter von Connexin32 (Cx32) -Mutationen bei CMTX [Gal et al., 1985; Bergoffen et al., 1993]. Dennoch bleibt der molekulare Pathomechanismus, der den Weg einer bestimmten Cx32-Mutation zum entsprechenden Phänotyp beschreibt, noch weitestgehend unerforscht. Connexine stellen die molekularen Bausteine sogenannter „gap junctions“ dar, die inter- und intrazelluläre Kanäle ausbilden und somit den Austausch kleiner Moleküle ermöglichen [Bennett et al., 1991; Ressot et al., 1998, und hierin enthaltende Literaturhinweise]. Im peripheren Nerv läßt sich die Lokalisation von Connexin32 auf nicht kompakte Myelinanteile der Schmidt-Lanterman-Inzisuren und Paranodien begrenzen, um auf diese Weise vermutlich in erster Linie „gap junctions“ zwischen angrenzenden Myelinlamellen derselben Schwann-Zelle auszubilden [Bergoffen et al., 1993; Scherer et al., 1995]. Dies hätte einen bis zu 1000-fach verkürzten intrazellulären Diffusionsweg zur Folge [Scherer, 1997], wodurch sowohl äußere, abaxonale als auch innere, adaxonale Myelinlamellen, inklusive des Axons selbst, mit Signal- und Nährstoffen versorgt werden könnten.

Bislang entdeckte Mutationen erstrecken sich über das gesamte Protein [Bort et al., 1997; De Jonghe et al., 1997; Latour et al., 1997; Rouger et al., 1997; Silander et al., 1997]. Zusammenhänge bezüglich Struktur und Funktion verschiedener Mutationen und jeweils korrelierender klinischer Phänotypen können möglicherweise dazu beitragen, die Rolle des Proteins innerhalb des peripheren Nervensystems weiter aufzuklären. Demzufolge wird der Erforschung weiterer Connexin32-Mutationen bei Patienten mit hereditärer motorisch-sensibler Neuropathie enorme Bedeutung beigemessen. Außerdem läßt sich, wie bereits angeklungen, eine Verwechslung mit anderen CMT-Typen oftmals nicht ausschließen [Rozear et al., 1987; Hahn et al., 1990; Schiavon et al., 1996; Timmerman et al., 1996; De Jonghe et al., 1997], wenn die Diagnostik einzig und allein auf elektrophysiologischen und morphologischen Untersuchungstechniken basiert. Überdies werden Mutationen männlicher Patienten allzuleicht als sporadisch eingestuft, falls vorherige Generationen lediglich klinisch gesunde, heterozygote Konduktorinnen aufwiesen. Anhand dieser Fakten wird die Bedeutung

und Notwendigkeit einer genetischen Untersuchung erkennbar, da einzig und allein auf diese Weise die Diagnose CMTX letztendlich gesichert werden kann und von enormem Interesse bezüglich Familienplanung und Prognose, insbesondere bei weiblichen Patienten, sein dürfte. Darüberhinaus beweist die vorliegende Studie, daß Paraffin-eingebettetes Material genetische Reklassifizierungen, selbst von vor vielen Jahren nervbiopsierten Patienten, erlaubt. Auf diese Weise wird es möglich, die Diagnostik auf verstorbene Familienmitglieder auszudehnen, und so, mittels erweiterter Stammbaumanalysen, Genotyp-Phänotyp-Korrelationen ableiten zu können.

2. Hereditäre sensomotorische Neuropathien unter besonderer Beachtung der X-chromosomal dominanten Form CMTX

2.1 Historische Entwicklung

Bereits vor den in die Nosologie eingegangenen Autoren Charcot, Marie und Tooth beschrieb Virchow 1855 erstmals eine Familie „mit progressiver distaler Muskelatrophie“, welche ähnliche Merkmale aufzeigte, wie die heute als HMSN bekannte Krankheitsgruppe. Knapp 30 Jahre später, 1884, faßte Schultze die klinischen Eigenschaften der Krankheit zusammen, wobei er auf Fallbeschreibungen von Friedreich (1866) und Eichhorst (1873) zurückgriff. Diese gaben als Symptome einen kindlichen bis adoleszenten Krankheitsbeginn und eine langsam, aber progredient verlaufende distal akzentuierte Schwäche mit Muskelatrophie an. Zunächst seien die unteren, später jedoch auch die oberen Extremitäten betroffen. Weiter wurde die Krankheit durch vorwiegend motorischen, weniger sensiblen Befall und charakteristische Fußdeformitäten typisiert. Da auch weitere Familienangehörige an solchen oder ähnlichen Symptomen erkrankt waren, vermutete man bereits damals eine Erbkrankheit. 1886 beschrieben die beiden französischen Neurologen Jean-Marie Charcot und Pierre Marie das Krankheitsbild der peronealen Muskelatrophie, welches sie an fünf Kindern am Hôpital de la Salpêtrière in Paris studiert hatten. Während diese beiden die Ätiologie im Myelon suchten, vermuteten Henry Tooth, der seine Beobachtungen zur gleichen Zeit in London publizierte, und später auch Hoffmann (1891) eher eine Beeinträchtigung der peripheren Nerven selbst. In den darauffolgenden Jahren wurde bereits die Vielfalt dieser Krankheit offenbar. So beschrieben 1893 Dejerine und Sottas zwei Geschwister von offensichtlich gesunden Eltern mit einer „interstitiellen hypertrophischen Neuritis“, die sich durch einen besonders schwerwiegenden Verlauf bereits in frühester Kindheit auszeichnete. Zusätzliche Verwirrung stifteten Publikationen, wie etwa jene von Roussy und Lévy (1926), die eine gleichzeitig bestehende zentrale Beteiligung mit Ataxie, Tremor, Pyramidenbahnzeichen und Optikusatrophie postulierte. Damals wie heute sind jedoch diese beiden letztgenannten Verlaufsformen als eigenständige Krankheitsentitäten mehr als umstritten; vielmehr wird mittels dieser Fallbeispiele der enormen phänotypischen Varianz dieses Krankheitskomplexes Ausdruck verliehen. Erste Versuche einer Klassifizierung des heterogenen Krankheitsbildes unternahm Davidenkow (1927), der eine Einteilung aufgrund klinischer und genetischer

Gesichtspunkte in nicht weniger als zwölf Untergruppen vorschlug. Erst mit Einführung der Neurographie erfolgte ein weiterer Meilenstein in der Historie, denn mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungen wurde es nun möglich, CMT Typ 1 mit deutlich verlangsamten NLGs vom Typ 2 mit annähernd normalen NLGs zu differenzieren. Einer der ersten, die dieses Phänomen beschrieben, war Henriksen 1956. Eine weitere technische Erneuerung der damaligen Zeit, die Elektronenmikroskopie, ermöglichte es 1967 Thomas und Lascelles nachzuweisen, daß die beobachteten Verdickungen der Nerven auf wiederholten De- und Remyelinisierungsvorgängen beruhen, wodurch typische Zwiebelschalen-formationen, sogenannte „onion bulbs“, resultieren. 1968 faßten Dyck und Lambert die bis dato gewonnenen Erkenntnisse zusammen und erstellten eine Klassifikation der Krankheit nach klinischen, elektrophysiologischen und morphologischen Kriterien. Hiernach resultiert die hypertrophe Variante CMT1 aus einer Erkrankung der Schwann-Zellen markhaltiger Nervenfasern und weist als pathomorphologisches Korrelat die von Thomas und Lascelles beschriebenen Veränderungen auf. Die neuronale Form CMT2 hingegen beruht auf einer primären Degeneration der überwiegend distalen Anteile des Axons. Von Anfang an war die Erbllichkeit der Erkrankung diskutiert worden. So erweiterte Dyck 1975 seine Klassifikation auf insgesamt sieben Untergruppen unter besonderer Berücksichtigung des Vererbungsmodus und des klinischen Verlaufs. Während autosomal-dominante als auch autosomal-rezessive Erbgänge allgemein akzeptiert wurden, stieß ein X-chromosomal Vererbungsmodus lange Zeit bei vielen Autoren auf Ablehnung. Dennoch beschrieben bereits 1939 und 1964, Allan bzw. Woratz, zwei große Familien, die X-chromosomale Vererbung vermuten ließen.

In den letzten zehn Jahren gelang es mit Hilfe molekulargenetischer Methoden, die Ursache einiger Subtypen der Charcot-Marie-Tooth Krankheit aufzuklären und gleichzeitig eine neue Klassifikation nach genetischen Gesichtspunkten zu etablieren. Insbesondere wurde die Existenz X-chromosomaler Erbgänge, sowohl dominant als auch rezessiv, nachgewiesen. Nach heutigem Kenntnisstand weisen etwa 10-15% aller CMT-Patienten genetische Defekte des X-Chromosoms auf, was einer Inzidenz von ungefähr 1:20.000 entspricht. Somit stellt die X-chromosomal dominant vererbte Form CMTX1 den zweithäufigsten Typ der Charcot-Marie-Tooth Krankheit nach CMT1A dar.

Um einen X-chromosomalen Vererbungsmodus zu verifizieren, wurden genetische Kopplungsstudien mit dem Ziel der Kartierung des zugrundeliegenden Gens auf entsprechenden Chromosomenabschnitten durchgeführt. So grenzten Gal et al. (1985) durch erneute Untersuchung der ursprünglich von Woratz beschriebenen Familie den Genlocus auf

den Bereich zwischen Xq13 und Xq21 ein, was etwa zur gleichen Zeit von Fischbeck et al. und Beckett et al. durchgeführte Studien bestätigten. Rozear et al. (1987) belegten durch Erweiterungen des knapp 50 Jahre zuvor von Allan beschriebenen Stammbaums den strengen Charakter der Krankheit bei Männern und die sehr variabel ausgeprägte Klinik bei Frauen, die sich sowohl in schwer betroffenen als auch völlig asymptomatischen Phänotypen mit dann normalen NLGs widerspiegelt. 1990 schlossen Hahn et al. klinische, neuropathologische und elektrophysiologische Erkenntnisse in ihre Studie mit ein und betrachteten CMTX als Resultat einer primär axonalen Degeneration. Klinisch und elektrophysiologisch wurden CMTX-Patienten etwa intermediär zwischen CMT1 und 2 eingestuft. Dennoch wurde CMTX weiterhin von vielen als Subtyp einer demyelinisierenden CMT1-Form angesehen.

Nachdem 1992 das gap-junction Protein Connexin32 (Cx32) von Corcos et al. auf Chromosom Xq13.1 kartiert worden war, kam es als Kandidaten-Gen für CMTX in Betracht, so daß Bergoffen et al. kurze Zeit später Mutationsanalysen eben dieses Genlocus durchführten. Zuvor sicherten sie mit Hilfe von Northern Blots und immunhistochemischen Techniken die normale Expression von Cx32 im myelinisierten peripheren Nerv. Daraufhin durchgeführte Sequenzanalysen enthüllten Mutationen, die sämtlich in unterschiedlichen Abschnitten des Proteins lokalisiert waren, was bereits damals Spekulationen zuließ, inwieweit nicht jede Cx32-Region unentbehrlich für die korrekte Proteinfunktion im peripheren Nervensystem sei. Die Bestätigung dieser Hypothese wird zweifelsohne durch die Verteilung der bis dato über 160 entdeckten, verschiedenartigen Cx32-Mutationen erbracht.

Cx32 (Bezeichnung aufgrund des Molekulargewichts von 32 kDa) repräsentiert ein Mitglied der untereinander homologen Connexin-Familie (Abb. 1). Connexine bilden die molekularen Bestandteile inter- und intrazellulärer Kanäle, sogenannter gap junctions, die gehäuft im Bereich benachbarter Zellen lokalisiert sind, um auf diese Weise den Austausch kleiner Moleküle (<1000 Da) wie etwa Ionen, „second messengers“ oder Metaboliten zu ermöglichen [Ressot et al., 1998] (Abb. 2, 3). Das 283 Aminosäuren umfassende Protein durchzieht die Membrandoppelschicht insgesamt viermal (M1-4), wobei sowohl der Amino- als auch der Carboxy-Terminus intrazellulär lokalisiert sind, so daß drei zytoplasmatische und zwei extrazelluläre Domänen (E1/2) resultieren [Milks et al., 1988]. Sechs kreisförmig angeordnete Connexine bilden dabei sogenannte Connexone [Sosinsky, 1996; Yeager und Nicholson, 1996], welche über die jeweiligen E1- und E2-Domänen gegenüberliegende Korrelate erreichen und auf diese Weise erst den eigentlichen inter- und intrazellulären Kanal ausbilden [Bruzzone et al., 1996]. Die M3-Segmente der zusammengelagerten Connexine

kleiden diesen Tunnel aus. Hierdurch gebildete amphipathische Helix-Strukturen stellen ein gelungenes Gating-Prinzip dar. Neigung und Rotation der M3-Domänen führen zur Schließung des Kanals, indem kleine polare Gruppen aus dem Lumen heraus- und sperrige, umfangreiche Phenylalanin-Reste hineingedreht werden. Die Aminosäuresequenz, insbesondere der genannten extrazellulären und transmembranösen Abschnitte, erweist sich dabei erwartungsgemäß als hoch konserviert, was 1986 bereits Kumar und Gilula beschrieben, als sie erstmals die komplette humane cDNA identifizierten und mit dem entsprechenden Korrelat der Ratte verglichen.

Cx32 wird in einer Vielzahl von verschiedenartigen Geweben und Organen exprimiert [Bergoffen et al., 1993; Dermietzel und Spray, 1993; Lechner-Scott et al., 1995; Dermietzel et al., 1997]. So bestimmten 1995 Scherer et al. die genaue Lokalisation von Cx32 im peripheren (PNS) und zentralen (ZNS) Nervensystem. Während das Protein in myelinisierenden Schwann-Zellen in den paranodalen Myelinlamellen und Schmidt-Lanterman-Inzisuren lokalisiert ist, wird es in den Myelin-bildenden Zellen des ZNS, den Oligodendrozyten, in Zellsomata und deren Fortsätzen angetroffen. Erstaunlicherweise rufen Cx32-Mutationen jedoch scheinbar ausschließlich im PNS Krankheitssymptome hervor. Allerdings postulierten 1996 Nicholson und Corbett auch eine zentrale Beteiligung bei CMTX-Patienten, indem sie Verzögerungen akustisch evozierter Hirnstamm-Potentiale (BAERs) nachwiesen. Weitere Funktionseinschränkungen jenseits des PNS vermuteten Nelles et al. in deutlich verminderten Werten sympathogener Glukose-Freisetzung aus hepatischen Glykogen-Speichern Cx32-defizienter Mäuse. Entsprechende Befunddaten oder gar Leberschäden konnten jedoch beim Menschen bisher in keinster Weise mit CMTX assoziiert werden. Warum gerade myelinisierende Schwann-Zellen besondere Empfindlichkeit gegenüber Cx32-Mutationen offenbaren, bedarf weiterer Klärung.

Ebenfalls ungeklärt bleibt bislang die Frage der genauen Pathogenese bei CMTX. Mehrere Transfektionsversuche u.a. mit *Xenopus* Oocyten und HeLa Zellkulturen [Bruzzone et al., 1994; Rabadan-Diehl et al., 1994; Omori et al., 1996; Oh et al., 1997; Cao et al., 1998; Ressot et al., 1998] verdeutlichten, daß Cx32-Mutationen zwei voneinander distinkte Funktionsmuster entfalten. Zum einen der erwartungsgemäße Verlust jeglicher gap junction-Aktivität, auf der anderen Seite jedoch Mutationen, die scheinbar keinerlei Funktionseinbußen offenbaren, obgleich Ressot et al. Unterschiede bezüglich Sensitivität und Kinetik gegenüber Cx32-Wildtyp-Proteinen ausmachen konnten. Daher scheint diesen, auf den ersten Blick funktionstüchtigen CMTX-Mutationen, ein subtilerer Pathomechanismus zugrunde zu liegen,

als lediglich ein einfacher Funktionsverlust. So beschrieben z.B. Oh et al. zwei Cx32-Mutationen, denen eine reduzierte gap junction-Permeabilität gemeinsam war; im einen Fall durch Reduktion der maximal zulässigen Molekülgröße, im anderen durch verminderte Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals bedingt. Ein anderer möglicher Pathomechanismus liegt darin begründet, daß bei neugebildeten Cx32-Proteinen entweder der Transport zur Zellmembran hin [Bone et al., 1997] oder aber der Einbau [Yoshimura et al., 1998] in diese nicht ordnungsgemäß verläuft. Daraufhin vermuteten Deschenes et al. (1997) eventuell auftretende toxische Effekte durch cytoplasmatische Akkumulation von Cx32.

Im Tiermodell [Anzini et al., 1997; Scherer et al., 1998] zeigte sich, daß Cx32-defiziente Mäuse eine erst spät einsetzende, jedoch progrediente und rein demyelinisierende periphere Neuropathie entwickeln und demzufolge morphologische Merkmale wie Zwiebschalenformationen oder abnorm dünne Myelinisierungen erkennen ließen, die auf wiederholte De- und Remyelinisierungsprozesse hindeuten. Aufgrund der protrahierten Krankheitsmanifestation darf hierbei spekuliert werden, daß der axonale Transport ausreicht, um auch die peripheren Anteile der kurzen Axone kleiner Lebewesen mit Nährstoffen zu versorgen, so daß diese eine vermutlich geringere Empfindlichkeit gegenüber gestörten Diffusionsvorgängen offenbaren als die wesentlich längeren Axone des Menschen. Überdies fiel auf, daß sich die weniger kompakten Anteile des Myelins, wie etwa periaxonale Verdickungen, ungewöhnlich aufgetrieben darstellten. Dagegen wichen elektrophysiologische Untersuchungsdaten nur unwesentlich von denen des Wildtyps ab, was hervorragend mit einem normal erscheinenden Phänotyp und keinerlei Anzeichen von Muskelschwäche in Einklang zu bringen war. Die im Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse lassen jedoch sicherlich nur bedingt Rückschlüsse auf den Menschen zu, da neben den bereits erwähnten Differenzen bezüglich der Axonlängen sicherlich auch der uniforme genetische Hintergrund des Tiermodells eine nicht unerhebliche Diskrepanz darstellt.

Dominant vererbte Krankheiten, wie CMTX1, korrelieren in aller Regel mit Strukturprotein-Defekten. Es zeichnet sich jedoch in jüngster Vergangenheit immer deutlicher ab, daß der Phänotyp einer hereditären sensomotorischen Neuropathie nicht ausschließlich durch Mutationen in für Strukturproteine kodierenden Genen ausgelöst wird, sondern ebenfalls Defekte regulatorischer Elemente, wie etwa Promoter-Sequenz [Ionasescu et al., 1996a] oder Transkriptionsfaktoren (EGR2, Pax-3 oder Oct-6) [Scherer, 1997; Jessen und Mirsky, 1998; Warner et al., 1998], eine Rolle spielen.

2.2 Klinisches Erscheinungsbild

Eine Trennung einzelner CMT-Subtypen, rein nach klinischen Kriterien, erweist sich als schlichtweg unmöglich, da die Leitsymptome in allen Untergruppen weitestgehend übereinstimmen. Hinweise auf CMTX liefern allenfalls typische Charakteristika eines X-chromosomalen Erbgangs. So übertragen Männer ihr erkranktes Gen niemals auf männliche Nachkommen, während ihre Töchter stets obligate Allelträgerinnen sind. Frauen dagegen vererben die Krankheit statistisch betrachtet an 50% ihres Nachwuchses, unabhängig des Geschlechts. Die Penetranz beträgt nahezu 100%. Die bei CMTX-Patientinnen zu postulierende Lyon-Hypothese impliziert einen sowohl ausgeprägteren als auch frühzeitiger auftretenden klinischen Phänotyp bei männlichen Allelträgern, obwohl erhebliche Varianz diesbezüglich zu beobachten ist. Meist manifestiert sich die zunächst blande verlaufende, symmetrische, distal betonte Muskelatrophie und -schwäche innerhalb der ersten beiden Lebensdekaden. Die Atrophie nimmt dabei ihren Ursprung in den intrinsischen Fußmuskeln, um sich allmählich auf die Unterschenkelmuskulatur auszubreiten. Hierdurch entsteht das klinische Bild sogenannter „Storchenbeine“ (Abb. 4 d). Überdies führen Muskelschwächen und hieraus resultierende Muskelungleichgewichte zum typischen Steppergang und deutlichen Fußdeformitäten mit Hammerzehenbildung und Hohlfuß (Abb. 4 b, c). Selten verläuft die Erkrankung so dramatisch, daß der Patient rollstuhlabhängig wird. Ein relativ frühes und konstantes Merkmal bei CMTX stellt der Übergriff der Muskelschwäche auf Thenar- und intrinsische Handmuskeln dar. Hierdurch erfahren die Patienten eine Einschränkung ihrer Geschicklichkeit und die Ausbildung einer mit häufigen Krämpfen assoziierten, jedoch meist reversiblen Krallenhand (Abb. 4 a). In nahezu allen Fällen zeigen sich die Muskeleigenreflexe der unteren Extremität stark abgeschwächt oder erloschen. Zudem fallen Sensibilitätsstörungen in Form einer distal akzentuierten, „strumpf- oder handschuhförmig begrenzten“ Herabsetzung der Empfindung für die Qualitäten Propriozeption, Berührung und Vibration, insbesondere bei kaltem Wetter, auf. Hierauf sind im wesentlichen auch die häufig zu beobachtenden Stand- und Gangunsicherheiten zurückzuführen, die mit Hilfe des Romberg-Tests bzw. Unterberger-Tretversuchs objektiviert werden können. Gelegentlich treten trophische Störungen auf, welche jedoch nur in Einzelfällen Ulzerationen zur Folge haben. Weitere seltene Merkmale stellen eine aufgrund einer Beeinträchtigung der Rückenmuskulatur zu Tage tretende Skoliose und Atemstörungen infolge einer Affektion des N. phrenicus und daraus resultierender Zwerchfellschwäche dar. Vereinzelt zu beobachtende

Beteiligungen kranialer oder autonomer Nerven komplettieren schließlich das äußerst variabel erscheinende klinische Bild.

2.3 Elektrophysiologische Diagnostik

Die Neurographie stellt ein perfektes Abbild der bei CMTX zu beobachtenden Heterogenität dar. Zum einen erinnern signifikant verlangsamte NLGs motorischer und sensibler Nerven bei männlichen CMTX-Patienten an CMT1. Andererseits bringen gleiche Untersuchungen bei Frauen meist normale oder lediglich geringgradig verzögerte Meßwerte zum Vorschein, so daß aufgrund der elektrophysiologischen Daten hierbei zweifelsohne von einem Typ 2 auszugehen wäre. Sensible und motorische Summenaktionspotentiale lassen bei beiden Geschlechtern stark erniedrigte oder gar fehlende Amplituden erkennen [Rozeau et al., 1987; Hahn et al., 1990; Hahn, 1993]. Im Elektromyogramm finden sich oftmals Zeichen neurogenen Umbaus sowie Faszikulationen und pseudomyotone Entladungen [Hoogendijk und de Visser, 1991]. Somit suggerieren all diese Veränderungen eher eine primär axonale Degeneration mit distalen motorischen und sensorischen Faserverlusten als einen primär demyelinisierenden Prozeß.

2.4 Morphologie

Morphologische Charakteristika ähneln ebenfalls eher einem primär axonalen Geschehen, bei dem demyelinisierende Anzeichen erst sekundär nachzuweisen sind [Hahn et al., 1990; Hahn, 1993]. So offenbaren Nervenbiopsie-Querschnitte einen progredienten Ausfall insbesondere großkalibriger, myelinisierter Fasern, begleitet von reichlich Gruppen regenerierter Nervenfasern. Diese dünn myelinisierten, regenerativen Axone bilden typische Gruppierungen und werden von konzentrisch angeordneten Schwann-Zellfortsätzen umgeben, so daß sie letztendlich Zwiebelschalenformationen ähneln. Darüberhinaus lassen sich Büngnersche Bänder und strukturelle Veränderungen axonaler Komponenten als Zeichen chronischen Faserverlustes darstellen.

Morphometrische Analysen belegen einen chronischen, kontinuierlich fortschreitenden Nervenfaserverlust. So veranschaulichen Faserhistogramme den vorwiegenden Ausfall großer

myelinisierter Nervenfasern bei gleichzeitiger Zunahme kleinerer Faserkaliber, wobei letzteres die bedeutende Anzahl dünn myelinisierter Regenerate widerspiegelt.

Demzufolge lassen morphologische Befunde letztlich einen chronisch progressiven, axonalen Degenerationsprozeß und Faserverlust mit üppigen Regenerationstendenzen vermuten.

Nur einige wenige Autoren stellen eher demyelinisierende Veränderungen wie Zwiebelschalenformationen oder abnorm dünn myelinisierte Axone in den Vordergrund und sehen diese morphologischen Merkmale in wiederholten De- und Remyelinisierungsvorgängen begründet [Rozear et al., 1987; Mostacciuolo et al., 1991].

2.5 Differentialdiagnosen

Die differentialdiagnostische Abgrenzung einer hereditären sensomotorischen Neuropathie gegenüber anderen Erbkrankheiten oder erworbenen Polyneuropathien erscheint insofern von besonderem Interesse, als es darum geht dem Patienten frühzeitig die für ihn geeignete, der untereinander doch sehr heterogenen Therapieformen angedeihen zu lassen. Dennoch gelingt in etwa 10-20 Prozent aller klinisch und elektrophysiologisch diagnostizierten Polyneuropathien keine ätiologische Zuordnung.

Liegt elektrophysiologisch eine axonale Neuropathie vor, müssen, insbesondere bei negativer Familienanamnese, eine Vielzahl metabolischer und toxischer, selten auch entzündliche Ursachen des Krankheitsbildes ausgeschlossen werden. Die häufigsten Formen stellen diabetische und alkoholische Polyneuropathien dar. Darüberhinaus ist sicherlich die Differentialdiagnose einer chronisch-progredienten spinalen Muskelatrophie mit distaler Myotrophie zu erwägen [Harding u. Thomas, 1980].

Liegt hingegen eine demyelinisierende Neuropathie vor, muß neben CMT1 auch eine erworbene, immunologisch bedingte Störung in Erwägung gezogen werden. Befinden sich alle Blutparameter im Normbereich, ist als weiteres der Liquor cerebrospinalis auf erhöhtes Eiweiß, IgG oder oligoklonale Banden hin zu untersuchen. Diese Differenzierung erscheint gerade deshalb von besonderem Interesse, da Patienten mit „Chronisch Inflammatorischer Demyelinisierender Polyneuropathie“ (CIDP) von einer immunsuppressiven Therapie profitieren [Gabreëls-Festen et al., 1993], während diese bei sämtlichen anderen peripheren Neuropathien relativ kontraindiziert ist.

Darüberhinaus stellen Friedreich-Ataxie, funikuläre Myelose und paraneoplastisches Syndrom weitere obligate Differentialdiagnosen dar.

Eine Nervenbiopsie scheint etwa bei Verdacht auf vaskulitische Neuropathie, Amyloidose oder Speichererkrankungen indiziert. In den übrigen Fällen sollte zunächst angestrebt werden, eine ausreichende Klärung mittels weniger invasiver Methoden, insbesondere der DNA-Analyse, herbeizuführen.

2.6 Therapie und Prognose

Eine spezifische Beratung im Anschluß an die molekulargenetische Diagnose erscheint essentiell. In einer solchen sollten die möglichen Krankheitsverläufe und, da bislang nicht kausal therapierbar, die Möglichkeiten supportiver Maßnahmen besprochen werden [Cowen et al., 1993; Bach, 1995; Molenaar et al., 1995; Njegovan et al., 1997; Wicklein et al., 1997].

So läßt sich der Nutzen orthopädischer Hilfsmittel, wie etwa Einlagen, speziell angefertigter Schuhe oder Peroneusschienen, für die Verbesserung der Stand- und Gangstabilität im Einzelfall gut abschätzen. Dagegen erscheint die Evaluierung operativer Therapieansätze ungemein schwierig. Denn oftmals erbringen diese Methoden lediglich temporäre Besserung und letztendlich nicht den erhofften Benefit. Solch mögliche Operationsverfahren bei CMT-Patienten beinhalten insbesondere Achillessehnenverlängerung, Sehnentransplantationen, Sprunggelenksarthrodesen und Osteotomien. Ebenfalls kritisch zu prüfen ist die Verordnung von Medikamenten. Hierbei sind leicht wirkende Analgetika und krampflindernde Substanzen zweifelsohne gerechtfertigt, während der Einsatz sogenannter „neurotropher“ Substanzen (α -Liponsäure / Vitamin-B12-Präparate) in Frage gestellt werden muß, da für sie ein therapeutischer Effekt auf die sensomotorischen Defizite bei hereditären Neuropathien ohne bekannten Stoffwechseldefekt bislang nicht belegt werden konnte. Die Suche nach alternativen Heilmethoden sollte als Indiz für den Leidensdruck vieler Patienten angesehen werden. Gleichzeitig spiegelt sie die Grenzen oder auch Unzulänglichkeiten der Schulmedizin für CMT-Patienten wider. Fraglos empfohlen werden kann eine kontinuierlich durchgeführte, stabilisierende Physiotherapie, wobei diese in erster Linie dosierte Kräftigungs- und Dehnungsübungen, insbesondere zur Vermeidung von Kontrakturen, beinhalten sollte. Überdies scheinen gemäßigte sportliche Aktivität und physikalische Therapieformen einigen Patienten Linderung zu verschaffen. Bei Bedarf können

Skoliosebehandlung und Atemgymnastik zur Anwendung gelangen. Einen weiteren wichtigen Aspekt der Patientenberatung stellt in vielen Fällen die Berufswahl bzw. -ausübung dar. Hierbei kann eine frühzeitige genetische Diagnostik wesentlich dazu beitragen, den relativ hohen Prozentsatz Umschulender und Frührentner zu reduzieren.

3. Patientenkollektiv

Für die vorliegende Studie wurden 45 der im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Aachen auf der Grundlage klinischer, elektrophysiologischer und morphologischer Befunde als CMT kodierten Fälle ausgewählt. Hierbei lautete in 30 Fällen die ursprüngliche Diagnose axonale CMT, wohingegen die übrigen 15 Fälle eher einem intermediären Typ mit sowohl axonalen als auch demyelinisierenden Komponenten glichen. Nachdem eine PMP22-Duplikation auf 17p11.2 mittels eines semiquantitativen PCR-Ansatzes ausgeschlossen werden konnte [Schröder, 1997; Thiex und Schröder, 1998], waren insgesamt folgende Kriterien zu erfüllen: (1) morphologische und klinische Befunde ließen sich mit einer Neuropathie vom axonalen bzw. intermediären Typ vereinbaren, (2) die NLGs zeigten lediglich mäßiggradige Verlangsamung, und schließlich (3) konnte ein X-chromosomaler Erbgang zumindest anhand der vorliegenden Familienanamnese nicht ausgeschlossen werden.

Daraufhin wurde zum Zweck einer Mutationsanalyse des Cx32-Gens DNA aus archivierten, Paraffin-eingebetteten Suralnervenbiopsien isoliert und hiernach PCR-SSCP-Untersuchungsmethoden durchgeführt. Auffällige SSCP-Laufmuster wurden sowohl einer automatisierten DNA-Sequenzierung als auch einem Restriktionsverdau unterzogen. Bei als Allelträger identifizierten Personen wurde die Untersuchung weiterer Familienmitglieder angestrebt, um anhand ihrer Blutprobe mittels Restriktionsverdau die entsprechende Mutation entweder auszuschließen oder aber auch bei ihnen nachzuweisen. Zur internen Kontrolle diente Leukozyten-DNA von 20 Patienten, inklusive derer mit später gesicherter Cx32-Mutation. Überdies wurden Polymorphismen durch die Untersuchung von insgesamt 78 Chromosomen (28 Frauen/ 22 Männer) gesunder, nicht verwandter Personen ausgeschlossen.

4. Untersuchungsgut

Zur Untersuchung gelangende Suralnerven- und in Kombination damit häufig auch Muskelbiopsien wurden jeweils zu einem Teil in 4%iger Formalinlösung und zu einem anderen in 3%igem Glutaraldehyd mit 0,1 M Phosphatpuffer nach SØRENSEN fixiert [Schröder, 1984; Schröder, 1998]. Die Einbettung der fixierten Präparate in Paraffin erfolgte nach Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe und einem Xylolbad.

45 der auf diese Weise präparierten Suralnervenbiopsien wurden in dieser Studie molekulargenetisch untersucht. Die lichtmikroskopische Beurteilung erfolgte an Semidünnschnitten dieser Suralnervenbiopsien. Dazu wurden die mit Glutaraldehyd-fixierten Abschnitte in einer 2%igen phosphatgepufferten Osmiumtetroxidlösung mit 0,1 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN) nachfixiert, bevor sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und in Epoxydharz eingebettet wurden. Hieraus wurden ca. 1,0 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, die mit Paraphenylendiamin und Toluidinblau gefärbt wurden.

5. Methoden

5.1 Molekulargenetische Untersuchungsmethoden

5.1.1 DNA-Extraktion aus Paraffin-eingebetteten Formalin- oder Glutaraldehyd-fixierten Suralnervenbiopsien

Aus den Paraffinblöcken wurden gemäß der jeweiligen Präparatgröße 5-10 10 µm dicke Schnitte angefertigt, so daß etwa 25 mg Gewebe je Probe resultierte. Zunächst wurde überschüssiges, störendes Paraffin zum einen mittels eines sterilen Skalpells und zum anderen durch zweimalige Versetzung der Proben mit je 1000 µl Xylol entfernt. Um das deparaffinierte Pellet von Xylolrückständen zu befreien, wurden die Proben zweimal mit 1000 µl absolutem Ethanol gewaschen. Die Verdunstung des restlichen Alkohols erfolgte durch Trocknung des Gewebes für ca. 30 Minuten unter dem Abzug. Anschließend wurde die Probe mit Proteinase K (Boehringer, Mannheim), einer Endopeptidase zur Elimination störender Proteine, in einer Konzentration von 2 mg/ml in 50 mM Tris, pH 8,5, 1 mM EDTA und 0,5% Tween 20 bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Hiernach wurden aufeinanderfolgend jeweils gleiche Volumina Phenol, eine 1:1 Mischung aus Phenol und Chloroform [24:1 (V/V) Chloroform: Isoamylalkohol] und schließlich reines Chloroform zur Beseitigung proteinhaltiger Störpartikel hinzugegeben. Bevor das Präzipitat zur Entfernung von Salzen oder sonstigen Verunreinigungen mit 70%igem Ethanol gewaschen werden konnte, hatte die Zugabe eines 2,5fachen Volumens 100%igen Ethanols und einem 0,1fachen Volumen 3 M Natriumacetats (pH 5,2) zu erfolgen. Abschließend wurde das Pellet je nach Quantität in 0,5-1 ml TE-Puffer gelöst und bei -20°C bis zum Einsatz in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aufbewahrt.

5.1.2 DNA-Extraktion aus Leukozyten

Je 10 ml EDTA-Blut gelangten zur Einsendung. Bis zur DNA-Extraktion wurden die Proben bei 4°C gelagert, wobei jedoch die Weiterverarbeitung innerhalb der nächsten 24 Stunden anzustreben war. Zunächst wurde das Volumen mittels eines Lyse-Puffers (NH₄Cl 154 mM,

KHCO₃ 9,2 mM, EDTA 2 mM) auf etwa 30 ml gebracht, um störende Erythrozyten zu lysieren. Nach 10minütigem Verweilen der Probe auf Eis, wurde diese zur Abtrennung der Zellkerne für neuerliche 10 Minuten mit 2000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis lediglich ein klares, weißes Pellet übrig blieb, das keinerlei Spuren später womöglich die PCR inhibierender Hämoglobin-Moleküle aufwies. Daraufhin wurde das Pellet mittels vorsichtigen Vortexens in 1,5 ml NaCl/EDTA-Puffer (75 mM/25 mM), 75 µl 20%igen SDS und 15 µl einer Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) aufgelöst und über Nacht bei 37°C inkubiert. Somit erfolgte erst am darauffolgenden Tag die Zugabe eines gleichen Volumens einer äquimolaren Phenol/Chloroform-Mischung. Nach Zentrifugation mit 2000 U/min bei Raumtemperatur wurde der Überstand mit gleichem Volumen einer 24:1 (V/V) Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol versetzt. Hierauf wurde nach Wiederholung des Zentrifugationsschrittes der Überstand mit 0,1fachem Volumen 3 M Natriumacetats (pH 5,2) und zweifachem Volumen kalten, absoluten Ethanol durchmischt. Die Isolierung des daraufhin sichtbaren „DNA-Knäuels“ gelang mittels eines sterilen Glasstabes problemlos. Ein kurzzeitiger Reinigungsvorgang mit 70%igem Ethanol ging der abschließenden Lösung des Präzipitats in 2 ml TE-Puffer voraus. Auch hierbei erfolgte die Aufbewahrung der DNA bis zum Einsatz in der PCR bei -20°C. Zuvor wurde jedoch bei beiden Extraktionsmethoden die jeweilige Konzentration der gewonnenen DNA durch Elektrophorese auf 1%igen Agarose-Gelen abgeschätzt.

5.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) stellt eine *in vitro*-Methode dar, mit deren Hilfe DNA-Teilabschnitte mit bekannten flankierenden Sequenzen so häufig vervielfältigt werden können, daß sie mittels einfacher molekularbiologischer Nachweismethoden detektierbar sind [Mullis et al., 1986; Taylor, 1991]. In Verbindung mit der Anwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase wurde sie erstmals von Saiki et al. (1988) beschrieben und erfuhr seit dieser Zeit unzählige Modifikationen zur Anpassung an die verschiedensten Spezialaufgaben. In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR nicht nur zur Amplifikation der kodierenden Connexin32-Sequenz, sondern auch zur Generierung von Ziel-DNA zum Zweck der DNA-Sequenzierung verwendet.

Zunächst ist es notwendig, zwei rund 20 Basenpaare (bp) umfassende Oligonukleotid-Primer je DNA-Teilamplifikat synthetisch herzustellen. Bei der Auswahl entsprechender Primer ist darauf zu achten, daß diese sich möglichst nur an die ihnen komplementären Sequenzen auf der Ziel-DNA anlagern können, sprich ein Primer am 3'- und der andere am 5'-Ende, um auf diese Weise unspezifische Vermehrungen zu verhindern. Durch den Abstand zwischen den beiden Primern wird die Größe des Amplifikats definiert, da nur der hiervon eingeschlossene Bereich vervollständigt wird. Der erste eigentliche Schritt der PCR besteht nun darin, die doppelsträngige DNA bei 94°C in Einzelstränge zu denaturieren. Mittels einer Temperatursenkung auf etwa 50-65°C erfolgt die Anlagerung der Primer, das sogenannte Annealing. Dabei binden die Primer an beiden Strängen am 5'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs und bilden mit ihren freiliegenden 3'-Enden den Startpunkt für die Polymerase. Diese füllt bei 72°C die komplementären Nukleotide auf und synthetisiert so die identischen Tochterstränge, ein Vorgang, der als Extension bezeichnet wird. Im darauffolgenden Schritt der Denaturierung werden die Doppelstränge bei 94°C wiederum getrennt. Das Prinzip der PCR beruht darauf, daß in den ersten Reaktionszyklen synthetisierte Amplifikate in den folgenden Zyklen ihrerseits als Matrize dienen. Die Vorgänge Denaturierung, Primerannealing und Extension stellen in ihrer Gesamtheit einen PCR-Zyklus dar. Dabei verdoppelt sich die Menge amplifizierter DNA mit jedem Zyklus, womit die Reaktion folglich exponentiell verläuft.

Das Cx32-Gen umfaßt 2 Exone, wobei das zweite die komplette, 283 Aminosäuren aufweisende kodierende Sequenz beinhaltet [Kumar und Gilula, 1986; Miller et al., 1988; Ionasescu et al., 1996a]. In der vorliegenden Studie wurden vier überlappende DNA Segmente amplifiziert, die den gesamten translatierten Genbereich abdeckten. Folgende Nukleotidsequenzen lagen den Primerpaaren zugrunde:

Primerpaar 1: 1F 5'- **TGAGGCAGGATGAACTGGACAGG** -3'
 1R 5'- **TTGCTGGTGAGCCACGTGCATGG** -3'

Primerpaar 2: 2F 5'- **ATCTCCCATGTGCGGCTGTGGTCC** -3'
 2R 5'- **CACTTGACCAGCCGCACCAT** -3'

Primerpaar 3: 3F 5'- **GCAACACATAGAGAAGAAAATGCTA** -3'
 3R 5'- **CCGGATGATGAGGTACACCACCTC** -3'

Primerpaar 4: 4F 5'- **CGTCTTCATGCTAGCTGCCTCTGG** -3'
4R 5'- **TGGCAGGTTGCCTGGTATGT** -3'

Die Amplifikation der verschiedenen Fragmente wurde getrennt voneinander in jeweils 50 µl umfassenden Ansätzen durchgeführt. Diese enthielten je 150 ng genomische DNA, 5 µl 10 x Taq Puffer (500 mM KCl, 100 mM TRIS-HCl pH 8,3, und 0,01% Gelatine), 100 µM jedes Deoxynukleotids, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 U Taq DNA Polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.), 25 pmol des betreffenden Primerpaares und schließlich aqua bidest. ad 50 µl. Jeder Reaktionsansatz wurde initial für sieben Minuten bei 94°C denaturiert und daraufhin 40 PCR-Zyklen unterzogen, wobei jeder Zyklus sich aus einer thermischen Denaturierung bei 94°C für eine Minute, dem ebenfalls einminütigen Primerannealing bei 62°C und letztlich der Extension bei 72°C für die Dauer von zwei Minuten zusammensetzte. Die *Taq*-Polymerase stellt ein hitzestabiles Enzym aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* dar und besitzt unter den gewählten Bedingungen die Prozessivität eines Einbaus von 1500-3000 Nukleotiden in den wachsenden DNA-Strang pro Minute. Dem letzten Zyklus folgte ein finaler Elongationsschritt bei 72°C für zehn Minuten, um eventuell bislang unvollständig synthetisierte Fragmente an ihren Enden aufzufüllen. Danach wurde das PCR-Produkt auf 4°C abgekühlt und konnte bei dieser Temperatur über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden.

Jeder PCR-Ansatz enthielt zusätzlich jeweils eine lediglich mit Wasser gefüllte Negativkontrolle zum Nachweis einer möglichen Kontamination der Proben und somit falschen positiven PCR-Ergebnissen.

5.1.4 Elektrophorese der Amplifikationsprodukte auf Agarosegelen

5 µl des PCR-Produktes wurden auf einem 2%igen Agarosegel in 1 x TBE-Puffer bei 60 Volt (V) für 45 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe des Molekulargewicht-Standards pGEM-DNA-Marker (Promega, Madison, Wisconsin, USA), der neben den Testproben aufgetragen wurde, gelang es, die Größe der Amplifikationsprodukte zu bestätigen. Nach Färbung mit Ethidiumbromid konnten die jeweiligen Banden unter UV-Transillumination sichtbar gemacht werden.

5.1.5 SSCP-Elektrophorese zum Nachweis von Punktmutationen

Doppelsträngige DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld hauptsächlich in Abhängigkeit von ihrer Größe und nur teilweise in Abhängigkeit von ihren Basensequenzen [Orita et al., 1989]. Will man nun aber geringfügige Sequenzunterschiede, wie z.B. Punktmutationen, in der Elektrophorese sichtbar werden lassen, gelangt als probates Screening-Verfahren die sogenannte SSCP-Methode (engl.: single-strand conformation polymorphism) zur Anwendung. Hierbei werden 8 µl des jeweiligen PCR-Produktes mit einem gleichen Volumen Formamid-Puffer (95% Formamid, 10 mM NaOH, jeweils 0,05% Bromphenolblau und Xylen-Cyanol) versetzt, fünf Minuten auf 95°C erhitzt, in einem Eisbad abgeschreckt und sofort der nativen, nicht denaturierenden Gelelektrophorese (ohne Harnstoff!) zugeführt. Die Einzelstränge dürfen sich dabei nicht wieder zu Doppelsträngen zusammenlagern. Einzelstrang-DNA besitzt im Gegensatz zur Doppelstrang-DNA unterschiedliche, von ihrer jeweiligen Basensequenz abhängige, räumliche Anordnungen (Conformations). Diese verschiedenen Conformations gilt es elektrophoretisch darzustellen (Abb. 5). Dies gelingt nur in einer nativen Elektrophorese, da in Gegenwart von Harnstoff gleichartige, denaturierte Strukturen vorliegen.

In der vorliegenden Studie wurden die Abschnitte 1 und 2 auf einem 7%igen Acrylamid-Gel (Acrylamid:Bis-Acrylamid 37,5:1) mit 5% Glycerol bei 350 V für 19 Stunden und auf einem 1 x HydroLink MDE-Gel (FMC Bioproducts, Rockland, Me.) bei 15 Watt für 20 Stunden getestet. Dagegen erfuhren die PCR-Produkte der Abschnitte 3 und 4 die elektrophoretische Auftrennung auf einem 10%igen Acrylamid-Gel (Acrylamid:Bis-Acrylamid 37,5:1) bei 450 V für 19 Stunden und auf einem 1 x HydroLink MDE-Gel bei 15 Watt für einen Zeitraum von 20 Stunden. Proben von Patienten mit den folgenden Cx32-Mutationen wurden dabei als Positivkontrollen verwendet: Arg15Trp, Leu81Phe, Tyr135Cys, Arg142Trp (freundlicherweise überlassen von Prof. A. Gal und Dr. U. Orth, Hamburg, Deutschland) und Ser281stop (freundlicherweise überlassen von Prof. J. J. Martin, Antwerpen, Belgien).

Anschließend wurde das Gel zur Darstellung der Banden silbergefärbt. Hierzu wurde es zunächst zehn Minuten mittels 1%iger Salpetersäure fixiert, um danach zwanzig Minuten in 0,2%iger Silbernitrat-Lösung gefärbt zu werden. Nach zweimaligem, gründlichem Abspülen mit Aqua bidest. schloß sich ein Entwicklungsschritt mit 0,28 M Natriumcarbonat-/0,037%iger Formaldehyd-Mischung an, wobei die Lösung zwei- bis dreimal zu wechseln

war. Erschien die Intensität der Banden als ausreichend, wurde dieser Vorgang mittels 10%iger Essigsäure gestoppt. Nach wiederholtem Spülen wurde das Gel schließlich zehn Minuten mit 5%iger Glycerin-Lösung imprägniert.

5.1.6 Automatisierte DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der DNA wurde nach dem von Sanger et al. (1977) eingeführten Kettenabbruchprinzip unter Verwendung von Dideoxynukleotiden (ddNTPs) durchgeführt. Im Gegensatz zur konventionellen, radioaktiven Methode, bei der insgesamt vier Reaktionsgefäße für jedes einzelne ddNTP benötigt werden, erfordert die automatische, nicht-radioaktive Sequenzierung nur ein einziges Gefäß, da die Detektion der Sequenzierungsprodukte auf dem Einbau von vier verschiedenartig fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotiden (sog. Dye-Terminatoren) am 3'-Ende beruht. Neben der Eingefäßreaktion wird auf diese Weise durch die verschiedenfarbige Fluoreszenzmarkierung auch eine Einspur-Gelelektrophorese (durchgeführt mit dem 373A-DNA-Sequencer, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) ermöglicht. Als Enzym für die Sequenzierung dient die *Taq*-Polymerase, die bereits im „Premix“ (PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) enthalten ist und im Vergleich zur T7-Polymerase (Sequenase) lediglich geringe Mengen an DNA erfordert. Die Auftrennung der Sequenzierungsprodukte erfolgt in 7%igen Harnstoff-Polyacrylamidgelen. Sowohl bei der Anfertigung des Sequenzierungsgels, als auch bei der Aufbereitung der Proben, muß peinlichst darauf geachtet werden, daß keine der verwendeten Substanzen, inklusive der Waschmittel für die Glasplatten und des Wassers zum Ansetzen der Puffer oder des Gels, fluoreszierende Substanzen enthält. Die Sequenzierungsprodukte werden während des senkrechten Laufs im Gel mit Hilfe eines Lasers, geeigneter Filter und eines „Photomultipliers“ detektiert. Die Fluoreszenzmeßwerte werden direkt während des Laufs von einem Geräte-immanenten Computer in Sequenzdaten umgewandelt. Diese müssen allerdings im Anschluß an den Lauf, aufgrund der hohen Sensitivität der Methode und daraus resultierenden, vom Computer nicht auflösbaren Sequenz-Zweideutigkeiten, durch visuellen Abgleich zum ebenfalls aufgezeichneten Chromatogramm editiert werden.

Der Erfolg der Sequenzierung hängt unmittelbar von der Reinheit der eingesetzten DNA ab. Daher wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits (QIAGEN,

Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Hierzu wurde zunächst die gewünschte DNA-Bande mittels eines sterilen Skalpells aus einem 2%igen Agarosegel herausgeschnitten, um daraufhin mit drei Volumina des QX1-Puffers und 20 µl einer QIAEX II-Lösung bei 50°C für zehn Minuten inkubiert zu werden. Dies diente zum einen dem Zweck, störende Agarose aufzulösen und zum anderen, die Adsorption der DNA an QIAEX II-Partikel zu gewährleisten. Hiernach wurde die Probe für 30 Sekunden zentrifugiert, so daß der Überstand abpipettiert werden konnte. Daraufhin wurde das Pellet zur Entfernung restlicher Agarose mit 500 µl QX1-Puffer durchmischt. Nach Wiederholung des Zentrifugationsschrittes und Abnahme des Überstandes wusch man das resultierende Pellet zweimal mit 500 µl PE-Puffer, um noch vorhandene Salz-Kontaminationen zu beseitigen. Anschließend wurden die Proben für etwa 30 Minuten unter dem Abzug getrocknet. War dies geschehen, löste man das Pellet nochmals in 20 µl Aqua bidest. auf, um letztlich nach zehnminütiger Inkubationszeit bei 50°C und erneutem Zentrifugationsschritt als Überstand das aufgereinigte PCR-Produkt gewinnen zu können. 2 µl dieses DNA-Extraktes wurden anschließend auf einem dünnen, 2%igen Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des DNA-Standards Bio Marker Low (Eurogentec, Seraing, Belgien) quantifiziert, wobei grundsätzlich jede Bande des Standards einer DNA-Menge von 50 ng entspricht. Daraufhin wurde die Menge des aufgereinigten Amplifikationsproduktes so gewählt, daß etwa 100-200 ng in der sich anschließenden „Cycle Sequencing“-Reaktion eingesetzt wurden.

Die in der SSCP verwendeten Primer kamen ebenfalls in der Sequenzierung zum Einsatz, so daß die entsprechenden Fragmente sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung gelesen wurden. Der Sequenzierungsansatz enthielt die entsprechende Menge an DNA (wie oben angegeben), 4 pmol Primer, 8 µl „Premix“ und aqua ad injectionem ad 20 µl. Nachdem der programmierbare Thermoheizblock auf 96°C vorgewärmt worden war, wurden die Proben nach einminütiger Denaturierung folgendem Amplifikationsprogramm mit 25 Zyklen unterzogen:

Denaturierung: 30 Sekunden bei 96°C,
Primerannealing: 30 Sekunden bei 50°C,
Extension: 4 Minuten bei 60°C.

Nach Ablauf des Programmes wurde der Block auf 4°C abgekühlt, woraufhin die Proben nachfolgend beschriebene Aufbereitung erfuhren.

Hierbei wurde die DNA zunächst durch Zugabe von 2 µl 3 M Natriumacetat (ph 5,2) und 50 µl 95%igem Ethanol gefällt und der Ansatz auf dem Laborschüttler gut durchmischt, um danach für 10 Minuten auf Eis gestellt zu werden. Durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 U/min und Raumtemperatur wurde die gefällte DNA sedimentiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde durch Zugabe von 250 µl, kurz zuvor frisch angesetztem 70%igem Ethanol gewaschen, durchmischt und bei obengenannten Bedingungen für 15 Minuten erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipetiert und die DNA unter dem Abzug getrocknet. Auf diese Weise eingeeengt, konnten die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt werden. Bevor das DNA-Sediment auf das Sequenzierungsgel aufgetragen werden konnte, mußte es in 4 µl Formamid/50 mM EDTA (ph 8,0) (5:1) gelöst und für zwei Minuten bei 90°C denaturiert werden. Nach kurzem Abkühlen auf Eis konnten die Proben schließlich auf das Gel aufgetragen werden. Zuvor wurde jedoch noch ein Gelvorlauf gestartet (ca.1700 V, 18 mA, 29 W, 40°C), der nach 15-20 Minuten unterbrochen wurde, um die Proben aufzutragen. Zur Verminderung einer Diffusion der Proben in den Laufpuffer, wurde nach dem diskontinuierlichen Auftrag von 12 Proben die Elektrophorese-Apparatur für 5-10 Minuten eingeschaltet, bis die Proben in das Gel eingelaufen waren. Hiernach erfolgte die Beladung der restlichen 12 Geltaschen, so daß der Hauptlauf unter den gleichen Bedingungen wie der Vorlauf mit Datenkollektion gestartet und über Nacht fortgesetzt werden konnte.

5.1.7 Restriktionsenzym-Analyse

Durch DNA-Analyse offenbarte Sequenzunterschiede wurden mit Hilfe eines Restriktionsverdau bestätigt. Ein Verdauansatz setzte sich dabei aus 20 µl des jeweiligen PCR-Produktes, 10 U des betreffenden Restriktionsenzym und 30 µl des zugehörigen 1 x Puffers zusammen. Über Nacht erfolgte die Inkubation der Reaktionsgemische bei 37°C (bzw. 55°C für den *BalI*-Verdau). Hiernach wurden die verdauten Fragmente auf einem 10%igen Acrylamid-Gel aufgetragen und mit 100 V bei einer Laufzeit von zwei Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Silberfärbung oder Interkalierung der DNA mittels Ethidiumbromid und nachfolgender UV-Transillumination brachte schließlich das Bandenlaufmuster zur Darstellung.

5.2 Morphometrie an Semidünnschnitten

Zur Korrelation und Quantifizierung der Nervenfasernzahl, ihrer Myelinschichtdicke und der Axondurchmesser wurden die jeweiligen Semidünnschnitte der einzelnen Suralnervenbiopsien bei 1000facher Vergrößerung in Ölimmersion morphometrisch auf die Zahl myelinisierter Nervenfasern pro mm^2 und den prozentualen Anteil der Myelinfläche an der Fläche des Endoneuriums untersucht. Hierzu diente ein automatisches, optisch-elektronisches, digitales Auswertungssystem mit der Bezeichnung KS 300 (Zeiss/ Kontron, Oberkochen, München).

Die Zahl myelinisierter Nervenfasern pro mm^2 spiegelte den Verlust von Neuronen wider. Jedoch konnte dieser Parameter auch bei stark ausgeprägten axonalen Neuropathien noch im Normbereich liegen, da er ebenfalls die zahlreich vorhandenen regenerativen Nervenfasern miteinfaßte [Schröder und Sommer, 1991].

Der prozentuale Anteil der Myelinfläche an der endoneuralen Fläche zeigte den Ausfall und den Myelinisationsgrad markhaltiger Nervenfasern an und gab Auskunft über die Hypomyelinisierung infolge einer vorausgegangenen segmentalen Demyelinisierung oder Regeneration im Zuge einer Waller'schen Degeneration. Die entsprechenden Werte für die untersuchten Suralnervenbiopsien wurden mit Kontrollwerten des Instituts für Neuropathologie verglichen.

6. Ergebnisse

Innerhalb dieser Studie war es möglich, vier Familien mit CMTX zu identifizieren, wobei jeweils unterschiedliche Mutationen im Connexin32-Gen das pathogenetische Korrelat darstellten (Abb. 6). Die Index-Patienten der einzelnen Familien entstammten einem zu Beginn festgelegten, 45 CMT Patienten umfassenden Kollektiv. Phäno- und Genotyp konnten jeweils über mindestens drei Generationen hinweg verfolgt werden (Abb. 7). Zweifelsohne ließ sich hierbei in allen Familien der jeweilige Genotyp mit dem klinischen Phänotyp in Einklang bringen; dennoch darf nicht unerwähnt bleiben, daß mehrere Allelträgerinnen der Familien Ac06, Ac36 und Ac40 lediglich in der elektrophysiologischen Diagnostik diskrete Anzeichen einer peripheren Nervenläsion verrieten. Der pathogenetische Charakter der jeweiligen Mutationen wurde bestätigt, indem weder bei einem der 50 Kontrollindividuen, noch bei gesunden Familienmitgliedern eine dieser genetischen Veränderungen nachgewiesen werden konnte. Klinische und elektrophysiologische Daten von 23 der insgesamt 25 Allelträger wurden tabellarisch aufgelistet (s. 11. Anhang). Generell ist zu betonen, daß diese Befunde keinerlei klare Trennung zwischen Patienten mit axonaler und intermediärer Neuropathie erkennen ließen. Bestätigt werden konnte indes die stärkere Affektion männlicher CMTX-Patienten, welche zudem deutlicher reduzierte neurographische Werte aufwiesen als ihr weibliches Pendant (mittlere motorische NLG bei Männern: 31 m/s, Range: 27,7-33,3 m/s; mittlere motorische NLG bei Frauen: 40 m/s, Range: 35-49 m/s). Die Ausprägung des klinischen Phänotyps männlicher Patienten reichte von mäßiger bis hin zu schwergradiger Beeinträchtigung. Noch deutlicher hingegen variierte der Phänotyp weiblicher Allelträgerinnen. So schien es auch nicht weiter verwunderlich, daß gleich mehrere Patientinnen sich ihres Genotyps völlig unbewußt waren. Demnach konnte die in der Literatur beschriebene ausgeprägte phänotypische Varianz bei CMTX, selbst innerhalb einzelner Familien, mittels der vorliegenden Studie bestätigt werden.

Morphometrische Evaluationen konnten den axonalen Charakter der Neuropathie bei Index-Patient(in) Ac36 und Ac40 belegen, während vergleichbare Daten der Index-Patienten Ac04 und Ac06 doch eher einen intermediären Prozeß mit deutlicher demyelinisierender Komponente vermuten ließen (Abb. 8). So konnten insbesondere bei erstgenannten Patienten bemerkenswerte Verluste großer, myelinisierter Nervenfasern und reaktive Aussprossungen regenerativer, dünn myelinisierter Fasern beobachtet werden, so daß im Faserhistogramm eine Verschiebung in Richtung kleinerer Durchmesser resultierte. Die bei Ac04 und Ac06 stärker

ausgeprägte demyelinisierende Komponente kam vor allem im Rahmen der Messung des prozentualen Anteils der Myelinfläche an der Fläche des Endoneuriums (Norm: 20-30%) zum Ausdruck. Denn während die beiden axonal zu beurteilenden CMTX-Patienten lediglich moderate Reduktionen aufwiesen, schwand der prozentuale Anteil bei Ac04 und Ac06 auf etwa 6% bzw. 8%. Die exakten Werte sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Familie Ac04:

Der 29-jährige Index-Patient dieser Familie entwickelte bereits im Kindesalter manifesten Tremor beider Hände. Eine Schwäche der unteren Wadenmuskulatur fiel dagegen erst im Alter von 17 Jahren auf. Bei der jetzigen Untersuchung offenbarte er lediglich mäßig ausgeprägte Symptome einer CMT, wie leichte Thenaratrophy, Storchenbeine und eine Hohlfußdeformität. Die Ausführung des Fersengangs erwies sich als unmöglich. Ebenso konnte auf beiden Seiten der Achillessehnenreflex (ASR) nicht ausgelöst werden. Überdies fiel ein distaler, strumpfförmig begrenzter Sensibilitätsverlust auf. Der das Beschwerdebild des Patienten bestimmende Haltetremor wies eine Frequenz von 4-8/s auf und erfuhr eine durch mentalen Stress auszulösende Verstärkung. Die Messung mittlerer motorischer NLGs erbrachte lediglich intermediär verlangsamte Werte (33,3 m/s im Alter von 16 Jahren; 34 m/s bei jetziger Kontrolle); die Ableitung sensorischer Nervenaktionspotentiale erwies sich als vermindert. Die erst kürzlich durchgeführte Suralnervenbiopsie ergab eine Kombination sowohl demyelinisierender Veränderungen, als auch axonaler Verluste, begleitet von regenerativen Aussprossungen (Abb. 9a). Ergänzend durchgeführte BAER-Ableitungen suggerierten eine zusätzliche zentrale Beteiligung, indem sich sowohl die Wellen II-V als auch sämtliche Interpeaklatenzen verzögert darstellten.

Die 50-jährige Mutter des Index-Patienten bemerkte keinerlei klinische Einschränkungen, ausgenommen des sie ebenfalls seit frühester Kindheit beeinträchtigenden Tremors beider Hände. Bei ihr im Alter von 36 Jahren durchgeführte elektrophysiologische NLG-Messungen erwiesen sich als deutlich verlangsamt. Ansonsten fanden sich jedoch keine weiteren erkrankten Familienmitglieder, weder mit Tremor, noch mit Anzeichen einer peripheren Neuropathie. Dennoch wurde allein anhand dieser beiden Familienmitglieder die Diagnose einer CMTX in Betracht gezogen, da zum einen der morphologische Befund des Index-Patienten eine Kombination axonaler und demyelinisierender Läsionen verriet, und zum anderen die NLG lediglich intermediär verlangsamte Werte aufwies. Darüberhinaus

deutete vor allem die von der Neuropathie klinisch unbeeinträchtigte und erst in der Elektrophysiologie auffällige Mutter auf einen X-chromosomalen Erbgang hin.

Die Mutationsanalyse mittels SSCP erbrachte ein abweichendes Laufmuster des 5'-terminalen PCR-Fragmentes (Abschnitt 1) sowohl auf Acrylamid-, als auch auf MDE-Gelen, woraufhin die sich anschließende DNA-Sequenzierung einen Basenaustausch von C zu T enthüllte, der sich auf das zweite Nukleotid des Codons 39 bezog und einen Ersatz von Alanin durch Valin im mutierten Connexin32-Protein zur Folge hatte (Abb. 6a). Im darauffolgenden Restriktionsverdau resultierte aus dieser Sequenzänderung der Verlust einer von zwei *PstI* (Boehringer, Mannheim, Deutschland) -Schnittstellen, die normalerweise im 306 Basenpaare (bp) umfassenden Wildtyp (WT) PCR-Produkt vorzufinden sind. Mittels dieser Methode wurde das Screening weiterer Familienmitglieder auf Vorliegen des mutierten Allels wesentlich erleichtert (Abb. 7b). Darüberhinaus konnte die Mutation des Index-Patienten, ebenso wie die der Mutter, bestätigt werden, wobei letztere als Trägerin zweier X-Chromosomen ein heterozygotes Bandenmuster des Connexin32-Genlocus präsentierte.

Familie Ac06:

Der 41-jährige Index-Patient weist bereits seit seinem 8. Lebensjahr eine Hohlfußdeformität mit Gangstörung auf. Im Alter von 14 Jahren litt er unter permanent brennenden Schmerzen beider Füße, ein Zustand, der jedoch im Laufe der Zeit verschwand. Die nun durchgeführte neurologische Untersuchung erbrachte bilaterale Atrophien sowohl der Thenar-, als auch der unteren Wadenmuskulatur, wodurch eine deutliche Behinderung resultierte. So zeigte sich ein betonter Steppergang, der in Einklang zu bringen war mit fehlender Dorsalextension des Fußrückens. Auch bei ihm konnte der ASR beidseits nicht ausgelöst werden; ebenso wurde der Sensibilitätsverlust als distal und strumpfförmig begrenzt beschrieben. Die im Alter von 29 Jahren durchgeführte Messung der motorischen NLG des N. ulnaris erbrachte mit 32,3 m/s einen deutlich verlangsamten Wert. Eine zur gleichen Zeit entnommene Suralnervenbiopsie zeigte sowohl axonale als auch demyelinisierende Schädigungen (Abb. 9b). Zum damaligen Zeitpunkt wurde ebenfalls die klinische Untersuchung weiterer Familienmitglieder durchgeführt. Hierbei erwiesen sich die Eltern des Patienten als offenbar gesund, auf neurographische Aufzeichnungen wurde jedoch verzichtet. Hingegen fand man bei einer Schwester des Index-Patienten verlangsamte motorische NLGs, so daß damals die Diagnose einer autosomal-rezessiven CMT1 gestellt wurde. Mittlerweile wurde die Diagnostik dieser Patientin und ihres 14-jährigen Sohnes um die Messung akustisch evozierter

Hirnstammpotentiale erweitert, wobei insbesondere der Filius ähnliche Latenzen wie Index-Patient Ac04 aufwies.

Ein auffälliges Laufmuster sowohl der Einzelstrang-Fragmente 3, als auch 4 auf Acrylamid- und MDE-Gelen engte bereits in der SSCP die Lokalisation der mutmaßlichen Sequenzänderung auf das überlappende Segment zwischen Codon 199 und Codon 207 ein. Endgültige Klärung verschaffte die daraufhin durchgeführte Sequenzierung des C-terminalen PCR-Abschnittes, indem hierbei eine Mutation in Codon 206 zu beobachten war (Abb. 6b). Dabei läßt sich einer der beiden Thymin-Reste an Position 679-680 in der veränderten Sequenz durch eine Baseninsertion erklären (679insT). Die hierdurch ausgelöste Verschiebung des Leserahmens (sog. frame shift) verursacht einen vorzeitigen Translationsabbruch nach dem Einbau von 35, nicht mit Connexin32 assoziierten Aminosäuren. Mittels eines Restriktionsverdaus gelang wiederum die rasche, jedoch ungemein sensitive Untersuchung weiterer möglicher Allelträger, da die Mutation den Verlust einer von vier *Bsi*YI (Boehringer, Mannheim, Deutschland) -Schnittstellen des 304 bp großen WT PCR-Fragmentes zur Folge hat. Auf diese Weise war es möglich, die Krankheit und den entsprechenden Überträger-Status über 3 Generationen hinweg zu verfolgen (Abb. 7a). So entpuppten sich sowohl die 3-jährige Tochter des Index-Patienten, als auch seine obengenannte Schwester und Mutter als heterozygot für das mutierte Allel, allesamt klinisch gesund und daher bis dato ihres Genotyps nicht bewußt, obwohl zumindest bei der Schwester elektrophysiologische Messungen bereits ähnliche Vermutungen hätten aufkommen lassen können.

Familie Ac36:

Als Index-Patient dieser Familie präsentiert sich ein 15-jähriger Junge, der bereits im Alter von 9 Jahren erste Symptome erkennen ließ. So weist er typische Atrophien und Schwächen im unteren Wadenbereich sowie eine Hohlfußdeformität auf. Auch fiel bereits damals beidseitiges Fehlen des ASR und seine Unfähigkeit zum Hackengang auf, wohingegen eine strumpfförmig begrenzte Sensibilitätsminderung bis zum jetzigen Zeitpunkt lediglich leichte Ausmaße annimmt. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben intermediäre NLG-Verlangsamungen (N. tibialis: 33-35,7 m/s; N. peronaeus: 36,6-42,1 m/s) und deutlich erniedrigte Amplituden sowohl sensorischer als auch motorischer Summenaktionspotentiale, so daß die Befunde einer primär axonalen Neuropathie entsprachen. Dies wurde anhand der im Alter von 11 Jahren durchgeführten Suralnervenbiopsie bestätigt, die einen langsam

fortschreitenden axonalen Prozeß mit nur gering ausgeprägten Zeichen einer De- und Remyelinisierung und nur wenigen Zwiebschalenformationen ähnelnden Gebilden wiedergibt (Abb. 9c).

Die klinische Affektion übriger Familienmitglieder stellt sich variabel dar. So offenbaren die Mutter und Großmutter des Index-Patienten lediglich milde ausgeprägte Zeichen einer Neuropathie, während sowohl ein Onkel, als auch Großonkel mütterlicherseits schwer erkrankt sind. Darüberhinaus existiert in der Familie eine zweite X-chromosomal vererbte Krankheit. Da der Großvater des Index-Patienten zwar rot-grün blind, aber nicht Cx32-Allelträger ist, der Index-Patient jedoch beide Krankheiten aufweist, muß in der Keimbahn der Mutter eine obligate Rekombination zwischen beiden betreffenden Genloci stattgefunden haben, zumal bei ihrem zweiten Sohn weder der eine, noch der andere Gendefekt nachzuweisen ist. Diese Entkopplung von Markern zum einen auf dem kurzen und zum anderen auf dem langen Arm des X-Chromosoms beobachteten bereits Iselius und Grimby (1982) und schlossen kausale Zusammenhänge zwischen beiden Krankheiten aus.

Ein abweichendes Wanderungsverhalten des N-terminalen PCR-Fragmentes ließ sich in der SSCP-Analyse auf 7% Acrylamid-Gel beobachten, wohingegen das Laufmuster auf MDE-Gelen keinerlei Auffälligkeit verriet. In der DNA-Sequenzierung zeigte sich ein Basenaustausch von G zu A an Position 127 in Codon 22, wodurch ein Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin resultiert (Abb. 6c). Diese Daten konnten anhand eines Restriktionsverdaus mit *BalI* (Promega, Madison, Wis.) bestätigt werden, da der Basenaustausch eine zusätzliche Schnittstelle für dieses Enzym impliziert (Abb. 7c).

Familie Ac40:

Das Auftreten erstmaliger Symptome bei der Index-Patientin dieser Familie datiert etwa zurück auf das 40. Lebensjahr. Die damalige neurologische Untersuchung der mittlerweile 47-jährigen Frau ließ eine deutliche Gangstörung und mäßige Atrophie der Thenar-Muskeln erkennen. Überdies litt die Patientin an einem beidseitigen Karpaltunnel-Syndrom. Sowohl an der oberen, als auch an der unteren Extremität fiel ein distaler, etwa handschuh- bzw. sockenförmig begrenzter Sensibilitätsverlust auf. Muskelschwäche ließ sich vor allem an Armen und Händen eruieren.

Neurographische Untersuchungsbefunde sprachen für eine primär axonale Neuropathie mit nur mäßig reduzierten NLG-Werten motorischer Nerven (N. medianus: 43,8 m/S; N. tibialis: 58,9 m/s; N. peroneus: 43,5 m/s), jedoch deutlich verlangsamten sensorischen NLGs

(N. medianus: 33,9-38,2 m/s; eine Ableitung des N. suralis gelang mittels Oberflächen Elektroden nicht). Die Messung motorischer und sensorischer Summenaktionspotentiale ergab stark reduzierte Amplituden. Auch das Elektromyogramm konnte Zeichen chronisch fortschreitender Denervierung sowohl der oberen, als auch der unteren Extremität belegen. Demzufolge ließen sich sämtliche Befunde mit der Diagnose einer CMT2 vereinbaren.

Eine Nervenbiopsie wurde bei der Patientin im Alter von 44 Jahren durchgeführt und brachte deutliche Verluste großer, myelinisierter Nervenfasern bei parallel zu beobachtenden Regenerationstendenzen zum Vorschein (Abb. 9d), was mittels morphometrischer Analysen belegt werden konnte, die ebenfalls einen primär axonalen Prozeß mit Zeichen von De- und Remyelinisation verrieten.

Auch ihre beiden Söhne lassen sich als Allelträger identifizieren, wobei der jüngere, ohnehin schwerer betroffene, bereits seit seinem 19., der ältere seit seinem 25. Lebensjahr manifeste Krankheitssymptome verspürt. Ein Cousin (mit * gekennzeichnet) beider wurde bereits im Alter von 11 Jahren aufgrund zweier, sich gegenseitig verstärkender Krankheiten an den Rollstuhl gefesselt. Zum einen durch die in der Familie bekannte Neuropathie, mit bei ihm stark ausgeprägten Fußdeformitäten, und zum anderen durch eine sporadisch aufgetretene muskuläre Dystrophie mit Deletion der Exone 3-7 des Dystrophin-Gens, so daß sowohl distale als auch proximale Muskelatrophien resultieren. Bis dato weist dieser Patient jedoch im Alter von 27 Jahren keinerlei respiratorische Probleme auf, so daß offenbar eher von einem Becker-Kiener Typ als der ursprünglich diagnostizierten Form einer Duchenne'schen Muskeldystrophie ausgegangen werden kann. Die zweifelsohne auch in dieser Familie zu beobachtende Varianz spiegelt sich im Phänotyp dreier, jeweils verschiedenen Generationen zugehöriger Allelträgerinnen (I-1, II-5, III-7) wider, die allesamt lediglich elektrophysiologische Auffälligkeiten verrieten. Bei zweien dieser wurden daraufhin ergänzend akustisch evozierte Hirnstammpotentiale abgeleitet, die auf eine zusätzliche zentrale Affektion hinwiesen, indem vor allem Patientin II-5 Verzögerungen sowohl der proximal zu lokalisierenden Wellen als auch der Interpeaklatenzen erkennen ließ.

In der SSCP-Analyse stellte sich ein Laufweitenunterschied des 5'-terminalen PCR-Abschnittes sowohl auf Acrylamid- als auch auf MDE-Gelen dar. Dieses abweichende Wanderungsverhalten der Einzelstränge stimmte mit dem Laufmuster einer Positivkontrolle (Arg15Trp) überein. Die Bestätigung erfolgte mittels DNA-Sequenzierung, da sowohl Index-Patientin als auch Positivkontrolle einen Basenaustausch von C zu T des ersten Nukleotids (an

Position 105) in Codon 15 verrieten, woraufhin eine Substitution von Arginin durch Tryptophan im Connexin32-Protein resultiert (Abb. 6d). Auch hierbei wurde im Verdau mittels des Restriktionsenzym *BsrI* (New England Biolabs, Beverly, Mass.) eine durch die Mutation neu entstandene Schnittstelle genutzt, um Allelträger anhand zusätzlicher Fragmentbanden im Gel zu identifizieren (Abb. 7d).

7. Diskussion

Inhalt dieser Studie war die Untersuchung eines definierten Patientenkollektivs mit axonaler oder intermediärer Neuropathie auf Mutationen des Cx32-Gens. Vier dieser Patienten wiesen eine jeweils unterschiedliche CMTX-Mutation auf, woraufhin die Mutationsanalyse auf Familienmitglieder ausgedehnt wurde. Zwei der innerhalb dieser Studie beobachteten Mutationen wurden zuvor noch nicht in der Literatur beschrieben, wobei eine dieser beiden einen frame shift und dadurch bedingten vorzeitigen Translationsstop hervorruft. Molekulare und klinische Untersuchungen offenbarten komplette Übereinstimmung von Phäno- und Genotyp innerhalb der einzelnen Familien: So trug weder ein Patient zwei gesunde Allele, noch konnte die Mutation bei klinisch unauffälligen Familienmitgliedern entdeckt werden.

Innerhalb dieser Studie konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, daß Mutationsanalysen des Connexin32-Gens auch anhand Paraffin-eingebetteten Materials durchführbar sind. Bislang gelang die DNA-Extraktion aus Paraffin-eingebetteten Nervenbiopsien lediglich im Rahmen von CMT1A-Fällen [Schröder, 1997; Thiex und Schröder, 1998] und aus einigen anderen Geweben [An et al., 1994; Date et al., 1997]. Mittels zusätzlich durchgeführter Analysen an Leukozyten-DNA wurde die Zuverlässigkeit der angewandten Methoden überprüft und zugleich bestätigt, daß es sich bei den entdeckten Sequenzänderungen tatsächlich um Keimbahnmutationen handelt. Demnach erlaubt dieser Ansatz zweifelsohne die genetische Reklassifikation von Nervenbiopsien und eine entsprechende Ausdehnung von Mutationsanalysen auf verstorbene Familienmitglieder. Auf diese Weise besteht die Möglichkeit mittels erweiterter Stammbaumanalysen gewisse Struktur-Funktions-Korrelationen zwischen verschiedenen Connexin32-Mutationen und den jeweils resultierenden klinischen Merkmalen abzuleiten. Denn betrachtet man die enorm ausgeprägte Varianz der CMTX-Punktmutationen und entsprechender Phänotypen, so sollte der Charakter einer Mutation durchaus relevante Aussagen zu Klinik und Prognose ermöglichen.

Connexin32 wird außer in Schwann-Zellen des PNS in einer Vielzahl weiterer Gewebe exprimiert. Hierzu zählen u.a. Leber, Pankreas und Epithelzellen, ebenso wie zentral myelinisierende Glia [Bergoffen et al., 1993; Dermietzel und Spray, 1993; Dermietzel et al., 1997]. Jedoch offenbaren CMTX-Patienten einzig eine periphere Neuropathie, ohne jegliche Beeinträchtigung eines anderen Organs zu zeigen. Möglicherweise besitzen myelinisierende Schwann-Zellen eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Connexin32-Mutationen, da

dieses 32 kDa schwere Protein auch gleichzeitig das einzige ihrerseits exprimierte gap junction-Protein darstellt. Demgegenüber exprimieren die meisten anderen Zellspecies weit mehr als nur ein Mitglied der Connexin-Familie und sind so unter Umständen in der Lage, das mutierte Connexin32 zu substituieren [Scherer et al., 1995]. Darüberhinaus wiesen *in vitro*-Studien die Funktionalität heterotypischer interzellulärer Kanalformationen verschiedenartiger Connexine nach. So sind sowohl Cx32-Wildtyp-Proteine als auch funktionelle CMTX-Mutationen in der Lage, mit Cx26, 46 und 50 intakte gap junctions auszubilden [Bruzzone et al., 1996; Kumar und Gilula, 1996; Ressot et al., 1998]. Neueren elektrophysiologischen Studien zu Folge, welche eine eindeutige Affektion zentraler myelinisierter Leitungsbahnen postulieren [Nicholson und Corbett, 1996], scheint jedoch die Manifestation einer CMTX keineswegs strikt auf das PNS begrenzt zu sein. Hierauf soll im folgenden noch näher eingegangen werden.

Neuartige und bereits beschriebene Mutationen im Connexin32 Gen

Unmittelbar bevor die erste Transmembrandomäne in den extrazellulären Bereich übergeht, läßt sich die Aminosäure Ala39 lokalisieren. Die in einer der Familien zu beobachtende Substitution von Alanin durch Valin scheint hierbei keine drastische Änderung der Primärstruktur und alpha-helikalen Ausrichtung des ersten transmembranösen Abschnitts hervorzurufen, da beide Aminosäuren große Ähnlichkeiten bezüglich ihrer strukturellen und biochemischen Eigenschaften aufweisen. Allerdings stellt Ala39 eine hoch konservierte Aminosäure unter Mitgliedern der Connexin-Genfamilie sowohl bei Ratte und *Xenopus* als auch beim Menschen dar, während dies auf andere transmembranöse Alanin-Reste nicht zutrifft [Kumar und Gilula, 1986; Bennett et al., 1991]. Darüberhinaus wiesen mehrere, bislang beschriebene missense-Mutationen der direkt benachbart liegenden Nukleotid-Triplets einen CMTX-Phänotyp auf [Orth et al., 1994; Nelis et al., 1996], wobei eine dieser Mutationen den geschilderten konservativen Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin exakt widerspiegelt. Zudem beweisen *in vitro*-Ansätze, daß einzelne Aminosäure-Substitutionen innerhalb der ersten Transmembrandomäne durchaus die Kanalfunktion zu beeinträchtigen wissen [Oh et al., 1997]. So gelangt man schließlich unter Zugrundelegung aller Untersuchungsergebnisse zu dem Schluß, daß die strukturelle Integrität der Grenzregion zwischen erster transmembranöser Helix und extrazellulärer Domäne für eine korrekte Funktion des Connexin32-Proteins gewährleistet sein muß.

Keinen Zweifel ob des pathogenetischen Charakters läßt die in einer weiteren Familie zu beobachtende Insertion einer zusätzlichen Thymin-Base in Codon 206 aufkommen, da hierdurch nach Einbau von 35, nicht mit Connexin32 assoziierten Aminosäuren ein deutlich verkürztes Protein resultiert. Zum einen zerstört diese Verschiebung des Leserahmens vermutlich die durch Einbau von Prolin- und Glycin-Resten angestrebte alpha-helikale Anordnung des C-Terminus. Noch wesentlich gravierender erscheint jedoch die Substitution von in der Wildtyp-Sequenz an Position 215, 219 und 223 vorhandener Arginin-Reste durch apolare Aminosäuren. Denn genau diese basischen Bestandteile des Proteins scheinen mit negativ geladenen Abschnitten der mittleren zytoplasmatischen Domäne zu interagieren, um so den Öffnungszustand des Kanals mittels chemischer und elektrischer Signale regulieren zu können [Peracchia und Wang, 1997, und hierin enthaltende Literaturhinweise]. Demzufolge beeinträchtigen zweifelsohne die durch frame shift hervorgerufene Verkürzung des C-Terminus und hierdurch bedingter Funktionsverlust sämtliche gap junction-vermittelten Diffusions- und Signalvorgänge.

Die in den beiden übrigen Familien zu beobachtenden Cx32-Mutationen konnten bereits mehrfach in anderen, nicht miteinander verwandten Familien beschrieben werden [Ionasescu et al., 1995a; Nelis et al., 1996; De Jonghe et al., 1997; Silander et al., 1997; Wicklein et al., 1997], wobei sogar unterschiedliche Nukleotidsequenzänderungen innerhalb von Codon 15 und Codon 22 zu verzeichnen waren. Daher braucht der pathogenetische Charakter der Mutationen Arg15Trp und Arg22Gln auch nicht in Frage gestellt zu werden. Bisweilen relativ unbeantwortet bleibt jedoch die Frage hinsichtlich funktioneller Eigenschaften der betroffenen Abschnitte, so daß lediglich Spekulationen diesbezüglich existieren [Fairweather et al., 1994; Silander et al., 1997; Wicklein et al., 1997]. Hiernach werden der ersten Zytoplasmadomäne, die auch Arg15 beinhaltet, gewisse Kontrollfunktionen bei der Kanalöffnung zugeschrieben. Arg22 ist bereits transmembranös lokalisiert und nimmt demnach vermutlich entscheidenden Einfluß auf eine ordnungsgemäße Kanalformation. Darüberhinaus scheinen beide Mutationen, insbesondere da sie jeweils keinen konservativen Aminosäureaustausch darstellen, die korrekte Membraninsertion des Proteins wesentlich zu beeinträchtigen.

Klinischer Phänotyp

Trotz der missense-Mutation Ala39Val ließ der Index-Patient AC04 lediglich moderate CMT-Symptome erkennen, auch wenn ein beidseitiger Tremor durchaus beeinträchtigend wirkte.

Seine Mutter wies diesen Tremor ebenfalls auf; die Neuropathie dagegen war bei ihr lediglich an reduzierten NLG-Meßwerten auszumachen. So scheinen der relativ milde Phänotyp des Index-Patienten und keinerlei äußere Neuropathiezeichen seiner Mutter offenbar doch mit der wenig veränderten Struktur des mutierten Proteins in Beziehung zu stehen. Ein gleichzeitiges Auftreten von Tremor und hereditärer sensomotorischer Neuropathie wurde erstmals 1926 beobachtet und nach seinen Erstbeschreibern als Roussy-Lévy Syndrom (RLS) bezeichnet. Jedoch ließen die im Laufe der Zeit hinzugewonnenen elektrophysiologischen, morphologischen und genetischen Erkenntnisse starke Zweifel bezüglich einer Abgrenzung des RLS als eigenständige Krankheitsentität aufkommen, so daß heute zusätzlich auftretender Tremor lediglich als ein weiteres phänotypisches Merkmal des ohnehin bunten CMT-Krankheitsbildes gewertet wird [Ionasescu, 1995b]. Nervenbiopsien solcher Patienten offenbaren meist demyelinisierende, CMT1 ähnelnde Läsionen [Harding und Thomas, 1980; Barbieri et al., 1984], gestützt durch den molekulargenetischen Nachweis einer CMT1A-Duplikation auf 17p [Thomas et al., 1997; Auer-Grumbach et al., 1998]. Andererseits wurde jedoch auch das Krankheitsbild mehrerer CMT2 Familien maßgeblich durch manifesten Tremor geprägt [Salisachs et al., 1979]. Darüberhinaus gibt die in dieser Studie beschriebene Familie berechtigten Anlaß zu der Annahme, daß ebenfalls CMTX mit Tremor assoziiert in Erscheinung treten kann. Jedoch kann hierbei weder eine rein zufällige Assoziation noch das Vorliegen einer zweiten genetischen Alteration ausgeschlossen werden, so daß letztendlich Untersuchungen weiterer CMTX-Familien hinsichtlich des Vorkommens eines Tremors zur Klärung beitragen müssen. Der zentrale oder aber periphere Ursprung des mit peripherer Neuropathie assoziierten Tremors wurde seit jeher kontrovers diskutiert [Brooks et al., 1992; Cardoso und Jankovic, 1993; Bain et al., 1996]. Im Rahmen der IgM-Neuropathie konnte nachgewiesen werden, daß der hierbei zu beobachtende Tremor auf fehlgeleitete periphere Impulse zurückzuführen ist und daraufhin letztlich im Kleinhirn generiert wird, obgleich dieses wiederum vollkommen intakt zu sein scheint [Bain et al., 1996]. Auf der anderen Seite verdichten sich die Beweise, daß auch zentrale Leitungsbahnen bei CMTX involviert sind [Nicholson und Corbett, 1996]. Gestützt wird diese Hypothese u.a. durch verzögerte BAERs, die auch drei der hier untersuchten Familien aufwiesen. So belegten die innerhalb dieser Studie aufgezeichneten Werte eindeutig den eher zentralen Charakter der im Verlauf des achten Hirnnervs zu beobachtenden Leitungsverlangsamungen. Denn während Latenzen der peripher zu lokalisierenden Welle I stets Normwerte aufwiesen, zeigten insbesondere die dem Bereich des pons und colliculus inferior zuzuordnenden Wellen IV und V deutliche

Verzögerungen. Daher scheint die Überlegung gerechtfertigt, ob ein mit CMTX assoziierter Tremor im ZNS, und dort vermutlich im Kleinhirn, seinen Ursprung findet und somit als weiteres Zeichen zentraler Beteiligung zu werten ist. Demzufolge sollte zukünftig die Überprüfung zerebellärer Funktionen eine obligate und durchaus interessante Fragestellung bei Patienten mit Connexin32-Mutation darstellen.

Deutliche Symptome einer CMT wies hingegen Index-Patient Ac06 auf, obgleich der Phänotyp von Patienten mit nonsense-Mutation in den benachbart liegenden Abschnitten Codon 217 und Codon 220 noch schwerwiegender ausfiel [Ionasescu et al., 1996b], hierdurch hervorgerufene Effekte jedoch durchaus dem des C-terminalen Funktionsverlustes entsprechen dürften. Trotz alledem zeigte eine Schwester des Index-Patienten, ihres Zeichens selbst Allelträgerin, bis dato keinerlei Anzeichen einer peripheren Neuropathie. Ebenso erging es ihrer Mutter, die im Alter von 57 Jahren ohne jegliche Beeinträchtigung verstarb. Diese enorm ausgeprägten Differenzen bezüglich des Phänotyps mögen zum größten Teil durch Mosaikbildungen des mutierten X-Chromosoms und eine hierdurch hervorgerufene Verzögerung und mildere Ausprägung der Krankheit bei weiblichen, heterozygoten Patientinnen zu erklären sein. Darüberhinaus stellt jedoch große phänotypische Varianz ein ohnehin häufig zu beobachtendes Phänomen bei CMTX-Patienten mit der gleichen Mutation, selbst innerhalb einer Familie, dar [Silander et al., 1997]; ebenfalls bestätigt durch die Stammbaumanalysen der Familien Ac36 und Ac40. Denn während sowohl beide Index-Patienten als auch einige weitere Familienmitglieder deutlich ausgeprägte Zeichen einer peripheren Neuropathie verrieten, fielen gleich mehrere klinisch gesunde Patientinnen erst in der elektrophysiologischen Diagnostik auf. Diese extreme Bandbreite klinischer Symptome war auch Gegenstand der Beschreibung in bislang veröffentlichten Studien zu Arg15Trp und Arg22Gln [Ionasescu et al., 1995a; Nelis et al., 1996; De Jonghe et al., 1997; Silander et al., 1997; Wicklein et al., 1997]. Folglich läßt sich die Variabilität der Krankheitssymptome nicht einzig und allein auf den jeweiligen Genotyp zurückführen. Vielmehr scheinen zusätzliche Faktoren, wie etwa Umwelteinflüsse oder aber auch andere Gene, ebenfalls involviert zu sein.

Physiopathologische und morphologische Befunde bei CMTX

Eine Differenzierung der X-chromosomal vererbten Form gegenüber den CMT-Typen 1 und 2 allein auf Basis elektrophysiologischer Daten gelingt nur in den seltensten Fällen. Denn während Meßwerte männlicher CMTX-Patienten einem CMT1-Phänotyp ähneln, weist das weibliche Pendant eher elektrophysiologische Merkmale einer axonalen Neuropathie auf

[Nicholson und Nash, 1993; De Jonghe et al., 1996; Timmerman et al., 1996]. Daher scheint die irrtümliche Kodierung einiger Familien als CMT1 oder 2 unvermeidbar, falls lediglich Meßwerte eines Geschlechts bei der elektrophysiologischen Diagnostik berücksichtigt werden. Erschwerend gesellt sich hinzu, daß männliche CMTX-Patienten durchaus auch intermediäre, nur gering verzögerte motorische NLGs von 30 bis 40 m/s aufweisen können [Rouger et al., 1997; De Jonghe et al., 1998]. Weitere Studien werden indes klären müssen, ob diese relativ hohen NLG-Werte ein lediglich altersbezogenes Phänomen repräsentieren. So wurden diesbezügliche Messungen beim Index-Patienten der Familie Ac04 erstmals im Alter von 16 Jahren durchgeführt, erfuhren jedoch keinerlei weitere Verlangsamung bei Wiederholung des Vorgangs 13 Jahre darauf (33,3 m/s gegenüber 34 m/s), womit zumindest dieser Fall zweifellos oben genannte These belegen kann.

CMTX-Patienten entfalten eine große Bandbreite morphologischer Befunde, die sowohl axonale Läsionen, als auch eher demyelinisierende Formen beinhalten. So zeigten Nervenbiopsien der Index-Patienten Ac04 und Ac06 überwiegend de- und remyelinisierende Veränderungen, inklusive Zwiebelschalen-ähnlicher Formationen. Demgegenüber ließen morphologische Untersuchungen an Nervenabschnitten der beiden anderen Index-Patienten Ac36 und Ac40 vor allem Faserdegenerationen und regenerative Axonsprossungen erkennen, was zweifelsohne einem primär axonalen Prozeß entspricht. Demzufolge drängt sich die Frage auf, wie überhaupt Mutationen eines in Schwann-Zellen exprimierten Proteins primär axonale Verluste verursachen können. Im peripheren Nerv zeigt sich die Lokalisation von Connexin32 auf den Bereich nicht-kompakter Myelinanteile, der Ranvier'schen Schnürringe und Schmidt-Lanterman-Inzisuren, begrenzt [Bergoffen et al., 1993; Scherer et al., 1995]. An diesen Stellen sind bei CMTX-Patienten mehrere, verschiedenartige degenerative Veränderungen wie abnorme Aufweitungen der Inzisuren, Myelinfiguren, vakuoläre Degenerationen der Ranvier'schen Schnürringe und mikroversikuläre Disintegration der Myelinlamellen zu beobachten [Schröder und Himmelmann, 1992; Schröder, 1996]. Die Anzeichen verdichten sich, daß Connexine in der Lage sind, intrazelluläre gap junctions zwischen benachbarten Myelinlamellen derselben Schwann-Zelle auszubilden [Sandri et al., 1982; Bergoffen et al., 1993; Scherer et al., 1995; Balice-Gordon et al., 1998] und auf diese Weise Ionen, Metaboliten und second messengers ermöglichen, die Myelinscheide auf kürzestem Weg zu passieren, ohne den um ein Vielfaches weiteren Weg entlang der einzelnen Myelinspiralen bestreiten zu müssen. *In vitro* erprobte Connexin32-Mutationen beeinträchtigen sowohl die Kanal-Formation als auch die Leitungseigenschaften [Bruzzone et al., 1994; Omori et al.,

1996; Oh et al., 1997]. Oder aber sie behindern Transportwege des Proteins innerhalb der Zelle, vom Ort der Synthese bis hin zur Zellmembran [Deschenes et al., 1997], inklusive der Membraninsertion, so daß letztendlich der Transfer kleiner Moleküle durch die Myelinscheide eine erhebliche Einschränkung erfährt. Demnach hat die nur unzureichende Vermittlung von Nähr- und Signalstoffen eine Degeneration des Myelins und schließlich die Demyelinisierung des Axons zur Folge. Dennoch dominieren morphologische Anzeichen axonaler Degeneration und regenerativer Aussprossungen sowohl vorliegende als auch bereits in der Literatur beschriebene CMTX-Fälle [Hahn, 1993; Sander et al., 1998], so daß gap junctions darüberhinaus ebenfalls den Kontakt zwischen Schwann-Zelle und zugehörigem Axon zu gewährleisten scheinen [Reynolds und Woolf, 1993; Dezawa et al., 1998]. So verwundert es auch nicht, daß innerhalb eines *in vivo*-Myelinisationssystems Atrophie und Degeneration des Axons infolge einer Connexin32-missense-Mutation nachgewiesen werden konnte [Sahenk und Chen, 1998]. Letztlich scheint hiermit die Erklärung für primär axonal zu beobachtende Läsionen und die enorme Variabilität morphologischer Phänotypen bei CMTX gefunden.

Gleich mehrere Faktoren mögen dafür verantwortlich sein, daß die übrigen 41 der 45 ausgewählten Fälle keinerlei Auffälligkeiten im Rahmen der durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungsmethoden erkennen ließen: Zunächst muß darauf hingewiesen werden, daß die Sensitivität der SSCP-Elektrophorese 80% nicht übersteigt und somit nicht alle Mutationen detektiert werden [Cooper et al., 1996]. Andererseits wurde lediglich die kodierende Gensequenz in die Untersuchung miteinbezogen, wodurch mögliche Änderungen der am 5'- und 3'-Ende gelegenen, nicht translatierten, regulatorischen Abschnitte [Ionasescu et al., 1996a] ebenso wie exon/intron splice site-Mutationen übersehen wurden. Weiterhin muß eine eventuelle Fehldiagnose der bei den restlichen Patienten zu beobachtenden peripheren Neuropathie als CMT in Erwägung gezogen werden. Schließlich mögen einige dieser Patienten unter Umständen Mutationen im PMP22-, P0-Gen, in Sequenzen für Transkriptionsfaktoren [Scherer, 1997; Jessen und Mirsky, 1998; Warner et al., 1998] oder aber auch Mutationen in bislang unbekannten Genabschnitten aufweisen.

8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden 45 ausgewählte Fälle mit axonaler oder intermediärer Neuropathie auf Mutationen des Cx32-Gens anhand Paraffin-eingebetteter Suralnervenbiopsien untersucht. Bei vier dieser Patienten gelang der Nachweis einer jeweils unterschiedlichen Punktmutation, woraufhin auch die Familien dieser Index-Patienten in die Untersuchung miteinbezogen wurden. Zu betonen ist, daß sowohl die Mutation Ala39Val als auch die Insertion 679insT erstmalig im Rahmen dieser Studie beschrieben wurden. Überdies fand eine bislang einzigartige Kombination von neuromuskulären Krankheiten Erwähnung in der Literatur. So wies der Patient AC40:III-4 nicht nur die in seiner Familie bekannte periphere Neuropathie auf, sondern war zudem noch durch eine Muskeldystrophie vom Typ Becker-Kiener gekennzeichnet.

Untersuchungen auf Cx32-Mutationen sollten bei der Auswahl geeigneter Kriterien bezüglich potentieller Familien mit einer Neuropathie mehr als nur demyelinisierende Aspekte und dominante Vererbungsmerkmale berücksichtigen. Denn sowohl physiopathologische als auch hereditäre Erscheinungsformen spiegeln oftmals ein wesentlich bunteres Krankheitsbild wider. So können elektrophysiologische Befunddaten ebenso einer CMT1 wie einer CMT2 ähneln; auch mag der Erbgang innerhalb einzelner Familien durchaus autosomal-rezessive oder sporadische Züge tragen, falls die Mutation in den Generationen zuvor phänotypisch gesunde Konduktorinnen betraf. Die Diagnose einer Connexin32-Mutation erweist sich von entscheidender Bedeutung bei der Identifizierung noch asymptomatischer Allelträger(innen), um rechtzeitig adäquate Therapieschemata einleiten zu können. Darüberhinaus ist bei der genetischen Beratung von CMTX-Familien zu beachten, daß ein X-chromosomaler Vererbungsmodus günstigere Verlaufsformen für Allelträgerinnen impliziert als autosomal-dominant vererbte CMT-Formen. Zudem werden weitere Nachforschungen über die Verteilung von Mutationen im Connexin32-Gen dazu beitragen, zugrundeliegende Struktur-Funktions-Beziehungen zu begreifen und auf diese Weise, in Verbindung mit *in vitro*-Experimenten und Tiermodellen, ein besseres Verständnis bezüglich der CMTX Pathogenese zu erlangen. Im Rahmen solcher Studien sollte die genetische Reklassifizierung archivierter Nervenbiopsien ein willkommenes Hilfsmittel darstellen. So erweist sich die Entdeckung weiterer Connexin32-Mutationen nicht allein aus diagnostischen Gesichtspunkten als unverzichtbar, sondern erfährt auch im Rahmen wissenschaftlicher Studien grundsätzliche Bedeutung.

9. Literatur

1. Allan W (1939) Relation of hereditary pattern in clinical severity as illustrated by peroneal atrophy. Arch Intern Med 63:1123-1131
2. An SF, Ciardi A, Scaravilli F (1994) PCR detection of HIV proviral DNA (*gag*) in brains of patients with AIDS: comparison between results using fresh frozen and paraffin wax embedded specimen. J Clin Pathol 47:990-994
3. Anzini P, Neuberg DHH, Schachner M, Nelles E, Willecke K, Zielasek J, Toyka KV, Suter U, Martini R (1997) Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin32. J Neurosci 17: 4545-4551
4. Auer-Grumbach M, Strasser-Fuchs S, Wagner K, Körner E, Fazekas F (1998) Roussy-Levy syndrome is a phenotypic variant of Charcot-Marie-Tooth syndrome IA associated with a duplication on chromosome 17p11.2. J Neurol Sci 154:72-75
5. Bach JR (1995) Introduction to rehabilitation of neuromuscular disorders. Semin Neurol 15:1-5
6. Bain PG, Britton TC, Jenkins HI, Thompson PD, Rothwell JC, Thomas PK, Brooks DJ, Marsden CD (1996) Tremor associated with benign IgM paraproteinaemic neuropathy. Brain 119:789-799
7. Balice-Gordon RJ, Bone LJ, Scherer SS (1998) Functional gap junctions in the Schwann cell myelin sheath. J Cell Biol 24:1095-1104
8. Barbieri F, Filla A, Ragno M, Crisci C, Santoro L, Corona M, Campanella G (1984) Evidence that Charcot-Marie-Tooth disease with tremor coincides with the Roussy-Levy syndrome. Can J Neurol Sci 11(4):534-540
9. Beckett J, Holden JJ, Simpson NE, White BN, MacLeod PM (1986) Localization of X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2) to Xq13. J Neurogenet 3:225-231
10. Bennett MVL, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Saez JC (1991) Gap junctions: new tools, new answers, new questions. Neuron 6:305-320
11. Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Orton-Scott M, Bone L, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance P, Fischbeck K (1993) Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. Science 262:2039-2042
12. Bone LJ, Dahl N, Lensch MW, Chance PF, Kelly T, Le Guern E, Magi S, Parry G,

- Shapiro H, Wang S, Fischbeck KH (1995) New connexin32 mutations associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 45:1863-1866
13. Bone LJ, Deschenes SM, Balice-Gordon RJ, Fischbeck KH, Scherer SS (1997) Connexin32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurobiol Dis* 4:221-230
 14. Bort S, Nelis E, Timmerman V, Sevilla T, Cruz-Martínez A, Martínez F, Millán JM, Arpa J, Vílchez JJ, Prieto F, Broeckhoven C van, Palau F (1997) Mutational analysis of the MPZ, PMP22 and Cx32 genes in patients of Spanish ancestry with Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 99:746-754
 15. Brooks DJ, Jenkins HI, Bain PG, Colebatch JG, Thompson PD, Findley LJ, Marsden CD (1992) A comparison of the abnormal patterns of cerebral activation associated with neuropathic and essential tremor. *Neurology* 42 (Suppl):423
 16. Bruzzone R, White TW, Scherer SS, Fischbeck KH, Paul DL (1994) Null mutations of connexin32 in patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 13:1253-1260
 17. Bruzzone R, White TW, Paul DL (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238:1-27
 18. Bruzzone R, Ressot C (1997) Connexins, gap junctions, and cell-cell signaling in the nervous system. *Eur J Neurosci* 9:1-6
 19. Cao F, Eckert R, Elfgang C, Nitsche JM, Snyder SA, Hülser DF, Willecke K, Nicholson BJ (1998) A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *J Cell Sci* 111:31-43
 20. Cardoso FE, Jankovic J (1993) Hereditary motor-sensory neuropathy and movement disorders. *Muscle Nerve* 16:904-910
 21. Charcot JM, 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 Med Paris* 6:97-138
 22. Cooper CA, Bubb VJ, Smithson N, Carter RL, Gledhill S, Lamb D, Wyllie AH, Carey FA (1996) Loss of heterozygosity at 5q21 in non-small cell lung cancer: a frequent event but without evidence of APC mutation. *J Pathol* 180:33-37
 23. Corcos IA, Lafreniere RG, Begy CR, Loch-Caruso R, Willard HF, Glover TW (1992) Refined localization of human connexin32 gene locus, GJB1, to Xq13.1. *Genomics* 13:479-480

24. Cowen J, Greenwood R, Fletcher N (1993) Disorders of the peripheral nerve. In: Greenwood R, Barnes MP, McMillan TM, Ward CD (eds) Neurological rehabilitation. Churchill Livingstone, London
25. Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Shirieda K, Fujimoto T, Matsukura S (1997) Detection of three transthyretin gene mutations in familial amyloidotic polyneuropathy by analysis of DNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Neurol Sci* 150:143-148
26. Dejerine J, Sottas J (1893) Sur la névrite interstitielle, hypertrophique et progressive de l'enfance. *C R Soc Biol (Paris)* 45:63-96
27. De Jonghe P, Nelis E, Simokovic S, Timmerman V, Martin JJ, Broeckhoven C van (1996) The X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease type 1: clinical and electrophysiological features. *Eur J Hum Genet* 4 (Suppl 1):2
28. De Jonghe P, Timmerman V, Nelis E, Martin JJ, Broeckhoven C van (1997) Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *J Periph Nerv Sys* 2:370-387
29. De Jonghe P, Timmerman V, de Visser M, Brice A, Broeckhoven C van and co-authors (1998) Classification and diagnostic guidelines for Charcot-Marie-Tooth type 2 (CMT2 – HMSN II) and distal hereditary motor neuropathy (distal HMN – spinal CMT). *Neuromusc Disord* 8:426-431
30. Dermietzel R, Spray DC (1993) Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci* 16:186-192
31. Dermietzel R, Farooq M, Kessler JA, Althaus H, Hertzberg EL, Spray DC (1997) Oligodendrocytes express gap junction proteins connexin31 and connexin45. *Glia* 20:101-114
32. Deschênes SM, Walcott JL, Wexler TL, Scherer SS, Fischbech KH (1997) Altered trafficking of mutant connexin32. *J Neurosci* 17:977-9084
33. Dezawa M, Mutoh T, Dezawa A, Adachi-Usami E (1998) Putative gap junctional communication between axon and regenerating Schwann cells during mammalian peripheral nerve regeneration. *Neuroscience* 85:663-667
34. Donaldson P, Eckert R, Green C, Kistler J (1997) Gap junction channels: new roles in disease. *Histol Histopathol* 12:219-231
35. Dyck PJ, Lambert EH (1968) Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy: I. Neurologic, genetic and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies. *Arch Neurol* 18:603-618

36. Dyck PJ, Chance P, Lebo R, Carney JA (1993) Hereditary motor and sensory neuropathies. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Podulso JF (eds) *Peripheral neuropathy*. Saunders, Philadelphia, pp 1094-1136
37. Fairweather N, Bell C, Cochrane S, Chelly J, Wang S, Mostacciuolo ML, Monaco AP, Haite NE (1994) Mutations in the connexin32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). *Hum Mol Genet* 3:29-34
38. Gabreëls-Festen AAWM, Gabreëls FJM, Hoogendijk JE, Bolhuis PA, Jongen PJH, Vingerhoets HM (1993) Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy or hereditary motor and sensory neuropathy? Diagnostic value of morphological criteria. *Acta Neuropathol* 86:630-635
39. Gal A, Mücke J, Theile H, Wieacker PF, Ropers HH, Wienker TF (1985) X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease: suggestion of linkage with a cloned DNA sequence from the proximal Xq. *Hum Genet* 70:38-42
40. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65:475-502
41. Gros DB, Jongsma HJ (1996) Connexins in mammalian heart function. *BioEssays* 18:719-730
42. Hahn AF, Brown WF, Koopman WJ, Feasby TE (1990) X-linked dominant hereditary motor and sensory neuropathy. *Brain* 113:1511-1525
43. Hahn AF (1993) Hereditary motor and sensory neuropathy: HMSN type II (neuronal type) and X-linked HMSN. *Brain Pathol* 3:147-155
44. Harding AE, Thomas PK (1980) The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 103:259-280
45. Hayasaka K, Himoro M, Sato W, Takada G, Uyemura K, Shimizu N, Bird TD, Conneally PM, Chance PF (1993) Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nat Genet* 5:31-34
46. Hoogendijk JE, de Visser M (1991) Hereditary motor and sensory neuropathy types I and II (Charcot-Marie-Tooth disease). *Handb Clin Neurol* 60:185-211
47. Ionasescu V, Searby C, Ionasescu R, Meschino W (1995a) New point mutations and deletions of the connexin32 gene in X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neuromusc Disord* 5:297-299
48. Ionasescu VV (1995b) Charcot-Marie-Tooth disease: from clinical description to molecular genetics. *Muscle Nerve* 18:267-275

49. Ionasescu VV, Searby C, Ionasescu R, Neuhaus IM, Werner R (1996a) Mutations of the noncoding region of the connexin32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neurology* 47:541-544
50. Ionasescu V, Ionasescu R, Searby C (1996b) Correlation between connexin32 gene mutations and clinical phenotype in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Am J Med Genet* 63:486-491
51. Iselius L, Grimby L (1982) A family with Charcot-Marie-Tooth's disease, showing a probable X-linked incompletely dominant inheritance. *Hereditas* 97:157-158
52. Jessen KR, Mirsky R (1998) Origin and early development of Schwann cells. *Microsc Res Tech* 41:393-402
53. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (1991) Principles of neural science. Appleton & Lange, Norwalk CT
54. Kumar NM, Gilula NB (1986) Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J Cell Biol* 103:767-776
55. Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388
56. Kwon JM, Elliott JL, Yee W, Ivanovich J, Scavarda NJ, Moolsintong PJ, Goodfellow PJ (1995) Assignment of a second Charcot-Marie-Tooth type II locus to chromosome 3q. *Am J Hum Genet* 57:853-858
57. Latour P, Lévy N, Paret M, Chapon F, Chazot G, Clavelou P, Couratier P, Dumas R, Ollagnon E, Pouget J, Setiey A, Vallat JM, Boucherat M, Fontes M, Vandenberghe A (1997) Mutations in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease in the French population. *Neurogenetics* 1:117-123
58. Lechner-Scott JS, Scott RJ, Steck AJ, Kappos L (1995) Hereditäre motorisch-sensible Neuropathien. Klinische und molekulargenetische Aspekte. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* 146:157-167
59. Lupski JR, Montes de Oca-Luna R, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzeta V, Trask BJ, Sancedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, Chakravarti A, Patel PI (1991) DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66:219-232
60. Milks LC, Kumar NM, Houghten R, Unwin N, Gilula NB (1988) Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. *EMBO J* 7:2967-2975

61. Miller T, Dahl G, Werner R (1988) Structure of a gap junction gene: rat connexin-32. *Biosci Rep* 8:455-464
62. Molenaar DSM, de Haan R, Vermeulen M (1995) Impairment, disability, or handicap in peripheral neuropathy: analysis of the use of outcome measures in clinical trials in patients with peripheral neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59:165-169
63. Mostacciuolo ML, Müller E, Fardin P, Micaglio GF, Bardoni B, Guioli S, Camerino G, Danieli GA (1991) X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. A linkage study in a large family by using 12 probes of the pericentromeric region. *Hum Genet* 87:23-27
64. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273
65. Nelis E, Timmerman V, De Jonghe P, Muylle L, Martin JJ, Broeckhoven C van (1994) Linkage and mutation analysis in an extended family with Charcot-Marie-Tooth disease type 1B. *J Med Genet* 31:811-815
66. Nelis E, Broeckhoven C van, and co-authors (1996) Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet* 4:25-33
67. Nelles E, Butzler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stumpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R, Willecke K (1996) Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9565-9570
68. Nicholson G, Nash J (1993) Intermediate nerve conduction velocities define X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy families. *Neurology* 43:2558-2564
69. Nicholson G, Corbett A (1996) Slowing of central conduction in X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy shown by brain stem auditory evoked responses. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 61:43-46
70. Njegovan ME, Leonard EI, Joseph FB (1997) Rehabilitation medicine approach to Charcot-Marie-Tooth disease. *Clin Podiatr Med Surg* 14:99-116
71. Oh S, Ri Y, Bennett MV, Trexler EB, Verselis VK, Bargiello TA (1997) Changes in permeability caused by connexin 32 mutations underlie X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 19:927-938
72. Omori Y, Mesnil M, Yamasaki H (1996) Connexin32 mutations from X-linked Charcot-Marie-Tooth disease patients: functional defects and dominant negative effects.

73. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2766-2770
74. Orth U, Fairweather N, Exler MC, Schwinger E, Gal A (1994) X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy: valine-38-methionine substitution of connexin32. *Hum Mol Genet* 3:1699-1700
75. Othmane KB, Middleton LT, Loprest LJ, Wilkinson KM, Lennon F, Rozear MP, Stajich JM, Gaskell PC, Roses AD, Pericak-Vance MA, Vance JM (1993) Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 17:370-375
76. Patel PI, Roa BB, Welcher AA, Schoener-Scott R, Trask BJ, Pentao L, Snipes GJ, Garcia CA, Francke U, Shooter EM, Lupski JR, Suter U (1992) The gene for the peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1:159-165
77. Paul DL (1995) New functions for gap junctions. *Curr Opin Cell Biol* 7:665-672
78. Peracchia C, Wang XG (1997) Connexin domains relevant to the chemical gating of gap junction channels. *Braz J Biol Res* 30:577-590
79. Rabadan-Diehl C, Dahl G, Werner R (1994) A connexin32 mutation associated with Charcot-Marie-Tooth disease does not affect channel formation in oocytes. *FEBS Lett* 351:90-94
80. Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, Barker DF, Martin JJ, De Visser M, Bolhuis PA, Broeckhoven C van, and the HMSN collaborative research group (1991) Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A (CMT1A). *Neuromusc Disord* 1:93-97
81. Ressot C, Gomes D, Dautigny A, Pham-Dinh D, Bruzzone R (1998) Connexin32 mutations associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease show two distinct behaviors: loss of function and altered gating properties. *J Neurosci* 18:4063-4075
82. Reynolds ML, Woolf CJ (1993) Reciprocal Schwann cell-axon interactions. *Curr Opin Neurobiol* 3:683-693
83. Roa BB, Garcia CA, Suter U, Kulpa DA, Wise CA, Müller J, Welcher AA, Snipes GJ, Shooter EM, Patel PI, Lupski JR (1993) Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med* 329:96-

84. Rouger H, LeGuern E, Birouk N, Gouider R, Tardieu S, Plassart E, Gugenheim M, Vallat JM, Louboutin JP, Bouche P, Agid Y, Brice A (1997) Charcot-Marie-Tooth disease with intermediate motor nerve conduction velocities: characterization of 14 Cx32 mutations in 35 families. *Hum Mut* 10:443-452
85. Roussy G, Lévy G (1926) Sept cas d'une maladie familiale particulière. *Nev Neurol* 1:427-450
86. Rozear MP, Pericak-Vance MA, Fischbeck K, Stajich JM, Gaskell PC, Krendel DA, Graham DG, Dawson DV, Roses AD (1987) Hereditary motor and sensory neuropathy, X-linked: a half century follow-up. *Neurology* 37:1460-1465
87. Rubin JB, Verselis VK, Bennet MVL, Bargiello TA (1992) Molecular analysis of voltage dependence of heterotypic gap junctions formed by connexins 26 and 32. *Biophys J* 62:183-195
88. Sahenk Z, Chen L (1998) Abnormalities in the axonal cytoskeleton induced by a connexin32 mutation in nerve xenografts. *J Neurosci Res* 51:174-184
89. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
90. Salisachs P, Codina A, Gimenez-Roldan S, Zarranz JJ (1979) Charcot-Marie-Tooth disease with 'essential tremor' and normal and/or slightly diminished motor conduction velocity. Report of 7 cases. *Eur Neurol* 18:49-58
91. Sander S, Nicholson GA, Ouvrier RA, McLeod JG, Pollard JD (1998) Charcot-Marie-Tooth disease: histopathological features of the peripheral myelin protein (PMP22) duplication (CMT1A) and connexin32 mutations (CMTX1). *Muscle Nerve* 21:217-225
92. Sandri C, Van Buren JM, Akert K (1982) Membrane morphology of the vertebrate nervous system. *Prog Brain Res* 46:201-265
93. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
94. Satake M, Yoshimura T, Ohnishi A, Kobayashi T (1997) Connexin32 gene expression in rat sciatic nerves and cultured Schwann cells. *Dev Neurosci* 19:189-195
95. Scherer SS, Deschênes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL (1995) Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* 15:8281-8294
96. Scherer SS (1997) The biology and pathobiology of Schwann cells. *Curr Opin Neurol*

97. Scherer SS, Xu Yt, Nelles E, Fischbeck K, Willecke K, Bone LJ (1998) Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy. *Glia* 24:8-20
98. Schiavon F, Fracasso C, Mostacciuolo ML (1996) Novel missense mutation of the connexin32 (GJB1) gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum Mutat* 8:83-84
99. Schröder JM (1984) Zur Pathologie der Neuropathien. *Internist* 25:589-598
100. Schröder JM, Sommer C (1991) Mitochondrial abnormalities in human sural nerves: fine structural evaluation of cases with mitochondrial myopathy, hereditary and non-hereditary neuropathies, and reviews of the literature. *Acta Neuropathol* 82:471-482
101. Schröder JM, Himmelmann F (1992) Fine structural evaluation of altered Schmidt-Lanterman incisures in human sural nerve biopsies. *Acta Neuropathol* 83:120-133
102. Schröder JM (1996) Developmental and pathological changes at the node and paranode in human sural nerves. *Micros Res Tech* 34:422-435
103. Schröder JM (1997) Peripheral neuropathies. Correlation between molecular genetic and fine structural diagnosis of inherited peripheral neuropathies. *Brain Pathol* 7:1299-1302
104. Schröder JM (1998) Recommendations for the use of peripheral nerve biopsy. *Virchows Arch* 432:199-205
105. Silander K, Meretoja P, Pihko H, Juvonen V, Issakainen J, Aula P, Savontaus ML (1997) Screening for connexin32 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease families with possible X-linked inheritance. *Hum Genet* 100:391-397
106. Sosinsky GE (1996) Molecular organization of gap junction membrane channels. *J Bioenerg Biomembr* 28:297-309
107. Spray DC, Dermietzel R (1995) X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease and other potential gap-junction diseases of the nervous system. *Trends Neurosci* 18:256-262
108. Taylor GR (1991) Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR: PCR - a practical approach. IRL Press at Oxford University Press (pp. 1-14)
109. Thiex R, Schröder JM (1998) PMP-22 gene duplications and deletions identified in archival, paraffin-embedded sural nerve biopsies: correlation to structural changes. *Acta Neuropathol* 96:13-21
110. Thomas PK, King RHM, Small JR, Robertson AM (1996) The pathology of Charcot-

- Marie-Tooth disease and related disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22:269-284
111. Thomas PK, Marques W, Davis MB, Sweeney MG, King RH, Bradley JL, Muddle JR, Tyson J, Malcolm S, Harding AE (1997) The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain* 120:465-478
 112. Timmerman V, Nelis E, Hul W van, Nieuwenhuijsen BW, Chen KL, Wang S, Othman BK, Cullen B, Leach RJ, Hanemann CO, De Jonghe P, Raeymaekers P, Ommen GJB van, Martin JJ, Müller HW, Vance Jm, Fischbeck KH, Broeckhoven C van (1992) The peripheral myelin protein gene PMP-22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Nat Genet* 1:171-175
 113. Timmerman V, De Jonghe P, Spoelders P, Simokovic S, Löfgren A, Nelis E, Vance J, Martin JJ, Broeckhoven C van (1996) Linkage and mutation analysis of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2 families with chromosomes 1p35-p36 and Xq13. *Neurology* 46:1311-1318
 114. Tooth HH (1886) The peroneal type of progressive muscular atrophy. Lewis, London
 115. Valentijn LJ, Baas F, Wolterman RA, Hoogendijk JE, Bosch NHA van den, Zorn I, Gabreëls-Festen AAWM, de Visser M, Bolhuis PA (1992) Identical point mutations of PMP22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 2:288-291
 116. Veenstra RD (1996) Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins. *J Bioenerg Biomembr* 28:327-337
 117. Verselis VK, Ginter CS, Bargiello TA (1994) Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. *Nature* 368:348-351
 118. 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. *Nature Genet* 18:382-384
 119. White TW, Bruzzone R (1996) Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and functional consequences. *J Bioenerg Biomembr* 28:339-350
 120. Wicklein EM, Orth U, Gal A, Kunze K (1997) Missense mutation (R15W) of the connexin32 gene in a family with X chromosomal Charcot-Marie-Tooth neuropathy with only female members affected. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63:379-381
 121. Wicklein EM, Pfeiffer G, Ratusinski T, Kunze K (1997) Charcot-Marie-Tooth Syndrom Typ I. Behinderung und Management. *Nervenarzt* 68:358-362

122. Woratz G (1964) Neurale Muskelatrophie mit dominantem X-chromosomalem Erbgang. Abh Dtsch Akad Wissensch Berl Nr.2
123. Yamasaki H, Naus CCG (1996) Role of connexin genes in growth control. Carcinogenesis 17:1199-1213
124. Yeager M, Nicholson BJ (1996) Structure of gap junction intercellular channels. Curr Opin Struct Biol 6:183-192
125. Yoshimura T, Satake M, Ohnishi A, Tsutsumi Y, Fujikura Y (1998) Mutations of connexin32 in Charcot-Marie-Tooth disease type X interfere with cell-to-cell communication but not cell proliferation and myelin-specific gene expression. J Neurosci Res 51:154-161

10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung von Herrn Prof. Dr. med. J. M. Schröder am Institut für Neuropathologie der RWTH Aachen.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. J. M. Schröder für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die stets gewährte Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Zudem ermöglichte er mir durch die Arbeit in seinem molekulargenetischen Labor einen interessanten Einblick in den Alltag experimenteller Forschung.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Jan Senderek, der mir durch seine unschätzbare und zuverlässige Zusammenarbeit in jeglicher Hinsicht ein treuer Weggefährte und Freund war.

Auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums Aachen möchte ich danken, da sie sich stets durch ihre freundliche und hilfsbereite Art auszeichneten.

Mein Dank gilt ebenso den Kliniken und betreuenden Ärzten der aufgeführten Patienten, hierbei insbesondere der Klinik für Kinderheilkunde und für Neurologie der RWTH Aachen.

Danken möchte ich überdies allen in dieser Arbeit beschriebenen Patienten und ihren Familien für ihre Kooperationsbereitschaft und das entgegengebrachte Vertrauen.

Außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium und meine Ausbildung ermöglichten und meinen Werdegang uneingeschränkt unterstützten.

Abschließend möchte ich all denen danken, die hier nicht explizit erwähnt wurden, aber dennoch direkt oder indirekt an Gelingen und Fertigstellung meiner Dissertation beteiligt waren.

Aachen, im Oktober 1998

Carsten Bergmann

11. Anhang

Klinische und elektrophysiologische Daten

Familie	Mutation	Patient	Geschlecht	Erkrankungs- beginn	Fuß- deformität ^a	Muskel- atrophie ^b	Gang- störung ^c	Reflexab- schwächung ^d		Sensible Defizite ^e	Nervenleitgeschwindigkeit (m/s)		
								ASR	PSR		Medianus	Tibialis Peroneus	
AC04	Ala39Val	I-1	W	-(50 J.)	-	-	-	-	-	-	35	43	33.9
		II-2	M	17	+	++	+	++		+	33.3	36	30
AC06	679insT	I-2	W	-(57 J.)	-	-	-	-	-	-			
		II-1	M	8	++	++	++	+	++	++	32.7	36	
		II-2	W	-(40 J.)	-	-	-	-	-	-		38	
		II-3	W	-(43 J.)	-	-	-	-	-	-	40		
		III-1	W	-(3 J.)	-	-	-	-	-	-			
		III-4	M	12	+	+	+	++	++	-	29	37	
AC36	Arg22Gln	II-1	M	25	++	++	++	+	++	+	33		32
		II-2	W	35	+	+	+	+	+	+	35		59
		III-1	W	-(34 J.)	-	-	-	-	-	-			
		III-2	M	26	+	+	+	++	++	++	33.3	31	32.6
		III-3	W	32	+	+	+	++	+	+	36	39	
		IV-1	M	9	++	++	+	+	+	+		35.7	36

Familie	Mutation	Patient	Geschlecht	Erkrankungs- beginn	Fuß- deformität ^a	Muskel- atrophie ^b	Gang- störung ^c	Reflexab- schwächung ^d		Sensible Defizite ^e	Nervenleitgeschwindigkeit		
								ASR	PSR		Medianus	Tibialis	Peroneus
AC40	Arg15Trp	I-1	W	50	+	-	+	-	-	-			
		II-1	W	40	+	+	+	++	+	+	43.8	58.9	43.5
		II-2	W	35	+	+	+	++	+	+	42		37.2
		II-3	W	15	++	++	++	++	++	+	44		
		II-5	W	-(49 J.)	-	-	-	-	-	-	44	44	
		III-1	M	25	+	+	+	++	+	+	27.7	27.2	
		III-2	M	19	++	++	++	++	+	++		23.6	
		III-4 ^f	M	6	+++	+++ ^f	+++ ^f	++	++	++		29.2	40
		III-7	W	-(26 J.)	-	-	-	-	-	-	49	45	

^aFußdeformität: keine Fußdeformität (-); Fußdeformität ohne Behinderung (+); benötigt orthopädisches Schuhwerk (++); chirurgische Korrektur (+++)

^bMuskelatrophie: nicht vorhanden (-); gering ausgeprägt (+); deutlich ausgeprägt (++); stark ausgeprägt (+++)

^cGangstörung: nicht vorhanden (-); Schwierigkeiten beim Laufen (+); Steppergang (++); benötigt Gehhilfen (+++)

^dReflexabschwächung: nicht abgeschwächt (-); abgeschwächt (+); nicht auslösbar (++)

^eSensible Defizite: normal ausgeprägte Sensibilität (-); eingeschränkte distale Sensibilität (+); distaler Sensibilitätsverlust (++)

^fRollstuhlabhängiger Patient mit zusätzlicher proximaler Muskelatrophie, der gleichzeitig eine Deletion der Exone 3-7 im Dystrophin-Gen aufweist

Tabelle 1: Morphometrische Auswertung

	Geschlecht	Alter z. Z. der Biopsie	NF/ mm ²	MF (%)
Ac04.II-2	M	29	6516	5,55
Ac06.II-1	M	30	6299	7,97
Ac36.IV-1	M	11	9361	15,76
Ac40.II-1	W	44	6866	11,26
Kontrollen ^a			10 069 ± 1347	24,34 ± 1,05

NF/ mm²: Anzahl der Nervenfasern pro mm²

MF (%): Prozentualer Anteil der Myelinfläche an der Fläche des Endoneuriums

^a Mittelwerte ± Standardabweichung, $n = 5$

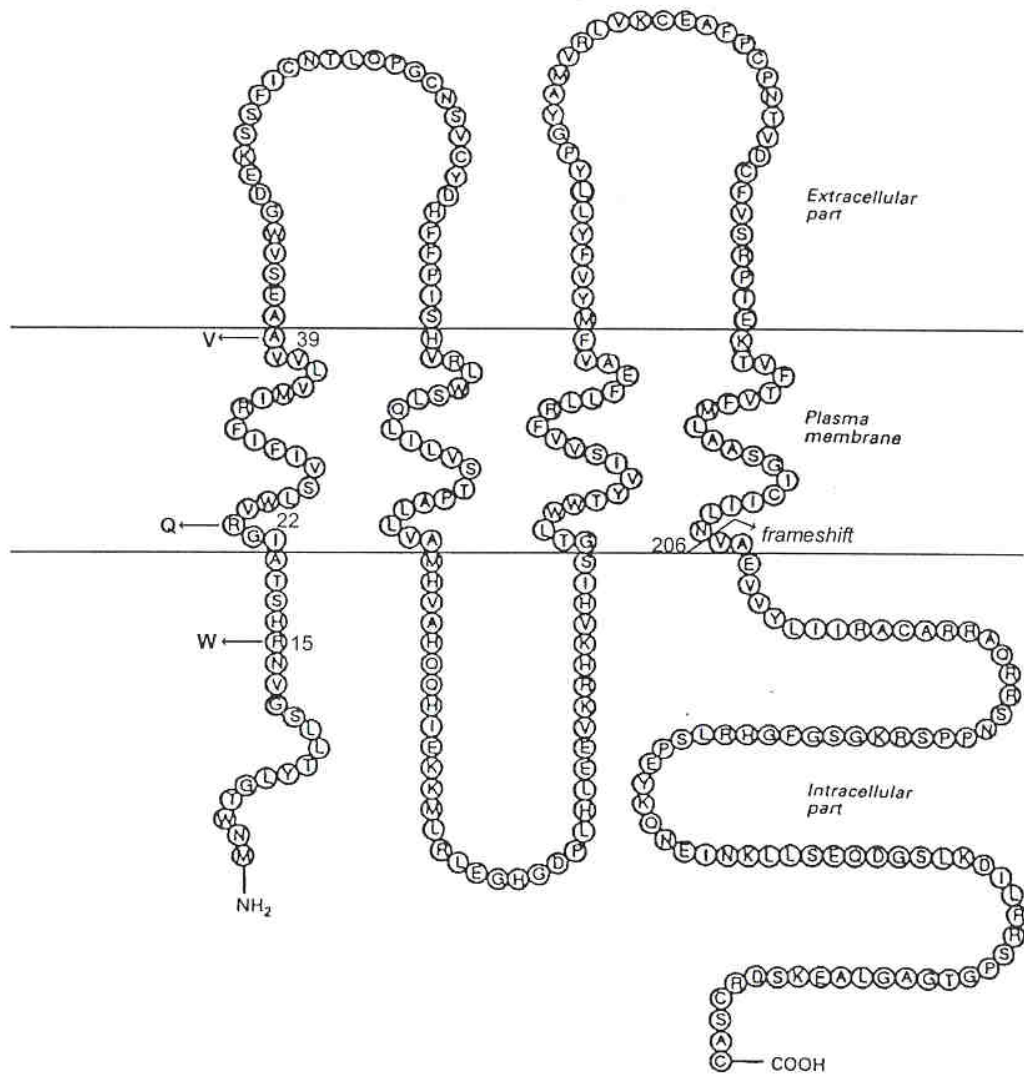


Abb. 1

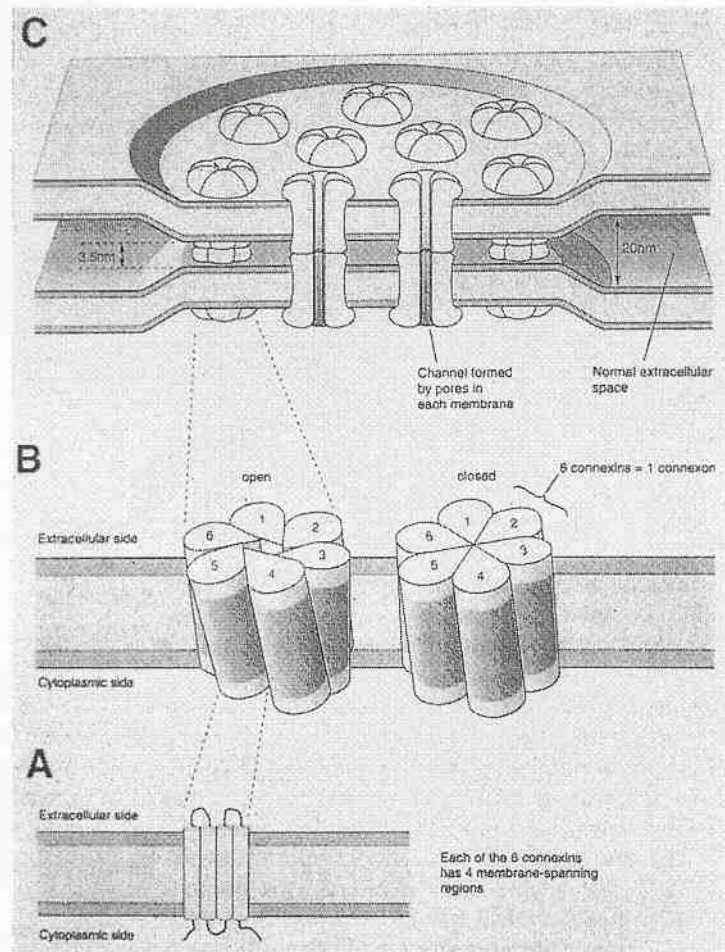


Abb. 2

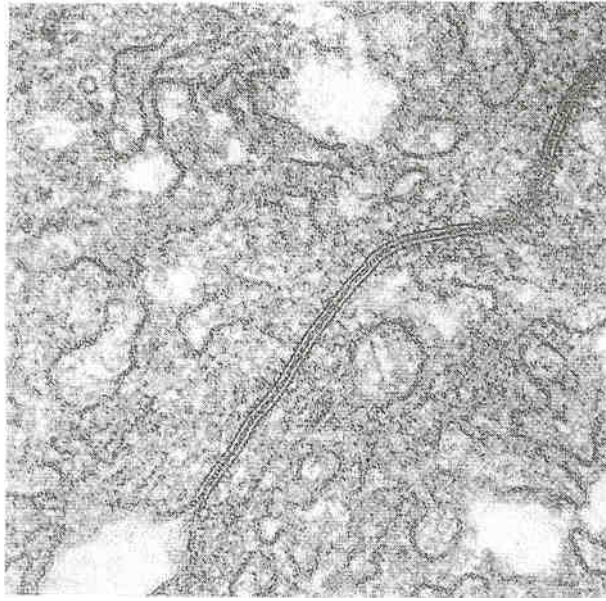


Abb. 3

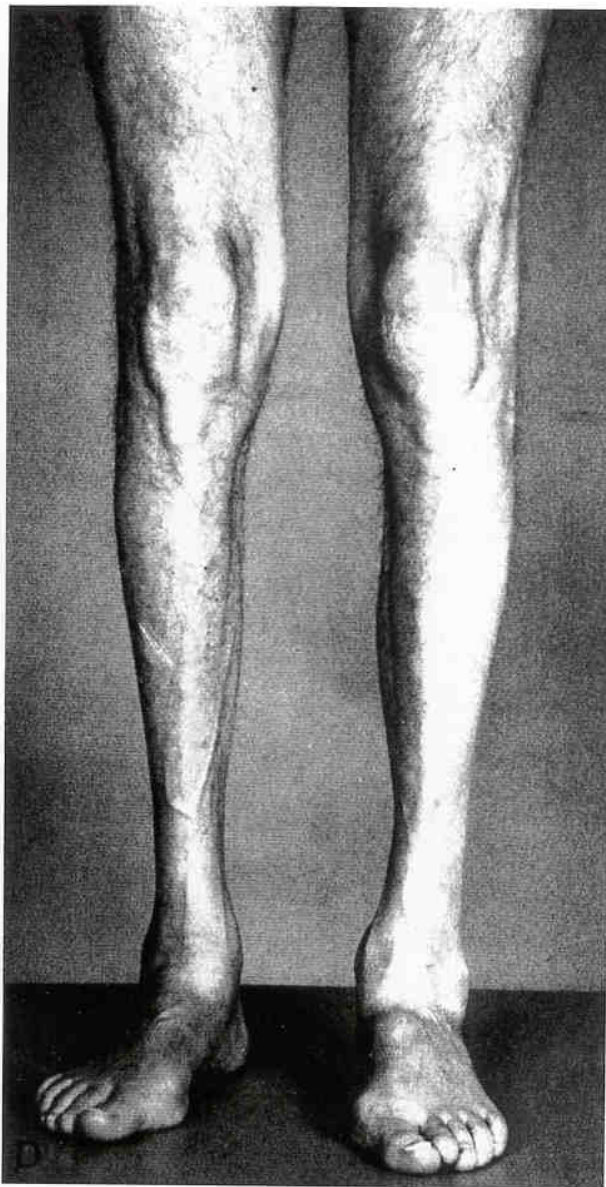
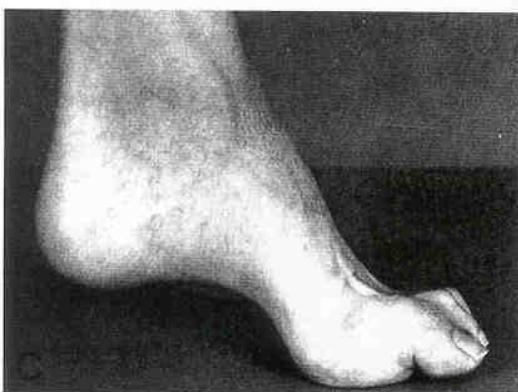


Abb. 4

DIAGRAM OF SSCP REACTION

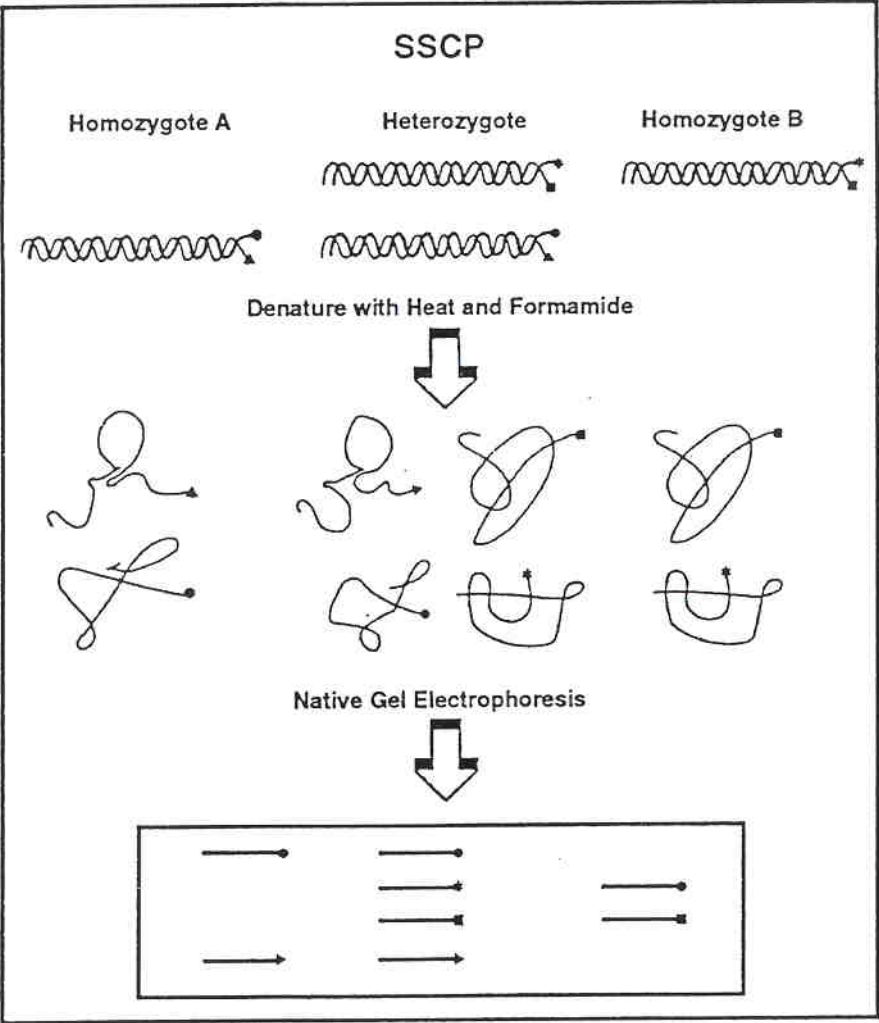


Abb. 5

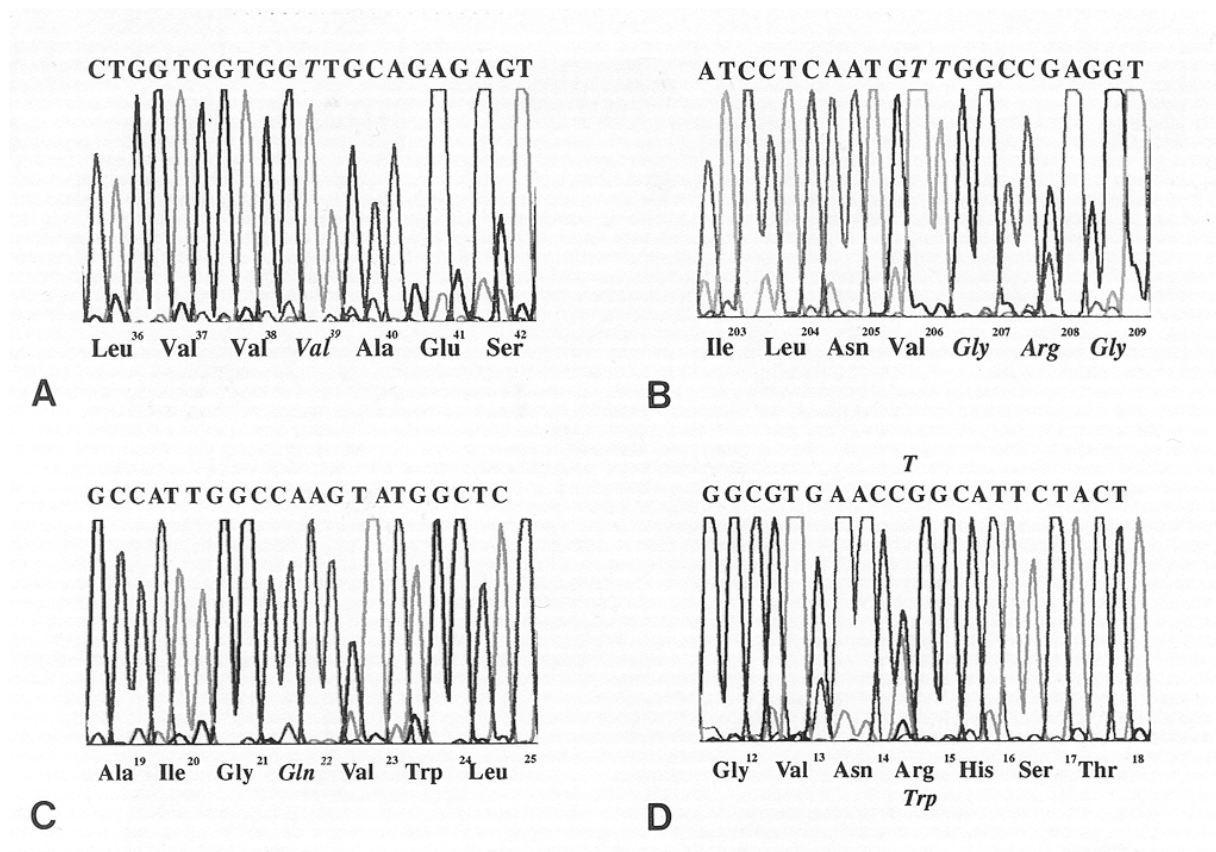


Abb. 6

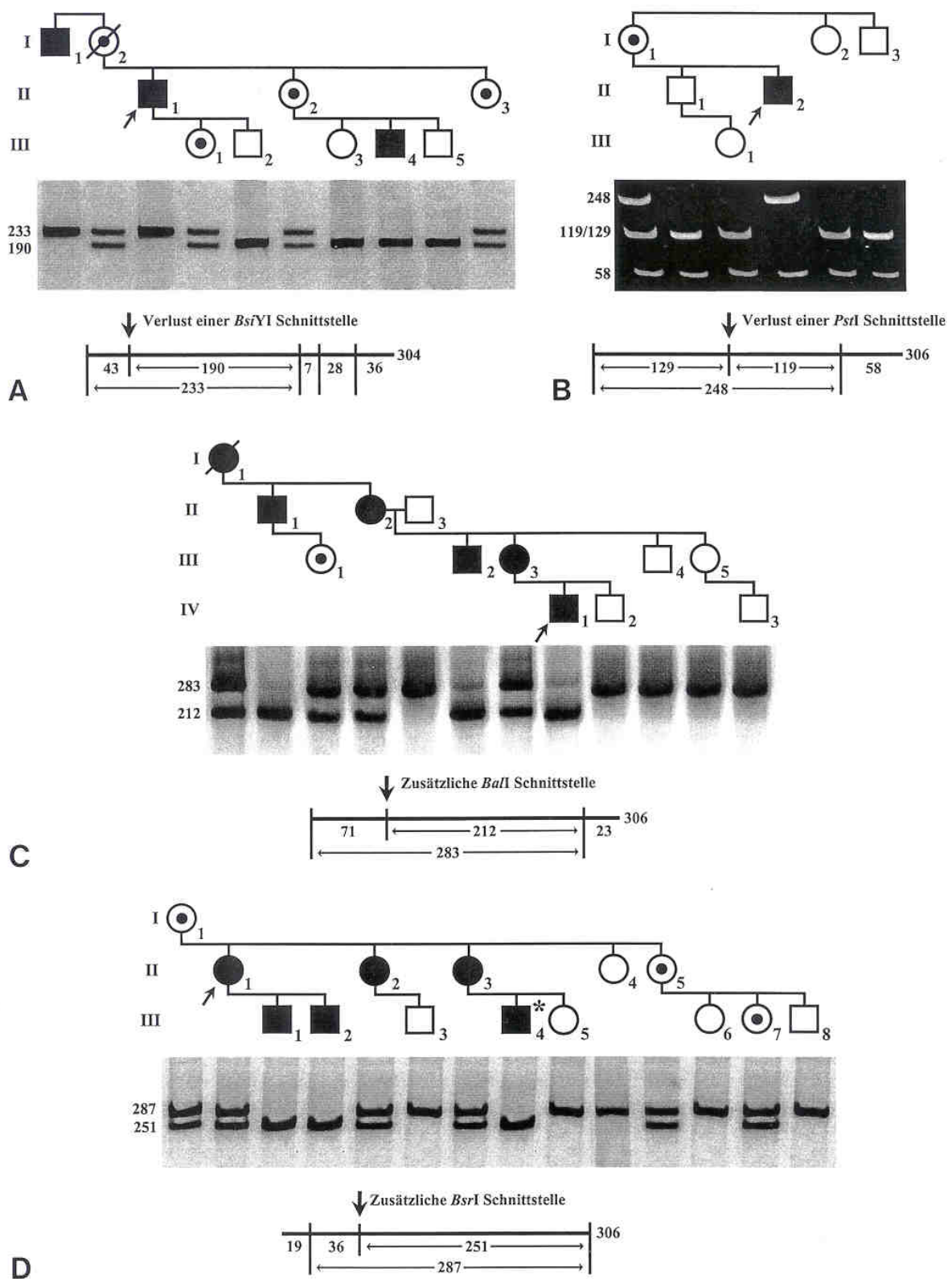


Abb. 7

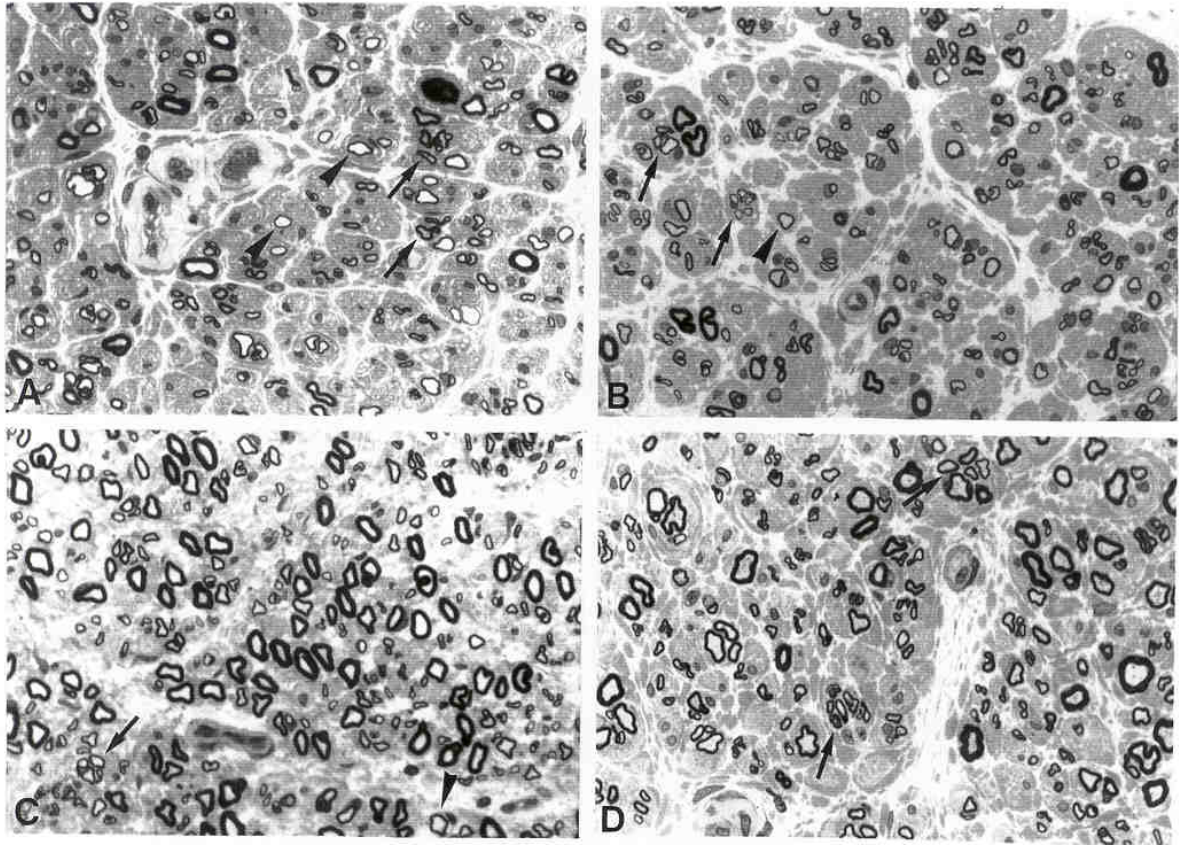
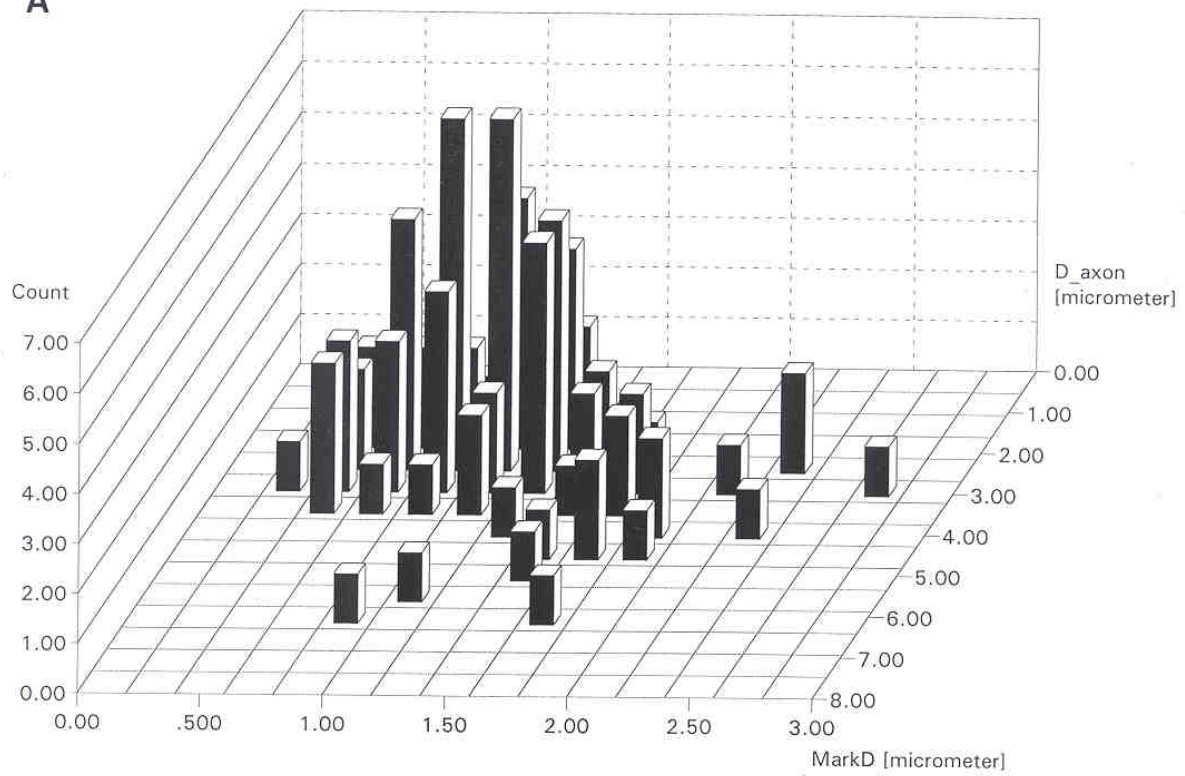


Abb. 8

A



B

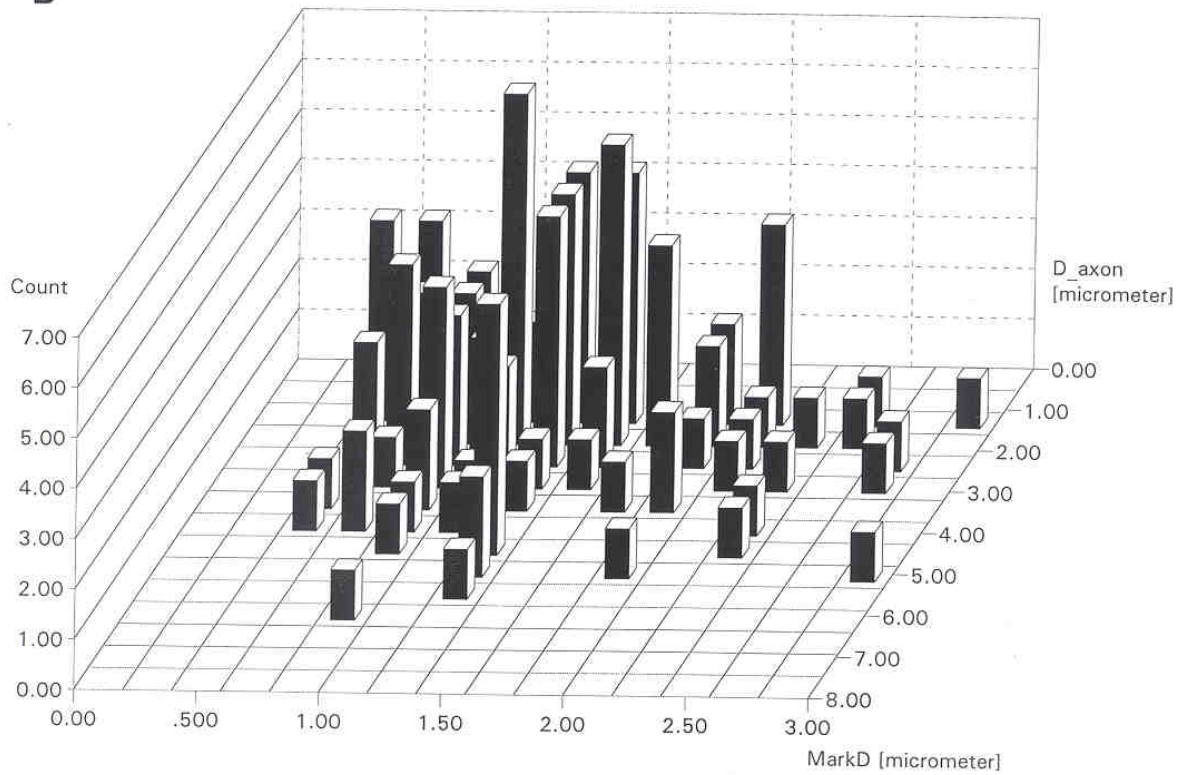
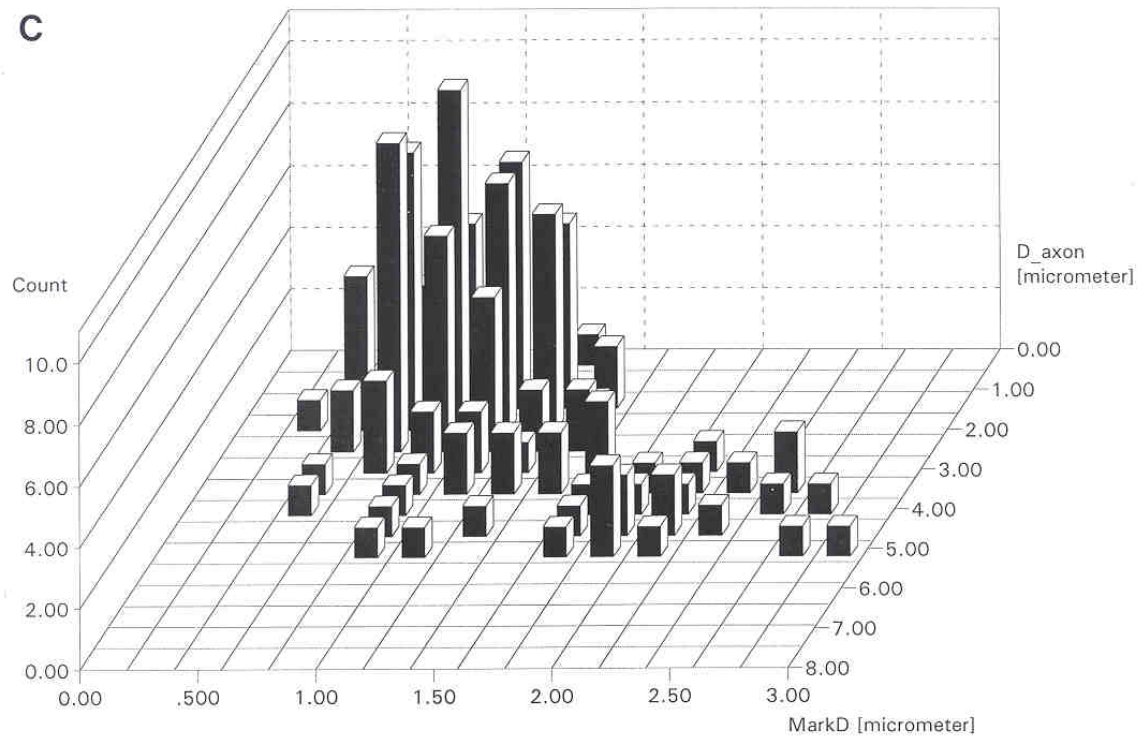
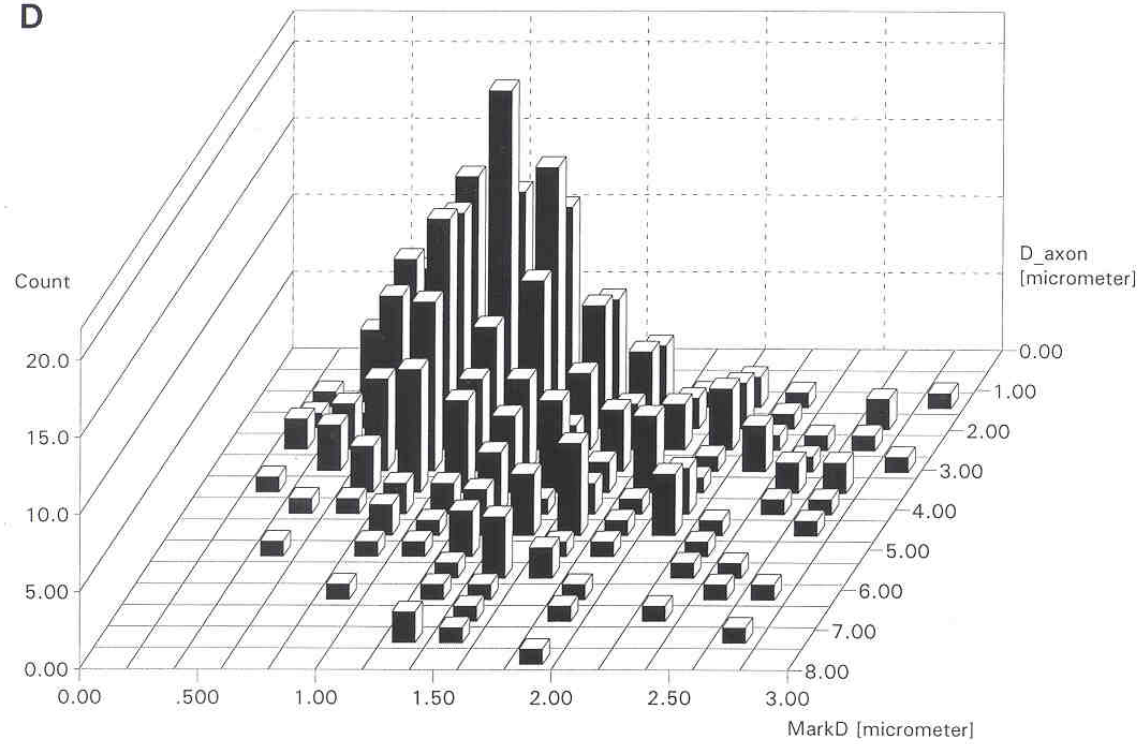


Abb. 9

C**D**

Abbildungslegenden

Abb. 1: Diagramm des Connexin32-Proteins, wobei die Aminosäuresequenz im Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben ist. Die 4 innerhalb dieser Studie nachgewiesenen CMTX-Mutationen sind durch Pfeile gekennzeichnet (modifiziert nach BONE et al. 1995).

Abb. 2: Schematische Darstellung der molekularen Vorgänge, die letztlich zur Ausbildung interzellulärer Kanäle führen. Zunächst oligomerisieren einzelne Connexin-Proteine (A) zur hexameren Struktur des Connexons (B). Daraufhin koppelt der extrazellulär lokalisierte Bereich des Connexons an selbigen benachbarter Zellen an, um auf diese Weise funktionsfähige, interzelluläre Kanäle auszubilden, die in größerer Anzahl sog. gap junctions beschreiben (C) (modifiziert nach KANDEL et al. 1991).

Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer gap junction. Der Interzellularspalt mißt im Bereich der gap junction etwa 3-4 nm (aus L.C. Junqueira und J. Carneiro, Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen, zweite, korrigierte Auflage, 1986, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo).

Abb. 4 A-D: Phänotypische CMTX-Merkmale. (A) Krallenhand mit deutlich ausgeprägter Atrophie der Thenar- und intrinsischen Handmuskulatur. (B) Klumpfüße und daraus resultierende, abnorme Druckpunkte, die insbesondere am linken, lateralen Fußrücken zu beobachten sind. (C) Hohlfußdeformität mit Hammerzehenbildung. (D) „Storchenbeine“ mit ausgeprägter Atrophie der Unterschenkelmuskulatur (aus HOOGENDIJK und DE VISSER 1991).

Abb. 5: Prinzip der SSCP-Gelelektrophorese (Informationsbeilage der Firma FMC Bioproducts [Rockland, Me., USA] zum MDE-Gel).

Abb. 6 A-D: DNA-Sequenzanalysen der 4 Index-Patienten identifizierten den jeweils vorliegenden Basen- und hieraus resultierenden Aminosäureaustausch. (A) Ac04: Ala39Val; (B) Ac06: 679insT; (C) Ac36: Arg22Gln; (D) Ac40: Arg15Trp.

Abb. 7 A-D: Mittels Restriktionsverdau ließ sich die Übereinstimmung von Phäno- und

Genotyp in den jeweiligen Familien bestätigen: (A) Familie Ac06: Die Insertion einer zusätzlichen Thymin-Base (T) in Codon 206 läßt sich durch Wegfall einer *Bsi*YI-Schnittstelle zur Darstellung bringen. Demzufolge weisen sowohl der Index-Fall als auch sämtliche heterozygote Patientinnen ein neuartiges 233-bp großes Fragment auf. Im Falle der verstorbenen Konduktorin I-2 wurde die DNA-Extraktion an Paraffin-eingebettetem Ovarialgewebe durchgeführt, welches im Jahre 1989 aufgrund eines metastasierten Magen-Karzinoms entfernt werden mußte. (B) Familie Ac04: Die Mutation von GCT (Ala) zu GTT (Val) in Codon 39 des Connexin32-Proteins hat den Verlust einer *Pst*I-Schnittstelle zur Folge. Hieraus resultiert ein neues 248-bp großes Fragment, welches den Index-Patienten und seine Mutter als Allelträger identifizieren. (C) Familie Ac36: Der Basenaustausch von G zu A in Codon 22 führt zu einer Substitution von Arginin durch Glutamin und zu einer neu entstandenen Restriktionsschnittstelle für das Enzym *Bal*I, so daß Allelträger anstelle des 283-bp großen Fragments DNA-Banden in Höhe von 212- und 71-bp aufweisen. Die Extraktion genomischer DNA im Falle der bereits verstorbenen Patientin Ac36.I-1 gelang aus Paraffin-eingebettetem Gallenblasengewebe, welches aufgrund einer 1971 durchgeführten Cholezystektomie anfiel. (D) Familie Ac40: Die in dieser Familie zu beobachtende Veränderung von C zu T in Codon 15 hat einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Tryptophan zur Folge. Hierdurch wird eine neue Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bsr*I innerhalb des 287 bp großen WT-Fragmentes geschaffen, woraufhin Allelträger ein kürzeres, 251 bp großes Bruchstück aufweisen. Patient III-4 (mit * gekennzeichnet) weist eine zusätzliche Becker'sche Muskeldystrophie mit einer Deletion des Dystrophin-Gens auf. (Index-Patienten sind mit einem Pfeil versehen. Die Ziffern links der Gellaufmuster und innerhalb der Schemazeichnungen markieren die Größe der jeweiligen Verdauungsprodukte (in bp). Auf den Gelausschnitten nicht zur Darstellung gelangen die lediglich 7, 28, 36 und 43 bp großen Fragmente in (A), die 23 und 71 bp großen Banden in (C), und schließlich die 19 und 36 bp großen Fragmente in (D).)

Abb. 8 A-D: Suralnervenbiopsie-Querschnitte der Index-Patienten (in Klammern das jeweilige Alter zum Zeitpunkt der Biopsie): (A) Patient Ac04 (29 J.), (B) Patient Ac06 (30 J.), (C) Patient Ac36 (11 J.), und (D) Patientin Ac40 (44 J.). Die Anzahl großer, myelinisierter Nervenfasern zeigt sich vermindert, während Anhäufungen von Gruppen regenerierter, dünn myelinisierter Fasern vermehrt zu beobachten sind (Pfeile). Einzelne isolierte Axone weisen unverhältnismäßig dünne Myelinscheiden auf (Pfeilköpfe). Der mit dem Alter fortschreitende

Faserverlust wird durch die Querschnitte der älteren Patienten (A), (B) und (D) belegt (in Epoxydharz eingebettete Semidünnschnitte, Toluidinblau gefärbt, x400).

Abb. 9 A-D: Dreidimensionale Diagrammdarstellungen, welche Anzahl (*Count*, y-Achse), Myelinscheidendicke (*MarkD*, x-Achse) und Axondurchmesser (*D_axon*, z-Achse) der jeweiligen myelinisierten Nervenfasern miteinander korrelieren. Hierbei läßt sich eine zahlenmäßige Verminderung großer myelinisierter Fasern und eine bemerkenswerte Streuung beobachten, die das gesamte Ausmaß abnorm dünn oder dick myelinisierter Fasern widerspiegelt: (A) Patient Ac04, (B) Patient Ac06, (C) Patient Ac36, und (D) Patientin Ac40.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname:	Carsten Bergmann
Geburtsdatum:	7. Oktober 1972
Geburtsort:	Mönchengladbach
Familienstand/Kinder:	ledig/keine
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	röm.-kath.
Eltern:	Wolfgang Emil Bergmann Maria Katharina Bergmann, geb. Friedrich
Geschwister:	Peter Bergmann

Schulbildung

1979-1983	Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Baal
1983-1992	Besuch des Cusanus Gymnasiums Erkelenz
Juni 1992	Abiturprüfung

Zivildienst

Juli 1992 - September 1993	St.Josef Krankenhaus Linnich Funktionsdiagnostik Endoskopie/ Elektrokardiographie
----------------------------	---

Hochschulstudium

Oktober 1993	Immatrikulation an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
August 1995	Physikum
August 1996	1.Staatsexamen
April 1999	2.Staatsexamen
April 1999 - März 2000	Praktisches Jahr mit dem Wahlfach Pädiatrie
Mai 2000	Ärztliche Prüfung
Juni 2000	Anstellung als Arzt im Praktikum am Institut für Humangenetik der RWTH Aachen