

Armin Schneider
Dr. med.

Molekulargenetische Untersuchungen zur Funktion des Proteolipid-Proteins in natürlichen und transgenen Mausmutanten

Geboren am 15.05.1965 in Neckarsulm
Reifeprüfung am 30.05.1984
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1987 bis SS 1996
Physikum am 05.04.1989 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in San Antonio (USA), Houston (USA), Heidelberg
Staatsexamen am 23.10.1996 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Neurologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. H.-M. Meinck

Das Prinzip der Myelinisierung von Axonen zur Erhöhung der Leitgeschwindigkeit war ein entscheidender Schritt in der Entwicklung des Nervensystems. Primäre Störungen der Myelinisierung (Dysmyelinisierung) oder der sekundäre Verlust der Myelinhülle (Demyelinisierung) verursachen schwere neurologische Krankheitsbilder beim Menschen (Leukodystrophien, Multiple Sklerose) und bei verschiedenen Tiermodellen.

Als Ursache für die frühletale Dysmyelinisierung bei der seit langem bekannten Mausmutante *jimpy* konnte 1987 eine Mutation des Gens für das Proteolipid-Protein identifiziert werden. Das Proteolipid-Protein (PLP), ein 4-Transmembranprotein mit 276 Aminosäuren, ist das Hauptprotein des Myelins im Zentralen Nervensystem, und zeichnet sich durch eine extrem hohe evolutionäre Konservierung aus. 1989 wurden Mutationen des PLP-Gens bei einigen Patienten mit der seltenen Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung, einer Leukodystrophie, gefunden.

1990 wurde eine neue dysmyelinisierte Mausmutante, *rumpshaker*, beschrieben, die eine X-Koppelung ihrer Mutation aufwies. In Teil I der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Ursache des *rumpshaker*-Phänotyps in einem Aminosäureaustausch des Proteolipid Proteins liegt (Ile->Thr im zweiten extrazellulären Loop). Da diese Mutation ungleich der bisher bekannten PLP-Mausmutanten *jimpy* und *jimpy^{msd}* nicht letal war, und keinen massiv erhöhten Oligodendrozytentod zeigte, war dies ein genetischer Beweis dafür, daß Zelltod und Dysmyelinisierung bei PLP-Mutationen nicht miteinander gekoppelt sind, wie man vorher annahm.

Ausgehend von den jetzt zur Verfügung stehenden drei PLP-Mausmutanten wurde in Teil II versucht, diese durch Einbringen eines wt-PLP-Transgens zu komplementieren (da das PLP-Gen X-Chromosomal lokalisiert ist, existiert in der Natur keine zellulär heterozygote Situation). Dazu wurde das PLP-Gen auf einem Cosmid kloniert und kartiert. Es wurden zwei transgene Linien etabliert, die das Transgen ontogenetisch und topologisch korrekt exprimierten. Diese transgenen Linien wurden mit den Mausmutanten (*jimpy*, *jimpy^{msd}* und *rumpshaker*) gekreuzt. Trotz angemessener Expressionsstärke der Transgene (ca. 50% bzw. 100% des wt-Levels) blieben die *jimpy*- und *jimpy^{msd}*-Mäuse, die das Transgen trugen, gegenüber ihren nicht-transgenen Geschwistern phänotypisch unverändert. Die *rumpshaker*-Mutation konnte hingegen phänotypisch "gentherapiert" werden: Transgene *rumpshaker*-Mäuse wiesen nahezu keine Ataxie und keinen Tremor mehr auf. *Jimpy*-Mäuse, die das wt-PLP-Gen exprimieren, zeigen jedoch einen reduzierten Oligodendrozytentod gegenüber nicht

transgenen *jimpy*-Tieren. Ein Modell zur Erklärung dieser Ergebnisse schlägt eine funktionelle Homo- oder Heterooligomerisierung von PLP vor.

Teil III schließlich untersuchte die erstaunliche Beobachtung näher, daß PLP-transgene Tiere selbst Dysmyelinisierung zeigen. Die in Teil II erzeugten transgenen Linien zeigten im homozygoten Zustand die typischen neurologischen Symptome der Dysmyelinisierung. Gendosisbestimmungen von betroffenen Tieren bestätigten die initiale Vermutung. Quantifizierungen der Expressionsstärke zeigten eine theoretische 200%ige Überexpression der PLP-mRNA in einer Linie an. Verschiedene Daten schließen aus, daß es sich bei dem Effekt um eine Insertionsmutation handeln könnte. Die morphologische Untersuchung der Tiere ergab eine starke Dysmyelinisierung des ZNS und eine massive Astrogliose. Die Oligodendrozyten erscheinen weitgehend normal. Der Defekt scheint in einer Störung der terminalen Oligodendrozytendifferenzierung zu bestehen. Die Schwere des Myelindefektes in den transgenen Linien korreliert dabei gut mit der festgestellten Gendosis.

In Teil IV schließlich wurden einige Patienten mit der klinischen Diagnose M. Pelizaeus-Merzbacher auf eine mögliche Mutation des PLP-Gens hin untersucht. Wir konnten jedoch in keinem Fall einen Hinweis auf Veränderungen des PLP-Gens bei diesen Patienten erbringen. Dies steht in Übereinstimmung mit Berichten anderer Gruppen, die bei der Mehrzahl klinischer Verdachtsfälle mit X-Koppelung ebenfalls keine PLP-Mutationen fanden.

Der dysmyelinisierende Effekt der PLP-Überexpression bei den transgenen Mäusen stellt einen experimentellen Beweis dafür dar, daß die PLP-Dosisverdopplung bei Pelizäus-Merzbacher Patienten mit einer partiellen X-Chromosomalen Duplikation die wahrscheinliche Ursache der Erkrankung ist. Dies ist überhaupt der erste uns bekannte Beweis dafür, daß Dosisveränderungen einzelner Gene Ursache genetischer Erkrankungen sein können, und fand eine interessante Parallele bei Patienten mit der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ Ia. Bei Patienten mit der klinischen Diagnose Pelizäus-Merzbacher und einer X-chromosomalen Kopplung, bei denen bisher keine Mutationen der kodierenden Bereiche des PLP-Gens gefunden werden konnten, sollte daher auch nach Mutationen in den regulatorischen Genregionen gesucht werden, die Dosisveränderungen hervorrufen könnten. Der Mechanismus, durch den die Dosiserhöhung von PLP zu Dys- oder Demyelinisierung führt, ist bis jetzt noch unklar.

1994 wurde bei einem Patienten mit X-gekoppelter Spastischer Paraplegie exakt dieselbe Punktmutation wie bei der *rumpshaker*-Maus gefunden. Patienten mit Spastischer Paraplegie zeichnen sich durch einen im Vergleich mit der Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung sehr milden Phänotyp und eine hohe Variabilität des Phänotyps durch verschiedene Generationen hindurch aus, beides auch Charakteristika der *rumpshaker*-Maus. Zusammen mit dem qualitativ anderen Verhalten dieser Mutante gegenüber einer transgenen Komplementation unterstreicht dies die erstaunliche Parallelität der Tiermodelle.

Insgesamt stellen sich die PLP-Mutationen jetzt als ein breites Spektrum dar, das beim Menschen von Punktmutationen, die Spastische Paraplegie hervorrufen, über Deletionen und Duplikationen in zunehmender Schwere des Krankheitsverlaufes hin zu Punktmutationen mit früh letalem M. Pelizaeus-Merzbacher führt. Das Studium der uns jetzt zur Verfügung stehenden Mausmodelle, die dieses Spektrum nachbilden, wird uns in Zukunft noch viele wertvolle Hinweise zum Verständnis der PLP-Mutationen liefern.