

Analyse genetischer Syndrome bereits zu einer Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten und zur Identifizierung wichtiger Gene des Menschen geführt hat. Es ist zu erwarten, daß die Kenntnis der molekularen Ursachen genetischer Syndrome auch zur Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte führt.

Deutsches Ärzteblatt

91 (1994) A-1800-1805 [Heft 25/26]

Literaturverzeichnis

1. Bühler, E. M., N. J. Malik: the tricho-rhino-phalangeal syndrome(s): chromosome 8 long arm deletion: is there a shortest region of overlap between reported cases? TRPI and TRPII syndromes: are they separate entities. *Am. J. Med. Genet* 19 (1984) 113-119
2. Cook, A.; W. Raskind, S. H. Blanton, R. M. Pauli, R. G. Gregg, C. A. Francomano, E. Puffenberger, E. U. Conrad, G. Schmale, G. Schellenberg, E. Wijsman, J. T. Hecht, D. Wells, M. J. Wagner: Genetic heterogeneity in families with hereditary multiple exostoses. *Am. J. Hum. Genet* 53 (1993) 71-79
3. Dittrich, B.; W. P. Robinson, H. Knoblauch, K. Buiting, K. Schmidt, G. Gillissen-Kaesbach, B. Horsthemke: Molecular diagnosis of the Prader-Willi and Angelman syndromes by detection of parent-of-origin specific DNA methylation in 15q11-13. *Human Genetics* 90 (1992) 313-315
4. Haber, D. A.; A. J. Buckler, T. Glaser, K. M. Call, J. Pelletier, R. L. Sohn, E. C. Douglass, D. E. Housman: An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms tumor. *Cell* 61 (1990) 1257-1269
5. Jordan, T.; I. Hanson, D. Zaletayev, S. Hodgson, J. Prosser, A. Seawright, N. Hastie, V. van Heyningen: The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nature Genetics* 1 (1992) 328-332
6. Lüdecke, H. J.; G. Senger, U. Claussen, B. Horsthemke: Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 338 (1989) 348-350
7. Nicholls, R.: Genomic imprinting and candidate genes in the Prader-Willi and Angelman syndromes. *Current Opinion in Genetics and Development* 3 (1993) 445-456
8. Özcelik, T.; S. Leff, W. Robinson, T. Donlon, M. Lalonde, E. Sanjines, A. Schnitzel, U. Francke: Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region. *Nature Genetics* 2 (1992) 265-269
9. Pelletier, J.; W. Bruening, C. E. Kashtan, S. M. Mauer, J. C. Manivel, J. E. Striegel, D. C. Houghton, C. Junien, R. Habib, L. Fouser, R. N. Fine, B. L. Silverman, D. A. Haber, D. Housman: Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67 (1991) 437-447
10. Reiner, O.; R. Carrozzo, Y. Shen, M. Wehnert, F. Faustinella, W. B. Dobyns, C. T. Caskey, D. H. Ledbetter: Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein β -subunit-like repeats. *Nature* 364 (1993) 717-721
11. Rinchik, E. M.; S. J. Bultman, B. Horsthemke, S. T. Lee, K. M. Strunk, R. A. Spritz, K. M. A. Avidano, M. T. C. Jong, R. D. Nicholls: A gene for the mouse pink-eyed dilute on (p) locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature* 361 (1992) 72-76
12. Schmickel, R.: Contiguous gene syndromes: A component of recognizable syndromes. *J. Pediat.* 109 (1986) 231-241
13. Sinet, P. M.; Z. Rahmani, D. Theophile, Z. Chettouh, J. L. Blouin, M. Prieur, B. Noel, C. Pangalos, J. F. Mattei, J. Kraus, J. M. Delabar: Molecular definition of 7 minimal regions on chromosome 21 involved in the pathogenesis of 23 features of Down syndrome. *Cytogenet Cell Genet* 58 (1991) 2040

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. rer. nat.
Bernhard Horsthemke
Institut für Humangenetik der
Universität Gesamthochschule Essen
Hufelandstraße 55
45122 Essen

Molekulargenetische Wege zur Neuropathologie

Wilhelm Stoffel

Hirnstrukturen und -funktionen verstehen zu lernen, ist eine der größten Herausforderungen und schwierigsten Aufgaben der Neurowissenschaften. In den normalen Funktionen sieht der Neurowissenschaftler eine koordinierte, im pathologischen Zustand eine fehlgesteuerte Biochemie des Gehirns. Nichtwissenschaftlern kann es schwerfallen, das Konzept zu akzeptieren, daß oft komplexe Strukturen und Leistungen des Gehirns auf chemische Reaktionen zurückgeführt werden können und daß in der Kausalkette einer auf einem mutierten Gen beruhenden Hirnerkrankung Umwelteinflüsse, Erziehung, mangelnde Zuneigung und anderes keinen Platz finden. Eine manische

Depression kann durch keine noch so intensive psychiatrische Beratung und Zuneigung erfolgreich behandelt werden, wohl aber durch Lithium oder Antidepressiva.

Zur Lösung der Fragen der Neurowissenschaften, Neurologie und Psychiatrie stehen in steigendem Maße Methoden vor allem der Molekularbiologie und molekularen Genetik zur Verfügung. Die Folge sind eine verbesserte Diagnostik und ein molekulares Verständnis von menschlichen Erbkrankheiten. Der Weg von der Entdeckung der genetischen Grundlage einer Krankheit, heute

sehr oft durch positionelles Klonieren, also der Bestimmung der Genposition und weniger seiner Funktion, bis zum molekularen Verständnis der pathologischen zellulären Reaktionen, ist lang. Dennoch ergibt sich aber eine frühe und direkte Nutzung für die Diagnostik, die rasch, genau und zuverlässig für den betreffenden Patienten und Träger des präsymptomatischen Krankheitszustandes von Familienmitgliedern durchgeführt werden kann.

Nach der Aufklärung des Gendefektes kann

a) das gesunde Genprodukt im Reagenzglas synthetisiert werden und die Krankheit, die durch ein mutiertes Gen unterhalten wird, durch ein gesundes, rekombinantes norma-

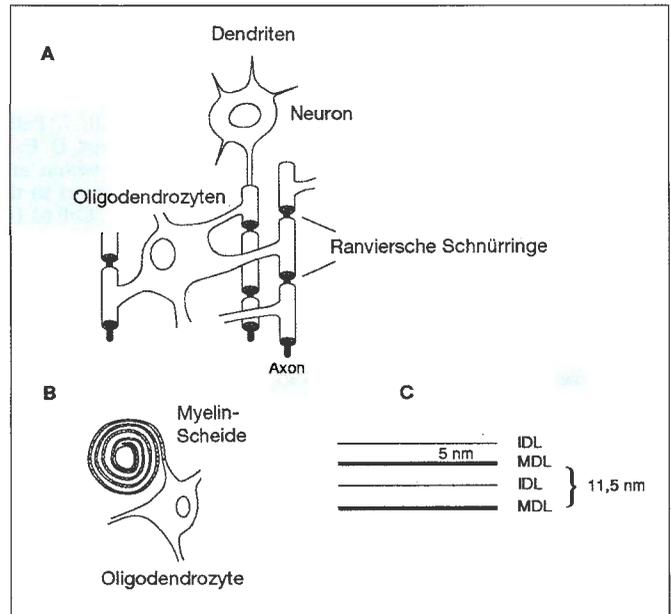
Institut für Biochemie (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Wilhelm Stoffel) Medizinische Fakultät der Universität zu Köln

les Protein in Form einer Substitutionstherapie oder

b) gar durch den Ersatz des kranken Gens auf dem Weg der somatischen Gentherapie behandelt werden. Konzeptionell und experimentell sind hier die Weichen für die nahe Zukunft, für neue Wege, von der Substitutionstherapie bis hin zur somatischen Gentherapie reichend, gestellt.

Die Zahl der bekannten neurologischen Syndrome mit Mendelschem Erbgang hat heute schätzungsweise 1000 erreicht. Der Einzug molekularbiologischer und molekulargenetischer Methoden in die Medizin während der vergangenen zehn Jahre ermöglichte bei mehr als 50 genetisch bedingten Erkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems den Sprung vom phänotypischen Erscheinungsbild zum genotypischen, ursächlichen Zusammenhang. Diese Entwicklung verläuft so dramatisch, daß man von der „Dekade des Gehirns“ in der Molekularbiologie spricht, in der zwei vorrangige Zielrichtungen der Neurobiologie und -pathologie erkennbar sind: zum einen die Molekularbiologie der Synapsen, die bis hin zum Verständnis der long term potentiation (LTP), der long term depression (LTD) und

Abbildung 1: a) Schematische Darstellung der Myelinscheidenbildung durch Oligodendrozyten. Aufeinanderfolgende myelinisierte Axonabschnitte sind durch Ranviersche Schnürringe getrennt. b) Detaildarstellung der spiralförmigen Umhüllung eines Axons durch eine Myelinscheide eines Oligodendrozyten. c) Periodizität der übereinanderliegenden Schichten in der Myelinscheide. IDL: intermediate dense line, MDL: main dense line



der Signaltransduktion im Neuron als Basis des Erlernens und des Gedächtnisses reicht; zum anderen die genetisch bedingten Grundlagen neurodegenerativer Krankheiten.

In diese rasche Entwicklung fallen immer wieder überraschende Entdeckungen, wie zum Beispiel das jüngst entdeckte Konzept von Mutationen in Form instabiler Trinukleotid-Repeats in Exons oder in nicht exprimierten Regionen nahe eines

Gens, das mit fünf bisher bekannten neurologischen Krankheiten, die im mittleren und späteren Lebensalter auftreten, korreliert. Als Beispiele seien das fragile X-Syndrom, die familiäre geistige Retardierung (familiäre mental retardation, verknüpft mit dem FMR1-Gen), erwähnt, bei dem am 5'-Ende des auf Chromosom Xq27.3 gelegenen FMR1-Gens über die reguläre Zahl hinaus amplifizierte (CGG)-Repeats nach einem noch unbekanntem Replikationsmechanismus vorliegen.

Eine weitere, nämlich die spinobulbäre muskuläre Atrophie, eine an den Xq21.3-Chromosomenlocus gebundene Erkrankung, enthält eine (CAG)-Triplet-Repeat-Amplifikation im Androgen-Rezeptor-Gen.

Ein anderes Ergebnis der molekularen Neurobiologie ist die Aufschlüsselung der genetischen Heterogenität der familiären Alzheimer-Krankheit (FAD), die zunächst als eine monogene Erkrankung angesehen wurde.

In seltenen Fällen fand man bisher Mutationen im amyloid precursor protein (APP)-Gen, dessen Locus auf dem Chromosom 21q liegt. Mehr als 70 Prozent der FAD mit einer frühen Manifestation sind an Mutationen im Chromosomenlocus 14q24.3 gebunden, eine Region von Kandidatengenen, darunter das transforming gene (TFG) β , das Hitzeschockprotein (HS70) und das

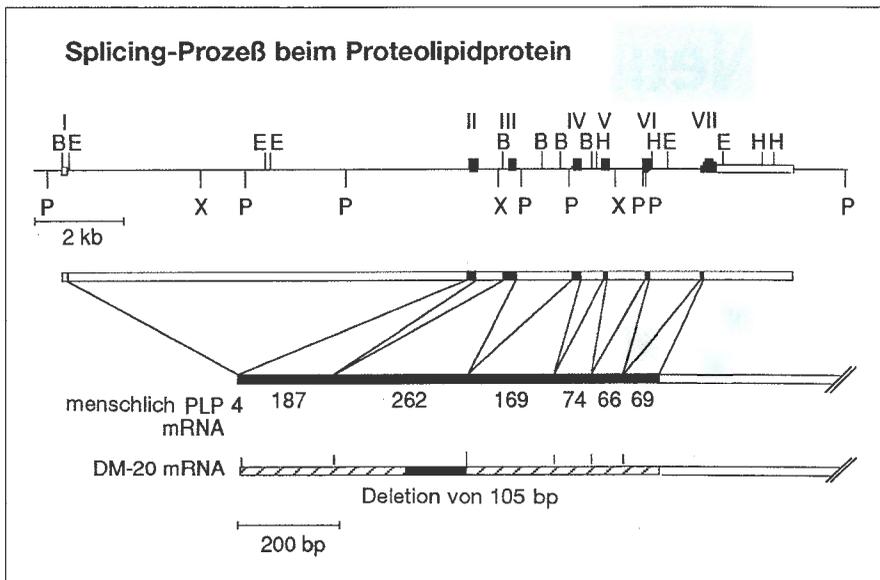


Abbildung 2: Überblick über den Splicing-Prozess beim PLP. Oben: Gen mit den römisch numerierten Exons und Intronbereichen; Restriktionsschnittstellen eingezeichnet; B, BamHI; E, Eco RI; H, HindIII; P, PstI; X, XbaI. In der durch Splicing-Prozess entstehenden mRNA sind die Längen der Exonanteile aufgeführt. Die DM20-mRNA stellt eine Isoform des PLP dar, bei der durch alternatives Splicen eine Deletion von 105 Basenpaaren vorliegt

c-fos-Onkogen. Dazu wurde jüngst ein Genlocus auf Chromosom 19q nahe dem Apolipoprotein E-Allel entdeckt.

FAD hat zweifellos einen multiplen genetischen Hintergrund.

Die rasch anwachsenden Informationen innerhalb des humanen Genomprojekts werden für die Neurowissenschaften zunächst in der schnellen Identifizierung von neurologischen, genetisch bedingten Krankheiten ihren Nutzen bringen.

Gestörte Architektur und Funktion des ZNS-Myelins im Lichte der molekularen Neurobiologie

Unsere Arbeiten zielen seit Jahren auf die systematische Erforschung der molekularen Architektur der vom Oligodendrozyten gebildeten Myelinscheiden der Axone des ZNS.

Dabei stehen die Strukturen der wichtigsten vom Oligodendrozyten exprimierten Gene von Proteinen und Enzymen, die an der Synthese und dem Aufbau des einzigartigen Membransystems des Myelins beteiligt sind, im Vordergrund.

Eine Reihe von Mutationsereignissen in diesen Genen führen zu Dysmyelinosen, schwersten Störungen der Markscheidenbildung.

Zum besseren Verständnis sollen kurz die zell- und molekularbiologischen Schritte der Myelinogenese vorausgeschickt werden.

O2A-Vorläuferzellen differenzieren zum Oligodendrozyten, die mit der Synthese der Myelinmembranproteine beginnen, des basischen Myelinproteins, des Proteolipidproteins und anderen, in geringen Konzentrationen vorkommenden Proteinen, sowie der enormen Mengen von komplexen Phospholipiden, Cholesterin und Sphingolipiden, die 80 Prozent der Masse des Myelins ausmachen. Oligodendrozytenspezifische Lipide sind die Zerebroside und Sulfatide.

Die Synthese der Myelinmembranbausteine erfolgt synchron: so zeigen zum Beispiel die Synthese der

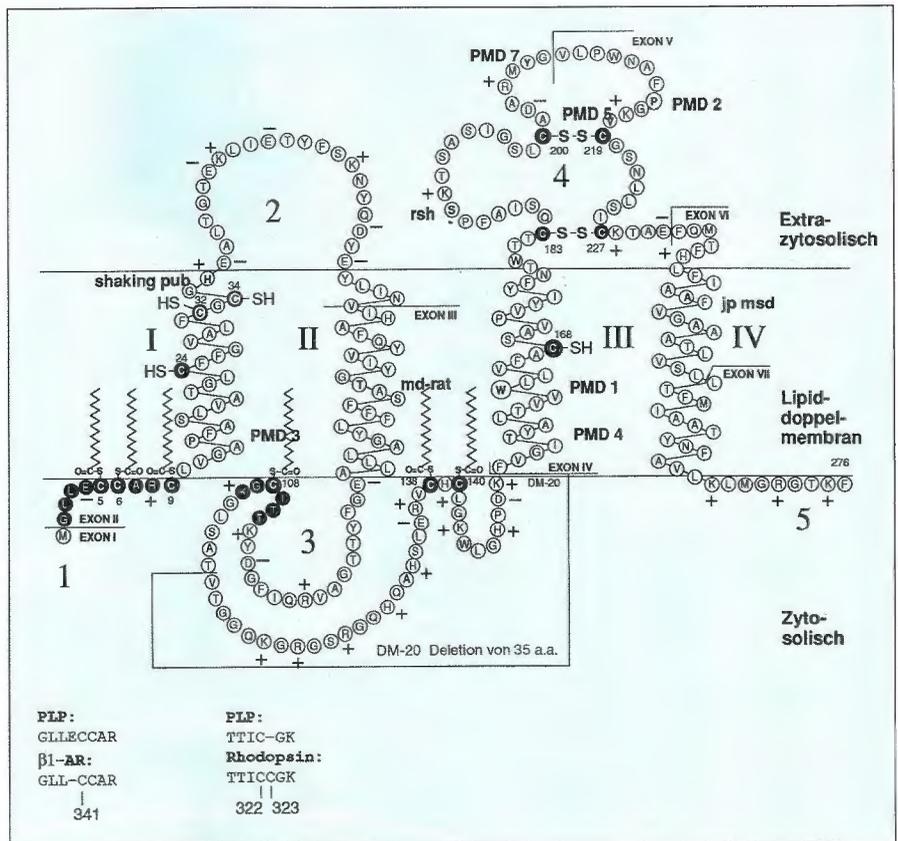


Abbildung 3: Modell der Membranintegration des Proteolipidproteins (PLP). Die häufigsten, durch Mutationen hervorgerufenen Defekte, sind eingetragen, die betroffenen Aminosäuren fett hervorgehoben.

mRNAs der Myelinprotein-Gene und die des Schlüsselenzyms der Zerebrosid-synthese, der Ceramid-UDP-β-Galaktosyltransferase die gleiche Kinetik der Expression in der Northern-Blot-Hybridisierungsanalyse.

Diese zeigt, daß die Myelinisierung bei Maus und Ratte um den zehnten Tag und bei menschlichen Föten im fünften Fötalmonat beginnt. Die Markreifung verläuft fulminant, bei Maus und Ratte über einen Zeitraum von drei Wochen, beim Menschen über durchschnittlich zwei Jahre hinweg.

Jeden Tag produziert ein Oligodendrozyt das drei- bis fünffache seiner eigenen Masse und transportiert die Membranproteine und Lipide in die 50 bis 100 Ausläufer seiner Plasmamembran, die dann, spiralg und dicht gepackt, verschiedene Axone in Form der Internodien umwickeln. Diese durch Ranviersche Schnürringe unterbrochene Isolierung der Axone bringt folgende Vorteile des myelinisierten gegenüber dem nicht myelinisierten Axon:

- ❶ die Erregungsleitung erfolgt saltatorisch bis zu 100fach schneller.
- ❷ Eine Membrandepolarisation tritt nur in den kleinen Membranarealen der Ranvierschen Schnürringe auf. Demzufolge ist für die Repolarisierung erheblich weniger Energie erforderlich.
- ❸ Der Durchmesser des myelinisierten Axons kann für dieselbe Erregungsleitung erheblich kleiner sein, das heißt die Myelinisierung ist es, die die kompakte Struktur des ZNS ermöglicht.

Schon kleinste strukturelle Änderungen im Bauplan der Myelinscheide können zu katastrophalen Folgen führen. Der Untergang eines Oligodendrozyten zieht serielle Defekte der Internodien aller von diesem Oligodendrozyten adressierten Axone nach sich.

Die molekularbiologische Analyse der die Myelinmembran aufbauenden Proteine hat in den letzten Jahren gezeigt, daß sie über Jahrtausende eine konservierte Struktur beibehalten.

Molekulare Architektur der multilamellaren Myelinscheide

Die Gene und die daraus abgeleiteten Proteinstrukturen des Myelins, vor allem das Proteolipidprotein (PLP, 50 Prozent des Gesamtproteins), das basische Myelinprotein (MBP, 40 Prozent), das myelinassozierte Glykoprotein (MAG) und auch das Zerebrosid synthetisierende Enzym wurden in den letzten Jahren mit Hilfe der Molekularbiologie aufgeklärt (Abbildung 1). Gleichzeitig konnte die Chromosomenlokalisierung dieser Gene bestimmt werden.

Genetische Defekte als Ursache einer defekten Myelinisierung

Paradigmatisch soll der Weg von der normalen Struktur des Gens und Genproduktes bis hin zu genetischen Defekten und ihren pathogenetischen Folgen am integralen Membranprotein des Myelins, dem Proteolipidprotein, dem Hauptbaustein der Myelinmembran, aufgezeichnet werden.

PLP ist ein sehr hydrophobes Membranprotein der Myelinmembran. Es wird für den engen Kontakt zwischen den Oberflächen der sich spiralförmig übereinanderwickelnden Myelinschichten verantwortlich gemacht. Das transgene Mausmodell hat diese Funktion des PLP beweisen können. Das PLP-Gen befindet sich auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq21.3-22) und ist etwa 20 kb lang. Die in acht Exons enthaltenen kodierenden Sequenzen von 831 bp kodieren ein 277 Aminosäurereste enthaltendes Protein. PLP wird am rauhen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und zusammen mit Cholesterin, Phospho- und Sphingolipiden vesikulär zum Einbau in die Plasmafortsätze, die die internodalen Segmente der Myelinscheide bilden, transportiert. Die PLP-Struktur wurde in der Evolution stark konserviert. So sind die Aminosäuresequenzen des menschlichen PLPs und das der Maus völlig identisch. Dies weist auf die Bedeutung einer stabilen Struk-

a)		Pro	
64	IleHisAlaPheGlnTyrValIleTyrGlyThrAlaSerPhePhePheLeuTyrGlyAla		83
314	GATTCATGCTFTCCAGTATGTCATCTATGGAACTGCCTCTTCTTCTTCTTATGGGGCC		373
		C	
		Ava II	
84	LeuLeuLeuAlaGluGlyPheTyrThrThrGlyAlaValArgGlnIlePheGlyAspTyr		103
375	CTCCTGCTGGCCGAGGGCTTCTACACCACCGGCCTGTGAGGCAGATCTTTGGCGACTAC		434
b)		Ile	
	...accocatgcaatcatttttag TTT GTG GGC ATC ACC TAT GCC	Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala	157
		T	471
		Hph II	

Abbildung 4: a) Punktmutation im Exon III des PLP der md-Ratte mit einem Austausch von Threonin⁷⁵ gegen Prolin und einem AVA-II-Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP), b) Exon IV des PMD-Patienten mit einem Austausch von Threonin¹⁵⁵ gegen Isoleukin und einen Hph-II-RFLP

tur hin, die kaum Strukturänderungen erlaubt.

Es sind eine Reihe von X-Chromosomen-gebundenen rezessiven Dysmyelinosen bei mehreren Spezies bekannt, Erkrankungen, die auf einer fehlenden Myelinsynthese beruhen, so die jimpy-Maus, die myelindefiziente Ratte (md rat), shaking pupa – eine Dysmyelinose des Hundes – und die sudanophile Leukodystrophie des Menschen, auch als Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit bekannt. In allen Spezies weisen die Dysmyelinosen einen Pleiotropismus auf: es fehlen alle Proteine und auch die Lipide der Myelinmembran. Von den bisher bekannten Myelinmembranproteinen befindet sich nur das Gen des PLP auf dem X-Chromosom. Es lag daher nahe, nach einem Defekt des PLP-Gens zu forschen. Bei dieser Suche nach der Mutation stellte sich die Kenntnis der Genorganisation des PLP als unverzichtbar heraus.

Strategie zur molekularen Definition eines genetischen Defektes

Abbildung 2 zeigt die Genorganisation des PLP und projiziert die Exonsequenzen auf die mRNA-Struktur. Die Strategie, ein mutiertes Gen auf der molekularen Ebene zu definieren, besteht darin, zunächst größere Umlagerungen oder Deletionen zu entdecken beziehungsweise

auszuschließen. Dies erfolgt durch ausgedehnte Restriktionsenzym-Analysen.

Durch Southern-Blot-Hybridisierung mit der radioaktiv markierten cDNA des PLP (831 bp) werden alle Restriktionsfragmente der genomischen DNA erfaßt, die ein oder mehrere kodierende Exons des PLP-Gens enthalten. Der Längenvergleich dieser Fragmente in der Agarose-Elektrophorese mit denen der normalen genomischen PLP-cDNA würde größere Deletionen (> 100 bp) oder Genumlagerungen, Duplikationen deutlich machen. Bei allen bis auf eine der bekannten PLP-Mutationen handelte es sich jedoch um Punktmutationen. Der nächste Schritt besteht in der Bestimmung der Nukleotidsequenz der kodierenden Exons.

Die früher mühsamen Klonierungsarbeiten von Exons enthaltenen Restriktionsfragmenten für die Sequenzierung werden heute durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) ersetzt. Oligonukleotidprimer von einzelne oder mehrere Exons eingrenzenden Intronsequenzen werden für die DNA-Amplifikation durch PCR eingesetzt und die PCR-Fragmente sequenziert. Wichtig sind hier Kontrollexperimente, um mögliche, durch die PCR eingeführte Fehler auszuschalten. Punktmutationen in Form von Transitionen (A ↔ G, C ↔ T) oder Transversionen (A/G → C/T) führen häufig neue Restrik-

tionsenzym-schnittstellen ein oder zerstören sie, so daß es dann zum Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) kommt. Ein RFLP des Gens gewinnt dann zusätzlich und unterstützend an Bedeutung für die rasche und exakte genetische Analyse einer von der Mutation betroffenen Familie. Fragen wir nun, wie eine Punktmutation, zum Beispiel ein einziger Basenaustausch unter den 20 000 bp des PLP-Gens, das von der Geburt an progredient verlaufende und immer lethal endende Krankheitsbild der sudanophilen Leukodystrophie vom Typ Pelizaeus-Merzbacher (PMD) molekular erklärbar wird. Von der präzisen Kenntnis der genetischen Grundlage ausgehend sind die biochemischen Funktionen des PLP für die Integrität des Myelins zu erklären.

Es ist nicht verwunderlich, daß die ZNS-Symptome der PMD-Patienten identisch mit denen der genannten tierischen Species (Maus, Ratte, Hund) sind, wie allgemeiner Muskelzittern, Krämpfe, spastische Lähmungen, Nervus-opticus-Atrophie und allgemeine Wachstumsstörungen. Die jimpy-Maus und die md-Ratte sterben am Ende der regulären Myelinisierungsphase drei bis vier Wochen nach der Geburt. Die Mehrzahl der bisher bekannten PMD-Defekte besteht in Punktmutationen, die analog sind zu denen der jimpy-Maus, md-Ratte und in anderen Species gefundenen. Die Positionen der durch die Mutation verursachten Aminosäureaustausche sind in *Abbildung 3* markiert.

Die Punktmutation der jimpy-Maus besteht in einer A → G-Transition an der Splice-Akzeptor-Stelle, also dem 3'-Ende des Introns IV, wodurch eine Verknüpfung von Exon IV und VI unter Verlust von Exon V im Splicing-Prozeß hervorgerufen wird. Die Folge ist die Synthese eines verkürzten und missense-C-terminalen PLP aufgrund der gleichzeitig eintretenden Leserasterverschiebung. Anders verhält es sich allerdings bei der md-Ratte: hier entdeckten wir eine A → C-Transversion im Exon III, was zu einem Austausch von Threonin⁷⁵ gegen Prolin in einer transmembranalen Helix des PLP führt (*Abbildung 4*).

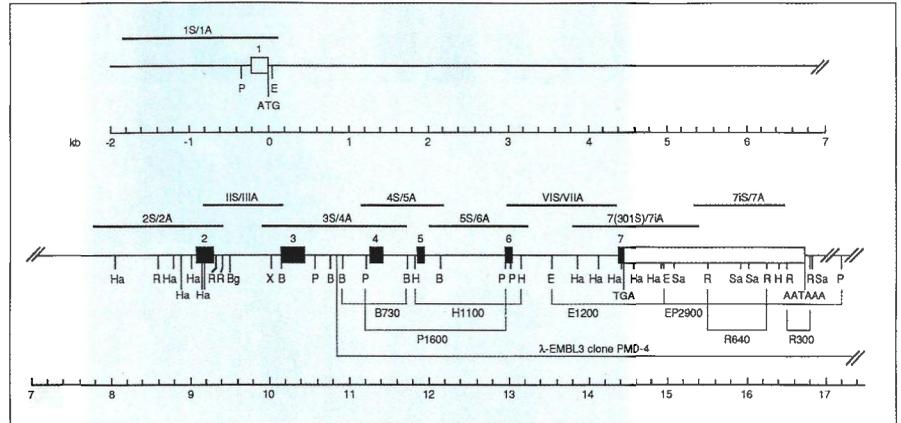


Abbildung 5: Sequenzierungsstrategie für das PLP-Gen bei der Aufklärung des Defekts eines Pelizaeus-Merzbacher-Patienten. Die Restriktionsenzyme: Bg, Bgl; E Eco RI; H, Hind III; Ha, Hpa II; P, Pst I; Rsa I; Sa Sal I; X, Xba I

Die Abfolge in der Analyse dieser Mutanten von Maus und Ratte bestand:

- a) in der Isolierung von genomischer DNA aus Leukozyten,
- b) in der Verdauung mit Restriktionsenzymen und Trennung der Restriktionsenzym(RE)-Fragmente in Agarose-Gelen,
- c) im Blotting und in der Hybridisierung mit ³²P-cDNA des PLP, gefolgt von der Autoradiographie.

Ganz analog identifizieren wir den genetischen Defekt, der der Pelizaeus-Merzbacher-Dysmyelinose zugrundeliegt, mit dem Ergebnis: die Längen der RE-Fragmente der DNA von Kontroll-Person und PMD-Patienten sind gleich. Deshalb war erforderlich:

- d) die Bestimmung der gesamten codierenden DNA-Sequenz des PLP des Patienten. Diese erfolgte durch PCR-Analyse der einzelnen Exons des Ratten- und menschlichen Genoms mit spezifischen Primern (*Abbildung 5*), und
- e) durch die DNA-Sequenzierung der einzelnen PCR-Fragmente.

Eine C → T-Transition im Exon IV des menschlichen PLP-Allels führte zu einem Thr¹⁵⁵ → Ile-Austausch. Die Mutationen ergeben bei der PMD-Patienten-DNA einen Hph-II-RFLP, in der md-Ratte einen Ava-II-RFLP. Die Aufklärung der Mutation bei diesem männlichen Familienmitglied erforderte die Erhebung des gesamten genetischen Familienstatus (pedigree), der in *Abbildung 6* zusammengefaßt ist. Diese

Punktmutationen und die damit verknüpften Aminosäuren-Austausche können unter Umständen zu Veränderungen der Konformation des Proteins führen. Im Falle eines Membranproteins kann dies zur Folge haben, daß der intrazelluläre Transport für PLP über das ER-System und den Golgi-Apparat zur Plasmamembran und der für die Integrität (Funktion) der Membran erforderliche korrekte Einbau verhindert werden. Ein derart mutiertes Protein wird sehr rasch der intrazellulären Proteolyse anheimfallen. PLP besitzt vier äußerst hydrophobe Sequenzen. Unsere Arbeitshypothese ist nun, daß diese in die hydrophobe Lipidschicht der Plasmamembran, aber auch von Membranen subzellulärer Partikel eingelagert werden und zur Perturbation der betreffenden Membranfunktion führen. Diese nun experimentell zu prüfende Hypothese basiert fernerhin auf In-situ-Hybridisierungen von jimpy- und md-männlichen Maus- beziehungsweise Rattengehirnen, die sich im Stadium der Myelinisierung befanden. Hier findet man eine nur noch geringe Zahl von überlebenden Oligodendrozyten, die durch ³⁵S-markierte antisense-RNA des PLP dargestellt werden.

Die Apoptose der Oligodendrozyten erklärt den Pleiotropismus der Mutation. Alle oligodendrozytenspezifischen Strukturproteine und Enzyme werden nicht mehr exprimiert, und gleichzeitig bleibt auch die Synthese der Myelinlipide aus. In anderen Worten: Die Myelinisierung aller Axone

ist defekt, woraus sich die neurologischen Symptome erklären lassen.

Diese Beispiele veranschaulichen die verheerende Wirkung eines einzelnen Nukleotidaustausches und gleichzeitig die Möglichkeiten der Diagnostik und Präventivmedizin, die sich durch die molekulare Neurobiologie eröffnen. In diesem kurzen Abriss, der nur einen ersten Einblick in die Möglichkeiten vermittelt, die die neurobiologische Grundlagenforschung durch die Anwendung der molekularbiologischen Techniken in die Diagnostik neurologischer und bald auch psychiatrischer Erkrankungen einbringt, drängen sich unausweichlich Fragen auf, die in den ethischen Bereich hinüberreichen.

Wir befinden uns in einer Zeit, in der die rapide wachsende genetische Information in der Medizin zu einer raschen und exakten Diagnose führt und in der sich ein nicht abzusehendes Potential für neue therapeutische Strategien entwickelt.

Die Diagnostik genetischer Krankheiten verbessert sich dabei sehr viel rascher als unsere Möglichkeiten der Therapie. Schwierige ethische Fragen harren ihrer dringenden Lösung: wie gehen wir mit persönlichen genetischen Informationen bezüglich Prädisposition und der Prädiktion genetischer Krankheiten um, Fragen zur Vertraulichkeit im weitesten Sinne sowie zur pränatalen Diagnostik und Intervention, um hier nur einige zu nennen.

Der Segen, der vom Fortschritt in Molekularbiologie und Genetik ausgeht, muß durch Antworten auf diese Fragen so begleitet werden, daß er nicht zum Trauma für das Individuum und für die ganze Gesellschaft wird.

Die molekularen Neurowissenschaften bedürfen des Tiermodells genetisch bedingter Krankheiten des Zentralnervensystems

Die humanen molekularen Neurowissenschaften experimentieren nur streng innerhalb der enggesteck-

ten ethischen Grenzen. Um so bedeutsamer sind für den Fortschritt, der auf der molekular-ätiologischen Seite im wesentlichen von den Ergebnissen der Molekularbiologie als Arbeitsrichtung der Neurowissenschaften getragen wird, die Verfügbarkeit von Tiermodellen neurologischer Krankheiten, wie sie die Natur zufällig liefert oder aber im Tiermodell

Hier liegt ein unverzichtbares Anwendungsgebiet des Tierversuchs in der Medizin vor.

Eine ausführlichere Übersicht ist zu finden in: Stoffel, W. The myelin membrane of the central nervous system. Essential macromolecular structure and function, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 29 (1990), 958-976.

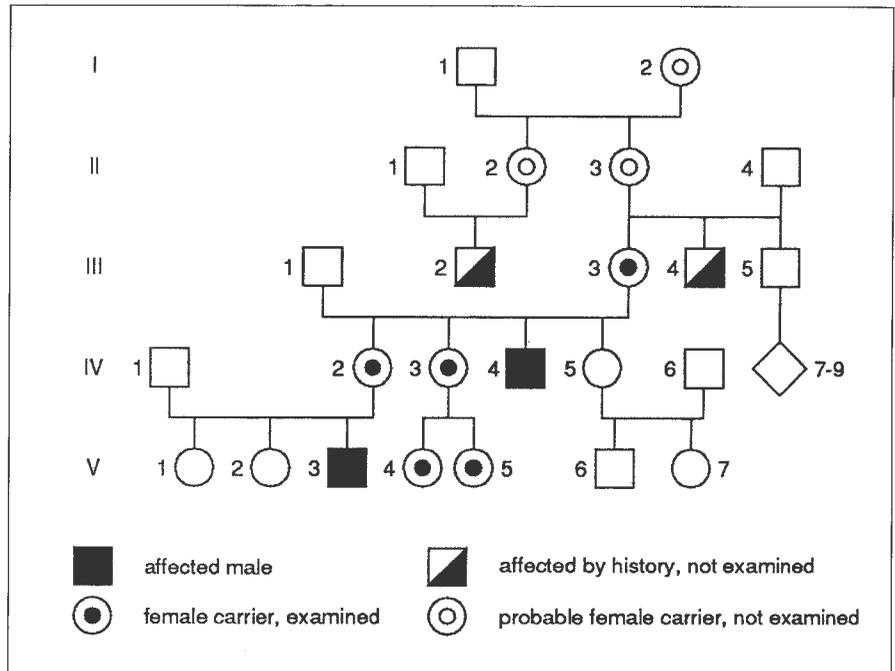


Abbildung 6: Stammbaum einer Familie mit Pelizaeus-Merzbacher-Patienten

nun mit Hilfe der Technik des „gene targeting“ mittels homologer Rekombination gezielt etabliert werden können. Homologe Rekombination erlaubt die präzise, ortsspezifische Integration eines gezielt mutierten Gens oder die Ausschaltung eines jeden Gens, dessen Funktion untersucht werden soll, und schließt die ungesteuerte statistische Integration in das Genom aus.

Bei Kenntnis der Genstruktur und der Mutation bedarf es nur noch des experimentellen Geschicks, jede genetisch bedingte Erkrankung im Tiermodell zu erstellen.

Diese Modelle erlauben dann ein detailliertes Studium diagnostischer, pharmakologischer, therapeutischer und prophylaktischer Probleme zu genetischen Erkrankungen des Zentralnervensystems.

Deutsches Ärzteblatt

91 (1994) A-1805-1813 [Heft 25/26]

Literatur:

Stoffel, W.: The myelin membrane of the central nervous system. Essential macromolecular structure and function. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 29 (1990) 958-976

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat.
Wilhelm Stoffel
Institut für Biochemie
Medizinische Fakultät
Joseph-Stelzmann-Straße 52
50931 Köln