

Schlussbericht zu Leukonet II, Gesamtdarstellung

Koordinator: Prof. Dr. Volkmar Gieselmann
Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Nussallee 11
53115 Bonn

Titel: Leukonet: A network for coordinated clinical and basic research on
Leukodystrophies
Leukonet: Ein Netzwerk für koordinierte klinische und Grundlagenforschung im
Bereich der Leukodystrophien

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Das Netzwerk besteht aus einem klinisch ausgerichteten und einem überwiegend grundlagenwissenschaftlich ausgerichteten Projektteil. Innerhalb des klinischen Bereiches des Netzwerkes stand die Weiterführung des Datenbanksystems für die Registrierung von Leukodystrophiepatienten in Deutschland im Vordergrund. Basierend auf krankheitsspezifischen Datenbanken sollte weiterhin der natürliche Verlauf von Leukodystrophien mit bekanntem genetischen Defekt zunächst bei Kindern genauer charakterisiert werden. Hierbei wurde der Metachromatischen Leukodystropie besondere Aufmerksamkeit geschenkt, da gegen Ende der Laufzeit eine klinische Phase I/II-Studie zu erwarten war, für die genaue klinische Verlaufsdaten eine unabdingbare Bedingung darstellten. Die Diagnostik von Leukodystrophien beruht wesentlich auf der Magnetresonanztomographie. Daher sollten neuradiologische Verfahren etabliert werden, die aufgrund von spezifischen MR-Mustern, aber auch der MR-Spektroskopie eine Verbesserung der Diagnostik erlauben sollten. Während sich ein klinisches Projekt mit der Weiterentwicklung der MR-Parameter für alle Leukodystrophien befasste, konzentrierte sich ein weiteres Projekt auf die Bedeutung von MR-Imaging und Spektroskopie bei seltenen, zumeist bisher unklassifizierten Leukodystrophien des Kindesalters, die mit Hypomyelinisierung verbunden sind. Diese Daten könnten die Differentialdiagnose verbessern aber auch zur Definition neuer Entitäten unter den bisher nicht klassifizierbaren Leukodystrophien führen. Leukodystrophien wurden lange Zeit als typische Erkrankung des Kindesalters betrachtet, so dass den Leukodystrophien im Erwachsenenalter wenig Beachtung geschenkt wurde. Wenngleich auch seltener, so manifestieren sich aber eine Reihe von Leukodystrophien erst im Erwachsenenalter. Daher war ein Projekt der Charakterisierung von klinischen Verlaufsformen von Leukodystrophien im Erwachsenenalter gewidmet. Die häufigste genetische bedingte Leukodystrophie ist die sogenannte X-chromosomale Adrenoleukodystrophie. Diese Erkrankung ist genetisch gut charakterisiert, pathophysiologisch aber nach wie vor schlecht verstanden. Insbesondere ist ungeklärt, warum diese Erkrankung bei gleicher zugrunde liegender Mutation und selbst bei Geschwistern klinisch sehr unterschiedliche Verläufe nehmen kann. Im Extremfall reicht das Spektrum von schweren kindlichen Verlaufsformen bis hin zu fast asymptomatischen Formen des Erwachsenenalters. In diesem Projekt sollten ferner die biochemischen Grundlagen der X-ALD untersucht werden. Ein Projekt hatte daher zur Aufgabenstellung sich mit den Ursachen dieser unterschiedlichen klinischen Verlaufsform zu befassen. Ein großes Problem im Bereich der Leukodystrophien ist die Tatsache, dass es trotz aller Fortschritte der letzten Jahre immer noch etwa 30% aller Patienten mit Leukodystrophien nicht

klassifiziert werden können. Eine weitere Gruppe stellen Patienten dar, die klinisch zwar einer bestimmten Leukodystrophieform zugeordnet werden, bei denen der genetische Defekt aber unbekannt ist. Ein Projekt hatte daher zu Ziel, das krankheitsverursachende Gen bei Patienten mit zystischer Leukenzephalopathie ohne Megenzephalie zu finden. Für die Forschung im Bereich der Pathophysiologie der Leukodystrophien, aber auch für die Entwicklung von therapeutischen Strategien sind Mausmodelle unabdingbar. Daher wurde in einigen Projekten sowohl an der Weiterentwicklung wie auch an der Analyse von Mausmodellen von diverser Leukodystrophien gearbeitet. Pathophysiologische Untersuchungen beschränken sich aber nicht nur auf Tiermodelle, sondern können auch in Zellkulturen von Zellen durchgeführt werden, die von Patienten gewonnen wurden. Ein Projekt befasste sich mit solchen Zellkulturen und versuchte anhand von Patientenfibroblasten mit peroxisomalen Stoffwechseldefekten Veränderungen im zellulären Stoffwechsel und zellulären Signalwegen zu identifizieren, um Hinweise auf pathophysiologisch relevante Veränderungen zu bekommen. Bei einigen lysosomalen Speichererkrankungen bietet sich die sogenannte Substratreduktionstherapie als ein Konzept zur Therapieentwicklung an. Dies betrifft auch die Metachromatische Leukodystrophie. Daher sollte in einem Projekt u.a. biologische Werkzeuge entwickelt werden, die es erlauben, eine solche Substratreduktionstherapie in Zukunft zu entwickeln. Die Metachromatische Leukodystrophie kann auch durch die Defizienz eines sogenannten Aktivatorproteins, des Saposin B, verursacht werden. Ein Projekt hatte zum Ziel, die biochemischen Grundlagen der Funktionsweise dieses Proteins zu untersuchen. Es war ferner Aufgabe der Leukonet die Patientenorganisation in die Struktur und die Veranstaltungen des Netzwerkes einzubeziehen. Desweiteren sollten die Webseite und die Patienten/Arzt Informationsstellen in Hamburg und Wermsdorf weitergeführt werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Arbeiten des Leukonet II basierten ganz wesentlich auf den Voraussetzungen, die im Leukonet I geschaffen wurden. Im klinischen Bereich gehörten hierzu, dass die Patientenregistrierungsdatenbank bereits aufgebaut war, die krankheitsspezifischen Datenbanken in Grundzügen konzipiert waren. Ferner war es während der ersten Förderphase gelungen das Netzwerk so zu entwickeln, dass es nicht zuletzt unter Einbindung der Betroffenenorganisationen zu einer Zuweisung von Patienten mit bestimmten Erkrankungen zu bestimmten Zentren kam. Diese Voraussetzung war insbesondere für die Charakterisierung von Leukodystrophien im Kindesalter wichtig. Für die Identifizierung des krankheitsverursachenden Gens bei der zystischen Leukenzephalopathie ohne Megenzephalie war es wichtig, dass die klinische Klassifizierung dieses Krankheitsbildes in einem Teilprojekt während der ersten Förderphase stattgefunden hat. Die klare klinische Klassifizierung ist eine Grundvoraussetzung für alle weiteren genetischen Untersuchungen. Für die eher grundlagenwissenschaftlich ausgerichteten Projekte war eine wesentliche Voraussetzung die Kontinuität der Projekte zum Leukonet I. So basierten die pathophysiologischen Untersuchungen an Zellkulturen von Patienten mit peroxisomalen Stoffwechselstörungen letzten Endes auf der Rekrutierung entsprechender Patienten durch das Teilprojekt in der ersten Förderphase. Untersuchungen zu Tiermodellen basierten auf der Weiterentwicklung vom Tiermodellen und von Techniken insbesondere in der Myelinproteomanalyse bzw. bei der Substratreduktionstherapie auf Befunden, die in der ersten Antragsphase erhoben worden sind.

Es muss an dieser Stellen betont werden, dass eine gewisse Diskrepanz zwischen den pro Netzwerk zur Verfügung stehenden Mitteln und den vom Zuwendungsgeber im Rahmen der Ausschreibung formulierten Erwartungen gab. Die finanziellen Voraussetzungen, unter

denen das Vorhaben stattfand, sind gemessen an den förderpolitischen Zielen eigentlich nicht als ausreichend zu bezeichnen.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Zu Planung und Ablauf der Einzelprojekte sei auf die Darstellung in den entsprechenden Berichten der Teilprojekte verwiesen. Was das Leukonet als Ganzes angeht, so fanden in der letzten Förderperiode jeweils zweimal im Jahr (Mai und Oktober) Treffen sämtlicher Mitglieder des Leukonet II statt. Auf diesen Treffen wurden jeweils alle Projekte besprochen, deren Fortschritt bewertet und das weitere Vorgehen diskutiert. Durch diese regelmäßigen Treffen wurde eine enge Vernetzung der Projekte erreicht. Beispielhaft seien hier nur die gemeinschaftlich getragenen Entwicklung von Scores im Bereich der klinischen Projekte sowie die Entwicklung eines Verfahrens zur Mustererkennung im MR zur Erleichterung der Diagnostik genannt. Im Bereich der theoretischen Projekte haben Kollaborationen zu einer gemeinsamen Nutzung der Analytik für das Myelinproteom und der Transkriptomanalyse in verschiedenen Tiermodellen, die in unterschiedlichen Teilprojekten bearbeitet wurden, geführt. Die Planungen zum Netzwerktreffen im Oktober wurden jeweils in enger Absprache mit den Betroffenenorganisationen durchgeführt.

4. wissenschaftlich und technischem Stand, an den angeknüpft wurde

In den Projekten wurden keine Verfahren oder Materialien benutzt, die patentrechtlich geschützt waren. Allen Projektbeteiligten standen über die jeweiligen Universitäten bzw. über das Max Planck Institut alle für das Vorhaben relevanten Journale / Publikationen zur Verfügung. Eine besonders häufig genutzte Quelle war der Informationsdienst PubMed des National Institute of Health in Bethesda/ U.S.A..

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die meisten Teilprojekte des Leukonet II sind dadurch gekennzeichnet, dass sie mit vielen internationalen Kooperationspartnern zusammengearbeitet haben. So ist insbesondere zu nennen, dass während der Laufzeit des Leukonet II die Basis für eine Internationalisierung der Datenbank für ausgesuchte Leukodystrophien gelegt wurde. Daher gab es multiple Kontakte mit europäischen wie außereuropäischen Zentren, die im Bereich der Leukodystrophien ausgewiesen sind. Hierzu gehören beispielhaft die Universität Clermont-Ferrand/Frankreich, das Massachusetts General Hospital in Boston, die Abteilung Kinderheilkunde am Hospital Saint Vincent de Paul in Paris, die Abteilung für Kinderheilkunde Manchester in England, die Abteilung für Innere Medizin an der Universität Oxford/England, die Abteilung für Neurologie Philadelphia/USA, die Abteilung für Neurologie an der Universität Amsterdam usw. Wegen der Seltenheit von Patienten von adulten Formen der Leukodystrophien wurden insbesondere Anstrengungen unternommen, solche Patienten auch aus osteuropäischen Ländern zu rekrutieren. Daher gab es Kooperationen mit den Universitäten in Minsk, Belarus, Szeged/Ungarn, Warschau/Polen, Vilnius/Litauen und Szczecin/Polen.

II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegeben Ziele.

Zur Einzeldarstellung der Ergebnisse wird auf die detaillierte Darstellung in den jeweiligen Berichten zu den Teilprojekten verwiesen. Diese Gesamtdarstellung wird sich daher auf die wesentlichen Fortschritte, die innerhalb des Leukonets gemacht wurden, beschränken.

Die Projekte des Leukonets haben eine Reihe wichtiger struktureller und wissenschaftlicher Fortschritte erbracht, die in einer Vielzahl von Publikationen in international anerkannten Zeitschriften resultierten. Dazu wird auf die Zusammenfassung dieser Publikationen am Ende der allgemeinen Beschreibung des Netzwerkes unter Punkt 6 verwiesen.

Klinische Projekte

In dieser zweiten Förderphase wurde die Datenbank zur zentralen Patientenregistrierung an der Universität Hamburg weiterbetrieben. Alle in den beteiligten Zentren des Leukonets diagnostizierten Patienten wurden hier erfasst. In zwei Jahren wurden 190 neue Patienten erfasst. Ältere Publikationen zur Häufigkeit von Leukodystrophien erlaubten die Kalkulation, dass pro Jahr mit etwa 25 neuen Patienten zu rechnen war. Die zentrale Patientenregistrierung zeigt, dass Leukodystrophien in ihrer Gesamtheit wahrscheinlich häufiger sind als bisher angenommen. Im Rahmen des für die Patientenregistrierung verantwortlichen Projektes wurden die krankheitsspezifischen Datenbanken weiterentwickelt. Dieses System gibt einen allgemeinen Rahmen vor, der jeweils auf die Bedürfnisse der Erfassung bestimmter Erkrankungen angepasst werden kann. Zur Benutzung wurde ein Handbuch erstellt.

Insbesondere für drei Projekte war die zentrale Patientenregistrierung von wesentlicher Bedeutung. Nicht zuletzt diese Datenbank ermöglichte es, dass 15 Patienten mit zystischer Leukenzephalopathie ohne Megenzephalie identifiziert und als eine distinkte Krankheitsform charakterisiert werden konnten. Diese Arbeiten waren die Voraussetzung dafür, dass im Leukonet II das dieser Erkrankungsform zugrunde liegende Gen (RNASET 2) durch Genkartierung identifiziert werden konnte. Diese Arbeiten haben zu einer hochrangigen Publikation im Nature Genetics geführt, die soeben angenommen worden ist. Sehr erfolgreich war auch die Rekrutierung von Patienten mit Metachromatischer Leukodystrophie. Hier konnten insgesamt 96 Patienten rekrutiert werden. Davon konnten während des Leukonet II insgesamt 57 Patienten sowohl retrospektiv als auch prospektiv aufgrund der innerhalb des Leukonets erstellten standardisierten Scores klinisch sehr gut charakterisiert werden. Hierzu sei auf Abbildung 1 in Teilprojekt 2 verwiesen, die zeigt, dass die klinischen Symptome diese Patienten innerhalb eines kurzen Zeitfensters von maximal 12 Monaten dramatisch zunehmen. Erstaunlich war der relativ gleichmäßige Verlauf dieser Erkrankung bei den verschiedenen Patienten. Diese auf den neurologischen Symptomen beruhenden Befunde korrelieren gut mit den sich zur gleichen Zeit verändernden Scores für die Magnetresonanz (Abbildung 3/Teilprojekt 2). Dieses Ergebnis war von großer Bedeutung für eine klinische Phase I/II-Studie zur Ersatztherapie der Metachromatischen Leukodystrophie der Firma Zymenex. Die innerhalb des Leukonets erhobenen Befunde dienten dabei für die Definition der geeigneten klinischen Endpunkte, die im Rahmen diese Phase I/II klinischen Studie erreicht werden sollten. Die Studie wurde zwischenzeitlich abgeschlossen, Ergebnisse liegen leider noch nicht vor. Der Koordinator des Teilprojektes 1 hat ferner versucht die Datenbank und Patientenregistrierung für die Metachromatische Leukodystrophie zu internationalisieren. Dies hat zu Unterzeichnung eines Mission Statements für ein International MLD Patient Registry geführt. Nicht zuletzt wegen der unterschiedlichen Vorgaben zum Datenschutz und Struktur von Datenbanken in den beteiligten Ländern ist dieses Vorhaben komplex und wird bis zur Vollendung sicher noch Zeit in Anspruch nehmen.

Weiterhin erlaubte die systematische Rekrutierung von Patienten innerhalb des Leukonets erstmals eine präzise Bestimmung der Geburtsprävalenz von spät infantiler und juveniler Metachromatischer Leukodystrophie. Erstmals gelang es in einem biometrisch korrekten Verfahren die Häufigkeit dieser Erkrankung auf 0.88 pro 100.000 in Deutschland zu bestimmen. Es sind insbesondere diese beiden Projekt zur Zystischen Leukenzephalopathie und zur Metachromatischen Leukodystrophie, die im Bereich der klinischen Projekte besonders erfolgreich verlaufen sind. Der Erfolg dieser Projekte basierte nicht zuletzt auf dem Aufbau des zentralen Registrierungssystems für Leukodystrophiepatienten. Dass diese beiden Projekte hervorgehoben werden soll aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass auch in den anderen klinischen Projekten wesentliche Fortschritte erreicht wurden. So konnte ein MR Diagnostik Werkzeug entwickelt werden. Diese Arbeiten beruhen auf einer Sammlung typischer Leukodystrophie-Läsionsmuster und deren systematischer Auswertung bei insgesamt 200 Patienten, die dem neuroradiologisch ausgerichteten Projekt zugewiesen wurden. Das Ergebnis dieser Arbeiten ist online verfügbar und kann daher von allen klinischen Zentren eingesehen und für die Diagnostik benutzt werden (http://webhost1.mh-hannover.de/mr-leuko/findings/typical_not_logged.php). In einem weiteren Projekt, dass sich mit Magnetresonanstechniken befasste, wurden standardisierte Protokolle für die Magnetresonanztomographie entwickelt und auf insgesamt 104 Patienten angewendet. Die Ergebnisse legen nahe, dass es bei einigen Erkrankungen spezifische MR spektroskopische Veränderungen gibt, die differentialdiagnostisch nutzbar gemacht werden könnten. Ebenfalls im Bereich der adulten Leukodystrophien konnten standardisierte klinische Scores gemeinsam von den Teilprojekten entwickelt werden und auf Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungsbildern angewendet werden. Wegen der Seltenheit von Leukodystrophien bei Erwachsenen hat das Projekt auch seine sehr guten Kontakte in den osteuropäischen Raum genutzt, um mehr Patienten zu rekrutieren. Es ist bei diesem Projekt zu beachten, dass die klinische Charakterisierung der Patienten ein sehr langfristiger Prozess ist, der nicht innerhalb einer einzelnen Förderphase abgeschlossen werden kann. Bei den adulten Patienten verlaufen die Leukodystrophien meist über mehrere Dekaden. Daher werden die im Leukonet gesammelten Daten erst in einigen Jahren erlauben, zu einer präziseren klinischen Beschreibung zu kommen. Es muss erwähnt werden, dass sich insbesondere dieses Teilprojekt darum bemüht hat, die Leukodystrophien in das Bewusstsein der Neurologen zu bringen. So wurde durch die Teilprojektleiter dieses Projektes eine Leukodystrophie Leitlinie für die Deutsche Gesellschaft für Neurologie erstellt und somit einer breiten Ärzteschaft zur Kenntnis gebracht.

Grundlagenwissenschaftliche Projekte

Innerhalb der grundlagenwissenschaftlichen Projekte sind ebenfalls eine Reihe von wesentlichen Fortschritten erzielt worden. Hier ist insbesondere zu erwähnen, dass es auch in dieser Förderperiode gelungen ist, bei einer weiteren bisher nicht genau diagnostizierbaren Leukodystrophie das krankheitsverursachende Gen zu identifizieren. Dabei handelt es sich um das RNASET2 Gen, welches bei Patienten mit zystischer Leukenzephalopathie ohne Megenzephalie defekt ist. Diese Arbeiten haben zu einer hochrangigen Publikation in Nature Genetics geführt, die soeben angenommen worden ist. In einem Projekt sollte insbesondere die Myelinproteomanalytik von Mausleukodystrophiemodellen ausgenutzt werden, um neue Einsichten in die Pathogenese zu bekommen. Dieser Ansatz war bei Mausmodellen der Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung sehr erfolgreich. Hier konnte gezeigt werden, dass im Myelin dieser Tiere das Protein Sirtuin-2 fast vollständig fehlt. Man nimmt an, dass dieses Protein als eine Art Sensor des Energieladezustandes einer Zelle dient. Veränderungen in diesem Protein könnten daher für die Energieversorgung von Zellen und damit deren Überleben wichtig sein. Dieser Befund

erlaubt völlig neue Arbeitshypothesen zur Pathogenese der Demyelinisierung aber auch der axonalen Neuropathie in dieser Erkrankung. Eine Reihe von Mausmodellen reflektieren nicht die pathologischen Veränderungen, die beim Menschen gefunden werden. Es gelang in zwei Teilprojekten durch genetische Eingriffe bestehende Mausmodelle zu verbessern. Dazu zählte einmal das Mausmodell der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie und der Metachromatischen Leukodystrophie. Diese verbesserten Modelle waren bereits in der Endphase der vorhergehenden Förderperiode erzeugt worden, eine detaillierte Charakterisierung dieser Tiere war aber Gegenstand dieser Förderperiode. Beide Mausmodelle sind innerhalb dieser Förderperiode hochrangig publiziert worden (Nature Genetics, Journal of Neuroscience). Die existierenden und neuen Modelle der Metachromatischen Leukodystrophie wurden in einer projektübergreifenden Zusammenarbeit durch Transkriptomanalyse untersucht. Hierbei ergaben sich eine Reihe von Genexpressionsveränderungen. Einige der in ihrer Expression veränderten Gene wurde bereits früher mit demyelinisierenden Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (z.B. der Kaliumkanal Kir 4.1). Die Transkriptomanalyse wurde auch verwendet, um nach Genexpressionsunterschieden in Hautfibroblasten von Patienten mit Zellweger Syndrom zu suchen. Dabei ergab sich eine Verminderung der Expression des Glutamat-Transportes EAAT. Diese Veränderung konnte auch funktionell auf biochemischer Ebene an Fibroblastenkulturen von Zellwegerpatienten bestätigt werden. Die Patientenzellen nehmen weniger Glutamat aus dem Medium auf. Dieser Befund ist insofern interessant, als Veränderungen dieser Transporter auch bei anderen neurodegenerativen Krankheiten beschrieben wurden. Fortschritte konnten auch im Bereich der biochemischen Charakterisierung von zwei an peroxisomalen Erkrankungen beteiligten ABC-Transportern erzielt werden. Basierend auf der Technik der FRET-Mikroskopie konnte an lebenden Zellen gezeigt werden, dass die beiden Proteine PMP70 und ALDP (die Defizienz des letzteren Proteins führt zur X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie) in vivo in lebenden Zellen Heterodimere formen. Dieser Befund beendete eine längere Diskussion, die auf Koimmunopräzipitationsexperimenten beruhte, die nahelegten, dass diese Proteine in vitro ausschließlich Homodimere formen können. Abgesehen von der in diesem Überblick sehr selektiven Darstellung der Ergebnisse sollte darauf hingewiesen werden, dass weitere wesentliche Resultate erreicht wurden wie z.B., die Beschreibung charakteristischer Magnetresonanzspektrumsveränderung in Patienten mit Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung, verschiedene klinische Beschreibungen von Patienten, Analyse neuer Mutationen bei der Vanishing White Matter Disease, Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung und der Metachromatischen Leukodystrophie. Abschließend sei nochmal auf die komplette Liste der Publikationen am Ende dieser Darstellung verwiesen.

Patientenrelevante Projekte

Als wesentliches Ergebnis des Netzwerkes soll auch aufgeführt werden, dass das Leukonet einer Reihe von Strukturen aufgebaut hat, die von unmittelbarem Nutzen für die Betroffenen sind. Hierzu gehören nicht nur die Möglichkeit zu einem direkten telefonischen Kontakt an den Zentren in Hamburg und in Wermsdorf, der von sehr vielen Betroffenen wie auch nicht spezialisierten Ärzten genutzt wurde. Diese wurden in der ersten Förderperiode etabliert und in der aktuellen als eine Serviceeinrichtung für Betroffene aber auch betreuende Ärzte vorgehalten. Wegen der sehr unterschiedlichen Beratungsbedürfnisse von Kindern und Erwachsenen bestanden zwei unabhängige Kontaktstellen, die sich jeweils an diese Patienten/Betroffengruppen richteten. Darüber hinaus wurde die Webseite weitergeführt, über die viele Betroffene Zugang zu den Projektleitern im Leukonet gefunden haben. Wesentlicher Bestandteil des Leukonets II waren auch die jährlichen gemeinsamen Treffen mit den Betroffenenorganisationen Bundesverband Leukodystrophien, Pelizaeus-

Merzbacher-Verein und Myelin Projekt. Bei diesen jeweils Anfang Oktober in Hannoversch Münden stattfindenden Treffen, die von etwa 100 bis 150 Betroffenen bzw. Eltern von Betroffenen besucht wurden, haben Projektleiter des Leukonet jeweils in für Laien verständlicher Form über Fortschritte im Bereich der Forschung der Leukodystrophien berichtet. Jeweils an den Nachmittagen dieser Veranstaltung wurden Spezialisten für die einzelnen Erkrankungen jeweils auf kleinere Räume verteilt, in denen sie von den Betroffenen in ungezwungener Atmosphäre und ohne formalen Rahmen befragt werden konnten. Diese Art der „Sprechstunde“ ist von fast allen Betroffenen, insbesondere von Eltern betroffener Kinder, intensiv genutzt worden.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Wesentliches förderpolitisches Ziel war es nachzuweisen, dass mindestens die Hälfte aller Patienten mit den entsprechenden Erkrankungen in Deutschland erfasst werden. Das Leukonet hat insgesamt bis zum Ende der Förderperiode des Leukonets II etwa 1.350 Patienten erfasst, von denen ca. 1.150 deutsche Patienten waren. Gemäß einer Veröffentlichung aus dem Jahre 1997 wird die Inzidenz aller Leukodystrophien in Deutschland auf etwa 3 in 100.000 geschätzt. Bei einer Geburtenrate von 800.000 Kindern im Jahr erlaubt dies die Schätzung, dass etwa 25 Patienten mit einer Leukodystrophie jedes Jahr geboren werden. Die zentrale Patientenregistrierung enthielt bis zum Ende der Förderperiode von Leukonet II etwa 1.350. Allein in den Jahren 2006 und 2007 wurden 190 neue Patienten aus Deutschland registriert. Diese Zahlen belegen, dass das Leukonet das Ziel, den größten Teil der Leukodystrophie-Patienten in Deutschland zu erfassen, erfüllt hat und erlaubt auch die Abschätzung, dass die Inzidenz dieser Erkrankung wahrscheinlich höher ist als in der eben zitierten Publikation erwartet.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Vor der Existenz des Leukonets hat es in Deutschland nur in sehr begrenztem Umfang eine koordinierte klinische und grundlagenwissenschaftliche Forschung zu Leukodystrophien gegeben. Daher war der Aufbau der durch das Leukonet geschaffenen Struktur notwendig. Eine Reihe von Projekten innerhalb des Leukonets – hier wird auf den Arbeitsbericht verwiesen – wäre ohne den Aufbau dieses Netzwerkes nicht möglich gewesen. Angesichts der doch sehr begrenzten Förderung dieses Netzwerkes ist die geleistete Arbeit weit mehr als angemessen.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Hier ist darauf hinzuweisen, dass die Verwertung von Ergebnissen im Bereich von seltenen Erkrankungen naturgemäß sehr eingeschränkt ist. Das Projekt hat aber insbesondere ein verwertbares Ergebnis im Bereich des Aufbaus von Datenbanken und den damit verbundenen Ergebnissen zur klinischen Verlaufsform bestimmter Leukodystrophien erbracht. Diese Ergebnisse waren und sind Grundlage von klinischen Studien, die im Rahmen der Enzyersatztherapie bei Patienten mit Metachromatischer Leukodystrophie durchgeführt wurden bzw. in Planung sind. Diese Ergebnisse waren Grundlage für eine klinische Phase I/II Studie, deren Ergebnisse im Moment aber noch nicht vorliegen. Es sind weitere Studien in den Vereinigten Staaten, Europa und Japan geplant und die diese Studien durchführende Firma ist sehr an den Ergebnissen aus der klinischen Datenbank interessiert. Sie hat daher bereits in der Vergangenheit zusätzliche Mittel zur Durchführung der klinischen Studien im Bereich der Metachromatischen Leukodystrophie zur Verfügung gestellt und das

Leukonet wird in der nächsten Antragsperiode versuchen, weitere finanzielle Kompensationen von der entsprechenden Firma zu bekommen.

5. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Forschung auf dem Bereich der Leukodystrophien findet im wesentlichen auch in den USA und den angrenzenden Staaten des europäischen Auslands statt. Zu diesen Ergebnissen gehören positive Vorversuche im Bereich der Gentherapie, die auf der Transplantation genetisch modifizierter hämatopoetischer Stammzellen beruht. Diese Untersuchungen wurden allerdings mit Mäusen durchgeführt, die im Rahmen des Leukonets erzeugt wurden. Des Weiteren wurden auch von anderen Gruppen innerhalb der bisher nicht klassifizierbaren Leukenzephalopathien neue klinische Entitäten definiert und innerhalb bereits klassifizierbarer Leukodystrophien auch Gene, die krankheitsverursachend sind, identifiziert. Teilweise waren Mitglieder des Leukonets an diesen Untersuchungen beteiligt. Des Weiteren haben natürlich viele Arbeitsgruppen neue Mutationen in bereits bekannten Genen beschrieben und so die genetische Datenbasis zu verschiedenen Formen der Leukodystrophien erweitert.

6. der erfolgten Veröffentlichungen der Ergebnisse.

1. **Schols L**, Nagele T, Schule R, Berg D (2006): Cerebrotendinous xanthomatosis. *Neurology* 67(11): E20.
2. **Müller I**, Kustermann-Kuhn B, Holzwarth C, et al. (2006): In vitro analysis of multipotent mesenchymal stromal cells as potential cellular therapeutics in neurometabolic diseases in pediatric patients. *Exp Hematol.* 34:1413-19.
3. Kehrer C, Kustermann-Kuhn B, **Krägeloh-Mann I** (2006): Early symptoms and time period from the occurrence of first symptoms to the diagnosis of metachromatic leucodystrophy (MLD). *Neuropediatrics* 37: 380
4. Kaga Y, Shoemaker WJ, Furusho M, Bryant M, Rosenbluth J, Pfeiffer SE, Oh L, Rasband M, Lappe-Siefke C, Yu K, Ornitz DM, **Nave KA**, Bansal R (2006): Mice with conditional inactivation of fibroblast growth factor receptor-2 signaling in oligodendrocytes have normal myelin but display dramatic hyperactivity when combined with Cnp1 inactivation. *J Neurosci* 26, 12339-12350.
5. Krämer-Albers EM, Gehrig-Burger K, Thiele C, Trotter J, **Nave KA** (2006): Perturbed interactions of mutant proteolipid protein/DM20 with cholesterol and lipid rafts in oligodendroglia: Implications for dysmyelination in spastic paraplegia. *J Neurosci* 26, 11743-11752.
6. Thurnherr T, Benninger Y, Wu X, Chrostek A, Krause SM, **Nave KA**, Franklin RJM, Brakebusch C, Suter U, Relvas JB (2006): Cdc42 and Rac1 signaling are both required for and act synergistically in the correct formation of myelin sheaths in the CNS. *J Neurosci* 26, 10110-10119.
7. Ip CW, Kroner A, Bendszus M, Leder C, Kobsar I, Fischer S, Wiendl H, **Nave KA**, Martini R (2006): Immune cells contribute to myelin degeneration and axonopathic changes in mice overexpressing proteolipid protein in oligodendrocytes. *J Neurosci* 26, 8206-8216.

8. Benninger Y, Colognato H, Thurnherr T, Franklin RJM, Leone DP, Atanasoski S, **Nave KA**, French-Constant C, Suter U, Relvas JB (2006): Beta1-integrin signaling mediates premyelinating oligodendrocyte survival but is not required for CNS myelination and remyelination. *J Neurosci* 26, 7665-7673.
9. Rosenbluth J, **Nave KA**, Mierzwa A, Schiff R (2006): Subtle myelin defects in PLP-null mice. *Glia* 54, 172-182.
10. Fowler JH, Edgar JM, Pringle A, McLaughlin M, McCulloch J, Griffiths IR, Garbern JY, **Nave KA**, Dewar D (2006): Alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid-mediated excitotoxic axonal damage is attenuated in the absence of myelin proteolipid protein. *J Neurosci Res* 84, 68-77.
11. Yin X, Baek RC, Kirschner DA, Peterson A, Fujii Y, **Nave KA**, Macklin WB, Trapp BD (2006): Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin. *J Cell Biol* 172, 469-478.
12. Schweitzer J, Becker T, Schachner M, **Nave KA**, **Werner H** (2006): Evolution of myelin proteolipid proteins: Gene duplication in teleosts and expression pattern divergence. *Mol Cell Neurosci* 31, 161-177.
13. **Ding X**, Goerg M, Eckert B, Ohlenbusch A, **Gartner J**, **Kohlschütter A**, **Zeumer H** (2006): Rapidly progressive vanishing white matter disease in a child with previously inconspicuous brain MRI. ***Neuropediatrics*** 37:253-256.
14. Neubauer BA, Stefanova I, Hübner CA, Neumeier Probst E, Bohl J, Oppermann HC, Stoll H, Hahn A, Stephani U, **Kohlschütter A**, Gal A (2006): A new type of X-chromosomal leukoencephalopathy with metaphyseal chondrodysplasia maps on Xq25-q27. *Neurology* 67:587-591.
15. Berger J, **Gärtner J** (2006): X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Res* 1763:1721-1732.
16. Linnebank M, Kemp S, Wanders RJ, Kleijer WJ, van der Sterre ML, **Gärtner J**, Fliessbach K, Semmler A, Sokolowski P, **Köhler W**, Schlegel U, Schmidt S, Klockgether T, Wullner U (2006): Methionine metabolism and phenotypic variability in X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology* 66:442-443.
17. Linnebank M, Semmler A, Kleijer WJ, van der Sterre ML, **Gärtner J**, Fliessbach K, Sokolowski P, **Köhler W**, Schlegel U, Klockgether T, Wanders RJ, Schmidt S, Wullner U, Kemp S (2006): The cystathionine beta-synthase variant c.844_845ins68 protects against CNS demyelination in X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mutat* 27:1063-1064.
18. Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Locatelli Hoops S, Breiden B, **Sandhoff K**, Brinkmann V, Kaufmann SHE, and Schaible UE (2006): Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* 24, 105-117.
19. Wendeler M, Werth N, Maier T, Schwarzmann G, Kolter T, Schoeninger M, Hoffmann D, Lemm T, Saenger W, **Sandhoff K** (2006): The enzyme-binding region of the GM2-activator protein. *FEBS J.* 273, 982-991.
20. Schultz-Heienbrock R, Remmel N, Klingenstein R, Rossocha M, **Sandhoff K**, Saenger W, and Maier T (2006): Crystallization and preliminary characterization of three different crystal forms of human saposin C heterologously expressed in *Pichia pastoris*. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62, 117-20.

21. John M, Wendeler M, Heller M, **Sandhoff K**, and Kessler H (2006): Characterization of Human Saposins by NMR Spectroscopy. *Biochemistry* 45, 5206-16.
22. Kolter T and **Sandhoff K** (2006): Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, pub ahead of print
23. Locatelli Hoops S, Kolter T, and **Sandhoff K** (2006): Saposin C and Other Sphingolipid Activator Proteins, in: *Gaucher Disease*, eds. Anthony H. Futerman and Ari Zimran, CRC Press, Taylor & Francis Group, Chapter 4, 67-84.
24. Locatelli-Hoops S, Rimmel N, Klingenstein R, Breiden B, Rossocha M, Schoeniger M, Koenigs C, Saenger W, and **Sandhoff K**. (2006): Saposin A mobilizes lipids from low cholesterol and high bmp containing membranes. Patient variant saposin A lacks lipid extraction capacity. *J. Biol. Chem*, 281, 32451-60.
25. Hoffmann B, Beck M, **Rolfs A**, Neumann HP (2007): Fabry disease - complex clinical picture, simple diagnosis procedure, causal treatment. *Dtsch Med Wochenschr.*, 133:1965-1972.
26. Riecker A, Nagele T, **Henneke M**, **Schols L** (2007): Late onset vanishing white matter disease. *J Neurol* 254(4): 544-545
27. Werner HB, Kuhlmann K, Shen S, Uecker M, Schardt A, Dimova K, Orfaniotou F, Dhaunchak A, Brinkmann BG, Möbius W, Guarente L, Casaccia-Bonnet P, Jahn O, **Nave KA** (2007): Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. *J Neurosci* 27, 7717-7730.
28. Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HB, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahm J, **Nave KA** (2007): Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet* 39, 969-976.
29. Dhaunchak AS, **Nave KA** (2007): A common mechanism of PLP/DM20 misfolding causes cysteine-mediated endoplasmic reticulum retention in oligodendrocytes and Pelizaeus-Merzbacher disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 17813-17818.
30. Leder C, Schwab N, Ip CW, Kroner A, **Nave KA**, Dornmair K, Martini R, Wiendl H (2007): Clonal expansions of pathogenic CD8+ effector cells in the CNS of myelin mutant mice. *Mol Cell Neurosci* 36, 416-424.
31. He Y, Dupree J, Wang J, Sandoval J, Li J, Liu H, Shi Y, **Nave KA**, Casaccia-Bonnet P (2007): The transcription factor yin yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron* 55, 217-230.
32. Karim SA, Barrie JA, McCulloch MC, Montague P, Edgar JM, Kirkham D, Anderson TJ, **Nave KA**, Griffiths IR, McLaughlin M (2007): PLP overexpression perturbs myelin protein composition and myelination in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Glia* 55, 341-351.
33. Ip CW, Kroner A, Crocker PR, **Nave KA**, Martini R (2007): Sialoadhesin deficiency ameliorates myelin degeneration and axonopathic changes in the CNS of PLP overexpressing mice. *Neurobiol Dis* 25, 105-111.
34. **Görg M**, Wilck W, Granitzny B, Suerken A, Lukacs Z, **Ding X**, Schulte-Markwort M, **Kohlschütter A** (2007): Stabilization of Juvenile Metachromatic Leukodystrophy after

- Bone Marrow Transplantation: A 13 Year Follow-up. **J Child Neurol**, 22:1139-42.
35. **Brockmann K**, Dechent P, Bönnemann C, Schreiber G, Frahm J, Hanefeld F (2007): Quantitative proton MRS of cerebral metabolites in Laminin $\alpha 2$ chain deficiency. *Brain & Development* 29:357-64.
 36. Groeschel S, **Brockmann K**, Hanefeld F (2007): Virchow-Robin spaces on magnetic resonance images of children with adrenoleukodystrophy. *Eur J Paediatr Neurol*. 11:142-45.
 37. van der Knaap MS, Linnankivi T, Paetau A, Feigenbaum A, Wakusawa K, Haginoya K, **Kohler W**, **Henneke M**, Dinopoulos A, Grattan-Smith P, **Brockmann K**, Schiffmann R, Blaser S (2007): Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum: Follow-up and pathology. *Neurology* 69:166-171.
 38. Hillebrand M, Verrier SE, Ohlenbusch A, Schäfer A, Söling HD, Wouters FS, **Gärtner J** (2007): Live cell FRET microscopy: Homo- and heterodimerization of two human peroxisomal ABC transporters, the adrenoleukodystrophy protein (ALDP, ABCD1) and PMP 70 (ABCD3). *J Biol Chem* 282:26997-267005.
 39. Schönberger S, Roerig P, Schneider DT, Reifenberger G, Göbel U, **Gärtner J** (2007): Genotype and protein expression after bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy. *Arch Neurol* 64:651-657.
 40. **Gärtner J**, **Kohlschütter A**, **Gieselmann V** (2007): Leukodystrophies: diseases of white matter of the nervous system]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 50(12):1531-40.
 41. Ramakrishnan H, Hedayati KK, Lüllmann-Rauch R, Wessig C, Fewou SN, Maier H, Goebel HH, **Gieselmann V**, **Eckhardt M** (2007): Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy. *J Neurosci*. 27(35):9482-90.
 42. **Eckhardt M**, Hedayati KK, Pitsch J, Lüllmann-Rauch R, Beck H, Fewou SN, **Gieselmann V** (2007): Sulfatide storage in neurons causes hyperexcitability and axonal degeneration in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *J Neurosci*. 27(34):9009-21.
 43. Yaghootfam A, Sorkalla T, Häberlein H, **Gieselmann V**, Kappler J, **Eckhardt M** (2007): Cerebroside sulfotransferase forms homodimers in living cells. *Biochemistry*. 46(32):9260-9.
 44. **Gieselmann V** (2007): Sphingolipids in physiology and pathophysiology. *Acta Paediatr Suppl*. 96(455):39.
 45. Saravanan K, Büsow H, Weiler N, **Gieselmann V**, Franken S (2007): A spontaneously immortalized Schwann cell line to study the molecular aspects of metachromatic leukodystrophy. *J Neurosci Methods*. 15;161(2):223-33.
 46. Sevin C, Verot L, Benraiss A, Van Dam D, Bonnin D, Nagels G, Fouquet F, **Gieselmann V**, Vanier MT, De Deyn PP, Aubourg P, Cartier N (2007): Partial cure of established disease in an animal model of metachromatic leukodystrophy after intracerebral adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Gene Ther*. 14(5):405-14.

47. Remmel N, Locatelli-Hoops S, Breiden B, Schwarzmann G, **Sandhoff K** (2007): Saposin B mobilizes lipids from cholesterol-poor and bis(monoacylglycero)phosphate-rich membranes at acidic pH. Unglycosylated patient variant saposin B lacks lipid-extraction capacity. *Febs J* 274, 3405-20.
48. Babalola JO, Wendeler M, Breiden B, Arenz C, Schwarzmann G, Locatelli-Hoops S, **Sandhoff K** (2007): Development of an assay for the intermembrane transfer of cholesterol by Niemann-Pick C2 protein. *Biol Chem* 388, 617-26.
49. Rossmann M, Schultz-Heienbrok R, Behlke J, Remmel N, Alings C, **Sandhoff K**, Saenger W, Maier T (2008): Crystal structures of human saposins C and D: implications for lipid recognition and membrane interactions. *Structure* 16, 809-17.
50. Hoffmann B, Beck M, **Rolfs A**, Neumann HP (2008): Fabry disease - complex clinical picture, simple diagnosis procedure, causal treatment. *Dtsch Med Wochenschr.* , 133:1965-1972.
51. Falke K, Büttner A, Schittkowski M, Stachs O, Kraak R, Zhivov A, **Rolfs A**, Guthoff R (2008): The microstructure of cornea verticillata in Fabry disease and amiodarone-induced keratopathy: a confocal laser-scanning microscopy study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* Oct 18.
52. **Schöls L**, Bösch S, **Köhler W**, **Krägeloh-Mann I**, **Rolfs A** (2008): Leukodystrophien im Erwachsenenalter. In: Diener HC, Putzki N (eds) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Thieme, Stuttgart, 822-826.
53. **Köhler W** (2008): Diagnostic algorithm for the differentiation of leukodystrophies in early MS. *J Neurol.* 255.
54. Maier EM, Mayerhofer PU, Asheuer M, **Köhler W**, Rothe M, Muntau AC, Roscher AA, Holzinger A, Aubourg P, Berger J (2008): X-linked adrenoleukodystrophy phenotype is independent of ABCD2 genotype. *Biochem Biophys Res Commun.* 377(1):176-80.
55. Semmler A, **Köhler W**, Jung HH, Weller M, Linnebank M (2008): Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Expert Rev Neurother.* 8(9):1367-79. Review.
56. **Weller S**, Rosewich H, **Gärtner J** (2008): Cerebral MRI as a valuable diagnostic tool in Zellweger spectrum patients. *J Inherit Metab Dis* 31: 270-280.
57. Spinazzola A, Santer R, Akman OH, Tsiakas K, Schaefer H, **Ding X**, Karadimas CL, Shanske S, Ganesh J, Di Mauro S, Zeviani M (2008): Hepatocerebral form of mitochondrial DNA depletion syndrome: novel MPV17 mutations. *Arch Neurol* 65:1108-1113.
58. **Ding XQ**, Sun Y, Braabeta H, Illies T, **Zeumer H**, Lanfermann H, Fiehler J (2008): Evidence of Rapid Ongoing Brain Development Beyond Two Years of Age Detected by Fiber Tracking. *AJNR Am J Neuroradiol* 24:24
59. **Ding XQ**, Fiehler J, Kohlschütter B, Wittkugel O, Grzyska U, **Zeumer H**, Ullrich K (2008): MRI abnormalities in normal-appearing brain tissue of treated adult PKU patients. *J Magn Reson Imaging* 27:998-1004.
60. Bester M, Heesen C, Schippling S, Martin R, **Ding XQ**, Holst B, Fiehler J (2008): Early anisotropy changes in the corpus callosum of patients with optic neuritis. *Neuroradiology* 50:549-557. Epub 2008 May 2006.

61. Prietsch V, Arnold S, **Kraegeloh-Mann I**, Kuehr J, Santer R (2008): Severe hypomyelination as the leading neuroradiological sign in a patient with fucosidosis. *Neuropediatrics*. 39:51-4.
62. **Gärtner J**, Neumaier-Probst E (2008): Typische Magnetresonanztomographie (MRT)-Befunde bei neurometabolischen und neurodegenerativen Erkrankungen. In: Aksu F, ed.. *Neuropädiatrie*. Uni-Med Bremen, 700-717.
63. Kehrer C, Kustermann-Kuhn B, Raabe C, **Krägeloh-Mann I** (2008): Natural history of metachromatic leucodystrophy (MLD) – clinical course. *Eur J Pediatr* 167, 374
64. Kehrer C, Kustermann-Kuhn B, **Krägeloh-Mann I** (2008): Clinical course of metachromatic leucodystrophy (MLD) in children – an analysis using standardized functional motor scores. *Neuropediatrics* 39; DOI: 10.1055/s-2008-1079467.
65. Kehrer C, Kustermann-Kuhn B, Raabe C, **Krägeloh-Mann I** (2008): Klinischer Verlauf der Metachromatischen Leukodystrophie (MLD) im Kindesalter anhand standardisierter motorischer Scores. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 156, Suppl 1, 24-25.
66. Kehrer C, Opherk K, Müller I, Wilke M, **Krägeloh-Mann I** (2008): Clinical course of two siblings with Metachromatic Leukodystrophy (MLD) with and without Stem cell transplantation (SCT). *Neuropediatrics* 39(5), 301.
67. Wilke M, Grodd W, Kehrer C, **Krägeloh-Mann I** (2008): A new score for assessing white matter changes in metachromatic leukodystrophy. *Neuropediatrics* 39(5), 284.
68. Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW, Garratt AN, Wende TH, Stassart RM, Nawaz S, Humml C, Velanac V, Radyuschkin K, Goebbels S, Fischer TM, Franklin RJ, Lai C, Ehrenreich H, Birchmeier C, Schwab MH, **Nave KA** (2008): Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59, 581-595.
69. Yin X, Kidd GJ, **Nave KA**, Trapp BD (2008): P0 protein is required for and can induce formation of schmidt-lantermann incisures in myelin internodes. *J Neurosci* 28, 7068-7073.
70. Ip CW, Kohl B, Kleinschnitz C, Reuss B, **Nave KA**, Kroner A, Martini R (2008): Origin of CD11b+ macrophage-like cells in the CNS of PLP-overexpressing mice: Low influx of haematogenous macrophages and unchanged blood-brain-barrier in the optic nerve. *Mol Cell Neurosci* 38, 489-494.
71. Chatterjee N, Stegmüller J, Schätzle P, Karram K, Koroll M, **Werner HB**, **Nave KA**, Trotter J (2008): Interaction of syntenin-1 and the NG2 proteoglycan in migratory oligodendrocyte precursor cells. *J Biol Chem* 283, 8310-7.
72. **Henneke M**, Combes P, Diekmann S, Ohlenbusch A, Kaiser J, Plecko B, Burlina AP, **Brockmann K**, Rodriguez D, Bertini E, Boespflug-Tanguy O, **Gärtner J** (2008): *GJA12* mutations as a rare cause for Pelizaeus-Merzbacher-like Disease. *Neurology*. 70:748-754.
73. **Dreha-Kulaczewski S**, Dechent P, Finsterbusch J, **Brockmann K**, **Gärtner J**, Frahm J, Hanefeld F (2008): Early Reduction of NAA in Patients with Classical Vanishing White Matter Disease. A Long-term Follow-up MRS Study. *Ped Research* 63:444-449.

74. **Brockmann K, Dreha-Kulaczewski S**, Dechent P, Bönnemann C, Helms G, Kyllerman M, Brück W, Frahm J, Huehne K, **Gärtner J**, Rautenstrauss B (2008): Cerebral involvement in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mitofusin2 mutations. *J Neurol* 255:1049-58.
75. **Eckhardt M** (2008): The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol Neurobiol.* 37(2-3):93-103.
76. **Gieselmann V** (2008): tachromatic leukodystrophy: genetics, pathogenesis and therapeutic options. *Acta Paediatr Suppl.* 97(457):15-21.
77. Rossmann M, Schultz-Heienbrok R, Behlke J, Rimmel N, Alings C, **Sandhoff K**, Saenger W, Maier T (2008): Crystal structures of human saposins C and D: implications for lipid recognition and membrane interactions. *Structure* 16, 809-17.
78. Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, **Sandhoff K**, Polyakova S, Belov VN, Hein B, von Middendorff C, Schonle A, Hell SW (2009): Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 457, 1159-62.
79. Matzner U, Breiden B, Schwarzmann G, Yaghootfam A, Fluharty AL, Hasilik A, **Sandhoff K, Gieselmann V** (2009): Saposin B-dependent reconstitution of arylsulfatase A activity in vitro and in cell culture models of metachromatic leukodystrophy. *J Biol Chem* 284, 9372-81.
80. Schulze H, Kolter T, **Sandhoff K** (2009): Principles of lysosomal membrane degradation Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochim Biophys Acta* 1793, 674-83.
81. **Ding X-Q, Zeumer H**, Lanfermann H (2009): Typische Kernspintomographie-Befunde von häufigen neurometabolischen und neurodegenerativen Erkrankungen im Kindersalter. *Kinder- und Jugendarzt* 40:91-97.
82. **Ding XQ**, Sun Y, Kruse B, Illies T, **Zeumer H**, Fiehler J, Lanfermann H (2009): Microstructural callosal abnormalities in normal-appearing brain of children with developmental delay detected with diffusion tensor imaging. *Eur Radiol* 29:29.
83. Klein D, Yaghootfam A, Matzner U, Koch B, Bräulke T, **Gieselmann V** (2009): Mannose 6-phosphate receptor-dependent endocytosis of lysosomal enzymes is increased in sulfatide-storing kidney cells. *Biol Chem.* 390(1):41-8.
84. Hans M, Pusch A, Dai L, Racké K, Swandulla D, **Gieselmann V**, Kappler J (2009): Lysosulfatide regulates the motility of a neural precursor cell line via calcium-mediated process collapse. *Neurochem Res.* 34(3):508-17.
85. Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, **Sandhoff K**, Polyakova S, Belov VN, Hein B, von Middendorff C, Schonle A, Hell SW (2009): Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 457, 1159-62.
86. Matzner U, Breiden B, Schwarzmann G, Yaghootfam A, Fluharty AL, Hasilik A, **Sandhoff K, Gieselmann V** (2009): Saposin B-dependent reconstitution of arylsulfatase A activity in vitro and in cell culture models of metachromatic leukodystrophy. *J Biol Chem* 284, 9372-81.

87. Schulze H, Kolter T, **Sandhoff K** (2009): Principles of lysosomal membrane degradation Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochim Biophys Acta* 1793, 674-83.
88. Corbeil D, Joester A, Fargeas CA, Jászai J, Garwood J, Hellwig A, **Werner HB**, Huttner WB (2009): Expression of distinct splice variants of the stem cell marker prominin-1 (CD133) in glial cells. *Glia* 57(8): 860-74.
89. Buser AM, Erne B, **Werner HB**, **Nave KA**, Schaeren-Wiemers N (2009): The septin cytoskeleton in myelinating glia. *Mol Cell Neurosci* 40(2): 156-66.
90. **Henneke M**, Diekmann S, Ohlenbusch A, Kaiser J, Engelbrecht V, **Kohlschütter A**, Krätzner R, Madruga-Garrido M, Mayer M, Opitz L, Rodriguez D, Rüschenhoff F, Schumacher J, Thiele H, Thoms S, **Steinfeld R**, Nürnberg P, **Gärtner J** (2009): RNASET2 glycoprotein deficiency causes cystic leukoencephalopathy without megalencephaly. *Nature Genetics*, in print.
91. Eichler F, Grodd W, Grant E, Sessa M, Biffi A, Bley A, **Kohlschütter A**, Loes DJ, **Kraegeloh-Mann I** (2009): Metachromatic Leukodystrophy: A Scoring System for Brain MR Observations. *Am J Neuroradiol AJNR*, in print.
92. **Kohlschütter A**, Bley A, **Brockmann K**, **Gärtner J**, **Köhler W**, **Krägeloh-Mann I**, **Rolfs A**, **Schöls L** (2009): Leukodystrophies and other genetic metabolic leukoencephalopathies in children and adults - A diagnostic check list. *Brain Development*, in press.
93. Semmler A, Bao X, Cao G, **Köhler W**, Weller M, Aubourg P, Linnebank M (2009): Genetic variants of methionine metabolism and X-ALD phenotype generation: results of a new study sample. *J Neurol*.
94. **Ding XQ**, Hagel C, Ringelstein B, Buchheit S, **Zeumer H**, Kühlenbäumer G, Fiehler J (2009): MRI features of pontine autosomal dominant microangiopathy and leukoencephalopathy (PADMAL). *Journal of Neuroimaging* Jan 29. [Epub ahead of print]
95. **Steinfeld R**, **Gärtner J** (2009): Peroxisomale Erkrankungen. In: Korinthenberg R, Panteliadis CP, Hagel C, eds.. *Neurologische Therapie im Kindesalter*. Urban und Fischer München, im Druck.
96. **Henneke M**, Diekmann S, Ohlenbusch A, Kaiser J, Engelbrecht V, **Kohlschütter A**, Krätzner R, Madruga-Garrido M, Mayer M, Opitz L, Rodriguez D, Rüschenhoff F, Schumacher J, Thiele H, Thoms S, **Steinfeld R**, Nürnberg P, **Gärtner J** (2009): RNASET2 deficient cystic leukoencephalopathy resembles congenital cytomegalovirus brain infection. *Nat Genetics*, *im Druck*.
97. Schardt A, Brinkmann BG, Mitkovski M, Sereda MW, **Werner HB**, **Nave KA** (2009): The SNARE protein SNAP-29 interacts with the GTPase Rab3A: Implications for membrane trafficking in myelinating glia. *J Neurosci Res* [Epub ahead of print].

Schlussbericht Leukonet - 2. Förderungsperiode
TP 1 Datenbank und Informationsplattform; TP 3 MRT-Klassifizierung von
Leukodystrophien. Förderkennzeichen 01GM0641, Kassenzeichen 810301906607

I. Kurze Darstellung

(Es wird nur über das TP 1 berichtet, da das TP3 mit dem Wegzug von Frau Dr. Dr. X. Ding nach Hannover dort weiterbetrieben wurde.)

1. Aufgabenstellung

Weiterentwicklung eines Datenbanksystems für die Registrierung klinischer Daten von Leukodystrophiepatienten mit verschiedenen Krankheitsformen.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Vorausgesetzt war die dauernde Verfügbarkeit einer mit dem Projekt beauftragten Ärztin und eines Dateningenieurs am Arbeitsort Hamburg, sowie die zeitlich enge Zusammenarbeit mit anderen klinischen Zentren des Leukonetprojekts.

Diese personellen Voraussetzungen in Hamburg waren insofern nicht immer gegeben, weil die für das Projekt eingestellte Ärztin (Maria Görg) die Klinik im Sommer 2006 verließ und eine Nachfolgerin (Annette Bley) sich erst ab Februar 2007 einarbeiten konnte. Frau Bley unterbrach ihre Arbeit wegen Mutterschaft ab September 2008 und nahm sie im Februar 2009 zu ¼ wieder auf.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Der Projektleiter Kohlschütter wurde im Herbst 2005 pensioniert. Er hat anschließend bis zum Ende der Förderung (31.01.2009) das Projekt auf ehrenamtlicher Basis weitergeführt. Dabei hat er an der Kinderklinik Hamburg, und in Zusammenarbeit mit dieser, eine Arbeitsgruppe für Leukodystrophien und eine wöchentliche Spezialsprechstunde für Leukodystrophiepatienten geleitet.

Trotz der unter 2. genannten Einschränkungen wurde das TP weitergeführt und abgeschlossen. Wesentliche Elemente der aufgebauten Datenbanksysteme wurden mit Auslauf der Förderung des TP1 an ein Teilprojekt des Leukonet im Rahmen des 3. Förderperiode an die Kinderklinik der Universität Tübingen übertragen.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Entfällt.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

(a) Die klinischen Zentren des Leukodystrophie-Netzwerks.

(b) In den letzten Jahren ergab sich zunehmend die Möglichkeit (und auch die sachliche Notwendigkeit), im Leukonet-Projekt formulierte Ziele auch auf internationaler Ebene zu verfolgen. Dabein entstand eine tieferegehende Zusammenarbeit mit folgenden Einrichtungen außerhalb Deutschlands:

Frankreich: Universität Clermont-Ferrand (Prof. Odile Boespflug-Tanguy)

USA: Massachusetts General Hospital, Boston (Prof. Florian Eichler).

Für das Projekt wesentliche Kontakte bestanden außerdem mit Leukodystrophie-Patientenorganisationen. Abgesehen von den deutschen Organisationen kam es zu Kontakten mit französischen und holländischen Gruppen

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses

Hauptziel der Entwicklung von klinischen Datenbanken für Leukodystrophiepatienten war die quantitative Beschreibung der Variabilität der klinischen Verläufe bei sämtlichen Formen von Leukodystrophien.

Entsprechend den Vorgaben wurde unter Verwendung der zugewendeten Personalmittel für eine Ärztin (unter Berücksichtigung der oben unter 1.2 erwähnten Einschränkungen) und einen Dateningenieur das in der vorausgegangenen Förderungsperiode entwickelte klinische Datenbanksystem für Leukodystrophie-Patienten vervollkommen. Als Ergebnis steht ein voll funktionsfähiges Datenbanksystem für die quantitative Erfassung des Krankheitsverlaufs bei unterschiedlichen Leukodystrophieformen zur Verfügung. Hierzu wurde ein Qualitätssicherungskonzept erarbeitet und ein Handbuch für die Benutzung durch andere Personen in anderen klinischen Zentren hergestellt. Das ursprüngliche Ziel, ein solches System für alle verschiedenen Leukodystrophieformen zu entwickeln, konnte nicht erreicht werden, wie bereits in früheren Berichten dargestellt. Hierzu hätte an jedem der klinischen Zentren des Leukonet außerhalb Hamburg Personal vorhanden sein müssen, um die krankheitspezifischen Besonderheiten bei den einzelnen Leukodystrophien im Kontakt mit dem Personal in Hamburg laufend zu erarbeiten und zu perfektionieren. Die Unterfinanzierung bei den entsprechenden Zentren stand somit der vollständigen Erfüllung der Aufgaben des TP1 teilweise entgegen.

Es wurde daher von der Mitgliederversammlung des Leukonets beschlossen die Ressourcen zunächst für bestimmte Krankheitsbilder zu bündeln. Zunehmend bestand jetzt Interesse, vor allem für solche Leukodystrophieformen ein funktionstüchtiges klinisches Datenbanksystem zu besitzen, für die experimentelle Therapieformen in Entwicklung sind. Da dies besonders für die auf lysosomalen Defekten (MLD und M. Krabbe) beruhenden Formen zutrifft, wurde das klinische Datenbanksystem für die MLD perfektioniert. An dieser Entwicklung war naturgemäß das entsprechende Teilprojekt der Kinderklinik Tübingen (Krägeloh-Mann) beteiligt, das in der 3. Förderungsperiode weitergefördert wird. Die im TP1 in Hamburg erarbeitete Technologie des Datenbanksystems und der Prozess der Erfassung von MLD-Patienten wurde daher mit dem Auslauf des TP1 nach Tübingen übertragen.

Parallel hierzu kam es zu einer Internationalisierung der Bemühungen um eine präzise Erfassung der Krankheitsverläufe von MLD-Fällen. Eine wesentliche Ursache hierfür war die Entwicklung einer Enzymersatztherapie für MLD, zunächst durch die Firma Zymenex in Dänemark, später durch Firma Shire HGT in USA. Im engen Kontakt mit Patienten-Organisationen und Firmen wurde das Konzept eines International MLD Patient Registry geschaffen, das sich vollständig an den in Deutschland im Leukonet entwickelten Kriterien für das quantitative klinische Scoring orientiert. Es kam im Jahre 2007 zu einem „Mission Statement“ interessierter Personen aus verschiedenen Ländern (Anlage #1), dann zur Bildung eines Konsortiums mit Unterzeichnung einer vertraglichen Regelung der Zusammenarbeit (Anlage #2). Diese Entwicklung ist noch im Gang und wird voraussichtlich eine weitere Förderung auf europäischer Ebene erhalten (FP7-Projekt Leukotreat WP1).

Da für eine quantitative Verlaufsbeschreibung bei Leukodystrophiepatienten nicht nur Verfahren eines klinischen Scorings in Frage kommen, sondern vor allem die zerebralen Bildgebungsverfahren eine Rolle spielen, wurde eine Interessengruppe gebildet, die ein Scoringssystem für MRT-Bilder von MLD-Patienten entwickeln sollte. Hieran waren aus dem Leukonet-Bereich Tübingen und Hamburg beteiligt, außerdem Spezialisten in Mailand und in Boston. Ein solches neuroradiologisches Scoringssystem für den Schweregrad einer MLD wurde erarbeitet und im Mai 2009 zur Publikation angenommen (Eichler et al. 2009).

Die zum TP1 gehörende Informations-Plattform im Internet für Leukodystrophiepatienten und andere Personen ist unzählige Male besucht worden und hat erheblich zur Publizität der Leukodystrophien beigetragen. Die Existenz dieser Plattform war offensichtlich Ursache für sehr häufige konkrete Anfragen von Patienten und Ärzten. Solche Anfragen wurden fast

immer sorgfältig, individuell und meist mit angemessener Schnelligkeit beantwortet, oder die Frage wurde an ein anderes klinisches Leukonet-Zentrum weitergeleitet. Viele Anfragen zu Patienten mit unklaren leukodystrophischen Prozessen wurden anhand von Unterlagen und MR-Bildern studiert und nach Diskussion mit ausführlichen schriftlichen Gutachten beantwortet. In vielen Fällen kam es zu einer ambulanten oder stationären Untersuchung des betreffenden Patienten im eigenen Zentrum oder einem anderen klinischen Leukonet-Zentrum.

Diese aufwendige Arbeit stellte eine erhebliche Serviceleistung dar, in welche die Arbeitskraft der vom TP1 finanzierten Ärztin und diejenige des Arbeitsgruppenleiters einging. Diese Art ärztlich-wissenschaftlicher Arbeit hat, in Zusammenarbeit mit anderen klinischen Projektleitern des Leukonet, zu einer Konsolidierung des klinischen Wissens auf dem Gebiet genetischer Leukodystrophien und verwandter Krankheiten geführt, die in einer gemeinsam erarbeiteten Übersichtsveröffentlichung zum Ausdruck gekommen ist (Kohlschütter et al. 2009).

2. Zahlenmäßige Nachweise

Wesentliches förderpolitisches Ziel war es nachzuweisen, dass mindestens die Hälfte aller Patienten mit den entsprechenden Erkrankungen in Deutschland erfasst werden. Das Leukonet hat insgesamt bis zum Ende der Förderperiode des Leukonets II etwa 1.350 Patienten erfasst, von denen ca. 1.150 deutsche Patienten waren. Gemäß einer Veröffentlichung aus dem Jahre 1997 wird die Inzidenz aller Leukodystrophien in Deutschland auf etwa 3 in 100.000 geschätzt. Bei einer Geburtenrate von 800.000 Kindern im Jahr erlaubt dies die Schätzung, dass etwa 25 Patienten mit einer Leukodystrophie jedes Jahr geboren werden. Die zentrale Patientenregistrierung enthielt bis zum Ende der Förderperiode von Leukonet II etwa 1.350. Allein in den Jahren 2006 und 2007 wurden 190 neue Patienten aus Deutschland registriert. Diese Zahlen belegen, dass das Leukonet das Ziel, den größten Teil der Leukodystrophie-Patienten in Deutschland zu erfassen, erfüllt hat und erlaubt auch die Abschätzung, dass die Inzidenz dieser Erkrankung wahrscheinlich höher ist als in der eben zitierten Publikation erwartet.

Zur Internet-Informationsplattform: diese ist von 01.10.2006 bis 31.12.2008 über 30.000 mal besucht worden.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Eine koordinierte Patientenregistrierung für Leukodystrophien gab es zuvor in Deutschland nicht. Das gleiche gilt für Datenbanken, Webseiten und Betroffeneninformation. Insofern waren die Arbeiten notwendig. Angesichts der zur Verfügung stehenden Mittel waren die Arbeiten angemessen.

4. Nutzen

Das entwickelte Datenbanksystem für die Erfassung klinischer Daten von Patienten mit hirndegenerativen Krankheiten zum Zweck der quantitativen Beschreibung der Variabilität der Verläufe ist modular und anpassungsfähig konstruiert. Es wird voraussichtlich innerhalb eines europäischen Verbundprojektes zu Leukodystrophien eingesetzt werden (FP7-Projekt LEUKOTREAT). Es ist außerdem als Modell vorgesehen für das erwähnte transatlantische Projekt INTERNATIONAL MLD REGISTRY. Da es anpassungsfähig an Bedürfnisse ist, die bei anderen fortschreitenden kindlichen Gehirnerkrankungen bestehen, findet es inzwischen Anwendung bei einer anderen Gruppe von hirndegenerativen Krankheiten des Kindesalters, den neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen.

Verstetigung der Informationsplattform und der Betreuung von Leukodystrophiepatienten in Hamburg: Der oben dargestellte große Nutzen dieser Aktivität für Patienten und andere an Leukodystrophie Interessiert hat dazu geführt, dass private Geldgeber für eine mittelfristige Weiterführung der ärztlichen Komponente (1/2 Stelle) gefunden werden konnten. Ob eine

Chance für dauerhafte Etablierung der Leukodystrophiesprechstunde besteht, ist gegenwärtig unklar.

Auch für die Erhaltung des Dateningenieurs (Dirk Kilian) für Ziele des Leukonet wurden Mittel aus privaten Spenden eingeworben, die dessen Aktivität (½ Stelle) mittelfristig sicherstellen. (Zu einer weiteren ½ Stelle wird er von der neuroradiologischen Klinik finanziert.)

5. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

S. oben unter 4.

6. Veröffentlichungen

S.Anlage #3

Schlussbericht Projekt 2

Projekt Koordination

Prof. Dr. med. Ingeborg **Krägeloh-Mann**
Kinderklinik der Universität
Hoppe-Seyler-Strasse 1
D - 72076 Tübingen
Tel.: +49/7071 - 29-84735
Fax: +49/7071 - 29-5473
e-mail: ingeborg.kraegeloh-mann@med.uni-tuebingen.de

Projekt Titel

Beschreibung des natürlichen Verlaufs von Leukodystrophien mit bekanntem genetischen Defekt, die sich während der Kindheit manifestieren

Funding Periode

zwei Jahre (Okt. 2006- Sept 2008), kostenneutrale Verlängerung bis Dez 2008

I Einleitung

1. Aufgabenstellung

Die metachromatische Leukodystrophie (MLD) und Globoid Zell Leukodystrophie (GCL) sind seltene, genetisch bedingte Erkrankungen, die sich hauptsächlich in der Kindheit manifestieren und zu frühem Tod führen oder auch in der Adoleszenz, dann mit einem mehr protrahierten Verlauf. Die beschreibende Analyse des klinischen Verlaufs ist von aktuellem klinischen Interesse insbesondere mit Hinblick auf neue Therapieoptionen wie Stammzelltransplantation (SZT) und Enzymersatztherapie (EE). Dieses Projekt untersucht den natürlichen Verlauf von metachromatischer und Globoidzell-Leukodystrophie im Kindes- und Jugendalter mit standardisierten Scores für Grob- und Feinmotorik, Kognition und Sprache, sowie für zerebrale Bildgebung. Dieses Instrumentarium wurde auch zur Verlaufsbeobachtung unter Therapie eingesetzt, besonders bei Stammzelltransplantation. Die Beratung der betroffenen Patienten und ihrer Familien ist ein weiterer Schwerpunkt,. Während der Förderperiode wurde die Fortsetzung der Patientenrekrutierung und Verlaufsbeurteilung anhand standardisierter Fragebögen und Scores auf nationaler Ebene fortgesetzt.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die personelle Ausstattung des Projektes war mit ½ MTA Stelle und ¼ BAT IIa Stelle knapp bemessen, da weiterhin eine aktive Patientenrekrutierung notwendig war, auch die Etablierung standardisierter Scores für die Bildgebung als zusätzlicher Auftrag anstand (hierzu wurde auf Ressourcen der Abteilung zurückgegriffen, sowie des Kooperationspartners Prof. Wolfgang Grodd, Sektion Experimentelle Kernspinnresonanz des ZNS)

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Rekrutierung von Patienten erforderte ein mehrstufiges Vorgehen, das unter anderem von der Inhaberin der MTA-Stelle übernommen wurde, die ebenfalls langjährige Erfahrung mit diesen Krankheitsbildern hat und insbesondere Kontakte zu Laboren bundesweit pflegt, in denen die Erstdiagnose der MLD und der GCL durchgeführt wird.

Ärztlicherseits wurden Kontakte zu behandelnden Ärzten und Kliniken hergestellt, die diese Kinder betreuen, sowie zu verschiedenen krankheitsspezifischen Elternvereinigungen (zur Rekrutierung siehe unten). Die Aufgabenbeschreibung umfasste zusätzlich die definitive Etablierung des Scores für grob- und feinmotorische Funktion bei spätinfantiler und juveniler MLD. Die Patientendaten – erhoben über Arztberichte, den Fragebogen, ergänzt durch Telefoninterviews und zum Teil auch durch direkte Untersuchung von Patienten (ein Teil der Patienten wurde in Tübingen vorgestellt) – wurden anhand der Scores erfasst und analysiert. Die gewonnenen kernspintomographischen Aufnahmen des Gehirns wurden von einer Gruppe von Neuropädiatern und Neuroradiologen, erfahren in der Beurteilung von kernspintomographischen Aufnahmen des Gehirns bei Kindern mit Leukodystrophien, geratet (blind bezüglich des Stadium der Erkrankung).

Neben der Beschreibung des natürlichen Verlaufs wurden einige Patienten unter Therapie (nach Stammzelltransplantation) evaluiert.

Die Patientenhotline für MLD und GCL, und das Informationsforum für Familien wurde fortgesetzt.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

4.1. Erfassungsbögen für Motorik und Kernspintomographie

International anerkannte, bereits publizierte und nach Möglichkeit validierte Scoringsysteme wurden als Ausgangsbasis gewählt. Für die Motorik sind sie etabliert in der Erfassung von statischen Gehirnerkrankungen (Cerebralpareesen) (Palisano et al. 1997, Beckung and Hagberg 2002). Für die Kernspinnbildgebung wurde auf den Loes-Score zurückgegriffen, der für die Erfassung der Adrenoleukodystrophie etabliert und validiert worden ist (Moser et al. 2000).

4.2. Rekrutierung

Ein Netzwerk von Kontakten ist wie oben erwähnt über Ärzte, Labore und Elternverbände neu aufgebaut worden.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

a. International läuft im Bereich der MLD eine Studie zum Enzyersatz, die eingeleitet wurde durch die Firma Zymenex, Kopenhagen, Dänemark, dann übernommen durch die Firma Shire Human Genetic Therapies, Inc. Cambridge, Massachusetts. Die Koordinatorin gehört, zusammen mit internationalen Leukodystrophie-Experten - Prof. Patrick Aubourg, Paris, Dr. Ed Wraith, Manchester, Dr. Tim Cox, Oxford, Dr. Maria Escolar, Philadelphia - dem *medical board* zur *Enzyersatztherapiestudie Phase II und III an*. Die dänische Prüfärztin, Dr. Christine I Dali, kam mehrfach nach Tübingen, u. a. um hier rekrutierte und von der Koordinatorin im Hinblick auf die geplante Enzyersatzstudie ausgewählte Patienten mit MLD näher kennen zu lernen und gemeinsam vor Ort zu untersuchen, einschließlich der standardisierten Erfassung nach den hier etablierten Kriterien. Sie nahm außerdem an den standardisierten Kernspinauswertungen teil. Die Scores wurden auch für die Enzyersatzstudie übernommen. Die Daten zum

natürlichen Verlauf bei infantiler MLD dienten der Firma Shire zur Berechnung des ‚sample size‘ für die Phase III Studie.

b. Mit Dr. Daniel Loes und Dr. Florian Eichler, USA, erfolgte eine Zusammenarbeit zur Etablierung eines modifizierten Scores zur standardisierten Beurteilung der Kernspinbefunde bei MLD (Eichler et al. Manuscript in revision).

c. In Anbetracht solch etablierender Therapieoptionen – siehe unten – laufen auf internationaler Ebene Bemühungen, eine einheitliche Erfassung der MLD zu erreichen. Die Vorarbeiten des Leukonet sind dabei von immenser Bedeutung. Mehrere Treffen fanden zur Etablierung eines internationalen Konsortiums statt. Für die 3. Laufzeit ist daher ein Ziel, die Datenbank für den internationalen Zugriff zu öffnen.

II Hauptteil

1. Ergebnisse

1.1. Patientenrekrutierung

Details zur Patientenrekrutierung und der Versendung von Informations- und Arbeitsmaterials an die betreffenden Familien sind im letzten Abschlussbericht beschrieben.

Bislang konnten wir zu 93 Patienten mit Metachromatischer Leukodystrophie persönlichen Kontakt aufnehmen.

72 dieser 93 Patienten haben unseren Fragebogen ausgefüllt und zurückgeschickt, was einer Rücklaufquote von 77 % Prozent entspricht.

Von diesen 72 Patienten haben 23 eine spätinfantile Form der MLD, 43 eine juvenile Form und 6 eine adulte Form der MLD nach den Kriterien (spätinfantile Form mit Beginn bis zum dritten Geburtstag, juvenile Form mit Beginn zwischen dem dritten und sechzehnten Geburtstag und adulte Form mit Beginn ab dem sechzehnten Geburtstag).

Uns sind des weiteren 25 Familien mit GCL bekannt, von denen 6 bereits einen Fragebogen ausgefüllt haben. Die nun folgenden Angaben beziehen sich jedoch auf Patienten mit Metachromatischer Leukodystrophie, auf deren Verlaufserfassung wegen der sich abzeichnenden Therapieoption mit künstlicher Arylsulfatase A zunächst der Auswertungsschwerpunkt gelegt wurde.

2.1. krankheitsspezifische Parameter

Der krankheitsspezifische Erfassungsbogen legt einen besonderen Fokus auf Krankheitsbeginn und den klinischen Verlauf und umfasst folgende Bereiche:

- Patientenerfassung in anonymisierter Form sowie die im Rahmen der Diagnosestellung erhobenen Befunde (Alter bei Diagnose, Alter zum Zeitpunkt der ersten Symptome, Labor der Erstdiagnose, diagnostische Kriterien).
- Meilensteine der Entwicklung im Hinblick auf das Erlernen einzelner Parameter im Bereich der Motorik, Sprache, Kognition und Kommunikation sowie das Verlernen der jeweiligen Parameter (auf der Basis von 90% Perzentilen der normalen Entwicklung, Standards nach Largo et al (1986) und Touwen (1984)). Erhebung des aktuellen Stands, bzw. des Entwicklungsstandes unmittelbar vor dem Tod eines Kindes.
- Funktionelle Scores für Grob- und Feinmotorik – gross motor function classification system (GMFCS) mit altersspezifischen Standards, da die grobmotorischen Fähigkeiten in den ersten Lebensjahren stark altersabhängig sind (Palisano et al. 1997), und bimanual fine motor function scores (BFMF) für die Feinmotorik (Beckung E and Hagberg G 2002).
- Erfassung des Neurostatus, angelehnt an die für die Cerebralparesen entwickelten Europäischen Standards (SCPE 2000) in einer für neurodegenerative Erkrankungen modifizierten Form. Erfassung von somatischen und klinischen Parametern.
- Information über -entsprechend den Kriterien der zentralen Datenbank- eventuell verfügbare Hautzellen, DNA-Befunde oder andere Proben, (z.B. aus dem Liquor.

Erhebung von Zusatzbefunden, wie beispielsweise elektrophysikalischer Befunde (NLG) auch im Verlauf.

- kernspintomographischer Befunde, auch im Verlauf (modifizierter Loes Score)
- Erhebung sozialpädiatrischer Parameter.

2.3. Auswertung

Erste Auswertungen liegen von 66 Patienten mit MLD vor. Hiervon hatten 23 eine spätinfantile, 37 eine juvenile und 6 eine adulte Form der MLD. Der Median der Zeitspanne vom Auftreten erster Symptome bis zur Diagnosestellung betrug 15 Monate (P25-P75: 7-26). Diese Zeitspanne war bei Patienten mit juveniler Verlaufsform (11 Monate) signifikant länger als bei Patienten mit spätinfantiler Verlaufsform (23 Monate; $p \sim 0,001$). Im Hinblick auf den Verlust des freien Gehens zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied mit einem Lauflernverlust von 1–3 Jahren bei der infantilen, 5–16 Jahren bei der juvenilen und 20-26 Jahren bei der adulten Verlaufsform. Mittels standardisierter funktioneller motorischer Scores (GMFCS, BFMF) konnte bei 20 Kindern mit spätinfantiler Verlaufsform der MLD der Verlust sämtlicher motorischer Fähigkeiten bis hin zum Verlust der Kopfkontrolle dargestellt werden: Es zeigt sich hierbei ein bemerkenswert einheitlicher und schnell progredienter Verlauf. Die Phase des rapidesten Abbaus motorischer Fähigkeiten fällt in den Alterszeitraum von 22 bis 34 Monaten. Die Verläufe des Verlustes motorischer Fähigkeiten bei 18 Kindern mit juveniler Verlaufsform zeigen dahingegen ein variables Bild. Zum einen sehen wir Verläufe mit ähnlich raschem motorischen Abbau wie bei den spätinfantilen Patienten, jedoch zu einem späteren Zeitpunkt und nach vorausgegangenen Auffälligkeiten im kognitiven Bereich und im Verhalten. Zum anderen sehen wir weitaus langsamere Verläufe bzgl. des motorischen Abbaus bzw. eine über Jahre und Jahrzehnte lange Stabilität der Motorik auf unauffälligem oder kaum auffälligen Niveau bei massiver Problematik in Kognition, Sprache und Verhalten.

Abb. 1: Motorische Scores für spätinfantile MLD (20 Patienten)

Der motorische Abbau verläuft innerhalb eines sehr engen Zeitfensters

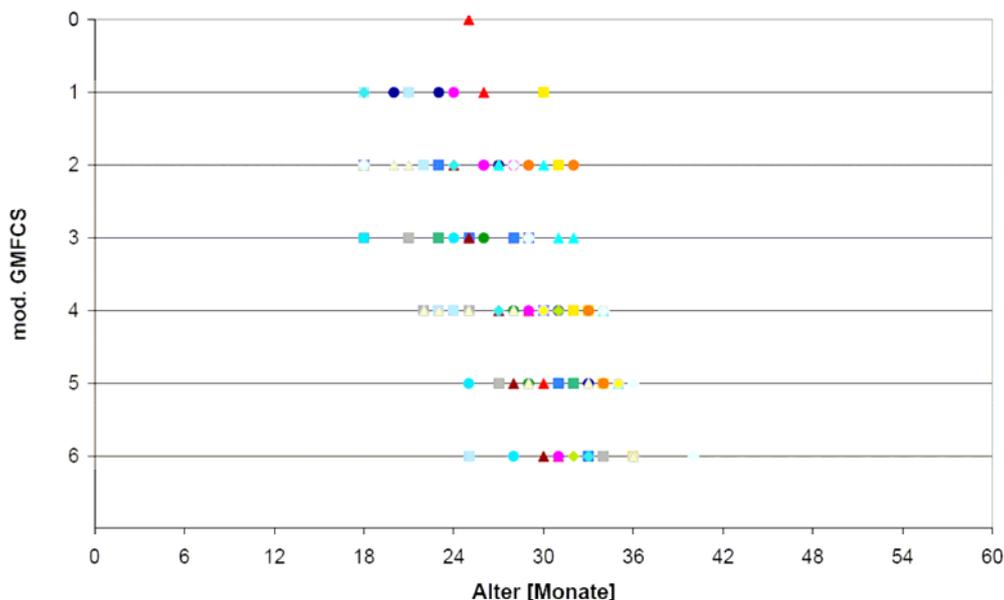


Abb. 2: Motorische Scores für spätinfantile (20 Patienten) und juvenile MLD (18 Patienten)
 Es wird der sehr homogene Verlauf bei der spätinfantilen und die wesentliche größere Variabilität bei der juvenilen Form deutlich

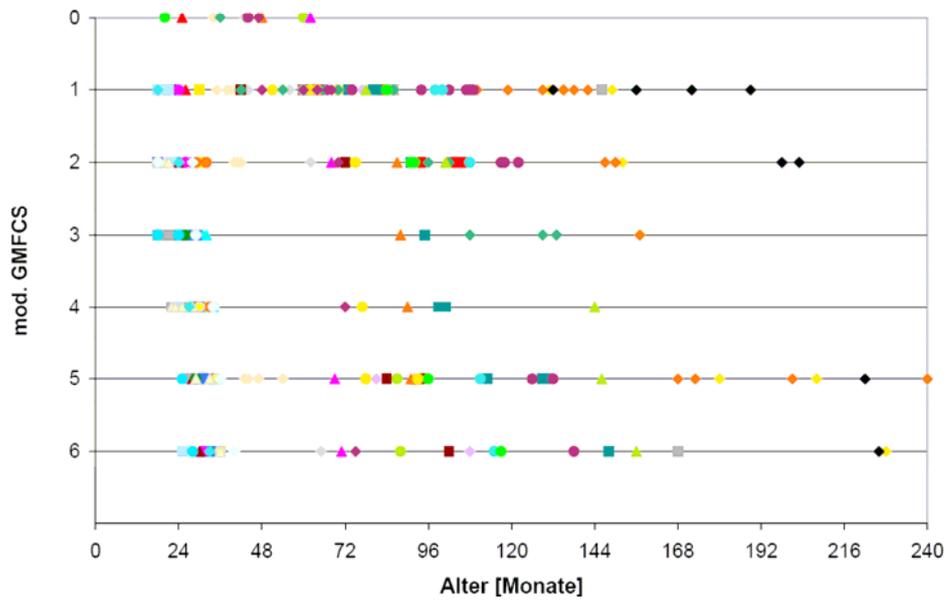
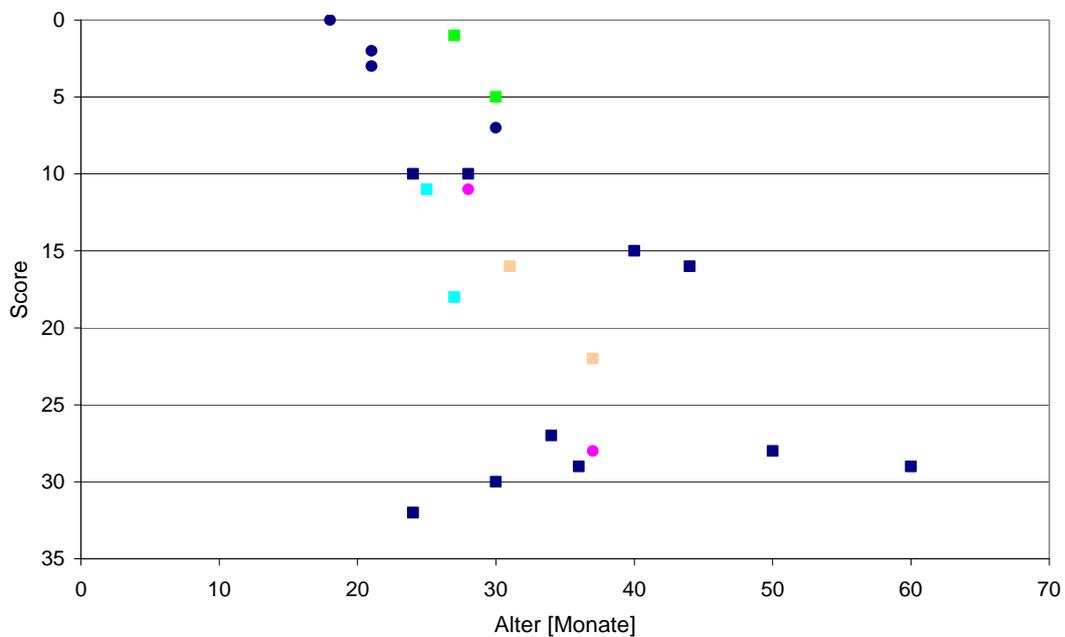


Abb 3: Kernspin scores für spatioinfantile MLD (18 Patienten, 4 mit follow-up, Farbsymbole), die eine entsprechend rasche Verschlechterung anzeigen



2. Voraussichtlicher Nutzen

Die Kenntnis des natürlichen Verlaufs der Erkrankungen ist wichtig

2.1. für die Beratung von betroffenen Familien

bereits jetzt bietet das Leukonet über die zentrale Anlaufstelle (Projekt 1) und über das Projekt 2 ein Forum für Betroffene, das regelmäßig und häufig genutzt wird. In Tübingen haben wir, obwohl dies nicht offiziell angeboten wird (diese Rolle lag im Projekt 1), mehrere wöchentliche Anfragen von Ärzten und Eltern, insbesondere zur MLD. Des Weiteren wenden sich in regelmäßigen Abständen Eltern von uns rekrutierter Kinder mit krankheitsspezifischen Fragen (Medikation, sozialrechtliche Beratung, Akutintervention) an uns. Auch die Vorstellung ambulanter und stationärer MLD - Patienten bundesweit ist eine Folge des Charakters der „Anlaufstelle Leukonet“.

2.2. für eine Beschreibung der Phänotyp-Genotyp Korrelation

ein zu erwartendes Ergebnis – Genotypisierung wird im Projekt 1 vorangetrieben.

2.3. für die Evaluation von sich neu etablierenden Therapien wie Knochenmarkstransplantation, Enzyersatztherapie und Gentherapie.

Wie im nächsten Paragraph dargestellt, haben sich insbesondere bei der MLD, z. T. auch bei GCL die Möglichkeiten einer Therapie deutlich konkretisiert. Das Leukonet stellt sich damit zu einem Zeitpunkt auf, zu dem international nach Standards für die Erfassung dieser Erkrankungen gesucht wird und Daten zum natürlichen Verlauf notwendig werden. Wie oben dargestellt, wurde das Projekt 2 – vom Koordinator des Leukonets eingeführt - schon konkret einbezogen in die Planung und Durchführung einer Enzyersatztherapiestudie. Daten aus diesem Projekt dienen der Firma Shire zur **Berechnung des ‚sample size‘ für die Phase III Studie**

2.4. Zur Verkürzung der Zeitspanne zwischen Erstsymptom und Diagnosestellung

Typische Symptomcluster und ihr besseres Bekanntwerden ermöglichen gerade bei den länger verlaufenden juvenilen Verlaufsformen der MLD, die eine signifikant längere Zeitspanne zwischen Erstsymptom und Diagnosestellung zeigen als die spätinfantile Form, eine in Zukunft raschere Diagnosestellung. Dies ist gerade auch im Hinblick auf therapeutische Optionen wie der Enzyersatztherapie und insbesondere der Stammzelltransplantation relevant.

3. Bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens während der Laufzeit

Eine effektive Therapie für die hier behandelten Erkrankungen ist bislang noch nicht zweifelsfrei etabliert. Seit der Beantragung ergaben sich jedoch einige neue Entwicklungen, die besonders die beiden Sphingolipidosen, insbesondere die MLD, betreffen:

Der Erfolg und damit die Indikation der **Stammzelltransplantation** bei den beiden Sphingolipidosen ist nach neuerer Datenlage besser beurteilbar. Bei der infantilen Form der GCL führt sie zu einem besseren klinischen Outcome nur, wenn sie sehr früh, neonatal, d.h. zu einem frühen präsymptomatischen Zeitpunkt durchgeführt wird (Escolar et al. 2005). T

Dies wird auch für die spätinfantile Form der MLD diskutiert, ist jedoch noch nicht evidenzbasiert. Sie ist wahrscheinlich auch effektiv im sehr frühen Krankheitsverlauf bei den juvenilen Verlaufsformen von MLD und GCL (Kehrer et al. 2009). Die Datenbasis ist jedoch noch immer klein. Während eines internationalen Workshops zur MLD in Washington 2005, der MLD - Spezialisten weltweit zusammengeführt hat, wurde unterstrichen, dass eine essentielle Voraussetzung für die Interpretation der Effekte der Stammzelltransplantation auf den Krankheitsverlauf die bessere Kenntnis des natürlichen Verlaufs ist. Es wurde gefolgert, dass ein Standardinstrument für die klinische Evaluation zwingend notwendig ist, um Daten von verschiedenen Zentren besser miteinander vergleichen zu können. Auf internationaler Ebene laufen daher Bemühungen, eine einheitliche Erfassung der MLD zu erreichen, die Vorarbeiten des Leukonet sind dabei von immenser Bedeutung, für die 3. Laufzeit ist daher ein Ziel, die Datenbank für den internationalen Zugriff zu öffnen.

Enzymersatztherapie: Im Tiermodell wurde eine ASA-defiziente Maus 4-wöchentlich mit ASA 20mg/kg therapiert. Eine klare Reduktion der Sulfatidspeicherung wurde in der Niere und im peripheren Nerv dieser Tiere gefunden. Sogar die Sulfatidspeicherung im ZNS war reduziert (hauptsächlich die Speicherung in den Makrophagen), ebenso wurde eine Verbesserung auch funktionell gesehen (Matzner et al. 2005). Dies ergab die Grundlage für eine Therapiestudie beim Menschen. Wie für die Knochenmarkstransplantation wird auch hier als wichtig angesehen, dass prognostische Marker für das Fortschreiten der Erkrankung einerseits und den Erfolg der Therapie andererseits identifiziert werden, die sich aus der Kenntnis des natürlichen Krankheitsverlaufs ergeben.

Gentherapie: Mitglieder des Leukonet konnten bereits in einem MLD - knock-out - Mausmodell zeigen, dass die Transplantation von mit retroviralem Vektor transduzierten Stammzellen, die die humane ASA cDNA exprimieren, zu einer signifikanten Zunahme der ASA Aktivität im Gehirn führen, ohne jedoch die Sulfatidspeicherung zu reduzieren (Gieselmann, 2003, Matzner et al. 2000, 2001, 2002). Inzwischen wurden Lentivirusvektoren bei der Transplantation mit autologen transduzierten Stammzellen in einem MLD - knock-out - Mausmodell eingesetzt. Funktionelle Verbesserungen, eine Zunahme der Nervenleitgeschwindigkeit sowie verbesserte Myelinisierung im ZNS wurden 6 Monate nach Transplantation beschrieben (Biffi et al. 2004; Consiglio et al. 2001). In einer anderen Studie wurden transduzierte neuronale Zellen (Vektor AAV Virus) direkt in das ZNS von ASA defizienten Mäusen injiziert. Eine ASA Expression wurde sogar in einiger Entfernung der Einstichstelle gefunden, die Sulfatidspeicherung nahm ab und die Tiere zeigten eine funktionelle Verbesserung (Halt auf der Drehscheibe und bezüglich einer Hyperaktivität) (Cartier-Lacave, communication MLD initiative meeting, Washington 5/2005). Der nächste Schritt wird die Untersuchung an größeren Säugetieren (Affen) sein, bevor dieser Ansatz auf den Menschen übertragen werden kann

Diese Entwicklungen unterstreichen, dass sich Therapieoptionen für die MLD und auch für den GCL konkreter abzeichnen. Es ist daher essentiell, die Forschung über den natürlichen Verlauf dieser lysosomalen Speichererkrankungen voranzutreiben und Standards zur Erfassung zu etablieren.

Referenzen

Beckung E, Hagberg G. Neuroimpairments, activity limitations and participation restrictions in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 2002; 44: 309-316

Biffi A, De Palma M, Quattrini A, Del Carro U, Amadio S, Visigalli I, Sessa M, Fasano S, Brambilla R, Marchesini S, Bordignon C, Naldini L. Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *J Clin Invest.* 2004; 113 (8): 1118-1129

Consiglio A, Quattrini A, Martino S, Bensadoun JC, Dolcetta D, Trojani A, Benaglia G, Marchesini S, Cestari V, Oliverio A, Bordignon C, Naldini L. In vivo gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction of neuropathology and protection against learning impairments in affected mice. *Nat Med.* 2001; 7 (3): 310-316

Escolar ML, Poe MD, Provenzale JM, Richards KC, Allison J, Wood S, Wenger DA, Pietryga D, Wall D, Champagne M, Morse R, Krivit W, Kurtzberg J. Transplantation of umbilical-cord blood in babies with infantile Krabbe's disease. *N Engl J Med.* 2005; 19; 352 (20):2069-81.

Gieselmann V. Metachromatic leukodystrophy: recent research developments. *J Child Neurol.* 2003; 18 (9):591-4

Largo RH, Molinari L, Comenale Pinto L, Weber M, Duc G. (1986) Language development of term and preterm children during the first years of life. *Dev Med Child Neurol* 28:333-350

Matzner U, Harzer K, Learish RD, Barranger JA, Gieselmann V. Long-term expression and transfer of arylsulfatase A into brain of arylsulfatase A-deficient mice transplanted with bone marrow expressing the arylsulfatase A cDNA from a retroviral vector. *Gene Ther.* 2000; 7 (14):1250-7

Matzner U, Schestag F, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, D'Hooge R, De Deyn PP, Gieselmann V. Bone marrow stem cell gene therapy of arylsulfatase A-deficient mice, using an arylsulfatase A mutant that is hypersecreted from retrovirally transduced donor-type cells. *Hum Gene Ther.* 2001; 10; 12 (9):1021-33.

Matzner U, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, Coenen R, Rothert F, Mansson JE, Fredman P, D'Hooge R, De Deyn PP, Gieselmann V. Bone marrow stem cell-based gene transfer in a mouse model for metachromatic leukodystrophy: effects on visceral and nervous system disease manifestations. *Gene Ther.* 2002; 9 (1):53-63.

Matzner U, Herbst E, Hedayati KK, Lullmann-Rauch R, Wessig C, Schroder S, Eistrup C, Moller C, Fogh J, Gieselmann V. Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Hum Mol Genet.* 2005; 1;14 (9): 1139-52

Palisano R, Rosenbaum P, Walter S, Russell D, Wood E, Galuppe B. Development and reliability of a system to classify gross motor function in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 1997; 39: 214-223

SCPE Working Group. Surveillance of Cerebral Palsy in Europe: A collaboration of cerebral palsy surveys and registers. *Dev Med Child Neurol.* 2000; 42: 816-824.

Touwen BCL. (1984) Normale neurologische Entwicklung: Die nicht bestehende inter- und intra-item-Beziehung. In: Michaelis R, Nolte R, Buchwald-Saal, Haas G, editors. *Entwicklungsneurologie*: Stuttgart: Kohlhammer, Inc. p 17-24

4. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

Eichler F, Grodd W, Grant E, Sessa M, Bizzi A, Bley A, Kohlschuetter A, Loes D, Krägeloh-Mann I, Metachromatic Leukodystrophy: A Scoring System for Brain MR Observations (in revision *AJNR*)

Gieselmann V, Krägeloh-Mann I. *Metachromatic leukodystrophy in ...* editor, Mac Keith Press London

Müller I, Kustermann-Kuhn B, Holzwarth C, et al. (2006) In vitro analysis of multipotent mesenchymal stromal cells as potential cellular therapeutics in neurometabolic diseases in pediatric patients. *Exp Hematol.* 34:1413-19.

Kehrer C, Kustermann-Kuhn B, Krägeloh-Mann I (2006) Early symptoms and time period from the occurrence of first symptoms to the diagnosis of metachromatic leukodystrophy (MLD). *Neuropediatrics* 37: 380

Kehrer C, Kustermann-Kuhn B, Krägeloh-Mann I (2007) Frühsymptomatik, Zeitspanne bis zur Diagnosestellung sowie Erwerb und Verlust des freien Gehens bei Metachromatischer Leukodystrophie (MLD). *Monatsschr. Kinderheilkd.* 155, Suppl 3

Kehrer C, Kustermann-Kuhn B, Raabe C, Krägeloh-Mann I (2008) Natural history of metachromatic leukodystrophy (MLD) – clinical course. *Eur J Pediatr* 167, 374

Kehrer C, Kustermann-Kuhn B, Krägeloh-Mann I (2008) Clinical course of metachromatic leukodystrophy (MLD) in children – an analysis using standardized functional motor scores. *Neuropediatrics* 39; DOI: 10.1055/s-2008-1079467

Kehrer C, Kustermann-Kuhn B, Raabe C, Krägeloh-Mann I (2008) Klinischer Verlauf der Metachromatischen Leukodystrophie (MLD) im Kindesalter anhand standardisierter motorischer Scores. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 156, Suppl 1, 24-25

Kehrer C, Opherk K, Müller I, Wilke M, Krägeloh-Mann I (2008) Clinical course of two siblings with Metachromatic Leukodystrophy (MLD) with and without Stem cell transplantation (SCT). *Neuropediatrics* 39(5), 301

Wilke M, Grodd W, Kehrer C, Krägeloh-Mann I (2008) A new score for assessing white matter changes in metachromatic leukodystrophy. *Neuropediatrics* 39(5), 284

Kehrer C, Blumenstock G, Krägeloh-Mann I (2009) The natural course of gross motor deterioration in metachromatic leukodystrophy. (prepared for submission)

Abschlussbericht

Deutsches Leukodystrophie-Netzwerk II (Leukonet II, 01GM0641).

Teilprojekt 3: Klassifizierung von Leukodystrophien unbekannter Ursache nach neuroradiologischen Kriterien. Anwendung von MRT-Musteranalysen und MR-Spektroskopie

Hannover, den 11. 05.2009

Xiaoqi Ding, Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. med (Projektleiterin)

Experimentelle Neuroradiologie
Institut für Diagnostische und
Interventionelle Neuroradiologie
Medizinische Hochschule Hannover
Carl-Neuberg-Str. 1,30625 Hannover
email: Ding.Xiaoqi@mh-hannover.de
Tel.: 0049 511 532 3401
Fax: 0049 511 532 5876

I. Kurze Darstellung

Zerebrale Stoffwechselstörungen sind seltene, in der Regel genetisch bedingte Erkrankungen des Nervensystems, vor allem der weißen Substanz (Leukodystrophie), mit einem vielfältigen Erscheinungsbild. Die genetischen Defekte sind bei vielen dieser metabolischen Störungen bekannt und werden als „klassisch“ bezeichnet, wie z.B. die metachromatische Leukodystrophie (MLD) und die Adrenoleukodystrophie (ALD). Es werden aber kontinuierlich neue Erkrankungen entdeckt, deren Ursachen noch gesucht werden müssen. Diese werden dann als „unklare Fälle“ (Leukodystrophie unbekannter Ursache, ULD) bezeichnet. Die Erkrankungen manifestieren sich meist im Kindesalter. Die fortschreitenden Schäden des Nervengewebes führen bei den jungen Patienten zum Verlust motorischer und kognitiver Fähigkeiten sowie zu Seh-, Sprach-, Hör- und Bewusstseinsstörungen mit einer verkürzten Lebenserwartung. Die psychischen und sozioökonomischen Belastungen für die Familien der betroffenen Kinder sind enorm, und leider ist die Mehrzahl der Erkrankungen zurzeit immer noch nicht heilbar. In einigen Fällen, wenn die Krankheit in einem Frühstadium diagnostiziert wird, kann eine Knochenmarktransplantation den Progress stoppen oder sogar die Stoffwechselstörung beseitigen und damit die Krankheit heilen. Eine Früherkennung der Erkrankungen ist deshalb von großer Bedeutung, um (1) rechtzeitig gezielte Maßnahmen, z.B. Diät oder Knochenmarktransplantation für die häufig sehr jungen Patienten einzuleiten und (2) die betroffenen Familieangehörigen entsprechend zu betreuen. Die Magnetresonanztomographie, also die MRT, ist eines der wichtigsten Werkzeuge bei der Diagnostik von derartigen Erkrankungen. Mit der MRT werden Schnittbilder vom Gehirn erstellt, und die Läsionen im Hirnparenchym der Patienten werden sichtbar. Eine zutreffende Interpretation der MRT-Befunde kann richtungweisend sein für die Einordnung zerebraler Stoffwechselstörungen und gibt häufig Anlass zu weiteren gezielten laborchemischen und genetischen Untersuchungen, um die exakte Genese herauszufinden und damit eine endgültige Diagnose zu stellen. Der erste systematische Versuch, neurometabolische Erkrankungen zu klassifizieren, erfolgte durch van der Knaap et al. 1991. Entsprechend der im MRT nachweisbaren morphologischen Veränderungen des Gehirns wurde ein System des „Mustererkennens“ vorgeschlagen. Mit Hilfe dieses Systems zeigten sich einige „Muster“ als typisch oder zumindest indikativ für bestimmte Erkrankungen, während andere „Muster“ eher unspezifisch bzw. nicht interpretierbar waren. Beispiele hierfür sind die zystische Leukoenzephalopathie mit Megalenzephalie oder die „vanishing white matter disease“, die zuerst nach einer MR-Morphologie kategorisiert wurden und für die anschließend die zugehörige genetische Ursache festgestellt werden konnte. In der Praxis ist die Früherkennung zerebraler Stoffwechselstörungen nicht einfach. Da die verschiedenen Stoffwechselstörungen einerseits selten sind und andererseits das gesamte Spektrum sehr vielfältig ist, werden die morphologischen Veränderungen in den MRT-Aufnahmen der Patienten vielerorts oft nicht als solche richtig erkannt und zugeordnet; stattdessen gelingt dies häufig erst einem der wenigen Experten.

Die Teilprojektleiterin und ihr Team verfügen als wissenschaftliche Mitarbeiter eines neuroradiologisches Institutes über langjährige Erfahrungen in der klinischen und wissenschaftlichen Forschung und haben spezielle Expertise auf diesem Gebiet gesammelt. Es hat sich als besonders vorteilhaft für das Teilprojekt erwiesen, dass die Teilprojektleiterin PD Dr. Dr. Xiaoqi Ding als Medizinerin und Physikerin die wissenschaftlichen Erfahrungen aus diesen beiden Fächern kombinieren kann. Unter ihrer Leitung hat die Arbeitsgruppe nicht nur eine Methode zur systematischen Erkennung von makroskopisch typischen Leukodystrophie-Läsionen etabliert, sondern auch verschiedene quantitative MR-Imaging-Verfahren für die klinische Diagnostik aufgebaut, mit denen es möglich ist, auch visuell unsichtbare mikrostrukturelle Veränderungen im Gehirn zu entdecken. Diese Techniken erlauben (1) die Krankheiten schon in einem früheren Stadium zu erkennen, um z.B., die entsprechenden therapeutischen Maßnahme rechtzeitig einzusetzen und (2) die Therapie-Effekte genau und präzise zu dokumentieren, um eine Optimierung der Therapie zu ermöglichen. Die Hauptziele des Projektes bestanden darin, die Fälle mit Verdacht auf LD/ULD unter Verwendung neuroradiologischer Expertise zu klassifizieren und alle anderen klinischen Gruppen innerhalb von LEUKONET als neuroradiologisches Referenzzentrum zu unterstützen. Dies geschieht sowohl in Form von Untersuchungen mittels MRT und MR-Spektroskopie an Patienten mit Verdacht auf ULDs, die von Kollegen an unser Zentrum überwiesen wurden, als auch durch das Bereitstellen von neuroradiologischem Sachverstand für die Interpretation von MRT-Daten, die von anderen klinischen Gruppen innerhalb von LEUKONET und auch sonstigen relevanten Kliniken aufgenommen wurden. Zusätzlich haben wir unsere neuroradiologische Expertise für die Fortbildung von Pädiatern, Neuroradiologen sowie anderen interessierten ärztlichen Kollegen in Form von Vorträgen, Fortbildungsartikeln oder via Internetzugang zur Verfügung gestellt (Neuroradiologie Aktuell 2007 (UKE, Hamburg), MR-Arbeitskreis (MHH, Hannover), Mitarbeit am neuropädiatrischen Symposium „Der ungelöste Fall“ (MHH, Hannover), Fortbildungsartikel für die Zeitschrift des Berufsverbandes der Kinder- und Jugendärzte). Außerdem wurde die primäre Struktur eines MRT-Diagnostik-Tools zur Musteranalyse von ULDs nach dem van Knaap'schen Schema entwickelt, dessen erster Teil - systematisch gesammelte typische Leukodystrophie-Muster - bereits online verfügbar ist (s.u.).

Insbesondere zu betonen ist, dass trotz des Ortswechsels der Projektleiterin in der 2. Förderungsperiode (vom UKE, Hamburg an die MHH, Hannover) das Teilprojekt wie geplant weitergeführt werden konnte. Die Projektleiterin, Frau PD Dr. Dr. Xiaoqi Ding, hat ab 01.09.2007 die Stelle als Leiterin der Experimentellen Neuroradiologie am Institut für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie der Medizinische Hochschule Hannover (MHH) übernommen. Mit Zustimmung des BMBF (Änderungsbescheid vom 13.08.2007, 01GM0641) wurde das Teilprojekt 3 mit den entsprechenden Finanzierungsmitteln und mit voller Unterstützung durch die MHH (Institut für Diagnostische und Interventionelle

Neuroradiologie, Neuropädiatrie) weiterhin unter der Leitung von Frau PD Dr. Ding erfolgreich fortgeführt.

II. Eingehende Darstellung

1. MRT und MR-Spektroskopie-Untersuchungen an 200 Patienten mit Verdachtsdiagnose ULD. Zusätzlich Bearbeitung der MRT-Daten von 59 Patienten mit Verdachtsdiagnose ULD.

Um die richtige Interpretation der MRT-Befunde von Patienten zu erleichtern, haben wir für viele zerebrale Stoffwechselstörungen typische MRT Aufnahmen auf der Basis unserer Erfahrungen sowie auf der Grundlage von Literaturrecherchen herausgefiltert und nutzen sie als Muster für die Zuordnung neuer Krankheitsfälle. Dabei haben wir gezeigt, dass durch sorgfältige und systematische Analyse der MRT-Bilder die meisten Fälle, die uns zunächst mit dem Verdacht auf ULD zugeschickt worden waren, doch einer bestimmten bekannten Ursache und einer klaren Diagnose zugeordnet werden konnten. Es wurden uns ca. 200 Patienten mit der vorläufigen Verdachtsdiagnose ULD von anderen klinischen Zentren zugeschickt, um eine MRT durchzuführen. Gezielte MRT- Untersuchungen und ggf. MR-Spektroskopien wurden bei diesen Patienten erstellt. Zusätzlich haben wir die MRT-Daten von 59 Patienten, die von anderen klinischen Gruppen innerhalb von LEUKONET und auch von anderen Kliniken aufgenommen worden waren, systematisch bearbeitet. Dabei konnten wir feststellen, dass 30 Patienten an klassischen Leukodystrophien, 13 Patienten an Mitochondriopathie, 5 Patienten an Neuronaler Ceroid-Lipofuszinose und 34 Patienten an Fehlbildungen litten. Bei 20 Patienten wurde eine mögliche ULD diagnostiziert, und die Befunde wurden mit Empfehlungen für weitere diagnostischen Maßnahmen an die entsprechenden pädiatrischen Kollegen weitergeleitet, um bestimmte in Frage kommende Differenzialdiagnosen zu bestätigen bzw. auszuschließen. Etwa die Hälfte der untersuchten Patienten litt an anderen Erkrankungen als an Leukodystrophien oder war ohne auffälligen cerebralen MRT-Befund. Alle diese Ergebnisse wurden an die klinischen Partner weitergeleitet, um eine gezielte Suche nach den relevanten Ursachen und ggf. eine spezifische Therapie der Krankheiten zu ermöglichen.

Beispiel 1.1: Die MRT-Bilder eines 16 Monate alten Kleinkindes wurden uns mit folgenden klinischen Angaben zur weiteren Diagnosestellung zugesandt: Das Kind wurde von konsanguinen Eltern nach normaler Schwangerschaft geboren. Ab dem 2. Lebensmonat wurde es neurologisch auffällig. Eine bekannte Galaktosämie war durch Diät gut unter Kontrolle zu halten. Zusätzlich wurde eine NADH-CoQ-Oxidoreduktaseinsuffizienz (Komplexe I - Mitochondriopathie) festgestellt. In den MR-Aufnahmen waren für die Kollegen wegen des niedrigen Alters und der damit verbundenen Unreife des Gehirns die

pathologischen Veränderungen nicht eindeutig zuzuordnen. Durch genaue Analyse der MR-Daten konnten wir zusätzlich zu der rückständigen Hirnreifung eine Schwellung des kaum myelinisierten Marklagers feststellen. Die bildmorphologische Auswertung sprach für eine „vanishing white matter disease (VWD)“, auch wenn eine Koexistenz dieser Erkrankung mit einer Mitochondriopathie bisher unbekannt war. Eine genetische Untersuchung wurde deshalb veranlasst, und die Ergebnisse bestätigten unsere Diagnose – eine Gen-Mutation für den Translations-Initiations-Faktor EIF2B wurde gefunden. Es gibt zwar zurzeit noch keine Therapie für diese Erkrankung, die genaue Diagnose ermöglicht jedoch zumindest eine gezieltere Patienten-Betreuung.

2. Anwendung quantitativer MRT-Verfahren zur genaueren Beurteilung von pathologischen T2-Relaxationsszeitänderungen bei LD

Die Magnetenresonanztomographie (MRT) ist ein sehr wichtiges Werkzeug bei der Diagnostik von Hirnerkrankungen. Um eine pathologischen Veränderung festzustellen, wird primär u.a. die visuelle Beurteilung von Signalunterschieden zwischen grauer und weißer Substanz in den MR-Aufnahmen benutzt. Diese Methode ist zwar schnell und effektiv, in der Regel aber auch subjektiv, weil sie stark von den Erfahrungen der Auswerter und den verwendeten Untersuchungssequenzen abhängig ist. Es wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um eine Methode zu definieren, die unabhängig von der Subjektivität der Auswerter und der Einstellung der technischen Parameter der MR-Untersuchung Veränderungen im Gehirn quantifizieren kann. Bislang war eine klinisch routinemäßig anwendbare Methode nicht verfügbar. In der ersten Förderperiode haben wir daher die Basis für ein quantitatives MRT-Verfahren mittels T2-Relaxationsszeitmessung entwickelt. Es ist bekannt, dass die T2-Relaxationszeit gut mit dem Hirnreifungsprozess korreliert. Unter Einsatz der von uns gesammelten Norm-Daten – T2-Werte im normal entwickelten Gehirn im Altersbereich von 1 Monat bis zu 60 Jahren – als Referenzwerte haben wir die Messung der T2-Werte zu einer diagnostischen Routinemethode ausgebaut. Damit werden subtile pathologische Veränderungen exakter erfasst. Vergleichbare Vorteile bietet auch die Methode des Proton-Density-Mappings, mit dem sich die mobile Protonendichte im Gehirn bestimmen lässt.

Beispiel 2.1: Bei der metachromatischen Leukodystrophie (MLD), einer autosomal rezessiven Erkrankung mit einem Gen-Defekt der Arylsulfatase A, besteht eine Störung im Stoffwechsel des Myelins mit Anreicherung von Sulfatid, so dass die Markscheiden instabil werden und zerfallen. Dies hat eine Demyelinisierung der weißen Substanz im Gehirn zur Folge. Die betroffenen Patienten werden, je nach Subtypus, langsam oder schnell stetig zunehmend schwer behindert mit einer verkürzten Lebenserwartung. Z. Zt. ist eine

Knochenmarkstransplantation (KMT) die einzige erfolversprechende Therapiemöglichkeit. Nach der KMT ist dann eine genaue klinische Überwachung wichtig, um den Therapie-Erfolg zu kontrollieren und ggf. rechtzeitig eine erneute KMT ins Auge zu fassen. Die Kombination von quantitativer T2-Bestimmung und MR-Spektroskopie erweist sich hier als eine effektive Methode für das Monitoring. Ein jetzt 10-jähriger Junge mit präsymptomatischer MLD bekam vor 5 Jahren eine KMT. Seitdem ist er regelmäßig zu MR-Kontrolluntersuchungen gekommen. Zusätzlich zu den stabilen morphologischen Befunden konnten wir anhand der quantitativen T2-Bestimmung und MR-Spektroskopie (kontinuierlich sich normalisierende T2-Messwerte und zwischenzeitlich geringe Zunahme der Myoinositol-Konzentration) zeigen, dass ein remyelinisierender Prozess nach der KMT wahrscheinlich stattgefunden hat, eine bislang noch nie berichtete in-vivo-Beobachtung von Reparatur-Prozessen bei Leukodystrophien in Menschen. Unsere Beobachtung ist konsistent mit der klinischen Beobachtung des Patienten: Das Kind entwickelt sich altersgemäß normal.

Beispiel 2.2: Die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (X-ALD) ist eine häufig erbliche peroxisomale Erkrankung. Die Mutationen im ALD-Gen führen zu einer gestörten β -Oxidation und zu einer Akkumulation von überlangkettigen gesättigten Fettsäuren in Körpergeweben und -flüssigkeiten. Klinisch sind unterschiedliche Erkrankungsformen - von der schweren kindlich zerebralen Verlaufsform bis hin zur asymptomatischen Form des Erwachsenenalters - zu unterscheiden. Für die schwere kindlich zerebrale Verlaufsform, die eine schwerste Behinderung mit einer stark verkürzten Lebenserwartung bedeutet, ist eine Knochenmarkstransplantation zurzeit die einzige Therapiemöglichkeit, um den destruirenden Krankheitsprozess aufzuhalten. Die Therapie ist allerdings für den Patienten nicht ohne Risiko und häufig mit einer langzeitigen Einbuße von Lebensqualität verbunden. Neben der Selektion des ALD-Patienten als geeigneten Kandidaten ist der optimale Zeitpunkt für die Therapie von großer Bedeutung. Dabei erweist sich die Kombination von quantitativer T2-Bestimmung und MR-Spektroskopie als eine effektive Methode um diesen Zeitpunkt zu identifizieren. Z.B. befindet sich ein jetzt 17-jähriger Junge mit ALD-Gen-Mutation, dessen jüngerer Bruder schwer an der ALD erkrankt war, seit dem Jahr 2002 regelmäßig unter unserer MR- Kontrolle. Mittels der Ergebnisse unserer MR-Analyse ist eine damals schon drohende KMT bis heute aufgeschoben worden.

Beispiel 2.3: Die Phenylketonurie (PKU) ist eine autosomal rezessive Stoffwechselerkrankung. Mit der Nahrung aufgenommenes Phenylalanin kann im Körper der betroffenen Patienten nicht abgebaut werden. Diese Substanz reichert sich daher an und verursacht die Krankheitssymptome. Ein Routinetest von Neugeborenen, der eine Früherkennung und rechtzeitige Diättherapie ermöglicht, bewahrt die PKU-Patienten vor

einer schweren geistigen und körperlichen Behinderung und führt zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose der Patienten. Allerdings zeigen die PKU-Patienten, darunter auch PKU-Patienten unter strenger frühzeitiger Diättherapie, häufig bestimmte neuropsychologische Defizite. Besondere Läsionsmuster in der cerebralen MRT von PKU-Patienten sind zwar bekannt, eine Korrelation der neuropsychologischen Defizite mit den MR-Läsionen ist bisher aber unbestätigt geblieben. Daher haben wir 4 PKU-Patienten mit frühzeitiger und langjähriger Diättherapie und 4 Kontrollpersonen mittels MRT untersucht. Unter anderem wurde ein quantitatives Proton-Density-Mapping durchgeführt. Mit dieser Methode konnten wir feststellen, dass in scheinbar normalen Hirnregionen der Patienten erhöhte, kompaktere Zelldichten ohne Veränderung des Nervenbahnenverlaufs existieren. Diese Beobachtung ist vereinbar mit histologischen post mortem Befunden an nicht behandelten PKU-Patienten, wurde aber bislang noch nicht in vivo bei Patienten berichtet. Die genaue Bedeutung dieser Beobachtung ist zurzeit noch unklar. Es ist jedoch denkbar, dass diese Ergebnisse zur Erklärung der neuropsychologischen Defizite bei behandelten PKU-Patienten beitragen können.

3. Entwicklung einer Grundstruktur der „ULD-Pattern-Analyse“: MRT-Diagnostik-Tool

Mit finanzieller Förderung des BMBF konnte die Projektleiterin in der MHH eine Arbeitskraft für Informatik einstellen (10.2007-10.2008), um die neuroradiologische Expertise in ein MRT-Diagnostik-Tool einzubauen. Basierend auf der Arbeit von van der Knaap et al. 1991 wurde die Grundstruktur eines MRT-Diagnostik-Tools entwickelt. Als erster Teil der Arbeit wurden typische Leukodystrophie-Läsions-Muster von den vielfältigen bekannten LDs systematisch gesammelt und ab Oktober 2008 online verfügbar gemacht (http://webhost1.mh-hannover.de/mr-leuko/findings/typical_not_logged.php, Abbildung1). Um eine Erweiterung und Aktualisierung des Inhalts zu ermöglichen ist ein Antrag auf Fortsetzung der Finanzierung der Arbeit geplant.

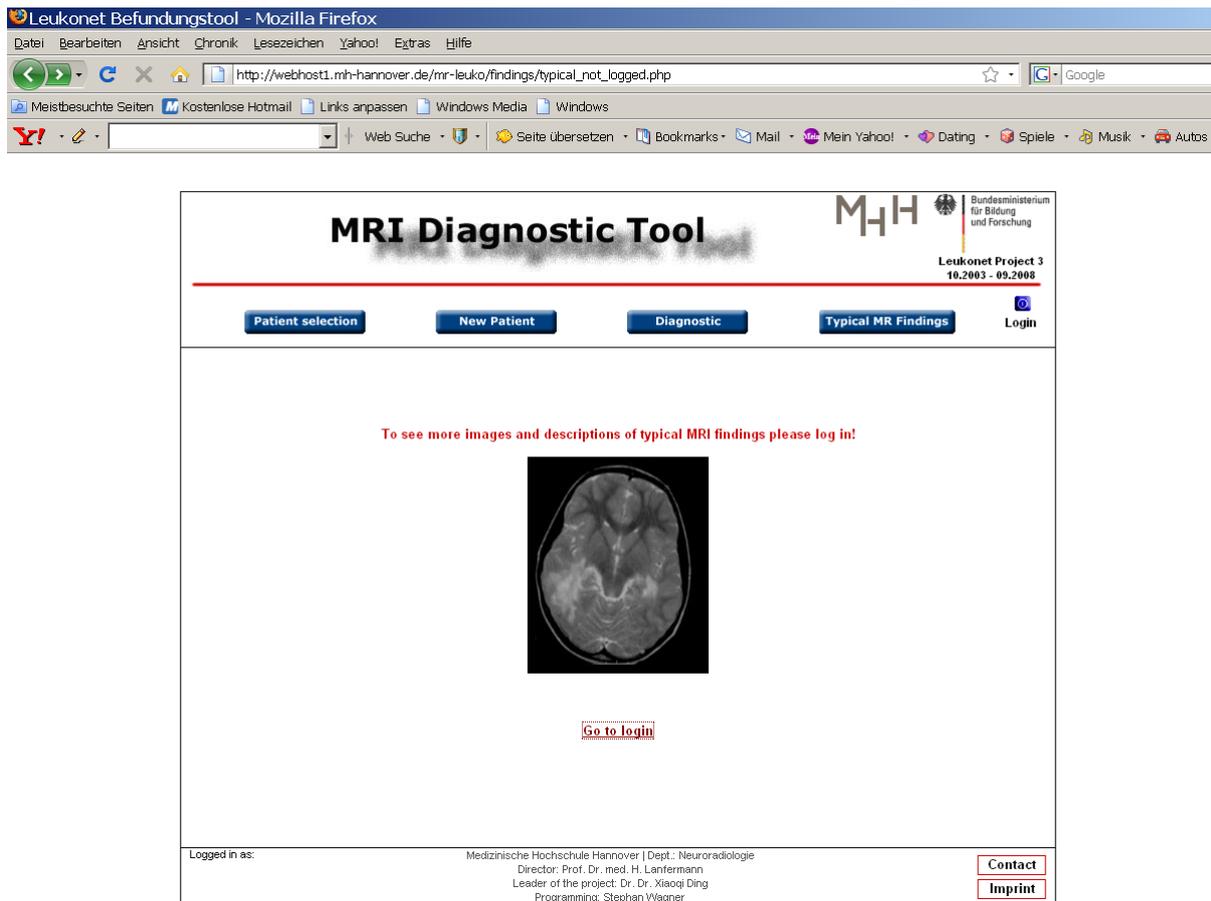


Abbildung 1

4. Beiträge zur neuroradiologischen und neuropädiatrischen Fortbildung hinsichtlich der Diagnostik von Leukodystrophien

1) Vorträge:

a) Neuroradiologie Aktuell, Hamburg (2007)

Titel: Häufige neurometabolische Erkrankungen im Kindesalter

b) Fortbildung, Institut für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie, MHH, Hannover (2008)

Titel: Neuroradiologische Bestimmung der Hirnreifung

c) MR-Arbeitskreis, Hannover (2008)

Titel: Häufige neurometabolische und neurodegenerative Erkrankungen im Kindesalter – typische MR-Befunde

d) Blended Learning - Sommerseminar – (2008)

Titel: Beurteilung der Myelinisierung anhand der MRT

2) Mitarbeit am 17. Neuropädiatrie-Seminar (*Der ungelöste Fall*), Hannover (2008)

5. Publikationen ab 2007:

- [1]. Ding X-Q, Zeumer H, Lanfermann H: Typische Kernspintomographie-Befunde von häufigen neurometabolischen und neurodegenerativen Erkrankungen im Kindersalter. *Kinder- und Jungenarzt* 2009, 40:91-97
- [2]. Ding XQ, Sun Y, Kruse B, Illies T, Zeumer H, Fiehler J, Lanfermann H: Microstructural callosal abnormalities in normal-appearing brain of children with developmental delay detected with diffusion tensor imaging. *Eur Radiol* 2009, 29:29
- [3]. Spinazzola A, Santer R, Akman OH, Tsiakas K, Schaefer H, Ding X, Karadimas CL, Shanske S, Ganesh J, Di Mauro S, Zeviani M: Hepatocerebral form of mitochondrial DNA depletion syndrome: novel MPV17 mutations. *Arch Neurol* 2008, 65:1108-1113.
- [4]. Ding XQ, Sun Y, Braabeta H, Illies T, Zeumer H, Lanfermann H, Fiehler J: Evidence of Rapid Ongoing Brain Development Beyond Two Years of Age Detected by Fiber Tracking. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008, 24:24
- [5]. Ding XQ, Hagel C, Ringelstein B, Buchheit S, Zeumer H, Kuhlenbäumer G, Fiehler J: MRI features of pontine autosomal dominant microangiopathy and leukoencephalopathy (PADMAL). *Journal of Neuroimaging* 2009 Jan 29. [Epub ahead of print]
- [6]. Ding XQ, Fiehler J, Kohlschutter B, Wittkugel O, Grzyska U, Zeumer H, Ullrich K: MRI abnormalities in normal-appearing brain tissue of treated adult PKU patients. *J Magn Reson Imaging* 2008, 27:998-1004.
- [7]. Bester M, Heesen C, Schippling S, Martin R, Ding XQ, Holst B, Fiehler J: Early anisotropy changes in the corpus callosum of patients with optic neuritis. *Neuroradiology* 2008, 50:549-557. Epub 2008 May 2006.
- [8]. Ding XQ, Wittkugel O, Goebell E, Forster AF, Grzyska U, Zeumer H, Fiehler J: Clinical applications of quantitative T2 determination: A complementary MRI tool for routine diagnosis of suspected myelination disorders. *Eur J Paediatr Neurol* 2007, 25:25

Titel:**Multiparametric MR evaluations in rare childhood leukoencephalopathies with hypomyelination****Multiparametrische MR Untersuchungen bei seltenen Leukoencephalopathien mit Hypomyelinisierung im Kindesalter*****Projekt-Koordinator:***Prof. Dr. med. **Knut Brockmann**

Abteilung Pädiatrie II mit Schwerpunkt Neuropädiatrie

Universitätsmedizin Göttingen

Georg-August-Universität

Robert-Koch-Strasse 40

37075 Göttingen

Telefon +49-551-39-6210

Fax +49-551-39-6252

E-mail: kbrock@med.uni-goettingen.de***Ko-Antragstellerin***Dr. med. **Steffi Dreha-Kulaczewski**

Abteilung Pädiatrie II mit Schwerpunkt Neuropädiatrie

Universitätsmedizin Göttingen

Georg-August-Universität

Robert-Koch-Strasse 40

37075 Göttingen

Telefon +49-551-39-6210

Fax +49-551-39-6252

E-mail: sdreha@gwdg.de**I. Kurze Darstellung zu*****1. Aufgabenstellung,***

Mittels multiparametrischer Magnetresonanz (MR)-Untersuchungen (MR-Tomographie, lokalisierte Protonen-MR-Spektroskopie mit absoluter Quantifizierung der Metabolite, Diffusions Tensor Imaging) bei Kindern mit hypomyelinisierender Leukoencephalopathie sollen diagnostische Muster identifiziert werden, die eine Klassifizierung unterschiedlicher Entitäten sowie Aussagen zu unterschiedlichen Pathomechanismen erlauben.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde,

Zur Durchführung des Projektes standen die räumlichen und organisatorischen Gegebenheiten des Universitätsklinikums der Georg-August Universität Göttingen zur Verfügung. Das Projekt wurde innerhalb des neurowissenschaftlichen Schwerpunktes der Medizinischen Fakultät durchgeführt. Die MR Untersuchungen

erfolgten in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe „MR-Forschung in der Neurologie und Psychiatrie“ (Leiter Dr. Peter Dechent) am Klinikum der Georg August-Universität.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens,

In der Förderperiode haben wir mehr als 100 Patienten mit unklassifizierten oder klassifizierten Leukoencephalopathien rekrutiert und mit Magnetresonanzverfahren untersucht. Davon lagen bei 20 Patienten Leukoencephalopathien mit Hypomyelinisierung vor. Zudem wurden die Daten von aus früheren Jahren bekannten Patienten mit derartigen Leukoencephalopathien mit Hypomyelinisierung re-evaluiert. In Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen erfolgten Untersuchungen zur genetischen und biochemischen Charakterisierung neu klassifizierter Erkrankungen.

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

- Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden,

Die MR Untersuchungen wurden an einem Siemens MR-Gerät TRIO der Arbeitsgruppe „MR-Forschung in der Neurologie und Psychiatrie“ (Leiter Dr. Peter Dechent) am Klinikum der Georg August-Universität durchgeführt.

- Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste,

Es wurde die in PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed) gelistete Fachliteratur zu Leukodystrophien verwandt und darüber hinaus folgende Standardwerke:
 Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS (2001). The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill, New York.
 van der Knaap M, Valk J. Magnetic Resonance of Myelination and Myelin Disorders. 3rd edition 2005. Berlin, Springer

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Die MR-Untersuchungen erfolgten an Patienten, die aus dem Krankengut der Abteilung Pädiatrie II mit Schwerpunkt Neuropädiatrie, Universitätsmedizin Göttingen, sowie aus der Zusammenarbeit mit anderen neuropädiatrischen Zentren in Deutschland rekrutiert wurden. Die MR-Diagnostik wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „MR-Forschung in Neurologie und Psychiatrie“, Leiter: PD Dr. Peter Dechent, Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Frahm, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen.

Klinisch-neuroradiologische Kooperation erfolgte mit Prof. Dr. van der Knaap, Amsterdam, zur weiteren Charakterisierung der Hypomyelinisierung mit Atrophie der Basalganglien und des Cerebellums (H-ABC). Klinisch-genetische Kooperation erfolgte mit Prof. Dr. Rautenstrauss, Erlangen/München zum molekulargenetischen Nachweis von Mitofusin2 Mutationen bei Patienten mit Leukoencephalopathie und peripherer axonaler Neuropathie.

II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele,

Die Zuwendung wurde für eine Post-Doc Arztstelle nach BAT IIa für die Dauer von 2 Jahren verwendet.

Während der Förderperiode wurden in Göttingen bei der klinischen, neuroradiologischen, biochemischen und genetischen Charakterisierung von Leukoencephalopathien mit Hypomyelinisierung im Kindesalter folgende Ergebnisse erzielt:

1.1. Für die MR-Untersuchungen wurde ein standardisiertes Messprotokoll etabliert. Es beinhaltet Single-Voxel Protonen-MR-Spektroskopie mit kurzen Echozeiten sowie multimodales quantitatives Imaging. Letzteres setzt sich aus Magnetisation-Transfer-Sequenzen, Diffusion-Tensor-Imaging und T1-gewichteten Sequenzen zusammen. Auch Nachverarbeitung und Auswertung wurden standardisiert. Histogramme und quantitative Karten werden berechnet und mittels Farbcodierung dargestellt.

1.2. Drei Patienten im Alter von 9 Monaten bis 13 Jahren mit „Hypomyelination and Atrophy of Basal ganglia and Cerebellum (H-ABC)“ sind mit diesem Protokoll untersucht worden. Protonen-MRS-Befunde zeigen hochnormale oder signifikant erhöhte CholinKonzentrationen und unterscheiden sich damit eindeutig vom Muster bei Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung (PMD). Quantitatives multimodales Imaging, dessen Parameter Myelin und Myelinisierung reflektieren, weist auf eine deutliche Verminderung dieser Werte hin. Zudem zeigt sich in den farbcodierten Karten ein charakteristisches Muster der stark erniedrigten Werte insbesondere im Corpus callosum, in periventrikulären Regionen und subcortikal. Diese Verteilungsmuster und Histogramme wurden verglichen mit denen anderer bekannter hypomyelinisierender Leukoencephalopatien (Pelizaeus-Merzbacher-like Disease (PMLD), Mitochondriopathie bei Komplex IV-Defizienz). Eine Publikation dazu ist in Vorbereitung.

1.3. Bei zwei Patienten, 11 und 18 Jahre alt, mit Pelizaeus-Merzbacher-ähnlicher Hypomyelinisierung (PMLD) und molekulargenetisch gesicherter *GJA12* Mutation wurde das MR-Messprotokoll angewandt. Die Protonen-MRS-Befunde mit reduzierter CholinKonzentration ähneln denen bei Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung (PMD). Die quantitativen MR-Methoden lassen ein anderes räumliches Muster von Regionen mit signifikant erniedrigten Parametern erkennen. Diese finden sich hier vor allem periventrikulär sowie im Bereich der U-Fasern, während das Corpus callosum weniger betroffen ist. Die Ergebnisse wurden mit der klinischer Symptomatik korreliert und mit den Befunden anderer hypomyelinisierender Leukoencephalopathien (H-ABC und Mitochondriopathie bei Komplex IV-Defizienz) verglichen.

Dazu Vortrag auf 9. Kongress der European Society of Magnetic Resonance in Neuropediatrics (ESMRN), Mai 2007 Tübingen.

Beitrag auf dem 2. White Matter Study Group Meeting, September 2008 in Krakow, Polen.

Beitrag auf dem 17. Kongress der International Society of Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM), April 2009 in Honolulu, USA.

Eine Publikation dazu ist in Vorbereitung.

1.4. Zwölf Patienten mit bisher unklassifizierten hypomyelinisierenden Leukoencephalopathien wurden mit dem multimodalen MR-Protokoll untersucht.

1.5. Bei zwei Patienten mit hypomyelinisierender Leukoencephalopathie bei cerebraler Folatdefizienz, inzwischen drei und sechs Jahre alt, wurden die MR-Untersuchungen gemäß Protokoll durchgeführt. Das initiale MR-Spektroskopie-Muster ist hochgradig charakteristisch und normalisiert sich unter Therapie. Verlaufsuntersuchungen werden über inzwischen 2 Jahre durchgeführt. Insbesondere die MRS-Ergebnisse nehmen im Rahmen der Therapiekontrolle und – evaluierung einen hohen Stellenwert ein. Eine Publikation dazu ist in Vorbereitung.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

104 Patienten mit Leukoencephalopathie wurden mittels des etablierten multimodalen MR-Protokolls [MRS und quantitatives MRI (MT, DTI, T1)] untersucht, davon 20 mit bekannter oder unklassifizierter hypomyelinisierender Leukoencephalopathie.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

- Validierung der neuen Methoden
- Charakterisierung neuer Aspekte von bekannten hypomyelinisierenden Leukoencephalopathien
- Etablierung neuer Kriterien für weitere Klassifikation/Einteilung bisher unklarer hypomyelinisierender Leukoencephalopathien
- Therapiemonitoring

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans,

Das Projekt ist erfolgreich verlaufen. Eine wissenschaftliche Anschlussfähigkeit der Ergebnisse in der Forschung ist gegeben. Die Abgrenzung neuer Krankheitsentitäten und die weitere Charakterisierung kürzlich identifizierter Erkrankungen dienen der Diagnostik und Beratung betroffener Familien. Eine wirtschaftliche Anschlussfähigkeit ist aufgrund der Seltenheit dieser Erkrankungen nicht zu erwarten.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

Neu abgegrenzte Leukoencephalopathien mit Hypomyelinisierung des Kindesalters, die von anderen Arbeitsgruppen identifiziert wurden, sind in den hier aufgeführten Publikationen beschrieben:

1. Sasaki M, Takanashi JI, Tada H, Sakuma H, Furushima W, Sato N. Diffuse cerebral hypomyelination with cerebellar atrophy and hypoplasia of the corpus callosum. Brain Dev. 2008 Oct 11. [Epub ahead of print]

2. Magen D, Georgopoulos C, Bross P, Ang D, Segev Y, Goldsher D, Nemirovski A, Shahar E, Ravid S, Luder A, Heno B, Gershoni-Baruch R, Skorecki K, Mandel H. Mitochondrial hsp60 chaperonopathy causes an autosomal-recessive neurodegenerative disorder linked to brain hypomyelination and leukodystrophy. *Am J Hum Genet.* 2008;83:30-42
3. Prietsch V, Arnold S, Kraegeloh-Mann I, Kuehr J, Santer R. Severe hypomyelination as the leading neuroradiological sign in a patient with fucosidosis. *Neuropediatrics.* 2008;39:51-4.
4. Rossi A, Biancheri R, Zara F, Bruno C, Uziel G, van der Knaap MS, Minetti C, Tortori-Donati P. Hypomyelination and congenital cataract: neuroimaging features of a novel inherited white matter disorder. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29:301-5.
5. Ugur SA, Tolun A. A deletion in DRCTNNB1A associated with hypomyelination and juvenile onset cataract. *Eur J Hum Genet.* 2008;16:261-4.
6. Wolf NI, Harting I, Innes AM, Patzer S, Zeitler P, Schneider A, Wolff A, Baier K, Zschocke J, Ebinger F, Boltshauser E, Rating D. Ataxia, delayed dentition and hypomyelination: a novel leukoencephalopathy. *Neuropediatrics.* 2007;38:64-70.
7. Biancheri R, Zara F, Bruno C, Rossi A, Bordo L, Gazzero E, Sotgia F, Pedemonte M, Scapolan S, Bado M, Uziel G, Bugiani M, Lamba LD, Costa V, Schenone A, Rozemuller AJ, Tortori-Donati P, Lisanti MP, van der Knaap MS, Minetti C. Phenotypic characterization of hypomyelination and congenital cataract. *Ann Neurol.* 2007;62:121-7.
8. Timmons M, Tsokos M, Asab MA, Seminara SB, Zirzow GC, Kaneski CR, Heiss JD, van der Knaap MS, Vanier MT, Schiffmann R, Wong K. Peripheral and central hypomyelination with hypogonadotropic hypogonadism and hypodontia. *Neurology.* 2006;67:2066-9.
9. Zara F, Biancheri R, Bruno C, Bordo L, Assereto S, Gazzero E, Sotgia F, Wang XB, Gianotti S, Stringara S, Pedemonte M, Uziel G, Rossi A, Schenone A, Tortori-Donati P, van der Knaap MS, Lisanti MP, Minetti C. Deficiency of hyccin, a newly identified membrane protein, causes hypomyelination and congenital cataract. *Nat Genet.* 2006;38:1111-3.

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

BÜCHER UND BUCHKAPITEL

1. **Brockmann K**, Dechent P, Hanefeld F. MR spectroscopy in pediatric white matter disease. In: *Clinical MR Neuroimaging*, edited by Jonathan Gillard, Adam Waldman & Peter Barker, Cambridge University Press, 2nd edition, im Druck

ORIGINALARBEITEN

1. **Brockmann K**, Dechent P, Bönnemann C, Schreiber G, Frahm J, Hanefeld F. Quantitative proton MRS of cerebral metabolites in Laminin $\alpha 2$ chain deficiency. *Brain & Development*, 2007;29:357-64
2. Groeschel S, **Brockmann K**, Hanefeld F. Virchow-Robin spaces on magnetic resonance images of children with adrenoleukodystrophy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2007;11:142-45
3. van der Knaap MS, Linnankivi T, Paetau A, Feigenbaum A, Wakusawa K, Haginoya K, Kohler W, Henneke M, Dinopoulos A, Grattan-Smith P, **Brockmann K**, Schiffmann R, Blaser S. Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum: Follow-up and pathology. *Neurology* 2007;69:166-171
4. Henneke M, Combes P, Diekmann S, Ohlenbusch A, Kaiser J, Plecko B, Burlina AP, **Brockmann K**, Rodriguez D, Bertini E, Boespflug-Tanguy O, Gärtner J. *GJA12* mutations as a rare cause for Pelizaeus-Merzbacher-like Disease. *Neurology*. 2008;70:748-754.
5. **Dreha-Kulaczewski S**, Dechent P, Finsterbusch J, **Brockmann K**, Gärtner J, Frahm J, Hanefeld F. Early Reduction of NAA in Patients with Classical Vanishing White Matter Disease. A Long-term Follow-up MRS Study. *Ped Research*, 2008;63:444-449.
6. **Brockmann K**, **Dreha-Kulaczewski S**, Dechent P, Bönnemann C, Helms G, Kyllerman M, Brück W, Frahm J, Huehne K, Gärtner J, Rautenstrauss B. Cerebral involvement in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mitofusin2 mutations. *J Neurol*, 2008;255:1049-58.
7. Kohlschütter A, Bley A, **Brockmann K**, Gärtner J, Krägeloh-Mann I, Rolfs A, Schöls L. Leukodystrophies and other genetic metabolic leukoencephalopathies in children and adults. *Brain & Development*, im Druck

Schlussbericht 2. Förderphase für Projekt 4

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung,

Adulte Formen der Leukodystrophien sind bis heute wenig beachtet und untersucht. Ziel des Vorhabens ist die vollständige phänotypische Charakterisierung adulter Patienten mit Leukodystrophien. Die Erfassung des gesamten klinischen Spektrums der Leukodystrophien und ihres natürlichen Erkrankungsverlaufs ist eine Voraussetzung für die Erforschung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen, Untersuchungen von Krankheits-modifizierenden Genen und die Entwicklung von Therapiestudien.

2. Voraussetzungen,

In einer Kooperation zwischen den neurologischen Kliniken Tübingen, Rostock und Wermsdorf werden adulte Leukodystrophiepatienten rekrutiert und standardisiert erfasst. Alle 3 Zentren besitzen langjährige Erfahrung in der Diagnose und Therapie leukodystrophischer Erkrankungen.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens,

Im Zentrum der Aktivität stand auch im zweiten Förderzeitraum die Rekrutierung und Diagnose von Patienten mit bekannten oder unbekanntem, adulten Leukodystrophien sowie die Entwicklung krankheitsspezifischer Scoring-Systeme.

Angabe der im Zeitraum 10/2005-5/2009 neu diagnostizierten bzw. neu rekrutierten adulten Patienten (Alter 16 – 72 Jahre)

	Wermsdorf	Tübingen	Rostock
Mitochondriale		22	34 (41)
Peroxisomale	47	4	20 (39)
Lysosomale	7	17	217 (289)
PLP, Canavan, Alexander		1	21 (44)
Other defined leukodystrophies		4	34 (71)
Unclassified	6	7	21 (30)
Summe	60	55	347 (514)
<i>Anteil der adulten Patienten</i>	100%	96%	64%

Die prognostizierten Zahlen konnten in allen Subgruppen erfolgreich erzielt werden. Die Patientendaten werden anonymisiert weitergeleitet an das Teilprojekt 1, teilweise zusätzlich an andere Teilprojekte des Leukonet.

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde

Die in Leukonet I begonnenen Projekte wurde kontinuierlich fortgeführt.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Innerhalb des Leukonet

- Teilprojekt 1: Alle in Teilprojekt 4 rekrutierten Patienten werden dem Projekt 1, der zentralen Patientendatenbank, zugeführt.
- Teilprojekt 2, das mit ähnlichen Techniken ähnliche Ziele bei den Leukodystrophien des Kindesalters verfolgt. Hier besteht eine besonders enge Kooperation zwischen der

Erwachsenenneurologie und der Neuropädiatrie in Tübingen, zwischen denen gemeinsame Fallkonferenzen etabliert sind und abteilungsspezifische Untersuchungsmöglichkeiten gemeinsam genutzt werden. Diese Kooperation hat sich insbesondere auch für eine kontinuierliche Betreuung der Patienten beim Übergang aus dem Kindes- ins Erwachsenenalter bewährt.

- Teilprojekt 3: Darüber hinaus besteht eine enge Kooperation mit Teilprojekt 3 a, das kernspintomographische und MR-spektroskopische Muster bei bis jetzt nicht näher klassifizierten Leukodystrophien des Kindesalters untersucht.

- Innerhalb des Teilprojekt 4: Prof. Dr. L. Schöls/ Uni Tübingen, 72076, Tübingen,
Prof. Dr. A. Rolfs/ Uni Rostock, 18055, Rostock
Chefarzt W. Köhler/ FKH Hubertusburg, 04779, Wernsdorf

Kooperation mit neurologischen Praxen und Kliniken

- In Leukonet- Fallkonferenzen wurden regelmäßig Zusendung von Patientenunterlagen durch neurologische FA- Praxen und neurologische Kliniken beraten, die zur diagnostischen Klärung unklarer Fälle oder Einholung einer Zweitmeinung eingereicht wurden.

Internationale Kooperationen

Prof. Berger, Wien (Projekt: Cholestin – Therapie bei X-ALD/AMN)

Prof. van der Knaap, Amsterdam (Projekt: molekulargenetische Differenzierung unklarer LD)

Prof.. Linnebank, Zürich, (Projekt: Polymorphismen im Methioninstoffwechsel bei X-ALD/AMN)

Internationale Zentren, von denen Patienten bzw. diagnostisches Material an die Universität Rostock gesandt wurden:

- Dr. Nina Gusina; Byelorussian Centre for Medical Genetics; Orlovskaya Street 54-70, 220053 Minsk, Belarus
- Prof. Dr. A. Laszlo, Dpartment of Pediatrics, Medical School, Univrsity of Szeged, Koranyi fasor 14-15, 6720 Szeged, Hungary
- Prof. Dr. Barbara Czartoryska, Department of Genetics, Institute of Psychiatry and Neurology, University of Warsaw, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warsaw, Poland
- Prof. Dr. Anna Tyłki-Szymanska, Department of Metabolic Diseases, The Children Memorial Health Institute, AL. Dzieci Posilkich 20, 04-736 Warsaw, Poland
- Prof. Dr. B. Juodka, Medical Faculty, Universiteto 3, 2734 Vilnius, Lithuania
- Prof. Dr. Z. Kucinskiene, Medical Faculty, Dept. of Human Genetics, M. K. Ciurlionio street 21, 2009 Vilnius, Lithuania
- Prof. Dr. Zdzislaw Chmielewski, Medical Faculty, Dept. of Neurogenetics, Aleja Jednosci Narodowej 22a, 70-453 Szczecin, Poland

Zusammenarbeit mit Patientengruppen

Kontaktpflege mit den Patienten-Selbsthilfegruppen

Bundesverein Leukodystrophie (BVL),

Verein für Pelizeus- Merzbacher- Syndrom e. V. (PMD),

Myelinprojekt Deutschland,

Allianz chronisch seltener Erkrankungen (ACHSE)

II. Eingehende Darstellung

1. des erzielten Ergebnisses,

Teilprojekt Rostock:

1. Entwicklung Score

Auf der Basis von 246 vorhandenen Datensätzen von Patienten mit adulten Leukodystrophien (16 – 54 Jahre) unterschiedlicher Ätiologien wurde mittels einfacher Regressionsanalyse ein klinischer Score entwickelt (Rostock Adult Leukodystrophy Score, RALS), der mit der Progression des Krankheitsbildes hoch korreliert ($r = 0.92$); die Berechnung der multivariaten Regressionsanalyse wird in den nächsten Wochen abgeschlossen werden.

2. Verbesserung der Labordiagnostik

Es wurde ein erfolgreicher Aufbau einer breiten Palette genetischer Diagnostik-Assays von mehr als 55 Leukodystrophie-Erkrankungen in der Routineanalyse etabliert und durchgeführt, so z.B.

- ARSA (MLD)
- Megaloencephalic leukodystrophy (MLC1), KIAA0027
- Pelizaeus-Merzbacher like disease 1 (PMLD1, OMIM 608.804), GJC2
- Cerebrotendinöse Xanthomatosis (OMIM 213.700), CYP27A1
- Pelizaeus-Merzbacher disease (OMIM 312,080), PLP1
- Adrenoleukodystrophie (OMIM 300.100), ABCD1
- Alexander disease (OMIM 203.450), GFAP
- Neuroaxonal dystrophy (OMIM 256.600), PLA2G6
- Aicardi-Goutieres Syndrome (OMIM 225.750), TREX1

3. MR- Spektroskopie

Die routinemäßige Anwendung der Spektroskopie konnte bei der Mehrzahl der klinischen und MRT-untersuchten Patienten eingeführt werden; die Etablierung von Normwerten hatte sich anfänglich als deutlich schwieriger dargestellt, als geplant.

Teilprojekt Tübingen:

In Kooperation mit dem neurometabolischen Labor erfolgte ein Screening von Patienten mit unklarer Ataxie, Spastik, Dystonie, Neuropathie, Epilepsie oder Demenz auf spät manifeste Form der Leukodystrophien. Hierbei wurden je 1 Patient mit GM1-Gangliosidose, GM2-Gangliosidose und M. Krabbe sowie zwei Patienten mit adulter Metachromatischer Leukodystrophie sowie 4 Patienten mit Adrenomyeloneuropathie/Adrenoleukodystrophie entdeckt. 21 Patienten wiesen eine mitochondriale Störung auf, die meisten davon mit Mutationen in der Polymerase γ (POLG). Alle Patienten wurden standardisiert klinisch und elektrophysiologisch phänotypisiert und zu jährlichen Verlaufsuntersuchungen einbestellt. Zur Dokumentation des natürlichen Erkrankungsverlaufs wurde die Schwere der Erkrankung mittels motorischer Scores (SARA, SPRS), neuropsychologischer Tests (MMSE + individuell angepasste Testbatterie) und der Alltagsaktivitäten (Part IV der UHDRS) erfasst. Die Diagnostik der bildgebenden Veränderungen erfolgte mit 3D-Datensätzen und MR-Spektroskopie.

Teilprojekt Wermisdorf:

1. Adult ALD Clinical Score

Entwicklung und Validierung eines krankheitsspezifischen Scores für adulte Formen der X-ALD. Der Score beruht auf klinischen Meilensteine in der Krankheitsprogression der X-ALD und erlaubt eine valide Erfassung der Krankheitsprogression mit hoher Korrelation zur MRT (LOES Score) mit hoher interrater Reliabilität sowohl für die retrograde als auch die prospektive Erfassung.

2. Langzeit – Daten X-ALD

Zur X-ALD wurden umfassende Daten zum klinischen Verlauf, Bildgebung, Neuropsychologie und Neurophysiologie über Zeitraum bis zu 10 Jahren erfasst und teilweise bereits ausgewertet (Lit.). Weitere Analysen sind geplant, u. a. stehen LZ-Daten zum Verlauf unter Therapie mit GTO/ GTE (Lorenzos Öl) zur Verfügung, die erstmals die Möglichkeit einer therapeutischen Beeinflussung der AMN-Variante der X-ALD nahelegt.

3. Diagnostischer Algorithmus für unklare Leukodystrophien

38/54 (70%) von zuvor unklaren Leukodystrophien (ULD) konnten einer Diagnose zugeführt werden. 16 Patienten befinden sich weiterhin im diagnostischen Verlauf. Die dabei gewonnenen Erfahrungen wurden 1.) für die Entwicklung eines Diagnose-Algorithmus (Köhler. J Neurol (2008) 255) eingesetzt und 2.) zur Verbesserung einer Leitlinie für die DGN genutzt um sie somit einer breiten Ärzteschaft zur Kenntnis zu bringen.

4. MR-Spektroskopie bei X-ALD

Es wurden 85 Patienten (51 Adrenomyeloneuropathie, 17 cerebral arrestiert, 17 cerebral entzündlich) sequenziell MR- spektroskopisch untersucht, wobei sich signifikante Unterschiede zwischen zerebralen und nicht- zerebralen Formen und Kontrollen zeigten. Diese Erkenntnisse tragen wesentlich zur prognostischen Beurteilung bei und sind bedeutsam für die Indikationsstellung zur HSCT-

5. HSCT bei entzündlichen adulten Formen der X-ALD
Unbehandelt muss die Prognose für zerebral entzündlich- demyelinisierende Formen der X- ALD auch im Erwachsenenalter als infaust eingeschätzt werden. In Kooperation mit dem Transplantationszentrum der Charité Berlin wurden daher Indikationskriterien für die HSCT im Erwachsenenalter erarbeitet. Nach diesen Kriterien wurden bislang 3 Patienten behandelt. Die Verlaufsdaten wurden systematisch erfasst und analysiert.
6. Patientenkontaktstelle
Die Arbeit der Patientenkontaktstelle entwickelte sich als ein wichtiges Bindeglied der wissenschaftlichen Projekte zu Patienten. Im Verlauf des Projektes wurde die Kontaktstelle mehr als 4000 mal in Anspruch genommen, überwiegend von Patienten, z. T. aber auch von ratsuchenden Ärzten und Kliniken.
7. Polymorphismen im Methioninstoffwechsel bei X-ALD
In einem Kooperationsprojekt mit Prof. Linnebank, Bonn/Zürich konnten wir zeigen, dass bei X-ALD Patienten mit bestimmten Polymorphismen im Methioninstoffwechsel zerebrale Demyelinisierungen häufiger vorkommen (Linnebank et al, Neurology 2006). Die Untersuchungen sollten fortgesetzt werden.

2. des voraussichtlichen Nutzens

Teilprojekt Rostock

Die Entwicklung eines klinischen Progressionsscore hat für die standardisierte Dokumentation der betroffenen Patienten sowie für spätere therapeutische Interventionen eine große Bedeutung. Die Etablierung kurzfristig verfügbarer genetischer Assays (mittlere Analysezeit 2-3 Wochen) verkürzt massiv die Wartezeit der Patienten bis zu Klärung der Ursache Ihrer Erkrankung, spart Kosten und verbessert die genetische Beratung der Ratsuchenden.

Teilprojekt Tübingen:

Ausgehend von den Ergebnissen des Screenings bei unklaren Bewegungsstörungen und kognitiven Einschränkungen sowie den Erfahrungen des gemeinsamen Patientenkollektivs wurde eine Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Leukodystrophien im Erwachsenenalter erarbeitet. Dies wurde mit österreichischen und schweizerischen Kollegen abgeglichen und in die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie übernommen. Hiermit steht erstmals eine offizielle Anleitung für die Diagnostik und Therapie von Leukodystrophien im Erwachsenenalter zur Verfügung. Außerdem gelang es auf den Tagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2008 und bei der Neurowoche 2009 als den wichtigsten neurologischen Kongressen in Deutschland (über 3000 Teilnehmer) jeweils einen Workshop bzw ein Symposium über Leukodystrophien im Kongressprogramm zu verankern, die zu einer breiten, verbesserten Wahrnehmung der Erkrankungsgruppe und ihrer Herausforderungen beitragen. Dem gleichen Zweck dient eine umfassende Übersicht über klinische, diagnostische und therapeutische Aspekte der Leukodystrophien, die jüngst in Brain Development erschienen ist.

Teilprojekt Wermisdorf:

Die Entwicklung grundlegender Bewertungskriterien für die X- ALD und andere Leukodystrophien erlaubt die exakte Charakterisierung des klinischen Verlaufs adulter x- ALD- Varianten im natürlichen Verlauf und unter Therapie und erbringt wertvolle Erkenntnisse zur Differenzierung anderer Erkrankungen im Erwachsenenalter, wie etwa der Multiplen Sklerose.

Die Phänotypisierung bekannter und Charakterisierung bislang unbekannter Leukodystrophien des Erwachsenenalters sind von grundsätzlicher Bedeutung für die klinische Beratung der Patienten und die Erweiterung des klinisch- wissenschaftlichen Horizonts. Darüber hinaus wurden Algorithmen und Leitlinien für die Deutsche Gesellschaft für Neurologie zur Differenzierung von unklaren LD erarbeitet.

Von großer Bedeutung sind die Ergebnisse der MR-Spektroskopie Verlaufuntersuchungen. Sie dienen der Verlaufskontrolle und sollen später klinisch relevante Entscheidungen vereinfachen (frühe progn. Aussagekraft, KMT- Indikation bei X-ALD, Diagnostik unklarer LD).

Durch die Kontaktstelle entstanden verbesserte Informationsmöglichkeiten für Patienten. (Hinterlegung als Ansprechpartner inkl. Kontaktdaten auf Homepages, z. B. Leukonet, BVL; Erstellung und Weitergabe von Informationsmaterialien). Insgesamt kamen ca. 4000 Kontakte zustande, davon ca. 500 Telefonate, 1800 E-Mails sowie 700 Briefe.

3. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

Unter Einbeziehung von Daten des Leukonet (siehe internationale Kooperation) konnten fortlaufend bisher unklare Erkrankungen genotypisiert werden.

4. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

Teilprojekt Rostock:

1. Hoffmann B, Beck M, **Rolfs A**, Neumann HP. Fabry disease - complex clinical picture, simple diagnosis procedure, causal treatment. Dtsch Med Wochenschr. 2008, 133:1965-1972
2. Falke K, Büttner A, Schittkowski M, Stachs O, Kraak R, Zhivov A, **Rolfs A**, Guthoff R. The microstructure of cornea verticillata in Fabry disease and amiodarone-induced keratopathy: a confocal laser-scanning microscopy study. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2008 Oct 18.
3. Cybulla M, Walter K, Neumann H.P.H., Widmer U, Schärer M, Sunder-Plassmann G, Jansen T, **Rolfs A**, Beck M. Morbus Fabry: demographische Übersicht aus dem deutschsprachigen Raum seit der Einführung der Enzymersatztheapie (EET). Dtsch Med Wochenschr. 2007, 132:1505-1509. (**IF 0.7**)
4. Mercimek - Mahmutoglu S, Gruber S, **Rolfs A**, Stadlbauer A, Woeber Ch, Kurnik P, Voigtlaender T, Moser E, Stockler - Ipsiroglu S. Neurological and brain MRS findings in patients with Gaucher disease type1. Mol Genet Metab 2007, 91: 390-395 (**IF 2.6**)
5. Nagy ZF, Bencsik K, Rajda C, Morvay M, Husz S, Voros E, **Rolfs A**, Honti V, Dobozy A, Vescei L. A rare manifestation of Fabry's disease. Swiss Med Wkly. 2007, 137: 130. (**IF 1.2**)

Teilprojekt Tübingen:

1. Hoffmann B, Beck M, Rolfs A, Neumann HP. Fabry disease - complex clinical picture, simple diagnosis procedure, causal treatment. Dtsch Med Wochenschr. 2008, 133:1965-1972
2. Riecker A, Nagele T, Henneke M, Schols L. Late onset vanishing white matter disease. J Neurol 2007; 254(4): 544-545
3. Schols L, Nagele T, Schule R, Berg D. Cerebrotendinous xanthomatosis. Neurology 2006; 67(11): E20
4. Schöls L, Bösch S, Köhler W, Krägeloh-Mann I, Rolfs A (2008) Leukodystrophien im Erwachsenenalter. In: Diener HC, Putzki N (eds) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Thieme, Stuttgart, 822-826
5. Kohlschütter A, Bley A, Brockmann K, Gärtner J, Köhler W, Krägeloh-Mann I, Rolfs A, Schöls L. Leukodystrophies and other genetic metabolic leukoencephalopathies in children and adults - A diagnostic check list. Brain Development 2009, in press

Teilprojekt Wermsdorf:

1. **Köhler, W.**, Sokolowski, P. (2005) Clinical phenotypes, diagnosis and treatment of adulthood x-linked adrenoleukodystrophy in Berger, J., Stöckler-Ipsiroglu, S., Köhler, W. (Eds.) Understanding and Treating Adrenoleukodystrophy – present state and future perspectives. SPS Verlagsgesellschaft, Heilbronn.

2. Linnebank M, Semmler A, Kleijer WJ, van der Sterre ML, Gärtner J, Fließbach K, Sokolowski P, **Köhler W**, Schlegel U, Klockgether T, Wanders RJ, Schmidt S, Wüllner U, Kemp S. The cystathionine beta-synthase variant c.844_845ins68 protects against CNS demyelination in X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mutat.* 2006 Oct;27(10):1063-4.
3. Hehr U, Bauer P, Winner B, Schule R, Olmez A, **Koehler W**, Uyanik G, Engel A, Lenz D, Seibel A, Hehr A, Ploetz S, Gamez J, Rolfs A, Weis J, Ringer TM, Bonin M, Schuierer G, Marienhagen J, Bogdahn U, Weber BH, Topaloglu H, Schols L, Riess O, Winkler J. Long-term course and mutational spectrum of spatacsin-linked spastic paraplegia. *Ann Neurol.* 2007 Dec;62(6):656-65.
4. Semmler A, Bao X, Cao G, **Köhler W**, Weller M, Aubourg P, Linnebank M. Genetic variants of methionine metabolism and X-ALD phenotype generation: results of a new study sample. *J Neurol.* 2009
5. **Köhler W**. Diagnostic algorithm for the differentiation of leukodystrophies in early MS. *J Neurol.* 2008 Dec;255
6. Maier EM, Mayerhofer PU, Asheuer M, **Köhler W**, Rothe M, Muntau AC, Roscher AA, Holzinger A, Aubourg P, Berger J. X-linked adrenoleukodystrophy phenotype is independent of ABCD2 genotype. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Dec 5;377(1):176-80
7. Semmler A, **Köhler W**, Jung HH, Weller M, Linnebank M. Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Expert Rev Neurother.* 2008 Sep;8(9):1367-79. Review.
8. van der Knaap MS, Linnankivi T, Paetau A, Feigenbaum A, Wakusawa K, Haginoya K, **Köhler W**, Henneke M, Dinopoulos A, Grattan-Smith P, Brockmann K, Schiffmann R, Blaser S. Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum: follow-up and pathology. *Neurology.* 2007 Jul 10;69(2):166-71.

Schlussbericht

Jutta Gärtner, Göttingen

Teilprojekt 5 „Disease modifier genes in X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) and their influence on adrenoleukodystrophy protein (ALDP) function“

zu I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung:

Die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (X-ALD) ist die häufigste erbliche peroxisomale Erkrankung. Das für die X-ALD verantwortliche Gen ist bekannt. Es liegt auf Chromosom Xq28 und kodiert ein ATP-abhängiges peroxisomales Membranprotein. Mutationen im *ALD*-Gen führen zu einer gestörten β -Oxidation und zu einer Akkumulation von überlangkettigen gesättigten Fettsäuren in Körpergeweben und –flüssigkeiten. Klinisch sind mindestens sechs unterschiedliche Erkrankungsformen zu unterscheiden, von der schweren kindlich zerebralen Verlaufsform bis hin zur asymptomatischen Form des Erwachsenenalters. Zwischen der Art der *ALD*-Genmutation, dem Ausmaß der Anhäufung von überlangkettigen Fettsäuren und dem klinischen Verlauf ergibt sich keine Korrelation. Innerhalb von betroffenen Familien können schwere und milde klinische Ausprägungen nebeneinander vorkommen. Unterschiedliche Erkrankungsverläufe sind auch bei monozygoten Zwillingen beschrieben. Ziel des Projektes war die Suche nach modifizierenden Genen und epigenetischen Faktoren, die neben der *ALD*-Genmutation für die Ausprägung des klinischen Bildes bei Patienten mit X-chromosomaler Adrenoleukodystrophie eine Rolle spielen.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:

das Projekt wurde in der Abteilung Pädiatrie II der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Die Abteilung ist bundesweites Referenzzentrum für die Diagnostik und Behandlung von Patienten mit X-chromosomaler Adrenoleukodystrophie. Die für die Durchführung des Projekts notwendige Infrastruktur ist in der Abteilung (Stoffwechsellabor, Molekulargenetisches Labor) und innerhalb der Göttinger Neurowissenschaften (Transkriptomanalyselabor, FRET-Studien) vorhanden. Es besteht eine enge Kooperation zu den in Göttingen ansässigen Max-Planck-Instituten (MPI für Biophysik, MPI für Medizin)

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

In der gesamten Antragsperiode wurden symptomatische und asymptomatische Patienten mit X-ALD rekrutiert. Alle Fälle wurden klinisch, radiologisch und laborchemisch charakterisiert und validiert. In den erfassten informativen Familien mit betroffenen monozygoten Zwillingen wurden Transkriptomanalysen durchgeführt, um modifizierende Gene zu identifizieren. Innerhalb der rekrutierten symptomatischen und asymptomatischen Patientengruppen wurden Polymorphismen in Kandidatengen wie Genen des Methioninmetabolismus bestimmt. Darüber hinaus wurde die Funktion des ALD-Proteins untersucht. Hierzu wurden die Interaktionen des ALD-Proteins mit peroxisomalen und peroxisomen-assoziierten Proteinen bestimmt.

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

• Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden,

keine

• Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste,

Es wurde die in PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed) gelistete Fachliteratur zu Leukodystrophien und insbesondere die zur X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie verwandt. Darüber hinaus wurde auf die europäische X-ALD Mutationsdatenbank (www.x-ald.nl) zurückgegriffen. Ebenso gingen folgende Standardwerke ein:

Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS (2001). The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill, New York.
van der Knaap M and Valk J (2002). Magnetic Resonance of Myelin, Myelination and Myelin Disorders. Berlin, Springer.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Die kooperierenden Wissenschaftler waren innerhalb der Göttinger Neurowissenschaften Prof. Dr. Wolfgang Brück (Neuropathologie), Dr. Peter Dechent (MR-Forschung in der Neurologie und Psychiatrie), Prof. Dr. Kurt von Figura und Dr. Jobst Landgrebe (ehemals Biochemie II), Prof. Dr. Klaus-Armin Nave (Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin) und Prof. Dr. Fred S. Wouters (European Neuroscience Institute). Darüber hinaus bestanden Kooperationen mit Prof. Dr. Patrick Aubourg (Hôpital Saint-Vincent de Paul Paris, Frankreich), Prof. Dr. Eugen Boltshauser (Kinderspital Zürich, Schweiz) und Dr. T. Linnemann (ehemals Neurologische Klinik der Universität Bonn).

zu II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele,

Rekrutierung von Patienten

Eine X-chromosomale Adrenoleukodystrophie kann in unterschiedlichen Krankheitsformen auftreten. Die derzeitige Klassifikation unterscheidet sechs Krankheitsformen, von der schweren kindlichen zerebralen Form bis hin zu asymptomatischen Formen des Erwachsenenalters. Darüber hinaus können auch Überträgerinnen klinische Symptome aufweisen. Wir haben insgesamt mehr als 300 Patienten mit X-ALD rekrutieren können, darunter zwei betroffene monozygote Zwillingspaare mit diskordantem Phänotyp. Proben der Patienten haben wir für folgende Untersuchungen eingesetzt:

- (i) in einer informativen Familie wurde ein positiver Effekt der hämatopoetischen Stammzelltransplantation auf die intrazerebrale Genexpression nachgewiesen,
- (ii) der Einfluss von Polymorphismen in Genen, die Proteine des Methionin-Stoffwechsels kodieren, auf den klinischen Phänotyp wurde untersucht,
- (iii) mittels Transkriptomanalysen wurde versucht, Unterschiede in der Genexpression bei zwei monozygoten Zwillingspaaren mit asymptomatischer bzw. kindlicher zerebraler Form nachzuweisen,
- (iv) mittels FRET- und FRAP-Analysen wurden die Auswirkungen von ALD-Genmutationen auf Protein-Protein-Interaktionen bestimmt.

Wirkweise der hämatopoetischen Stammzelltransplantation

Bei einem Patienten mit schwerer cerebraler Verlaufsform einer X-ALD konnten wir zeigen, dass die hämatopoetische Stammzelltransplantation nicht nur zur Expression des X-ALD Gens des Spenders in peripheren Geweben führt sondern nach drei Monaten auch in Neuronen und Gliazellen nachweisbar ist. Die Ergebnisse sind veröffentlicht (Schönberger et al. 2007).

Polymorphismen in Genen des Methionin-Stoffwechsels

Gene des Methioninmetabolismus scheinen eine Rolle in der Demyelinisierung einzunehmen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. T. Linnemann (ehemals Neurologische Klinik, Universität Bonn) wurden Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsformen der X-ALD auf funktionelle Polymorphismen in Genen des Methioninmetabolismus hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen, die die Demyelinisierung bei Methotrexat behandelten Patienten günstig beeinflussen, auch bei der X-ALD eine Rolle spielen. Die Ergebnisse sind veröffentlicht (Linnemann et al. 2006a und 2006b).

Transkriptomanalysen bei monozygoten Zwillingen mit unterschiedlichen X-ALD Krankheitsformen

Transkriptomanalysen mit Bestimmung von Genexpressionsmustern bei unterschiedlichen Krankheitsformen der X-ALD wurden in Fibroblasten von zwei monozygoten Zwillingspaaren mit unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen - schwere kindliche zerebrale Form versus asymptomatisch – durchgeführt und mehr als 300 differentiell exprimierte Gene identifiziert. Die Gene kodieren Proteine ganz unterschiedlicher Proteinfamilien. Die höchste Signifikanz ergab sich für Proteine des Wnt-Signalweg. Die Auswertung und Bestätigung auf Proteinebene der differentiell exprimierten Gene ist noch nicht abgeschlossen.

FRET- und FRAP-Analysen zur Protein-Protein-Interaktion

Die bei Patienten mit X-ALD vorliegende Fehlfunktion des ALD-Proteins und die Interaktionspartner dieses Proteins scheinen eine Rolle in der Pathogenese und damit Krankheitsausprägung einzunehmen. Wir haben Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels FRET (fluorescence resonance energy transfer) and FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) durchgeführt. Das ALD-Protein interagiert vorwiegend mit sich selbst oder dem 70 kDa peroxisomalen Membranprotein. Mutationen im ALD-Gen beeinflussen diese Interaktionen. Die Ergebnisse sind veröffentlicht (Hillebrand et al. 2007).

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Insgesamt konnten mehr als 300 Patienten einer seltenen Krankheit, der X-ALD rekrutiert werden, die in dieses Teilprojekt und auch in weitere Teilprojekte des German Leukonet eingegangen sind.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Pathogenese und die Wirkweise der Knochenmarktransplantation, der derzeit einzig zur Verfügung stehenden kurativen Therapie für die schwere cerebrale Verlaufsform der X-ALD, sind bis heute unverstanden. Zur Entwicklung weiterer Therapieansätze sind Untersuchungen zum Verständnis der Pathogenese und zum Verständnis der Wirkweise der Knochenmarktransplantation dringendst erforderlich. Die im Rahmen des Teilprojekts durchgeführten Arbeiten konnten hierzu einen Beitrag leisten.

3. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans,

Das Projekt ist erfolgreich verlaufen. Eine wissenschaftliche Anschlussfähigkeit der Ergebnisse in der Forschung ist gegeben. Die Ergebnisse können in die Entwicklung gentherapeutischer Ansätze einschließlich der pharmakologischen Gentherapie einbezogen werden. Eine wirtschaftliche Anschlussfähigkeit ist aufgrund der Seltenheit der Krankheit nicht zu erwarten.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

keine

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

BÜCHER UND BUCHKAPITEL

1. **Gärtner J**, Roscher A (2007): Peroxisomale Krankheiten. In: Lenze MJ, Schaub J, Schulte FJ, Spranger J, eds.. Pädiatrie - Grundlagen und Praxis. Springer Verlag Heidelberg, 399-404.
2. **Gärtner J** (2007): Erkrankungen des Nervensystems. In: Koletzko B, ed.. Von Harnack Kinderheilkunde. Springer Verlag Heidelberg, 559-605.
3. **Gärtner J** (2007): Neurometabolische und heredodegenerative Erkrankungen. In: Reinhardt D, ed.. Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter. Springer Verlag Heidelberg, 1660-1667.
4. **Gärtner J**, Neumaier-Probst E (2008): Typische Magnetresonanztomographie (MRT)-

- Befunde bei neurometabolischen und neurodegenerativen Erkrankungen. In: Aksu F, ed.. Neuropädiatrie. Uni-Med Bremen, 700-717.
5. Steinfeld R, **Gärtner J** (2009): Peroxisomale Erkrankungen. In: Korinthenberg R, Panteliadis CP, Hagel C, eds.. Neurologische Therapie im Kindesalter. Urban und Fischer München, im Druck.

ORIGINALARBEITEN

1. Berger J, **Gärtner J** (2006): X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Res* 1763:1721-1732.
2. Linnebank M, Kemp S, Wanders RJ, Kleijer WJ, van der Sterre ML, **Gärtner J**, Fliessbach K, Semmler A, Sokolowski P, Köhler W, Schlegel U, Schmidt S, Klockgether T, Wullner U (2006): Methionine metabolism and phenotypic variability in X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology* 66:442-443.
3. Linnebank M, Semmler A, Kleijer WJ, van der Sterre ML, **Gärtner J**, Fliessbach K, Sokolowski P, Köhler W, Schlegel U, Klockgether T, Wanders RJ, Schmidt S, Wullner U, Kemp S (2006): The cystathionine beta-synthase variant c.844_845ins68 protects against CNS demyelination in X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mutat* 27:1063-1064.
4. Hillebrand M, Verrier SE, Ohlenbusch A, Schäfer A, Söling HD, Wouters FS, **Gärtner J** (2007): Live cell FRET microscopy: Homo- and heterodimerization of two human peroxisomal ABC transporters, the adrenoleukodystrophy protein (ALDP, ABCD1) and PMP 70 (ABCD3). *J Biol Chem* 282:26997-267005.
5. Schönberger S, Roerig P, Schneider DT, Reifenberger G, Göbel U, **Gärtner J** (2007): Genotype and protein expression after bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy. *Arch Neurol* 64:651-657.

Netzwerk für seltene Erkrankungen: Leukodystrophie (Leukonet), Förderkennzeichen 01GM0640

Marco Henneke, Göttingen
Johannes Schumacher, Bonn

Angaben zum Schlussbericht zu Nr. 3.2 für Teilprojekt 6 "Identification of the causative disease gene for cystic leukoencephalopathy without megalencephaly within the defined locus on chromosome 6q"

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung,

Ziel des vorliegenden Teilprojektes war die Identifikation des der Zystischen Leukoencephalopathie ohne Megalenzephalie (cystic leukoencephalopathy without megalencephaly, CLminusM) zugrunde liegenden Krankheitsgens im Bereich der in der ersten Leukonet Förderperiode anhand zweier informativer Indexfamilien ermittelten Kopplungsregion auf Chromosom 6q.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde,

Das Projekt wurde in Kooperation zwischen der Abteilung Pädiatrie II mit Schwerpunkt Neuropädiatrie der Georg August Universität Göttingen und dem Institut für Humangenetik der Universität Bonn durchgeführt. Zusätzlich bestand für Teile des Projektes eine Kooperation mit dem Transkriptomanalyselabor der Georg August Universität Göttingen. Für das Projekt standen die räumlichen, technischen und organisatorischen Gegebenheiten der Universität Göttingen und Bonn zur Verfügung.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens,

Die CLminusM ist als umschriebene Krankheitsentität definiert. Wir konnten bislang 28 Patienten, die die Kriterien zur Diagnose des Syndroms erfüllen, rekrutieren. Der Phänotyp von 15 dieser Patienten wurde in einer umfassenden Studie detailliert beschrieben (Henneke et al. 2005). Insgesamt findet sich in der Literatur bis heute eine Gesamtzahl von 29 beschriebenen Fällen mit CLminusM. In der ersten Leukonet Förderperiode konnte durch genomweite Kopplungsanalysen an zwei konsanguinen Familien mit vier von CLminusM betroffenen Kindern ein Genlocus für diese Krankheitsentität auf Chromosom 6q ermittelt werden. Die Identifikation des Krankheitsgens innerhalb dieser Kopplungsregion auf Chromosom 6 sollte durch Re-Sequenzierungen von geeigneten Kandidatengenen an betroffenen Personen der beiden Indexfamilien erfolgen. Im ersten Jahr der zweiten Leukonet Förderperiode konnte das aufgrund funktioneller Vorbefunde zunächst aussichtsreichste sog. *Quaking (HQQ-)* Gen nach umfangreichen Re-Sequenzierungen und RT-PCR Analysen als Krankheitsgen ausgeschlossen werden. Es erfolgten daraufhin Re-Sequenzierungen weiterer aussichtsreicher Kandidatengene der Kopplungsregion. Hierbei konnten schließlich bei den Betroffenen der beiden Indexfamilien Mutationen des *RNASET2* Gens nachgewiesen und damit ein die Erkrankung verursachendes Gen identifiziert werden. Parallel konnte durch eine Transkriptomanalyse eine signifikant niedrigere Expression des *RNASET2* Gens bei den Betroffenen im Vergleich zu gesunden Familienmitgliedern detektiert werden. In sich anschließenden Mutationsanalysen des *RNASET2* Gens bei weiteren zuvor rekrutierten CLminusM Patienten

konnten weitere pathogenetisch relevante Sequenzalterationen identifiziert werden. Das *RNASET2* Gen kodiert das Glykoprotein RNASET2, über dessen biologische Funktion, insbesondere in Bezug auf Gehirnentwicklung und Myelinisierung, bislang nur sehr wenig bekannt ist. Daher wurden inzwischen weiterführende Expressionsstudien und Untersuchungen in unterschiedlichen Zellmodellen zur näheren Charakterisierung des RNASET2 Wildtypproteins und der identifizierten RNASET2 Mutanten begonnen. Die Generierung und Charakterisierung eines RNASET2 defizienten Mausmodells ist geplant.

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

- **Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden,**

- Keine -

- **Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste,**

Die in PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed) gelistete für das Projekt relevante Fachliteratur fand Verwendung. Darüber hinaus wurde das Standardwerk "van der Knaap MS & Valk J. Magnetic Resonance of Myelination and Myelin Disorders, 3rd ed. (Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2005) herangezogen. Für das Projekt relevante biomedizinische und molekularbiologische Informationen wurden in erster Linie über das National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bezogen.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Das vorliegende Projekt wurde in Zusammenarbeit zwischen der Abteilung Pädiatrie II mit Schwerpunkt Neuropädiatrie der Georg August Universität Göttingen und dem Institut für Humangenetik der Universität Bonn durchgeführt. Die auf Microarray-Experimenten basierte Transkriptomanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Transkriptomanalyselabor der Georg August Universität Göttingen (Leukonet Teilprojekt 8).

II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele,

Identifikation des positionellen Krankheitsgens im Kopplungsintervall auf 6q26-6q27

In den internationalen Datenbanken fanden sich für den von uns identifizierten Kopplungsbereich auf Chromosom 6q 46 RefSeq-Gen-Einträge. Wir wählten ein positionelles Kandidatengen-Verfahren, in dem die Kandidatengene aufgrund ihrer soweit bekannten zellulären Funktion priorisiert wurden. Dem *Quaking (HQB-)* Gen kam dabei aufgrund seiner beeinträchtigten Funktion in einer natürlich auftretenden Mausmutante mit phänotypisch schwerer Dysmyelinisierung des zentralen Nervensystems ganz besondere Bedeutung zu. Trotz umfangreicher Re-Sequenzierungen innerhalb des HQB-Gens (sämtliche exonischen, intronischen Gen-Bereiche, 3' und 5' UTR-Abschnitte) an betroffenen Patienten und entsprechenden Kontrollen konnten keine pathogenetisch relevanten Mutationen nachgewiesen werden. In RT-PCR Analysen zeigten sich keine signifikanten

Unterschiede im Expressionsprofil des HQK-Gens zwischen den vier betroffenen Personen der beiden Indexfamilien und entsprechender Kontrollen, so dass das HQK-Gen als Krankheitsgen sicher ausgeschlossen werden konnte. Es erfolgten daraufhin Re-Sequenzierungen weiterer aussichtsreicher Kandidatengene der Linkageregion. Hierbei konnten schließlich bei den vier Betroffenen der beiden Indexfamilien zwei unterschiedliche Mutationen des *RNASET2* Gens nachgewiesen und damit ein die Erkrankung verursachendes Gen identifiziert werden. Weitere der 24 rekrutierten Patienten mit CLminusM wurden im Folgenden auf Mutationen des *RNASET2* Gens untersucht. Hierbei konnten bei drei von 19 Patienten pathogenetisch relevante Sequenzalterationen identifiziert werden, was für eine genetisch heterogene Ätiologie der CLWM spricht.

Auf Microarray-Experimenten basierte Transkriptomanalyse

In Kooperation mit dem hiesigen Transkriptomanalyselabor (Leukonet Teilprojekt 8) wurde an beiden CLminusM Indexfamilien eine auf Microarray-Experimenten basierte Transkriptomanalyse, die alle bekannten Transkripte der Kopplungsregion auf Chromosom 6q erfassen sollte, durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression des *RNASET2* Gens bei den vier Betroffenen im Vergleich zu gesunden Familienmitgliedern. Entsprechende RT-PCR Analysen konnten diese mutationsbedingte verminderte Expression des *RNASET2* Gens bestätigen und somit die pathogenetische Relevanz der identifizierten *RNASET2* Mutationen zeigen.

Charakterisierung des *RNASET2* Wildtypproteins und der identifizierten *RNASET2* Mutanten

Das *RNASET2* Gen kodiert das sekretorische Glykoprotein RNASET2, das einzige bekannte menschliche Mitglied innerhalb der Rh/T2/S Familie von Ribonucleasen bzw. sauren Hydrolasen. Die physiologischen Funktionen einzelner Mitglieder dieser Proteinfamilie sind sehr unterschiedlich und hängen sehr von der jeweiligen Spezies ab. Bislang ist abgesehen von einer nachgewiesenen enzymatischen Aktivität als RNase und einer zugeschriebenen Rolle in der Tumor- und Angiogenese sehr wenig über die Funktion des RNASET2 Proteins bekannt, insbesondere ist seine Bedeutung für die Gehirnentwicklung und Myelinisierung des ZNS unklar. Daher haben wir inzwischen mit einer weiterführende Charakterisierung der RNASET2 assoziierten CLminusM begonnen:

- (i) Ein polyklonaler Antikörper gegen das RNASET2 Wildtypprotein wurden im Kaninchen hergestellt.
- (ii) Das RNASET2 Wildtypprotein und eine RNASET2 Missense Mutante wurden in der Hefe *Pichia pastoris* sowie in HEK293 Zellen exprimiert. In beiden Modellsystemen zeigte sich in Proteinfärbungen und Immunoblots ein Sekretionsdefekt der Mutante im Vergleich zum Wildtypprotein.
- (iii) In RNase-Aktivitäts-Assays konnte eine deutliche enzymatische Aktivität der in (ii) exprimierten und nach extrazellulär sekretierten RNASET2 Wildtypproteine nachgewiesen werden.
- (iv) Mittels RT-PCR Analysen wurde das natürliche Profil der *RNASET2* Expression in unterschiedlichen Regionen des menschlichen Gehirns untersucht. Hierbei zeigte sich eine relativ höhere Expression in fetalem Gehirn sowie im Bereich des Temporallappens.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Insgesamt wurden 28 Patienten, die die Kriterien zur Diagnose der CLminusM erfüllen, rekrutiert und phänotypisch charakterisiert. Vier dieser Patienten gehören den beiden konsanguinen Indexfamilien an, in denen die genomweiten Kopplungsanalysen durchgeführt wurden. Nach Identifikation des *RNASET2* Gens als die Erkrankung in den Indexfamilien verursachendes Gen erfolgten Mutationsanalysen des *RNASET2* Gens an weiteren 19 zuvor rekrutierten Patienten mit CLminusM.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Die CLminusM ist als umschriebene Krankheitsentität definiert. Bislang war kein die Erkrankung verursachender Gendefekt bekannt. Für einen Teil der Patienten mit CLminusM konnte nun das *RNASET2* Gen als Krankheitsgen identifiziert werden. Dies ist zum einen von großer persönlicher Bedeutung für die betroffenen Patienten und Familien, insbesondere auch in Hinblick auf eine nun mögliche präzise humangenetische Familienberatung. Zum anderen ergeben sich hieraus bedeutende neue grundlagenwissenschaftliche Erkenntnisse zur Gehirnentwicklung und zum Myelinstoffwechsel. Die im Rahmen des Teilprojektes geleisteten Arbeiten bilden die Grundlage zukünftiger Untersuchungen zur *RNASET2* und zu der mit ihr assoziierten Erkrankung mit dem Ziel der Entwicklung möglicher therapeutischer Interventionsstrategien.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans,

Das Projekt ist erfolgreich verlaufen. Es konnte ein der CLminusM zugrunde liegendes Krankheitsgen identifiziert werden. Eine wissenschaftliche Anschlussfähigkeit des Projektes ist gegeben. Die Ergebnisse bilden den Ausgangspunkt für zukünftige grundlagenwissenschaftliche Fragestellungen und zur Entwicklung von Therapieansätzen. Eine wirtschaftliche Anschlussfähigkeit ist aufgrund der Seltenheit der Erkrankung nicht zu erwarten.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

- keine -

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

- Henneke M, Rüschemann F, Thiele H, Nürnberg P, Gärtner J (2004): Cystic Leukoencephalopathy without megalencephaly – clinical and molecular characterisation. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 27, 248A.
- Henneke M, Rüschemann F, Thiele H, Nürnberg P, Gärtner J (2004): Clinical and molecular characterisation of leukodystrophies with unknown defects. *Eur. J. Pediatr.*, 162, R5A.
- Henneke M, Preuss N, Engelbrecht V, Aksu F, Bertini E, Bibat G, Brockmann K, Hübner C, Mayer M, Mejaski-Bosnjak V, Naidu S, Neumaier-Probst E, Rodriguez D, Weisz W, Kohlschütter A, Gärtner J (2005): Cystic leukoencephalopathy without megalencephaly: a distinct disease entity in 15 children. *Neurology* 64:1411-1416.
- Henneke M, Diekmann S, Ohlenbusch A, Kaiser J, Engelbrecht V, Kohlschütter A, Krätzner R, Madruga-Garrido M, Mayer M, Opitz L, Rodriguez D, Rüschemann F, Schumacher J, Thiele H, Thoms S, Steinfeld R, Nürnberg P, Gärtner J (2009): *RNASET2* deficient cystic leukoencephalopathy resembles congenital cytomegalovirus brain infection. *In Revision*.

Schlussbericht zu Nr. 3.2

Prof. Klaus-Armin Nave, PhD
Max Planck Institut für Experimentelle Medizin
Hermann Rein Strasse 3
37075 Göttingen
0551 – 3899757
nave@em.mpg.de
<http://www.em.mpg.de>

I. Kurze Darstellung zu Teilprojekt 7:

Mausmodelle des Pelizaeus-Merzbacher Syndroms (PMD): genetische und proteomische Analysen zum Pathomechanismus

1. Aufgabenstellung

Analyse von Mausmodellen der Leukodystrophie Pelizaeus-Merzbacher Krankheit (PMD) mit transgenen und proteomischen Techniken.

- Projekt 1: Proteolipide PLP und M6B: neue Mausmodelle der PMD
- Projekt 2: Das Myelinproteom der Maus
- Projekt 3: Proteomische Veränderungen im Myelin PLP-defizienter Mäuse
- Projekt 4: Eine mögliche Rolle für SIRT2 in Myelinerkrankungen
- Projekt 5: Etablierung und Analyse eines neuen Mausmodells der X-ALD

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das geförderte Vorhaben wurde in der Abteilung Neurogenetik am MPI für Experimentelle Medizin (Göttingen) im Rahmen einer Masters-Arbeit, einer Promotionsarbeit und der durch Leukonet geförderten Tätigkeit eines wissenschaftlichen Mitarbeiters (Postdoktorand) durchgeführt.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt ist wie geplant und ursprünglich beantragt im Labor umgesetzt worden. Die ursprüngliche Planung wurde den erzielten experimentellen Ergebnissen entsprechend angepasst.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde:

a) Bekannte Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden

Alle durchgeführten Experimente beruhen auf publizierten Verfahren der Mausgenetik und neuropathologischen Analyse, sowie der Proteomanalyse. Plasmide und Vektorkonstruktionen waren frei verfügbar und verletzt, da sie nur im Rahmen der Grundlagenforschung eingesetzt wurden, keine Schutzrechte Dritter.

b) Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Die Max Planck Gesellschaft hat umfangreichen Zugang zur wissenschaftlichen Fachliteratur (online und Printmedien). Artikel mit Relevanz für das geförderte Vorhaben wurden durch manuelle und automatisierte Suche in der Pubmed (MyNCBI) und regelmäßiges Abfragen der Inhalte ausgewählter Fachzeitschriften (electronic tables of content) identifiziert und können benannt werden.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die regelmässigen Treffen der Mitglieder des Leukonet Netzwerks tragen erheblich dazu bei, klinische und Grundlagenforschung an Leukodystrophien einander anzunähern. Insbesondere ist die persönliche Diskussion von Ergebnissen der Charakterisierung von Tiermodellen mit den Pädiatern, die regelmässig Patienten betreuen von grosser Relevanz. Unter den Leukonet-Partnern bearbeiten wir derzeit aktiv mit Professor Jutta Gärtner (Göttingen), Dr. Matthias Eckhardt und Professor Volkmar Gieselmann (Bonn) gemeinsame wissenschaftliche Projekte. Darüber hinaus unterhält die Abteilung Neurogenetik des MPI für Experimentelle

Medizin umfangreiche Zusammenarbeiten mit wissenschaftlichen Arbeitsgruppen im In- und Ausland. Wichtigste Kooperationspartner für die Grundlagenforschung an Leukodystrophien sind Professor Jens Frahm (Göttingen), Professor Johannes Berger (Wien, Österreich), Professor Odile Boespflug-Tanguy (Clermont-Ferrand, Frankreich) und Professor Ian R. Griffiths (Glasgow, UK). SIRT2-nullmutante Mäuse wurden von Professor Lenny Guarente (Boston, USA) zur Verfügung gestellt. Innerhalb des Instituts arbeiten wir sehr eng mit der Arbeitsgruppe Proteomik (Dr. O. Jahn) zusammen.

II. Eingehende Darstellung

1. der erzielten Ergebnisse

a) Projekt 1: Proteolipide PLP und M6B: neue Mausmodelle des PMD

Die hypomyelinisierende Leukodystrophie Pelizaeus-Merzbacher Syndrom (PMD) beruht auf Überexpression oder verschiedenen Punktmutationen des abundantesten Proteins im ZNS Myelin, Proteolipid Protein (PLP). Andere Punktmutationen, die nicht die Transmembrandomänen betreffen, oder Deletionen, verursachen die allelische, mildere PMD-Variante spastische Paraplegie (Typ2, SPG-2). Wir haben Mausmodelle hergestellt, die das phänotypische Spektrum von der axonalen Degeneration bei SPG-2-Patienten bis zur Dysmyelinisierung bei PMD abbilden (Klugmann et al., Neuron 1997; Readhead et al., Neuron 1994). Vergleichbar mit SPG-2 Patienten bewirkt der vollständige Verlust von PLP auch in nullmutanten Mäusen (PLP^{null}) einen vergleichsweise milden Entwicklungsphänotyp, und erst alternde PLP^{null} Mäuse entwickeln spät einsetzende axonale Degeneration. Hingegen verursachen Punktmutationen und transgene Überexpression einen der PMD vergleichbaren schweren Krankheitsverlauf mit Dysmyelinisierung und frühem Tod. Dies führte zu den Annahmen, dass (1) PLP nicht essentiell für die normale Myelinbiogenese ist (Klugmann et al., Neuron 1997), (2) in eine neuroprotektive Funktion von Oligodendrocyten eingebunden ist (Griffiths et al., Science 1998) und (3) PLP-Punktmutationen oder Überexpression einen dominant-negativen Effekt auf andere, nicht identifizierte Proteine in Oligodendrocyten ausübt. Oligodendrocyten exprimieren neben PLP auch das homologe Proteolipid M6B. Die in diesem Projekt verfolgten Arbeitshypothesen waren, dass (1) PLP und M6B überlappende Funktionen in der Myelinbiogenese haben, (2) dass M6B die PLP-Defizienz in der Myelinbiogenese PLP-defizienter Patienten und Mäuse (partiell) kompensiert, und dass (3) mutantes PLP einen dominant-negativen Einfluss auf M6B ausübt, der die normale subzelluläre Lokalisierung von M6B und damit seine normale Funktion beeinträchtigt. Um diese Hypothesen zu testen, haben wir PLP^{null}*M6B^{null}-Doppelmutante Mäuse hergestellt und systematisch untersucht. Doppelmutante Mäuse sind motorisch stark beeinträchtigt und sterben spätestens im Alter von 6 Monaten. Ihre Myelinbiogenese wurde histologisch und elektronenmikroskopisch analysiert. M6B^{null}-Einzelmutanten sind vollständig myelinisiert (bei nur unwesentlichen ultrastrukturellen Abnormalitäten), ähnlich wie es bereits vorher für PLP^{null} Mäuse gezeigt wurde. Im Gegensatz dazu verbleiben PLP^{null}*M6B^{null}-Doppelmutanten erheblich dysmyelinisiert. Dies zeigt, dass Proteolipide für die vollständige ZNS-Myelinisierung notwendig sind und Funktionsverlust zumindest partiell kompensieren können, zumindest in PLP^{null} oder M6B^{null}-Einzelmutanten. Wir konnten auch zeigen, dass PLP^{null}*M6B^{null}-Doppelmutanten neuropathologisch und in ihrer axonalen Signalweiterleitung erheblich beeinträchtigt sind. Generalisiert stellt der Phänotyp der PLP^{null}*M6B^{null}-Doppelmutanten ein Intermediat zwischen PLP^{null}-Mäusen (als SPG-2-Modell) und Mäusen mit PLP-Punktmutationen oder Überexpression (als PMD-Modellen) dar. Mittels Überexpression in einer immortalisierten oligodendroglialen Zelllinie (Oli-neu) *in vitro* konnten wir zeigen, dass fluoreszenzmarkiertes, mutantes (nicht jedoch wildtypisches) PLP, einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisierung von M6B ausübt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der schwerere Phänotyp bei PLP-Punktmutationen relativ zu Nullmutationen, teilweise auf einen zusätzlichen Funktionsverlust von M6B zurückzuführen sein dürfte.

Auf der molekularen Ebene konnten wir zeigen, dass PLP und M6B Cholesterol-assoziierte Proteine sind, die in der gleichen CHAPS-unlöslichen Myelin-subfraktion angereichert sind. PLP^{null}-Myelin weist eine erstaunlich unveränderte Proteinzusammensetzung auf (siehe auch Projekt 3), ist aber in seinem Gehalt an Cholesterol stark reduziert. Diese Experimente wurden komplementiert mit *in vitro* Studien in transfizierten Gliazellen (Oli-neu), um die Assoziation der Proteolipide mit Cholesterol zu visualisieren. Hier zeigte sich auch, dass eine hochabundante Expression von Proteolipiden hinreichend ist, um zelluläres Fortsatzwachstum zu induzieren. Da die Verfügbarkeit von Membranständigem Cholesterol Geschwindigkeits bestimmend für die ZNS-Myelinbiogenese ist, schlagen wir vor, dass die oligodendroglialen Proteolipide PLP und M6B Cholesterol in der Membran als Voraussetzung der Myelinbiogenese anreichern. Allerdings ist nur PLP so abundant im ZNS-Myelin, dass es den Cholesterolgehalt im Myelin determiniert. Das Projekt wurde innerhalb der zweiten Förderperiode des Leukonet 2 weit gehend abgeschlossen und nun zur Veröffentlichung eingereicht (Werner HB, Krämer-Albers EM, Strenzke N, Saher G, de Monasterio-Schrader P, Möbius W, Ohno-Iwashita Y, Moser T, Griffiths IR, Nave KA (2009) A role for proteolipid proteins in recruiting cholesterol into myelin membranes. Genes & Development, zur Publikation eingereicht).

b) Projekt 2: Das Myelinproteom der Maus

Als Voraussetzung der systematischen Analyse der Proteinzusammensetzung des ZNS Myelins in Mausmodellen von Leukodystrophien (Projekt 3) haben wir systematisch die Proteine analysiert, die mit biochemisch aufgereinigtem, wildtypischen ZNS-Myelin assoziiert sind. Hierzu haben wir zweidimensionale Referenzkarten des Myelinproteoms mit zwei Methoden erstellt: (1) Separierung mittels konventioneller zweidimensionaler Gelelektrophorese mit isoelektrischer Fokussierung (IEF) in der ersten und SDS-PAGE in der zweiten Dimension, und (2) Separierung im Benzyltrimethyl-n-hexadecylammonium chlorid (16-BAC)-Gel in der ersten und SDS-PAGE in der zweiten Dimension. Die Identifizierung der Proteine in den spots durch Massenspektroskopie erreichte eine Effizienz von über 92%. Im Vergleich zu 2D-IEF/SDS-PAGE verbesserte 2D-16-BAC/SDS-PAGE die Darstellbarkeit von Myelinproteinen mit ungewöhnlichen biochemischen Eigenschaften, insbesondere sehr hydrophober Proteine, die im Myelin besonders abundant sind. Die Kombination beider Techniken erlaubte das Erstellen des bisher umfangreichsten Kompendiums von 162 nichtredundanten, mit ZNS Myelin assoziierten Proteinen, das in der zweiten Förderperiode veröffentlicht wurde (Werner et al., 2007).

c) Projekt 3: Proteomische Veränderungen im Myelin PLP-defizienter Mäuse

Zur systematischen Analyse der Myelinproteinkomposition in Leukodystrophie-Modellen haben wir die Technik der zweidimensionalen differentiellen Fluoreszenzintensitätsgelelektrophorese (2D-DIGE) für die Anwendung am Myelin adaptiert. Ein typisches Projekt umfasst (1) die Präparation der Gehirne, (2) biochemische Aufreinigung von Myelin mittels sequentieller Ultrazentrifugation im Sucrosegradienten, (3) Evaluierung der Proteinkonzentrationen, (4) eindimensionale SDS-PAGE Testgradientengele mit Silber- und Coomassie-Färbungen, (5) ein konventionelles 2D-IEF/SDS-PAGE Testgel mit Coomassiefärbung pro Genotyp, (6) vier 2D-DIGE-IEF/SDS-PAGE Gele inklusive Farbstoffwechsel, (7) Ausstechen der spots, (8) im-Gel Verdau, und (9) massenspektrometrische Proteinidentifizierung. Das System wurde erfolgreich verwendet, um die ZNS Myelinfraktion von PLP^{null} Mäusen, dem Mausmodell der vergleichsweise milden PMD-Variante SPG-2 zu analysieren. In diesem Experiment konnten wir zeigen, dass definierte molekulare Abnormalitäten des PLP^{null} Myelinproteoms der axonalen Degeneration vorausgehen. Das Ergebnis wurde in der zweiten Förderperiode veröffentlicht (Werner et al., 2007). Die Technik der differentiellen Myelinproteomanalyse wird in der dritten Förderperiode in Kooperationen auf weitere Leukodystrophie-Modelle angewandt, auch innerhalb des Leukonet. Um eine Applikation bei stark hypomyelinisierten Mäusen oder Patientenmaterial realistisch erscheinen zu lassen, musste der anfänglich sehr hohe Materialbedarf (aufgereinigtes Myelin mit einem Proteinäquivalent von 3 mg) optimiert werden. Inzwischen haben wir einen Bedarf von ca. 1.2 mg Proteinäquivalent für ein typisches Projekt erreicht und begonnen, das humane Myelinproteom zu analysieren, zunächst an bei Aneurysma-Operationen gewonnener subkortikaler weisser Substanz.

d) Projekt 4: Eine mögliche Rolle für SIRT2 bei Myelinerkrankungen

Der auffälligste Befund der differentiellen Myelinproteomanalyse (Projekt 3) war Nichtdetektierbarkeit von Sirtuin 2 (SIRT2) im PLP^{null} Myelin. SIRT2 ist eine NAD⁺-abhängige Proteindeacetylase unbekannter Funktion *in vivo*. Wir konnten zeigen, dass SIRT2 in allen Entwicklungsstadien der Oligodendrocyten exprimiert und – in Abhängigkeit von PLP – ins ZNS Myelin inkorporiert wird. Die Assoziierung von SIRT2 mit dem Myelin des peripheren Nervensystems (PNS) ist von PLP unabhängig. Acetylierung stellt eine reversible posttranslationale Modifikation etlicher Proteine in Säugetieren dar, und alle acetylierten Myelinproteine (α -tubulin, MBP, MOG, und weitere nicht-identifizierte Proteine niedriger Abundanz) sind potentielle Substrate von SIRT2. Die Aktivierung der enzymatischen Funktion von oligodendroglialem SIRT2 durch erhöhte axonale NAD⁺-Konzentration könnte die Entfernung von Acetylresten von Myelinproteinen und damit Änderungen ihres Ladungsmusters und ihrer Funktion bewirken. Wir spekulieren, dass der PLP-abhängige Transport von SIRT2 ins ZNS-Myelin eine Voraussetzung für eine dynamische Reaktion von Oligodendrozyten auf Änderungen der NAD⁺-Konzentration in der weissen Substanz darstellt, die notwendig für deren Rolle in der langfristigen Aufrechterhaltung axonaler Integrität sein könnte. Erste Ergebnisse wurden in der zweiten Förderperiode des Leukonet veröffentlicht (Werner et al., 2007). Wir folgen dieser Arbeitshypothese in der dritten Förderperiode mit Experimenten, die auch die Analyse von SIRT2^{null} Mäusen umfassen, die von Maria Carla Motta und Lenny Guarente (MIT, Boston, USA) zur Verfügung gestellt wurden.

e) Projekt 5: Etablierung und Analyse eines neuen Mausmodells der X-ALD

In der ersten Phase der Leukonet-Förderung (Leukonet 1) haben wir eine neue Mauslinie hergestellt und charakterisiert, in der der peroxisomale Biogenesefaktor PEX5 selektiv in Oligodendrocyten ausgeschaltet wurde (CNP^{Cre/+*}PEX5^{flox/flox}). Während der zweiten Phase (Leukonet 2) wurde die Erstbeschreibung der neuen Linie mit der Publikation abgeschlossen (Kassmann et al., 2007). Kurzgefasst stellt der durch Peroxisomen-defiziente Oligodendrocyten induzierte Phänotyp mit axonaler Degeneration, sekundärer Inflammation, und der Invasion von B-Zellen und aktivierten T-Zellen ein sehr exaktes Modell der Pathologie der cerebralen X-ALD dar. Ebenso wie die X-ALD Patienten weist auch die neue Mauslinie Ataxie, Tremor, und frühzeitigen Tod auf, während das bereits vorher verfügbare, genetisch exaktere Modell (ABCD1^{null} Mäuse) die mildere Verlaufsform der Adrenomyeloneuropathie (AMN) ohne inflammatorische Komponente modelliert. Peroxisomen sind also

wichtige zelluläre Mediatoren der essentiellen neuroprotektiven Funktion der Oligodendrocyten, deren Relevanz bei demyelinisierenden Erkrankungen des Menschen und in entsprechenden Mausmodellen offenbar wird. Folgeprojekte unter Verwendung der CNP^{Cre/+*}PEX5^{flox/flox} Mauslinie werden, mit Finanzierung durch die EU, ausserhalb des Rahmens des Leukonet durchgeführt.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmässigen Nachweises

12.000 E Herstellungskosten für transgene Mäuse
(Kultur, Expansion, Karyotypisierung & Blastozysteninjektion embryonaler Stammzellen)

24.000 E Tierhaltung in Hochsicherheitsbarrieren

36.000 E

Reisekosten (500 E) wurden verwendet, um eine Präsentation und Diskussion der Ergebnisse bei der Cold Spring Harbor Laboratory Konferenz „Glia in Health and Disease“ (Juli 2008) teilzufinanzieren.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Experimente waren notwendig und angemessenen um die gesetzten Ziele zu erreichen.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Eine Modulation der Enzymaktivität von SIRT2 könnte möglicher Weise eine neuroprotektive Strategie darstellen. Die wirtschaftliche Verwertbarkeit ist jedoch erst realistisch abzuschätzen, wenn die Relevanz von SIRT2 in der Aufrechterhaltung axonaler Integrität vollständig geklärt ist. Modulatoren der Enzymaktivität von Deacetylasen der Sirtuin-Proteinfamilie existieren, wurden aber unseres Wissens bisher nicht im Hinblick auf eine mögliche Verwendung in Zellen des ZNS getestet.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen:

In der Myelinproteomanalyse wurde die Verwendung von Cetyltrimethylammonium-bromid (CTAB)-Gelen in der ersten Dimension der zweidimensionalen Auftrennung beschrieben (Yamaguchi et al., J Neurosci Res. 2008; 86:755-65). Nach unseren Erfahrungen sind CTAB und 16-BAC für diese Anwendung weit gehend äquivalent.

Unabhängig von unserer Studie (Werner et al., 2007) wurde SIRT2 als in Oligodendrozyten experimentiertes Protein beschrieben (Southwood et al., 2007, Neurochem Res 32:187-95), dass die Motilität von Cytoskelettelementen kontrolliert (Li et al., 2007, J Neurosci 27:2606-16).

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

a) Erschienene Originalarbeiten mit Relevanz für das Leukonet (2006-2008)

Werner HB, Kuhlmann K, Shen S, Uecker M, Schardt A, Dimova K, Orfaniotou F, Dhaunchak A, Brinkmann BG, Möbius W, Guarente L, Casaccia-Bonnel P, Jahn O, Nave KA (2007) Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. J Neurosci 27, 7717-7730

Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HB, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahm J, Nave KA (2007) Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. Nat Genet 39, 969-976

Dhaunchak AS, Nave KA (2007) A common mechanism of PLP/DM20 misfolding causes cysteine-mediated endoplasmic reticulum retention in oligodendrocytes and Pelizaeus-Merzbacher disease. Proc Natl Acad Sci USA 104, 17813-17818

Schardt A, Brinkmann BG, Mitkovski M, Sereda MW, Werner HB, Nave KA (2009) The SNARE protein SNAP-29 interacts with the GTPase Rab3A: Implications for membrane trafficking in myelinating glia. J Neurosci Res [Epub ahead of print]

Corbeil D, Joester A, Fargeas CA, Jászai J, Garwood J, Hellwig A, Werner HB, Huttner WB (2008) Expression of distinct splice variants of the stem cell marker prominin-1 (CD133) in glial cells. Glia [Epub ahead of print]

Buser AM, Erne B, Werner HB, Nave KA, Schaeren-Wiemers N (2008) The septin cytoskeleton in myelinating glia. Mol Cell Neurosci [Epub ahead of print]

Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW, Garratt AN, Wende TH, Stassart RM, Nawaz S, Humml C, Velanac V, Radyuschkin K, Goebbels S, Fischer TM, Franklin RJ, Lai C, Ehrenreich H, Birchmeier C, Schwab MH, Nave

- KA (2008) Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59, 581-595
- Yin X, Kidd GJ, Nave KA, Trapp BD (2008) P0 protein is required for and can induce formation of schmidt-lantermann incisures in myelin internodes. *J Neurosci* 28, 7068-7073
- Ip CW, Kohl B, Kleinschnitz C, Reuss B, Nave KA, Kroner A, Martini R (2008) Origin of CD11b+ macrophage-like cells in the CNS of PLP-overexpressing mice: Low influx of haematogenous macrophages and unchanged blood-brain-barrier in the optic nerve. *Mol Cell Neurosci* 38, 489-494
- Chatterjee N, Stegmüller J, Schätzle P, Karram K, Koroll M, Werner HB, Nave KA, Trotter J (2008) Interaction of syntenin-1 and the NG2 proteoglycan in migratory oligodendrocyte precursor cells. *J Biol Chem* 283, 8310-7
- Leder C, Schwab N, Ip CW, Kroner A, Nave KA, Dornmair K, Martini R, Wiendl H (2007) Clonal expansions of pathogenic CD8+ effector cells in the CNS of myelin mutant mice. *Mol Cell Neurosci* 36, 416-424
- He Y, Dupree J, Wang J, Sandoval J, Li J, Liu H, Shi Y, Nave KA, Casaccia-Bonnel P (2007) The transcription factor yin yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron* 55, 217-230
- Karim SA, Barrie JA, McCulloch MC, Montague P, Edgar JM, Kirkham D, Anderson TJ, Nave KA, Griffiths IR, McLaughlin M (2007) PLP overexpression perturbs myelin protein composition and myelination in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Glia* 55, 341-351
- Ip CW, Kroner A, Crocker PR, Nave KA, Martini R (2007) Sialoadhesin deficiency ameliorates myelin degeneration and axonopathic changes in the CNS of PLP overexpressing mice. *Neurobiol Dis* 25, 105-111
- Kaga Y, Shoemaker WJ, Furusho M, Bryant M, Rosenbluth J, Pfeiffer SE, Oh L, Rasband M, Lappe-Siefke C, Yu K, Ornitz DM, Nave KA, Bansal R (2006) Mice with conditional inactivation of fibroblast growth factor receptor-2 signaling in oligodendrocytes have normal myelin but display dramatic hyperactivity when combined with Cnp1 inactivation. *J Neurosci* 26, 12339-12350
- Krämer-Albers EM, Gehrig-Burger K, Thiele C, Trotter J, Nave KA (2006) Perturbed interactions of mutant proteolipid protein/DM20 with cholesterol and lipid rafts in oligodendroglia: Implications for dysmyelination in spastic paraplegia. *J Neurosci* 26, 11743-11752
- Fitzner D, Schneider A, Kippert A, Möbius W, Willig KI, Hell SW, Bunt G, Gaus K, Simons M (2006) Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin. *EMBO J* 25, 5037-5048
- Thurnherr T, Benninger Y, Wu X, Chrostek A, Krause SM, Nave KA, Franklin RJM, Brakebusch C, Suter U, Relvas JB (2006) Cdc42 and Rac1 signaling are both required for and act synergistically in the correct formation of myelin sheaths in the CNS. *J Neurosci* 26, 10110-10119
- Ip CW, Kroner A, Bendszus M, Leder C, Kobsar I, Fischer S, Wiendl H, Nave KA, Martini R (2006) Immune cells contribute to myelin degeneration and axonopathic changes in mice overexpressing proteolipid protein in oligodendrocytes. *J Neurosci* 26, 8206-8216
- Benninger Y, Colognato H, Thurnherr T, Franklin RJM, Leone DP, Atanasoski S, Nave KA, French-Constant C, Suter U, Relvas JB (2006) Beta1-integrin signaling mediates premyelinating oligodendrocyte survival but is not required for CNS myelination and remyelination. *J Neurosci* 26, 7665-7673
- Rosenbluth J, Nave KA, Mierzwa A, Schiff R (2006) Subtle myelin defects in PLP-null mice. *Glia* 54, 172-182
- Fowler JH, Edgar JM, Pringle A, McLaughlin M, McCulloch J, Griffiths IR, Garbern JY, Nave KA, Dewar D (2006) Alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid-mediated excitotoxic axonal damage is attenuated in the absence of myelin proteolipid protein. *J Neurosci Res* 84, 68-77
- Yin X, Baek RC, Kirschner DA, Peterson A, Fujii Y, Nave KA, Macklin WB, Trapp BD (2006) Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin. *J Cell Biol* 172, 469-478
- Schweitzer J, Becker T, Schachner M, Nave KA, Werner H (2006) Evolution of myelin proteolipid proteins: Gene duplication in teleosts and expression pattern divergence. *Mol Cell Neurosci* 31, 161-177

b) Leukonet-relevante Übersichtsartikel

Nave KA (2008) Neuroscience: An ageing view of myelin repair. Nature 455, 478-479

Kassmann CM, Nave KA (2008) Oligodendroglial impact on axonal function and survival - a hypothesis. Curr Opin Neurol 21, 235-41

Nave KA, Trapp BD (2008) Axon-Glial Signaling and the Glial Support of Axon Function. Annu Rev Neurosci 31, 535-561

Trapp BD, Nave KA (2008) Multiple Sclerosis: An Immune or A Neurodegenerative Disorder? Annu Rev Neurosci 31, 247-69

c) Geplante weitere Veröffentlichungen von Ergebnissen der zweiten Förderperiode

Werner HB, Krämer-Albers EM, Strenzke N, Saher G, de Monasterio-Schrader P, Möbius W, Ohno-Iwashita Y, Moser T, Griffiths IR, Nave KA (2009) A role for proteolipid proteins in recruiting cholesterol into myelin membranes. Genes & Development, submitted.

Schlussbericht

Sabine Grønborg (geb. Weller), Göttingen

Teilprojekt 8 „Screening und Analyse von sekundären metabolischen Effekten bei Patienten, denen funktionelle Peroxisomen fehlen (Zellweger Syndrom Spektrum)“

zu I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung:

Erbliche Defekte der Peroxisomenbiogenese führen zu einem Ausfall der meisten oder aller peroxisomalen Stoffwechselwege und zu einer schweren neurometabolischen Erkrankung, dem Zellweger Syndrom Spektrum (ZSS). Die Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt. Defekte in einem von 12 Proteinen, die an der Peroxisomenbiogenese beteiligt sind – sogenannte Peroxine – können das ZSS verursachen. Durch den Ausfall der peroxisomalen Stoffwechselwege fallen die Patienten biochemisch durch eine Akkumulation von überlangkettigen Fettsäuren, Gallensäuren-Vorstufen und Phytansäure auf. Die Patienten haben einen Mangel an Plasmalogenen, einem wichtigen Bestandteil aller Membranen. Die Verbindung zwischen dem Stoffwechseldefekt und dem zentralnervösen Phänotyp der Patienten mit neuronaler Migrationsstörung und Leukodystrophie ist unklar. Bisher ist es nicht gelungen die Entstehung des ZNS-Phänotyps bei ZSS-Patienten pathogenetisch zu erklären.

Ziel dieses Teilprojektes war die Identifizierung von sekundären Veränderungen im zellulären Stoffwechsel und in zellulären Signalwegen als Reaktion auf den Ausfall peroxisomaler Funktionen in Fibroblasten von ZSS-Patienten. Die Beschreibung solcher sekundärer Veränderungen in Zellen mit Defekten der Peroxisomenbiogenese bietet die Möglichkeit, die noch fehlende Verbindung zwischen dem bei ZSS-Patienten bestehenden Stoffwechseldefekt und der Entstehung des ZNS-Phänotyps aufzuklären.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:

Das Projekt wurde in der Abteilung Pädiatrie II der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Die Abteilung ist bundesweites Referenzzentrum für die Diagnostik und Behandlung von Patienten mit Peroxisomenbiogenesedefekten/ZSS. Unser Labor hat in den letzten 10 Jahren mehr als 50 Fibroblasten-Zelllinien mit Defekten der Peroxisomenbiogenese gesammelt und charakterisiert. Die für die Durchführung des Projekts notwendige Infrastruktur ist in der Abteilung (Stoffwechsellabor, Molekulargenetisches Labor) und innerhalb der Göttinger Neurowissenschaften (Transkriptomanalyselabor) vorhanden. Es besteht eine Kooperation zu den in Göttingen ansässigen Max-Planck-Instituten.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

In der gesamten Antragsperiode wurden weiterhin Patienten mit ZSS rekrutiert. Die Fälle wurden, wenn möglich, klinisch, radiologisch, laborchemisch und molekulargenetisch charakterisiert und validiert. Der zerebrale Phänotyp unserer Gruppe von ZSS-Patienten wurde durch die retrospektive Auswertung von Magnetresonanztomografiebildern des Gehirns bestimmt (1). Ausgewählte Fibroblasten-Zelllinien von ZSS-Patienten wurden dann zur Untersuchung möglicher sekundärer Veränderungen des zellulären Stoffwechsels verwendet. Zunächst wurden die Genexpressionsprofile in Hautfibroblasten-Linien von 4 Patienten mit ZSS und zerebralem Phänotyp sowie von 2 gesunden Probanden mit Hilfe einer Transkriptom-Analyse verglichen. Es fand sich eine auffällige Dysregulation für eine Gruppe von Glutamat-Transportern (EAAT1-3; EAAT: excitatory amino acid transporter), die sich auch mit Hilfe von quantitativer RealTime PCR bestätigen ließ. Im nächsten Schritt sollten Veränderungen des Glutamat-Transportes in ZSS-Fibroblasten biochemisch bestätigt werden. Wir etablierten ein Glutamat-Uptake-Assay unter Verwendung von Tritium-markiertem Glutamat und verglichen die Glutamat-Aufnahme in Zellen von zwei ZSS-Patienten und zwei gesunden Kontrollen. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion (6-fach) der Glutamat-Aufnahme in die ZSS-Fibroblasten in niedrigen Konzentrationsbereichen von Glutamat (0,1-1 μ M). Die genauere Charakterisierung der Transportunterschiede mit Hilfe

der Bestimmung der Zelltyp-spezifischen Km- und Vmax-Werte ist aktuell Gegenstand der Arbeiten. Die Veränderungen dieser Werte sollen Aufschluss über den dem gestörten Glutamat-Transport zugrunde liegenden Mechanismus geben und werden den Verlauf der nachfolgenden Experimente bestimmen. Der Glutamat-Transport soll auch in einer Mauslinie mit gestörter Peroxisomenbiogenese untersucht werden. Es konnte Keimbahnübertragung des mutierten *Pex1*-Lokus erreicht werden, allerdings wurden weiterhin keine homozygot mutanten *Pex1*^{-/-}-Mäuse generiert werden. Eine embryonale Letalität als Ursache dieses Phänomens konnte mittlerweile weitgehend ausgeschlossen werden. Eine zusätzliche, transgene Integration des Targeting-Vektors wird momentan als Ursache untersucht.

Parallel suchten wir in der Literatur nach Hinweisen auf weitere mögliche sekundäre Veränderungen des zellulären Stoffwechsels bei gestörter Peroxisomenbiogenese. Tatsächlich gibt es eine Vielzahl von Hinweisen darauf, dass Defekte der Peroxisomenbiogenese zu morphologischen und funktionellen Veränderungen der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums führen. Wir sammelten diesbezüglich Hinweise aus der Literatur und formulierten die Hypothese, dass diese sekundären Veränderungen einen Einfluss auf die Entstehung des ZSS-Phänotyps haben (2). Arbeiten zur experimentellen Bestätigung dieser Hypothese haben begonnen.

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

- **Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden,**

keine

- **Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste,**

Es wurde die in PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed) gelistete Fachliteratur zu Peroxisomenbiogenesedefekten, zu den Glutamat-Transportern EAAT1 – 3, zu neurodegenerativen Erkrankungen und zu sekundären organellären Veränderungen bei PBD beim Menschen und im Mausmodell verwandt. Ebenso ging das folgende Standardwerk ein: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS (2001). The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill, New York.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Die kooperierenden Wissenschaftler waren innerhalb der Göttinger Neurowissenschaften Dr. Jobst Landgrebe (ehemals Biochemie II) und Prof. Dr. Klaus-Armin Nave (Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin).

zu II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele,

Unser Labor konnte in den letzten 10 Jahren mehr als 50 Fibroblasten-Zelllinien mit Defekten der Peroxisomenbiogenese sammeln und die Patienten klinisch, radiologisch und laborchemisch charakterisieren. Die Patientenrekrutierung wurde in der Förderperiode fortgeführt. Die Informationen über den Phänotyp der Patienten und die zugehörigen Zelllinien haben wir für folgende Untersuchungen eingesetzt:

(i) Der zerebrale Phänotyp unserer Gruppe von ZSS-Patienten wurde durch die retrospektive Auswertung von Magnetresonanztomografiebildern des Gehirns bestimmt und dem klinischen und laborchemischen Phänotyp sowie dem Genotyp gegenübergestellt (1). Diese Arbeit gibt uns einen detaillierteren Überblick über die bei ZSS vorliegenden zerebralen Veränderungen.

(ii) Mittels Transkriptom-Analyse ausgewählter Fibroblasten-Zelllinien von ZSS-Patienten wurde versucht zelluläre Stoffwechsel- und Signalwege zu identifizieren, die in ZSS-Zellen

sekundär verändert sind. Zunächst wurden die Genexpressionsprofile in Hautfibroblasten-Linien von 4 Patienten mit ZSS und zerebralem Phänotyp sowie von 2 gesunden Probanden mit Hilfe einer Transkriptom-Analyse verglichen. Es fand sich eine auffällige Dysregulation für eine Gruppe von Glutamat-Transportern (EAAT1-3; EAAT: excitatory amino acid transporter), die sich auch mit Hilfe von quantitativer RealTime PCR bestätigen ließ. Glutamat ist der vorherrschende exzitatorische Neurotransmitter des ZNS und ein Überschuss im synaptischen Spalt kann über eine Aktivierung der NMDA- oder AMPA-Rezeptoren den Untergang von Neuronen verursachen (sog. Exzitotoxizität). EAAT1 (GLAST) und EAAT2 (GLT1a und GLT1b) sind vor allem in Gliazellen lokalisierte Glutamattransporter, die für eine rasche Aufnahmen von Glutamat aus dem synaptischen Spalt zuständig sind und damit u.a. eine wichtige Rolle bei der Vermeidung der Exzitotoxizität von Glutamat einnehmen. EAAT2 (EAAC1) hingegen ist selektiv neuronal lokalisiert. Funktionsveränderungen und -verlust der EAATs sind an einer Vielzahl verschiedener neurologischer/neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. der Amyotrophen Lateralsklerose oder der Spinozerebellären Ataxie beteiligt. Es sind verschiedene Mechanismen der Modulation der EAAT-Aktivität beschrieben. Hierzu zählen ein veränderter intrazellulärer Transport, Phosphorylierung, alternatives Splicing und Veränderungen des Expressionsmusters. Veränderungen im zellulären Glutamat-Transport wären somit eine äußerst interessante sekundäre Stoffwechselveränderung bei Zellweger-Patienten mit möglichen Implikationen für den zerebralen Phänotyp. Veränderungen der Lipidzusammensetzung der Plasmamembran und eine Misslokalisierung von EAATs wären eine mögliche Ursache vor dem Hintergrund der generalisierten peroxisomalen Stoffwechselstörung. Zur biochemischen Bestätigung einer Veränderung des Glutamat-Transports in ZSS-Fibroblasten etablierten wir ein Glutamat-Uptake-Assay unter Verwendung von Tritium-markiertem Glutamat und verglichen die Glutamat-Aufnahme in Zellen von zwei ZSS-Patienten und zwei gesunden Kontrollen. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion (6-fach) der Glutamat-Aufnahme in die ZSS-Fibroblasten in niedrigen Konzentrationsbereichen von Glutamat (0,1-1 μM). Die genauere Charakterisierung der Transportunterschiede mit Hilfe der Bestimmung der Zelltyp-spezifischen K_m - und V_{max} -Werte ist aktuell Gegenstand der Arbeiten. Die Veränderungen dieser Werte sollen Aufschluss über den dem gestörten Glutamat-Transport zugrunde liegenden Mechanismus geben.

(iii) Möglicherweise sekundär veränderte zelluläre Stoffwechsel- und Signalwege sollten im Verlauf in einer Mauslinie mit gestörter Peroxisomenbiogenese untersucht werden. Es gelang uns für den mutierten *Pex1*-Lokus Keimbahnübertragung zu erreichen und heterozygote Mäuse zu generieren. Allerdings wurden weiterhin keine homozygot mutanten *Pex1*^{-/-}-Mäuse geboren. Eine embryonale Letalität als Ursache dieses Phänomens konnte mittlerweile weitgehend ausgeschlossen werden. Eine zusätzliche, transgene Integration des Targeting-Vektors wird momentan als Ursache untersucht

(iv) Parallel suchten wir in der Literatur nach Hinweisen auf weitere mögliche sekundäre Veränderungen des zellulären Stoffwechsels bei gestörter Peroxisomenbiogenese. Tatsächlich gibt es eine Vielzahl von Hinweisen darauf, dass Defekte der Peroxisomenbiogenese zu morphologischen und funktionellen Veränderungen der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums führen. Auch die zellulären „stress response“-Kaskaden werden möglicherweise als Reaktion auf das Fehlen von Peroxisomen und die Akkumulation fehlgeleiteter peroxisomaler Proteine aktiviert. Wir sammelten diesbezüglich Hinweise aus der Literatur und formulierten die Hypothese, dass diese sekundären Veränderungen einen Einfluss auf die Entstehung des ZSS-Phänotyps haben (2). Arbeiten zur experimentellen Bestätigung dieser Hypothese haben begonnen.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Insgesamt konnten während der Projektlaufzeit von drei Jahren insgesamt 12 neue Patienten mit PBD rekrutiert werden. Der zerebrale Phänotyp von 18 ZSS-Patienten konnte retrospektiv anhand magnetresonanztomografischer Daten beschrieben werden (1).

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Pathogenese des ZSS, insbesondere des zentralnervösen Phänotyps, ist bis heute nur unzureichend verstanden. Eine klare Verbindung zwischen den beschriebenen biochemischen Auffälligkeiten der Patienten und der neuronalen Migrationsstörung sowie der bei einem Teil der Patienten entstehenden Leukodystrophie konnte nicht gezeigt werden. Sekundäre Veränderungen des Zellstoffwechsels bei ZSS-Patienten sind möglicherweise mitverantwortlich für die Entstehung des Phänotyps. Da aktuell keine kausalen Therapieansätze für das ZSS zur Verfügung stehen, sind Untersuchungen, die sich mit solchen sekundären, potentiell therapeutisch beeinflussbaren Veränderungen befassen, notwendig, um zukünftig therapeutische Ansätze für diese Erkrankungen entwickeln zu können. Die im Rahmen des Teilprojekts durchgeführten Arbeiten konnten hierzu einen Beitrag leisten.

3. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans,

Eine wissenschaftliche Anschlussfähigkeit der erzielten Ergebnisse in der Forschung ist gegeben. Die Ergebnisse können nach Abschluss der Untersuchung zu Mechanismen, die dem verminderten Glutamat-Transport zugrunde liegen, in die Entwicklung möglicher therapeutischer Ansätze, zunächst im Tiermodell, eingeschlossen werden. Eine wirtschaftliche Anschlussfähigkeit ist aufgrund der Seltenheit der Krankheit nicht zu erwarten.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen, keine

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

ORIGINALARBEITEN

1. **Weller S**, Rosewich H, Gärtner J (2008): Cerebral MRI as a valuable diagnostic tool in Zellweger spectrum patients. J Inher Metab Dis 31: 270-280
2. Thoms S, **Grønborg S**, Gärtner J (eingereicht 2009): Organelle interplay in peroxisomal disorders. Trends Mol Med

Leukonet II Abschlußbericht

Oct. 2006 - Sep. 2008

Teilprojekt 9

PD Dr. M. Eckhardt/Prof. Dr. V. Gieselmann

Institut für Physiologische Chemie, Universität Bonn

Metachromatic leukodystrophy and Krabbe disease: Inhibition of substrate synthesis as a therapeutic concept, mutation analysis and development of a new genotyping method

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Die Metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine, autosomal rezessiv vererbare, lysosomale Speichererkrankung [1]. Bei diesen Erkrankungen kommt es, aufgrund von spezifischen Enzymdefekten, zur Akkumulation von Substraten in den Lysosomen. Die MLD beruht auf einem genetischen Defekt des Arylsulfatase A (ASA)-Gens oder, seltener, auf einem Defekt im Saposin-Gen, das für das Aktivatorprotein Saposin B (SapB), dessen Anwesenheit für die Funktion der ASA essentiell ist. Ausfall der ASA-Aktivität führt zur Speicherung des Sphingolipids Sulfatid (3-O-Sulfogalactosylceramid), einem wichtigen Bestandteils des Myelins. ASA-defiziente Mäuse sind ein etabliertes Tiermodell der MLD [2].

Die Sulfatidspeicherung verursacht, über bisher nicht verstandene Mechanismen, eine zunehmende Demyelinisierung im zentralen und peripheren Nervensystem. Diese geht mit verschiedenen neurologischen Symptomen einher. Eine Therapie dieser Erkrankung ist bisher nicht möglich. Therapieversuche mittels Gentherapie und Enzymersatztherapie werden zur Zeit durchgeführt. Einen alternativen Therapieansatz stellt die sogenannte Substratreduktionstherapie dar. Bei diesem Verfahren, dessen prinzipielle Durchführbarkeit an Tiermodellen für Tay-Sachs- und Sandhoff-Erkrankung nachgewiesen wurde, wird die Synthese des bei der Erkrankung akkumulierenden Substrates durch spezifische Enzyminhibitoren gehemmt [3,4]. Um dieses Ziel für die MLD zu erreichen, ist daher die Identifizierung eines Inhibitors für die Cerebrosid-Sulfotransferase, dem Sulfatid-synthetisierenden Enzyms, notwendig.

Obwohl die Sulfatidspeicherung in Myelin-bildenden Zellen, bzw. in Microgliazellen, die Myelinreste durch Phagozytose aufnehmen, am ausgeprägtesten ist, findet sich auch in anderen Zelltypen (Neuronen, Astrocyten) eine deutliche Sulfatidspeicherung. Inwieweit die Sulfatidspeicherung in den nicht myelinisierenden Zellen für die Pathologie der Erkrankung mit verantwortlich ist, ist bisher weitgehend unbekannt. Vor diesem Hintergrund sollten deshalb in diesem Teilprojekt die Konsequenzen einer verstärkten Sulfatidakkumulation in spezifischen Zelltypen (Myelin-bildenden Zellen bzw. Neuronen) untersucht werden.

2. Voraussetzungen

Zu den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zu diesem Projekt gehören insbesondere die Etablierung einer Reihe von Mausmodellen der Metachromatischen Leukodystrophie (MLD). Als Voraussetzung zur Durchführung des Vorhabens standen die notwendigen zellbiologisch, molekularbiologischen und biochemischen Methoden zur Untersuchung neuer ASA-Mutationen und deren funktionellen Auswirkungen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

Als wesentliche Voraussetzung der Arbeiten ist eine ASA-defiziente Maus zu nennen, die als Tiermodell der MLD dient. Ein demyelinisierendes Mausmodell der MLD war bisher nicht verfügbar. Es waren daher in unserer Arbeitsgruppe verschiedene transgene Mauslinien generiert wurden, von denen eine verstärkte Sulfatidspeicherung und damit möglicherweise eine Verstärkung der Symptome zu erwarten waren. Des Weiteren waren die

neuen transgenen Mauslinien so entworfen worden, dass ein Zelltyp-spezifische Verstärkung der Sulfatidspeicherung erzielt werden konnte, womit die Bedeutung von neuronaler bzw. glialer Sulfatidspeicherung für die Pathogenese der MLD in Zukunft untersucht werden kann.

Desweiteren konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die normalerweise Membran-gebundene Cerebrosid-Sulfotransferase (CST) als aktives lösliches Enzym exprimiert werden kann.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben wurde weitgehend entsprechend der im Projektantrag beschriebenen Planung durchgeführt. Beim Ablauf ergab sich bei der Expression der löslichen Cerebrosid-Sulfotransferase, dass es mit zunehmender Expressionshöhe des Enzyms zu einer zunehmenden intrazellulären Akkumulation des Proteins (im endoplasmatischen Retikulum) und damit zur verminderten Sekretion kommt. Der Ablauf des Projektes wurde daher dahingehend modifiziert, dass zunächst die subzelluläre Sortierung der CST genauer untersucht werden sollte, um den ungewöhnlich ineffizienten Export aus dem endoplasmatischen Retikulum besser zu verstehen. Bezüglich des Teilprojektes zur Expression der CGT konnte das Vorhaben nicht weitergeführt werden, da sich herausstellte, dass die Expression einer enzymatisch aktiven, aber nicht membrangebundenen Form der CGT nicht möglich war. Die Untersuchungen an neuen transgenen Mausmodellen der MLD wurden entsprechend der Planungen des Projektantrages durchgeführt.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Projektbeginn

Diverse transgene Mausmodelle der MLD waren vor Projektbeginn generiert worden, aber noch nicht intensiv untersucht worden. Konventionelle ASA-defiziente Mäuse (d.h. ohne transgene Überexpression der Sulfatid-synthetisierenden Enzyme CGT bzw. CST) waren in früheren Projekten intensiv untersucht worden [5-13], und die dabei erhaltene Ergebnisse konnten somit als Referenz für die Untersuchungen der neuen transgenen MAusmodelle genutzt werden. Zu Beginn des Projektes lagen diverse Plasmidkonstrukte für die Expression von löslichen Varianten der CST vor. Für die Durchführung des Projektes wurden Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie eingesetzt. Die entsprechenden Materialien und Geräte standen im Institut zur Verfügung.

Informations- und Dokumentationsdienste

Die zur Durchführung des Projektes notwendigen Informations-Recherchen erfolgten weitgehend über das Internet zugänglichen Literaturdatenbanken (insbesondere: PUBMED "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>" der U.S. National Library of Medicine und der National Institutes of Health der USA).

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Histologische Untersuchungen und Verhaltensstudien an Mäusen wurden in Kooperationen mit dem Institut für Anatomie der Universität Kiel (Prof. Dr. R. Lüllmann-Rauch) bzw. mit der Universität Leuven (Prof. Dr. R. D'Hooge) durchgeführt.

Literaturangaben

1. von Figura, K., Gieselmann, V., Jaeken, J. (2001) Metachromatic leukodystrophy. In: The metabolic and molecular basis of inherited disease. Eds.: Scriver, Beaudet, Valle, Sly Mc Graw Hill, New York, eighth edition, chapter 148, 3695-3724
2. Hess, B., Saftig, P., Hartmann, D., Coenen, R., Lüllmann-Rauch, R., Goebel, H., Evers, M., von Figura, K., D'Hooge, R., Nagels, G., DeDeyn, P., Peters, C., Gieselmann, V. (1996) Phenotype of arylsulfatase A deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 14821-14826

3. Jeyakumar, M., Butters, T. D., Cortina-Borja, M., Hunnam, V., Proia, R. L., Perry, V. H., Dwek, R. A., Platt, F. M. (1999) Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 6388-6393
4. Dwek, R. A., Butters, T. D., Platt, F. M., Zitzmann, N. (2002) Targeting glycosylation as a therapeutic approach. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 65-75
5. Gieselmann V, Matzner U, Hess B, Lüllmann-Rauch R, Coenen R, Hartmann D, D'Hooge R, DeDeyn P, Nagels G. Metachromatic leukodystrophy: molecular genetics and an animal model. *J Inherit Metab Dis*. 1998 Aug;21(5):564-74.
6. D'Hooge R, Hartmann D, Manil J, Colin F, Gieselmann V, De Deyn PP. Neuromotor alterations and cerebellar deficits in aged arylsulfatase A-deficient transgenic mice. *Neurosci Lett*. 1999 Oct 1;273(2):93-6.
7. D'Hooge R, Coenen R, Gieselmann V, Lüllmann-Rauch R, De Deyn PP. Decline in brainstem auditory-evoked potentials coincides with loss of spiral ganglion cells in arylsulfatase A-deficient mice. *Brain Res*. 1999 Nov 20;847(2):352-6.
8. D'Hooge R, Van Dam D, Franck F, Gieselmann V, De Deyn PP. Hyperactivity, neuromotor defects, and impaired learning and memory in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Brain Res*. 2001 Jul 13;907(1-2):35-43.
9. Coenen R, Gieselmann V, Lüllmann-Rauch R. Morphological alterations in the inner ear of the arylsulfatase A-deficient mouse. *Acta Neuropathol*. 2001 May;101(5):491-8.
10. Schott I, Hartmann D, Gieselmann V, Lüllmann-Rauch R. Sulfatide storage in visceral organs of arylsulfatase A-deficient mice. *Virchows Arch*. 2001 Jul;439(1):90-6.
11. Wittke D, Hartmann D, Gieselmann V, Lüllmann-Rauch R. Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: cellular alterations and topographic distribution. *Acta Neuropathol*. 2004 Oct;108(4):261-71.
12. Molander-Melin M, Pernber Z, Franken S, Gieselmann V, Månsson JE, Fredman P. Accumulation of sulfatide in neuronal and glial cells of arylsulfatase A deficient mice. *J Neurocytol*. 2004 Jul;33(4):417-27.
13. Yaghootfam A, Gieselmann V, Eckhardt M. Delay of myelin formation in arylsulphatase A-deficient mice. *Eur J Neurosci*. 2005 Feb;21(3):711-20.

II. Eingehende Darstellung

1. des erzielten Ergebnisses

1.1 Untersuchungen zur Expression der Cerebrosid-Sulfotransferase und der Ceramid-Galactosyltransferase

Eine Reihe von Expressionssystemen wurde genutzt, um das Enzym Cerebrosid-Sulfotransferase (CST) in löslicher Form in eukaryonten Zellen zu exprimieren. Neben der bereits früher beschriebenen Expression in Säugerzelllinien (Eckhardt et al., 2002), konnte die CST auch in Insektenzellen exprimiert werden. Das Hexahistidin-markierte Enzym kann in aktiver Form aus dem Kulturüberstand aufgereinigt werden. Allerdings mussten wir feststellen, dass auch in diesem Expressionssystem keine, für eine weitergehende Strukturanalyse notwendige Proteinmenge zu produzieren ist: In allen bisher verwendeten Expressionssystemen führt die Überexpression der CST zu einer intrazellulären Retention des Enzyms. Die CST kann ebenfalls als lösliches Protein, als Fusionsprotein mit Protein A in Säugerzelllinien exprimiert werden (CHO-Zellen). Eine effektive Reinigung des Enzyms über eine Affinitätschromatographie mittels immobilisierter IgG erwies sich aber als nicht sinnvoll, da die Elutionsbedingungen das Enzym denaturierten.

Es wurde versucht, auch die Ceramid-Galactosyltransferase (CGT) in löslicher Form in Säugerzellen (CHO-Zellen) zu exprimieren. Varianten der CGT ohne Membrandomäne waren allerdings alle inaktiv. Vermutlich, ist die Membranverankerung des Enzyms eine essentielle Voraussetzung für seine Aktivität. Da sich das Substrat Ceramid innerhalb der Membran befindet, besteht die Möglichkeit, dass Teile der Membrandomäne der CGT auch für die Substraterkennung notwendig sind.

Weitere Untersuchungen mit der nativen CST (d.h. CST mit Amino-terminaler Membrandomäne) zeigte, dass mit zunehmender Expressionshöhe, zunehmende Mengen an CST im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert waren und nur ein relativ geringer Teil des Enzyms in den Golgi-Apparat gelangte. Das weitere Vorgehen in dem Projekt wurde daher insofern geändert, dass zunächst das subzelluläre Targeting des Enzyms näher untersucht werden sollte, da davon auszugehen war, dass der ineffiziente Export aus dem Endoplasmatischen Retikulum für die geringe Produktionsmenge löslicher CST in den oben beschriebenen Expressionssystem verantwortlich ist.

Unsere weiteren Untersuchungen konnten zeigen, dass die Membrandomäne der CST ein notwendiges und hinreichendes Signal für die Lokalisation des Enzyms im medialen/trans-Golgi ist (Yaghootfam et al., 2007). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die CST ein homodimeres Protein ist und dass die lumenale, katalytische Domäne der CST für die Dimerisierung verantwortlich ist. Die Amino-terminal Membrandomäne der CST kann ein Reporterprotein (Grün-Fluoreszierendes Protein) effizient aus dem Endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat transportieren (Yaghootfam et al., 2007). Im Gegensatz dazu, ist der Export der CST aus dem Endoplasmatischen Retikulum nicht effizient. Weitere biochemische Untersuchungen zeigten, dass ein Teil des CST-Proteins in Form Detergenz-unlöslicher Aggregate vorliegt; dies kann möglicherweise den ineffizienten Export des Enzyms aus dem Endoplasmatischen Retikulum erklären (Yaghootfam et al., 2007).

1.2 Entwicklung von Enzymtests für die Suche nach Inhibitoren der CST und CGT

Aufgrund der Schwierigkeiten, ausreichende Mengen aktiver, löslicher CST zu produzieren, und aufgrund des Befundes, dass das Enzym CGT offensichtlich nicht in aktiver Form löslich exprimiert werden kann, konnten die Enzymtests nicht wie geplant etabliert und für das Screening von potentiellen Enzyminhibitoren eingesetzt werden. Die als Alternative für Screening-Enzymtests in Erwägung gezogene Aptamer-Strategie, konnte ebenfalls aufgrund der zu geringen Proteinmengen nicht durchgeführt werden.

1.3 Analyse neuer MLD-Mausmodelle

An einem neuen transgenen MLD-Mausmodell, welches, im Gegensatz zu dem bisherigen MLD-Tiermodell, eine deutliche Demyelinisierung im peripheren Nervensystem und z.T. auch im zentralen Nervensystem, wurden, bei parallel durchgeführter Analyse des bisherigen (nicht demyelinisierenden) Mausmodells konnten mittels Transkriptomanalyse (Affymetrix-Microarrays) Gene identifiziert werden, deren Herauf- bzw. Herunterregulation potentiell mit der Pathogenese der Erkrankung im Zusammenhang stehen können.

Die neuen MLD-Mausmodelle weisen, aufgrund einer transgenen Überexpression der CST in Oligodendrocyten und Schwannzellen, eine erhöhte Sulfatidsyntheserate auf, die zu einer signifikanten Verstärkung der Sulfatidspeicherung im zentralen und peripheren Nervensystem führte. Diese ging einher mit einer deutlichen Demyelinisierung und Neuropathie im peripheren Nervensystem (Ramakrishnan et al., 2007). Deutliche Hinweise auf Demyelinisierung gab es aber auch im zentralen Nervensystem dieser Tiere. Die neu generierten Tiere stellen damit ein deutlich verbessertes Tiermodell der MLD dar.

Mit dem Ziel, den Beitrag der neuronalen Sulfatidspeicherung für die Pathologie der Erkrankung zu untersuchen, wurden auch ASA-defiziente Mäuse generiert, bei denen die CST in Neuronen überexprimiert wurde. Während der neuronal Sulfatidgehalt in diesen Tieren kaum erhöht war, akkumulierten hier andere Sulfolipide. Dieses hatte aber keine nachweisbaren Auswirkungen auf die Pathologie (Eckhardt et al., 2007). Allerdings führt die Überexpression der an der Sulfatidbiosynthese beteiligten Ceramide-Galactosyltransferase (CGT) in Neuronen zu einer deutlichen Verstärkung der Sulfatidbiosynthese in Neuronen (Eckhardt et al., 2007). Nach der Generierung von transgenen ASA-defizienten Tieren, bei denen die Sulfatid-Synthese in Neuronen erhöht war, konnte gezeigt werden, dass die neuronal Sulfatidspeicherung zu einer zunehmenden, d.h. mit dem Ausmaß der Speicherung korrelierenden, axonalen Degeneration einhergeht (Eckhardt et al., 2007). Darüberhinaus konnten EEG-Messungen an den Mausmodellen signifikante Veränderungen in der neuronalen Aktivität kortikaler Neurone aufzeigen. Neurone der Tiere, die eine verstärkte Sulfatidspeicherung in Neuronen aufwiesen, wiesen eine deutliche Hyperaktivität auf. Diese war, allerdings deutlich schwächer ausgeprägt, auch in den konventionellen ASA-defizienten Mäusen nachweisbar, aber nicht in Tieren, die zwar vermehrt Sulfatid in Neuronen speicherten, aber, aufgrund normaler ASA-Expression, keine lysosomale Sulfatidspeicherung aufwiesen.

Interessanterweise zeigten aber auch die transgene Mäuse mit einer erhöhten Sulfatid-Synthese, aber mit einem intakten ASA-Gen, neurologische Symptome. Zwar zeigten die EEG-Ableitungen bei diesen Tieren keine Auffälligkeiten. Die Tiere waren aber sehr Lärmempfindlich und es konnten audiogene Anfälle bei diesen Tieren ausgelöst werden (Berger et al., Manuskript in Vorbereitung). Bei konventionellen ASA-defizienten Mäusen (d.h. Tieren ohne verstärkte Sulfatidsynthese in Neuronen) sind audiogene Anfälle nicht zu beobachten, da es hier zu einer sehr frühen Zerstörung von Neuronen des Innenohrs, aufgrund der Sulfatidspeicherung kommt. Da diese Untersuchungen deutlich zeigen, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften von Neuronen durch Sulfatid verändert werden können, besteht die Möglichkeit, dass epileptische Anfälle und andere neurologischen Symptome, die zumindest bei einigen MLD-Patienten auftreten, nicht Folgen der Demyelinisierung, sondern direkte Folgen einer neuronalen Sulfatidspeicherung sind. Die neuen transgene Mausmodelle sind geeignete Hilfsmittel, um diese Aspekte der Erkrankung in Zukunft weiter zu untersuchen.

1.4 Identifizierung und Charakterisierung neuer ASA-Mutationen

Während der Laufzeit des Projektes wurden keine neuen, bisher unbekanntenen Mutationen im ASA Gen gefunden.

2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die bewilligten Personalmittel und Sachmittel waren absolut notwendig, um die beschriebenen Versuche durchführen zu können. Sie sind daher vollständig verausgabt worden.

3. Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Das Vorhaben wurde weitgehend entsprechend der im Projektantrag beschriebenen Planung durchgeführt. Beim Ablauf ergab sich bei der Expression der löslichen Cerebrosid-Sulfotransferase, dass es mit zunehmender Expressionshöhe des Enzyms zu einer zunehmenden intrazellulären Akkumulation des Proteins (im endoplasmatischen Retikulum) und damit zur verminderten Sekretion kommt. Der Ablauf des Projektes wurde daher dahingehend modifiziert, dass zunächst die subzelluläre Sortierung der CST genauer untersucht werden sollte, um den ungewöhnlich ineffizienten Export aus dem endoplasmatischen Retikulum besser zu verstehen. Bezüglich des Teilprojektes zur Expression der CGT konnte das Vorhaben nicht weitergeführt werden, da sich herausstellte, dass die Expression einer enzymatisch aktiven, aber nicht membrangebundenen Form der CGT nicht möglich war. Die Untersuchungen an neuen transgenen Mausmodellen der MLD wurden entsprechend der Planungen des Projektantrages durchgeführt.

4. Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Trotz der Schwierigkeiten, die CST in großen Mengen zu exprimieren, bleibt das Ziel, größere Mengen des CST-Enzyms in aktiver Form zu produzieren, um damit strukturelle Untersuchungen durchzuführen und nach Inhibitoren des Enzyms zu suchen. Aufgrund der Strukturdaten die durch die biochemische Charakterisierung der CST und nach einer erfolgreichen Kristallisation des Enzyms durch Röntgenstrukturanalyse erhalten werden können, besteht die Möglichkeit spezifische Inhibitoren der Galactosylceramid-Sulfotransferase zu entwickeln. Langfristig können solche Inhibitoren für die Therapie der Metachromatischen Leukodystrophie eingesetzt werden. Langfristig bestehen für dieses Teilprojekt prinzipiell auch wirtschaftliche Erfolgsaussichten. Aufgrund der Seltenheit der Metachromatischen Leukodystrophie, ist das Marktpotential allerdings relativ gering. Zur Identifizierung solcher Inhibitoren sind Kooperationen mit Universitäts-Instituten und Industriepartnern einzugehen.

Aufgrund der nicht erfolgreichen Expression löslicher Ceramid-Galactosyltransferase (CGT), musste das Ziel der Etablierung eines effizienten Assays und die Herstellung größerer Mengen der CGT aufgegeben werden.

5. Der während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

Untersuchungen mit dem Ziel der Identifizierung von Inhibitoren der CGT oder CST sind während der Projektförderung von anderen Stellen nicht publiziert worden. Auch weiterführende biochemisch/zellbiologische Untersuchungen der Enzyme sind nicht publiziert worden.

Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben neue Mutationen im ASA-Gen bzw. im Saposin-Gen bei MLD-Patienten [1-5]. Eine weitere biochemisch/zellbiologische Analyse dieser Mutanten erfolgte aber nicht.

Literaturangaben

1. Anlar B, Wayne JS, Eng B, Oguz KK. Atypical clinical course in juvenile metachromatic leukodystrophy involving novel arylsulfatase A gene mutations. Dev Med Child Neurol. 2006 May;48(5):383-7.

2. Bertelli M, Gallo S, Buda A, Cecchin S, Fabbri A, Lapucci C, Andrichetto G, Sidoti V, Lorusso L, Pandolfo M. Novel mutations in the arylsulfatase A gene in eight Italian families with metachromatic leukodystrophy. *J Clin Neurosci*. 2006 May;13(4):443-8.
3. Wang J, Zhang W, Pan H, Bao X, Wu Y, Wu X, Jiang Y. ARSA gene mutations in five Chinese metachromatic leukodystrophy patients. *Pediatr Neurol*. 2007 Jun;36(6):397-401.
4. Deconinck N, Messaoui A, Zierysen F, Kadhim H, Sznajer Y, Pelc K, Nassogne MC, Vanier MT, Dan B. Metachromatic leukodystrophy without arylsulfatase A deficiency: a new case of saposin-B deficiency. *Eur J Paediatr Neurol*. 2008 Jan;12(1):46-50.
5. Grossi S, Regis S, Rosano C, Corsolini F, Uziel G, Sessa M, Di Rocco M, Parenti G, Deodato F, Leuzzi V, Biancheri R, Filocamo M. Molecular analysis of ARSA and PSAP genes in twenty-one Italian patients with metachromatic leukodystrophy: identification and functional characterization of 11 novel ARSA alleles. *Hum Mutat*. 2008 Nov;29(11):E220-30.

6. Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

Die folgenden Projekt-bezogenen Arbeiten wurden publiziert bzw. sind zur Publikation eingereicht:

1. Berger R, Gieselmann V, Eckhardt M. Increasing sulfatid synthesis in neurons causes lethal audiogenic seizures. Manuskript in Vorbereitung.
2. Klein D, Yaghoofam A, Matzner U, Koch B, Bräulke T, Gieselmann V. Mannose 6-phosphate receptor-dependent endocytosis of lysosomal enzymes is increased in sulfatide-storing kidney cells. *Biol Chem*. 2009 Jan;390(1):41-8.
3. Hans M, Pusch A, Dai L, Racké K, Swandulla D, Gieselmann V, Kappler J. Lysosulfatide regulates the motility of a neural precursor cell line via calcium-mediated process collapse. *Neurochem Res*. 2009 Mar;34(3):508-17.
4. Eckhardt M. The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol Neurobiol*. 2008 Apr-Jun;37(2-3):93-103.
5. Gieselmann V. Metachromatic leukodystrophy: genetics, pathogenesis and therapeutic options. *Acta Paediatr Suppl*. 2008 Apr;97(457):15-21.
6. Gärtner J, Kohlschütter A, Gieselmann V. [Leukodystrophies: diseases of white matter of the nervous system]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2007 Dec;50(12):1531-40.
7. Ramakrishnan H, Hedayati KK, Lüllmann-Rauch R, Wessig C, Fewou SN, Maier H, Goebel HH, Gieselmann V, Eckhardt M. Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy. *J Neurosci*. 2007 Aug 29;27(35):9482-90.
8. Eckhardt M, Hedayati KK, Pitsch J, Lüllmann-Rauch R, Beck H, Fewou SN, Gieselmann V. Sulfatide storage in neurons causes hyperexcitability and axonal degeneration in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *J Neurosci*. 2007 Aug 22;27(34):9009-21.

9. Yaghootfam A, Sorkalla T, Häberlein H, Gieselmann V, Kappler J, Eckhardt M. Cerebroside sulfotransferase forms homodimers in living cells. *Biochemistry*. 2007 Aug 14;46(32):9260-9.
10. Gieselmann V. Sphingolipids in physiology and pathophysiology. *Acta Paediatr Suppl*. 2007 Apr;96(455):39.
11. Saravanan K, Büsow H, Weiler N, Gieselmann V, Franken S. A spontaneously immortalized Schwann cell line to study the molecular aspects of metachromatic leukodystrophy. *J Neurosci Methods*. 2007 Apr 15;161(2):223-33.
12. Sevin C, Verot L, Benraiss A, Van Dam D, Bonnin D, Nagels G, Fouquet F, Gieselmann V, Vanier MT, De Deyn PP, Aubourg P, Cartier N. Partial cure of established disease in an animal model of metachromatic leukodystrophy after intracerebral adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Gene Ther*. 2007 Mar;14(5):405-14.

Schlussbericht zu Nr. 3.2

Prof. Dr. rer. nat. Konrad Sandhoff
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn
Gerhard Domagk Str. 1, 53121 Bonn
Phone: (0228) 73 5346, Fax: (0228) 73 7778
E-Mail: sandhoff@uni-bonn.de

I. Kurze Darstellung zu

Metachromatische Leukodystrophie: Struktur, Funktion und biophysikalische Eigenschaften von MLD verursachenden Varianten des Sphingolipidaktivatorproteins B (Sap-B)

Metachromatic leukodystrophy: Structure, function and biophysical properties of MLD-causing variants of the sphingolipid activator protein (SAP) -B

Metachromatische Leukodystrophie: Struktur, Funktion und biophysikalische Eigenschaften des Sphingolipidaktivatorproteins B (Sap-B)

1. Aufgabenstellung,

- Aim 1: Expression von funktionellen MLD- verursachenden Varianten von Sap-B im Baculovirus und *Pichia pastoris* Expressionssystem und deren strukturelle Analyse Aufklärung der Funktion und der Wechselwirkung mit der Arylsulfatase A
- Aim 2: Untersuchung der biophysikalischen Interaktion von Sap-B mit Lipidmembranen und der Arylsulfatase A in Oberflächen-Plasmon Resonanz (Biacore) Experimenten
- Aim 3: Biophysikalische Studien über die Lipidtransfer Eigenschaften von Sap-B und dessen MLD verursachenden Varianten zwischen Donor und Akzeptor Membranen

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde,

Wie bereits seit einigen Jahren bekannt ist, gibt es eine Form der juvenilen Metachromatischen Leukodystrophie (MLD), die nicht durch eine Defizienz oder die reduzierte Aktivität der Arylsulfatase A verursacht wird, sondern durch einen Defekt des nicht enzymatischen Glykoproteins Sap-B. Sap-B, eines der fünf bisher bekannten Sphingolipidaktivatorproteine (SAPs), ist ein Glykolipidbindungsprotein, das die Hydrolyse von etwa zwanzig Glykolipiden durch verschiedene Enzyme stimuliert. Eine von Sap-B stimulierte Reaktion ist dabei die Hydrolyse von Sulfatid durch die Arylsulfatase A. Zur Zeit sind sechs verschiedene Mutationen auf dem Sap-B kodierenden Genabschnitt bekannt. Sie resultieren alle im Verlust von reifem Sap-B und der dadurch bedingten Akkumulation von Sulfatid und anderen Glykolipiden. Der klinische Verlauf der dadurch auftretenden Erkrankung ähnelt mit nur wenigen Einschränkungen dem der klassischen MLD. Sphingolipidaktivatorproteine sind in der Regel Membran-perturbierende Lipidbindungsproteine mit unterschiedlichen Spezifitäten für das entsprechend, gebundene Lipid und die dadurch aktivierte enzymatische Reaktion. Ihr Fehlen oder Inaktivität führt zu der entsprechenden Membran- oder Lipidspeicherkrankheit. Sphingolipidaktivatorproteine erleichtern nicht nur den Abbau der Glykolipide, sondern fungieren auch als sogenannte Glykolipid-Transferproteine, die z.B. die Assoziation von Lipidantigenen mit den entsprechenden Immunrezeptoren der CD1 Familie erleichtern. Bei allen funktionellen Interaktionen der Enzyme, wie z.B. der Arylsulfatase A, mit den entsprechenden Lipidsubstraten spielt neben den Sphingolipidaktivatorproteinen auch die Zusammensetzung der Membran und dort speziell der Gehalt an anionischen Phospholipiden eine entscheidende Rolle. Erste biophysikalische und enzymatische Experimente konnten zeigen, dass einige der

Aktivatorproteine die Lipidphase durch Protein-Lipid Wechselwirkungen stören und gleichzeitig die abbauenden Enzyme durch die entsprechenden Protein-Protein Wechselwirkung rekrutieren.

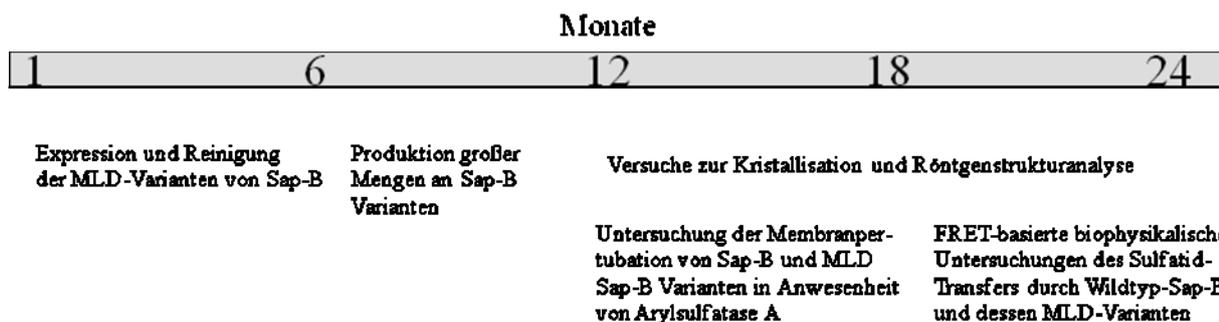
3. Planung und Ablauf des Vorhabens,

Einige der publizierten Fälle von Metachromatischer Leukodystrophie zeigen einen Defekt im Sphingolipidaktivatorprotein Sap-B, einem nichtenzymatischen Kofaktor der Arylsulfatase A. Sap-B entsteht durch die proteolytische Prozessierung des Sap-Vorläufer Proteins, das ebenfalls für drei weitere Saps kodiert (Sap-A, C, D) Zusammen mit der Arylsulfatase A ist Sap-B notwendig für den intralysosomal Abbau von Sulfatiden. Um die genaue Funktion von Sap-B bei diesem Abbauschritt zu verstehen, war es absolut notwendig die molekulare Struktur von Sap-B Varianten zu charakterisieren, die auf MLD auslösenden Mutationen der Sap-B mRNA basieren, und deren biophysikalischen Eigenschaften an Lipid-Lysosol Grenzflächen zu untersuchen.

Daher wollten wir mit Hilfe des *Pichia pastoris* Hefe-Expressionssystems sowie mit Hilfe des Baculovirus Expressionssystems Sap-B Varianten in großen Mengen herstellen und reinigen.

Um dessen Wirkungsmechanismus an der Lipid-Lysosol Interphase sowie die entsprechenden Protein-Protein und Protein-Lipid Wechselwirkungen zu untersuchen, sollten *in vitro* liposomale Assays und Biacore Experimente sowie weitere biophysikalische Experimente wie z.B. kalorimetrische Messungen durchgeführt werden. (siehe Ziele und Aufgabenstellung und Zeitplan)

Balkendiagramm Teilprojekt 10



4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

Nach Internalisierung durch Endozytose werden Glykosphingolipide aus der Plasmamembran im lysosomalen Kompartiment abgebaut. Basierend auf unseren vorherigen Forschungsergebnissen erreichen die Glykosphingolipide das Lysosom als Bestandteile von intralysosomal Vesikeln durch Invaginationsprozesse von endosomalen Membranen (1, 2). Der Abbau der Glykosphingolipide erfolgt dort auf der dem Lysosol zugewendeten Membranseite durch den sequenziellen Abbau der Zuckerketten und des Lipidgerüsts durch saure lysosomale Hydrolasen. Die lysosomale Degradation der Glykosphingolipide mit kurzen Oligosaccharidketten erfolgt allerdings nur in Gegenwart kleiner nichtenzymatischer Sphingolipidaktivatorproteine (Saps, Saposins). Vier der fünf bereits bekannten Saps, Sap-A, B, C, D, entstehen durch die proteolytische Prozessierung eines gemeinsamen Vorläufers, dem Sap-Vorläufer (3, 4, 5). Das reife Sap-B Protein tritt dabei in 3 Spleißformen auf und stimuliert *in vivo* speziell den Abbau von Sulfatiden durch die Arylsulfatase A und *in vitro* zwanzig anderen Glykolipiden durch verschiedene Enzyme.

Mutationen in der Arylsulfatase A oder der Sap-B Domäne im Sap-Vorläufer Gen sind verantwortlich für die autosomal rezessiv vererbte Metachromatische Leukodystrophie (MLD) (6, 7, 8). MLD ist eine Sphingolipidose und resultiert in der Speicherung von Sulfatiden und der Demyelinisierung.

Der Sap-Vorläufer scheint zusätzlich andere Funktionen zu besitzen, da er in bestimmten Körperflüssigkeiten wie z.B. der Cerebrospinalflüssigkeit, dem Seminalplasma und der postnatalen Milch stark angereichert ist (9,10). Außerdem wird vermutet, dass der Sap-Vorläufer neurotrophe Eigenschaften besitzt (11, 12). Weder der Rezeptor oder der Mechanismus der Signaltransduktion (13) ist jedoch bekannt noch bestätigen unsere eigene Ergebnisse diese neurotrophen Effekte.

1. Fürst, W. and Sandhoff, K. (1992). Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1126, 1-16.

2. Kolter T, Sandhoff K (2005) Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 81-103
3. Fürst,W., Machleidt,W., and Sandhoff,K. (1988). The precursor of sulfatide activator protein is processed to three different proteins. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 369, 317-328.
4. O'Brien,J.S., Kretz,K.A., Dewji,N., Wenger,D.A., Esch,F., and Fluharty,A.L. (1988). Coding of two sphingolipid activator proteins (SAP-1 and SAP-2) by same genetic locus. *Science* 241, 1098-1101.
5. Vielhaber,G., Hurwitz,R., and Sandhoff,K. (1996). Biosynthesis, processing, and targeting of sphingolipid activator protein (SAP) precursor in cultured human fibroblasts. Mannose 6- phosphate receptor-independent endocytosis of SAP precursor. *J. Biol. Chem.* 271, 32438-32446.
6. Stevens,R.L., Fluharty,A.L., Kihara,H., Kaback,M.M., Shapiro,L.J., Marsh,B., Sandhoff,K., and Fischer,G. (1981). Cerebroside sulfatase activator deficiency induced metachromatic leukodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 33, 900-906.
7. Gieselmann,V. (1995). Lysosomal storage diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1270, 103-136.
8. Henseler,M., Klein,A., Reber,M., Vanier,M.T., Landrieu,P., and Sandhoff,K. (1996a). Analysis of a splice-site mutation in the sap-precursor gene of a patient with metachromatic leukodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 65-74.
9. Hineno,T., Sano,A., Kondoh,K., Ueno,S., Kakimoto,Y., and Yoshida,K. (1991). Secretion of sphingolipid hydrolase activator precursor, prosaposin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 668-674.
10. Tyynela,J., Baumann,M., Henseler,M., Sandhoff,K., and Haltia,M. (1995). Sphingolipid activator proteins (SAPs) are stored together with glycosphingolipids in the infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis (INCL). *Am. J. Med. Genet.* 57, 294-297.
11. Sano,A., Matsuda,S., Wen,T.C., Kotani,Y., Kondoh,K., Ueno,S., Kakimoto,Y., Yoshimura,H., and Sakanaka,M. (1994). Protection by prosaposin against ischemia-induced learning disability and neuronal loss. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 994-1000.
12. Patton,S., Carson,G.S., Hiraiwa,M., O'Brien,J.S., and Sano,A. (1997). Prosaposin, a neurotrophic factor: presence and properties in milk. *J. Dairy Sci.* 80, 264-272.
13. Hiraiwa,M., Campana,W.M., Martin,B.M., and O'Brien,J.S. (1997). Prosaposin receptor: evidence for a G-protein-associated receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 415-418.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Prof. Dr. V. Gieselmann, Prof. Dr. A. Hasilik (Marburg), Prof. Dr. W. Sängler (Berlin), Prof. Dr. U. Schaible (Berlin)

II. Eingehende Darstellung

1. des erzielten Ergebnisses,

Aim 1: Expression von funktionellen MLD- verursachenden Varianten von Sap-B im Baculovirus und *Pichia pastoris* Expressionssystem und deren strukturelle Analyse Aufklärung der Funktion und der Wechselwirkung mit der Arylsulfatase A

In der ersten Antragsperiode konnten wir mit Hilfe der Hefe *Pichia Pastoris* und des Sf9-Insektenzell-Systeme die Expression des rekombinanten Sap-Vorläufer Protein und der einzelnen prozessierten Saps (Sap-A,B,C,D) etablieren. Nach erfolgreicher Expression und Reinigung von analytischen Mengen von Sap-B aus methylotropher Hefe *P. pastoris* haben wir versucht die Expressions- und Reinigungsbedingungen zur präparativen Herstellung des Proteins für die Röntgenstrukturanalyse anzupassen. Dieses Ziel wurde in der ersten Antragsperiode erreicht. Leider wurde die Struktur während der laufenden Antragsperiode von einer anderen Arbeitsgruppe aufgeklärt. Prive und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Wildtyp Sap-B aus einer

muschelartig angeordneten dimeren Struktur besteht, die eine durch α -helikale Struktur begrenzte, große Kavität enthält. In der 2. Antragsperiode haben wir daher Varianten von Sap-B in größerem Maßstab exprimiert, von denen gezeigt wurde, dass sie eine Form der MLD auslösen. Wir konnten die Varianten bis zur Homogenität reinigen. Neben den Versuchen, diese Varianten zu kristallisieren (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. W. Sanger, Berlin), haben biophysikalische Experimente durchgeföhrt, um Einsichten in den Wirkungsmechanismus von Sap-B zu gewinnen und um die Auswirkungen der Mutationen bei der Entstehung der MLD zu untersuchen. Die endgültige Aufklärung der Strukturen steht noch aus. Wir konnten in der letzten Antragsperiode jedoch die Strukturen der anderen Saposine (Sap-A, Sap-C und Sap-D) aufklären, die zusammen mit der Struktur von Sap-B (s. o) einen Hinweis auf den Wirkungsmechanismus dieser kleinen Aktivatorproteine liefert. Die entsprechenden Publikationen sind unten aufgeföhrt.

Aim 2: Untersuchung der biophysikalischen Interaktion von Sap-B mit Lipidmembranen und der Arylsulfatase A in Oberflächen-Plasmon Resonanz (Biacore) Experimenten

Mit den gereinigten Sap-B Varianten war es uns möglich, die biophysikalische Untersuchung zur Interaktion der MLD auslösenden Varianten und des Wildtyp Sap-B mit Lipidmembranen durchzuföhren. Wie wir bereits für Sap-A zeigen konnten (Locatelli et al. 2006 siehe Publikationsliste) interagiert ebenfalls Sap-B an der Lipid-Lysosol Phasengrenze der intralysosomalen Vesikel als Detergenz und die entsprechenden Lipide werden aus der Membran herausgelöst und den entsprechenden Enzymen wie z.B. der Arylsulfatase A angeboten.

Für die biophysikalischen Untersuchungen an Lipidmembranen verwendeten wir immobilisierte Liposomen als ein Modell für die intralysosomalen Membranen. Die Interaktion der Liposomen mit den Sap-B Varianten z. B. Asn215His wurde mit Hilfe der SPR-Spektroskopie gemessen. Die entsprechende Publikation (Rommel et al.) ist unten aufgeföhrt. In unseren bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Degradation der endozytierten Glykolipide an den intralysosomalen Membranen ablaufen. Diese Membranen unterscheiden sich von der limitierenden lysosomalen Membran in folgenden Punkten: Die Vesikel besitzen keine schtzende Glykokalix, sind nahezu frei von Cholesterol und reich an BMP (Bis(monoacylglycero)phosphat), ein Lipid, das eine starke Krümmung der Membran bewirkt. Der Durchmesser der intralysosomalen Vesikel beträgt bei Patienten mit einer Sap-B Defizienz zwischen 50 und 100 nm. Die Vesikel besitzen eine starke Krümmung, die in einer hohen Oberflächenspannung resultiert. Als Modell dieser intralysosomalen Vesikel haben wir Liposomen mit verschiedenen Zusammensetzungen auf einer Gold-Dextran-Oberfläche immobilisiert und die Bindungseigenschaften von Sap-B mit Hilfe der Plasmonresonanztechnik gemessen. Sap-B stört wie schon für Sap-A gezeigt nach einer anfänglichen Bindung an die Liposomen die Membranstruktur und mobilisiert die Lipide aus der Membran. Dieser Prozess war sowohl abhängig vom sauren pH und der Anwesenheit des anionischen Lipids BMP, wohingegen ein höherer Gehalt an Cholesterol zur Stabilisierung der Liposomen führte. Bei der MLD verursachenden Variante Asn215His, die sich durch eine fehlende Glykostruktur auszeichnet, reduzierte sich der Abschwemmeffekt der Lipide auf ein Minimum, wodurch es zur Anreicherung der Sulfatide kommt. Dieser Abschwemm- oder Lipidtransporteffekt wurde in anschließenden liposomalen Transferexperimenten auch in Gegenwart der Arylsulfatase A genauer analysiert und unter Aim 3 genauer erläutert.

Aim 3: Biophysikalische Studien über die Lipidtransfer Eigenschaften von Sap-B und dessen MLD verursachenden Varianten zwischen Donor und Akzeptor Membranen

Viele saure Hydrolasen, wie die Arylsulfatase A, binden monomere Lipide, die wahrscheinlich außerhalb der Membran nur gebunden von ihren Aktivatorproteinen vorkommen. Ein essentieller Schritt zum besseren Verständnis der Sulfatid Präsentation an der Arylsulfatase A war die Aufklärung der Sulfatid-Transfer Eigenschaften von Sap-B von Membranen zum Enzym und von Membran zu Membran. Wie für viele Lipidbindungproteine angenommen, sollte die Sulfatid-Präsentation an die ASA über ein zwei Stufen Modell laufen, das einer Oberflächen/ Lösungs-Kinetik folgt. In einem ersten Schritt erfolgt die Anbindung von Sap-B an Membranen, Mizellen oder Liposomen. Hohe Konzentrationen an Sap-B beschleunigen die Reaktion. Die Sequestrierung von Sap-B an der zweidimensionalen Lipid-Grenzfläche kann so die Detektion und Bindung von Sulfatid erleichtern.

Um den Lipidtransfer von der Membran zur Arylsulfatase A zu studieren, entwickelten wir zu einem Detergenz-freien-mizellaren und liposomalen Assay als *in vitro* System und in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Gieselmann Zellkulturmodelle der MLD für eine *in vivo* Untersuchung.

Unter *in vitro* Bedingungen hatte die Reaktion, wie schon für Sap-B alleine gezeigt, ein pH Optimum von pH 4.3 und wurde inhibiert durch mono- und divalenten Kationen, Phosphat und Sulfid. Bis(monoacylglycero)phosphat und Phosphatidsäure waren Aktivatoren der Reaktion. Erst hohe Konzentrationen von Sap-B verursachte einen Anstieg der Sulfatid-Hydrolyse durch Sap-B. Dies lässt

vermuten, dass Sap-B in hohen Konzentrationen vorhanden sein muss, um eine Maximale Hydrolyserate zu erzielen. SPR-Spektroskopie hat gezeigt (s. Aim 2), dass Sap-B schnell aber nicht sehr stark an Membranen bindet und in einem Äquilibrium an löslichem und gebundenen Sap-B vorliegt.

In den Lysosomen vermuten wir jedoch, dass der größte Teil von Sap-B membrangebunden vorliegt.

Im in vivo Assay an Arylsulfatase A defizienten primären Mauszellen, die eine starke Akkumulation an Sulfatid zeigen, konnten wir nach Zugabe von rekombinanter Arylsulfatase zumindest eine anteilige Hydrolyse des Sulfatids zeigen. Die Zugabe von Sap B oder des Sap-Vorläuferproteins (s. 1. Antragsperiode) resultierte zwar in der endozytotischen Aufnahme aber nicht in einer Steigerung der Arylsulfatase A katalysierten Hydrolyse des Sulfatids. Das lässt vermuten, dass Sap-B kein limitierender Faktor in dieser Reaktion ist.

Schnelle Membran-Assoziations- und Dissoziationsraten wie sie bei der SPR beobachtet wurden erklären die Effizienz der Sap-B Präsentation des Sulfatids an die Arylsulfatase A. Es ist daher wahrscheinlich, dass Sap-B das Sulfatid vollständig aus der Lipidmembran herauslöst und als löslichen Sap-B/Lipid Komplex der Arylsulfatase anbietet.

2. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans,

Da es sich hier um ein Grundlagenprojekt handelt, ist bisher noch keine wirtschaftliche Verwertbarkeit daraus entstanden. Wie bereits im Verwertungsplan beschrieben, kann später nach vollständiger Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Sap-B eventuell eine Therapie entwickelt werden, die zur Milderung der MLD Symptome führen kann.

4. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

Folgende Projekt-relevante Veröffentlichungen sind in der vergangenen Förderperiode erschienen:

1. Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, **Sandhoff K**, Polyakova S, Belov VN, Hein B, von Middendorff C, Schonle A, Hell SW (2009) Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* **457**, 1159-62
2. Matzner U, **Breiden B**, Schwarzmann G, Yaghoofam A, Fluharty AL, Hasilik A, **Sandhoff K**, Gieselmann V (2009) Saposin B-dependent reconstitution of arylsulfatase A activity in vitro and in cell culture models of metachromatic leukodystrophy. *J Biol Chem* **284**, 9372-81
3. Schulze H, Kolter T, **Sandhoff K** (2009) Principles of lysosomal membrane degradation Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 674-83
4. Rossmann M, Schultz-Heienbrok R, Behlke J, Rimmel N, Alings C, **Sandhoff K**, Saenger W, Maier T (2008) Crystal structures of human saposins C and D: implications for lipid recognition and membrane interactions. *Structure* **16**, 809-17
5. Rimmel N, Locatelli-Hoops S, **Breiden B**, Schwarzmann G, **Sandhoff K** (2007) Saposin B mobilizes lipids from cholesterol-poor and bis(monoacylglycerol)phosphate-rich membranes at acidic pH. Unglycosylated patient variant saposin B lacks lipid-extraction capacity. *FEBS J* **274**, 3405-20
6. Babalola JO, Wendeler M, **Breiden B**, Arenz C, Schwarzmann G, Locatelli-Hoops S, **Sandhoff K** (2007) Development of an assay for the intermembrane transfer of cholesterol by Niemann-Pick C2 protein. *Biol Chem* **388**, 617-26
7. Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, **Locatelli Hoops S**, Breiden B, **Sandhoff K**, Brinkmann V, Kaufmann SHE, and Schaible UE (2006) Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis *Immunity* **24**, 105-17
8. Wendeler M, Werth N, Maier T, Schwarzmann G, Kolter T, Schoeninger M, Hoffmann D, Lemm T, Saenger W, and **Sandhoff K** (2006), The enzyme-binding region of the GM2-activator protein, *FEBS J*. **273**, 982-91.
9. Schultz-Heienbrok R, Rimmel N, Klingenstein R, Rossocha M, **Sandhoff K**, Saenger W, and Maier T (2006) Crystallization and preliminary characterization of three different crystal forms of human saposin C heterologously expressed in *Pichia pastoris*, *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**, 117-20

10. John M, Wendeler M, Heller M, **Sandhoff K**, and Kessler H (2006) Characterization of Human Saposins by NMR Spectroscopy, *Biochemistry* **45**, 5206-16
11. Kolter T and **Sandhoff K** (2006) Sphingolipid metabolism diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, **Epub ahead of print**
12. **Locatelli Hoops S**, Kolter T, and **Sandhoff K** (2006) Saposin C and Other Sphingolipid Activator Proteins, in: Gaucher Disease, eds. Anthony H. Futerman and Ari Zimran, CRC Press, Taylor & Francis Group, Chapter 4, 67-84.
13. **Locatelli-Hoops S**, Rimmel N, Klingenstein R, Breiden B, Rossocha M, Schoeniger M, Koenigs C, Saenger W, and **Sandhoff K**. (2006) Saposin A mobilizes lipids from low cholesterol and high bmp containing membranes. Patient variant saposin A lacks lipid extraction capacity *J. Biol. Chem*, **281**, 32451-60

Schlussbericht Projekt 12

Projekt Koordination

Prof. Dr. Volkmar **Gieselmann**
Institut für Physiologische Chemie
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Nussallee 11
53115 Bonn
Tel.: +49/228-73-2411
Fax: +49/228-73-2416
e-mail: gieselmann@institut.physiochem.uni-bonn.de

Projekt Titel

Koordinationsprojekt des Netzwerkes

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

In diesem Projekt wurden die Aktivitäten des Netzwerkes koordiniert. Dieses Projekt hat halbjährliche Treffen der Projektleiter organisiert. Gleiches gilt für die Organisation der gemeinsamen Treffen der Wissenschaftler mit den Betroffenenorganisationen. Soweit möglich hat dieses Projekt auch die Ausgaben und den Ablauf aller im Netzwerk vertretenen Projekte kontrolliert.

2. Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Für das Vorhaben stand eine halbe Sekretärinnenstelle zur Verfügung. Es stand ein Büroraum im Institut für Biochemie und Molekularbiologie zur Verfügung

3. Planung und Ablauf des Projektes

Entfällt

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde

Entfällt

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Projekt hat mit allen Koordinatoren des Netzwerkes sowie mit den Betroffenenorganisationen zusammengearbeitet.

II. Eingehende Darstellung

1. Eingehende Darstellung des erzielten Ergebnisses

Das Projekt 12 hat jeweils im Frühling bzw. Herbst Treffen aller Projektleiter organisiert. Die Frühlingstreffen fanden regelmäßig in Bonn, die im Herbst im Rahmen des gemeinsamen Treffens mit den Patientenorganisationen statt. Die gemeinsamen Treffen mit den Patientenorganisationen bestanden im wesentlichen aus zwei Teilen. Zunächst einem wissenschaftlichen Teil, in dem jedes Projekt präsentiert wurde und von den Netzwerkprojektleitern diskutiert wurde. Der wissenschaftliche Fortschritt des jeweiligen

Projektes wurde begutachtet und evtl. Empfehlungen zur Weiterführung des Projektes gegeben. An dieses wissenschaftliche Treffen schloss sich das Treffen mit den Patientenorganisationen an, bei denen die Projektleiter in Laien verständlichen Vorträgen die Problematik der Leukodystrophien den Betroffenen versuchten näher zu bringen. Hierbei ist es im Rahmen des Leukonets gelungen nicht nur die Koordinatoren des Leukonets sondern auch drei verschiedene Betroffenenorganisationen auf ein gemeinsames Treffen zu verpflichten. Des weiteren hat das Projekt alle finanziellen Aspekte des Leukonets geregelt und die jeweiligen Zwischenberichte bzw. den Schlussbericht redaktionell begleitet.

Punkte 2-6 entfallen