

Diss. ETH No. 13530

**A Common Disease Mechanism for Hereditary
Neuropathies Due to Point Mutations in the
Peripheral Myelin Protein 22**

A Dissertation submitted to the
EIDGENÖSSICHE TECHNISCHE HOCHSCHULE (ETH)
ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

Roland Naef

dipl. sc. nat., ETH Zürich
Born March 22, 1966
Hemberg SG

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Ueli Suter, examiner
Prof. Dr. Hans M. Eppenberger, co-examiner

2000

2. Zusammenfassung

Das Periphere Myelin Protein 22 (PMP22) ist ein kleines, hydrophobes Glykoprotein, das hauptsächlich von Schwann'schen Zellen exprimiert wird und einen wichtigen Bestandteil des kompakten Myelins des peripheren Nervensystem bildet. Funktionell ist PMP22 von entscheidender Bedeutung für die korrekte Myelinisierung während der Entwicklung peripherer Nerven, für die Homöostase der Myelinschicht und für die Erhaltung von Axonen. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde PMP22 eine Rolle als strukturelles Myelinprotein, sowie eine regulierende Funktion in der Proliferation und Differentiation der Schwann'schen Zellen zugesprochen.

Mit der Entdeckung einer Punktmutation im *pmp22* Gen der natürlich auftretenden dysmyelinisierenden Mausmutante *Trembler* (*Tr*) konnte ein ursächlicher Zusammenhang zwischen PMP22 und peripheren Neuropathien gezeigt werden. Tatsächlich geht aus aktuellen molekular-genetischen Studien hervor, dass Veränderungen wie Duplikationen, Deletionen und Punktmutationen des *PMP22* Gens für die häufigsten Formen vererbbarer motorischer und sensorischer Neuropathien (HMSN), wie die Charcot-Marie-Tooth'sche Krankheit (CMT1A), die vererbte Neuropathie mit Anfälligkeit zu Druckläsionen (HNPP) und ein Subtyp des Dejerine-Sottas-Syndroms verantwortlich sind.

Mit unseren Studien beabsichtigten wir den Beitrag einer veränderten Funktion oder Regulation von mutiertem PMP22 Protein zu möglichen Krankheitsmechanismen aufzuklären. Die *Tr* Mausmutante, die Veränderungen in der Physiologie der Schwann'schen Zelle und der Myelinisierung zeigt, diente als Modellorganismus zur Bestimmung der primären Konsequenzen des Gendefektes von PMP22 auf molekularer und zellulärer Ebene.

Eine immunhistochemische Untersuchung der peripheren Nerven von acht Monate alten, heterozygoten *Tr* Mausmutanten zeigte eine intrazelluläre Ansammlung von PMP22-immunoreaktivem Protein in Organellen der Schwann'schen Zellen, die dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) oder

Golgi Apparat entsprachen. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf einen veränderten Transport des mutierten PMP22 Proteins zurückzuführen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde rekombinant exprimiertes Tr Protein im ER von transfektierten COS-7 und kultivierten Schwann`schen Zellen zurückgehalten, höchstwahrscheinlich aufgrund fehlerhafter Faltung und/oder beeinträchtigter Prozessierung. Darüber hinaus übte das Tr Protein in diesem *in vitro* System einen teilweisen dominant-negativen Effekt auf den Transport von gemeinsam exprimiertem Wildtyp PMP22 Protein vom ER zur Zelloberfläche aus.

In weiterführenden Experimenten erweiterten wir unsere Untersuchungen um eine Reihe von Mutationen des *PMP22* Gens, die in Patienten mit CMT1A, schwerer CMT1A, DSS und in einer vermuteten rezessiven Form der CMT1A gefunden worden waren.

Mit diesem Ansatz konnten wir damit bestätigen, dass unkorrekte Proteinfaltung und/oder beeinträchtigte Prozessierung eine Hauptursache für den Krankheitsmechanismus darstellt, der peripheren humanen Neuropathien zu Grunde liegt, die durch Punktmutationen im *PMP22* Gen verursacht werden.

Darüber hinaus konnten wir in unserem Zellkultursystem zeigen, dass die dominant vererbten mutanten PMP22 Proteine auch den Transport und die Prozessierung von gleichzeitig exprimiertem Wildtyp PMP22 stören.

3. Summary

Peripheral myelin protein 22 (PMP22) is a small, hydrophobic glycoprotein that is most prominently expressed by Schwann cells as a component of compact myelin of the peripheral nervous system (PNS). Its gene *pmp22* was independently identified as differentially regulated in various growth states of fibroblasts and after nerve injury.

Functionally, PMP22 is involved in correct myelination during development of peripheral nerves, the stability of myelin, and the maintenance of axons. While most of these functions relate to a role of PMP22 as a structural component of myelin, PMP22 has also been proposed as a regulator of Schwann cell proliferation and differentiation.

The discovery of a point mutation unveiled *pmp22* as the culprit gene for the naturally occurring dysmyelinating mouse mutant *Trembler* (*Tr*). Recent progress in molecular genetics revealed that mutations affecting the *PMP22* gene including duplications, deletions and point mutations are responsible for the most common forms of hereditary motor and sensory neuropathies (HMSN) including Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A), Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies (HNPP) and a subtype of Dejerine-Sottas Syndrome (DSS).

We intended to identify the contribution of an altered function or regulation of mutant PMP22 to possible disease mechanisms. The *Tr* mouse mutant showing alterations in Schwann cell physiology and myelination was chosen as a model organism to investigate the primary consequences of the gene defect on a molecular and cellular level.

An immuno-histochemical analysis of peripheral nerves of eight month-old heterozygous *Tr* mice showed an intracellular accumulation of PMP22-immunoreactive protein in compartments of Schwann cells reminiscent of the ER/Golgi apparatus. This phenomenon appeared to be a consequence of an altered transport of mutant PMP22 protein. In support of this hypothesis, recombinantly expressed *Tr* protein remains mainly retained in the ER

compartment of transfected COS-7 and cultured Schwann cells, most probably due to protein misfolding and/or impaired processing. In the same experimental approach, the Tr protein exhibits a partial dominant-negative effect on protein trafficking of wildtype PMP22 from the ER to the plasma membrane.

In a second round of investigations, we expanded our analysis to a wide variety of mutations that have been identified in human patients diagnosed for CMT1A, severe CMT1A, DSS and a presumed case of recessive CMT1A. Using the same experimental paradigm we could identify improper protein folding and/or impaired processing as the major contributing factor to the disease mechanism underlying human peripheral neuropathies caused by point mutations in the *PMP22* gene. We could further confirm a dominant negative effect on the transport and processing of co-expressed wildtype PMP22 of those mutated PMP22 proteins that are dominantly inherited.