

**Die genetische Variante c.131C>T im humanen *SPG4*-Gen
- Entwicklung eines Detektionsverfahrens und Ermittlung
der Prävalenz in Familien mit einer Hereditären
Spastischen Paraplegie und in Kontrollindividuen -**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Anna Ehram

geboren am 20.07.1980 in Erfurt

Gutachter:

- 1.
- 2.
- 3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

I Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| A | Adenin |
| AAA | ATPase assoziiert mit diversen zellulären Aktivitäten |
| Abb. | Abbildung |
| AD | autosomal dominant |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AR | autosomal rezessiv |
| AV | arterio-venös |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin |
| CCT | craniale Computertomographie |
| CHSP | engl. „complicated“ HSP |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| EMG | Elektromyographie |
| ENG | Elektroneurographie |
| G | Guanin |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HIV | engl. „Human immunodeficiency virus“ |
| HMSN | Hereditäre motorische sensible Neuropathie |
| HSP | Hereditäre spastische Paraplegie |
| IPTG | Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid |
| KIFA5A | engl. „Kinesin family member 5A“ |
| MEP | motorisch evozierte Potentiale |
| MIT | engl. „microtubule-interacting and trafficking molecules“ |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| NIPA | engl. „non-imprinted in Prader-Willi/Angelman“ |
| NES | Nukleäre Exportsignale |
| NLS | Nukleäre Lokalisationsequenzen |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PHSP | engl. „pure“ HSP |
| RFLP | Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus |
| SPG | engl. „spastic paraplegie gene“ |

| | |
|------|-------------------------------------|
| SSEP | somatosensibel evozierte Potentiale |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| Tm | Schmelztemperatur |
| ZNS | Zentralnervensystem |

II Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| I | Abkürzungsverzeichnis | 2 |
| II | Inhaltsverzeichnis | 4 |
| 1. | Einleitung | 7 |
| 1.1. | Hereditäre spastische Paraplegie (HSP) | 7 |
| 1.2. | Formen der HSP | 8 |
| 1.2.1. | Die komplizierte HSP (complicated HSP, CHSP) | 8 |
| 1.2.2. | Die reine HSP (pure HSP, PHSP) | 9 |
| 1.2.2.1. | Klinik | 9 |
| 1.2.2.2. | Pathologie | 10 |
| 1.2.2.3. | Diagnostik | 11 |
| 1.2.2.4. | Differentialdiagnostik | 12 |
| 1.3. | Molekulargenetische Grundlagen der HSP | 14 |
| 1.3.1. | Allgemeines zur Molekulargenetik der HSP | 14 |
| 1.3.2. | X-chromosomale HSP | 16 |
| 1.3.3. | Autosomal rezessive HSP | 16 |
| 1.3.4. | Autosomal dominante HSP | 17 |
| 1.3.5. | Autosomal dominante, <i>SPG4</i> -assoziierte HSP | 18 |
| 1.4. | Der <i>SPG4</i> -Lokus | 18 |
| 1.4.1. | Gen: <i>SPG4</i> | 18 |
| 1.4.2. | Protein: Spastin | 19 |
| 1.4.2.1. | Merkmale des Spastins | 19 |
| 1.4.2.2. | Funktion des Spastins | 20 |
| 1.4.2.3. | Lokalisation des Spastins | 21 |
| 1.4.3. | Mutationen im <i>SPG4</i> | 22 |
| 1.4.3.1. | Mutationsspektrum des <i>SPG4</i> | 22 |
| 1.4.3.2. | Der Nukleotidaustausch c.131C>T im Exon1 des <i>SPG4</i> | 23 |
| 1.5. | Ziele der Arbeit | 24 |
| 2. | Materialien und Methoden | 26 |
| 2.1. | Stichproben | |
| 2.1.1. | AD HSP Probandengruppe | 26 |
| 2.1.2. | Kontrollgruppe | 27 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.2. | Geräte und Verbrauchsmaterialien..... | 27 |
| 2.3. | Chemikalien (alphabetisch)..... | 29 |
| 2.4. | DNA-Präparation..... | 30 |
| | 2.4.1. EDTA-Blut und Chelex-Aufbereitung..... | 30 |
| | 2.4.2. PCR-Produktaufreinigung..... | 31 |
| | 2.4.3. Plasmid-Präparation..... | 31 |
| 2.5. | Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung..... | 31 |
| 2.6. | Polymerasekettenreaktion..... | 32 |
| | 2.6.1. Allgemeines zur Polymerasekettenreaktion..... | 32 |
| | 2.6.2. Primer- und Polymerasetest..... | 32 |
| | 2.6.3. Amplifikation eines definierten DNA-Abschnitts für den RFLP..... | 34 |
| | 2.6.4. Amplifikation von Exon 1 bis 17 (<i>SPG4</i>) zur Mutationssuche mittels DNA-Sequenzanalyse..... | 35 |
| 2.7. | Agarosegelelektrophorese..... | 38 |
| 2.8. | Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)..... | 39 |
| | 2.9.1. Allgemeines zum RFLP..... | 39 |
| | 2.9.2. RFLP mit dem Restriktionsenzym <i>Hinfl</i> | 40 |
| 2.9. | DNA-Klonierung..... | 40 |
| | 2.9.1. Allgemeines zur DNA-Klonierung..... | 40 |
| | 2.9.2. Einbringen der PCR-Produkte in den Vektor pCR®4-Topo..... | 41 |
| | 2.9.3. Transformation des rekombinanten Vektors in kompetente Zellen..... | 42 |
| | 2.9.4. Vermehrung des rekombinanten Plasmids..... | 43 |
| 2.10. | Sequenzierung von DNA..... | 43 |
| | 2.10.1. Allgemeines zur Sequenzierung von DNA..... | 43 |
| | 2.10.2. DNA-Sequenzierung..... | 44 |
| | 2.10.3. Sequenzanalyse durch den DNA-Sequenzierer Long Reader 4200 von Licor..... | 46 |
| 2.11. | In silico Analysen..... | 46 |
| 3. | Ergebnisse..... | 48 |
| | 3.1. Entwicklung eines RFLP-Assays zur Detektion der c.131C>T Variante..... | 48 |
| | 3.2. Sequenzanalyse der identifizierten potentiellen c.131T-Allele..... | 53 |
| | 3.2.1. Weitere DNA-Sequenzanalysen..... | 54 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.3. | Epidemiologie des Nukleotidaustauschs c.131C>T..... | 56 |
| 3.4. | Fallvorstellungen der HSP-Gruppe..... | 58 |
| 3.5. | <i>In silico</i> Analysen zur Aufklärung des Pathomechanismus des Nukleotidaustauschs c.131C>T..... | 61 |
| 4. | Diskussion | 63 |
| 4.1. | Verlässlichkeit des RFLP-Assays..... | 63 |
| 4.2. | c.131T-Allelverteilung..... | 64 |
| 4.3. | Modifizierende Wirkung des c.131T-Allels auf den Phänotyp..... | 65 |
| 4.4. | Schwierigkeiten der Diagnosestellung einer HSP..... | 67 |
| 4.5. | Zuordnung der nachgewiesenen Veränderungen zu möglichen Pathomechanismen..... | 68 |
| 4.5.1. | Haploinsuffizienz und dominant negativer Effekt..... | 68 |
| 4.5.1.1. | Nonsense, splice-site und frame-shift Mutationen..... | 68 |
| 4.5.1.2. | Missense Mutationen..... | 70 |
| 4.5.2. | Abhängigkeit der Wirkung der <i>SPG4</i> -Mutationen von ihrer Lokalisation im <i>SPG4</i> -Gen..... | 72 |
| 4.5.3. | Mögliche Ursachen für den modifizierenden Effekt des c.131C>T Polymorphismus..... | 73 |
| 5. | Schlußfolgerung | 75 |
| 6. | Zusammenfassung | 76 |
| III | Literaturverzeichnis | 78 |
| IV | Danksagung | 88 |
| V | Ehrenwörtliche Erklärung | 89 |
| VI | Lebenslauf | 90 |
| VII | Wissenschaftliche Beiträge | 93 |

1. Einleitung

1.1. **Hereditäre spastischen Paraplegie (HSP)**

Die hereditären spastischen Paraplegien sind eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die auch unter den Synonymen Strümpell-Lorrainsche und Erb-Charcotsche Erkrankung, familiäre spastische Paraplegie (FSP), spastische Spinalparalyse (SSP) und Spastische Paraplegie (SP) bekannt sind.

In den „Beiträgen zur Pathologie des Rückenmarks“ aus dem Jahre 1880 wurden von Adolf von Strümpell erstmals zwei Fälle mit spastischer Gangstörung ausführlich dokumentiert. In den Jahren darauf berichtete er wiederholt von anderen Patienten, die Symptome einer spastischen Paraplegie zeigten. Zudem erwähnte Lorrain 1898 in seiner Dissertation weitere Fälle einer spastischen Paraplegie (siehe Übersichten in Reid 1999, Sauter et al. 2002a).

Die Erkrankung wird in „reine“ und „komplizierte“ Formen eingeteilt (Harding 1984, Fink 1996, Reid 1997). Dabei spricht man von einer „komplizierten“ Form, wenn zusätzlich zu einer progressiven Spastik der unteren Extremität andere neurologische Symptome vorliegen (Harding 1994, Fink et al. 1996, Falco et al. 2004, Nicholas et al. 2004).

Des Weiteren existiert eine Einteilung in die Subtypen I und II. Der Typ I ist durch einen Erkrankungsbeginn vor dem 35. Lebensjahr sowie eine stärkere Spastik als Schwäche der unteren Extremität gekennzeichnet. Der Typ II beginnt erst nach dem 35. Lebensjahr, während es zu einer verstärkten Progression der Erkrankung kommt. Zusätzlich können bei dem Typ II leichte Sensibilitäts- und Blasenentleerungsstörungen auftreten (Harding 1981, Nicholas et al. 2004). Diese Subklassifikation hat sich im klinischen Alltag jedoch nicht durchgesetzt.

Eine sinnvolle Einteilung erfolgt nach den möglichen Vererbungsmodi der HSP. Die HSP kann autosomal dominant, autosomal rezessiv oder x-chromosomal

vererbt werden. Bei der Mehrzahl der HSP Fälle handelt es sich um einen autosomal dominanten Erbgang. Bei den restlichen Stammbäumen erfolgt die Vererbung autosomal rezessiv. Der x-chromosomale Vererbungsmodus tritt nur sehr selten auf (Harding 1993, Reid 1999). Für alle drei Vererbungsformen sind mehrere Genloci bekannt (siehe Tabelle 1.4.).

Zur Epidemiologie der HSP wurden bisher nur wenige Studien durchgeführt. Die Angaben zur Prävalenz in Europa reichen von 0,9 bis 14 Erkrankten pro 100 000 Einwohner (Skre 1974, Werdelin 1986, Polo et al. 1991, Filla et al. 1992, Leone et al. 1995, Silva et al. 1997, McMonagle et al. 2002). Die Schwankung der Angaben mag auf unterschiedliche diagnostische Kriterien, geografische Faktoren und unterschiedliche Studiendesigns zurückzuführen sein (McDermott et al. 2000).

1.2. Formen der HSP

1.2.1. Die komplizierte HSP (complicated HSP, CHSP)

Die komplizierte Form der HSP, ist wie die reine HSP, durch eine prominente spastische Paraparese gekennzeichnet. Zusätzlich wird die Spastik jedoch von zahlreichen weiteren Symptomen begleitet. Diese Symptome sind z.B. Epilepsie, Demenz, Neuropathien des peripheren Nervensystems, geistige Retardierung, Kleinhirnstörungen, Muskelschwund, Hörstörungen, extrapyramidale Störungen, Ichthyosis (Sjörgren-Larsson Syndrom), Depression, Migräne und retinale Veränderungen (Optikusatrophie, retinale Degeneration) (Heinzlef et al. 1998, Webb et al. 1998, McDermott et al. 2000, Reid 2003).

Die CHSP tritt nur selten auf und wird vorwiegend autosomal rezessiv vererbt (Sommerfelt et al. 1991, McDermott et al. 2000, Hughes et al. 2001). Die Vererbung der CHSP kann aber auch autosomal dominant und x-chromosomal erfolgen (Heinzlef et al. 1998, Reid 1999, Mc Dermott et al. 2000, Nielsen et al. 2004).

Ein häufiges Symptom der komplizierten HSP ist die Epilepsie. Hier findet man eine große intrafamiliäre Variabilität der epileptischen Symptome und im erstmaligen

Auftreten eines Krampfanfalls. Die CHSP mit Epilepsie kann autosomal dominant oder rezessiv vererbt werden. Die Epilepsie ist ein Charakteristikum Mitochondrialer Erkrankungen wie der MERRF (M yoklonus Epilepsie mit Ragged Red Fasern), die Symptome ähnlich einer komplizierten HSP zeigen. Mittlerweile konnte für verschiedene *SPG*-Loci eine Assoziation zu mitochondrialen Funktionen nachgewiesen werden (McDermott et al. 2000, Reid 2003, siehe auch 1.3.).

Ein weiteres bei der CHSP vorkommendes Symptom ist die Demenz. Sie tritt entweder isoliert oder mit mehreren der oben genannten Symptome in denjenigen CHSP Familien auf, welche eine autosomal dominante oder rezessive Vererbung zeigen. Der komplizierte Phänotyp einer HSP mit Demenz ist durch die Abwesenheit einer Agnosie, Aphasie und Dyscalculie gekennzeichnet; dies entspricht einer subcorticalen Demenz (Heinzlef et al. 1998, Webb et al. 1998, Mc Dermott et al. 2000). Begleitsymptom kann zudem eine Muskelatrophie der kleinen Handmuskeln oder der peronealen Muskulatur sein (Webb et al. 1998, McDermott et al. 2000).

Zur komplizierten HSP gehören auch das Troyer Syndrom, das MASA-Syndrom, die spastische Ataxie vom Typ Charlevoix-Saguenay, das MAST-Syndrom und das Kjellin-Syndrom (Reid 1999, McDermott et al. 2000). Einige Differentialdiagnosen der komplizierten HSP sind in der Tabelle 1.3. aufgelistet.

1.2.2. Die reine HSP (pure HSP, PHSP)

Die PHSP ist in etwa dreimal so häufig wie die CHSP (Harding 1993). Etwa 70 bis 80% der PHSP Familien zeigen einen autosomal dominanten Erbgang (Nicholas et al. 2004). Die restlichen Fälle zeigen entweder einen x-chromosomalen oder einen autosomal rezessiven Erbgang, wobei der letztere häufiger auftritt (Reid 1999).

1.2.2.1. Klinik

Das Leitsyndrom der Erkrankung ist die spastische Lähmung der unteren Extremität. Die Lähmung beginnt oft schleichend und ist langsam progredient (Fink et al. 1996, Falco et al. 2004, Nicholas et al. 2004). Das Erkrankungsalter reicht von der frühen Kindheit bis in die 7. Lebensdekade, wobei im Hauptteil der Fälle die

Erkrankung um das 45. Lebensjahr beginnt (Fonknechten et al. 2000). Der Schweregrad der Erkrankung reicht von asymptomatischen Fällen (10-20%) bis zur Behinderung mit Rollstuhlabhängigkeit (10-20%) (Reid 1999).

In der neurologischen Untersuchung von PHSP Patienten finden sich eine Hyperreflexie und spastische Tonuserhöhung der unteren Extremität. Wenn eine Parese der unteren Extremität vorhanden ist, dann ist in der Regel die Spastik stärker ausgeprägt als die Parese (Dürr et al. 1994, Reid 1999, Fonknechten et al. 2000, Orlacchio et al 2004). Als Zeichen einer Adduktorenspastik besteht häufig der „Scherengang“. In geringerer Ausprägung findet sich auch an der oberen Extremität eine Erhöhung der Muskeleigenreflexe (Reid 1999). Insbesondere nach längerer Krankheitsdauer kann an den unteren Extremitäten eine leichte distal betonte Muskelatrophie bestehen (Dürr et al. 1994, McDermott et al. 2000). In 30 bis 50 % der Fälle finden sich ein Hohlfuß oder andere Fußdeformitäten (Reid 1999). Zusätzlich können Pyramidenbahnzeichen positiv ausfallen (Polo et al. 1993, Reid 1999, Fonknechten et al. 2000, Nicholas et al. 2004). Seltener liegen Zeichen einer zerebellären Mitbeteiligung (leichte Dysdiadochokinese) vor. Ein Teil der Patienten (20-65%) zeigt leichte Sensibilitätsstörungen, wie z.B. ein reduziertes Vibrationsempfinden sowie seltener eine reduzierte Temperaturwahrnehmung und Tiefensensibilität (Reid 1999, Fonknechten et al. 2000, McDermott et al. 2000, Nicholas et al. 2004). Bei vielen Patienten bestehen Blasenfunktionsstörungen im Sinne einer Polliakisurie, Dranginkontinenz oder eines imperativen Harndrangs (Polo et al. 1993, Reid 1999, Chinnery et al. 2004). Defäkations- und Erektionsstörungen sind selten (Mc Dermott et al. 2000).

1.2.2.2. Pathologie

Das pathologisch-anatomische Korrelat reiner HSP-Formen ist die vorzugsweise distale Degeneration langer motorischer und sensibler Axone des kortikospinalen Traktes (deszendierend) und der Hinterstränge (aszendierend). Es sind vor allem die kreuzenden und nicht-kreuzenden kortikospinalen Bahnen zur unteren Extremität und des Fasciculus gracilis betroffen. Es können zusätzlich in geringerem Maße auch die spinocerebellären Bahnen beeinträchtigt sein (Reid 1999, Fonknechten et al. 2000, McDermott et al. 2000, Fink 2004).

All diese Veränderungen sind durch ein so genanntes „dying back“ der Axone gekennzeichnet. Dies bedeutet, dass die axonale Degeneration am distalen Ende beginnt, und der Zellkörper vorerst intakt bleibt. Begleitet wird dies von einer mikroglialen Reaktion und Demyelinisierung. Spinalganglien, periphere Nerven und Hinterwurzeln sind neuropathologisch unauffällig (McDermott et al. 2000, White et al. 2000, Wharton et al. 2003).

1.2.2.3. Diagnostik

Die Diagnose einer reinen HSP ergibt sich aus den entsprechenden klinischen Untersuchungsbefunden der Patienten und einer positiven Familienanamnese. Der schleichende Beginn der Erkrankung und das unterschiedliche subjektive Krankheitsempfinden machen eine Diagnosestellung sehr schwierig. Etablierte diagnostische Kriterien für eine reine HSP sind in der Tabelle 1.1. zusammengestellt.

Tabelle 1.1.: Diagnostische Kriterien für Angehörige einer Familie mit reiner HSP (Nach Reid 1999 und McDermott et al. 2000).

| Status | Kriterien | |
|--------------------------------|--|---|
| gesichert betroffen | <ul style="list-style-type: none"> • progressive Gangstörungen • Spastik, Hyperreflexie, Tonuserhöhung der unteren Extremität • positives Babinski Zeichen | zusätzlich: <ul style="list-style-type: none"> • Schließmuskelfehlfunktion • Hohlfuß • Zeichen einer Störung der Hinterstränge • Hyperreflexie der oberen Extremität • Dysmetrie |
| wahrscheinlich betroffen | <ul style="list-style-type: none"> • nicht gesicherte Gangstörung oder Individuen mit Zeichen einer spastischen Paraparese und ohne erwiesene Gangstörung • Spastik, Hyperreflexie, Tonuserhöhung der unteren Extremität • positives Babinski Zeichen | |
| möglich betroffen | <ul style="list-style-type: none"> • asymptomatisch • normaler Gang • milder Hyperreflexie, milder Tonuserhöhung • angedeutetes Babinski Zeichen | |
| wahrscheinlich nicht betroffen | <ul style="list-style-type: none"> • asymptomatisch • unauffälliger neurologischer Befund • geringeres Lebensalter als spätester Krankheitsbeginn in der Familie | |
| gesichert nicht betroffen | <ul style="list-style-type: none"> • asymptomatisch • unauffälliger neurologischer Befund • höheres Lebensalter als spätester Krankheitsbeginn in der Familie | |

Neurologische Untersuchungen dienen der Diagnosesicherung und dem Ausschluss von Differentialdiagnosen. Im MRT zeigen sich Verschmälerungen des Spinalmarks, vorzugsweise cervikal und thorakal, und des Corpus callosum (Krabbe et al. 1996, Nielsen et al. 1998, Reid 1999, Mc Dermott et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Atrophie des Rückenmarks zum Teil vom betroffenen Genlokus abhängt (Hedera et al. 2005). Verschmälerungen des Corpus callosum werden ebenfalls in komplizierten HSP Fällen gefunden (Casali et al. 2004, Winner et al. 2004) (siehe auch 1.3.). Außerdem werden Läsionen der weißen Substanz des Großhirns beschrieben (Krabbe et al. 1996, Nielsen et al. 1998).

Untersuchungen der peripheren und zentralen Leitgeschwindigkeiten von sensiblen und motorischen Nerven ergeben bei autosomal dominanten HSP Patienten ohne Assoziation zum *SPG4*-Lokus häufig pathologische Werte im Sinne einer axonalen Degeneration (verbreitertes Muskelaktionspotential vermindertes Amplitude) (Schulte et al. 2003). Die MEP und SSEP der unteren Extremitäten können ebenfalls pathologisch verändert sein (Nielsen et al. 1998, Reid 1999, Mc Dermott et al. 2000, Schulte et al. 2003).

Die im Einzelnen durchgeführten neurologischen Untersuchungen variieren stark von Studie zu Studie; dies ist auf konzeptionelle Unterschiede in den Studien zurückzuführen und erschwert damit die Erstellung eines einheitlichen klinisch-diagnostischen Gesamtbildes (Reid 1999).

1.2.2.4. Differentialdiagnostik

Vor allem bei Fällen mit unklarer Familiengeschichte gestaltet sich die Diagnosestellung schwierig. Die hereditäre spastische Paraplegie stellt in diesen Fällen eine Ausschlussdiagnose dar. Wichtige klinische Befunde, die für oder gegen eine HSP sprechen sind in den Tabelle 1.1. und 1.2. zusammengestellt.

Aus klinischer Sicht ist es wichtig, behandelbare Krankheiten und Erkrankungen mit einer anderen Prognose auszuschließen (Reid 1999, McDermott et al. 2000, Visbeck 2001). In der Tabelle 1.3. sind Differentialdiagnosen der HSP und weiterführende diagnostische Maßnahmen aufgelistet.

Tabelle 1.2.: Klinische Befunde, die eher für eine Alternativdiagnose (nicht HSP) sprechen (nach McDermott et al. 2000)

| Klinischer Befund | |
|---------------------------------|---|
| seltener mit HSP assoziiert | <ul style="list-style-type: none"> • Parese der oberen Extremität • distal betonte Muskelatrophie |
| Hinweise für Alternativdiagnose | <ul style="list-style-type: none"> • stärkere Parese als Spastik • prominente Ataxie • prominente Atrophie • vor allem obere Extremität betroffen • periphere Neuropathie • retinale Pigmentierung • extrapyramidale Zeichen |

Tabelle 1.3.: Differentialdiagnosen der HSP (nach Visbeck 2001)

| Einteilung | Erkrankung | Diagnostik |
|--|--|--|
| degenerative Erkrankungen | • amyotrophe Lateralsklerose (initial spastische Form) | • EMG, ENG |
| | • HMSN V * | • EMG, ENG |
| | • spastische Ataxie, SCA3/ Machado-Joseph-Erkrankung * | • genetische Diagnostik |
| | • L-Dopa-responsive Dystonie | • Gabe von L-Dopa |
| | • Hallervorden-Spatz-Erkrankung * | • MRT, Histologie |
| strukturelle Veränderungen des Schädels und des Spinalkanals | • zervikale Myelopathie | • MRT, Myelographie |
| | • spinale Raumforderungen (z.B. Neurinom, Meningeom) | • MRT, Myelographie |
| | • Tethered-cord-Syndrom | • MRT |
| | • spinale AV-Malformation | • MRT, Myelographie, Angiographie, EMG |
| | • zerebrale parasagittale Raumforderung | • CCT, MRT |
| | • Syringomyelie | • MRT |
| entzündliche Erkrankungen | • Fehlbildungen der okzipitozervikalen Übergangsregion | • CCT, MRT |
| | • Multiple Sklerose | • MRT, Liquorpunktion (oligonukleäre Banden), Elektrophysiologie |
| | • chronische Borelliose | • Liquorpunktion, MRT, Serologie |
| | • HTLV1-assoziierte Myelitis (Human T lymphotropic virus type 1 – tropische spastische Paraparese) | • HTLV1-Antikörper, MRT |
| | • HIV-assoziierte vakuoläre Myelopathie | • HIV-Antikörper, MRT |
| erbliche metabolische Erkrankungen | • Meningomyelitis syphilitica | • TPHA, Liquorpunktion |
| | • Adrenomyeloneuropathie (Adrenoleukodystrophie) * | • überlangkettige Fettsäuren (VLCFA), MRT |
| | • Mitochondropathie * | • Laktat (Blut/Liquor), Muskelbiopsie |
| | • metachromatische Leukodystrophie (Erwachsenen- und Kindesalter) * | • MRT, Arylsulfatase, Suralisbiopsie |
| | • globoidzellige Leukodystrophie * | • MRT, Cerebrosid-beta-Galaktosidase |
| | • G _{M2} -Gangliosidose * | • Hexosaminidase A, B |
| | • Abetalipoproteinämie * | • Serumlipide, Lipielektrophorese, Blutbild |

| | | |
|-------------------------------------|--|--|
| erworbene metabolische Erkrankungen | <ul style="list-style-type: none"> • funikuläre Myelose • Folsäuremangel • Vitamin-E-Mangel | <ul style="list-style-type: none"> • Serum-VitaminB12-spiegel, BB, Schilling-Test • Serum-Folsäurespiegel • Vitamin-E-Serumspiegel, Vitamin-E- / Lipid-Konzentration im Serum |
| neurotoxische Syndrome | <ul style="list-style-type: none"> • Konzo • Lathyrismus | <ul style="list-style-type: none"> • Anamnese (endemisch in Afrika) • Anamnese (endemisch in Indien) |
| sonstiges | <ul style="list-style-type: none"> • infantile Zerebralparese | <ul style="list-style-type: none"> • CCT, MRT |

mit * gekennzeichnete Erkrankungen sind Differentialdiagnosen für eine komplizierte HSP; TPHA: Treponema pallidum – Hämagglutinationstest; VLCFA: engl. "very long chain fatty acids"

1.3. Molekulargenetische Grundlagen der HSP

1.3.1. Allgemeines zur Molekulargenetik der HSP

Die klinische Heterogenität geht mit einer ausgeprägten genetischen Heterogenität einher – beide Formen, die PHSP und die CHSP, sind genetisch komplex. Bisher konnten 28 Genloci und 11 Gene identifiziert werden, die für eine HSP verantwortlich sind (Orlacchio et al. 2005; abzurufen unter: HUGO Gene Nomenclature Committee <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>). Die einzelnen Genloci wurden nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert und benannt (engl. spastic paraplegia gene; *SPG1* bis *SPG29*, *SPG18* und *22* reserviert) (Blumen et al. 2003, Fink 2003, Patrono et al. 2005). In der Tabelle 1.4. ist der aktuelle Stand der bekannten genetischen Grundlagen zusammengefasst.

Tabelle 1.4.: Genetische Klassifikation der HSP (modifiziert nach Reid 2003)

| Lokus | chrom. Lokalisation | Genprodukt | Vererbung | Form |
|-------|---------------------|------------|----------------------|--|
| SPG1 | Xq28 | L1-CAM | x-chrom. | kompliziert (Jouet et al. 1994, Schrandt-Stumpler et al. 1995) |
| SPG2 | Xq22 | PLP1 | x-chrom. rezessiv | Rein, kompliziert (Pelizaeus-Merzbacher Krankheit) (Hodes et al. 1993) |
| SPG3A | 14q11-q21 | Atlastin | ad | Rein (Zhao et al. 2001) |
| SPG4 | 2p21-p22 | Spastin | ad | Rein, kompliziert |
| SPG5 | 8p12-q13 | - | ar | Rein (Hentati et al. 1994) |
| SPG6 | 15q11.1 | NIPA1 | ad | Rein (Rainier et al. 2003) |
| SPG7 | 16q24.3 | Paraplegin | ar | Rein, kompliziert (Casari et al. 1998) |
| SPG8 | 8q23-q24 | - | ad | Rein |

| | | | | |
|-------|------------------------------------|-----------|----------|--|
| SPG9 | 10q23.3-q24.1 | - | ad | Kompliziert |
| SPG10 | 12q13 | KIF5A | ad | Rein (Reid et al. 2002) |
| SPG11 | 15q13-q15 | - | ar | Rein, kompliziert (HSP-TCC) |
| SPG12 | 19q13 | - | ad | Rein |
| SPG13 | 2p33.1 | HSP60 | ad | Rein (Hansen 2002) |
| SPG14 | 3q27-q28 | - | ar | Kompliziert |
| SPG15 | 14q22-q24 | - | ar | Kompliziert (Kjellin-Syndrom) |
| SPG16 | Xq11.2 | - | x-chrom. | Rein, kompliziert |
| SPG17 | 11q12-q14 | Seipin | ad | Kompliziert (Silver-Syndrom) (Windpassinger et al. 2004) |
| SPG18 | reserviert | - | - | - |
| SPG19 | 9q33-q34 | - | ad | Rein |
| SPG20 | 13q12.3 | Spartin | ar | Kompliziert (Troyer-Syndrom) (Patel et al. 2002) |
| SPG21 | 15q22.31 | Maspardin | ar | Kompliziert (MAST-Syndrom) (Simpson et al. 2003) |
| SPG22 | reserviert | - | - | - |
| SPG23 | 1q24-q32 | - | ar | Kompliziert (Lison-Syndrom) (Blumen et al. 2003) |
| SPG24 | 13q14 | - | ar | rein (Hodgkinson et al. 2002) |
| SPG25 | 6q23.3-q24.1 | - | ar | rein (Zortea et al. 2002) |
| SPG26 | 12p11.1.-12q14 | n.a. | n.a. | n.a. (Wilkinson et al. 2005) |
| SPG27 | 10q22.1-q24.1. (Überhang: SPG9) | - | ar | Rein (Meijer et al. 2004) |
| SPG28 | 14q21.3-q22.3 | - | ar | Rein (Bouslam et al. 2005) |
| SPG29 | 1p31.1-1p21.1 | - | ad | kompliziert (Orlacchio et al. 2005) |

ad: autosomal dominant; ar: autosomal rezessiv; HSP-TCC: HSP-Thin Corpus Callosum); PLP: Proteolipoprotein; n.a.: nicht angegeben.

1.3.2. X-chromosomale HSP

Bis jetzt konnten drei Genorte (*SPG1*, *SPG2* und *SPG16*) identifiziert werden, die durch einen x-chromosomalen Erbgang gekennzeichnet sind. Der Phänotyp entspricht dem der komplizierten Form der HSP mit den jeweiligen Begleitsymptomen. Die Gene *SPG1* und *SPG2* konnten identifiziert werden (Tab. 1.4.).

Tabelle 1.5.: Funktion bereits bekannter Genprodukte einer x-chromosomalen HSP

| Gen/ Lokus | Genprodukt | Funktion und Besonderheiten |
|---------------|------------|--|
| <i>SPG1</i> | L1-CAM | <ul style="list-style-type: none"> • neuronales Zelladhäsionsmolekül • axonales Glykoprotein zuständig für neuronale Migration und Neuritenwachstum (Jouet et al. 1994) • CRASH-Syndrom (<u>C</u>orpus callosum Hypoplasie, <u>R</u>etardierung, <u>a</u>dduzierte Daumen, <u>S</u>pastische Paraplegie, <u>H</u>ydrozephalus) (Crosby et al. 2002) |
| <i>SPG2</i> | PLP1 | <ul style="list-style-type: none"> • PLP1 (<u>P</u>roteo<u>l</u>ipoprotein) ist ein Myelinprotein (Hodes et al. 1993) • PLP1 ist mutiert in CHSP und selten in PHSP |

1.3.3. Autosomal rezessive HSP

Für autosomal rezessive Formen der HSP konnten mittlerweile 12 Genloci ermittelt werden (s. Tab. 1.4.; *SPG5*, *SPG7*, *SPG11*, *SPG14*, *SPG15*, *SPG20*, *SPG21*, *SPG23*, *SPG24*, *SPG25*, *SPG27*, *SPG28*). Für diese Gruppe sind bisher nur die Gene *SPG7* (Paraplegin), *SPG20* (Spartin) und *SPG21* (Maspardin) identifiziert (Tab. 1.6.).

Tabelle 1.6.: Funktion bereits bekannter Genprodukte einer autosomal rezessiven HSP

| Gen/ Lokus | Genprodukt | Funktion und Besonderheiten |
|---------------|------------|--|
| <i>SPG7</i> | Paraplegin | <ul style="list-style-type: none"> • mitochondriale Metalloprotease • AAA-Protein (ATPase assoziiert mit diversen zellulären Aktivitäten) • Es wird angenommen, dass verändertes Paraplegin eine Akkumulation von falsch synthetisierten mitochondrialen Proteinen verursacht und damit über eine veränderte Zellatmung zu einer axonalen Degeneration führt. (Casari et al. 1998, Reid 2003) |
| <i>SPG20</i> | Spartin | <ul style="list-style-type: none"> • intrazellulärer Transport • eventuell endozytotische und mitogenetische Mechanismen (Bakowska et al. 2005) |
| <i>SPG21</i> | Maspardin | <ul style="list-style-type: none"> • intrazellulärer Proteintransport • der <i>SPG21</i>-Lokus beinhaltet drei Gene, eines davon kodiert Maspardin (Mast-Syndrom, Spastische Paraplegie, autosomal rezessiv mit Demenz) (Simpson et al. 2003) |

Mutationen in den Genen *SPG7*, *SPG11*, *SPG14*, *SPG15*, *SPG20*, *SPG21* und *SPG23* führen zu einer komplizierten HSP. Die Loci *SPG7* und *SPG11* sind sowohl mit einer komplizierten als auch einer reinen HSP assoziiert.

1.3.4. Autosomal dominante HSP

Die größte Gruppe bildet, wie bereits erwähnt, die autosomal dominante hereditäre spastische Paraplegie (ADHSP). Hier konnten bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt Kopplungen zu folgenden Loci ermittelt werden: *SPG3A*, *SPG4*, *SPG6*, *SPG8*, *SPG9*, *SPG10*, *SPG12*, *SPG13*, *SPG17*, *SPG19* und *SPG29*. Als Gene sind das *SPG17*- (Seipin), das *SPG13*- (HSP60), das *SPG10*- (KIF5A), das *SPG6*- (NIPA1), das *SPG3A*- (Atlastin) und das *SPG4*-Gen (Spastin) bekannt (Tab. 1.7.).

Tabelle 1.7.: Funktion bereits bekannter Genprodukte einer autosomal dominanten HSP

| Gen/ Lokus | Genprodukt | Funktion und Besonderheiten |
|---------------|------------|--|
| <i>SPG3A</i> | Atlastin | <ul style="list-style-type: none"> • intrazellulärer Vesikeltransport • GTPase mit strukturellen Homologien zur Dynamin-Proteinfamilie • Verantwortlich für 10% aller reinen ADHSP Fälle - mit Beginn in Kindheit (Zhao X et al. 2001, Reid 2003) |
| <i>SPG4</i> | Spastin | <ul style="list-style-type: none"> • Siehe Kapitel 1.4. |
| <i>SPG6</i> | NIPA1 | <ul style="list-style-type: none"> • <i>SPG6</i>-Locus enthält u. a. das <i>NIPA1</i>-Gen (<u>n</u>on-<u>i</u>mprinted in <u>P</u>rader-<u>W</u>illi/<u>A</u>ngelman loci 1) • Putativer Membrantransporter oder -rezeptor (Rainer et al. 2003) |
| <i>SPG10</i> | KIF5A | <ul style="list-style-type: none"> • KIF5A (Kinesin family member 5A) ist Bestandteil eines Motorproteinkomplexes • schneller anterograde axonaler Transport entlang von Mikrotubuli (Reid et al. 2002, Fichera et al. 2004). |
| <i>SPG13</i> | HSP60 | <ul style="list-style-type: none"> • HSP60 (Hitzeschockprotein 60, mitochondriales Chaperon) mit bisher unklarer Funktion (Reid 2003) |
| <i>SPG17</i> | Seipin | <ul style="list-style-type: none"> • Seipin ist ein integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums unbekannter Funktion (Windpassinger et al. 2004) |

Mutationen in den Genloci *SPG9*, *SPG17*, *SPG29* und *SPG4* führen zu einer komplizierten ADHSP. Die restlichen Genorte sind für eine reine ADHSP verantwortlich.

Eine Zuordnung eines bestimmten Phänotyps zu einem bestimmten Locus ist nur schwer möglich - Phänotyp-Genotyp-Korrelationen bei ADHSP gestalten sich schwierig (Dürr et al. 1994, Reid 1999, Fink 2004).

1.3.5. Autosomal dominante, *SPG4*-assoziierte HSP

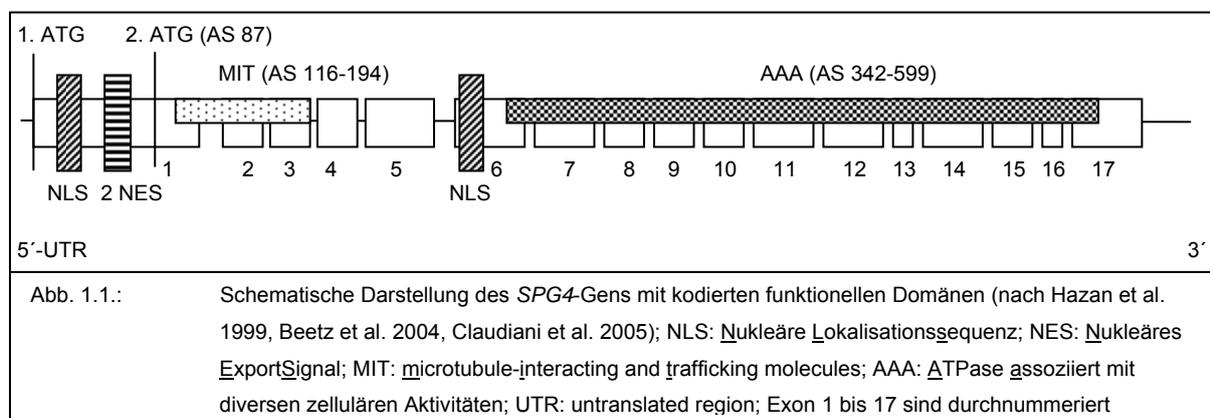
Ungefähr 40% aller autosomal dominanten PHSP Fälle zeigen eine Assoziation zum *SPG4*-Locus (Fonknechten et al. 2000). Mutationen im *SPG4*-Gen können somit als eine Art Prototyp für die reine ADHSP gelten. Im Gegensatz zu ADHSP Patienten mit Mutationen in anderen Genloci, fallen ADHSP *SPG4*-Patienten allerdings nicht durch pathologische Nervenleitgeschwindigkeiten und MEPs in neurologischen Untersuchungen auf (Reid 1999, Mc Dermott et al. 2000, Bönsch et al. 2003, Schulte et al. 2003). Bezüglich des Beginns und des Schweregrads der Erkrankung ist die autosomal dominante *SPG4*-assoziierte HSP, wie die anderen Formen der HSP auch, durch eine starke intrafamiliäre Heterogenität gekennzeichnet (Reid 1999, Fink 2004).

Der *SPG4*-Lokus kann in Ausnahmefällen mit einer komplizierten HSP assoziiert sein. Begleitsymptome der ADCHSP sind beispielsweise (subcorticale) Demenz, Epilepsie (Byrne et al. 1998, Heinzlef et al. 1998, White et al. 2001) sowie cerebelläre Ataxie, Migräne und Dysarthrie (Nielsen et al. 2004).

1.4. Der *SPG4*-Lokus

1.4.1. Gen: *SPG4*

Als krankheitsassoziiert auf dem *SPG4*-Lokus wurde ein bis dahin unbekanntes Gen identifiziert, welches den Namen *SPG4* oder *SPAST* erhielt. Das *SPG4*-Gen umfasst 17 Exons bei einer Größe von etwa 90kb. Es ist auf dem Chromosom 2p21-p22 lokalisiert (Hazan et al. 1999, McDermott et al. 2000). Regionen im *SPG4*-Gen, die für wichtige funktionelle Domänen des Spastins kodieren sind in der Abbildung 1.1. dargestellt.



Es konnten verschiedene, natürlich vorkommende Spleiß-Varianten des *SPG4*-Gens nachgewiesen werden; diesen fehlt entweder das Exon 4, 8 oder 15 (Svenson et al. 2001). Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass zwei verschiedene Startcodons genutzt werden, was in einer längeren cytoplasmatischen und einer kürzeren cytoplasmatisch-nukleären Variante des Spastins resultiert (Claudiani et al. 2005).

1.4.2. Protein: Spastin

1.4.2.1. Merkmale des Spastins

Spastin ist ein Protein der AAA-Familie (ATPase assoziiert mit diversen zellulären Aktivitäten) (Hazan et al. 1999). Es besteht aus 616 Aminosäuren und besitzt am C-Terminus eine konservierte AAA- (AS 342-599) und am N-Terminus eine MIT-Domäne (AS 116-194) (Ciccarelli 2003).

AAA-Proteine sind am ATP-abhängigen Abbau von Protein-Komplexen, am Zellzyklus und an vielen anderen zellulären Prozessen beteiligt. Die AAA-Domäne enthält neben den Walker A (ATP-Bindungsstelle) und B (Mg^{2+} -Bindungsstelle) - Motiven, Leucin-Zipper-Motive und eine Helix-Loop-Helix-Dimerisierungsdomäne (Hazan et al. 1999). Ihre spezifische Funktion ist von der Art des Bindungspartners am N-Terminus des Proteins abhängig (Dougan et al. 2002, Errico et al. 2002, Claudiani et al. 2005). *In vitro* Daten legen nahe, dass Spastin als Multimer funktionell ist (Errico et al. 2002, Baas et al. 2005).

1.4.2.2. Funktion des Spastins

Die Funktion von Spastin wurde an verschiedenen biologischen Systemen untersucht. Man nimmt an, dass Spastin am Um- und Abbau von Mikrotubuli beteiligt ist. Mikrotubuli dienen als Leitschienen dem axonalen Transport von Vesikeln, Endosomen und Zellorganellen. Entsprechend ihrer Funktionen unterliegen Mikrotubuli ständig starken Veränderungen bezüglich ihrer Organisation und Verteilung (Hirokawa et al. 2005).

In verschiedenen Zelllinien konnte ein Mikrotubuliabbau durch überexprimiertes Wildtyp-Spastin gezeigt werden (McDermott et al. 2003; Schickel et al. 2006). Dass überexprimiertes Spastin dabei, wie andere AAA-Proteine auch, über seinen N-Terminus mit den Mikrotubuli interagiert, konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Errico et al. 2004). Man nimmt außerdem an, dass diese Interaktion durch die ATPase Aktivität (ATP-Bindung und Hydrolyse) der AAA-Domäne reguliert wird (Evans et al. 2005).

Zudem wurde bei Untersuchungen an Neuronen festgestellt, dass endogenes Spastin in Zellregionen angereichert ist, die durch gesteigerte Umbauprozesse des Zytoskeletts gekennzeichnet sind. Dabei ist Spastin in mitotisch aktiven Zellen ein Bestandteil des Zentromers. In postmitotischen Neuronen liegt es vermehrt in den Wachstumskegeln vor. Diese Lokalisation könnte mit der Degeneration der Axone, bei Vorliegen von mutiertem Spastin, in Zusammenhang stehen (Errico et al. 2004, Svenson et al 2005).

Eine weitere Bestätigung für die Regulierung der Mikrotubulistabilität durch Spastin wurde in Studien gefunden, die die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als biologisches System zur Untersuchung der Spastinfunktion verwendeten (Tang Sherwood et al. 2004, Roll-Mecak et al. 2005). Überraschenderweise zeigten die Mutanten einer Studie mit funktionslosem Spastin, entgegen der bisherigen Hypothese, eine Verringerung der Zahl der Mikrotubulibündel (Sherwood et al. 2004).

Des Weiteren spielt Spastin wahrscheinlich eine Rolle beim Transport von Endosomen und Vesikeln. Dies begründet sich darin, dass die bereits erwähnte MIT-Domäne mit CHMP1B, einem Protein des ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)-III-Komplexes, zusammenwirkt (Reid et al 2004). Für diesen Komplex wird eine Aufgabe beim intrazellulären Transport angenommen (Takasu et al. 2005). Eine MIT-Domäne wird auch in anderen Proteinen, wie z.B. SKD1, SNX15 u.a. gefunden, die ebenfalls in die Endozytose und Transportvorgänge involviert sind (Cicarelli et al. 2003). Spartin, das Genprodukt des *SPG20*-Lokus ist (siehe 1.3.), enthält ebenfalls eine MIT-Domäne. Man geht in diesem Fall und im Fall des Spastins davon aus, dass Defekte des intrazellulären Transports der HSP-assoziierten Motorneuronendegeneration zu Grunde liegen können (Reid et al. 2004).

Es wird dementsprechend einerseits die Hypothese untersucht, ob und in wie weit mutiertes Spastin die Mikrotubuli-Assemblierung und -Disassemblierung verändert, und damit ursächlich für eine HSP ist. Oder aber andererseits der fehlende oder fehlerhafte intrazelluläre Stoff- und Organellentransport die Ursache für eine HSP darstellt. Der fehlerhafte Stofftransport könnte zu einer Degeneration des distalen Anteils der langen Axone der kortikospinalen Bahnen führen, denn

dieser distale Anteil ist wahrscheinlich besonders abhängig von einem axonalen Transport (McDermott et al. 2003, Svenson et al. 2004, Baas et al. 2005).

1.4.2.3. Lokalisation des Spastins

Spastin ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, das in Geweben des ZNS besonders stark exprimiert wird (Wharton et al. 2003). Endogenes Spastin konnte in Neuronen, aber nicht in Gliazellen, identifiziert werden (Charvin et al. 2003). Es ist sowohl im Zellplasma, als auch im Kern lokalisiert. Dabei zeigte sich in verschiedenen Immunfärbungen, dass Spastin, auch in proliferierenden Zellen, überwiegend im Kern vorhanden ist (Charvin et al. 2003, Wharton et al. 2003, Beetz et al. 2004, Errico et al. 2004). Im Gegensatz dazu wird überexprimiertes Wildtyp-Spastin vor allem als diskrete perinukleäre Punkte im Zytoplasma vorgefunden (Errico et al. 2002, McDermott et al. 2003, Reid et al. 2004, Claudiani et al. 2005).

Die nukleäre Lokalisation des Spastins erfolgt durch zwei unabhängige funktionelle nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS; AS 7-11 und AS 309-312) (Beetz et al. 2004). Die NLS vermitteln einen Übertritt des Spastins in den Kern. Beide NLS sind in der Abbildung 1.1. dargestellt (Hazan et al. 1999, Beetz et al. 2004). Die Mechanismen für die Regulierung der Lokalisation im Kern bzw. Cytoplasma sind größtenteils ebenfalls geklärt. Es existieren zwei Translationsstarts innerhalb des Exon1 des *SPG4*-Gens. So entstehen zwei Isoformen des Spastins mit den Größen von 60 und 68 kDa. Beide Formen werden in den Kern importiert. Allerdings enthält die 68 kDa große Form zwei NES (Nukleäre Exportsignale; AS 59-75), die den Export in das Zytoplasma effizienter gestalten (siehe Abbildung 1.1.). Die 68 kDa Form wird hauptsächlich im Gehirn und Rückenmark gefunden (Claudiani et al. 2005). Spastin scheint somit Funktionen im Plasma und im Kern zu haben.

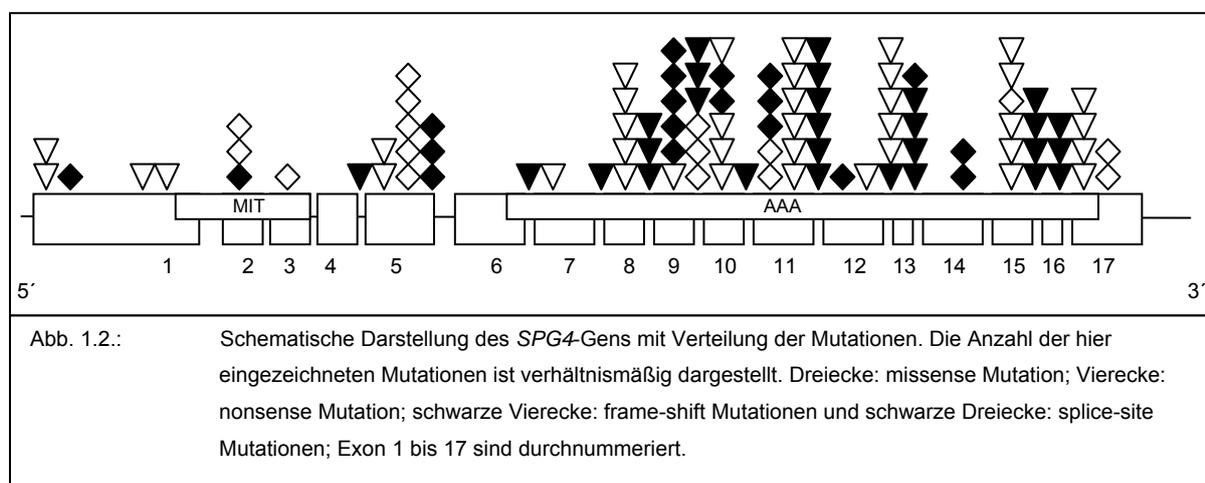
1.4.3. Mutationen im *SPG4*

1.4.3.1. Mutationsspektrum des *SPG4*

Mittlerweile konnten über 170 Mutationen im *SPG4*-Gen identifiziert werden. Dabei handelt es sich um missense, nonsense, splice-site Mutationen, Insertionen

und Deletionen, die entweder direkt oder indirekt die AAA-Domäne betreffen (Hazan et al. 1999, Burger et al. 2000, Fonknechten et al. 2000, Lindsey et al. 2000, Svenson et al. 2001, Proukakis et al. 2003, Svenson et al. 2004, Depienne et al. 2005, Patrono et al. 2005 sowie zahlreiche kleinere Studien). Die Nomenklatur der in dieser Arbeit genannten Mutationen erfolgt nach: <http://www.hgvs.org/mutnomen/>.

Nonsense und splice-site (frame-shift) Mutationen sind im ganzen *SPG4*-Gen verteilt. Die Mehrzahl der bekannten missense Mutationen betrifft dagegen die Region im *SPG4*-Gen, die für die AAA-Domäne kodiert (Fonknechten et al. 2000, Svenson et al. 2001, Charvin et al. 2003, Depienne et al. 2005, Patrono et al. 2005).



Mittlerweile konnten allerdings einige Basensubstitutionen am N-Terminus des Spastins nachgewiesen werden. Eine davon führt zum Aminosäureaustausch p.44S>L (c.131C>T). Darüber hinaus wurden zwei direkt benachbarte Basensubstitutionen (c.127G>C - p.E43Q, c.134C>A - p.P45Q) identifiziert, die sich wie der Nukleotidaustausch c.131C>T nicht nur in der Lokalisation im *SPG4*-Gen sondern auch in der Klinik von den anderen Mutationen unterscheiden (Svenson et al. 2004, Depienne et al. 2005).

1.4.3.2. Der Nukleotidaustausch c.131C>T im Exon 1 des *SPG4*

Erstmals wird der Nukleotidaustausch c.131C>T, der zum Aminosäureaustausch p.44S>L führt, im Jahr 2000 von Lindsey und Kollegen als missense Mutation beschrieben. Für das c.131T-Allel nimmt man in dieser Arbeit

einen rezessiven Erbgang an, da das Allel homozygot vorliegt und Verwandte ersten und zweiten Grades nicht betroffen sind (Lindsey et al. 2000).

Im Gegensatz dazu beschreiben Chinnery und Kollegen den Fall einer infantilen HSP, die sie auf den co-dominanten Effekt zweier Mutationen zurückführen; von denen eine der beiden Mutationen ist der Nukleotidaustausch c.131C>T ist. Der Vater, heterozygoter Träger des c.131T-Allels, wird als HSP-Betroffener beschrieben. Dies widerspricht der Annahme von Svenson und Kollegen, dass Heterozygote c.131T-Träger keine Symptome zeigen und es sich bei diesem Nukleotidaustausch um einen seltenen Populationspolymorphismus (Häufigkeit in der Kontrollgruppe von <0,6%) handelt (Svenson et al. 2004). Vielmehr interpretieren sie den Nukleotidaustausch als genetischen Faktor, der den Phänotyp einer HSP modifizieren kann. In den drei PHSP Familien segregiert das c.131T-Allel nicht mit der Erkrankung. Tritt in diesen Familien der Nukleotidaustausch zusammen mit einer krankheitsauslösenden Mutation *in trans* Konfiguration auf, kommt es zu einem früheren Erkrankungsbeginn und zu einem schwereren Verlauf (Svenson et al. 2004). Gegen diese Deutung von Svenson und Kollegen spricht, dass in anderen Studien, die große HSP-Stichproben auf *SPG4*-Mutationen untersuchten, das c.131T-Allel mittels der angewandten Methoden, wie z.B. des SSCP und DHPLC, nicht identifiziert wurde (Sauter et al. 2002, Patrono et al. 2005).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass nur lückenhafte und teilweise widersprüchliche Erkenntnisse zur Epidemiologie vorhanden sind. Darüber hinaus ist, geschuldet der geringen Zahl der beschriebenen Fälle, das klinische Erscheinungsbild von c.131T-Trägern nicht klar beschrieben.

1.5. Ziele der Arbeit

Um umfassendere Daten bezüglich der Prävalenz des Nukleotidaustauschs c.131C>T zu ermitteln, soll in dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt werden, mit dem es möglich ist, diese genetische Variante schnell und sicher zu identifizieren. Als Methodik ist dazu ein RFLP-Assay vorgesehen. Dieser soll auf DNA-Proben einer HSP-Gruppe und einer Kontrollgruppe angewendet werden. Die Möglichkeit einer eventuellen Unspezifität des Verfahrens macht eine sich an einen positiven RFLP-Befund anschließende verifizierende Sequenzierung des betreffenden DNA-Abschnitts notwendig.

Im Anschluss sollen die Stammbäume und Genotypen der untersuchten HSP-Familien analysiert werden. Insbesondere werden dabei heterozygote c.131T-Träger mit und ohne weitere *SPG4*-Mutation im Mittelpunkt stehen. Im Ergebnis dieser Analysen sollte enthalten sein, dass sich, über die damit erhöhten Fallzahlen, ein allgemeingültigeres Bild zur Auswirkung des c.131T-Allels auf den Phänotyp zeichnen lässt.

2. Patienten und Methoden

2.1. Stichproben

2.1.1. AD HSP Propandengruppe

Die HSP-Gruppe besteht aus 6 Einzelpersonen mit für eine autosomal dominante HSP positive Familiengeschichte und 27 Familien in denen eine autosomal dominante HSP (AD HSP Familien) auftritt. Insgesamt handelt es sich dabei um 277 betroffene und nicht betroffene Probanden. Die Versuchspersonen wurden von Fachärzten für Neurologie der unten genannten Einrichtungen untersucht und als betroffen oder nicht betroffen eingestuft. Zu den entsprechenden EDTA-Blutproben lagen von allen Familien die Stammbäume und in einigen Fällen die Arztbriefe vor.

11 der AD HSP Familien stammen aus einer vorhergehenden Studie zu HSP des Instituts für Klinische Chemie der Friedrich Schiller Universität Jena. Die restlichen DNA-Proben und EDTA-Blutproben der Versuchspersonen wurden aus folgenden Einrichtungen eingesandt:

Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Klinikum Mainz, Klinik für Neurologie (Dr. med. Sven Klimpe);

Karl-Franzens-Universität Graz, Institut für medizinische Biologie und Humangenetik (Prof. Dr. H. Zierler);

Universitätsklinikum Tübingen der Eberhard-Karls-Universität;

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Neurologische Klinik und Poliklinik – Großhadern (PD Dr. med. Klopstock);

Klinikum der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Klinik für Neurologie (Dr. med. Klebe);

Genetische Beratungs- und Untersuchungsstelle Innsbruck (Dr. B. Utermann);

Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden, Institut für klinische Genetik (OA Dr. med. F. R. Kreuz).

Von allen Probanden liegen unterzeichnete Einverständniserklärungen zur Untersuchung von DNA zu Forschungszwecken vor.

2.1.2. Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe umfasst 513 Probanden. 60 davon stammen von Probanden einer Studie, die sich mit Familiären Hörstörungen beschäftigt (Dr. Dr. med. Michael Kiehntopf, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der FSU Jena; Dr. med. Domenikus Bönsch). Diese Gruppe besteht aus 9 Familien zu denen keine Stammbäume vorliegen; die Allelzahl ist daher unbekannt. Außerdem werden DNA-Proben von 201 Einzelpersonen aus einer Studie zu Migräne (Dr. med. Thomas Wieser, Wien) untersucht. Aus einer Studie zu intrakraniellen Tumoren (Dr. Christian Beetz, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der FSU Jena) stammen Proben von weiteren 186 nichtverwandten Versuchspersonen. 32 DNA-Proben von Einzelpersonen liegen im Rahmen der PNG-Studie (Dr. Dr. med. Michael Kiehntopf, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der FSU Jena) vor. Zur Kontrollgruppe zählen auch 8 autosomal rezessive HSP Familien (vorhergehende HSP-Studie; Dr. med. Sven Klimpe, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Klinikum Mainz) und eine weitere Familie. Diese 9 Familien umfassen 34 Personen; Stammbäume sind vorhanden.

Zu den Versuchspersonen sind weder klinische noch persönliche Daten vorhanden; sie werden anonym untersucht.

2.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

PCR-Prozessoren

- Mastercycler gradient Eppendorf AG
(Hamburg, BRD)
- Hybais –Thermal Cycler Thermo Life Sciences
(Egelsbach, BRD)

Spannungsgeräte

- Electrophoresis Power Supply EPS 301 Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg, BRD)

Elektrophorese-Kammer

- Hoefer Super Sub Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg, BRD)

Zentrifuge

- Eppendorf Centrifuge 5415R Eppendorf AG (Hamburg, BRD)

Heizkörper

- FALC Thermoblock Renner GmbH (Darmstadt, BRD)

Spektralphotometer

- GeneQuantII Pharmacia biotech (Cambridge, UK)

Wasserbad

- Wasserbad GFL mbH (Burgwedel, BRD)

Wärmeschrank

- Wärmeschrank B6 Heraeus instruments (Hanau, BRD)

Schüttelinkubator

- Schüttelinkubator 3033 GFL mbH (Burgwedel, BRD)

Sequenzierer

- Licor - Long Reader 4200 Licor Biosciences (Nebraska, USA)

Vortexer

- Vortex Genie 2 Scientific Industries Inc. (New York, USA)

Pipetten

- Lab Mate-Pipetten ABIMED HAT (Virginia, USA)

PCR-Platten

- Thermowell, 96 Well Plate Corning inc. Costar

| | |
|--------------------|--------------------------------------|
| | (Schiphol-Rijk, NE) |
| Transilluminator | |
| • Image Master VDS | Pharmacia Biotech (Cambridge, UK) |

Gefäße

| | |
|---|--------------------------------------|
| • Standard Eppendorf Tubes 3810X, 1,5 ml | Eppendorf AG (Hamburg, BRD) |
| • PP-test tubes 50 ml (sterile) Celestar | Greiner bio-one (Kremsmünster, A) |

2.3. Chemikalien (alphabetisch)

| | |
|----------------------------------|---|
| AgarAgar | FLUKA Chemie GmbH (Buchs, CH) |
| APS (Ammoniumpersulfat) | Appli Chem (Darmstadt, BRD) |
| Ampicillin | Serva Boehringer Ingelheim (Heidelberg, BRD) |
| Borsäure | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, BRD) |
| Chelex 100 | Sigma [®] Aldrich (Steinheim, BRD) |
| Chill-Out™ 14 Liquid Wax | MJ Research™ Inc. (Boston, USA) |
| destilliertes Wasser | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, BRD) |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Sigma [®] Aldrich (Steinheim, BRD) |
| EDTA (Ethylendiamin-Tetraacetat) | Serva Boehringer Ingelheim (Heidelberg, BRD) |
| EDTA disodium salt | Sigma [®] Aldrich (Steinheim, BRD) |
| Essigsäure (100%) | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, BRD) |
| Ethanol | Gibco (Eggenstein, BRD) |
| Ethidiumbromid | Serva Boehringer Ingelheim (Heidelberg, BRD) |
| Hefeextrakt | Serva Boehringer Ingelheim (Heidelberg, BRD) |
| IPTG (100 mM) | Invitrogen (Carlsbad, USA) |
| Kanamycin | Serva Boehringer Ingelheim (Heidelberg, BRD) |

| | |
|--|---|
| MgCl ₂ (50 mM) | Finnzymes (Espoo, Finnland) |
| NaCl | FLUKA Chemie GmbH (Buchs, CH) |
| Seakem LE Agarose | Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, BRD) |
| Sucrose | Serva Boehringer Ingelheim (Heidelberg, BRD) |
| TEMED (N`N`N`N-Tetramethylethylenediamine, 99%) | Sigma® Aldrich (Steinheim, BRD) |
| Trisbase | Sigma® Aldrich (Steinheim, BRD) |
| Tris-HCl | Sigma® Aldrich (Steinheim, BRD) |
| Pepton | Serva Boehringer Ingelheim (Heidelberg, BRD) |
| Urea | Sigma® Aldrich (Steinheim, BRD) |
| x-Gal (2%ig Dimethylformamid) | Gibco BRL (New York, USA) |
| Xylene Cyano CF7 | Serva Boehringer Ingelheim (Heidelberg, BRD) |

2.4. DNA-Präparation

2.4.1. Chelex und EDTA-Blut

- Materialien:
1. EDTA-Blut
 2. Chelex 100 (10%ig in H₂O)
 3. Heizkörper

Von allen Probanden (exklusive der Proben von den Probanden zur Studie zu intrakraniellen Tumoren) lagen DNA-Proben vor. Diese wurden mittels Standardmethoden nach Müller et al. 1991 DNA aus EDTA-Blut gewonnen. Die DNA-Proben wurden bereits im Rahmen anderer Studien verwendet und werden deshalb im Labor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin aufbereitet gelagert.

Von 186 Probanden, die der Subkontrollgruppe Intrakranieller Tumoren zugeordnet sind, werden EDTA-Blutproben im Labor des Instituts für Klinische

Chemie und Laboratoriumsmedizin bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Aus diesen wird mit Chelex 100 DNA präpariert. Diese Substanz denaturiert die Eiweiße und bindet die freien Ionen; die DNA verbleibt im Überstand.

Es werden $5,00\text{ }\mu\text{l}$ EDTA-Blut mit $30,0\text{ }\mu\text{l}$ 10%igen Chelex versetzt und für 8 min bei $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wärmeblock gekocht und in Anschluß bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.4.2. PCR-Produktaufreinigung

Vor der Sequenzierung von DNA muss das PCR-Produkt aufgereinigt werden, um es von Primern, Ionen und Enzymen zu befreien, die die Sequenzierung stören könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wird der „QIAquick® PCR Purification Kit“ von Qiagen (Kat. Nr. 28106) verwendet. Die Aufreinigung folgt dem mitgelieferten Protokoll für Mikrozentrifugen.

2.4.3. Plasmid-Präparation

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wird in dieser Arbeit der „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ von Qiagen (Kat. Nr. 27106) eingesetzt. Die Plasmid-Präparation erfolgt in einer Mikrozentrifuge nach dem mitgelieferten Protokoll.

2.5. Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

- Materialien:
1. genomische DNA
 2. destilliertes Wasser
 3. Spektralphotometer

Die Konzentrationsbestimmung der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Proben erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm, da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren in diesem Bereich des UV-Lichtes liegt. Dazu werden $2\text{ }\mu\text{l}$ der DNA-Probe mit $198\text{ }\mu\text{l}$ destillierten Wassers versetzt (1:100) und in eine Quarzküvette überführt, die sich im Spektralphotometer befindet. Die Bestimmung erfolgt unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors

($F \cong 100$), des OD-Wertes für doppelsträngige DNA ($OD_{\text{Standard}} \cong 50 \mu\text{g/ml}$) unter Standardbedingungen (OD bei 1cm Schichtdicke der Küvette bei 260 nm) und des gemessenen OD-Wertes: $c [\mu\text{g/ml}; \text{ng}/\mu\text{l}] = OD_{260} \times F \times OD_{\text{Standard}}$. Darüberhinaus ist der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm ein Maß für die Verunreinigung der Probe mit Proteinen, die ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm haben. Proteinfreie Lösungen besitzen einen Quotienten von 1,8 bis 2.

2.6. Polymerasekettenreaktion

2.6.1. Allgemeines zur Polymerasekettenreaktion

Mit der in den achtziger Jahren eingeführten Polymerasekettenreaktion (PCR) können definierte DNA-Abschnitte vervielfältigt werden, um in ausreichender Menge für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu stehen.

Im ersten Schritt wird der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang (Template) im Schmelzschritt (Denaturierung) in Einzelstränge, die als Matrize (Vorlage) für die weitere DNA-Synthese dienen, überführt. Im zweiten Schritt lagern sich hitzestabile synthetische Oligonucleotide (Primer) jeweils komplementär an die DNA-Einzelstränge an (Hybridisierung/Annealing). Im Folgenden synthetisiert die thermostabile DNA-Polymerase aus den zugegebenen Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) einen zur Matrize komplementären neuen DNA-Strang (Synthese/Elongation). Durch diese drei Schritte wird die vorhandene DNA verdoppelt. Werden diese mehrfach wiederholt, steigt die DNA-Menge exponentiell an.

2.6.2. Primer- und Polymerasetest

- Materialien:
1. DNA-Verdünnungen (10 ng/ μl)
 2. andere Substanzen siehe 2.7.4.
 3. PCR-Prozessor

Um ein geeignetes PCR-Produkt für die Restriktion zu erhalten, müssen die Reaktionsbedingungen und die Reaktionszusammensetzung optimiert werden.

Zu Beginn werden zwei genomische DNA-Proben und zwei Plasmide als Templates eingesetzt; letztere enthalten die zu amplifizierende DNA-Sequenz. Die getesteten Primerpaare sind in der Tabelle 2.2. aufgelistet. Der PCR-Ansatz setzt sich aus 3,0 µl DNA-Verdünnung und den Substanzen der folgenden Tabelle (2.1.) zusammen:

Tab. 2.1.: Mastermix zur Amplifikation

| Substanz | Menge für einen 24 µl Mix |
|--|---------------------------|
| Aqua ad iniectionem Braun | 9,7 µl |
| 10x Buffer BIOTherm (15 mM MgCl ₂) | 1,5 µl |
| dNTP Gemisch (je 10mM) | 0,5 µl |
| Primer forward (10 pmol) | 0,1 µl |
| Primer reverse (10 pmol) | 0,1 µl |
| SupraTherm™ DNA Polymerase (5 units/µl) | 0,12 µl |

Tab. 2.2.: Bezeichnung der im Primertest verwendeten Primer (Sequenzen der Primer siehe Tab. 2.5.)

| Forward-Primer | Reverse-Primer |
|---------------------|----------------|
| Spa1n | detS44L_r |
| Spa-Anf | Spaex1 PCR2_r |
| SPG4 1-F | Spaex1 PCR1_r |
| Spa-PEST_AS16 Bgl_f | |
| Spa-PEST_AS1 Bgl_f | |
| detS44L_f | |

Die Amplifikation erfolgt im PCR-Prozessor nach folgendem Programm:

| Schritt | Temperatur | Dauer | Wiederholungen |
|------------------------|------------|---------|----------------|
| Initiale Denaturierung | 94 °C | 3´ | 1 |
| Denaturierung | 94 °C | 45´´ | 1 |
| Annealing | 56 °C | 45´´ | 1 |
| Elongation | 72 °C | 1´ 30´´ | 1 |
| Wiederholung ab | | | 34 |
| Denaturierung | | | |
| Elongation | 72 °C | 3´ | 1 |

Da die zu amplifizierende Region des Exon 1 des *SPG4* sehr GC-reich ist, wird in dieser Arbeit eine speziell geeignete Polymerase (TaKaRa La Taq) zur Amplifikation verwendet - aufgrund der hohen Probenanzahl wird in Vorexperimenten

die minimal notwendige Polymerasemenge ermittelt. Dies wird durch eine Amplifikation mit entweder 0,16 µl, 0,1 µl oder 0,05 µl Polymerase pro PCR-Ansatz für ein DNA-Template getestet. Wird weniger Polymerase zugegeben, muß mehr destilliertes Wasser verwendet werden, um den 12,00 µl Mastermix zu erhalten. Zur Durchführung siehe 2.7.3..

2.6.3 Amplifikation eines definierten DNA-Abschnitts für den RFLP

- Materialien:
1. genomische DNA-Verdünnungen (10 ng/µl)
 2. TaKaRa LA Taq™ with GC Buffer von TaKaRa Bio. Inc. (Otsu, Shiga, Japan) (Kat. Nr. RR02AG):
 - 2x GC I/II Puffer
 - dNTP Gemisch (je 2,5 mM)
 - TaKaRa LA Taq™ Polymerase (5U/µl)
 3. Primer (forward und reverse) von MWG Biotech AG (Ebersberg, BRD)
 4. PCR-Prozessor

Zur Vervielfältigung des 212 bp DNA-Abschnitts aus genomischer DNA wird diese mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt. Als Verdampfungs- und Spritzschutz werden je PCR-Ansatz 10 µl Wachs (ChillOut™ 14 Liquid Wax) in die PCR-Platten verteilt. Im Anschluss werden je 3 µl Template (DNA-Verdünnung) auf das Wachs pipettiert. Der PCR-Ansatz wird entsprechend der Tabelle 2.3. zusammengestellt, gemischt und zu je 12 µl auf die 3 µl Template in der PCR-Platte gegeben. Die PCR erfolgt anschließend im PCR-Prozessor nach folgendem Program:

| Schritt | Temperatur | Dauer | Wiederholungen |
|------------------------|------------|-------|----------------|
| Initiale Denaturierung | 94 °C | 1´ | 1 |
| Denaturierung | 94 °C | 30´´ | 1 |
| Annealing | 57 °C | 30´´ | 1 |
| Elongation | 72 °C | 2´ | 1 |
| Wiederholung ab | | | 34 |
| Denaturierung | | | |
| Elongation | 72 °C | 5´ | 1 |

Tab. 2.3.: Mastermix zur Amplifikation des 212 bp DNA-Abschnitts

| Substanz | Menge für einen 12 µl Mix |
|---|---------------------------|
| Aqua ad iniectionabilia Braun | 1,675 µl ≈ 1,7 µl |
| 2X GC I/II Buffer | 7,5 µl |
| dNTP Gemisch (je 2,5 mM) | 2,6 µl |
| Primer forward (10 pmol) – Spa-PEST_AS16Bgl_f | 0,1 µl |
| Primer reverse (10pmol) – detS44L_r | 0,1 µl |
| TaKaRa LA Taq™ (5 units/µl) | 0,025 µl |

Das Exon 1 des *SPG4* ist durch GC-reiche Regionen gekennzeichnet. Zur Amplifikation wird deshalb die DNA-Polymerase La Taq von TaKaRa Bio. Inc. (Japan) verwendet.

Als forward-Primer wird der Primer *Spa-PEST_AS16Bgl_f* eingesetzt, als reverse-Primer der Primer *detS44L_r* (zu den Sequenzen der Primer vgl. Tab. 2.5., vgl. Lage in Abb. 3.4.). Außer den zu untersuchenden genomischen DNA-Proben werden das Plasmid Spastin Mut. 44 (Positivkontrolle) sowie eine Wasserprobe (Negativkontrolle) als Templates eingesetzt. Das Plasmid enthält die cDNA des Exon 1 mit dem Nukleotidaustausch c.131C>T.

Bevor die PCR-Produkte der Restriktion zugeführt werden, erfolgt zum Nachweis des 212 bp Produktes eine Agarosegelelektrophorese (siehe 2.8.).

2.6.4 Amplifikation von Exon 1 bis 17 (*SPG4*) zur Mutationssuche mittels DNA-Sequenzanalyse

- Materialien:
1. genomische DNA (10 ng/µl)
 2. SupraTherm™ DNA Polymerase von GeneCraft GmbH (Lüdinghausen, BRD) (5 units/µl)
 3. 10x Puffer Bio Therm (15m MgCl₂) von GeneCraft GmbH (Lüdinghausen, BRD)
 4. dNTP Gemisch (je 10mM) von GeneCraft GmbH (Lüdinghausen, BRD):

| | |
|---------------|--------|
| dATP (100 mM) | 100 µl |
| dCTP (100 mM) | 100 µl |
| dGTP (100mM) | 100 µl |
| dTTP (100mM) | 100 µl |

destilliertes Wasser 600 µl

5. Primer von MWG Biotech AG (Ebersberg, BRD)

6. PCR-Prozessor (Eppendorf AG; Hamburg, BRD)

Die Durchführung der PCR zur Vervielfältigung von Exon 1 bis 17 des *SPG4* entspricht im wesentlichen der PCR zur Amplifikation des 212 bp DNA-Abschnitts aus Exon 1.

Es werden statt 3 µl DNA-Verdünnung 6 µl verwendet, womit sich durch den zusätzlichen Mehreinsatz an Mastermix ein 30 µl PCR-Ansatz ergibt (vgl. Tab. 2.4.).

Tab. 2.4.: Mastermix zur Amplifikation von Exon 2 bis 17

| Substanz | Menge für einen 24 µl Mix |
|---|---------------------------|
| Aqua ad iniectabilia Braun | 19,36 µl |
| 10x Buffer BIO Therm (15 mM MgCl ₂) | 3,0 µl |
| dNTP Gemisch (je 10mM) | 1,0 µl |
| Primer forward (10 pmol) | 0,2 µl |
| Primer reverse (10 pmol) | 0,2 µl |
| SupraTherm™ DNA Polymerase (5 units/µl) | 0,24 µl |
| Evtl. MgCl ₂ (50mM) | 1,00 µl |

Wird MgCl₂ zugegeben, muß entsprechend weniger Aqua ad iniectabilia verwendet werden, um den 24 µl Mastermix zu erhalten.

Die Polymerase wird durch die Supra Therm DNA™ Polymerase ersetzt, da zur Amplifikation von Exon 2 bis 17 keine spezielle Polymerase nötig ist. Durch die Zugabe von MgCl₂ kann die Bindungsspezifität der Primer herabgesetzt werden, wodurch eine Amplifikation möglich, das PCR-Produkt aber unspezifischer wird. Die verwendeten Primer liegen in den entsprechenden Introns, um auch mögliche splice-site Mutationen erfassen zu können (Sequenzen vgl. Tab. 2.5.).

Die Annealing-Temperatur des folgenden PCR-Programms richtet sich nach den Schmelztemperaturen (T_m) der eingesetzten Primerpaare:

| Schritt | Temperatur | Dauer | Wiederholungen |
|------------------------|----------------|---------|----------------|
| Initiale Denaturierung | 94 °C | 3´ | 1 |
| Denaturierung | 94 °C | 45´´ | 1 |
| Annealing | T _m | 45´´ | 1 |
| Elongation | 72 °C | 1´ 30´´ | 1 |
| Wiederholung ab | | | 34 |
| Denaturierung | | | |
| Elongation | 72 °C | 3´ | 1 |

Die Elongationsdauer von 1´ 30´´ verringert sich bei Exon 14 auf 45´´.

Tab. 2.5.: Bezeichnung und Sequenz der im Rahmen der Arbeit verwendeten PCR-Primer.

| Exon | Forward-Primer | Primersequenz 5' - 3' | Tm (°C) | Reverse-Primer | Primersequenz 5' - 3' | Tm (°C) |
|-------|----------------------------|--|------------|--------------------------|--|------------|
| 1 | Spa1-n | ctg ccg ccg tcg ctt ggt tc | 65,5 | Spaex1 PCR2_r | aga tga ggc tcc gac cta c | 58,8 |
| 1 | Spa-Anf | agt gag agc tgt gaa tga att | 54,0 | Spaex1 PCR1_r | caa agt cga cag cta cag tgc | 59,8 |
| 1 | Spa- PEST_AS1 Bgl_f | aga tct atg aat tct ccg ggt gga cga g | 56,0 | | | |
| 1 | detS44L_f | ata tgg ccc ctc cgc ccg ag | 56,0 | | | |
| 1 | Spa- PEST_AS1 6Bgl_f | aga tct atg gcc agc aac ccg gtg cct | 69,5 | detS44L_r + M13- tail | tca cga cgt tgt aaa acg acg gcc agt gaa ttg taa gac tcg aag gcg acc aaa cgc agc ag | 75,0 |
| 1 | SPG4 1-F | ccg tcg gtc tgc ggg ag | 62,4 | SPG4 1-r | cga ccc cac cgc ctt ctt | 60,5 |
| 2 | Spaex2F | aat gcc aca ctt gta atc tc | 53,2 | Spaex2R | tgt gaa tat atc ata att tgg g | 50,9 |
| 3 | Spaex3Fn | gct caa gtg att ctg ctt tgt | 55,9 | Spaex3R | aca tt cca ata cat ccc ac | 52,0 |
| 4 | Spaex4Fn | aca atc tgg taa cac ctt gag | 55,9 | Spaex4R | tta gaa tga cta tac ctg ac | 52,0 |
| 5 | Spaex5F | ttc cta tct acc tag tga c | 52,4 | Spaex5R | ttt tat agc aag ttg ccc tg | 53,2 |
| 6 | Spaex6F+ M13-tail | cgt gta aaa cga cgg cca gtg aat tct gtg aac ttt | 71,5 | Spaex6R | tct att tca ctc ctg aca tg | 53,2 |
| 7 | Spaex7F | gtc ata ggg ctt agg ctt c | 56,7 | Spaex7R | atc ata cta ccc act ttt cc | 53,2 |
| 8 | Spaex8F | tgt ttg gga aga tgc tac tg | 61,3 | Spaex8R | cta ctg aag ata cgt aca tg | 64,2 |
| 9 | Spaex9F | cat tga ttg cca tgt att gg | 55,9 | Spaex9R | aga agg cca gaa ata ctc ag | |
| 10-12 | Spaex10- 12F | ctc aag tct tag gaa tgc ag | 55,3 | Spaex10-12R | ctt tac tag act aat tct cct g | 54,7 |
| 13 | Spaex13F | cag att caa gaa gac aga tc | 53,2 | Spaex13R | gca ata att cac cac act tg | 53,2 |
| 14 | Spaex14F | caa gtg tgg tga att att gc | 53,2 | Spaex14R | gag ctg aaa agt att cag c | 52,4 |
| 14 | Spaex14Fn eu | taa cag cac aag acc ctg tct | 57,9 | Spaex14Rneu | cac tta cag gtt tta ata aat | 48,1 |
| 15 | Spaex15F | agc ctc tgg aga tag tat gc | 57,3 | Spaex15R | cta gaa cag ggg tca cag tc | 59,4 |
| 16 | Spaex16F | gca gta tgc aag aaa ttg aac | 54,0 | Spaex16R | ggc ctg taa ttt tct tct g | 52,4 |
| 17 | Spaex17F | gtg tag cag atc aac ata g | 52,4 | Spaex17R | cat ctt caa gtt tgg tgc ac | 55,3 |

Zur Amplifikation des gesamten Exon 1 wird die La Taq™ von TaKaRa Bio Inc. (Japan) verwendet. Als Forward-Primer dient der *SPG4 1-F*, als Reverse-Primer der *SPG4 1-R* (Tab. 2.5.). Beide liegen 45 bis 50 bp 5' stromauf- bzw. 3' stromabwärts des Exon 1.

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und das PCR-Programm entsprechen denen der Amplifikation des 212 bp Abschnitts (vgl. 3.7.2.).

2.7. Agarosegelelektrophorese

- Materialien:
1. Agarose
 2. 50 x TAE-Puffer: Essigsäure (100%) 57,10 ml

| | |
|------|---------|
| Tris | 242,0 g |
| EDTA | 14,7 g |
 3. 1 x TAE-Puffer: 50 x TAE-Puffer 100,0 ml

| | |
|--------|-----------|
| Wasser | 4900,0 ml |
|--------|-----------|
 4. Ladepuffer:

| | |
|------------------|--------|
| Sucrose | 4,0 g |
| 2 M Tris HCL | 0,5 ml |
| 0,5 M EDTA | 2,0 ml |
| Xylene Cyano CF7 | 4,0 mg |

alles mit destilliertem Wasser auf 10 ml auffüllen
 5. DNA-Marker 100 bp Marker
(GeneCraft GmbH, Lüdinghausen, BRD)
 6. Elektrophoresekammer
 7. Spannungsgerät
 8. Transilluminator

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und nachgewiesen werden. Lineare, doppelsträngige DNA wandert mit einer Geschwindigkeit durch die Agarose, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Zudem ist Geschwindigkeit u.a. abhängig von der Stromstärke (Spannung zwischen den beiden Elektroden), den Pufferbedingungen und der Agarosekonzentration. Um die Fragmente sichtbar zu machen, wird Ethidiumbromid verwendet, welches sich zwischen zwei benachbarte Basenpaare lagert und unter ultravioletter Bestrahlung Licht emittiert.

In der vorliegenden Arbeit wird die Agarosegelelektrophorese zum Nachweis von PCR-Produkten und zur Ermittlung der Größe von Restriktionsfragmenten (RFLP) genutzt. Für den Nachweis von PCR-Produkten wird ein 1,5%iges Agarosegel verwendet. 9 g Agarose werden zu 600 ml 1x TAE-Puffer gegeben und durch Kochen in einem Mikrowellengerät aufgelöst. Anschließend werden 10 µl

Ethidiumbromid ($c=10$ mg/ml) in die gelöste Agarose pipettiert und gemischt. Die Agarose wird in eine Gelkammer mit eingehängtem Kamm gegossen. Ist das Gel nach 20-30 min gehärtet wird der Kamm gezogen und 1x TAE-Puffer in die Elektrophoresekammer gefüllt. Die PCR-Reaktion wird mit je 4 μ l Ladepuffer versetzt und in jeweils eine Geltasche eingegeben. Als Molekulargewichtsstandard dienen 5 μ l eines 100 bp Markers. Die angelegte Spannung beträgt 130 Volt, die Stromstärke 400 mA. Nach 60 min wird das Gel unter UV-Bestrahlung eines Transilluminators betrachtet und ausgewertet.

Zum Auftrennen und Nachweis der Restriktionsfragmente wird ein 2,5%iges Agarosegel genutzt, wobei 15 g in 600 ml 1x TAE-Puffer gelöst werden. Die nachfolgenden Schritte sind die gleichen wie die oben genannten. Die Auswertung erfolgt nach 90 min.

2.8. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

2.8.1. Allgemeines zum RFLP

Der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) kann zum Nachweis genetischer Veränderungen eingesetzt werden. Nach einer Amplifikation mittels PCR wird der zu untersuchende DNA-Abschnitt mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaut. Treten Sequenzveränderungen in den Schnittstellen des Enzyms oder innerhalb des amplifizierten DNA-Abschnitts auf verändert sich das Bandenmuster.

2.9.2. RFLP mit dem Restriktionsenzym *Hinfl*

- Materialien:
1. Restriktionsenzym *Hinfl* (20 U/ μ l) von GeneCraft (Lüdinghausen, BRD)
 2. 10 x H-Puffer von GeneCraft (Lüdinghausen, BRD)
 3. Wärmeschrank

Zur Untersuchung der DNA-Proben auf den Nukleotidaustausch c.131C>T wird in dieser Arbeit der RFLP mit dem Restriktionsenzym *Hinfl* verwendet.

Ein Ansatz für die Restriktion von 6,0 µl eines PCR-Produktes enthält 11,75 µl destilliertes Wasser, 2,0 µl 10 x H-Buffer und 0,25 µl Restriktionsenzym *Hinfl*; es wird ein Mastermix verwendet. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C für 90 min.

Der Restriktionsansatz wird anschließend für 30 s zentrifugiert und mit 5,0 µl Ladedpuffer versetzt. Der Nachweis der Restriktionsfragmente erfolgt durch eine 2,5%ige Agarosegelelektrophorese.

2.9. DNA-Klonierung

2.9.1. Allgemeines zur DNA-Klonierung

In dieser Arbeit wird die DNA-Klonierung eingesetzt um beide Allele eines bestimmten DNA-Abschnitts der Probanden mittels Sequenzierung auswerten zu können.

Zur DNA-Klonierung wird der zu untersuchende isolierte DNA-Abschnitt in ein Plasmid eingebracht. Diesen Schritt nennt man Ligation. Ein Plasmid ist ein extrachromosomales zyklisches doppelsträngiges DNA-Molekül, das als Träger-DNA (Vektor) dient. Der Vektor wird mitsamt der eingebrachten DNA in kompetente Wirtszellen überführt (Transformation). Als Wirtszelle dient meist das Bakterium *Escherichia coli*. Durch das schnelle Wachstum der Bakterien findet eine starke Vermehrung des DNA-Abschnitts in der Bakterienpopulation statt. Die Selektion erfolgt durch ein Antibiotikaresistenzgen im Plasmid. Durch das Markergen der β -Galaktosidase *lacZ* ist eine Unterscheidung im „Blau-Weiß-Test“ zwischen den Bakterienkolonien, die das rekombinante Plasmid tragen (weiße Kolonien) und denen, die es nicht tragen (blaue Kolonien), möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der „Topo TA Cloning® for Sequencing Kit“ von Invitrogen™ verwendet. Als Vektor dient der pCR®4-Topo. Kompetente Zellen sind

die gramnegativen One Shot® Top chemically competent *Escherichia coli*, die zum Umfang des Testbestecks gehören.

2.9.2. Einbringen der PCR-Produkte in den Vektor pCR®4-Topo

Materialien: 1. Topo TA Cloning® for Sequencing Kit von Invitrogen GmbH (Karlsruhe, BRD) (Kat. No. K4575-01):

Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂)

S.O.C. Medium

pCR®4-Topo

One Shot® Top chemically competent *Escherichia coli*

Im folgenden Abschnitt wird das Einbringen der PCR-Produkte (212 bp, Exon 1) in den Vektor beschrieben.

Durch die Amplifikation mit der TakaRa La Taq™ Polymerase besitzen die PCR-Produkte am 3'-Ende einen Adenosinüberhang. Dieser Überhang ermöglicht das Einfügen des PCR-Produktes den Vektor, da dieser einen komplementären Thyminüberhang besitzt.

Zu Beginn wird ein Ansatz, der aus 4,0 µl aufgereinigtem PCR-Produkt, 1,0 µl Salzlösung und 1,0 µl pCR®4-Topo besteht, hergestellt und gemischt. Es folgt eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Als PCR-Produkte werden das 212 bp Produkt und das gesamte Exon 1 des *SPG4*-Gens von einzelnen Probanden zur Mutationsanalyse verwendet.

2.9.3. Transformation des rekombinanten Vektors in kompetente Zellen

Materialien: 1. Topo TA Cloning® for Sequencing Kit (siehe 2.10.2.)

2. LB-Medium: 1% Pepton

0,5% Hefe

0,5% NaCl

pH 7,2

3. LB-Agarplatte (Petrischale):

LB-Medium

15,0 g AgarAgar pro Liter LB-Medium

2,0 ml X-Gal (0,02 g/ml Dimethylformamid)

2,0 ml IPTG (23,8 mg/ml dest. H₂O)

1,0 ml Ampicillin (c= 50 mg/ml)

4. Wasserbad

5. Schüttelinkubator

6. Wärmeschrank

Es folgt die Transformation des rekombinanten pCR[®]4-Topo in die One Shot[®] Top chemically competent *E. coli*.

Der hergestellte Ansatz aus PCR-Produkt, Salzlösung und dem Plasmid wird in ein Gefäß überführt und mit 20,0 µl der kompetenten *E. coli* versetzt. Dieser Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sek. Danach wird der Probenansatz sofort für 1 min auf Eis gegeben. Nach der Zugabe von 200 µl des vorgewärmten S.O.C. Mediums, wird die Probe für 60 min bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Im Anschluss wird der Transformationsansatz auf einer LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Die Agarplatte enthält neben dem LB-Nährmedium das Antibiotikum Ampicillin, IPTG als Induktor des Markergens der β-Galaktosidase *lacZ* und X-Gal (für „Blau-Weiß-Test“).

2.9.4. Vermehrung des rekombinanten Plasmids

Materialien: 1. LB-Medium (siehe 2.10.3.)

2. Schüttelinkubator

Zur Vermehrung des rekombinanten Plasmids wird eine Flüssigkultur hergestellt.

3 ml vorgewärmtes LB-Medium (inklusive 1‰ Ampicillin) wird in 50 ml Reaktionsgefäße (Falcons) überführt. Von den LB-Agarplatten werden weiße Kolonien mit einem sterilen Holzspatel entnommen und in das 50 ml Falcon

eingbracht. Nach einer Schüttelinkubation bei 37 °C für 24 h kann mit der Plasmid-Präparation begonnen werden.

2.10. Sequenzierung von DNA

2.10.1. Allgemeines zur Sequenzierung von DNA

Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung lässt sich eine DNA-Basensequenzanalyse durchführen. In dieser Arbeit wird die Sequenzreaktion nach Sanger et al. (1977) angewendet, die auch als Kettenabbruchverfahren bezeichnet wird.

Ausgangsmaterial ist DNA, die durch Denaturierung in Einzelstränge überführt wird. Die DNA (Matrize) wird mit dem Sequenzierprimer am 3'-Ende hybridisiert. Der Sequenzierprimer oder die Nukleotide sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder radioaktiv markiert. Durch eine thermostabile DNA-Polymerase wird der komplementäre Strang aus den zugegebenen Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP) in 5' - 3'-Richtung synthetisiert. Die Reaktion verläuft in vier unterschiedlichen Gefäßen, in denen zusätzlich je eines der vier 2',3'-Dideoxyribonucleosidtriphosphate (ddNTP) enthalten ist. Erfolgt nun der Einbau eines ddNTPs anstelle eines dNTPs kommt es zum Kettenabbruch, weil keine freie OH-Gruppe am 3'-Ende eines ddNTPs vorhanden ist. Im statistischen Mittel erhält man alle möglichen Kettenabbruchfragmente mit dem jeweils eingebauten ddNTP. Im Polyacrylamidgel werden die Fragmente nach ihren Größen aufgetrennt. Die markierten Fragmente werden, je nach Art ihrer Markierung, sichtbar gemacht.

2.10.2. DNA-Sequenzierung

Materialien: 1. Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-Deaza-dGTP von Amersham Biosciences (Freiburg, BRD) (Kat. Nr. RPN 2438):

- A Reagenz
- C Reagenz
- G Reagenz
- T Reagenz

Loading dye

2. Sequenzierprimer (100 pmol) von MWG Biotech AG (Ebersberg, BRD) verdünnt auf 2 pmol/ μ l
3. DMSO
4. PCR-Prozessor

In der vorliegenden Arbeit werden bei einzelnen Probanden zur Mutationssuche alle Exons des *SPG4*-Gens sequenziert. Zusätzlich werden die 212 bp PCR-Produkte aller Probanden mit dem Nukleotidaustausch c.131C>T, der durch RFLP detektiert wurde, mittels Sequenzanalyse untersucht. Im nächsten Abschnitt wird exemplarisch die Durchführung einer Sequenzierung eines einzelnen DNA-Templates mit dem „Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-Deaza-dGTP“ von Amersham Biosciences beschrieben.

Zunächst werden die A-, C-, G-, T-Reagenzien und der Sequenzierprimer auf Eis getaut. Fünf Spalten einer Well-Platte werden von links nach rechts mit „A“, „C“, „G“, „T“ und „Mix“ beschriftet. In die mit „Mix“ beschriftete Spalte wird ein Voransatz aus 18 μ l Aqua ad iniectabilia Braun, 1 μ l DMSO, 1 μ l Sequenzierprimer und 4 μ l Template hergestellt. Durch Auf- und Abpipettieren wird der Ansatz gemischt. 2 μ l der jeweiligen dNTP-Reagenz (A-, C-, G-, T-Reagenz) werden in die entsprechend beschrifteten Spalten überführt. Die dNTP-Reagenzen enthalten neben allen vier dNTPs ein ddNTP und die Thermo Sequenase DNA-Polymerase. Im Anschluss erfolgt die Verteilung von je 5 μ l des Voransatzes auf die dNTP-Reagenzen. Zur Erhöhung der Qualität der Reaktion sollte die Zusammenstellung des Sequenzieransatzes auf Eis erfolgen. Nach dem Mischen wird jeder Sequenzierungsansatz mit 10 μ l Wachs bedeckt. Die Sequenzierung erfolgt nach folgendem Programm im PCR-Prozessor:

| Schritt | Temperatur | Dauer | Wiederholungen |
|------------------------|------------|-------|----------------|
| Initiale Denaturierung | 94 °C | 2´ | 1 |
| Denaturierung | 94 °C | 30´´ | 1 |
| Annealing | Tm | 30´´ | 1 |
| Elongation | 72 °C | 30´´ | 1 |
| Wiederholung ab | | | 20 |
| Denaturierung | | | |
| Elongation | 72 °C | 3´ | 1 |

Die zur Sequenzierung von Exon 1 bis 17 verwendeten Primer sind in der Tabelle 2.6. zusammengestellt. Die Sequenzierprimer enthalten am 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff IRD 700 oder 800. Der Sequenzierprimer *M13 universal* dient der Sequenzierung des 212 bp PCR-Produkts, das durch den PCR-Primer *detS44L-r* einen M13-Anhang am 5'-Ende besitzt.

Tab. 2.6.: Bezeichnung und Merkmale der Sequenzierprimer

| Exon | Sequenzierprimer | Sequenz 5' - 3' | IRD | T _m |
|------|------------------|---------------------------------|-----|----------------|
| 1 | M13 universal | tgt aaa acg gcc agt | 800 | 53,7 °C |
| 1 | M13 reverse | cag gaa aca gct atg acc | 700 | 53 °C |
| 2 | Spaex2 s-n | tac cat ggg ctg ata agc aa | 800 | 57 °C |
| 3 | Spaex3 n-s | ctg tat aaa gac tgt gac tcc | 700 | 56 °C |
| 4 | Spaex4 | tca ggt taa gta aga ctc | 800 | 50 °C |
| 5 | Spaex5 f-s | cct atg aag atc ctg gta c | 800 | 56 °C |
| 6 | Spaex6 s | tgt cat gat tct aac aag gg | 800 | 58 °C |
| 7 | Spaex7 rsn | atc tat tgt tac ctt ata tga att | 800 | 54 °C |
| 8 | Spaex8 nn-s | tta gat ggc aaa gag tac tta | 800 | 52 °C |
| 9 | Spaex9 fs neu | gag aat ctt ttc tag tac tta | 800 | 52°C |
| 10 | Spaex10 s-neu | gct atg tga gtc atc tga g | 800 | 56 °C |
| 11 | Spaex11 s | ctc aga tga ctc aca tag c | 800 | 56 °C |
| 12 | Spaex12 s-n | gct aga gat agt act gga aga | 800 | 56 °C |
| 13 | Spaex13 Fs-neu | ttt aca ata act acc aaa | 800 | 52 °C |
| 14 | Spaex14 s | tgc aaa gga cat agc cag tg | 800 | 57 °C |
| 15 | Spaex15 n-s | cat gcc tat aat ccc agc ta | 800 | 57 °C |
| 16 | Spaex16 s | gta ctg aat aga tac atg tag | 800 | 54 °C |
| 17 | Spaex17 n-s | tcc atc att tcg tta acc ac | 800 | 54 °C |

Nach dem Ende des Programms wird jede Sequenzierungsreaktion mit 5,0 µl Loading dye (Ladefarbstoff) versetzt und für 3 min bei 95 °C denaturiert. Die Well-Platten mit den vier Proben werden danach sofort auf Eis gebracht.

2.10.3. Sequenzanalyse durch den DNA-Sequenzierer Long Reader 4200 von Licor

Materialien: 1. 7%iger Long Ranger Gel-Ansatz:

Urea 12,60 g

Long Ranger Gellösung® 4,20 ml

(BMA, Rockland, USA)

auf 30,0 ml mit destilliertem Wasser auffüllen

| | | |
|---------------------|--|----------|
| 2. 10 x TBE-Puffer: | Trisbase | 108,0 g |
| | Borsäure | 55,0 g |
| | EDTA disodium salt | 10,0 g |
| | auf 1,0 l mit destilliertem Wasser auffüllen | |
| 3. 1 x TBE-Puffer: | 10 x TBE-Puffer | 100,0 ml |
| | destilliertes Wasser | 900,0 ml |
| 4. | Ethanol | |
| 5. | Sequenzierer | |

Zur Herstellung eines Acrylamidgels werden 20 ml eines 7%igen Long Ranger Gel-Ansatzes mit 140 μ l Ammoniumpersulfat (10%ig) und 14 μ l TEMED gemischt. Der Gelansatz wird zwischen zwei mit Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen. Diese haben einen Abstand von 0,25 mm, der durch eine spezielle Vorrichtung entsteht. Zusätzlich wird ein Vorkamm eingebracht, der nach 60 min durch den Kamm ersetzt wird, der die Probestaschen bildet. Das Gel wird mit den Glasplatten und der Vorrichtung in den Sequenzierer eingehängt. Beide Enden werden von 1 x TBE-Puffer (Laufpuffer) umspült. Die Einstellung der Spannung und des Lasers erfolgt nach den Empfehlungen des Herstellers. Anschließend werden jeweils 1,3 μ l der vier auf Eis liegenden Sequenzieransätze in vier der vorgeformten Taschen des Acrylamidgels eingebracht. Durch die angelegte Spannung wandern die fluoreszenzmarkierten Fragmente der Größe nach durch das Gel und werden durch das Gerät detektiert. Mit Hilfe eines angeschlossenen Rechners erscheint auf dem Monitor ein fortlaufendes Bild von Banden, welche den einzelnen Fragmenten und in ihrer Gesamtheit der DNA-Sequenz entsprechen.

2.11. *In silico* Analysen

Wir führten *in silico* Analysen mit dem Computer-Programm „PEST-FIND“ von Rechsteiner und Rogers durch, um eine sogenannte PEST-Sequenz zu identifizieren (siehe auch <http://www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind/>). Diese Sequenzen werden häufig in kurzlebigen Proteinen vorgefunden, die dem Ubiquitin-abhängigen Abbau durch das 26S Proteasom unterliegen. Das Computer-Programm gibt Werte zwischen -50 und +50 an. Per Definition gibt ein Wert über null eine mögliche PEST-

Sequenz an, und Werte über fünf sind von größerem Interesse (Rechsteiner et al. 1996).

3. Ergebnisse

3.1. Entwicklung eines RFLP-Assays zur Detektion der c.131C>T Variante

Zur Untersuchung des Exon 1 des *SPG4*-Gens auf den Nukleotidaustausch c.131C>T, der zum Aminosäureaustausch p.44S>L führt, sollten genomische DNA-Proben mittels PCR amplifiziert und anschließend mit dem Restriktionsenzym *HinfI* verdaut werden. Das PCR-Produkt wird dabei in drei Fragmente beim Wildtyp und in zwei Fragmente bei Vorliegen des Nukleotidaustauschs c.131C>T geschnitten.

Zur Reaktionsanalyse des PCR-Produktes mussten die Reaktionsbedingungen bezüglich ausreichender PCR-Produktmengen (GC-reicher DNA-Abschnitt) und entsprechender Spezifität des Produktes optimiert werden.

Die Abbildung 3.1. zeigt PCR-Produkte, die durch die SupraTherm Polymerase und 18 verschiedene Primerkombinationen amplifiziert wurden. Als Proben wurden jeweils zwei genomische DNA-Proben und zwei Plasmide verwendet. Die Plasmide enthalten die gesamte cDNA des *SPG4*-Gens und dienen als Positivkontrollen. Die *HinfI*-Schnittstelle ist in allen PCR-Produkten enthalten. Die Primerpaare mit den Nummern 2, 3, 10 und 16 wurden wiederholt zur Amplifikation eingesetzt, weil sie, neben unspezifischen Produkten, auch die erwarteten PCR-Produktgrößen im Agarosegel zeigten. In der Tabelle 3.1. sind alle getesteten Primerpaare zusammengestellt und mit den entsprechenden Nummern aus der Abbildung 3.1. versehen. Während der Optimierung wurde die Temperatur des Hybridisierungsschrittes in einem Bereich zwischen 56 °C und 62 °C variiert. Durch diese Veränderungen konnten jedoch in den Wiederholungen entweder keine oder nur unspezifische PCR-Nebenprodukte amplifiziert werden.

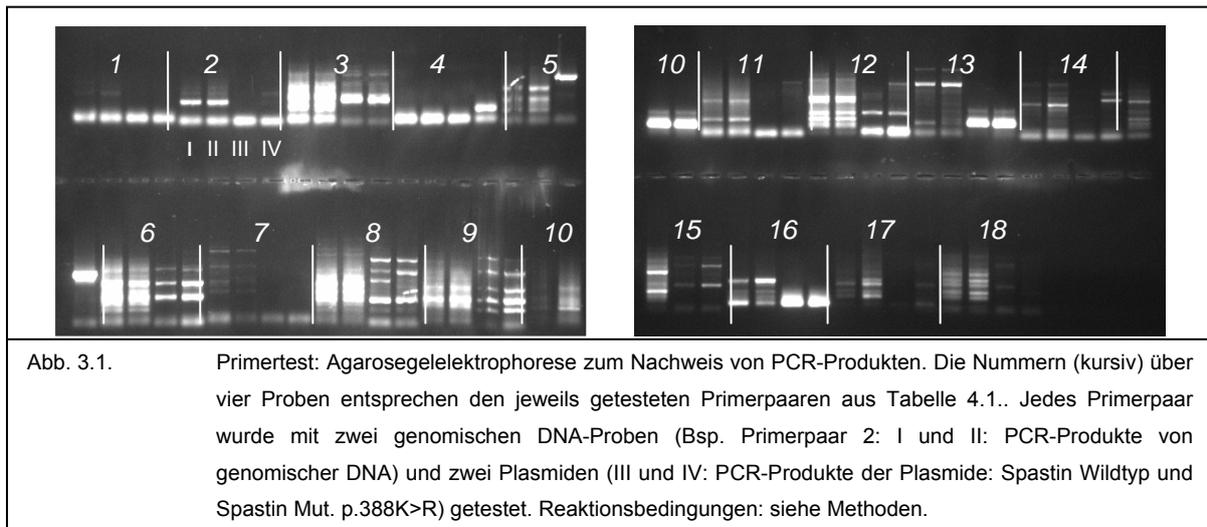
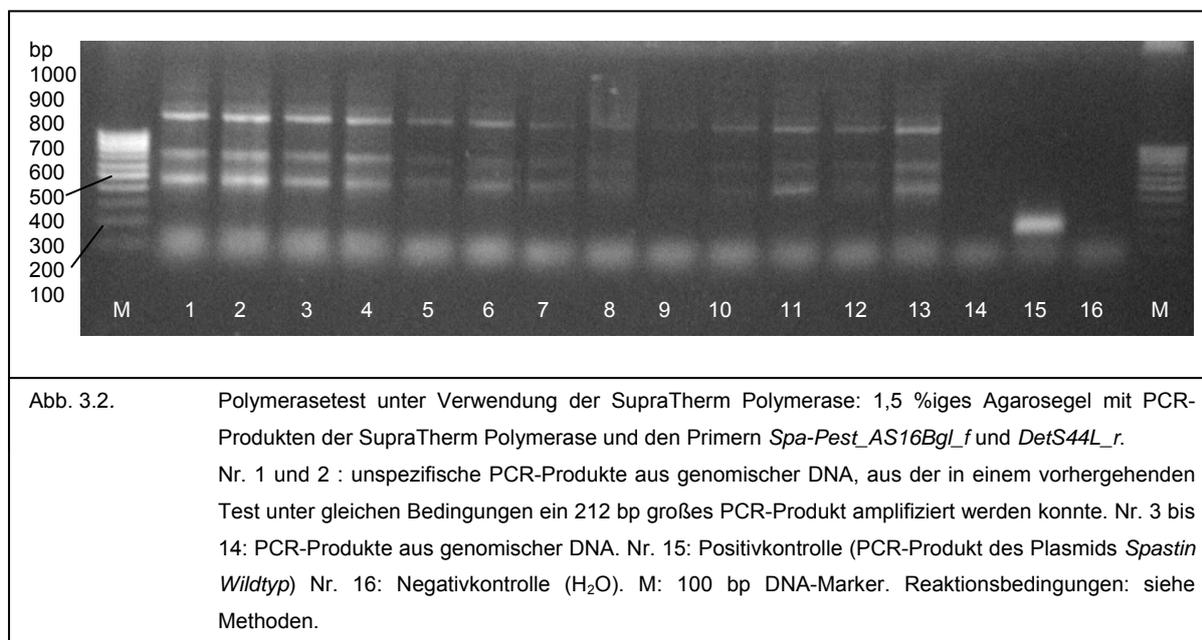


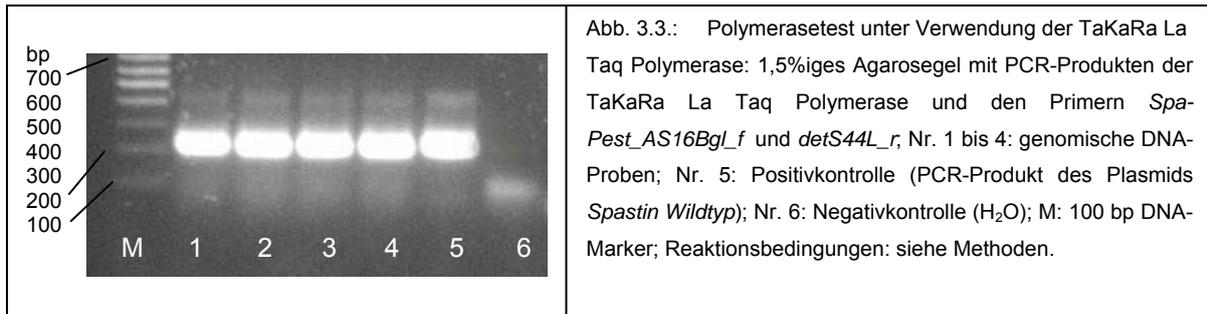
Tabelle 3.1.: Bezeichnung und Sequenz der in Abb. 4.1. verwendeten PCR-Primer.

| Nr. in Abb. 4.1. | Forward-Primer | Primersequenz | Reverse-Primer | Primersequenz |
|------------------------|--------------------|---------------------------------------|----------------|--|
| 1 | Spa1n | ctg ccg ccg tcg ctt ggt tc | detS44L_r | tca cga cgt tgt aaa acg acg ...(siehe 3.7.3.) |
| 2 | Spa1n | ctg ccg ccg tcg ctt ggt tc | Spaex1 PCR2_r | aga tga ggc tcc gac cta c |
| 3 | Spa1n | ctg ccg ccg tcg ctt ggt tc | Spaex1 PCR1_r | caa agt cga cag cta cag tc |
| 4 | Spa-Anf | agt gag agc tgt gaa tga att | detS44L_r | tca cga cgt tgt aaa acg acg ... |
| 5 | Spa-Anf | agt gag agc tgt gaa tga att | Spaex1 PCR2_r | aga tga ggc tcc gac cta c |
| 6 | Spa-Anf | agt gag agc tgt gaa tga att | Spaex1 PCR1_r | caa agt cga cag cta cag tc |
| 7 | SPG4 1-F | ccg tcg gtc tgc ggg ag | detS44L_r | tca cga cgt tgt aaa acg acg ... |
| 8 | SPG4 1-F | ccg tcg gtc tgc ggg ag | Spaex1 PCR2_r | aga tga ggc tcc gac cta c |
| 9 | SPG4 1-F | ccg tcg gtc tgc ggg ag | Spaex1 PCR1_r | caa agt cga cag cta cag tc |
| 10 | Spa-PEST_AS16Bgl_f | aga tct atg gcc agc aac ccg gtg cct | detS44L_r | tca cga cgt tgt aaa acg acg ... |
| 11 | Spa-PEST_AS16Bgl_f | aga tct atg gcc agc aac ccg gtg cct | Spaex1 PCR2_r | aga tga ggc tcc gac cta c |
| 12 | Spa-PEST_AS16Bgl_f | aga tct atg gcc agc aac ccg gtg cct | Spaex1 PCR1_r | caa agt cga cag cta cag tc |
| 13 | Spa-PEST_AS1Bgl_f | aga tct atg aat tct ccg ggt gga cga g | detS44L_r | tca cga cgt tgt aaa acg acg ... |
| 14 | Spa-PEST_AS1Bgl_f | aga tct atg aat tct ccg ggt gga cga g | Spaex1 PCR2_r | aga tga ggc tcc gac cta c |
| 15 | Spa-PEST_AS1Bgl_f | aga tct atg aat tct ccg ggt gga cga g | Spaex1 PCR1_r | caa agt cga cag cta cag tc |
| 16 | detS44L_f | ata tgg ccc ctc cgc ccg ag | detS44L_r | tca cga cgt tgt aaa acg acg ... |
| 17 | detS44L_f | ata tgg ccc ctc cgc ccg ag | Spaex1 PCR2_r | aga tga ggc tcc gac cta c |
| 18 | detS44L_f | ata tgg ccc ctc cgc ccg ag | Spaex1 PCR1_r | caa agt cga cag cta cag tc |

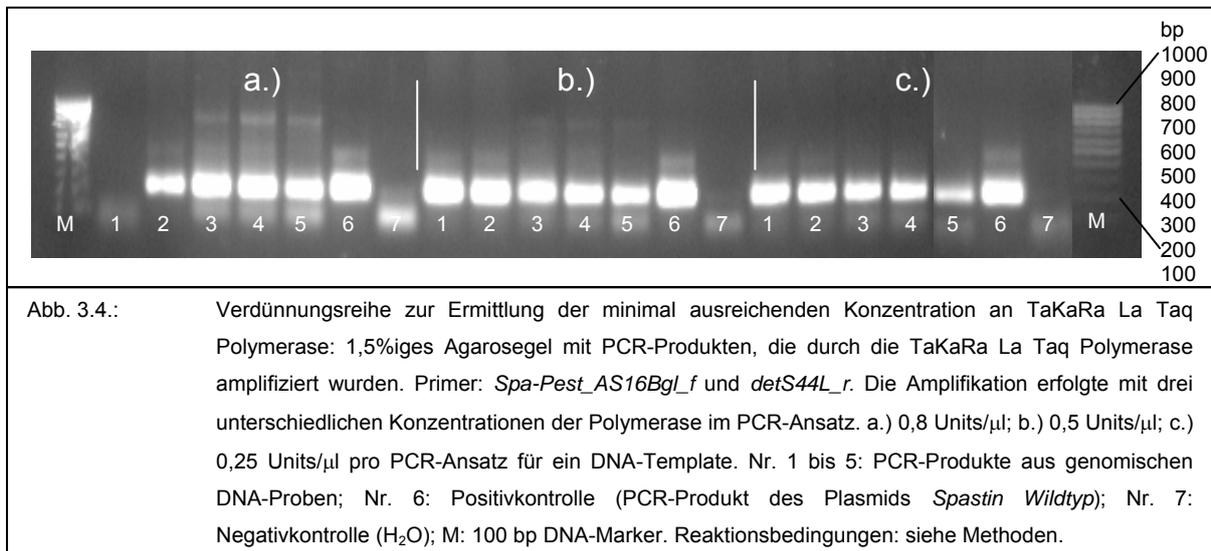
In der Abbildung 3.2. ist exemplarisch ein Bild eines Agarosegels mit unspezifischen PCR-Produkten der SupraTherm Polymerase und den Primern *Spa-Pest_AS16Bgl_f* und *detS44L_r* (Primerpaar Nr. 10) dargestellt. Nur aus dem Plasmid (Abb. 3.2.: Nr. 15), das die cDNA des *SPG4*-Gens enthält, ließ sich das gewünschte 212 bp PCR-Produkt amplifizieren. Die unbefriedigenden Ergebnisse kann man auf den hohen GC-Gehalt des Exon1 des *SPG4*-Gens zurückführen. Deshalb wurde die SupraTherm Polymerase durch die TaKaRa La Taq Polymerase ersetzt, da diese besser zur Amplifikation von GC-reichen DNA-Abschnitten geeignet ist. Die Qualität der PCR-Produkte mit der Primerkombination *Spa-Pest_AS16Bgl_f* und *detS44L_r* konnte so deutlich verbessert werden. Zudem gelang es, PCR-Produkte gleicher Qualität und Quantität aus jeder genomischen DNA-Probe zu amplifizieren (Abb. 3.3.).

Aufgrund dieser Tests haben wir uns für die TaKaRa La Taq als Polymerase, die Primerkombination *Spa-Pest_AS16Bgl_f* und *detS44L_r* sowie für die entsprechenden Temperaturen der Polymerasekettenreaktion (siehe Kapitel 2.6.3.) entschieden.





Der hohen Probenzahl geschuldet, sollte ferner die minimal ausreichende Konzentration an TaKaRa La Taq Polymerase ermittelt werden. Dabei zeigte sich, dass die Polymerasemenge auf eine Konzentration von 0,25 Units/ μ l pro PCR-Ansatz für ein DNA-Template reduziert werden konnte (siehe Abb. 3.4.).



In der Abbildung 3.5. ist die DNA-Sequenz des 212 bp Produkts dargestellt. Der reverse-Primer besitzt einen *M13*-Anhang, der dem Sequenzierprimer *M13 universal* als Template dient und die direkte Sequenzierung des PCR-Produkts erlaubt. Zusätzlich ist eine *HinfI*-Schnittstelle als interne Positivkontrolle enthalten.

```

5' GCC AGC AAC CCG GTG CCT CCC AGG CCT CCG CCC CCT TGC CTG GCC CCC GCC
   CCT CCC GCC GCC GGG CCG GCC CCT CCG CCC GAG TCG CCG CAT AAG CGG AAC
   CTG TAC TAT TTC TCC TAC CCG CTG TTT GTA GGC TTC GCG CTG CTG CGT TTG
   GTC GCC TTC GAGTCTTACAATTCACCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGA 3'

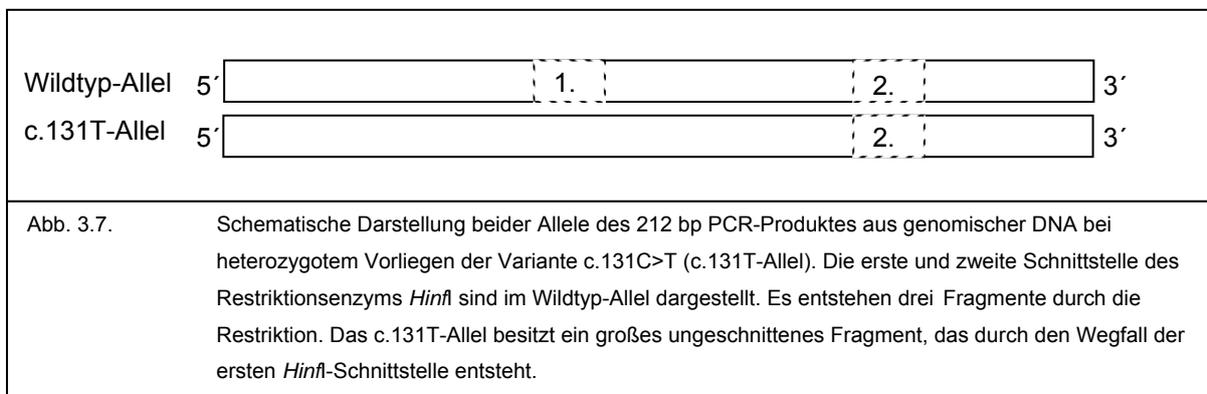
```

Abb. 3.5. DNA-Sequenz des 212 bp PCR-Produkts aus dem Exon1 des *SPG4*-Gens mit Primersequenzen; grau hinterlegt: forward-Primer *Spa-PEST_AS16Bgl_f*; hellgrau hinterlegt: reverse-Primer *detS44L_r*; gerahmt: 1. Schnittstelle des Restriktionsenzym *HinfI*; kursiv: artifiziiell durch den Primer *detS44L_r* eingebrachte zweite Schnittstelle für *HinfI*. Unterstrichener Anteil des reverse-Primers entspricht dem im Text erwähntem Anhang.

Das Restriktionsenzym *Hinfi* schneidet das 212 bp große PCR-Produkt beim homozygoten Vorliegen der Wildtyp-Sequenz an zwei Stellen – einmal in der genomischen DNA und einmal im Anhang des reverse-Primers. *Hinfi*-Schnittstellen sind durch die spezifische Basensequenz GANTC gekennzeichnet; es wird die Phosphodiesterbindung zwischen den Guanin- und Adeninbasen geschnitten. Liegt ein Basenaustausch vor, der zur Abänderung der Erkennungssequenz GANTC führt (z.B. c.131C>T: GANTT) – kann das Enzym nicht mehr spalten (siehe Abb. 3.6.). Im Zuge dessen erhält man ein verändertes Restriktionsmuster (siehe 3.7.).

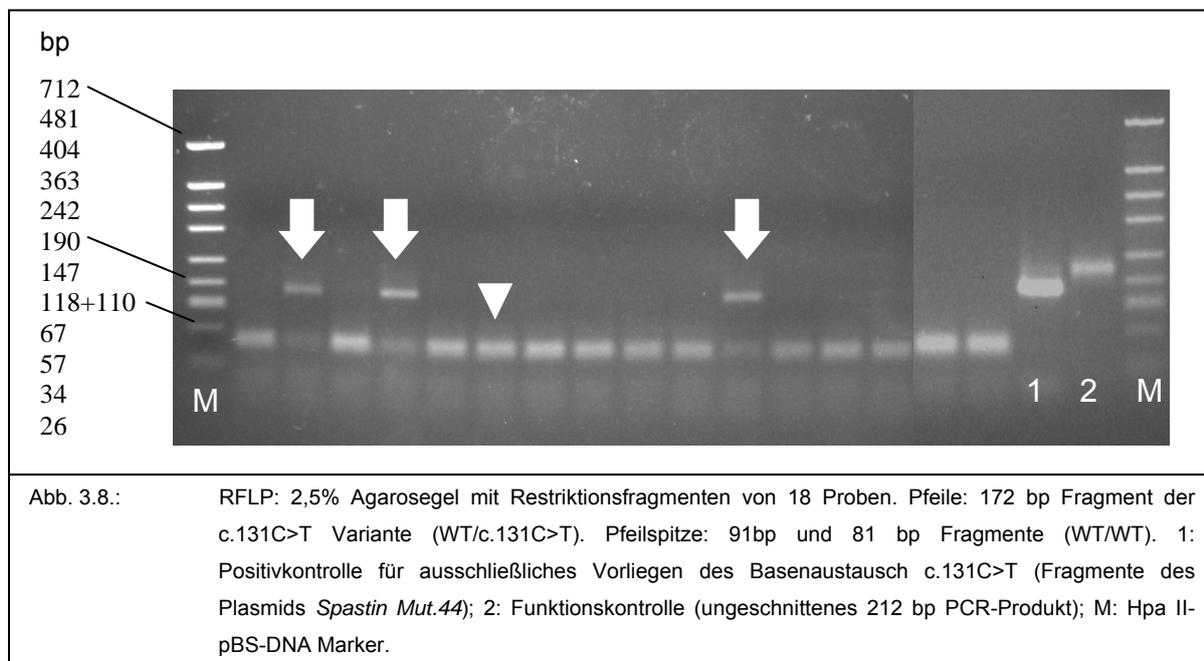
| | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| WT DNA-Sequenz | GCC | CCT | CCG | CCC | <u>GAG TCG</u> | G | CCG | CAT | AAG | CGG | AAC |
| c.131C>T DNA-Sequenz | GCC | CCT | CCG | CCC | <u>GAG TT</u> | G | CCG | CAT | AAG | CGG | AAC |
| Aminosäuresequenz | A | P | P | P | E | S>L | P | H | K | R | N |
| Aminosäureposition | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 |

Abb. 3.6. Ausschnitt aus der DNA-Sequenz des Exon 1 des *SPG4*-Gens und der Aminosäuresequenz des Spastins: Dargestellt ist der Basenaustausch c.131C>T, der zu dem Verlust der *Hinfi*-Schnittstelle im PCR-Produkt und zum Aminosäureaustausch p.44S>L führt.



Nach dem Restriktionsverdau (Durchführung siehe 2.9.) sollten die entstandenen Fragmente durch eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Liegt der Wildtyp (WT) homozygot vor, sind ein 40 bp, ein 81 bp und ein 91 bp Fragment im Gel zu erwarten. Bei dem heterozygoten Vorliegen des c.131T-Allels (c.131C>T/WT) würde man ein 40 bp, ein 81 bp, ein 91 bp und zusätzlich ein ungeschnittenes 172 bp Fragment erwarten (Abb. 3.7.). Das Auftragen eines ungeschnittenen PCR-Produktes diente der Funktionskontrolle des Enzyms *Hinfi* (Abb. 3.7.). Als Positivkontrolle wurde immer das PCR-Produkt des Plasmids *Spastin Mut.44* mitverdaut. Es enthält die cDNA des *SPG4*-Gens mit dem Basenaustausch

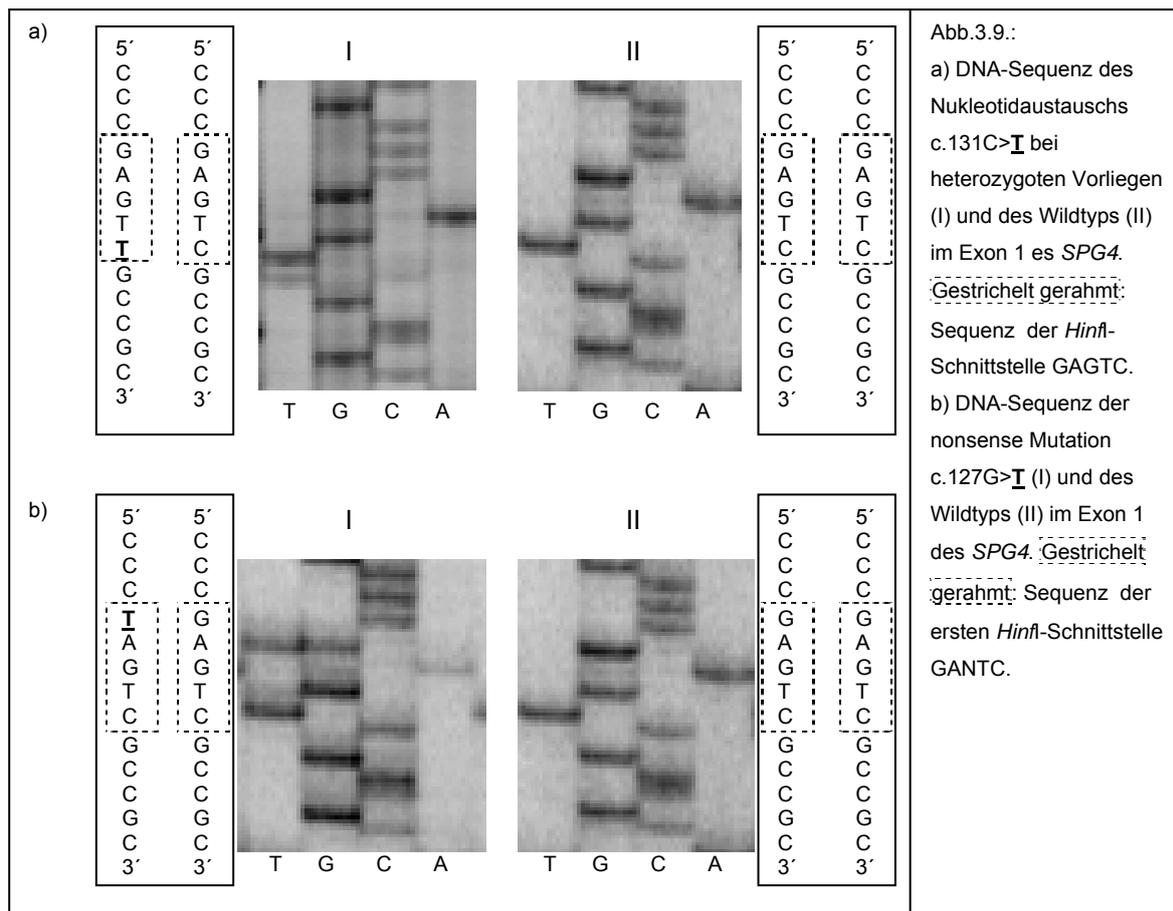
c.131C>T und sein Restriktionsmuster würde dem homozygoten Vorliegen des c.131T-Allels entsprechen; es ist durch das Vorhandensein des 172 bp Fragmentes gekennzeichnet. Das Auftreten des großen 172 bp Fragmentes wurde als Marker für den Nukleotidaustausch c.131C>T genutzt (siehe Abb. 3.8.).



3.2. DNA-Sequenzanalyse bei aberranten RFLP-Befunden

In der vorliegenden Arbeit wurden alle DNA-Proben der HSP- und Kontrollgruppe mit aberrantem RFLP-Muster zur Verifizierung sequenziert. Sieben von acht detektierten 172 bp DNA-Fragmenten der HSP-Gruppe und sieben von sieben identifizierten 172 bp Fragmenten der Kontrollgruppe konnten auf das Vorliegen des c.131T-Allels zurückgeführt werden (Abb. 3.9. a)).

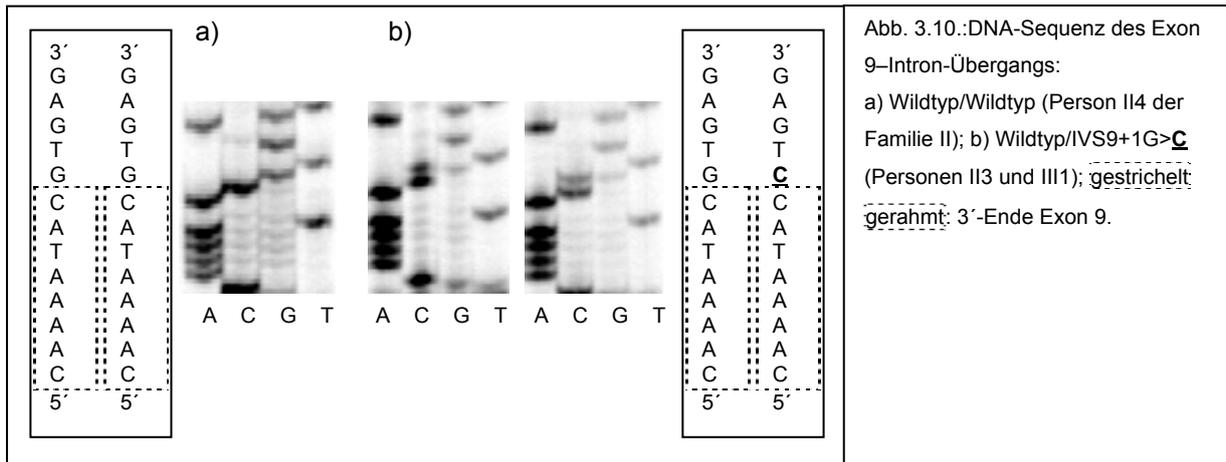
HSP Einzelperson: Bei einer der sechs Einzelpersonen mit positiver Familiengeschichte für eine autosomal dominante HSP wurde durch die Sequenzierung die nonsense Mutation c.127G>T (p.E43X) identifiziert, die wie die c.131C>T Variante zum Verlust der *HinfI*-Schnittstelle führt (Abb. 3.9. b)). Auch hier entsteht durch den Verdau neben den Wildtyp Fragmenten (81bp, 91bp, 40 bp) ein 172 bp Fragment.



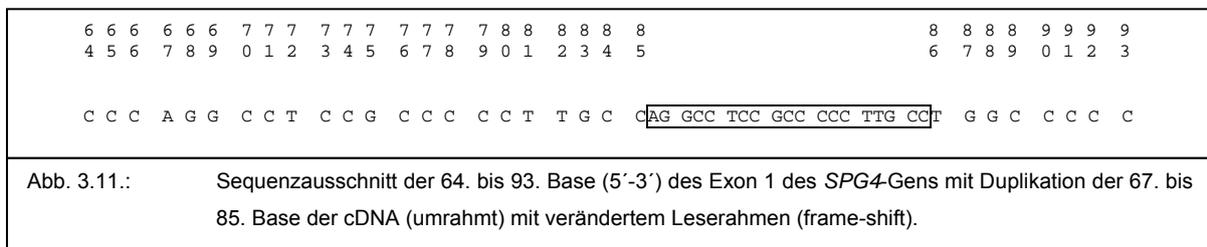
3.2.1. Weitere DNA-Sequenzanalysen

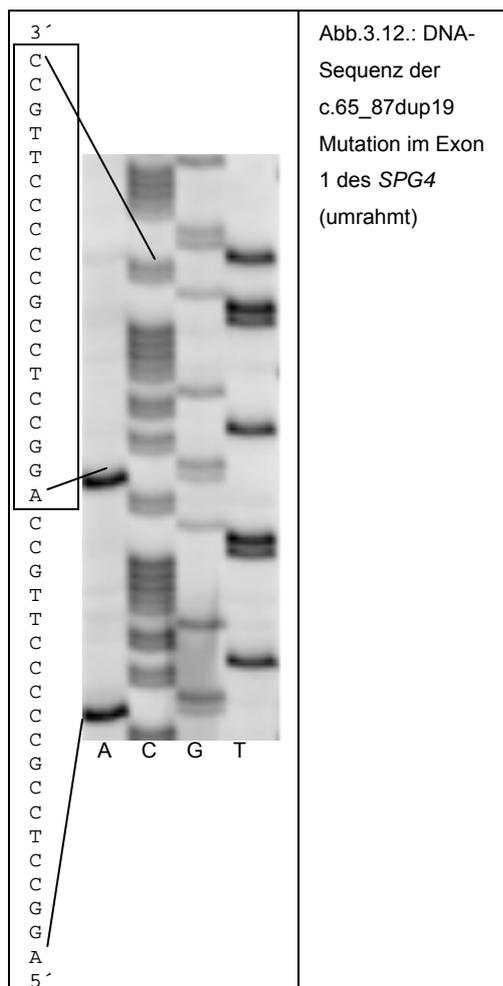
Zusätzlich wurden alle verfügbaren DNA-Proben der Familien II und III der HSP-Gruppe sequenziert.

Familie II: Bei der Indexpatientin (II3) dieser Familie wurde die bereits im Vorfeld ermittelte splice-site Mutation IVS9+1 G>C (nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe) mittels Sequenzierung bestätigt (Abb. 3.10.; Stammbaum siehe Abb. 3.16.). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden außerdem die DNA-Proben der restlichen Familienmitglieder sequenziert; die Verteilung dieser Mutation innerhalb der Familie II konnte somit aufgeklärt werden (Abb. 3.16.). Die Mutation IVS9+1 G>C wurde zudem in der Person III1 identifiziert, die zusätzlich den Nukleotidaustausch c.131C>T trägt. Das c.131T-Allel konnte ebenfalls durch eine Sequenzanalyse verifiziert werden.



Familie III: Die PCR-Produkte von einigen Familienmitgliedern sind durch eine aberrante Größe in der Agarosegelelektrophorese aufgefallen. Nach der Klonierung dieser PCR-Produkte und einer anschließenden Sequenzierung konnte eine 19 bp Duplikation identifiziert. Es handelt sich um eine Duplikation der 67. bis 85. Base des Exon1 des *SPG4*-Gens (Abb. 3.11. und 3.12.). Die c.67_85dup19 (g.192_210dup19) Mutation führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und zu einem vorzeitigen Stop-Codon. In der Sequenzanalyse aller *SPG4*-Exons des Betroffenen III2 konnte keine weitere Mutation identifiziert werden.





3.3. Epidemiologie des Nukeotidaustauschs c.131C>T

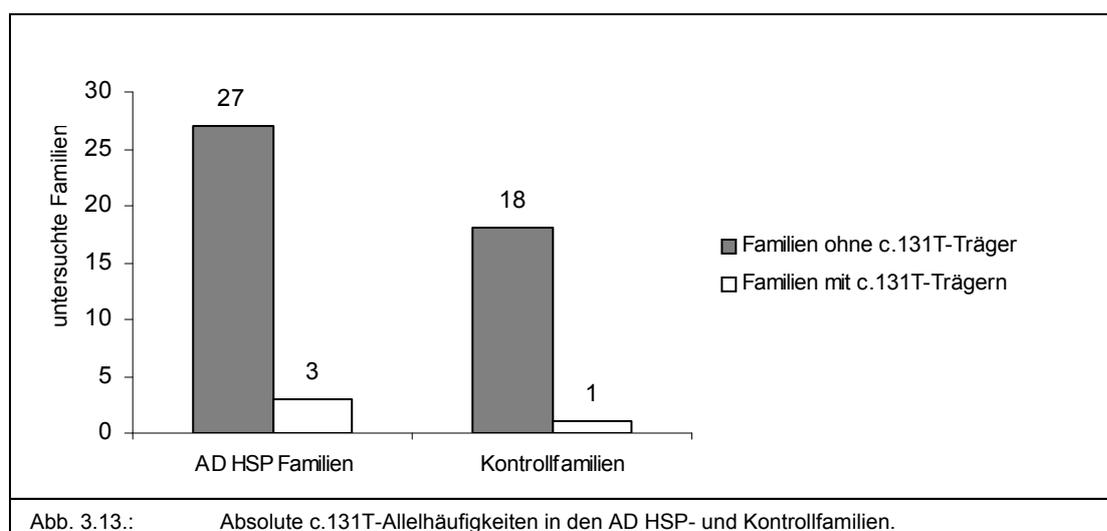
In dieser Arbeit sollten eine HSP-Gruppe und eine Kontrollgruppe auf das Vorliegen der c.131C>T Variante im *SPG4*-Gen untersucht werden. Die HSP-Gruppe beinhaltet 27 Familien und 6 Einzelpersonen, die von einer autosomal dominanten HSP betroffen sind. Insgesamt wurden durch die Untersuchung aller 277 Personen dieser Gruppe Daten zu 216 unabhängigen Chromosomen erhoben.

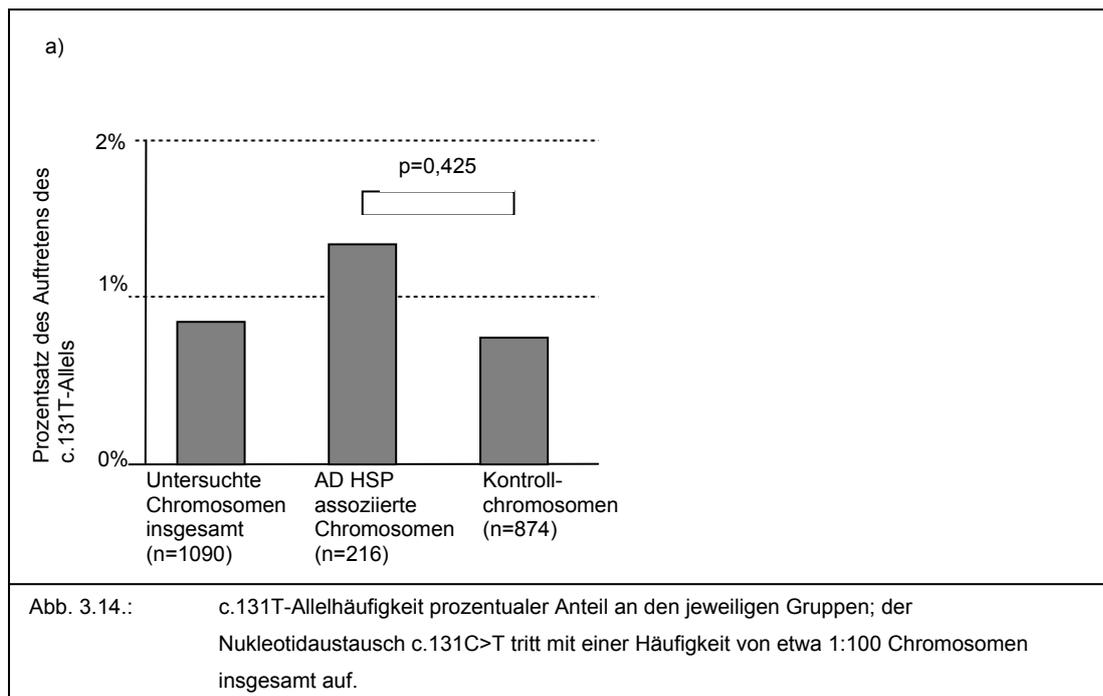
Der Kontrollgruppe wurden acht autosomal rezessiv assoziierte HSP- und eine weitere Familie zugeordnet. Von diesem Personenkreis wurden 36 unabhängige Chromosomen untersucht. Außerdem beinhaltet die Kontrollgruppe 838 unabhängige Chromosomen von Einzelpersonen. Zusätzlich wurden 9 Familien untersucht, die an einer Familiären Hörstörung leiden. Dabei handelt es sich um 50 Personen, von denen aufgrund des Fehlens der Stammbäume die unabhängigen Chromosomen

nicht ermittelt werden konnten. Insgesamt wurden dementsprechend 18 Kontrollfamilien, 838 Kontrollchromosomen (874 Kontrollchromosomen inklusive der 36 Chromosomen der autosomal rezessiven Familien) untersucht.

Unter Verwendung des hier etablierten RFLP-Assays, gefolgt von einer verifizierenden Sequenzierung, konnten drei c.131T-Allele in den 27 untersuchten AD HSP Familien ($3/27 = 11,11\%$) identifiziert werden (Abb. 3.13.). Da dieses Ergebnis keine Aussage über die Größe und das Auftreten des c.131T-Allels in der AD HSP-Kohorte insgesamt macht, wurden die unabhängigen Allele der AD HSP-Gruppe anhand der Stammbäume ausgezählt, um eine allgemeingültigere Aussage über diese Stichprobe machen zukönnen. Es wurde somit eine Häufigkeit von 1,39% für das c.131T-Allel ermittelt ($c.131C>T\ 3/216 = 1,39\%$; Abb. 3.14.) (Ergebnisse siehe 3.2.).

In der Kontrollgruppe konnten sieben c.131T-Allele identifiziert werden ($c.131C>T\ 7/874 = 0,8\%$; Abb. 3.14.). Ein 44L-Allel der Kontrollgruppe stammt aus einer Kontrollfamilie ($1/18 = 5,6\%$; Abb. 3.13.); der Rest von Einzelpersonen. Von den insgesamt 419 Kontrollprobanden (ohne die 60 Hörstörungen-, die 29 autosomal rezessiven HSP-Probanden und ohne weitere fünf Personen einer Familie) tragen dementsprechend 6 das c.131T-Allel, was einer Prävalenz von 1,43% Prozent entspricht.





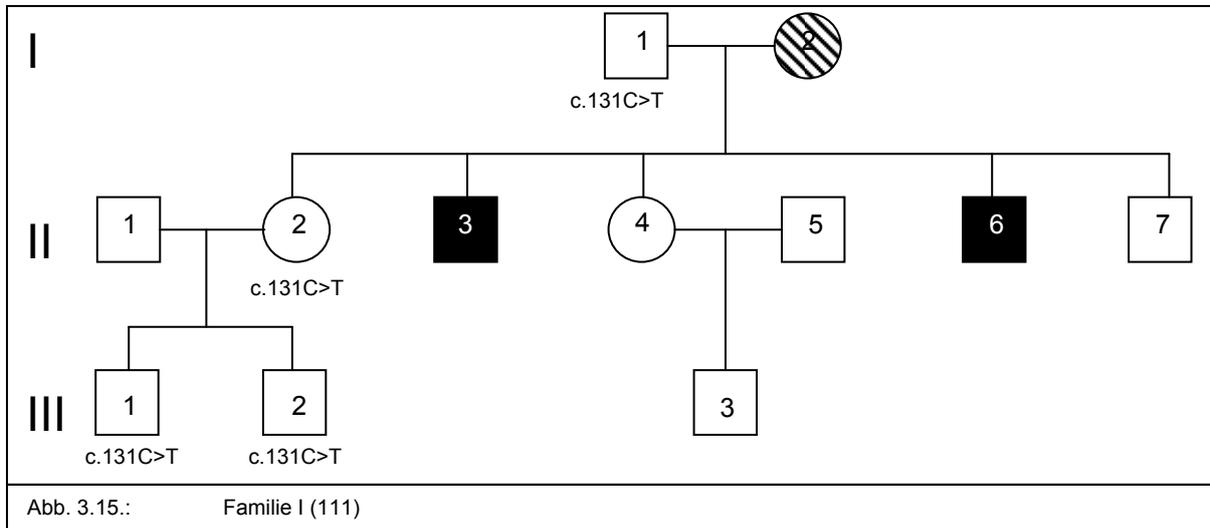
Die statistische Auswertung der Daten erfolgte computergestützt mit dem Softwareprogramm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences; SPSS GmbH Software, München, BRD) für Windows in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der FSU Jena. Zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschiedes zwischen der HSP- und Kontrollgruppe wurde der exakte Test nach Fisher verwendet, da es sich um zwei voneinander unabhängige Gruppen handelt, und das zu messende Merkmal nur zwei Ausprägungen zeigt (c.C131-Allel oder c.131T-Allel). Danach ergibt sich ein p-Wert von 0,425, demzufolge ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant.

3.4. Fallvorstellungen der HSP-Gruppe

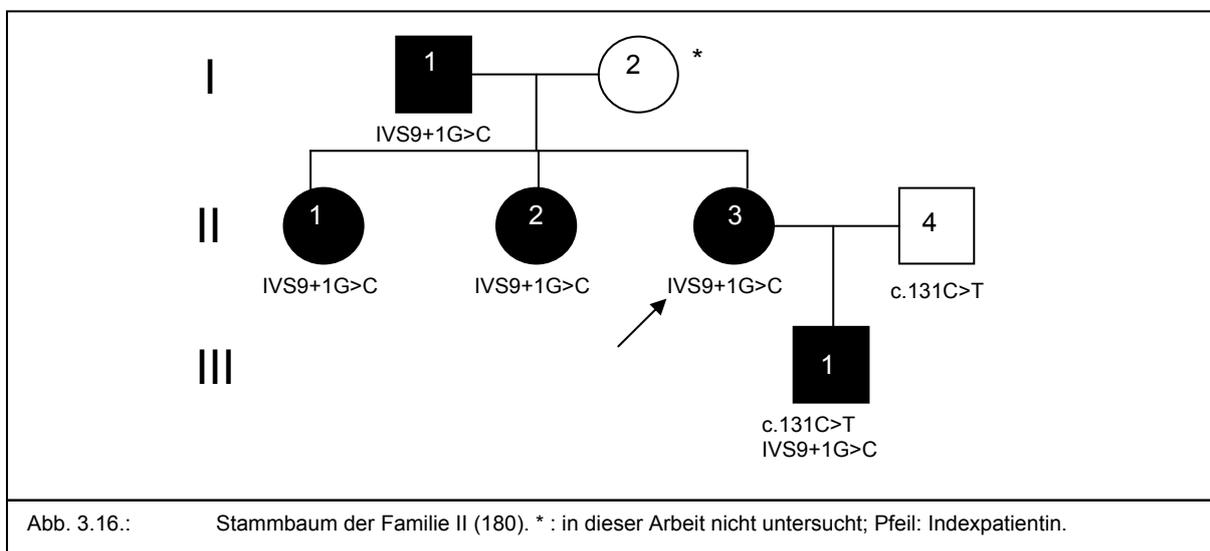
Wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt, entstammen die hier identifizierten c.131T-Allele aus drei der 27 Familien der HSP-Gruppe. In diesem Abschnitt werden diese Familien vorgestellt.

Familie I (111; Abb. 3.16.): Die Familienmitglieder II3 und II6 dieser Familie sind an einer HSP erkrankt. Der Rest der Familie ist subjektiv asymptomatisch. In neurologischen Untersuchungen zeigt einzig die Mutter I2 nicht eindeutig

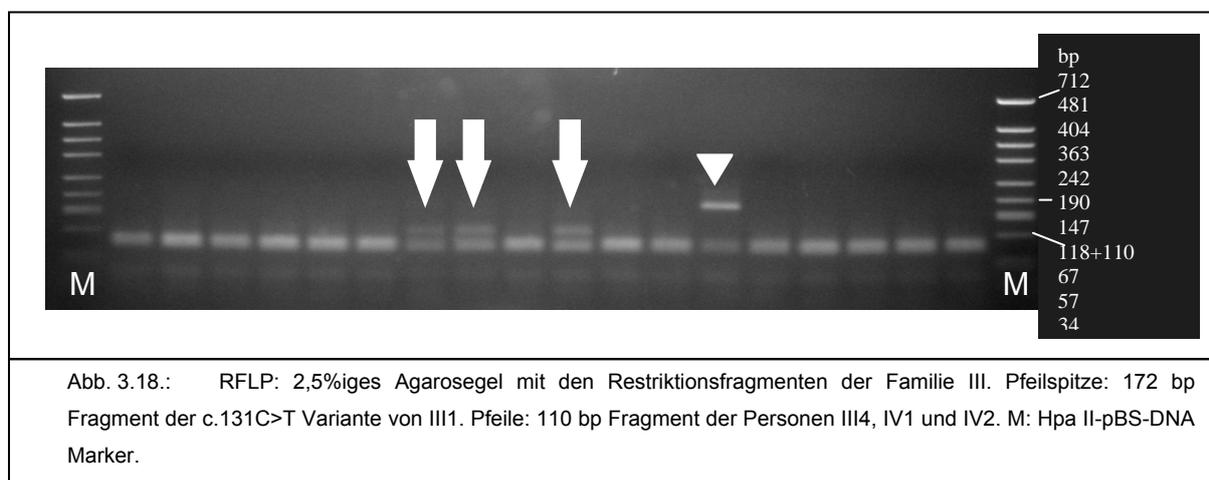
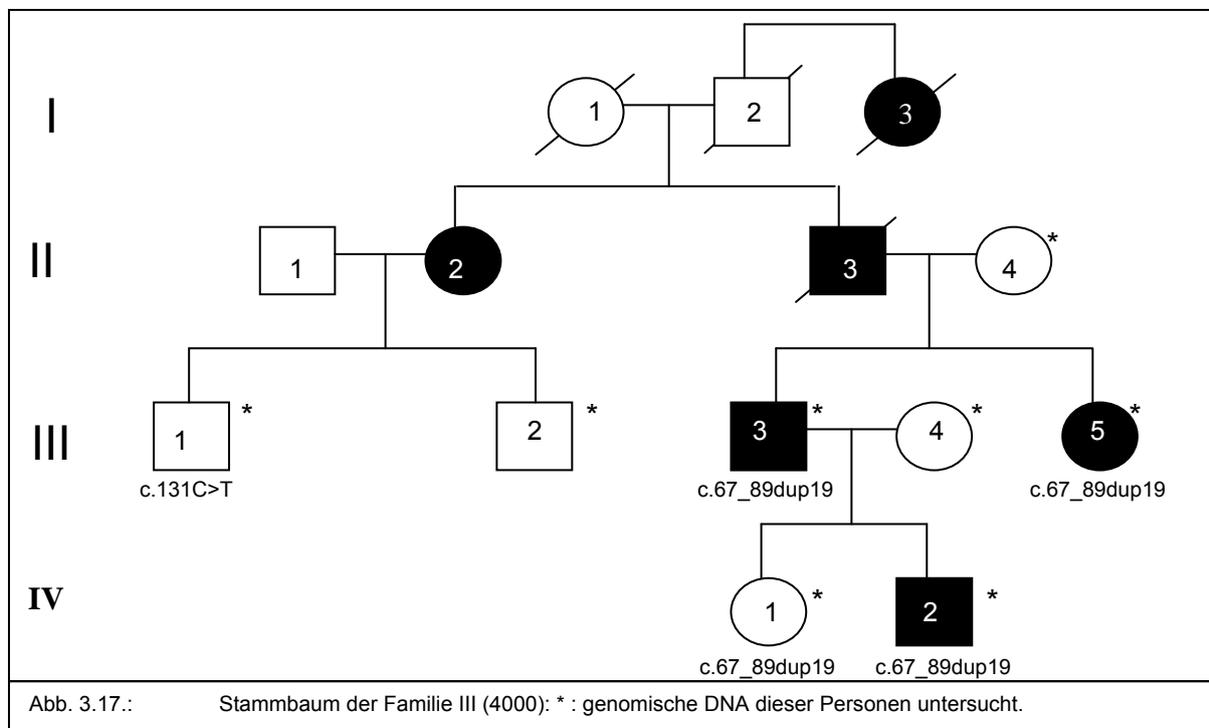
pathologische Befunde. Das c.131T-Allel konnte in der Familie I viermal identifiziert werden. Alle Allel-Träger (I1, II2, III1, III2) sind nicht betroffen. Das c.131T-Allel segregiert nicht mit der hier auftretenden HSP.



Familie II (180; Abb. 3.17.): Im Rahmen dieser Arbeit wurden die DNA-Proben von sechs Familienmitgliedern untersucht, von denen fünf dieser Personen an einer HSP erkrankt sind (I1, II1, II2, II3, III1). Mittels des hier etablierten RFLP-Assays wurde in den Personen II4 und III1 der Nukleotidaustausch c.131C>T identifiziert. Durch Sequenzanalyse wurde in den DNA-Proben der fünf Betroffenen eine schon vorher ermittelte (nicht publiziert) splice-site Mutation (IVS9+1 G>C; c.1370+1G>C) bestätigt. Auch in dieser Familie segregiert das c.131T-Allel nicht mit der Erkrankung, allerdings findet man eine Besonderheit vor, denn die betroffene Person III1 trägt die splice-site Mutation und den Nukleotidaustausch *in trans*; sie zeigt seit dem Kindesalter eine HSP-Symptomatik.



Familie III (4000; Abb. 3.17.): Diese Familie umfasst 14 Personen, davon sind sechs an einer HSP erkrankt. In dieser Arbeit wurden die DNA-Proben von acht Personen auf das c.131T-Allel untersucht. Bei drei Personen sind die vorhandenen Symptome mit der Diagnose einer HSP vereinbar (III4, III6, IV2). Die Person IV2 ist seit der Kindheit betroffen; IV1 ist bisher gesund. Durch den RFLP-Assay wurde ein nichtbetroffenes Familienmitglied identifiziert, dass für den Nukleotidaustausch c.131C>T heterozygot ist (III3). Des Weiteren fielen die betroffenen Personen III4, III6, IV2 sowie die nicht betroffene Person IV1 durch ein anderes PCR-Produkt auf (siehe dazu auch Abb. 3.18.). Ursache ist eine Duplikation (c.67_85dup19), die mittels Sequenzanalyse identifiziert werden konnte (siehe auch Abb. 3.12.).



HSP Einzelperson (nonsense Mutation, c.127G>T, p.43E>X): Der Patient leidet an einer Gangstörung mit einer Tonuserhöhung und Muskelschwäche der oberen und unteren Extremität. Pyramidenzeichen fielen beidseits positiv aus. Die Mutter und der Großvater mütterlicherseits zeigten ebenfalls die obengenannten Symptome. Das Erkrankungsalter liegt bei diesen drei Familienmitgliedern um das 50. Lebensjahr. Die genannten Symptome sind vereinbar mit der Diagnose einer *SPG4*-assoziierten HSP. Durch den *HinfI*-RFLP-Assay wurde bei dieser Person ebenfalls ein 172 bp Fragment identifiziert, dass sich in der Sequenzierung nicht als Nukleotidaustausch c.131C>T bestätigte. Es konnte die nonsense Mutation c.127G>T identifiziert werden.

Insgesamt sind alle c.131T-Allel-Träger dieser Arbeit, bis auf einen, nicht an einer HSP erkrankt. Bei der Ausnahme liegt identifizierte c.131T-Allel zusätzlich zu einer krankheitsverursachender Mutation *in trans* vor (siehe Abb. 3.10.).

Durch den hier etablierten RFLP-Assay konnten neben dem Nukleotidaustausch c.131C>T zwei weitere Mutationen im Exon 1 des *SPG4* detektiert werden.

3.5. *In silico* Analysen zur Aufklärung des Pathomechanismus des Nukleotidaustauschs c.131C>T

Zur Aufklärung eines möglichen Pathomechanismus des Nukleotidaustausch c.131C>T wurden im Rahmen dieser Arbeit *in silico* Analysen mit dem Computerprogramm PEST-FIND durchgeführt. Dieses Programm sucht in Aminosäuresequenzen nach einer Häufung der Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonine (T), die von Lysin (K), Arginin (R) und Histidin (H) flankiert werden. Peptidsequenzen dieser Art haben häufig eine Regulierungsfunktion für die Proteinstabilität.

Für das Spastin ließ sich mittels dieses Programms zwischen der Aminosäure 23 und 46 eine PEST-Sequenz mit einem Wert von 9 identifizieren (AS 23-46: RPPPPCLAPAPPAAGPAPPPESPH), was nach Rechsteiner und Kollegen ein

starker Hinweis für das Vorliegen einer PEST-Sequenz ist. Durch den Nukleotidaustausch c.131C>T wird der Wert auf Null reduziert; die PEST-Sequenz würde demnach wegfallen.

4. Diskussion

Die Hereditäre Spastische Paraplegie ist eine degenerative Erkrankung des Nervensystems, die durch eine starke Heterogenität der Klinik und Genetik gekennzeichnet ist. Diese Dissertation gliedert sich in Arbeiten ein, die sich mit der Aufklärung der heterogenen molekulargenetischen Grundlagen der HSP beschäftigen. Die *SPG4*-assoziierte autosomal dominante HSP ist die häufigste der HSP-Formen. Im *SPG4*-Gen wurden bereits über 170 Mutationen identifiziert. Dabei handelt es sich um missense Mutationen, die fast ausschließlich die kodierende Region der funktionellen AAA-Domäne am C'-Terminus des Proteins Spastin betreffen und um verkürzende (engl. truncating mutations) Mutationen (splice-site, nonsense, frame-shift Mutationen), die im gesamten Gen lokalisiert sind. Eine der wenigen Basensubstitutionen, die einen Aminosäureaustausch am N'-Terminus des Spastins zur Folge hat, ist die Variante c.131C>T (p.44S>L). Es bestehen nur lückenhafte Erkenntnisse über Wirkung und Häufigkeit des c.131T-Allels. Im Zuge dessen war es das Ziel der Arbeit, nach der Etablierung eines Verfahrens zur Detektion des Nukleotidaustauschs c.131C>T, Daten zur Häufigkeit und eventuell bestätigende Hinweise für die beschriebene modifizierende Wirkung des c.131T-Allels zu ermitteln.

4.1. **Verlässlichkeit des RFLP-Assays**

Durch den hier etablierten *Hinfl*-RFLP-Assay wurden insgesamt acht aberrante Restriktionsmuster in der AD HSP-Gruppe und sieben in der Kontrollgruppe identifiziert. In 14 der 15 Fälle konnte die Existenz des c.131T-Allels mittels DNA-Sequenzanalyse bestätigt werden. Nur ein abberantes Restriktionsmuster wurde nicht als Nukleotidaustausch c.131C>T sondern als nonsense Mutation c.127G>T (p.43E>X) identifiziert. Definitive Angaben zur Spezifität und Sensibilität sind möglich, da die Wildtyp-Allele nicht sequenziert wurden; eine unabhängige Untersuchungsmethode wurde nicht durchgeführt. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei einem positiven RFLP-Befund tatsächlich um das c.131T-Allel handelt, liegt bei >93% (positiver Vorhersagewert; 14/15). Eine Aussage über den negativen Vorhersagewert lässt aufgrund der nicht durchgeführten

Sequenzanalyse der Wildtyp-Allele (1079) nicht machen. Allerdings ist in jedem PCR-Produkt eine interne Positivkontrolle für das Restriktionsenzym enthalten, demzufolge würde jede genetische Veränderung registriert, die die Schnittstelle des Enzyms zerstört.

Kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, in der ein offensichtlich sporadischer HSP-Fall mit einer weiteren missense Mutation (c.127G>C, p.43E>Q) beschrieben wurde. Die betreffende Person leidet seit dem 41. Lebensjahr an einer milden PHSP. Die c.127G>C Mutation konnte im Rahmen der Veröffentlichung in 600 Kontrollchromosomen ausgeschlossen werden (Depienne et al. 2005). Die *HinfI*-Schnittstelle würde durch diese missense Mutation zerstört werden und sollte, wie die c.131C>T Varianten, in einem aberranten Restriktionsmuster resultieren. In der vorliegenden Arbeit ließ sich aber kein aberrantes Restriktionsmuster auf die c.127G>C missense Mutation zurückführen; diese Mutation konnte somit in der HSP- und Kontrollgruppe ausgeschlossen werden. Es handelt sich nicht um einen Polymorphismus.

Im Rahmen einer genetischen Beratung, beispielsweise wenn ein Elternteil an HSP erkrankt ist, kann der hier etablierte RFLP-Assay als sichere schnelle Voruntersuchung bezüglich des Vorliegens des c.131C>T Nukleotidaustauschs betrachtet werden. Aufgrund des möglichen Auftretens der missense Mutation c.127G>C (p.43E>Q; Depienne et al. 2005) oder einer nonsense Mutation c.127G>T (p.43E>X; diese Arbeit) und dem damit einhergehenden positiven Vorhersagewert von <100% sollte jedes c.131T-positive RFLP-Ergebnis durch eine DNA-Sequenzanalyse verifiziert werden.

4.2. c.131T-Allelverteilung

Svenson und Kollegen untersuchten insgesamt 28 HSP-Patienten auf Mutationen im *SPG4*-Gen, die entweder eine autosomal dominante Vererbung zeigten oder eine schon bekannte *SPG4*-Mutationen hatten. Sie ermittelten eine Häufigkeit für die c.131C>T Variante von ca. 9% in der HSP-Gruppe und von 0,6% in der Kontrollpopulation (Svenson et al. 2004). In einer weiteren Studie aus dem Jahr

2005, die die Untersuchung von sporadischen HSP-Patienten auf *SPG4*-Mutationen zum Gegenstand hatte, zeigten 1,45% der reinen HSP-assoziierten Chromosomen und 1,3% der Kontrollchromosomen das c.131T-Allel (Depienne et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit konnten durch den neu etablierten *HinfI*-RFLP-Assay Häufigkeiten des c.131T-Allels von 1,39% in der AD HSP-Gruppe und von 0,8% in der Kontrollgruppe ermittelt werden. Die Häufigkeit des Auftretens des c.131T-Allels in der Kontrollgruppe, bezogen auf die untersuchten Einzelpersonen, sollte der Häufigkeit des Auftretens des c.131T-Allels in der Allgemeinbevölkerung in Mitteleuropa entsprechen, da die Kontrollgruppe eine zufällige Auswahl nicht neurologisch voruntersuchter Individuen darstellt. Es ergibt sich somit eine Prävalenz von 1,43%. Ein statistisch signifikanter Unterschied bei diesem geringen Stichprobenumfang von 216 HSP-Chromosomen und 876 Kontrollchromosomen besteht zwischen den beiden untersuchten Gruppen allerdings nicht ($p=0,425$). Dennoch kommt das c.131T-Allel 1,7 mal häufiger in der HSP-Gruppe als in der Kontrollgruppe vor. Dies bestätigt die Daten von Svenson und Kollegen, dass der Nukleotidaustausch c.131C>T häufiger in HSP-Familien zu finden ist (Svenson et al. 2004). Die c.131T-Häufigkeit in der Kontrollpopulation beträgt in allen drei Arbeiten, diese hier eingeschlossen, in etwa ein Prozent. Das Ergebnis entspricht der Häufigkeit eines seltenen Polymorphismus; wie schon von Svenson und Kollegen vorgeschlagen (Lewin 2002, Svenson et al. 2004).

Durch diese Arbeit konnten die dokumentierten Fallzahlen an neurologisch voruntersuchten c.131C>T-Trägern erhöht werden. Damit sind bislang neun Fälle (inklusive der sechs hier vorgestellten) dokumentiert, die für das c.131T-Allel heterozygot sind (c.131T/*SPG4*-Wildtyp) und sechs weitere, die das c.131T-Allel und eine *SPG4*-Mutation in *trans* Konfiguration tragen (c.131T/*SPG4*-Mutation) (Chinnery et al. 2004, Svenson et al. 2004, Depienne et al. 2005, Studie dieser Arbeit). Insgesamt wurden in dieser Arbeit mittels des etablierten RFLP-Assays bislang die meisten c.131T-Allelträger identifiziert. Dies gelang in anderen großangelegten HSP-Studien, die die Identifizierung von *SPG4*-Mutationen mittels SSCP, DHPLC oder Sequenzierung zum Ziel hatten, nicht (Fonknechten et al. 2000, Svenson et al. 2001, Sauter et al. 2002, Patrono et al. 2005).

4.3. Wirkung des c.131T-Allels auf den Phänotyp

Durch Stammbaum- und DNA-Sequenzanalysen sollen in der vorliegenden Arbeit weitere Hinweise für einen modifizierenden Effekt der c.131C>T Variante ermittelt werden.

Von den erwähnten heterozygoten c.131T-Allelträgern mit einer *SPG4*-Mutation in *trans* Konfiguration, die bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt identifiziert wurden, waren alle seit dem Kindesalter an einer schweren Form der HSP erkrankt (5/5); im Gegensatz zu den anderen betroffenen Familienmitglieder mit dem Genotyp c.C131/*SPG4*-Mutation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch das etablierte RFLP-Verfahren eine weitere solche Person identifiziert, die zusätzlich zum c.131C>T Nukleotidaustausch eine Mutation (IVS9+1 G→C) in *trans* Konfiguration trägt (bereits im Vorfeld im Rahmen einer anderen Studie der Arbeitsgruppe des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der FSU Jena identifiziert). Die Mutation betrifft die konservierte AAA-Domäne des Spastins und wird von uns als krankheitsverursachend für diese Familie angesehen; alle anderen untersuchten betroffenen Familienmitglieder sind nur heterozygot für die splice-site Mutation, nicht aber für den c.131C>T Austausch. Sie zeigen eine milde Form der HSP mit Beginn der Erkrankung im mittleren Lebensalter. Der einzige heterozygote c.131T-Allelträger (c.131T/*SPG4*-Wildtyp) und Vater des schwer betroffenen Patienten (c.131T/IVS9+1G→C) zeigt keinerlei Symptome einer HSP. In dieser Familie segregiert das c.131T-Allel nicht mit der Erkrankung und wird unabhängig von der anderen Mutation vererbt. Die Schwere der Krankheit bei der Person mit beiden genetischen Veränderungen in *trans* Konfiguration ist gut mit dem vorgeschlagenen modifizierenden Effekt des c.131T-Allels auf den Phänotyp vereinbar (Svenson et al. 2004). Das c.131T-Allel scheint somit als genetischer Faktor zu wirken, der das Krankheitsbild einer vorhandenen *SPG4*-Mutation negativ im Bezug zum Beginn, zum Schweregrad und zur Progression der HSP beeinflusst. Dabei segregiert es in keiner der Familien mit der Erkrankung. Die Mitglieder der untersuchten HSP-Familien mit dem Genotyp c.131T/*SPG4*-Wildtyp scheinen generell keinen HSP-Phänotyp zu zeigen (Svenson et al. 2004, Depienne et al. 2005, diese Studie).

Die von Chinnery und Kollegen veröffentlichte Fallbeschreibung im Rahmen einer Untersuchung einer infantilen HSP steht den bisher gemachten Annahmen gegenüber. Ein schwer betroffenes Kind ist heterozygot für das c.131T-Allel und für eine Mutation im Exon 7 des *SPG4*. Es trägt zwei *SPG4*-Veränderungen in *trans* und zeigt seit dem zehnten Lebensmonat eine verzögerte motorische Entwicklung. Seine Mutter mit der Mutation im Exon 7 des *SPG4* war zum Zeitpunkt der Datenerhebung asymptomatisch. Sein Vater, der für c.131T-Allel heterozygot ist, diagnostizierten Chinnery und Kollegen als gesichert betroffen (Chinnery et al. 2004). Die Diagnose einer vorhandenen HSP des Vaters ist diskussionswürdig, da er bei unerschöpflichem Fußklonus und positivem Babinski Reflex keine Gangstörung zeigt. Zudem leidet er an einer Blasenentleerungsstörung bei fehlender HSP-Familienanamnese. Neurologische Untersuchungen, die den Verdacht einer HSP erhärten würden, wie z.B. eine Untersuchung der Nervenleitgeschwindigkeiten, der MEPs und der SSEPs, wurden nicht erwähnt. Man kann diese Person dementsprechend nur als möglich und nicht als sicher betroffen einstufen (siehe 1.2.2.3). Chinnery und Kollegen beschreiben die Beobachtungen am Kind als einen kombinierten Effekt zweier dominanter Mutationen (co-dominante Mutationen). Interpretiert man den Vater als nicht betroffen und somit das c.131T-Allel auch hier als nicht krankheitsauslösend, so fügt sich diese Fallbeschreibung in das Bild eines modifizierenden Effektes des c.131T-Allels auf den Phänotyp ein.

4.4. Schwierigkeiten in der Diagnosestellung einer HSP

Der letzte Absatz im vorherigen Kapitel 4.3. macht noch einmal die generelle Schwierigkeit der Diagnosestellung einer HSP deutlich (Reid 1999). Auch die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Familie I stellt ein Beispiel für das Problem dar. Die Befunde der Mutter I2 der Elterngeneration (F1) wurden als nicht eindeutig pathologisch angegeben. Andere klinische Daten waren nicht verfügbar. Dadurch ist nicht sicher festzustellen, ob es sich hier überhaupt um eine autosomal dominante Form der HSP handelt. Eine krankheitsverursachende Mutation konnte durch DNA-Sequenzierung aller *SPG4*-Exons nicht nachgewiesen werden. Möglich ist demzufolge in diesem Fall eine Mutation in einem der anderen Genloci. Sicher ist für

diese Familie jedoch die unabhängige Segregation der c.131C>T Variante von der Erkrankung; alle heterozygoten c.131T-Allelträger sind nicht betroffen.

Leider sind die klinischen Untersuchungsbefunde zu den c.131T-positiven Familien I, II und den anderen Probanden lückenhaft und ließen sich im Nachhinein nicht ergänzen; sie wurden als „betroffen“ oder „nicht betroffen“ eingeteilt. Das Erkrankungsalter und die Dauer der HSP konnten bei den meisten Probanden ebenfalls nicht ermittelt werden. Aussagen und Vergleiche zu anderen Studien im Bezug zu diesen Daten sind deshalb nicht möglich. Dies liegt einerseits daran, dass die DNA-Proben aus anderen Instituten bereits mit Diagnose einer HSP zur molekulargenetischen Diagnostik eingesandt wurden und andererseits daran, dass die Proben teilweise noch aus früheren Studien stammen und ein Kontakt zu Patienten und eventuell Hausärzten nicht hergestellt werden konnte. Die Diagnosen wurden jedoch von verschiedenen Fachärzten für Neurologie gestellt, und die Stammbäume aller Familien lagen vor. Zukünftigen Arbeiten sollte eine standardisierte Datenerhebung vorausgehen, um weitere Analysen zur Assoziation von molekulargenetischen Befunden und Klinik zu ermöglichen.

4.5. Zuordnung der nachgewiesenen Veränderungen zu möglichen Pathomechanismen

4.5.1. Haploinsuffizienz und dominant negativer Effekt

In den verschiedenen Veröffentlichungen zur HSP werden für Mutationen im *SPG4*-Gen die Haploinsuffizienz und der dominant negative Effekt als Pathomechanismen diskutiert (Errico et al. 2002, Fink 2004, Schickel et al. 2006).

4.5.1.1. Nonsense, splice-site und frame-shift Mutationen

Für nonsense, splice-site und frame-shift Mutationen wird im Allgemeinen Haploinsuffizienz als Pathomechanismus angenommen (Wilkie 1994). Dies gilt auch für diese Art von Mutationen im *SPG4*-Gen (Burger et al. 2000, Fonknechten et al.

2000, Svenson et al. 2001, Charvin et al. 2003). Bei der Haploinsuffizienz reicht die produzierte Gesamtproteinmenge des Wildtyp-Allels nicht aus und erreicht einen bestimmten Grenzwert nicht, um die Funktion des Proteins zu gewährleisten (Wilkie 1994, Svenson et al. 2001). Die Proteinmenge des mutierten Allels wird dabei entweder durch eine erhöhte Instabilität des Transkripts, durch eine verringerte Expression des Transkripts, durch eine verringerte Stabilität des Proteins oder durch eine veränderte Sekundärstruktur und damit funktionellem Ausfall des Proteins reduziert. Zudem nimmt man an, dass unvollständig synthetisiertes also verkürztes (engl. „truncated“) Protein neben dem Wildtyp-Protein des gesunden Allels vorliegen kann; die Gesamtmenge an funktionellem Wildtyp-Protein ist dann trotzdem verringert und somit nicht ausreichend (Burger et al. 2000, Charvin et al. 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene splice-site Mutation IVS9+1 G→C betrifft die Spleiß-Donorstelle im Intron 9 des *SPG4*. Am 5'-Ende des Introns wird die Guaninbase durch die Cytosinbase ersetzt. Die splice-site Mutation IVS9+1 G→C führt wahrscheinlich, wie die von Svenson und Kollegen beschriebene Mutation IVS9+1 G→A, zum Verlust des Exon 9. Durch eine Mutation, wie der IVS9+1 G→C (vorliegende Arbeit), G→T (Yabe et al. 2002) oder G→A (Svenson et al. 2001), wird die Donorstelle so verändert, dass das Spleißosom die Spleißstelle nicht erkennt und an dieser Stelle nicht spleißt. Stattdessen wird das gesamte Exon 9 auf RNA-Ebene deletiert (Svenson et al. 2001). Dies betrifft die Aminosäuren an Position 392 bis 415 im Spastin und somit einen Teil der AAA-Domäne. Die funktionelle Untersuchung eines ähnlich mutierten Proteins (p.406_415del) durch die hiesige Arbeitsgruppe zeigte einen Verlust der Fähigkeit Mikrotubuli abzubauen (Schickel et al. 2006). Ein ähnlicher Effekt ist auch für die splice-site Mutation zu erwarten.

Es ist aufgrund der gemachten Beobachtungen wahrscheinlich, dass die splice-site Mutation (skipping exon 9) via Haploinsuffizienz wirkt.

Auch die hier detektierte nonsense Mutation c.127G>T (p.43E>X) könnte über das vorzeitige Stop-Codon zu einer verringerten Menge Transkript führen. Dies wurde schon in vorherigen Studien beispielsweise für die p.112E>X, p.114E>X,

p.125E>X und p.239L>X Mutationen des Spastins postuliert (Svenson et al. 2001, Nicholas et al. 2004, Bürk et al. 2005, Patrono et al. 2005). Charvin und Kollegen untersuchten zu diesem Zweck lymphoblastoide Zelllinien von Patienten mit nonsense (p.193Q>X, p.229Q>X) und frame-shift (c.1634del22) Mutationen. Sie konnten weder mutiertes Transkript noch mutiertes Spastin nachweisen. Analog dazu fanden Molon und Kollegen eine Destabilisierung des Transkripts bei Vorliegen der Mutation c.1442delT (Molon et al. 2003). Ein ähnlicher Effekt ist für die nonsense Mutation c.127G>T (p.43E>X) dieser Arbeit zu erwarten.

Für die in der vorliegenden Arbeit identifizierte, aber schon vorher beschriebene Duplikation im Exon 1 des *SPG4*-Gens (c.67_85dup), ist als Pathomechanismus ebenfalls die Haploinsuffizienz denkbar (Proukakis et al. 2003). Diese Mutation führt durch eine Leserahmenverschiebung zu einem vorzeitigem Stop-Triplett. In den DNA-Proben von vier Familienmitgliedern konnte die Mutation durch Auftreten eines zweiten PCR-Produktes detektiert werden. Die Identität der Mutation wurde durch Sequenzierung verifiziert. Drei dieser für Mutationsträger sind an einer reinen AD HSP erkrankt. Die vierte Person war zum Zeitpunkt der Probenentnahme und Datenerhebung im Jahr 2001 in einem Alter von 6 Jahren und gesund; im Gegensatz zum Geschwister, das bereits vor dem 6. Lebensjahr betroffen war. Über den gegenwärtigen Gesundheitszustand beider Personen ist nichts bekannt. Mittlerweile könnte aber auch die bis dato gesunde Person eine HSP entwickelt haben. Insgesamt ist damit eine Assoziation einer frame-shift Mutation mit einer HSP gesichert. Auch diese Veränderung ist mit Haploinsuffizienz vereinbar.

Diese Daten demonstrieren, dass nonsense, splice-site und frame-shift Mutationen im *SPG4*-Gen in einer Instabilität des mutierten Transkripts resultieren können und deshalb zu einer verringerten Menge an funktionellem Wildtyp-Spastin führen (Charvin et al. 2003, Svenson et al. 2001). Für die Instabilität ist dabei vermutlich NMD verantwortlich (engl. „nonsense mediated decay“). Bei diesem zellulären Prozess werden mRNAs, denen nach einem „inframe“ Stop-Codon noch ein Intron folgt, abgebaut. Ein solches, nicht im letzten Exon gelegenes Stop-Codon entsteht bei allen vorgestellten Mutationen.

4.5.1.2. Missense Mutationen

Eine Transkriptinstabilität konnte für missense Mutationen nicht nachgewiesen werden (Charvin et al. 2003). Einige missense Mutationen, die die AAA-Domäne des Spastins betreffen, führen jedoch in Überexpressionsexperimenten zu einer irreversiblen Bindung des mutierten Spastins an einen Teil des Mikrotubulinnetzwerkes. Dies äußert sich in der Ausbildung diskreter perinukleärer filamentöser Strukturen (Errico et al. 2002, Schickel et al. 2006). Außerdem fehlt mutiertem Spastin in diesen Experimenten die Fähigkeit Mikrotubuli abzubauen (Errico et al. 2002, McDermott et al. 2003).

Als Ursache für diese Beobachtungen werden der dominant negative Effekt und die Haploinsuffizienz als mögliche Pathomechanismen der missense Mutationen diskutiert (Errico et al. 2002, Depienne et al. 2005, Patrono et al. 2005). Liegt eine dominant negative Mutation auf einem Allel vor, dann antagonisiert sie die Aktivität des Wildtyp-Allels. Der Hauptteil dieser Mutationen liegt in Genen, die für Proteine kodieren, die wiederum abhängig von einer Oligomerisierung sind, um ihre Aktivität zu erreichen (Wilkie et al. 1994). Geht man davon aus, dass Spastin, ähnlich dem Katanin und anderen AAA-Proteinen, erst ein Oligomer bilden muss, um den Mikrotubuliabbau zu gewährleisten, dann könnte der dominant negative Effekt von missense Mutationen im *SPG4*-Gen die genannten Beobachtungen in den verschiedenen Zellkulturexperimenten erklären (Errico et al. 2002, Baas et al. 2005).

Für einen dominant negativen Effekt der missense Mutationen spricht beispielsweise auch, dass im Zellkulturexperiment der Spastinmutante mit dem Aminosäureaustausch p.388K>R wahrscheinlich die Fähigkeit zur ATP-Bindung (Walker A-Motiv AS 382-389 zur Bindung oder Hydrolyse von ATP; Hazan et al. 1999) fehlt, die eventuell vorübergehend nötig ist, um ein Spastinhomooligomer zu bilden (Errico et al. 2002, Errico et al. 2004, Baas et al. 2005). Dafür spricht außerdem, dass in doppelt transfizierten Zellen (p.388K>R-Spastin und Wildtyp-Spastin) die Spastinmutante und das Wildtyp-Spastin co-lokalisieren (Errico et al. 2002).

Eine andere Erklärung für einen Funktionsverlust des mutierten Spastins (durch missense Mutationen) könnte ebenso die Haploinsuffizienz sein. In der doppelt transfizierten Zellmutante könnte es auch zum Verlust der ATPase-Aktivität des mutierten Spastins kommen, wodurch die Menge an funktionellem Spastin insgesamt verringert ist; die Spastinmenge des gesunden Allels kann die Funktion nicht gewährleisten (Roll-Mecak et al. 2005).

Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine vorab als missense Mutation interpretierter Basenaustausch der AAA-Domäne de facto über einen Einfluß auf das Spleißen seine pathogene Wirkung entfaltet (c.1216A>G, c.1216_1245del, p.406_415del) (Schickel et al. 2006). Statt des angenommenen dominant negativen Effektes konnte hier eindeutig Haploinsuffizienz nachgewiesen werden.

Insgesamt könnte es durch missense Mutationen somit entweder zu einer Funktionsverringering oder zu einer Fehlfunktion des Spastins kommen. Derzeit ist es allerdings unklar, über welchen Mechanismus eine individuelle missense Mutation im *SPG4*-Gen wirkt; weitere Untersuchungen sind im Einzelnen notwendig.

4.5.2. Abhängigkeit der Wirkung der *SPG4*-Mutationen von ihrer Lokalisation im *SPG4*-Gen

Die meisten missense, nonsense, splice-site und frame-shift Mutationen betreffen entweder direkt oder indirekt die AAA-Domäne (Hazan et al. 1999, Fonknechten et al. 2000, Svenson et al. 2001, Yabe et al. 2002, Proukakis et al. 2003, Chinnery et al. 2004, Depienne et al. 2005). Eine der wenigen Ausnahmen ist der Nukleotidaustausch c.131C>T, der zum Aminosäureaustausch p.44S>L am N'-Terminus des Spastins führt und dessen Prävalenz im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde (Svenson et al. 2001, Chinnery et al. 2004, Depienne et al. 2005). Die Rolle des N-Terminus für die Spastinfunktion ist größtenteils noch unklar. In Zellkulturexperimenten konnten Errico und Kollegen zeigen, dass das p.44L-Spastinkonstrukt genau wie der Wildtyp lokalisiert (Errico et al. 2002). Außerdem wird der Mikrotubuli-Abbau durch überexprimiertes p.44L-Spastin nicht reduziert

(unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe). Es zeigte sich, dass die Co-Lokalisation eines p.388K>R-Spastinkonstrukts mit Mikrotubulibündel durch eine zusätzliche Deletion des N'-Terminus nicht verändert wird (Errico et al. 2004). Die Interaktion zwischen Spastin und den Mikrotubuli ist demzufolge nicht vom Vorhandensein des N'-Terminus abhängig. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Transkriptstabilität des Nukleotidaustauschs c.131C>T nicht reduziert ist (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe für Molekulargenetik, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums der FSU Jena).

Mittlerweile konnten Claudiani und Kollegen eine physiologische Spastinvariante - neben den erwähnten artifiziellen Deletionskonstrukten des Spastins - nachweisen, der, unter Nutzung des alternativen zweiten Start-Codons, die ersten 87 Aminosäuren fehlen (Claudiani et al. 2005). Für die lange Form, unter Nutzung des ersten ATGs, konnte eine ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation gezeigt werden, wogegen die kurze Form auch im Nukleus zu finden ist. Dies lässt sich mit der Existenz von verschiedenen nukleären Exportsequenzen erklären (Claudiani et al. 2005, unveröffentlichte Daten der hiesigen Arbeitsgruppe). Die cytoplasmatische lange Isoform liegt im Gehirn und Rückenmark in größerer Menge vor als in anderen Geweben (Claudiani. et al 2005). Diese Beobachtung ist kongruent mit der Annahme, dass die cytoplasmatische Spastinvariante die pathologisch relevante Form ist, und dass somit dem N'-Terminus eine Bedeutung bei der *SPG4*-assoziierten HSP zukommt. Der Pathomechanismus des Nukleotidaustauschs c.131C>T ist also ein anderer als der der bisher diskutierten Mutationen.

4.5.3. Mögliche Ursachen für den modifizierenden Effekt des c.131C>T Polymorphismus

Durch *in silico* Analysen wurde ermittelt, dass die Aminosäureposition 44 im Spastin innerhalb einer PEST-Sequenz liegt. Durch den Aminosäureaustausch p.44S>L (c.131C>T) verringert sich der Wert für die identifizierte PEST-Sequenz erheblich. Eine PEST-Sequenz ist eine konservierte Region, die möglicherweise eine Phosphorylierungsstelle für Kinasen darstellt. Die Phosphorylierung selbst hat häufig Funktionen bezüglich der Proteinstabilität (Rechsteiner et al. 1996).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die hiermit bestätigte Hypothese einer pathogenen Bedeutung des Polymorphismus c.131C>T haben zur Planung und zum Ausführen weiterer Arbeiten geführt.

Erste unveröffentlichte Daten zeigen, daß das c.C131-Allel (Wildtyp) einen stabilisierenden Effekt auf das Spastin hat (unveröffentlichte Daten von X. Huang und Kollegen der Abteilung Molekularbiologie der Klinik für Chirurgie, Charité Berlin, siehe Poster im Anhang). Dieser wird durch den Nukleotidaustausch beeinträchtigt. 44L-Spastin wird dadurch instabiler, die Mikrotubulibindung und –diassemblierung bliebe aber durch die unbeeinträchtigten funktionellen Domänen erhalten. Der Menge an Spastin ist in nur geringem Umfang verringert (<50%). Dies würde auch die Beobachtung erklären, dass Personen mit dem Genotyp c.131T/*SPG4*-Wildtyp entweder nur eine leichte Symptomatik einer HSP zeigen oder gesund sind. Bei HSP-Patienten, die aber zusätzlich zum c.131T-Allel eine krankheitsverursachende Mutation im *SPG4*-Gen tragen, ist die Spastinmenge durch den instabilisierenden Effekt des c.131T-Allels (44L-Spastin) noch stärker verringert als bei alleinigem Vorliegen der krankheitsverursachenden Mutation (>50%). Die Person mit einem solchen Genotyp wäre seit der Kindheit an einer HSP erkrankt.

Der Nukleotidaustausch c.131C>T würde entsprechend dieser Annahmen als Modifizierer über die Spastinmenge den Phänotyp anderer *SPG4*-Mutationen negativ beeinflussen. Der Dosiseffekt bei Haploinsuffizienz anderer Mutationen würde weiter negativ beeinflusst oder ein dominant negativer Effekt einer missense Mutation der AAA-Domäne würde durch Vorliegen von noch weniger Protein verstärkt werden.

5. Schlussfolgerung

Im Ergebnis dieser Arbeit steht ein Verfahren zur Verfügung mit dem der c.131C>T Nukleotidaustausch sicher und schnell, auch bei hohen Probenzahlen, identifiziert werden kann.

Im Rahmen von genetischen Beratungen kann der RFLP-Assay beispielsweise als Vorverfahren genutzt werden. Bei positivem c.131T-RFLP-Befund ist eine verifizierende Sequenzierung des betreffenden DNA-Abschnitts notwendig, da der positive Vorhersagewert <100% ist.

Mittels des in dieser Arbeit etablierten RFLP-Assays wurden weitere Hinweise gewonnen, dass es sich bei dem Nukleotidaustausch c.131C>T um einen Polymorphismus mit einer Prävalenz von >1% handelt, der, wenn er heterozygot vorliegt, nicht zu dem Krankheitsbild einer HSP führt.

Das c.131T-Allel hat einen modifizierenden Effekt auf den Phänotyp, wenn zusätzlich eine andere Mutation *in trans* Konfiguration im *SPG4*-Gen vorliegt. Der Nukleotidaustausch c.131C>T führt dann zu einem früheren Beginn und eventuell schwerer Symptomatik einer HSP.

Das c.131T-Allel kommt in Familien mit einer autosomal dominanten Form der HSP häufiger vor, als in Familien mit einer autosomal rezessiven Form der HSP und in nicht HSP-Familien. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant, weist aber in Richtung der Daten einer vorhergehenden Studie.

Die bestätigte klinische Relevanz dieser genetischen Variante für eine HSP macht weitere Untersuchungen zur Aufklärung des offensichtlich besonderen Pathomechanismus erforderlich.

6. Zusammenfassung

Die hereditäre spastische Paraplegie gehört zu den chronisch progredienten neurodegenerativen Erkrankungen und ist durch eine ausgeprägte genetische und klinische Heterogenität gekennzeichnet. Die Hauptgruppe bildet die *SPG4*-assoziierte autosomal dominante Form der HSP. Der *SPG4*-Lokus kodiert für das AAA-Protein (ATPase assoziiert mit diversen zellulären Aktivitäten) Spastin, welches wahrscheinlich am Um- und Abbau von Mikrotubuli beteiligt ist. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurden über 170 Mutationen im *SPG4*-Gen identifiziert. Eine der wenigen Basensubstitutionen, die zu einem Aminosäureaustausch am N'-Terminus des Spastins führen, ist der Nukleotidaustausch c.131C>T (p.44S>L).

Diese Arbeit hatte zum Ziel die teils lückenhaften und teils widersprüchlichen Aussagen bezüglich der Prävalenz und Krankheitsassoziation des c.131T-Allels aufzuklären. Zu diesem Zweck wurde ein sicheres und schnelles, RFLP-basiertes Detektionsverfahren entwickelt und etabliert, mit dessen Hilfe eine Gruppe autosomal dominanter HSP-Familien und eine Kontrollgruppe auf den Nukleotidaustausch c.131C>T untersucht wurden. Es konnte eine Häufigkeit des c.131T-Allels (bezogen auf die untersuchten unabhängigen Chromosomen) von 1,39% in der HSP-Gruppe und von 0,8% in der Kontrollgruppe ermittelt werden. Bezogen auf die nicht neurologisch untersuchten Einzelpersonen der Kontrollgruppe ergibt sich eine Prävalenz für heterozygotes Vorliegen des c.131T-Allels von 1,43% in der Allgemeinbevölkerung Mitteleuropas. Das Ergebnis entspricht der vorgeschlagenen Klassifizierung des Allels als seltenen Polymorphismus. Dies steht im Widerspruch zu früheren Arbeiten mit großen Stichproben, die das c.131T-Allel nicht identifizierten, und wird als zu geringe Sensitivität der dort angewendeten Analysemethoden interpretiert.

Durch Stammbaumanalysen konnten weitere Hinweise für einen modifizierenden Effekt des c.131T-Allels auf den Phänotyp einer HSP ermittelt werden. Heterozygote c.131T-Allelträger, die eine krankheitsverursachende *SPG4*-Mutation *in trans* geerbt haben, sind auch in dieser Arbeit früher und schwerer an einer HSP erkrankt, während heterozygote c.131T-Träger nicht betroffen sind; der Nukleotidaustausch wird unabhängig von einer HSP vererbt.

Mittels des etablierten RFLP-Assays konnte darüber hinaus eine weitere *SPG4*-Mutation identifiziert werden. Es handelt sich dabei um eine nonsense Mutation (c.127G>T; p.43E>X), die zum gleichen Restriktionsmuster wie der c.131C>T Polymorphismus führt. Die Mutation verursacht eine *SPG4*-assoziierte HSP. Da mit diesem Befund der positive Vorhersagewert des RFLP-Assays <100% (93% in dieser Studie) beträgt, sollte sich bei einem eventuellen Einsatz in der Molekulardiagnostik stets eine verifizierende Sequenzanalyse des betreffenden DNA-Abschnitts anschließen.

Im Zusammenhang mit den Daten anderer Studien deuten auch die hier erhobenen Daten, bezüglich der klinischen Auswirkungen des c.131T-Allels, auf einen Pathomechanismus hin, der sich von dem anderer *SPG4*-Mutationen unterscheidet. Entsprechende Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus sind notwendig.

III Literaturverzeichnis

- Antonarakis SE. 1998. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. Hum Mutat, 11 (1):1-3.
- Baas PW, Karabay A, Qiang L. 2005. Microtubules cut and run. Trends Cell Biol, 15 (10):518-524.
- Beetz C, Brodhun M, Moutzouris K, Kiehntopf M, Berndt A, Lehnert D, Deufel T, Bastmeyer M, Schickel J. 2004. Identification of nuclear localisation sequences in spastin (SPG4) using a novel Tetra-GFP reporter system. Biochem Biophys Res Commun, 318 (4):1079-1084.
- Blumen SC, Bevan S, Abu-Mouch S, Negus D, Kahana M, Inzelberg R, Mazarib A, Mahamid A, Carasso RL, Slor H, Withers D, Nisipeanu P, Navon R, Reid E. 2003. A locus for complicated hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1q24-q32. Ann Neurol, 54 (6):796-803.
- Bönsch D, Schwindt A, Navratil P, Palm D, Neumann C, Klimpe S, Schickel J, Hazan J, Weiller C, Deufel T, Liepert J. 2003. Motor system abnormalities in hereditary spastic paraparesis type 4 (SPG4) depend on the type of mutation in the spastin gene. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 74:1109-1112.
- Bousslam N, Benomar A, Azzedine H, Bouhouche A, Namekawa M, Klebe S, Charon C, Durr A, Ruberg M, Brice A, Yahyaoui M, Stevanin G. 2005. Mapping of a new form of pure autosomal recessive spastic paraplegia (SPG28). Ann Neurol, 57 (4):567-571.
- Brockmann K, Simpson MA, Faber A, Bonnemann C, Crosby AH, Gartner J. 2005. Complicated hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum (HSP-TCC) and childhood onset. Neuropediatrics, 36 (4):274-278.
- Burger J, Fonknechten N, Hoeltzenbein M, Neumann L, Bratanoff E, Hazan J, Reis A. 2000. Hereditary spastic paraplegia caused by mutations in the SPG4 gene. Eur J Hum Genet, 8 (10):771-776.

- Burk K, Dalski A, Purmann S, Zuhlke C. 2005. Detection of a novel SPG4-nonsense-mutation in a large German pedigree with pure spastic paraplegia. *J Neurol*, 252 (3):371.
- Byrne PC, Webb S, McSweeney F, Burke T, Hutchinson M, Parfrey NA. 1998. Linkage of AD HSP and cognitive impairment to chromosome 2p: haplotype and phenotype analysis indicates variable expression and low or delayed penetrance. *Eur J Hum Genet*, 6 (3):275-282.
- Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, Zeviani M, Mora M, Fernandez P, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Marconi R, Durr A, Fontaine B, Ballabio A. 1998. Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell*, 93 (6):973-983.
- Charvin D, Cifuentes-Diaz C, Fonknechten N, Joshi V, Hazan J, Melki J, Betuing S. 2003. Mutations of SPG4 are responsible for a loss of function of spastin, an abundant neuronal protein localized in the nucleus. *Hum Mol Genet*, 12 (1):71-78.
- Chinnery PF, Keers SM, Holden MJ, Ramesh V, Dalton A. 2004. Infantile hereditary spastic paraparesis due to codominant mutations in the spastin gene. *Neurology*, 63 (4):710-712.
- Ciccarelli FD, Proukakis C, Patel H, Cross H, Azam S, Patton MA, Bork P, Crosby AH. 2003. The identification of a conserved domain in both spartin and spastin, mutated in hereditary spastic paraplegia. *Genomics*, 81 (4):437-441.
- Claudiani P, Riano E, Errico A, Andolfi G, Rugarli EI. 2005. Spastin subcellular localization is regulated through usage of different translation start sites and active export from the nucleus. *Exp Cell Res*, 309 (2):358-369.
- Crosby AH, Proukakis C. 2002. Is the transportation highway the right road for hereditary spastic paraplegia? *Am J Hum Genet*, 71 (5):1009-1016.

- Depienne C, Tallaksen C, Lephay JY, Bricka B, Poëa-Guyon S, Fontaine B, Labauge P, Brice A, Durr A. 2005. Spastin mutations are frequent in sporadic spastic paraparesis and their spectrum is different from the one observed in familial cases. *J Med Genet*,
- Dougan DA, Mogk A, Zeth K, Turgay K, Bukau B. 2002. AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. *FEBS Lett*, 529 (1):6-10.
- Durr A, Brice A, Serdaru M, Rancurel G, Derouesne C, Lyon-Caen O, Agid Y, Fontaine B. 1994. The phenotype of "pure" autosomal dominant spastic paraplegia. *Neurology*, 44 (7):1274-1277.
- Errico A, Ballabio A, Rugarli EI. 2002. Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Hum Mol Genet*, 11 (2):153-163.
- Errico A, Claudiani P, D'Addio M, Rugarli EI. 2004. Spastin interacts with the centrosomal protein NA14, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon. *Hum Mol Genet*, 13 (18):2121-2132.
- Evans KJ, Gomes ER, Reisenweber SM, Gundersen GG, Lauring BP. 2005. Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol*, 168 (4):599-606.
- Falco M, Scuderi C, Musumeci S, Sturnio M, Neri M, Bigoni S, Caniatti L, Fichera M. 2004. Two novel mutations in the spastin gene (SPG4) found by DHPLC mutation analysis. *Neuromuscul Disord*, 14 (11):750-753.
- Fink JK. 2002. Hereditary spastic paraplegia: the pace quickens. *Ann Neurol*, 51 (6):669-672.
- Fink JK, Rainier S. 2004. Hereditary spastic paraplegia: spastin phenotype and function. *Arch Neurol*, 61 (6):830-833.

- Fonknechten N, Mavel D, Byrne P, Davoine CS, Cruaud C, Bonsch D, Samson D, Coutinho P, Hutchinson M, McMonagle P, Burgunder JM, Tartaglione A, Heinzlef O, Feki I, Deufel T, Parfrey N, Brice A, Fontaine B, Prud'homme JF, Weissenbach J, Durr A, Hazan J. 2000. Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *Hum Mol Genet*, 9 (4):637-644.
- Hansen JJ, Durr A, Cournu-Rebeix I, Georgopoulos C, Ang D, Nielsen MN, Davoine CS, Brice A, Fontaine B, Gregersen N, Bross P. 2002. Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am J Hum Genet*, 70 (5):1328-1332.
- Harding AE. 1981. Hereditary "pure" spastic paraplegia: a clinical and genetic study of 22 families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 44 (10):871-883.
- Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, Paternotte C, Samson D, Artiguenave F, Davoine CS, Cruaud C, Durr A, Wincker P, Brottier P, Cattolico L, Barbe V, Burgunder JM, Prud'homme JF, Brice A, Fontaine B, Heilig B, Weissenbach J. 1999. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet*, 23 (3):296-303.
- Hedera P, Eldevik OP, Maly P, Rainier S, Fink JK. 2005. Spinal cord magnetic resonance imaging in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neuroradiology*, 47 (10):730-734.
- Heinzlef O, Paternotte C, Mahieux F, Prud'homme JF, Dien J, Madigand M, Pouget J, Weissenbach J, Rouillet E, Hazan J. 1998. Mapping of a complicated familial spastic paraplegia to locus SPG4 on chromosome 2p. *J Med Genet*, 35 (2):89-93.
- Hentati A, Pericak-Vance MA, Hung WY, Belal S, Laing N, Boustany RM, Hentati F, Ben Hamida M, Siddique T. 1994. Linkage of 'pure' autosomal recessive familial spastic paraplegia to chromosome 8 markers and evidence of genetic locus heterogeneity. *Hum Mol Genet*, 3 (8):1263-1267.

- Hirokawa N, Takemura R. 2005. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci*, 6 (3):201-214.
- Hodes ME, Pratt VM, Dlouhy SR. 1993. Genetics of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Dev Neurosci*, 15 (6):383-394.
- Hodgkinson CA, Bohlega S, Abu-Amero SN, Cupler E, Kambouris M, Meyer BF, Bharucha VA. 2002. A novel form of autosomal recessive pure hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 13q14. *Neurology*, 59 (12):1905-1909.
- Irobi J, Van den Bergh P, Merlini L, Verellen C, Van Maldergem L, Dierick I, Verpoorten N, Jordanova A, Windpassinger C, De Vriendt E, Van Gerwen V, Auer-Grumbach M, Wagner K, Timmerman V, De Jonghe P. 2004. The phenotype of motor neuropathies associated with BSCL2 mutations is broader than Silver syndrome and distal HMN type V. *Brain*, 127 (Pt 9):2124-2130.
- Krabbe K, Nielsen JE, Fallentin E, Fenger K, Herning M. 1997. MRI of autosomal dominant pure spastic paraplegia. *Neuroradiology*, 39 (10):724-727.
- Lindsey JC, Lusher ME, McDermott CJ, White KD, Reid E, Rubinsztein DC, Bashir R, Hazan J, Shaw PJ, Bushby KM. 2000. Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients with hereditary spastic paraparesis. *J Med Genet*, 37 (10):759-765.
- McDermott C, White K, Bushby K, Shaw P. 2000. Hereditary spastic paraparesis: a review of new developments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 69 (2):150-160.
- McDermott CJ, Grierson AJ, Wood JD, Bingley M, Wharton SB, Bushby KM, Shaw PJ. 2003. Hereditary spastic paraparesis: disrupted intracellular transport associated with spastin mutation. *Ann Neurol*, 54 (6):748-759.

- McMonagle P, Webb S, Hutchinson M. 2002. The prevalence of "pure" autosomal dominant hereditary spastic paraparesis in the island of Ireland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 72 (1):43-46.
- Meijer IA, Cossette P, Roussel J, Benard M, Toupin S, Rouleau GA. 2004. A novel locus for pure recessive hereditary spastic paraplegia maps to 10q22.1-10q24.1. *Ann Neurol*, 56 (4):579-582.
- Nicholas AP, O'Hearn E, Holmes SE, Chen DT, Margolis RL. 2004. Clinical signs and symptoms in a large hereditary spastic paraparesis pedigree with a novel spastin mutation. *Mov Disord*, 19 (6):641-648.
- Nielsen JE, Krabbe K, Jennum P, Koefoed P, Jensen LN, Fenger K, Eiberg H, Hasholt L, Werdelin L, Sorensen SA. 1998. Autosomal dominant pure spastic paraplegia: a clinical, paraclinical, and genetic study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 64 (1):61-66.
- Nielsen JE, Johnsen B, Koefoed P, Scheuer KH, Gronbech-Jensen M, Law I, Krabbe K, Norremolle A, Eiberg H, Sondergard H, Dam M, Rehfeld JF, Krarup C, Paulson OB, Hasholt L, Sorensen SA. 2004. Hereditary spastic paraplegia with cerebellar ataxia: a complex phenotype associated with a new SPG4 gene mutation. *Eur J Neurol*, 11 (12):817-824.
- Orlacchio A, Kawarai T, Gaudiello F, St George-Hyslop PH, Floris R, Bernardi G. 2005. New locus for hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1p31.1-1p21.1. *Ann Neurol*, 58 (3):423-429.
- Orlacchio A, Kawarai T, Totaro A, Errico A, St George-Hyslop PH, Rugarli EI, Bernardi G. 2004. Hereditary spastic paraplegia: clinical genetic study of 15 families. *Arch Neurol*, 61 (6):849-855.
- Patel H, Cross H, Proukakis C, Hershberger R, Bork P, Ciccarelli FD, Patton MA, McKusick VA, Crosby AH. 2002. SPG20 is mutated in Troyer syndrome, an hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet*, 31 (4):347-348.

- Patrono C, Scarano V, Cricchi F, Melone MA, Chiriaco M, Napolitano A, Malandrini A, De Michele G, Petrozzi L, Giraldi C, Santoro L, Servidei S, Casali C, Filla A, Santorelli FM. 2005. Autosomal dominant hereditary spastic paraplegia: DHPLC-based mutation analysis of SPG4 reveals eleven novel mutations. *Hum Mutat*, 25 (5):506.
- Pridmore S, Rao G, Abusah P. 1995. Hereditary spastic paraplegia with dementia. *Aust N Z J Psychiatry*, 29 (4):678-682.
- Proukakis C, Hart PE, Cornish A, Warner TT, Crosby AH. 2002. Three novel spastin (SPG4) mutations in families with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Sci*, 201 (1-2):65-69.
- Proukakis C, Auer-Grumbach M, Wagner K, Wilkinson PA, Reid E, Patton MA, Warner TT, Crosby AH. 2003. Screening of patients with hereditary spastic paraplegia reveals seven novel mutations in the SPG4 (Spastin) gene. *Hum Mutat*, 21 (2):170.
- Rainier S, Chai JH, Tokarz D, Nicholls RD, Fink JK. 2003. NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6). *Am J Hum Genet*, 73 (4):967-971.
- Rechsteiner M, Rogers SW. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 21 (7):267-271.
- Reid E. 1999. The hereditary spastic paraplegias. *J Neurol*, 246 (11):995-1003.
- Reid E. 2003. Science in motion: common molecular pathological themes emerge in the hereditary spastic paraplegias. *J Med Genet*, 40 (2):81-86.
- Reid E, Grayson C, Rogers MT, Rubinsztein DC. 1999. Locus-phenotype correlations in autosomal dominant pure hereditary spastic paraplegia. A clinical and

- molecular genetic study of 28 United Kingdom families. *Brain*, 122 (Pt 9):1741-1755.
- Reid E, Connell J, Edwards TL, Duley S, Brown SE, Sanderson CM. 2005. The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B. *Hum Mol Genet*, 14 (1):19-38.
- Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A, Hughes L, Bevan S, Svenson IK, Graham FL, Gaskell PC, Dearlove A, Pericak-Vance MA, Rubinsztein DC, Marchuk DA. 2002. A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet*, 71 (5):1189-1194.
- Roll-Mecak A, Vale RD. 2005. The *Drosophila* homologue of the hereditary spastic paraplegia protein, spastin, severs and disassembles microtubules. *Curr Biol*, 15 (7):650-655.
- Sauter S, Neesen J, Paulus W, Engel W. 2002. Hereditäre spastische Paraplegie. *Dtsch Arztebl* 99 (7): A 434-440.
- Sauter S, Mitterski B, Klimpe S, Bonsch D, Schols L, Visbeck A, Papke T, Hopf HC, Engel W, Deufel T, Epplen JT, Neesen J. 2002. Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients in Germany with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Hum Mutat*, 20 (2):127-132.
- Schickel J, Beetz C, Frömmel C, Heide G, Sasse A, Hemmerich P, Deufel T. 2006. Unexpected pathogenic mechanism of a novel mutation in the coding sequence of *SPG4* (spastin). *Neurology* (), 66:1-4.
- Schrander-Stumpel C, Howeler C, Jones M, Sommer A, Stevens C, Tinschert S, Israel J, Fryns JP. 1995. Spectrum of X-linked hydrocephalus (HSAS), MASA syndrome, and complicated spastic paraplegia (SPG1): Clinical review with six additional families. *Am J Med Genet*, 57 (1):107-116.

- Schulte T, Miterski B, Bornke C, Przuntek H, Epplen JT, Schols L. 2003. Neurophysiological findings in SPG4 patients differ from other types of spastic paraplegia. *Neurology*, 60 (9):1529-1532.
- Sherwood NT, Sun Q, Xue M, Zhang B, Zinn K. 2004. *Drosophila* spastin regulates synaptic microtubule networks and is required for normal motor function. *PLoS Biol*, 2 (12):e429.
- Simpson MA, Cross H, Proukakis C, Pryde A, Hershberger R, Chatonnet A, Patton MA, Crosby AH. 2003. Maspardin is mutated in mast syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia. *Am J Hum Genet*, 73 (5):1147-1156.
- Svenson IK, Kloos MT, Jacon A, Gallione C, Horton AC, Pericak-Vance MA, Ehlers MD, Marchuk DA. 2005. Subcellular localization of spastin: implications for the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia. *Neurogenetics*, 6 (3):135-141.
- Svenson IK, Kloos MT, Gaskell PC, Nance MA, Garbern JY, Hisanaga S, Pericak-Vance MA, Ashley-Koch AE, Marchuk DA. 2004. Intragenic modifiers of hereditary spastic paraplegia due to spastin gene mutations. *Neurogenetics*, 5 (3):157-164.
- Svenson IK, Ashley-Koch AE, Gaskell PC, Riney TJ, Cumming WJ, Kingston HM, Hogan EL, Boustany RM, Vance JM, Nance MA, Pericak-Vance MA, Marchuk DA. 2001. Identification and expression analysis of spastin gene mutations in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet*, 68 (5):1077-1085.
- Takasu H, Jee JG, Ohno A, Goda N, Fujiwara K, Tochio H, Shirakawa M, Hiroaki H. 2005. Structural characterization of the MIT domain from human Vps4b. *Biochem Biophys Res Commun*, 334 (2):460-465.
- Visbeck A. 2001. Die hereditären spastischen Spinalparalysen - Aktuelle Klassifikation und molekulargenetische Grundlagen. *Akt Neurol*, 28: 153-160.

- Webb S, Coleman D, Byrne P, Parfrey N, Burke T, Hutchinson J, Hutchinson M. 1998. Autosomal dominant hereditary spastic paraparesis with cognitive loss linked to chromosome 2p. *Brain*, 121 (Pt 4):601-609.
- Wharton SB, McDermott CJ, Grierson AJ, Wood JD, Gelsthorpe C, Ince PG, Shaw PJ. 2003. The cellular and molecular pathology of the motor system in hereditary spastic paraparesis due to mutation of the spastin gene. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62 (11):1166-1177.
- White KD, Ince PG, Lusher M, Lindsey J, Cookson M, Bashir R, Shaw PJ, Bushby KM. 2000. Clinical and pathologic findings in hereditary spastic paraparesis with spastin mutation. *Neurology*, 55 (1):89-94.
- Wilkie AO. 1994. The molecular basis of genetic dominance. *J Med Genet*, 31 (2):89-98.
- Wilkinson PA, Simpson MA, Bastaki L, Patel H, Reed JA, Kalidas K, Samilchuk E, Khan R, Warner TT, Crosby AH. 2005. A new locus for autosomal recessive complicated hereditary spastic paraplegia (SPG26) maps to chromosome 12p11.1-12q14. *J Med Genet*, 42 (1):80-82.
- Winner B, Gross C, Uyanik G, Schulte-Mattler W, Lurding R, Marienhagen J, Bogdahn U, Windpassinger C, Hehr U, Winkler J. 2005. Thin corpus callosum and amyotrophy in spastic paraplegia-Case report and review of literature. *Clin Neurol Neurosurg*,
- Yabe I, Sasaki H, Tashiro K, Matsuura T, Takegami T, Satoh T. 2002. Spastin gene mutation in Japanese with hereditary spastic paraplegia. *J Med Genet*, 39 (8):e46.
- Zhao X, Alvarado D, Rainier S, Lemons R, Hedera P, Weber CH, Tukul T, Apak M, Heiman-Patterson T, Ming L, Bui M, Fink JK. 2001. Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet*, 29 (3):326-331.

Zortea M, Vettori A, Trevisan CP, Bellini S, Vazza G, Armani M, Simonati A, Mostacciolo ML. 2002. Genetic mapping of a susceptibility locus for disc herniation and spastic paraplegia on 6q23.3-q24.1. *J Med Genet*, 39 (6):387-390.

IV **Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe „Molekulargenetik“ des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der FSU Jena für die freundliche Unterstützung und geduldige Einarbeitung in PCR-Techniken, Sequenzierungen und Klonierungen bedanken.

Bei Prof. Dr. Thomas Deufel bedanke ich mich für die Möglichkeit, in seinem renommierten Labor unter besten Bedingungen den experimentellen Teil dieser Arbeit erarbeiten zu dürfen, sowie für seine hilfreichen Anregungen.

Frau Cora Neumann gilt mein besonderer Dank für die Einarbeitung, die Zuarbeit, die vielen praktischen Tips und vor allem für ihre Geduld während der Datenerhebung.

Dr. med. Sven Klimpe von der Klinik für Neurologie Klinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz danke ich für die wertvollen Informationen und Beurteilungen zu einigen Patienten der Probandengruppe.

Frau Heike Hoyer vom Institut für medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der FSU Jena möchte ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit danken.

Dr. Christian Beetz und Dr. Jörg Schickel gilt besonderer Dank für die vielen Ratschläge und Diskussionen zum Gelingen der Experimente und ihre kritischen und konstruktiven Analysen des schriftlichen Teils der Arbeit.

V **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Dr. rer. nat. Jörg Schickel,
Prof. Dr. med. Thomas Deufel,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den _____

Unterschrift: _____

St. Martin de Porres Catholic Hospital Njinikom, Kamerun

Dr. med. Jürgen Stoltz
Chirurgische Praxis, Jena

Februar 2004

VI Praktisches Jahr

Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Meier-Hellman, Oktober 2005 – Februar
Dr. med. Gerald Burgard 2006
Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin
und Schmerztherapie
Helios Klinikum Erfurt

VII Wissenschaftliche Beiträge

Poster:

Beetz C, Ehram A, Schickel J, Deufel T. The S44L variant in spastin (SPG4) and its role in hereditary spastic paraplegia. *11th Annual Meeting of the German Society of Neurogenetics*. 8.-10. September, 2005; Westfälische Wilhelms Universität, Münster, Deutschland.

Ehram A, Beetz C, Schickel J, Deufel T. A new assay for the S44L variant in spastin (SPG4) allows to determine its prevalence among patients with hereditary spastic paraplegia (HSP) and controls and provides further evidence for a disease-modifying effect in SPG4-linked HSP. *2nd Annual Conference of the German United Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL)*. 6.-8. Oktober, 2005; Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Deutschland.

Beetz C, Ehram A, Schickel J, Huang X, Dubiel W, Deufel T. Additional evidence for a disease-aggravating character of the 44L polymorphism in spastin (SPG4) and a possible mode of its action. *Mid Term Review Meeting for EU-Project „Spasticmodels“*. 12.-13. Juni, 2005; San Raffaele Scientific Institute, Mailand, Italien.

Vortrag:

Ehram A. Der Aminosäureaustausch S44L im Spastin – Mutation oder Polymorphismus? *3. Platz im Nachwuchswissenschaftlerwettbewerb des Forschungszentrums Lobeda (FZL)*. 26. Juni, 2005; Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Deutschland.