

Julian Teinert

Dr. med.

Adaptor Protein Complex 4-Associated Hereditary Spastic Paraplegia: Phenotypic Spectrum, Cellular Mechanisms, And Development Of A Small Molecule Screen

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. Stefan Kölker

Die hereditären spastischen Paraplegien sind eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe von mehr als 80 neurodegenerativen Erkrankungen, die durch eine ausgeprägte Spastik der unteren Extremität gekennzeichnet sind. Biallele Funktionsverlustvarianten in Genen, die Untereinheiten des Adapter-Protein-Komplexes 4 kodieren (AP4B1, AP4M1, AP4E1 und AP4S1), ein am intrazellulären Transport von Proteinen beteiligtes Heterotetramer, führen zu in der Kindheit auftretenden hereditären spastischen Paraplegien, die sogenannten Adapter-Protein-Komplex 4-assoziierten hereditären spastischen Paraplegien: SPG47 (AP4B1), SPG50 (AP4M1), SPG51 (AP4E1) und SPG52 (AP4S1). Ziel dieser Arbeit ist es, das klinische Spektrum und die zellulären Mechanismen der Adapter-Protein-Komplex 4-assoziierten hereditären spastischen Paraplegie zu untersuchen und anschließend einen phänotypischen Screening-Assay zu entwickeln, um potentiell krankheits-modifizierende Moleküle zu identifizieren.

Die Querschnittsanalyse klinischer, bildgebender und molekularer Daten von 156 Patienten mit einer genetisch bestätigten Diagnose einer Adapter-Protein-Komplex 4-assoziierten hereditären spastischen Paraplegie ermöglichte die Identifikation einiger klinischer Kernmerkmale, die bei den meisten dieser Patienten zu beobachten waren. Zu diesen Merkmalen gehören eine früh einsetzende motorische Entwicklungsverzögerung, Sprachstörungen, mäßige bis schwere intellektuelle Behinderung, leichte postnatale muskuläre Hypotonie mit Fortschreiten zu spastischer Diplegie und später Tetraplegie, postnatale Mikrozephalie, Fußdeformitäten und Epilepsie. Häufige Befunde der Hirnbildgebung bei den Patienten umfassten eine Verdünnung des Corpus callosum, periventrikuläre Veränderungen der weißen Substanz und Ventrikulomegalie.

Bemerkenswert ist, dass der Schweregrad der Erkrankung und die verschiedenen Symptome gleichmäßig auf die Subtypen verteilt waren, so dass ein gemeinsamer Phänotyp von SPG47, SPG50, SPG51 und SPG52, ein Adapter-Protein-Komplex 4 Mangelsyndrom, nachgewiesen werden konnte.

Um die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen eines Adapter-Protein-Komplex 4 Mangels zu untersuchen, wurden Fibroblasten und aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte Neuronen von Patienten mit Adapter-Protein-Komplex 4-assoziiierter hereditärer spastischen Paraplegie generiert. Die detaillierte Untersuchung dieser Zelllinien ergab, dass alle Adapter-Protein-Komplex 4-defizienten Zelllinien eine erhöhte Expression des Autophagie-verwandten Proteins 9A, eines bekannten Zielproteins des Adapter-Protein-Komplexes 4, aufwiesen. Darüber hinaus zeigte sich immunzytochemisch eine veränderte Lokalisierung des Autophagie-verwandten Proteins 9A, bestehend aus einer Akkumulation im trans-Golgi-Netzwerk und einer Depletion von peripheren Zellkompartimenten. Die erneute Expression des AP4B1-Gens in AP4B1-defizienten Fibroblasten normalisierte die Proteinspiegel und die Lokalisation des mit der Autophagie-verwandten Proteins 9A, ein weiterer Hinweis auf einen vom Adapter-Protein-Komplex 4 abhängigen Mechanismus. Um mögliche nachgeschaltete Effekte eines fehllokalisierten Autophagie-verwandten Proteins 9A zu identifizieren, wurde anschließend der Autophagie-Signalweg und das Neuritenwachstum untersucht. In diesen Experimenten zeigten die von Patienten stammenden Fibroblasten einen intakten autophagischen Umsatz, die Autophagie in den Neuronen hingegen jedoch war gestört, ein Hinweis auf einen Neuronen-spezifischen Mechanismus. Darüber hinaus waren das Wachstum und die Verzweigung in den von Patienten stammenden Neuronen reduziert, dies lässt auf eine wichtige Rolle des Adapter-Protein-Komplexes 4 bei der neuronalen Entwicklung schließen.

Auf der Grundlage der veränderten Lokalisierung des Autophagie-verwandten Proteins 9A in Fibroblasten wurde ein Hochdurchsatz-Screening-Assay etabliert und die Molekülbibliothek „National Institute of Neurological Disorders and Stroke Custom Collection 2“ untersucht. Im Rahmen dieses Screenings wurden zwei Substanzen identifiziert, Pyrvinium pamoate und Ethidiumbromid, die die Lokalisierung des Autophagie-verwandten Proteins 9A normalisieren. Diese Moleküle stellen einen

möglichen Therapieansatz dar und müssen in Zukunft weiter detailliert untersucht werden.

Insgesamt beschreiben die hier präsentierten Ergebnisse das phänotypische und molekulare Spektrum, verbessern das Verständnis der zellulären Mechanismen in von Patienten gewonnenen Zellen und bieten in Form eines phänotypischen Screening-Assays ein vielversprechendes Instrument zur Identifizierung von potentiellen Therapieansätzen für die Adapter-Protein-Komplex 4-assoziierte hereditäre spastische Paraplegie.