

Barbara Brechmann

Dr. med.

## **Translational research in childhood-onset hereditary spastic paraplegia: From deep phenotyping to high-throughput small molecule screens**

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Stefan Kölker

Bei den hereditären spastischen Paraplegien handelt es sich um eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe von über 80 Erbkrankheiten. Diese sind aufgrund einer Degeneration der Pyramidenbahn und der Hinterstränge durch eine progrediente Spastik der Beine gekennzeichnet. Im Jahr 2012 wurden zum ersten Mal von bi-allelischen Mutationen im *TECPR2* Gen bei fünf Individuen berichtet und die assoziierte Erkrankung wurde zunächst als neue Form der hereditären spastischen Paraplegien eingeordnet (SPG49). *TECPR2* selbst gehört zur Familie der Tectonin- $\beta$ -Propeller-Repeat-Containing Proteine und ist an der Autophagie, dem Abbauen und Verwerten eigener zytosolischer Zellbestandteile beteiligt. Ebenso kann es bei den Adapter-Protein-Komplex-4 assoziierten hereditären spastischen Paraplegien (SPG47, 50, 51 und 52) zu Regulationsstörungen der Autophagie kommen, die auf Mutationen in den Untereinheiten des Adapter-Protein-Komplexes-4 beruhen. Da der Adaptor-Protein-Komplex-4 in den vesikulären Transport vom Trans-Golgi-Apparat zu frühen sowie späten Endosomen involviert ist, kann ein Funktionsverlust beispielsweise die Akkumulation des Autophagie-Proteins ATG9A im Trans-Golgi-Netzwerk zur Folge haben. Dies wiederum kann sich auf die Autophagozytose sowie auf die Funktion und das Wachstum von Axonen auswirken. Sowohl die *TECPR2*-assoziierte Krankheit also auch die Adaptor-Protein-Komplex-4 assoziierten hereditären spastischen Paraplegien zählen zu seltenen Krankheiten bei Kindern, sodass eine korrekte und frühzeitige Diagnose herausfordernd sein kann. Für beide Krankheiten gibt es zudem noch keine kurativen Therapieoptionen und die genauen molekularen Pathomechanismen blieben bisher unbekannt.

In dieser Arbeit wurde eine Kohorte aus 27 internationalen Patienten, die bi-allelische Varianten im *TECPR2*-Gen aufwiesen, untersucht. Dabei waren zehn Fälle bereits veröffentlicht und 17 Patienten wurden neu identifiziert. Eine Analyse ergab folgende wesentliche Symptome des *TECPR2*-assoziierten Phänotyps: geistige Behinderung, muskuläre Hypotonie, Dysarthrie, Gangstörungen, periphere Neuropathie und autonome Dysfunktion. Die Phänotypbeschreibung erfolgte standardisiert auf Basis der Human Phenotype Ontology. In der Kohorte konnten zehn neue trunkierende und Missense Varianten unter den insgesamt 17 Varianten nachgewiesen werden. Diese Varianten wurden anhand der Richtlinien des American College of Medical Genetics and Genomics eingestuft mit Hilfe von *in silico* - Analysen und der Position der Varianten.

Zur Unterstützung der Interpretation von Varianten im Adaptor-Protein-Komplex-4 Gen wurde ein funktioneller Assay etabliert, der die subzelluläre Lokalisation von ATG9A in aus

Patientenproben gewonnenen Fibroblasten misst. Die ATG9A-Fluoreszenz innerhalb des Trans-Golgi-Netzwerkes wurde dafür im Verhältnis zum Zytoplasma („ATG9A-Ratio“) mit Hilfe quantitativer immunocytochemischer Mikroskopie und automatischer Bildanalyse bestimmt. Der Assay generierte robuste Daten, da er die qualitativen Standards für zellbasierte Screening-Assays erfüllte ( $Z'$ -robust  $> 0,3$ ). Die „ATG9A Ratio“ zeigte sich deutlich erhöht in 18 Zelllinien von Patient\*innen im Vergleich zu Kontrollen (Mittelwert:  $1.21 \pm 0.05$  vs.  $1.21 \pm 0.05$  [Standardabweichung]). Die Receiver-Operating-Characteristic-Analyse zeigte eine robuste diagnostische Aussagekraft des Assays (Fläche unter der Kurve: 0.85, 95% Konfidenzintervall: 0.849-0.852).

Darüber hinaus wurde der Hochdurchsatz-ATG9A-Assay in 384-Well-Platten für das Screening von Compound Libraries entwickelt. Nach dem Nachweis der Sensitivität des Assays für die Wiederherstellung des Adaptor-Protein-Komplex-4 wurde die Mechanism of Action Library mit 880 Compounds und die Astellas Small Molecule Library mit ~29,000 Compounds gescreent. Aktive Compounds, die die „ATG9A-Ratio“ um drei Standardabweichungen reduzierten, wurden anschließend in Dosis-Wirkungs-Assays validiert. Aktive Compounds aus der Mechanism of Action Library wurden zusätzlich auf Autofluoreszenz getestet. Insgesamt wurden Simvastatin und Bafilomycin A1 als Hit-Compounds im Screening der Mechanism of Action Library entdeckt, während das verblindete Screening der Astellas Small Molecule Library 17 vielversprechende Hit-Compounds identifizierte.

Zusammengefasst werden in dieser Arbeit die klinischen, bildgebenden und genetischen Charakteristika der *TECPR2*-assoziierten Krankheit anhand einer Kohorte von 27 Patient\*innen untersucht. Dies wird zukünftig nicht nur den Diagnoseprozess erleichtern, sondern bildet auch eine Grundlage für prospektive Studien zum Erkrankungsverlauf. Der Hochdurchsatz-ATG9A-Translokationsassay im 384-Well-Format wird zudem die Diagnosestellung von Adaptor-Protein-Komplex-4-assoziierten hereditären spastischen Paraplegien unterstützen und auch bei der Interpretation von neuen Varianten behilflich sein. Der etablierte Assay sowie die identifizierten Hit-Compounds eröffnen neue Möglichkeiten für das Entdecken von therapeutischen Targets und neuen Therapieoptionen. Diese können auch zu Fortschritten im Verständnis der zellulären Mechanismen führen, die an dem rasch fortschreitenden Krankheitsprozess beteiligt sind.