

6 Conclusion

Pure hereditary spastic paraplegias (pHSP) are relatively mild neurodegenerative disorders of the spinal cord. The predominant clinical sign is a slowly progressive gait anomaly due to spasticity of the legs. Age of onset is usually during adulthood, but varies greatly both within and between families. Autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (ADHSP) are the major forms of pHSP and are genetically heterogeneous. The disease loci of pure ADHSP have been assigned to chromosomes 2 (*SPG4* in 2p 21-24, *SPG13* in 2q24-34), 8 (*SPG8* in 8q23-24), 12 (*SPG10* in 12p13), 14 (*SPG3* in 14q11.2-q24.3), 15 (*SPG6* in 15q11.1), and 19 (*SPG12* in 19q13). To date, the *SPG4* gene *SPAST* has been identified. The purpose of this dissertation is to (1) determine the disease locus of a large family with pure ADHSP, (2) construct the physical map of the candidate region as the first step to identify the disease gene, (3) investigate whether CAG repeat expansions were involved in the mechanism of disease, and (4) screen the mutation of patients with the *SPAST* gene. The results are summarized below.

- (1) The large family with pure ADHSP was analyzed by linkage test and a significant linkage of the disease loci to *SPG4* with lod scores = 3.63 and 3.39 at loci *D2S367* and *D2S352*, respectively was found.
- (2) A yeast artificial chromosomes (YAC) contig which comprised 10 additional YACs and 13 expressed sequence tags (ESTs) on the basis of the previously published YAC contig of *SPG4* critical region was constructed.
- (3) A total of six CAG/CTG containing fragments were obtained from cosmid libraries within the *SPG4* candidate region between loci *D2S367* and *D2S400*. Of the six CAG containing sequences, a highly polymorphic STRP (*D2S3008*) was serendipitously identified. It is composed of (GAAA)_n(AAGG)_n. A total of 28 alleles were identified in 50 Caucasian DNA samples. The marker has a heterozygosity of 0.81 and a PIC value of 0.78. Loci *D2S352* and *D2S2283* flank *D2S3008* distally and *D2S2351* flank it proximally. A 254 bp allele at locus *D2S3008* was segregated in the affected individuals of the *SPG4*-linked family.

- (4) Based on the sequences of the remaining five CAG positive clones, five new STSs were generated and their dbSTS_ID are 98663, 98664, 98809, 98810, 98811, respectively. Two of the six fragments showed the maximum of repeat units was (CTG)₆. However, no CAG/CTG repeat expanded alleles were detected in the affected individuals of the SPG4-linked family.
- (5) A contig which comprised 33 bacteriophage P1-derived artificial chromosomes (PACs) and 15 bacterial artificial chromosomes (BACs) was established in the SPG4 candidate region. The sizes of PACs and BACs were determined by pulse field gel electrophoresis and the average size of PACs and BACs was 120 kb and 127 kb, respectively. In addition, a total of 41 STSs comprising 26 ESTs were integrated into this contig. Of the 26 ESTs, SHGC12567 was found to be part of human xanthine dehydrogenase, N52847 was identical with human latent transforming growth factor beta binding protein 1 (LTBP1), and stSG 4150 and stSG 1707 were a part of human EH domain containing protein 3 (EHD3). The remaining ESTs had no striking homology with the known genes.
- (6) A novel mutation 1206-1209delCCTT in the exon 7 of *SPAST* was identified (Human Gene Mutation Data Accession Number: H971836) in one patient. In addition, one polymorphism 1298+17A>C in the intron 8 of *SPAST* was detected and the same polymorphism was found in one of 100 unrelated controls. There was no mutation found in the SPG4-linked family when all 17 exons, 5'UTR, 3'UTR, and introns 6,10,11 were sequenced. The mechanism of mutation in the SPG4-linked family has to be further investigated for gross deletion or atypical intronic mutation.

Zusammenfassung

Reine hereditäre spastische Paraplegie (pHSP) bezeichnet eine Gruppe von relativ gutartigen neurodegenerativen Erkrankungen des Rückenmarks. Das hervorstechende klinische Symptom ist eine langsam fortschreitende Gang-Anomalität, die durch eine Spastik der Beine begründet ist. Autosomal dominante hereditäre spastische Paraplegien (ADHSP) sind die Hauptformen von pHSP und sind genetisch heterogen. Als Genorte für die reine ADHSP wurden die Chromosomen 2 (SPG4 auf 2p 21-24, SPG13 auf 2q24-34), 8 (SPG8 auf 8q23-24), 12 (SPG10 auf 12p13), 14 (SPG3 auf 14q11.2-q24.3), 15 (SPG6 auf 15q11.1), und 19 (SPG12 auf 19q13) identifiziert. Bis zum heutigen Tag wurde allein das in SPG4-Patienten mutierte SPAST-Gen kloniert und analysiert.

Die Ziele dieser Dissertation sind: (1) Bestimmung des Krankheitslocus einer großen Familie mit reiner ADHSP; (2) Erstellung einer physikalischen Karte der Kandidaten-Gen-Region, um Kandidaten-Gene untersuchen zu können; (3) Untersuchung, ob CAG-Repeat-Expansionen für die Krankheitsentwicklung verantwortlich sind und (4) Suche nach neuen Mutationen im SPAST-Gen. Die Ergebnisse sind hier kurz zusammengefasst:

(1) Bei einer großen Familie mit reiner ADHSP wurde eine Linkage-Analyse durchgeführt und eine signifikante Assoziation der SPG4 Krankheitsloci mit lod score Werten von 3.63 am Locus D2S367 und 3.39 am Locus D2S352 erhalten.

(2) Eine Yeast Artificial Chromosome (YAC) Contig, die 10 zusätzliche YAC's und 13 EST's beinhaltet, wurde auf der Basis der zuvor veröffentlichten YAC Contig der SPG4-kritischen Region erstellt.

(3) Sechs Fragmente mit CAG/CTG Sequenzen wurden aus einer Cosmid-Genbank aus der SPG4 Kandidatengen-Region zwischen den Loci D2S367 und D2S400 isoliert. Bei der Analyse dieser sechs CAG-Sequenzen beinhaltenden Fragmente wurde ein hoch polymorpher STRP (D253008) zufällig identifiziert. Dieser STRP hat die Struktur (GAAA)_n(AAGG)_n und es konnten 28 Allele in 50 kaukasischen DNA-Proben identifiziert werden. Dieser Marker hat eine Heterozygotität von 0.81 und einen PIC Wert von 0.78.

Die Loci D2S352 und D2S2283 flankieren den Marker D2S3008 distal und D2S2351 flankiert ihn proximal. Ein 254 bp Allel am Locus D2S3008 segregiert mit den betroffenen Individuen aus der SPG4 zugeordneten Familie.

(4) Die verbleibenden fünf CAG-positiven Klone konnten genutzt werden, um fünf neue STSs (98663, 98664, 98809, 98810 und 98811) zu generieren. Zwei der sechs Fragmente beinhalten sechs CTG-Repeat-Einheiten. In den Patienten der SPG4 assoziierten Familie konnte jedoch keine Expansion eines CAG/CTG Repeat-Allels nachgewiesen werden.

5) Über die SPG4 Kandidatenregion wurde ein Contig gelegt das aus 33 P1-Bakteriophagen Artifiziiellen Chromosomen (PAC's) und 15 Bakteriellen Artifiziiellen Chromosomen (BAC's) besteht. Die Längen der BAC's und PAC's wurden über Pulsfeld Gelelektrophorese bestimmt, die Durchschnittsgröße der PAC's belief sich auf 120kB, die der BAC's auf 127 kB. Zusätzlich wurde eine Summe von 41 STS's, die 26 EST's beinhalten, in diesem Contig lokalisiert. Einige der 26 EST's wurden Genen zugeordnet: SHGC12567 wurde als Teil der humanen Xanthin Dehydrogenase erkannt; N52847 war identisch mit dem Human Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 1 (LTBP1); und sowohl stSG 4150 als auch stSG 1707 wurden als Teile des Humanen EH Domain Containing Protein 3 (EHD3) erkannt. Die weiteren EST's zeigten keine deutlichen Homologien zu bekannten Genen.

(6) In einem Patienten wurde im Exon 7 von SPAST eine neue Mutation 1206-1209(CCTT identifiziert (Human Gene Mutation Data Accession Number: H971836). Zusätzlich wurde in Intron 8 ein Polymorphismus 1298+17A>C gefunden, der aber auch in einer der 100 nicht verwandten Kontrollpersonen vorkam. In der Familie mit SPG4-Link konnte in allen 17 Exonen, sowie in 5'UTR, 3'UTR und Introns 6, 10, 11 von SPAST über DNA-Sequenzierung keine Mutation gefunden werden. Die Art der Mutation in der Familie mit SPG4-Link bleibt also noch zu bestimmen. Es könnte sich um eine große Deletion oder um eine atypische intronische Mutation handeln.