

Genetik und Pathobiochemie neuer und atypischer Formen neuronaler Ceroid-Lipofuszinosen

→ Die neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCL) bilden die am weitesten verbreitete Gruppe neurodegenerativer lysosomaler Speichererkrankungen des Kindes- und Jugendalters. Auf der Grundlage des Erkrankungsbeginns, der klinischen Symptome und der Genetik wurden elf NCL-Formen charakterisiert (CLN1-CLN10, CLCN6). Bei neun dieser Formen wurden die krankheitsverursachenden Gene identifiziert. Mindestens 10 % aller NCL-Patienten können jedoch bisher genetisch keiner der bekannten NCL-Formen zugeordnet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden neue Gendefekte bei drei konsanguinen Familien mit unklarer spätinfantiler bzw. juveniler NCL mittels genetischer Kopplungs-, Expressions- und Mutationsanalysen identifiziert.

- In der ersten Familie türkischer Herkunft wiesen zwei Patienten eine spätinfantile NCL-ähnliche Erkrankung auf. Nach Ausschluss bekannter Gen- und Protein-Defekte passend für die klinischen Symptome und das Alter bei Erkrankungsbeginn (CLN1, CLN2, CLN3, CLN6, CLN8 und CLN10), wurde mittels genetischer Kopplungsanalysen und nachfolgende Mutationsanalysen von Kandidatengenen eine homozygote Mutation, c.1102G>A (p.Asp368Asn), im *Neurabin-I*-Gen identifiziert. Neurabin-I ist ein Inhibitor der Protein Phosphatase 1, die u.a. am intrazellulären Transport, Zellteilung und Proteinsynthese beteiligt ist. Sollten die klinischen und anatomischen Veränderungen sowie weiterführende biochemische Untersuchungen lysosomale Dysfunktionen in Neurabin-I-defizienten Zellen bestätigen, würde Neurabin-I den ersten Vertreter eines zytosolischen Proteins repräsentieren, dessen Defekt zur NCL führt.

- In der zweiten Familie pakistanischer Herkunft wiesen zwei Patienten eine frühe juvenile NCL auf. Nach Ausschluss bekannter Gen- und Protein-Defekte wurde mittels genetischer Kopplungsanalysen eine neue homozygote Mutation, c.1072_1073delTT (p.Leu358AlafsX4), im *CLN5*-Gen identifiziert. In der dritten Familie afghanischer Herkunft wiesen zwei Patienten eine spätinfantile NCL auf. Hier wurde ebenfalls eine neue homozygote Mutation, c.1137G>T (p.Trp379Cys), im *CLN5*-Gen identifiziert. Die Patienten dieser zwei Familien stellen die ersten CLN5-Patienten dar, die in Asien diagnostiziert wurden. Expressionsanalysen zeigten eine Verkürzung des mutanten

p.Leu358AlafsX4 CLN5-Proteins und einen Verlust der *N*-Glykosylierungsstelle am Asparagin 401. Die Größe und die Glykosylierung des p.Trp379Cys mutanten CLN5-Proteins blieben normal. Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie zeigte, dass das Wildtyp-CLN5-Protein komplett in den Lysosomen lokalisiert ist, während die beide mutanten Proteine im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten werden, ohne die Lysosomen zu erreichen.

→ Ein Defekt im *CLN3*-Gen führt zur „klassischen“ juvenilen NCL, eine im Schulalter mit Erblindung beginnende Krankheit; später kommen Demenz und weitere psychomotorische Abbauerscheinungen hinzu. Bisher wurden mehr als 40 *CLN3*-Mutationen beschrieben. 85 % der Patienten sind homozygot für eine 1,02 kb Deletion, die zum Verlust der Exone 7 und 8 führt. Trotz gleichen Gendefekts besteht bei vielen *CLN3*-Patienten eine hohe Genotyp-Phänotyp Variabilität. In der vorliegenden Arbeit sollten „*modifier genes*“ identifiziert werden, die den klinischen Verlauf der *CLN3*-Krankheit beeinflussen und möglicherweise als prognostische Faktoren dienen könnten. Die Genexpression in frisch isolierten Lymphozyten von acht *CLN3*-Patienten mit homozygoter 1,02 kb-Deletion, die einen klassischen (n=4), schnellen (n=2) und langsamen Krankheitsverlauf (n=2) aufweisen, wurde mit der von sieben geschlechts- und altersentsprechenden Kontrollen mittels genomweiter Microarray-Analysen verglichen.

- In Lymphozyten von *CLN3*-Patienten mit langsamem Krankheitsverlauf waren 964 Gene signifikant dysreguliert. 93 Gene waren in Patienten mit klassischem Krankheitsverlauf und 689 Gene in Patienten mit schnellem Krankheitsverlauf gegenüber den Kontrollen verändert.

- Die mRNA-Expression von 5 Genen war bei allen *CLN3*-Patienten dysreguliert. Um zu überprüfen, ob der akute Verlust von *CLN3* einen ähnlichen Effekt auf die Expression dieser Gene im Zell-Modell hat, wurden die mRNA-Spiegel von zwei Kandidatengenen (*CDC42SE2* und *DUSP2*) in, mit *CLN3*-siRNA behandelten Hela-Zellen analysiert. In diesen Zellen war die *CLN3*-Expression um 96% erniedrigt. Die zwei Gene zeigten die gleiche Tendenz der mRNA-Expression wie im DNA-Array: *CDC42SE2* ist 10 % bis 30 % erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle und *DUSP2* ist 1,4-1,9-fach erhöht.

- Die mRNA-Spiegel von 13 Genen waren bei Patienten mit schnellem Verlauf erhöht und bei Patienten mit langsamem Verlauf erniedrigt. Diese Daten wurden anhand von 4 Kandidatengenen (*Spi-B*, *RapGEF1*, *MARCKS* und *BACE2*) in CLN3-siRNA behandelten HeLa-Zellen überprüft. Alle Gene zeigten eine unterschiedliche, zum Teil signifikante Erhöhung der mRNA-Expression nach CLN3 *knock-down*.

→ Die Daten zeigen, dass die genom-weite genetische Kopplungsanalyse eine geeignete Methode ist, um neue Gendefekte bei klinisch und morphologisch diagnostizierten NCL-Patienten unklarer Genese zu identifizieren. Microarray-Analyse der Lymphozyten aus CLN3-Patienten mit gleicher Mutation aber unterschiedlichem Krankheitsverlauf können erste Anhaltspunkte für die Identifizierung von „*modifier genes*“ und Prognosefaktoren liefern, bedürfen aber extensiver biochemischer Validierung an *in vitro* und *in vivo* Modellsystemen.