

## Abstract 8

### Motor neuron degeneration in patients with hereditary spastic paraplegia 11 mimics atypical amyotrophic lateral sclerosis lesions (Poster session I)

*Denora P., Smets K., Zolfanelli F., Ceuterick-de Grootte C., Casali C., Deconinck T., Sieben A., Gonzales M., Zuchner S., Darios F., Peeters D., Brice A., Malandrini A., De Jonghe P., Santorelli F.M., Stevanin G., Martin J.J., El Hachimi K.H. Laboratoire de neurogénétique EPHE, Inserm, U1127, F-75013, Paris, France CNRS, UMR7225, F-75013, UPMC Univ Paris 06, UMR\_S1127, ICM, Pitié-Salpêtrière Hospital, F-75013, Paris, France*

The most common form of autosomal recessive hereditary spastic paraplegia is caused by mutations in the SPG11/KIAA1840 gene on chromosome 15q. The nature of the vast majority of SPG11 mutations found to date suggests a loss-of-function mechanism of the encoded protein, spatacsin. The SPG11 phenotype is, most of the time, characterized by a 20 progressive spasticity with neuropathy, cognitive impairment and a thin corpus callosum on brain MRI. Full neuropathological characterization has not been reported up to now despite the description of >100 SPG11 mutations. We describe here the clinical and pathological features observed in two unrelated females, members of genetically ascertained SPG11 families originating from Belgium and Italy, respectively. We confirm the presence of lesions of motor tracts in medulla oblongata and spinal cord associated with other lesions of the CNS. Interestingly, we report for the first time pathological hallmarks of SPG11 in neurons that include intracytoplasmic granular lysosome-like structures mainly in supratentorial areas, and others in subtentorial areas that are partially reminiscent of those observed in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), such as ubiquitin and p62 aggregates, except that they are never labelled with anti-TDP43 or anti-cystatin C. The neuropathological overlap with ALS, associated with some shared clinical manifestations, opens up new fields of investigation in the physiopathological continuum of motor neuron degeneration.

## Zusammenfassung 8

### Motor Neuron Degeneration bei Patienten mit hereditären spastischen Paraplegie 11 ahmt atypischen amyotrophe Lateralsklerose Läsionen (Poster Session I)

*Denora P., Smets K., Zolfanelli F., Ceuterick-de Grootte C, Casali C, Deconinck T., A. Sieben, Gonzales M., Züchner S., Darios F., Peeters D., Brice A. Malandrini, A., De Jonghe P., Santorelli FM, Stevanin G., Martin JJ, El Hachimi KH Laboratoire de neurogénétique EPHE, Inserm, U1127, F-75013, Paris, Frankreich CNRS, UMR7225, F-75013, UPMC Univ Paris 06, UMR\_S1127, ICM, Krankenhaus Pitié-Salpêtrière, F-75013, Paris, Frankreich*

Die häufigste Form der autosomal-rezessiven Spastische Paraplegie wird durch Mutationen im SPG11 / KIAA1840-Gen auf dem Chromosom 15q verursacht. Die Art der überwiegenden Mehrheit der SPG11 bisher gefundenen Mutationen schlägt ein loss-of-function-Mechanismus des kodierten Proteins, spatacsin. Der SPG11 Phänotyp ist, die meiste Zeit von einem 20 progressive Spastik mit Neuropathie, kognitiver Beeinträchtigung und einer dünnen Corpus callosum auf Gehirn-MRT charakterisiert. Volle neuropathologische Charakterisierung hat jetzt trotz der Beschreibung der gemeldeten bis> 100 SPG11 Mutationen nicht. Wir beschreiben hier die klinischen und pathologischen Merkmale in zwei nicht miteinander verwandten Frauen beobachtet, die Mitglieder der genetisch ermittelten SPG11 Familien aus Belgien und Italien stammen, beziehungsweise. Wir

bestätigen das Vorhandensein von Läsionen der motorischen Bahnen in Medulla und des Rückenmarks im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen des ZNS. Interessanterweise berichten wir zum ersten Mal pathologischen Kennzeichen von SPG11 in Neuronen, die intrazytoplasmatische granulare Lysosomartige Strukturen vor allem in supratentoriellen Bereichen, und andere in subtentorialen Bereiche umfassen, die teilweise erinnert an die in der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) beobachtet werden, wie Ubiquitin und p62-Aggregate, mit der Ausnahme, dass sie nie mit Anti-TDP43 oder anti-Cystatin C. die neuropathologische Überlappung mit ALS, verbunden mit einigen gemeinsamen klinischen Manifestationen gekennzeichnet sind, eröffnen sich neue Untersuchungsfelder im pathophysiologischen Kontinuum von Motoneurondegeneration.

---

## Abstract 9

### Functional outcomes in Hereditary Spastic Paraplegia: the Canadian experience (Poster session I)

*Nicolas Chrestian<sup>1</sup>, Nicolas Dupré<sup>2</sup>, Ziv Gan-Or<sup>3</sup>, Anna Szuto<sup>4</sup>, Shiyi Chen<sup>5</sup>, Anil Venkitachalam<sup>6</sup>, Jean-Denis Brisson<sup>2</sup>, Jodi Warman-Chardon<sup>7</sup>, Kym Boycott<sup>7</sup>, Peter N. Ray<sup>8</sup>, Oskana Suchowersky<sup>6</sup>, Guy Rouleau<sup>3</sup>, Grace Yoon<sup>1,9</sup>*  
*1) Division of Neurology, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, 2) Division of Neurology, Laval University, 3) Department of Human Genetics, McGill University, 4) Department of Medical Genetics, University of Montreal, 5) The Hospital for Sick Children Research Institute, Child Health Evaluative Sciences/Biostatistics Design & Analysis Unit, 6) Division of Neurology, University of Alberta, 7) Division of Medical Genetics, Children's Hospital of Eastern Ontario, 8) Department of Paediatric Laboratory Medicine, Hospital for Sick Children, 9) Division of Clinical and Metabolic Genetics, Hospital for Sick Children, 555 University Avenue, M5G 1X8, Toronto, Ontario, Canada*

**Background:** Hereditary spastic paraplegias (HSP) are a very heterogeneous group of neurodegenerative disorders primarily involving the corticospinal tracts. Many forms of HSP have been reported in Canada, but the prevalence, clinical types, genetic characterization, and impact of this disease remains poorly studied.

**Objective:** To describe the clinical presentation and evolution of this disease in patients across Canada, and determine which clinical, radiologic and genetic factors determine functional outcome for patients with HSP.

**Methods:** We conducted a multicenter prospective observational study of patients who met the clinical criteria for diagnosis of HSP in the provinces of Alberta, Ontario and Quebec. Standardized clinical evaluations were carried out at all study sites. The characteristics of the participants were analyzed using descriptive statistics.

**Main Outcome measures:** The main outcome measure was the spastic paraplegia rating scale (SPRS) with the following subdomains: speed of gait, climb stairs, quality of gait, arising from chair, quality of spasticity, weakness and contractures, bladder dysfunction. All subdomains were rated on a scale between 0 and 4 with a maximum total score of 52. We also used the SPATAX-EUROSPA disability stage (disability score) to assess disability.

**Results:** A total of 534 patients were identified with HSP across the country and 160 patients had a confirmed genetic diagnosis. Mutations were identified 15 different genes; the most common were SPAST (SPG4, 45%), ATL1 (SPG3A, 19%), SPG11 (9%), PGN (SPG7, 6%), KIAA0196 (SPG8, 5%) and PLP1 (SPG 2, 5%). Pediatric onset of symptoms was a strong predictor for swallowing problems ( $p=0.009$ ), speech delay ( $p=0.004$ ), and motor delay ( $p=0.0013$ ) but these variables were not specifically associated with a particular gene. Diagnosis of SPG4 and SPG7 were associated with older age at symptom onset. SPG4 and SPG3A were less associated with learning disabilities compared to other subtypes of HSP. SPG11 was strongly associated with progressive cognitive deficits. SPG3A was associated with better functional outcome compared to other HSP subtypes ( $p=0.02$ ). The strongest predictor for significant disability was abnormal MRI ( $p=0.04$ ). 21

**Conclusion:** The most important predictors of disability in our patients with HSP were early age of symptom onset, abnormal MRI and SPG11 mutations. Accurate molecular characterization of well-phenotyped cohorts and international collaboration will be essential to establish the natural history of these rare degenerative disorders.

## Zusammenfassung 9

### Funktionelle Ergebnisse bei Spastische Paraplegie: die kanadische Erfahrung (Poster Session I)

*Nicolas Chrestian<sup>1</sup>, Nicolas Dupré<sup>2</sup>, Ziv Gan-OR<sup>3</sup>, Anna Szuto<sup>4</sup>, Shiyi Chen<sup>5</sup>, Anil Venkitachalam<sup>6</sup>, Jean-Denis Brisson<sup>2</sup>, Jodi Warman-Chardon<sup>7</sup>, Kym Boycott<sup>7</sup>, Peter N. Ray<sup>8</sup>, Oskana Suchowersky<sup>6</sup>, Guy Rouleau<sup>3</sup> Grace Yoon<sup>1,9</sup> 1) Abteilung für Neurologie, Klinik für kranke Kinder, Toronto, Ontario, 2) Abteilung für Neurologie, Universität Laval 3) Department of Human Genetics, McGill University, 4) Abteilung für Medizinische Genetik, Universität von Montreal, 5) The Hospital for Sick Children Research Institute, Child Health Evaluative Wissenschaften / Biostatistik Design & Analysis Unit, 6) Abteilung für Neurologie, University of Alberta, 7) Abteilung für Medizinische Genetik, Kinderkrankenhaus von Eastern Ontario, 8) Abteilung für Pädiatrische Laboratoriumsmedizin, Krankenhaus für kranke Kinder, 9) Abteilung für klinische und metabolische Genetics, Hospital for Sick Children, 555 University Avenue, M5G 1X8, Toronto, Ontario, Kanada*

**Hintergrund:** Hereditäre spastische Paraplegie (HSP) sind eine sehr heterogene Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen in erster Linie die corticospinal Bahnen beteiligt sind. Viele Formen von HSP wurden in Kanada berichtet, aber die Prävalenz, klinische Typen, genetische Charakterisierung, und die Auswirkungen dieser Krankheit bleibt nur wenig untersucht.

**Ziel:** Die klinische Präsentation und Entwicklung dieser Krankheit bei Patienten in ganz Kanada beschreiben und bestimmen, welche klinischen, radiologischen und genetischen Faktoren funktionelle Ergebnis für Patienten mit HSP bestimmen.

**Methoden:** Wir führten eine multizentrische prospektive Beobachtungsstudie von Patienten, die die klinischen Kriterien für die Diagnose von HSP in den Provinzen Alberta, Ontario und Quebec traf. Standardisierte klinische Bewertungen wurden bei allen Studienzentren durchgeführt. Die Eigenschaften der Teilnehmer wurden mit Hilfe der deskriptiven Statistik analysiert.

**Hauptzielmaßnahmen:** Das wichtigste Ergebnis Maßnahme war die spastische Paraplegie Rating-Skala (SPRS) mit den folgenden Sub-Domains: Ganggeschwindigkeit, Treppen steigen, die Qualität der Gang, von Stuhl entstehen, die Qualität der Spastik, Schwäche und Kontrakturen,

Blasenfunktionsstörungen. Alle Sub-Domains wurden auf einer Skala zwischen 0 und 4 mit einer maximalen Gesamtpunktzahl von 52 bewertet. Wir haben auch die SPATAX-EUROSPA Behinderung Stufe (Behinderungswert) Behinderung zu beurteilen.

**Ergebnisse:** Insgesamt wurden 534 Patienten mit HSP im ganzen Land identifiziert und 160 Patienten hatten eine bestätigte genetische Diagnostik. Die Mutationen wurden 15 verschiedene Gene identifiziert; die häufigsten waren SPAST (SPG4, 45%), ATL1 (SPG3A, 19%), SPG11 (9%), PGN (SPG7, 6%), KIAA0196 (SPG8, 5%) und PLP1 (SPG 2, 5%). Pediatric Einsetzen der Symptome war ein starker Prädiktor Probleme beim Schlucken ( $p = 0,009$ ), Sprachverzögerung ( $p = 0,004$ ), und die Motorverzögerung ( $p = 0,0013$ ), aber diese Variablen wurden nicht spezifisch mit einem bestimmten Gen assoziiert. Die Diagnose der SPG4 und SPG7 wurden mit höherem Alter bei Beginn der Symptome in Verbindung gebracht. SPG4 und SPG3A wurden weniger mit Lernschwierigkeiten im Vergleich zu anderen Subtypen von HSP verbunden. SPG11 war stark mit progressiven kognitiven Defiziten verbunden. SPG3A wurde mit besseren funktionellen Ergebnis assoziiert im Vergleich zu anderen HSP-Subtypen ( $p = 0,02$ ). Der stärkste Prädiktor für eine signifikante Behinderung war abnormal MRI ( $p = 0,04$ ). 21

**Fazit:** Die wichtigsten Prädiktoren für Behinderung bei unseren Patienten mit HSP waren bereits im Alter von Beginn der Symptome, abnorme MRI und SPG11 Mutationen. Eine genaue molekulare Charakterisierung von gut phänotypisiert Kohorten und die internationale Zusammenarbeit ist unerlässlich, den natürlichen Verlauf dieser seltenen degenerativen Erkrankungen zu etablieren.

## Abstract 15

### New mutations in CYP7B1 causing spastic paraplegia potentially treatable with simvastatin (Poster session I)

*Ylikallio E1,2, Auranen M1,2, Isohanni P3, Lönnqvist T3, Tyynismaa H1* 1Research Programs Unit, Molecular Neurology, University of Helsinki; 2Clinical Neurosciences, Neurology, University of Helsinki and Helsinki University Hospital; 3Department of Child Neurology, Children's Hospital, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland.

We have set out to characterize the genetic background of hereditary spastic paraplegia (HSP) in Finland. We also aim to test treatments that address the metabolic consequences of specific mutations. Our gene panel contains all known HSP genes. Selected patients with a negative gene panel undergo exome sequencing. Sequencing of index patients from 41 families with both adult-onset and childhood-onset disease has so far resulted in genetic diagnosis in 12 families (29%). The genetic spectrum appears wide, as mutations have been found in 6 different genes. We found new compound heterozygous mutations in CYP7B1 in one patient. The gene encodes an enzyme involved in cholesterol metabolism and patients are known to accumulate 27-OH-cholesterol, which may be toxic to motor neuron axons and thus be the cause of the disease. Our patient had elevated 27-OH-cholesterol, which was decreased by treatment with simvastatin. The patient has been followed for

one year with no adverse events. Our results have greatly benefited diagnostic procedures and have contributed to potentially one of the first specific treatments for HSP.

## Zusammenfassung 15

### Neue Mutationen in CYP7B1 verursachen spastische Paraplegie potenziell behandelbar mit Simvastatin (Poster Session I)

*Ylikallio E1,2, Auranen M1,2, Isohanni P3, Lönnqvist T3, Tyynismaa H1 1Research Programme Einheit, Molekulare Neurologie, Universität Helsinki; 2Clinical Neurosciences, Neurologie, Universität Helsinki und Helsinki University Hospital; 3 Abteilung für Kinder Neurologie, Kinderkrankenhaus, Universität Helsinki Central Hospital, Helsinki, Finland.*

Wir haben den genetischen Hintergrund von Spastische Paraplegie (HSP) in Finnland zu charakterisieren dargelegt. Wir wollen auch Behandlungen zu testen, die die Folgen für den Stoffwechsel von spezifischen Mutationen adressieren. Unser Gen-Panel enthält alle bekannten HSP-Genen. Ausgewählte Patienten mit einem negativen Gen-Panel durchlaufen Exoms Sequenzierung. Die Sequenzierung des Indexpatienten aus 41 Familien mit beiden Erwachsenen-Beginn und Kindheit einsetzende Erkrankung in der genetischen Diagnostik in 12 Familien (29%), so weit geführt. Das genetische Spektrum erscheint breit, wie Mutationen in 6 verschiedenen Genen gefunden. Wir fanden neue Verbindung heterozygote Mutationen im CYP7B1 bei einem Patienten. Das Gen kodiert für ein Enzym in den Cholesterinstoffwechsel beteiligt und Patienten bekannt sind, 27-OH-Cholesterin zu akkumulieren, die Motoneuron Axone toxisch sein können und somit die Ursache der Krankheit sein. Unser Patient hatte 27-OH-Cholesterin erhöht, die durch Behandlung mit Simvastatin verringert wurde. Der Patient wurde für ein Jahr ohne unerwünschten Ereignisse. Unsere Ergebnisse haben stark diagnostischen Verfahren profitiert und haben potentiell eine der ersten spezifischen Behandlungen für HSP beigetragen.

---

## Abstract 16

### Hereditary Spastic Paraplegia: clinical and mutational spectrum in the unexplored Greek population (Poster session I)

*Georgios Koutsis1, David S Lynch2, Marianthi Breza1, Georgia Karadima1, Alexandros Polymeris3, Roser Pons3, Arianna Tucci2,4,5, Filippo M Santorelli6, Alessandra Tessa6, Henry Houlden2,7, Marios Panas1 1 Neurogenetics Unit, 1st Department of Neurology, Eginition Hospital, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece 2 Department of Molecular Neuroscience, The National Hospital for Neurology and Neurosurgery, UCL Institute of Neurology, London, UK 3 1st Department of Pediatrics, Aghia Sofia Hospital, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece 4 Division of Pathology, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italy 5 Department of Pathophysiology & Transplantation, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy 6 Molecular Medicine and Neuroscience, IRCCS Stella Maris, Pisa, Italy 7 Neurogenetics Laboratory, The National Hospital for Neurology and Neurosurgery, UCL Institute of Neurology, London, UK*

**Introduction:** Hereditary spastic paraplegia (HSP) is a group of inherited degenerative disorders characterised by lower limb spasticity either alone (pure HSP) or in combination with other neurological manifestations (complicated HSP). HSP is among the most clinically and genetically heterogeneous Mendelian diseases. To date, more than 80 genes and loci have been implicated. The purpose of this study was to investigate the clinical and mutational spectrum of HSP in the previously unexplored Greek population.

**Methods:** We analyzed the clinical and genetic characteristics of 79 patients from 63 families, referred to the Neurogenetics Unit, Eginition Hospital and the Pediatric Neurology Unit, Aghia Sophia Children's Hospital, University of Athens over a 19-year period. Probands were screened with a combination of next generation sequencing (NGS) techniques, MLPA and on rare occasions Sanger sequencing.

**Results:** A genetic diagnosis was made in 32 index cases (51%), including 14 novel variants in 5 known HSP genes. Likely pathogenic mutations were found in SPAST, SPG11, KIF5A, CYP7B1, ATL1, REEP1, NIPA1, SPG7, PLP1 and ABCD1. Variants in SPAST, KIF5A and ATL1 were the most common causes of autosomal dominant HSP and in SPG11 and CYP7B1 of autosomal recessive HSP. We identified a novel variant of SPG11 in a late-onset patient, which may be unique to the Greek population, and a case of adrenomyeloneuropathy. 26

**Conclusion:** Our results provide for the first time comprehensive genetic data on the Greek HSP population, confirming findings in other European populations and supporting the early use of NGS as a diagnostic tool in HSP patients.

## Zusammenfassung 16

### Spastische Paraplegie: klinische und Mutationsspektrum in der unerforschten griechischen Bevölkerung (Poster Session I)

*Georgios Koutsis<sup>1</sup>, David S Lynch<sup>2</sup>, Marianthi Breza<sup>1</sup>, Georgia Karadima<sup>1</sup>, Alexandros Polymeris<sup>3</sup>, Roser Pons<sup>3</sup>, Arianna Tucci<sup>2,4,5</sup>, Filippo M Santorelli<sup>6</sup>, Alessandra Tessa<sup>6</sup>, Henry Houlden<sup>2,7</sup>, Marios Panas<sup>1</sup>* <sup>1</sup> Neurogenetics Einheit, 1. Abteilung für Neurologie, Eginition Hospital, School of Medicine, Nationale und Kapodistrias-Universität Athen, Athen, Griechenland <sup>2</sup> Department of Molecular Neuroscience, The National Hospital für Neurologie und Neurochirurgie, UCL Institute of Neurology, London, UK <sup>3</sup> 1. Department of Pediatrics, Aghia Sofia Hospital, School of Medizin, Nationale und Kapodistrias-Universität Athen, Athen, Griechenland <sup>4</sup> Abteilung für Pathologie, Fondazione IRCCS Ca 'Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italien <sup>5</sup> Institut für Pathophysiologie & Transplantation, Università degli Studi di Milano, Mailand, Italien <sup>6</sup> Molekulare Medizin und Neurowissenschaften, IRCCS Stella Maris, Pisa, Italien <sup>7</sup> Neurogenetics Laboratory, The National Hospital für Neurologie und Neurochirurgie, UCL Institute of Neurology, London, UK

**Einleitung:** Hereditäre spastische Paraplegie (HSP) ist eine Gruppe von erblichen degenerativen von der unteren Gliedmaßen Spastik gekennzeichnet Störungen entweder allein (reine HSP) oder in Kombination mit anderen neurologischen Symptomen (komplizierte HSP). HSP zählt zu den klinisch und genetisch heterogene Mendelschen Erkrankungen. Bis heute wurden mehr als 80 Gene und Loci eine Rolle spielen. Das Ziel dieser Studie war es, die klinische und Mutationsspektrum von HSP in den bislang unerforschten griechischen Bevölkerung zu untersuchen.

**Methoden:** Wir analysierten die klinischen und genetischen Merkmale von 79 Patienten aus 63 Familien, bezogen auf die Neurogenetics Einheit, Eginition Hospital und der Pediatric Neurology Einheit, Aghia Sophia Kinderkrankenhaus, Universität Athen über einen Zeitraum von 19 Jahren. Probanden wurden mit einer Kombination von Next Generation Sequencing (NGS) Techniken, MLPA und bei seltenen Gelegenheiten Sanger-Sequenzierung gescreent.

**Ergebnisse:** Eine genetische Diagnose wurde in 32 Index Fällen (51%), darunter 14 neue Varianten in 5 bekannten HSP-Genen hergestellt. Wahrscheinlich pathogener Mutationen wurden in SPAST, SPG11, KIF5A, CYP7B1, ATL1, REEP1, NIPA1, SPG7, PLP1 und ABCD1 gefunden. Varianten in SPAST, KIF5A und ATL1 waren die häufigsten Ursachen für autosomal-dominant HSP und in SPG11 und CYP7B1 der autosomal-rezessiven HSP. Wir identifizierten eine neue Variante von SPG11 bei einem Patienten mit spätem Beginn, die der griechischen Bevölkerung eindeutig sein kann, und einen Fall von adrenomyeloneuropathy. 26

**Fazit:** Unsere Ergebnisse liefern zum ersten Mal umfassende genetische Daten auf der griechischen HSP Bevölkerung, Erkenntnisse in anderen europäischen Populationen bestätigt und den frühen Einsatz von NGS als diagnostisches Werkzeug in HSP-Patienten zu unterstützen.

## Abstract 17

### Insight into the membrane traffic and microtubule dynamics in SPG4-KO neurons (Oral presentation)

*Clement PLAUD1, Vandana JOSHI1, Marinello MARTINA1, Thierry GALLI2, David PASTRE1, Patrick CURMI1 and Andrea BURGO1 1 Structure and Activity of Normal and Pathological Biomolecules, INSERM U1204, University of Evry, France. 2 Inserm URL U950, Institut Jacques Monod, France*

Alteration of axonal transport has emerged as a common factor in several neurodegenerative disorders including Human Spastic Paraplegia (HSP). Mutations in the gene SPAST (SPG4) encoding for the protein spastin account for 40% of the familial and approximately 20% of the sporadic cases within autosomal dominant HSP. This pathology is characterized mainly by a progressive degeneration of first motor neuron. By cleaving microtubules, spastin regulates several cellular processes depending on microtubule dynamics included intracellular membrane traffic. Axonal transport is essential for the stability and viability of motor neurons which have the longest axon and thus require an efficient transport of organelles, cytoskeletal components, and lipid constituents from the cell body to periphery. Although the data published up to now, suggested that spastin regulates axonal traffic there is no definitive information to document whether it might regulate traffic of specific membrane compartment implicated in axonal growth. The vesicular Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment Receptor (v-SNAREs) VAMP7/TI-VAMP was shown to play important role for axonogenesis and axonal and dendritic growth in cultured neurons. VAMP7 has been also related to other HSP genes such as the molecular motor Kif5A (SPG10) and the cell-cell adhesion molecule L1-CAM (SPG1). Particularly, the interaction with Kif5A allows VAMP7- positive secretory

vesicles formed in the somatic Golgi-apparatus to move along microtubules tracks from cell center to periphery. Here we showed that in cortical neurons from SPG4-KO mice the anterograde velocity of VAMP7 compartment, but not mitochondria, is increased. We demonstrated that this effect is related to an unbalanced ratio between acetylated and tyrosinated tubulin in SPG4-KO neurons which suggest an increased stability of microtubules network. Indeed, drug treatments inducing an increased level of acetylated tubulin mimicked the effect of lacking of spastin on VAMP7 axonal dynamics but also increased its retrograde velocity. Furthermore, in order to unravel the molecular mechanisms by which microtubules targeting drugs rescue/prevent axonal swelling that is the prominent axonal abnormality observed in human patients and mouse or human SPAST/SPG4 neuronal models, we investigated the combinatory effects of drug treatments and SPG4-KO on VAMP7 and microtubule dynamics.

## Zusammenfassung 17

### Einblick in die Membran-Verkehr und die Dynamik der Mikrotubuli in SPG4-KO Neuronen (Vortrag)

*Clement PLAUD1, Vandana JOSHI1, Marinello martina1, Thierry GALLI2, David PASTRE1, Patrick CURMI1 und Andrea BURGO1 1 Struktur und Aktivität normaler und pathologischer Biomoleküle, INSERM U1204, Universität von Evry, Frankreich. 2 Inserm U950 URL, Institut Jacques Monod, Frankreich*

Änderung des axonalen Transport hat sich als gemeinsamer Faktor bei mehreren neurodegenerativen Erkrankungen einschließlich Menschen Spastische Paraplegie (HSP) entstanden. Mutationen im Gen SPAST (SPG4) Codierung für das Protein Spastin Konto für 40% der familiären und etwa 20% der sporadischen Fälle innerhalb von autosomal-dominanten HSP. Diese Pathologie ist hauptsächlich durch eine fortschreitende Degeneration der ersten Motoneuron charakterisiert. Durch die Spaltung von Mikrotubuli, reguliert Spastin mehrere zelluläre Prozesse je nach Dynamik der Mikrotubuli enthalten intrazellulären Membranverkehr. Axonalen Transport ist von wesentlicher Bedeutung für die Stabilität und die Lebensfähigkeit von motorischen Neuronen, die die längste Axon haben und somit einen effizienten Transport von Organellen, Zytoskelett-Komponenten und Lipid-Bestandteile aus dem Zellkörper zur Peripherie erfordern. Obwohl die Daten jetzt veröffentlicht worden sind, vorgeschlagen, dass Spastin axonalen Verkehr regelt es keine definitive Informationen zu dokumentieren, ob es könnte Verkehr von spezifischen Membranraum in axonalen Wachstum verwickelt zu regulieren. Die vesikuläre Lösliche N-Ethylmaleimid empfindlichen Faktor Attachment Receptor (v-SNAREs) VAMP7 / TI-VAMP wurde gezeigt wichtige Rolle für axonogenesis und axonalen und dendritischen Wachstum in kultivierten Neuronen zu spielen. VAMP7 wurde im Zusammenhang auch auf andere HSP-Gene wie der molekulare Motor KIF5A (SPG10) und der Zell-Zell-Adhäsionsmolekül L1-CAM (SPG1). Insbesondere ermöglicht die Interaktion mit KIF5A VAMP7- positive Sekretvesikel in der somatischen Golgi-Apparat gebildet entlang von Mikrotubuli Spuren von Zell Zentrum zur Peripherie zu bewegen. Hier haben wir gezeigt, dass in kortikalen Neuronen von SPG4-KO-Mäusen die anterograde Geschwindigkeit von VAMP7 Fach, aber nicht die Mitochondrien erhöht wird. Wir haben gezeigt, dass dieser Effekt zu einem unausgeglichene Verhältnis zwischen acetyliert und tyrosinierten Tubulin in SPG4-KO Neuronen, die eine erhöhte Stabilität der Mikrotubuli-Netzwerk legen nahe verwandt ist. Tatsächlich medikamentöser Behandlung ein erhöhtes Maß an acetyliertes Tubulin induzieren nachgeahmt die Wirkung von auf VAMP7 axonalen Dynamik Spastin fehlt, sondern auch seine



rückläufige Geschwindigkeit erhöht. Darüber hinaus, um die molekularen Mechanismen, durch die Mikrotubuli Targeting Drogen Rettung / verhindern axonalen Schwellungen zu entwirren, die die prominente axonalen Anomalie bei menschlichen Patienten und Maus oder Mensch SPAST / SPG4 neuronale Modelle beobachtet wird, untersuchten wir die kombinatorischen Effekte der medikamentösen Behandlungen und SPG4- KO auf VAMP7 und die Dynamik der Mikrotubuli.

---

## Abstract 20

### Israeli hereditary spastic paraplegia (hsp) database.

A. Lossos (1), V. Meiner (2), I. Lerer (2). Departments of Neurology (1) and Genetics and Metabolic Diseases (2), Hebrew University-Hadassah Medical Center, Jerusalem.

**Background:** HSP is a clinically and genetically heterogeneous group of pure and complex forms with multiple reported loci and identified autosomal dominant (AD) and recessive (AR) genes. Because molecular characterization of HSP may yield efficient local diagnostic strategy, identify demographic clustering, and enable phenotype-genotype correlation, we have established an SPATAX-coordinated clinical and molecular HSP database in 2005.

**Methods:** 75 non-related centrally ascertained Israeli HSP pedigrees of various ethnic backgrounds currently form the database. Genotyping was performed on genomic DNA, and genome-wide homozygosity mapping and whole-exome sequencing were performed when indicated. Functional cell biological and subcellular studies were performed as appropriate for characterization of functional defects and their effects.

**Results:** The apparent mode of inheritance is AD in 18 families and AR in 49. As expected, AD-HSPs mainly present with early-onset pure clinical phenotype, whereas AR-HSPs usually manifest additional neurological features. In addition to the common AD and AR diagnoses in 29 pedigrees with SPG4, SPG3A, SPG11, SPG7, SPG15 and SPG35-related disorders, we have participated in identification of several rare, unique or new diagnoses. Responsible genes in these instances are involved in cytoplasmic organelle and mitochondrial function, axonal transport, and myelin metabolism.

**Conclusions:** We present the clinical and molecular findings in the largest Israeli HSP cohort. Despite apparent referral bias, the observed increased frequency of AR-HSP forms (65%) seems important and may be related to the common local preference of parental consanguinity. However, the relative proportion of the main AD forms grossly resembles their worldwide distribution. The new molecular methodology enhances identification of novel genes, provides accurate genetic counseling, and enables better understanding of the pathophysiology of HSP.

## Zusammenfassung 20

### Israeli Spastische Paraplegie (HSP) Datenbank.

A. Lossos (1), V. Meiner (2), I. Lerer (2). Kliniken für Neurologie (1) und Genetik und Stoffwechselkrankheiten (2), Hebrew University-Hadassah Medical Center in Jerusalem.

**Hintergrund:** HSP ist eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe von reinen und komplexen Formen mit mehreren Loci berichtet und identifiziert autosomal dominant (AD) und rezessive (AR) Gene. Da die molekulare Charakterisierung von HSP ergeben können effiziente lokale Diagnosestrategie identifizieren demografische Clustering und ermöglichen Korrelation Phänotyp-Genotyp haben wir einen SPATAX koordinierte klinische und molekulare HSP-Datenbank im Jahr 2005 gegründet.

**Methoden:** 75 nicht-verwandten zentral israelischen HSP Abstammungen verschiedener ethnischer Herkunft aktuell ermittelten bilden die Datenbasis. Die Genotypisierung wurde an genomischer DNA durchgeführt, und genomweite homozygotie Mapping und Voll Exoms Sequenzierung wurden, als angegeben ausgeführt. Funktionelle zellbiologische und subzellulärer Studien wurden als geeignet für die Charakterisierung von Funktionsstörungen und ihre Auswirkungen durchgeführt.

**Ergebnisse:** Die scheinbare Art der Vererbung ist AD in 18 Familien und AR in 49. Wie erwartet, AD-HSPs liegt vorwiegend mit früh einsetzender rein klinischen Phänotyp, während AR-HSPs in der Regel manifestieren zusätzliche neurologische Funktionen. Neben dem gemeinsamen AD und AR-Diagnosen in 29 Abstammungen mit SPG4, SPG3A, SPG11, SPG7, SPG15 und SPG35-bedingten Erkrankungen, haben wir bei der Identifizierung von mehreren seltenen, einzigartigen oder neuen Diagnosen teilgenommen. Verantwortlich Gene in diesen Fällen sind in zytoplasmatischen Organell und die Funktion der Mitochondrien, axonalen Transport und Myelin-Stoffwechsel beteiligt.

**Schlussfolgerungen:** Wir präsentieren die klinischen und molekularen Befunde in der größten Kohorte israelischen HSP. Trotz offensichtlich Befassung Bias, die beobachtete erhöhte Häufigkeit von AR-HSP Formen (65%) scheint wichtig und kann auf die gemeinsame lokale Präferenz der elterlichen Blutsverwandtschaft in Beziehung gesetzt werden. Allerdings ähnelt der relative Anteil der Haupt AD Formen grob ihre weltweiten Vertrieb. Die neue molekulare Methode verbessert die Identifizierung neuer Gene, liefert genaue genetische Beratung und ermöglicht ein besseres Verständnis der Pathophysiologie von HSP.

## Abstract 24

### CYP2U1 mutations in SPG56 inhibit arachidonic acid pathway (Oral presentation)

C.M. Durand<sup>1</sup>, L. Dhers<sup>2</sup>, C. Tesson<sup>3</sup>, L. Fouillen<sup>4</sup>, S. Jacquéré<sup>1</sup>, C. Pujol<sup>5</sup>, F. Darios<sup>5</sup>, G. Benard<sup>1</sup>, Raymond L<sup>5</sup>, El-HachimiKalid H<sup>5</sup>, D. Lacombe<sup>1</sup>, A. Durr<sup>5</sup>, F. Santorelli<sup>6</sup>, J.L. Boucher<sup>2</sup>, N. Pietrancoste<sup>2</sup>, D. Mansuy<sup>2</sup>, G. Stevanin<sup>3</sup>, C. Goizet<sup>1</sup>, I. Coupry<sup>1</sup>

Hereditary Spastic Paraplegias (HSPs) are a group of rare inherited disorders characterized by gradual spasticity and weakness of the lower limbs. These defects are the consequence of the retrograde degeneration of the cortico-spinal tracts. The pyramidal syndrome can occur alone in pure forms of HSP or associated with other neurological or extra neurological signs in complex forms. HSPs are transmitted according to all modes of inheritance and more than 70 genes have been identified. Genetic studies have identified key cell functions, vital for maintaining neuronal homeostasis in HSP. Abnormal membrane trafficking, axonal guidance and primary myelin abnormality, axonal transport, lipid metabolism and mitochondrial dysfunction have been recognized as some of the major pathophysiological mechanisms involved. 31 SPG56 is a rare autosomal recessive early onset complicated form of HSP caused by mutation in CYP2U1 gene. CYP2U1 is a cytochrome P450 family 2 member which plays an important role in modulating the arachidonic acid (AA) signaling pathway and in the metabolism of long chain fatty acids. CYP2U1 metabolizes AA into two bioactive metabolites 19- and 20-HETE. We identified several patients carrying either homozygous truncating mutation (p.L21Wfs\*191), and missense variations (p.D316V1; p.E380G1 and p.C490Y2), or compound heterozygous (p.C262R associated to p.R488W and c.1288+1G>A associated to p.G115S and p.R384I2). To determine the functional impact of missense variations on CYP2U1 ability to metabolize arachidonic acid, mutated and wild type transcripts of CYP2U1 were transiently overexpressed in HEK293 cells. The CYP2U1 dependent metabolism of arachidonic acid was measured by incubating protein extracts from transfected cells with arachidonic acid (AA; 0 to 7  $\mu$ M) and analyzed by LC-MS. CYP2U1L21Wfs\*19, CYP2U1G115S, CYP2U1D316V, CYP2U1C490Y, CYP2U1R488W, and CYP2U1C262R variants revealed no activity, suggesting a loss of function. Moreover, the UV-vis difference spectrum of lysate from HEK cells expressing CYP2U1WT showed a peak at 450 nm characteristic of the presence of a cytochrome P450 FeII-CO complex. Interestingly, no significant peak at 450 nm could be detected from HEK cells expressing those variations. Finally, the location of each variation was determined in 3D CYP2U1 model and the variations' effect on protein stability was evaluated. CYP2U1 mutants that have been related to HSP affect protein conformation or AA docking or heme binding. Variations p.R384I and p.E380G do not significantly modify the protein stability and its ability to correctly bind heme and to hydroxylate AA. They should be considered as polymorphisms.

In conclusion, using several approaches we could demonstrate that among the 9 variations observed in SPG56 patients all except two (p.R384I and p.E380G) drastically affected CYP2U1 enzymatic activity and inhibited AA metabolism. During this work, we have developed an in vitro assay to determine the functional significance of non-synonymous variations. 1. C. Tesson et al., *Am J Hum Genet* 91, 1051 (Dec 7, 2012). 2. Unpublished data

## Zusammenfassung 24

### CYP2U1 Mutationen in SPG56 hemmen Arachidonsäureweg (Vortrag)

CM. Durand<sup>1</sup>, L. Dhers<sup>2</sup>, C. Tesson<sup>3</sup>, L. Fouillen<sup>4</sup>, S. Jacqueré<sup>1</sup>, C. Pujol<sup>5</sup>, F. Darios<sup>5</sup>, G. Benard<sup>1</sup>, Raymond L5, El-HachimiKalid H5, D. Lacombe<sup>1</sup>, A. Durr<sup>5</sup>, F. Santorelli<sup>6</sup>, JL Boucher<sup>2</sup>, N. Pietrancoste<sup>2</sup>, D. Mansuy<sup>2</sup>, G. Stevanin<sup>3</sup>, C. Goizet<sup>1</sup>, I. Coupry<sup>1</sup>

Hereditäre Spastische Paraplegie (HSP) sind eine Gruppe von seltenen Erbkrankheiten durch allmähliche Spastik und Schwäche der unteren Extremitäten gekennzeichnet. Diese Defekte sind die Folge der retrograden Degeneration der cortico-spinalen Bahnen. Das pyramiden Syndrom kann allein in reinen Formen der HSP auftreten oder mit anderen neurologischen oder zusätzliche neurologische Symptome in komplexen Formen verbunden. HSPs werden nach allen Erbgänge übertragen und mehr als 70 Gene wurden identifiziert. Genetische Studien haben Schlüsselzellfunktionen identifiziert, von entscheidender Bedeutung für die neuronale Homöostase in HSP zu halten. Abnormal Membran Handel, axonalen Führung und primäre Myelin Anomalie, axonalen Transport, den Fettstoffwechsel und mitochondriale Dysfunktion wurden als einige der wichtigsten pathophysiologischen Mechanismen erkannt. 31 SPG56 ist eine seltene autosomal-rezessiv früh einsetzende komplizierte Form von HSP, verursacht durch Mutationen im Gen CYP2U1. CYP2U1 ist ein Cytochrom P450-Familie 2 Element, das bei der Modulation der Arachidonsäure (AA) Signalweg und im Stoffwechsel von langkettigen Fettsäuren eine wichtige Rolle spielt. CYP2U1 metabolisiert AA in zwei bioaktiven Metaboliten 19- und 20-HETE. Wir identifizierten mehrere Patienten, die entweder homozygot Abschneide Mutation trägt (p.L21Wfs \* 191), und Missense-Varianten (p.D316V1; p.E380G1 und p.C490Y2) oder heterozygot (p.C262R zu p.R488W und c.1288 assoziiert + 1G> A zugeordnet p.G115S und p.R384I2). Um die funktionelle Bedeutung von Missense-Variationen auf CYP2U1 Fähigkeit bestimmen, Arachidonsäure metabolisiert, mutierten und Wildtyp-Transkripte von CYP2U1 wurden transient überexprimiert in HEK293-Zellen. (; 0-7 uM AA) und analysiert durch LC-MS die CYP2U1 abhängigen Metabolismus von Arachidonsäure wurde durch Inkubieren von Proteinextrakten aus transfizierten Zellen, die mit Arachidonsäure gemessen. CYP2U1L21Wfs \* 19, ergab CYP2U1G115S, CYP2U1D316V, CYP2U1C490Y, CYP2U1R488W und CYP2U1C262R Varianten keine Aktivität, einen Verlust der Funktion hindeutet. Darüber hinaus zeigte die UV-vis-Differenzspektrum von Lysat von HEK-Zellen exprimieren CYP2U1WT einen Peak bei 450 nm charakteristisch für die Anwesenheit eines Cytochrom P450 Fell -CO-Komplex. Interessanterweise konnten keine signifikanten Peak bei 450 nm aus HEK-Zellen nachgewiesen werden, um diese Variationen exprimieren. Schließlich wurde die Lage der einzelnen Variation bestimmt in 3D CYP2U1 Modell und auf die Auswirkungen der Veränderungen auf die Proteinstabilität bewertet. CYP2U1 Mutanten, die HSP beeinflussen Proteinkonformation oder AA Andocken oder Häm-Bindung im Zusammenhang wurden. Variationen p.R384I und p.E380G nicht ändern signifikant die Proteinstabilität und seine Fähigkeit, Häm richtig binden und AA zu hydroxylieren. Sie sollten als Polymorphismen in Betracht gezogen werden.

Abschließend einige Ansätze könnten wir, dass unter den neun Variationen der SPG56 Patienten beobachtet zeigen alle außer zwei (p.R384I und p.E380G) drastisch beeinträchtigt CYP2U1 enzymatische Aktivität und gehemmt AA-Stoffwechsel. In dieser Arbeit haben wir ein in-vitro-Test zur Bestimmung der funktionellen Bedeutung von nicht auch Variationen entwickelt. 1. C. Tesson et al., Am J Hum Genet 91, 1051 (7. Dezember 2012). 2. Nicht veröffentlichte Daten

---

## Abstract 25

### Mutant forms of beta-glucosidase 2 (GBA2) associated with SPG46 are enzymatically inactive and abnormally structured (Poster session I)

*Saki Sultanaa, Douglas B Vieirab, Jennifer Reichbauerc, Matthias Synofzickd, Fanny Mochele,f,g, Giovanni Stevanine, f,h, Rebecca Schülec,d,i, and Aarnoud C van der Spoela, b a Department of Biochemistry & Molecular Biology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia B3H 4R2, Canada b Atlantic Research Centre, Departments of Pediatrics, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia B3H 4R2, Canada c Centre for Neurology and Hertie Institute for Clinical Brain Research, Eberhard-Karls-University, G-72074, Tübingen, Germany d German Centre of Neurodegenerative Diseases (DZNE), Eberhard-Karls-University, G-72074, Tübingen, Germany eINSERM U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR\_S\_1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, F-75013, Paris, France f APHP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Département de Génétique, F-75013, Paris, France g University Pierre and Marie Curie, Neurometabolic Clinical Research Group, F-75013, Paris, France h Ecole Pratique des Hautes Etudes, F-75014, Paris, France i Dr John T. Macdonald Foundation Department of Human Genetics and John P. Hussman Institute for Human Genomics, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL 33136, USA.*

SPG46 is a recessive neurological condition with early onset (age 1-20), presenting with a combination of cerebellar ataxia and spastic paraplegia, cerebellar and cerebral atrophy, thin corpus callosum, axonal neuropathy, and cognitive impairment. SPG46 is associated with nonsense, missense, and frameshift mutations in the GBA2 gene, which codes for - glucosidase 2, an enzyme involved in sphingolipid metabolism. The substrate of GBA2 is glucosylceramide, a membrane lipid made up of glucose and the hydrophobic compound ceramide. GBA2 cleaves glucosylceramide into glucose and ceramide, and is localized at the plasma membrane and endoplasmic reticulum. Recently, it was reported that GBA2 also can transfer glucose to cholesterol, producing glucosyl- $\beta$ -D-cholesterol. Currently very little is known about the involvement of GBA2, its substrate, or products, in muscle tone and motor control of the legs or additional roles in the central nervous system.

For a first assessment of the consequences of SPG46-associated GBA2 mutations, we transfected cultured cells with GBA2 cDNAs encoding five nonsense (Tyr121\*, Trp173\*, Arg234\*, Arg340\* and Arg870\*) and five missense mutants (Phe419Val, Asp594His, Arg630Trp, Gly683Arg, and Arg873His). Although the mutant forms of GBA2 were expressed at different levels, none of them raised the GBA2 activity of transfected cells above background, indicating that all ten mutants are enzymatically inactive [1]. In addition, whereas control lymphoblasts displayed a range of GBA2 activities, we found that lymphoblasts homozygous for the Arg340\* and Arg630Trp mutations had nearly undetectable GBA2 activities. Further, compared to wild-type GBA2, the GBA2 mutants migrated very differently on native protein gels, indicating that these mutants had different conformations compared to the wild-type protein. These findings provide the first insights in the biochemical basis of the complex pathology seen in SPG46 patients.

[1] Sultana S, Reichbauer J, Schüle R, Mochele F, Synofzik M, van der Spoel AC (2015). Lack of enzyme activity in GBA2 mutants associated with hereditary spastic paraplegia/cerebellar ataxia (SPG46). *Biochem Biophys Res Commun* 465: 35-40.

## Zusammenfassung 25

### Mutierte Formen von Beta-Glucosidase 2 (GBA2) im Zusammenhang mit SPG46 sind enzymatisch inaktiv und abnorm strukturierten (Poster Session I)

*Saki Sultanaa, Douglas B Vieirab, Jennifer Reichbauerc, Matthias Synofzick, d, Fanny Mochele, f, g, Giovanni Stevanine, f, h, Rebecca Schüle, d, i und Aarnoud C van der Spoela, ba Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia B3H 4R2, Kanada b Atlantic Research Centre, Departments of Pediatrics, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia B3H 4R2, Kanada c Zentrum für Neurologie und Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Eberhard-Karls-Universität, G-72074, Tübingen, Deutschland d Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), Eberhard-Karls-Universität, G-72074, Tübingen, Deutschland eINSERM U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMRS\_1127, Institut du cerveau et de la Moelle épinière, F-75013, Paris, Frankreich f APHP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Département de Génétique, F-75013, Paris, Frankreich g Universität Pierre und Marie Curie, Neuro Clinical Research Group, F-75013, Paris, Frankreich h Ecole Pratique des Hautes Etudes, F-75014 Paris, Frankreich i Dr. John T. Macdonald Stiftung Institut für Humangenetik und John P. Hussman Institut für Human Genomics, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL 33136, USA.*

SPG46 ist eine rezessiv neurologische Erkrankung mit frühem Beginn (Alter 1-20), mit einer Kombination aus Ataxie präsentiert und spastische Paraplegie, des Kleinhirns und Hirnatrophie, dünnes Corpus callosum, axonalen Neuropathie und kognitive Beeinträchtigung. SPG46 mit Unsinn, Missense verbunden sind, und Frameshift-Mutationen im GBA2 Gen, das für - Glucosidase 2, ein Enzym in Sphingolipidstoffwechsels beteiligt. Das Substrat von GBA2 ist glucosylceramide, ein Membranlipid besteht aus Glukose und der hydrophoben Verbindung Ceramid. GBA2 spaltet Glucosylceramid in Glucose und Ceramid, und wird an der Plasmamembran und endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Vor kurzem wurde es auch, dass GBA2 berichtet können 32 Transfer Glukose Cholesterin, die Herstellung von Glucosyl- $\beta$ -D-Cholesterin. Derzeit sehr wenig über die Beteiligung der GBA2, ihr Substrat, oder Produkte bekannt ist, in den Muskeltonus und Motorsteuerung der Beine oder weitere Rollen im zentralen Nervensystem.

Für eine erste Einschätzung der Folgen von SPG46-assoziierten GBA2 Mutationen, transfizierten wir kultivierten Zellen mit GBA2 cDNAs fünf Unsinn (Tyr121 \*, Trp173 \*, Arg234 \*, Arg340 \* und Arg870 \*) und fünf Missense-Mutanten (Phe419Val, Asp594His, Arg630Trp, Gly683Arg und Arg873His). Obwohl die mutierte Formen von GBA2 auf unterschiedlichen Niveaus exprimiert wurden, keiner von ihnen angehoben, welche die Aktivität von GBA2 transfizierten Zellen über dem Hintergrund, dass alle zehn Mutanten enzymatisch aktiv sind [1]. Zusätzlich, während Steuer Lymphblasten eine Reihe von GBA2 Aktivitäten angezeigt wird, fanden wir, dass Lymphblasten homozygot für das Arg340 \* und Arg630Trp Mutationen fast nicht nachweisbar GBA2 Aktivitäten hatten. Weiterhin im Vergleich zum Wildtyp GBA2 wanderten die GBA2 Mutanten sehr unterschiedlich auf native Protein-Gele, was darauf hinweist, dass diese Mutanten mit dem Wildtyp-Protein im Vergleich unterschiedliche Konformationen hatte. Diese Ergebnisse liefern die ersten Einblicke in die biochemischen Grundlagen der komplexen Pathologie in SPG46 Patienten beobachtet.

[1] Sultana S, Reichbauer J, Schüle R, Mochel F, Synofzik M, van der Spoel AC (2015). Der Mangel an Enzymaktivität in GBA2 Mutanten im Zusammenhang mit Spastische Paraplegie / Ataxie (SPG46). *Biochem.Biophys.Res.Commun* 465: 35-40.

## Abstract 30

### Results of Three On-line Surveys for People with HSP (Poster session I)

*Adam Lawrence, CEng.*

Diagnosed with HSP in 2009. This poster summarises results of three on-line surveys undertaken in 2013, 2014 and 2015 for people with HSP, and reported on Rare Disease Day the following year. The surveys were advertised and reported on my HSP blog <http://hspjourney.blogspot.co.uk/>, in various HSP social media groups/channels and notified to various HSP support groups. The surveys each had around 100 respondents predominantly from the USA and the UK, but also Europe, Australia and other places. For full details: <http://hspjourney.blogspot.co.uk/p/my-on-line-resarch.html> 2013: Mobility, Symptoms, Resources and Mis-diagnoses An analysis was undertaken between respondents' mobility levels and the number of other symptoms they have from the list: bladder problems, bowel problems, back pain, fatigue, stress, depression, clonus, pes cavus, numbness, stiffness when it is cold, loss of vibration sensitivity in legs, hammer toes, loss of balance.

Those who can walk unaided tend to have 4-5 minor symptoms, up to three moderate symptoms and no major symptoms. All respondents in this group had at least three symptoms, at least two of which were minor. 36 Those who use mobility aids some of the time tend to have 4-5 minor symptoms, up to three moderate symptoms and up to one major symptom. All of the respondents in this group had at least five symptoms, at least one of which was minor.

Those who use mobility aids all or most of the time tend to have 2-5 minor symptoms, up to 5 moderate symptoms and up to 5 major symptoms. All of the respondents in this group had at least 7 symptoms.

One fifth of respondents indicated that they had been correctly diagnosed with HSP the first time. The most frequent misdiagnoses were; Multiple Sclerosis, Cerebral Palsy, Arthritis and Charcot-Marie-Tooth disease.

#### **2014: Medication, Diet, Exercise and Relaxation**

The results showed that around three quarters of people are prescribed at least one form of medication for their HSP. Of those who do not take medication around half indicated that they have never been on medication for HSP with the others having previously been prescribed at least one medication, but no longer take any either because of side effects, because the medication was not effective or a combination of both. Medication is most commonly taken for Spasticity, Pain, Bladder, Spasms, Depression and Nerve Pain. Respondents indicated their medications, their perceptions of the benefits and any side effects. Almost half of the medication being taken is used to treat spasticity and spasms. The biggest proportion of this group of medications comprises people taking Baclofen (half of people). Other spasticity/spasm medications, with at least 5 respondents taking are: Botulinum toxin A / Botox / OnabotulinumtoxinA, Diazepam and Tizanidine / Zanaflex. One third of all medication being taken is for pain, ranging from over-the-counter medicines like paracetamol through to strong opioid medication like morphine. There is little published research to support the use of many of the medications used for treatment of HSP.

### **2015: Modifications at Home, Depression and Quality of Life**

Respondents indicated that there is a wide range of modifications that they have made around their properties. Modifications tend to be made after an accident or after noticing a change in mobility/symptoms, although some people are making modifications early and are planning for future changes. Frequently, the first modifications made are the installation of grab rails within the property, and these are often fitted in the bathroom first. Subsequent modifications are made depending on the rate of progression of HSP. The parts of properties which are modified the most after the inclusion of grab rails are the bathroom/toilet with a range of different modifications made. Adjustments to beds are also relatively common. Respondents indicated the benefits from the different modifications they had made. People with HSP appear to suffer from depression more than the general population. Respondents completed the PHQ-2 depression screening questionnaire, which showed that around a quarter should seek further assessment. Results have been compared with the 2009 Estonian study into depression with HSP, and a similar proportion of people with scores of zero, indicating no depression, is shown.

Respondents also completed a sample of questions from the Patients Like Me Quality of Life survey and it is concluded that HSP appears to affect quality of life. From the data there appears to be two step changes in quality of life. The first step change is in social functioning at the point when mobility aids are needed and the second step change is in physical functioning when mobility aids need to be relied on most or all of the time.

## **Zusammenfassung 30**

### **Ergebnisse für Menschen mit HSP On-line-Umfragen Drei (Poster Session I)**

Adam Lawrence, CEng.

Diagnostiziert mit HSP 2009 Dieses Plakat fasst die Ergebnisse von drei on-line durchgeführten Erhebungen im Jahr 2013, 2014 und 2015 für Menschen mit HSP, und berichtete über Tag der Seltenen Krankheit im nächsten Jahr. Die Erhebungen wurden ausgeschrieben und berichtete über meine HSP Blog <http://hspjourney.blogspot.co.uk/>, in verschiedenen HSP Social-Media-Gruppen / Kanäle und an verschiedene HSP Selbsthilfegruppen informiert. Die Umfragen hatten jeweils rund 100 Befragten überwiegend aus den USA und Großbritannien, aber auch Europa, Australien und anderen Orten. Ausführliche Informationen für: <http://hspjourney.blogspot.co.uk/p/my-on-line-resarch.html>  
2013: Mobilität, Symptome, Ressourcen und Mis-Diagnosen ergab eine Analyse zwischen Befragten Mobilitätsgrade und die Zahl unternommen andere Symptome, die sie aus der Liste: Blasenprobleme, Darmprobleme, Rückenschmerzen, Müdigkeit, Stress, Depressionen, Klonus, Hohlfuß, Taubheit, Steifheit, wenn es kalt ist, Verlust der Vibrationsempfindlichkeit in den Beinen, Hammerzehen, Verlust des Gleichgewichts .

Diejenigen, die ohne Hilfe gehen neigen 4-5 leichte Symptome zu haben, bis zu drei moderate Symptome und keine größeren Beschwerden. Alle Befragten in dieser Gruppe hatte mindestens drei Symptome, mindestens zwei davon Moll waren. Die 36, die Mobilität nutzen unterstützt einen Teil der Zeit sind in der Regel 4-5 leichte Symptome zu haben, bis zu drei moderate Symptome und bis zu



einem Hauptsymptom. Alle Antwortenden in dieser Gruppe mindestens fünf Symptome hatten, mindestens eine davon gering war.

Diejenigen, die Mobilität nutzen unterstützt alle oder die meisten der Zeit, sind in der Regel 2-5 kleinere Symptome haben, bis zu 5 moderate Symptome und bis zu 5 wichtigsten Symptome. Alle der Befragten in dieser Gruppe mindestens 7 Symptome hatte.

Ein Fünftel der Befragten gaben an, dass sie mit HSP richtig diagnostiziert das erste Mal war. Die häufigsten Fehldiagnosen waren; Multiple Sklerose, Zerebralparese, Arthritis und Charcot-Marie-Tooth-Krankheit.

### **2014: Medikation, Ernährung, Bewegung und Entspannung**

Die Ergebnisse zeigten, dass rund drei Viertel der Menschen mindestens eine Form von Medikamenten für ihre HSP vorgeschrieben. Von denen, die Medikamente nicht nehmen etwa die Hälfte an, dass sie noch nie für HSP auf Medikamente gewesen mit den anderen zuvor mindestens ein Medikament verschrieben wurde, aber nicht mehr nehmen Sie entweder wegen der Nebenwirkungen, weil das Medikament nicht wirksam oder war Kombination von beiden. Medikamente werden am häufigsten genommen für Spastik, Schmerz, Blasen, Krämpfe, Depressionen und Nervenschmerzen. Die Befragten gaben an, ihre Medikamente, ihre Wahrnehmungen über die Vorteile und Nebenwirkungen. Fast die Hälfte der Medikamente werden verwendet, genommen Spastik und Spasmen. Der größte Teil dieser Gruppe von Medikamenten umfasst Menschen Baclofen (die Hälfte der Menschen) nehmen. Andere Spastizität / Spasmus Medikamente, mit mindestens 5 Befragten einnehmen: Botulinum-Toxin A / Botox / OnabotulinumtoxinA, Diazepam und Tizanidin / Zanaflex. Ein Drittel aller Medikamente genommen werden, ist für die Schmerzen, die von Over-the-counter Medikamente wie Paracetamol durch zu starkes Opioid Medikamente wie Morphin. Es gibt wenig veröffentlichte Forschungs die Verwendung von vielen der Medikamente für die Behandlung von HSP verwendet zu unterstützen.

### **2015: Änderungen zu Hause, Depression und Lebensqualität**

Gaben an, dass es eine Vielzahl von Modifikationen ist, dass sie um ihre Eigenschaften gemacht. Änderungen sind in der Regel nach einem Unfall gemacht werden oder nach einer Änderung der Mobilität / Symptome bemerken, obwohl einige Leute machen Änderungen frühzeitig und sind für zukünftige Änderungen der Planung. Häufig machten die ersten Modifikationen sind der Einbau von Haltegriffe in der Eigenschaft, und diese sind oft im Badezimmer zuerst ausgestattet. Nachträgliche Änderungen sind in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Fortschreitens von HSP gemacht. Die Teile der Eigenschaften, die die meisten nach der Aufnahme von Haltegriffen verändert werden, sind das Bad / WC mit einer Reihe von verschiedenen Modifikationen vorgenommen. Anpassungen Betten sind auch relativ häufig. Die Befragten gaben an, die Vorteile aus den verschiedenen Modifikationen sie gemacht hatten. Menschen mit HSP erscheinen unter Depressionen mehr als die allgemeine Bevölkerung zu leiden. Die Befragten schloss die PHQ-2 Depression Fragebogen Screening, das die weitere Beurteilung rund ein Viertel zeigte suchen sollte. Die Ergebnisse haben mit 2009 Estonian

Studie in die Depression mit HSP, und ein ähnlicher Anteil von Menschen mit Noten von Null, was keine Depression verglichen wurde, wird gezeigt.

Die Befragten schloss zudem eine Stichprobe von Fragen der Patienten Like Me Erhebung zur Lebensqualität und wird der Schluss gezogen, dass HSP Lebensqualität zu beeinflussen scheint. Aus den Daten erscheint in der Lebensqualität zweistufigen Veränderungen. Der erste Schritt ist Veränderung in der sozialen Funktion zu dem Zeitpunkt, Mobilitätshilfen benötigt werden, und der zweite Schritt Änderung ist in der physikalischen Funktion, wenn Mobilitätshilfen auf die meisten oder alle der Zeit verlassen werden müssen.

---

## Abstract 31

### **A patient-derived stem cell model of Hereditary Spastic Paraplegia: Organelle trafficking impairment, oxidative stress and their rescue (Oral presentation)**

*Gautam Wali, Ratneswary Sutharsan, Nicholas F Blair, Ariadna Recasens, Youngjun Fan, Romal Stewart, Johana Tello, Denis I. Crane, Carolyn M Sue, Alan Mackay-Sim 37*

**Objective:** Hereditary spastic paraplegia (HSP) is an inherited neurological disorder characterised by degeneration of long axons along the corticospinal tract, leading to lower limb spasticity and gait abnormalities. Mutations in the SPAST gene account for the largest group of adult-onset HSP patients. SPAST encodes for spastin, a microtubule severing protein.

**Methods:** In olfactory neurosphere derived (ONS) cells from SPAST HSP patients; we investigated microtubule-dependent peroxisome movement using time-lapse imaging and automated image analysis. We also investigated oxidative stress and vulnerability to hydrogen peroxide.

**Results:** The peroxisome transport in patient cells is deficient with the average speed of peroxisome transport lower in patient ONS cells compared to control ONS cells. Our observations show that this defect is specific to the peroxisome transport dependent on microtubules. We suggest that the reduced levels of stabilised microtubules in patient cells leads to reduction in the availability of stabilised microtubules upon which peroxisomes can travel. In addition, when the number of stabilised microtubules in patient ONS cells was restored with microtubule-binding drugs, peroxisome trafficking average speeds in patient ONS cells returned to control ONS cell levels. Patient ONS cells were under oxidative stress and were also more sensitive to hydrogen peroxide, which is exclusively metabolised by peroxisomes. Finally, we show that low doses of epothilone D (2nM), a tubulin-binding drug that restored the stable microtubules and rescued the peroxisome-trafficking deficit in patient ONS cells also reduced the sensitivity of patient ONS cells to hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide is metabolized by catalase in peroxisomes.

**Discussion:** Our findings suggest mechanism whereby SPAST mutations lead to reduced levels of stable microtubules which compromises peroxisome trafficking and leads to increased oxidative stress. These downstream effects of SPAST mutations may cause a chronic state of oxidative stress in cortical motor neurons and other neurons, which ultimately leads to their degeneration. We are

presently investigating downstream effects of SPAST mutations in patient induced pluripotent stem cell derived neurons.

## Zusammenfassung 31

### Ein Patient abgeleiteten Stammzellmodell Spastische Paraplegie: Organell Handel Beeinträchtigung, oxidativer Stress und ihre Rettung (Vortrag)

*Gautam Wali, Ratneswary Sutharsan, Nicholas F Blair, Ariadna Recasens, Youngjun Fan, Romal Stewart, Johana Tello, Denis I. Kran, Carolyn M Sue, Alan Mackay-Sim 37*

**Ziel:** Hereditäre spastische Paraplegie (HSP) ist eine vererbte neurologische Erkrankung, die durch Degeneration der langen Axonen entlang des Tractus corticospinalis gekennzeichnet, vorlaufende Schenkel Spastik und Gangstörungen zu senken. Mutationen im Gen SPAST Konto für die größte Gruppe von Erwachsenen auftretenden HSP-Patienten. SPAST kodiert für Spastin, ein Mikrotubulus Trennen Protein.

**Methoden:** In Riech Neurosphere abgeleitet (ONS) Zellen aus SPAST HSP-Patienten; untersuchten wir die Mikrotubuli-abhängige Peroxisomen Bewegung Zeitraffer-Bildgebung und automatisierte Bildanalyse. Wir untersuchten auch den oxidativen Stress und die Anfälligkeit für Wasserstoffperoxid.

**Ergebnisse:** Die Peroxisomen-Transport in Patientenzellen ist mangelhaft mit der Durchschnittsgeschwindigkeit von Peroxisomen Transport niedriger bei Patienten ONS-Zellen im Vergleich ONS Zellen zu steuern. Unsere Beobachtungen zeigen, dass dieser Mangel an den Peroxisomen Transport abhängig von Mikrotubuli spezifisch ist. Wir schlagen vor, dass die reduzierte Mengen an stabilisierten Mikrotubuli in Patientenzellen führt in der Verfügbarkeit von stabilisierten Mikrotubuli Reduktion auf der Peroxisomen zu reisen. Zusätzlich wird, wenn die Anzahl der stabilisierten Mikrotubuli in Patienten ONS Zellen mit Mikrotubuli-bindende Arzneistoffe, Peroxisom Handel Durchschnittsgeschwindigkeiten in Patienten ONS Zellen wiederhergestellt wurde zurück ONS Zellspiegel zu kontrollieren. Patient ONS Zellen wurden unter oxidativem Stress und waren auch empfindlicher gegenüber Wasserstoffperoxid, das ausschließlich durch Peroxisomen metabolisiert wird. Schließlich zeigen wir, dass niedrige Dosen von Epothilon D (2 nM), ein tubulinbindende Medikament, das die stabilen Mikrotubuli restauriert und rettete den Peroxisomen-Handel Defizit in der Patienten ONS Zellen auch die Empfindlichkeit von Patienten ONS Zellen zu Wasserstoffperoxid reduziert. Wasserstoffperoxid wird durch Katalase in Peroxisomen metabolisiert.

**Diskussion:** Unsere Ergebnisse legen nahe Mechanismus, mit dem SPAST Mutationen reduzierte Mengen an stabilen Mikrotubuli führen, die Peroxisomen Handel Kompromisse und führt zu einer erhöhten oxidativen Stress. Diese nachgeschaltete Wirkungen SPAST Mutationen können einen chronischen Zustand des oxidativen Stresses in kortikalen motorischen Neuronen und anderen Neuronen verursachen, die schließlich zu ihrer Degeneration führt. Wir untersuchen derzeit nachgelagerten Auswirkungen von SPAST Mutationen in Patienten pluripotenten Stammzellen abgeleiteten Neuronen induziert.

---

## Abstract 37

### In vitro disease modelling of Hereditary Spastic Paraplegia type 11 and 15 (Poster session I)

*PhD Student: Luke Hill Supervisor: Professor Tom Warner University: University College London*

*Institute: Institute of Neurology / Reta Lila Weston Institute of Neurological Studies Department: Department of Molecular Neuroscience*

Mutations in the spastic paraplegia genes SPG11 and SPG15 cause the two most common types of autosomal recessive hereditary spastic paraplegia. Both SPG11 and SPG15 patients exhibit indistinguishable complex phenotypes due to widespread neurodegeneration. However, lower limb paraparesis and other clinical symptoms often occur early on in life, normally around the second decade, implying a developmental dysfunction as well as a neurodegenerative aspect. Given such a phenotype, disease modelling with human induced pluripotent stem cells appears the most suitable form of in vitro study. Using human neurons derived from SPG11 and SPG15 patient iPSC lines my PhD aims to investigate both developmental and neurodegenerative pathophysiology. Furthermore given that patients present with indistinguishable phenotypes and that the protein products of SPG11 and SPG15 are binding partners, both types of HSP may result as a consequence of perturbation of the same cellular process. Therefore, studying both may lead to future therapeutic treatments capable of treating a group of related HSPs.

The field of iPSC research is still developing and has a long way to fulfil its predicted role in disease modelling, drug discovery and cell therapy. Current neuronal differentiation protocols are time consuming, labour intensive and often produce immature (foetal) neurons that are not sub-type specific, making disease modelling difficult. In most complex HSPs layer V corticospinal motor neurons are most susceptible to the disease and often the first neuronal sub-type to present with pathology. Evidently, for effective disease modelling of neurodegenerative disease, generation of pure populations of sub-type specific neurons are required. As a second aim of my PhD I will utilise and apply developmental principles to shorten iPSC derived corticogenesis as well as generate pure populations of the two most susceptible neuronal sub-types in SPG11 and SPG15: layer V corticospinal motor neurons and layer II/ III corticocortical projection neurons.

## Zusammenfassung 37

### In-vitro-Krankheit Modellierung von Spastische Paraplegie Typ 11 und 15 (Poster Session I)

*Doktorand: Luke Hill Betreuer: Professor Tom Warner Universität: University College London*

*Institut: Institut für Neurologie / Reta Lila Weston Institut für Neurologische Studies Department: Institut für Molekulare Neurowissenschaft*

Mutationen in den Genen spastische Paraplegie SPG11 und SPG15 führen die beiden häufigsten Arten von autosomal-rezessiv erbliche spastische Paraplegie. Beide SPG11 und SPG15 Patienten nicht zu unterscheiden komplexer Phänotypen aufgrund der weit verbreiteten Neurodegeneration aufweisen. Allerdings unteren Extremitäten paraparesis und andere klinische Symptome treten häufig schon früh im Leben, in der Regel um das zweite Jahrzehnt, eine Entwicklungsstörung sowie eine neurodegenerative Aspekt impliziert. Bei einer solchen Phänotyp, Krankheitsmodelle mit

menschlichen induzierten pluripotenten Stammzellen scheint die am besten geeignete Form von in-vitro-Studie. Mit menschlichen Neuronen abgeleitet von SPG11 und SPG15 Patienten iPSC Linien meine Doktorarbeit sowohl Entwicklungs- und neurodegenerative Pathophysiologie zu untersuchen soll. Weiterhin da vorliegende Patienten mit ununterscheidbar Phänotypen und dass die Proteinprodukte von SPG11 und SPG15 Partner binden, beide Arten von HSP als Folge der Perturbation des gleichen zellulären Prozesses führen kann. Daher können in der Lage zu zukünftigen therapeutischen Behandlungen führen sowohl das Studium von einer Gruppe von verwandten HSPs zu behandeln.

Das Gebiet der iPSC-Forschung ist noch in der Entwicklung und hat einen langen Weg seiner vorhergesagten Rolle bei Krankheiten Modellierung, Arzneimittelforschung und Zelltherapie zu erfüllen. Aktuelle neuronale Differenzierung Protokolle sind zeitaufwendig, arbeitsintensiv und oft produzieren unreife (fötalen) Neuronen, die nicht Untertyp spezifisch sind, so dass Krankheit Modellierung schwierig. In den meisten komplexen HSPs Schicht V sind corticospinal Motoneuronen besonders anfällig für die Krankheit und oft die ersten neuronalen Subtyps mit der Pathologie zu präsentieren. Offensichtlich sind für eine wirksame Krankheitsmodelle von neurodegenerativen Erkrankung, die Erzeugung von reinen Populationen von Subtyp spezifische Neuronen erforderlich. Als zweites Ziel meiner Doktorarbeit werde ich nutzen und Entwicklungsprinzipien anwenden iPSC abgeleitet Kortikogenese sowie erzeugen reine Populationen der beiden am anfälligsten neuronaler Subtypen in SPG11 und SPG15 zu verkürzen: Schicht V corticospinal Motoneuronen und Schicht II / III corticocallosal Projektionsneuronen.

---

## Abstract 38

### Mitochondrial morphology and cellular distribution is altered in SPG31 patients in a DRP1-dependent manner (Poster session I)

*Julie Lavie<sup>1,3</sup>, Roman Serrat<sup>2,3,\*</sup>, Nadège Bellance<sup>1,3,\*</sup>, Gilles Courtand<sup>4, 3</sup>, Jean-William Dupuy<sup>XX,3</sup>, Christelle Tesson<sup>5</sup>, Guillaume Banneau<sup>6</sup>, Giovanni Stevanin<sup>5</sup>, Alexis Brice<sup>5</sup>, Didier Lacombe<sup>1,3</sup>, Alexandra Durr<sup>5</sup>, Frédéric Darios<sup>5</sup>, Rodrigue Rossignol<sup>1,3</sup>, Cyril Goizet<sup>1,3,#</sup> and Giovanni Bénard<sup>2,3,#</sup>, ¶ 1 INSERM U1211, Laboratoire Maladies Rares : Génétique et Métabolisme. Hôpital Pellegrin, 33000 Bordeaux 2 INSERM U862, NeuroCentre Magendie, 33077 Bordeaux, France 3 University of Bordeaux, 33077 Bordeaux, France 4 INCIA, Université de Bordeaux, CNRS UMR5287, Bordeaux, France. 5 Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, UMR-S975, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France. 6 UF neurogénétique, Dpt de Génétique et Cytogénétique, Hôpitaux Universitaires Pitié Salpêtrière, Paris, France*

SPG31 is a rare neurological disorder caused by mutation in REEP1 gene which encodes a microtubule interacting protein, REEP1. To date, it is still unknown how REEP1-dependent processes are responsible for the onset of SPG31. REEP1 is known to regulate morphology and trafficking of various endomembranes through interactions with microtubules. In this study, we collected primary fibroblasts of 5 SPG31 patients to study mitochondrial morphology and we found that patient cells display a highly tubular mitochondrial network compared to controls. We found that these morphological alterations are caused by the inhibition of mitochondrial fission protein, DRP1, due to its hyperphosphorylation at the serine 43 637 residue. Genetic or pharmacological-induced decrease of

DRP1-S637 phosphorylation restores the mitochondrial morphology in patient cells. Furthermore, ectopic expression of REEP1 carrying pathological mutations in primary neuronal culture drastically targets REEP1 to mitochondria. REEP1 mutated proteins sequester mitochondria in the perinuclear region of the neurons and therefore, hamper mitochondrial transport along the axon. Knowing the importance of mitochondria distribution and morphology for neuronal health, our results support the involvement of mitochondrial dysfunction in the SPG31.

## Zusammenfassung 38

### Die mitochondriale Morphologie und zelluläre Verteilung wird in SPG31 Patienten in einer DRP1 abhängig (Poster Session I) geändert

*Julie Lavie<sup>1,3</sup>, Roman Serrat<sup>2,3</sup>, \*, Nadège Bellance<sup>1,3</sup>, \*, Gilles Courtand<sup>4</sup>, 3, Jean-William Dupuy<sup>XX</sup>, 3, Telle Tesson<sup>5</sup>, Guillaume Banneau<sup>6</sup>, Giovanni Stevanin<sup>5</sup>, Alexis Brice<sup>5</sup>, Didier Lacombe<sup>1,3</sup>, Alexandra Durr<sup>5</sup>, Frédéric Darios<sup>5</sup>, Rodrigue Rossignol<sup>1,3</sup>, Cyril Goizet<sup>1,3</sup>, # und Giovanni Bénard<sup>2,3</sup>, #, ¶ 1 INSERM U1211, Laboratoire Maladies Rares: Génétique et métabolisme. Hôpital Pellegrin, 33000 Bordeaux 2 INSERM U862, Neurozentrum Magendie, 33077 Bordeaux, Frankreich 3 Universität Bordeaux, 33077 Bordeaux, Frankreich 4 INCIA, Université de Bordeaux, CNRS UMR5287, Bordeaux, Frankreich. 5 Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, UMR-S975, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, Frankreich. 6 UF neurogénétique, Dpt de Génétique et Cytogénétique, Hôpitaux Universitaires Pitié Salpêtrière, Paris, Frankreich*

SPG31 ist eine seltene, durch Mutation in REEP1 Gen verursacht neurologische Erkrankung, die eine Mikrotubuli interagieren kodiert Protein, REEP1. Bislang ist es noch nicht bekannt, wie REEP1 abhängige Prozesse für den Beginn der SPG31 verantwortlich sind. REEP1 ist bekannt, mit Mikrotubuli Morphologie und den Handel mit verschiedenen Endomembranen durch Interaktionen zu regulieren. In dieser Studie haben wir für primäre Fibroblasten von 5 SPG31 Patienten mitochondrialen Morphologie zu studieren, und wir fanden, dass Patientenzellen eine hochrohrförmigen mitochondrialen Netzwerk anzuzeigen Vergleich zu den Kontrollen. Wir fanden, daß diese morphologische Veränderungen durch die Hemmung der mitochondrialen Spaltungsproteins verursacht werden, DRP1 aufgrund seiner Hyperphosphorylierung am Serin 43 637-Rest. Genetische oder pharmakologisch-induzierte Abnahme von DRP1-S637 Phosphorylierung stellt die mitochondriale Morphologie in Patientenzellen. Des Weiteren ektopische Expression von REEP1 pathologischen Mutationen in primären neuronalen Kultur tragenden Ziele drastisch REEP1 an Mitochondrien. REEP1 mutierte Proteine absondern Mitochondrien im perinukleären Bereich der Neuronen und daher entlang des Axons mitochondrialen Transport behindern. die Bedeutung der Mitochondrien Verteilung und Morphologie für die neuronale Gesundheit, unsere Ergebnisse unterstützen die Beteiligung der mitochondriale Dysfunktion in der SPG31 zu kennen.

---

## Abstract 40

### Spg11 knockout in mouse mimics the pathology observed in patients (Oral presentation)

*Julien Branchu (1), Laura Sourd (1,2), Céline Leone (1,2), Alexandrine Corriger (1,2), Typhaine Esteves (1), Raphaël Matusiak (1), Maxime Boutry (1), Magali Dumont (1), Alexis Brice (1), Khalid El-Hachimi (1,2), Giovanni Stevanin (1,2) and Frédéric Darios (1 (1) : Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (Inserm U1127, CNRS UMR7225, UPMC UMR\_S975, Sorbonne Universités), 75013 Paris, France (2) : Ecole Pratique des Hautes Etudes, Neurogenetics team, Paris France.*

Hereditary Spastic Paraplegias (HSP) constitute the second most frequent group of motor neuron diseases characterized by progressive bilateral weakness, spasticity and loss of vibratory sense in the lower limbs. These symptoms are mainly due to the degeneration of axons of the upper motor neurons of the corticospinal tract. Autosomal recessive HSP with thin corpus callosum and mental impairment is a common and clinically distinct form of familial HSP that is associated with mutations in the SPG11 gene on chromosome 15q in most affected families. SPG11 mutations are either nonsense or indels leading to a frameshift, in agreement with a loss of function mechanism. SPG11 encodes a 2,443 amino acid protein of unknown function named spatacsin. It localizes to various cellular organelles and compartments, including endoplasmic reticulum, lysosomes and microtubules.

To investigate how the loss of spatacsin function leads to motor neuron neurodegeneration, we generated and characterized a Spg11 knockout mouse model. These mice recapitulate most of the clinical hallmarks observed in SPG11 patients: they showed progressive gait impairment, coordination problems and motor dysfunction that started early and worsened with time. All the Spg11 knockout mice also exhibited muscle strength loss and half of them developed lower limb spasticity and walk with stiff legs.

These behavioral deficits were associated with progressive brain atrophy with loss of neurons in the primary motor cortex and cerebellum as well as global spinal cord atrophy with loss of the large surface motor neurons and accumulation of dystrophic axons in the corticospinal tract. Interestingly, examination of the motor neuron alterations showed that the degeneration was preceded by an accumulation of autofluorescent lipid material in lysosomal structures. This new mouse model will help to decipher the role of spatacsine and the physiopathology of this disabling disease.

## Zusammenfassung 40

### Spg11 Knockout in Maus ahmt die Pathologie bei Patienten (Vortrag) beobachtet

*Julien Branchu (1), Laura Sourd (1,2), Céline Leone (1,2), Alexandrine corriger (1,2), Typhaine Esteves (1), Raphaël Matusiak (1), Maxime Boutry (1), Magali Dumont (1), Alexis Brice (1), Khalid El-Hachimi (1,2), Giovanni Stevanin (1,2) und Frédéric Darios (1 (1): Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (Inserm U1127, CNRS UMR7225 UPMC UMR\_S975, Sorbonne Universités), 75013 Paris, Frankreich (2): Ecole Pratique des Hautes Etudes, Neurogenetics Team, Paris Frankreich.*

Hereditäre Spastische Paraplegie (HSP) bilden die zweithäufigste Gruppe von Motoneuron durch progressive bilaterale Schwäche, Spastizität und den Verlust der Vibrationssinn in den unteren Extremitäten gekennzeichnet Krankheiten. Diese Symptome sind vor allem auf die Degeneration der

Axone der oberen motorischen Neuronen des corticospinal-Darm-Trakt. Autosomal-rezessive HSP mit dünnem Corpus callosum und geistige Behinderung ist eine häufige und klinisch ausgeprägte Form der familiären HSP, die mit Mutationen im SPG11-Gen auf dem Chromosom 15q in den meisten betroffenen Familien verbunden ist. SPG11 Mutationen sind entweder Unsinn oder indels zu einer Rasterverschiebung führt, in Übereinstimmung mit einem Funktionsverlust Mechanismus. SPG11 kodiert für ein 2443 Aminosäuren bestehendes Protein unbekannter Funktion spatacsin benannt. Es lokalisiert zu verschiedenen Zellorganellen und Fächer, einschließlich Endoplasmatischen Retikulum, Lysosomen und Mikrotubuli.

Um zu untersuchen, wie der Verlust von spatacsin Funktion führt zu motorischen Neurons Neurodegeneration, erzeugt wir und charakterisiert ein Spg11 Knockout-Mausmodell. Diese Mäuse meisten klinischen Merkmale in SPG11 Patienten beobachtet rekapitulieren: sie zeigten progressive Gangstörungen, Koordinationsstörungen und motorische Störungen, die früh und verschlechtert sich mit der Zeit begonnen. Alle Spg11 Knockout-Mäuse zeigten auch die Muskelkraft Verlust und die Hälfte von ihnen entwickelte unteren Extremitäten Spastik und gehen mit steifen Beinen.

Diese Verhaltensdefizite wurden mit progressiver Gehirnatrophie mit Verlust von Neuronen in dem primären motorischen Kortex und Cerebellum sowie globale Rückenmark Atrophie mit Verlust der großen Oberfläche motorischen Neuronen und Akkumulation von dystrophischen Neuriten in der Pyramidenbahn verbunden. Interessanterweise Untersuchung der motorischen Neurons Veränderungen zeigten, dass die Degeneration durch eine Anhäufung von autofluoreszenten Lipidmaterial in lysosomalen Strukturen voraus. Dieses neue Mausmodell wird dazu beitragen, die Rolle der spatacsine und die Pathophysiologie dieser behindernden Krankheit zu entschlüsseln.

---

## Abstract 41

### **A novel UBQLN2 mutation in a family with spastic paraplegia associating amyotrophic lateral sclerosis (Poster session I)**

*Roselina Lam<sup>1\*</sup>, Elisa Teyssou<sup>1\*</sup>, Laura Chartier<sup>1\*</sup>, Maria-Del-Mar Amador<sup>2</sup>, Mathilde Mairey<sup>1,3</sup>, Bertrand Fontaine<sup>1,2</sup>, François Salachas<sup>1,2</sup>, Giovanni Stevanin<sup>1,3</sup> and Stéphanie Millecamps<sup>1</sup> \*Equal contribution 1 Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, 75013, Paris, France 2Département des Maladies du Système Nerveux, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital de la Pitié- Salpêtrière, 75013, Paris, France 3Ecole Pratique des Hautes Etudes, 75014 Paris, France*

We report a family including 7 members (on 4 generations) who were affected by spastic paraplegia (SP). Main SP related genes were analyzed in 3 affected members of this family and no causing mutation was identified. As ten years after the onset of SP (that occurred at 45 35y), one of these SP members developed an aggressive Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) disease (complete loss of mobility of legs and arms within 12 months with dysarthria and diaphragmatic paralysis due to the degeneration of motor neurons in the spinal cord, the brainstem and the cortex), major ALS related genes were also analyzed. A mutation in UBQLN2 (c.1516C>G, p.Pro506Ala) was identified in the 3



SP patients. UBQLN2 is an intronless gene located on the X chromosome, which encodes ubiquilin-2, a component of the ubiquitin inclusions detected in degenerating motor neurons in ALS patients.

Ubiquilin-2 contains ubiquitin-like (UBL) and ubiquitin-associated (UBA) domains and is involved in several protein degradation pathways including the ubiquitin-proteasome system (UPS), the endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) pathway and autophagy. Mutations in UBQLN2 have been identified in families with dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia, but remained rare in ALS populations. Nevertheless seven point mutations involving one proline residue of a unique domain of the ubiquilin-2 protein, containing 12 PXX tandem repeats, have been identified as being associated with familial ALS. Other genetic analyses performed on ALS/Frontotemporal dementia patients identified variants outside the PXX domain that remain of unknown significance.

The Pro506Ala UBQLN2 mutation identified in the PS family, which is located in the PXX domain, has never been previously reported, was absent from ExAC Browser database and was predicted to be deleterious by SIFT in silico analysis. Experiments performed on patient lymphoblasts showed that protein degradation pathways were improperly regulated. Our results confirm the role of UBQLN2 PXX tract in ALS pathogenesis and expand the spectrum of UBQLN2 mutations to SP phenotype.

## Zusammenfassung 41

### Eine neuartige UBQLN2 Mutation in einer Familie mit spastischer Paraplegie Assoziieren Amyotrophe Lateralsklerose (Poster Session I)

*Roselina Lam1 \*, Elisa Teyssou1 \*, Laura Chartier1 \*, Maria-Del-Mar Amador2, Mathilde Mairey1,3, Bertrand Fontaine1,2, François Salachas1,2, Giovanni Stevanin1,3 und Stéphanie Millecamps1 \* Equal Beitrag 1 Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, 75013, Paris, Frankreich 2Département des Maladies du Système nerveux, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 75013, Paris, Frankreich 3Ecole Pratique des Hautes Etudes, 75014 Paris, Frankreich*

Wir berichten über eine Familie mit 7 Mitgliedern (über 4 Generationen), die durch spastische Paraplegie (SP) betroffen waren. Haupt SP verwandte Gene wurden in drei betroffenen Mitgliedern dieser Familie und keine verursachende Mutation identifiziert wurde analysiert. Als zehn Jahre nach dem Beginn der SP (die bei 45 35y aufgetreten ist), eine dieser SP-Mitglieder entwickelt eine aggressive Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) Krankheit (vollständiger Verlust der Beweglichkeit der Beine und Arme innerhalb von 12 Monaten mit Dysarthrie und Zwerchfelllähmung aufgrund die Degeneration von Motoneuronen im Rückenmark, Hirnstamm und der Cortex) wurden wichtige ALS verwandte Gene analysiert. Eine Mutation in UBQLN2 (c.1516C> G, p.Pro506Ala) wurde in den drei SP-Patienten identifiziert. UBQLN2 ist ein intron Gen auf dem X-Chromosom befindet, die in degenerierenden motorischen Neuronen in ALS-Patienten nachgewiesen Ubiquilin-2, einer Komponente der Ubiquitin-Einschlüssen kodiert.

Ubiquilin-2 enthält ubiquitin-like (UBL) und Ubiquitin-assoziierte (UBA) Domänen und wird in mehrere Proteinabbauwege einschließlich des Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), das endoplasmatische Retikulum-assoziiertes Protein Degradation (ERAD) -Weg und autophagy beteiligt. Mutationen in UBQLN2 wurden in Familien mit dominant X-gebundenen juvenilen und Erwachsenenalter ALS und

ALS / Demenz identifiziert, blieb aber bei der ALS-Populationen selten. Dennoch sieben Punktmutationen denen ein Prolinrest einer einzigartigen Domäne des Ubiquilin-2-Protein, mit 12 PXX Tandem-Repeats, wurden als im Zusammenhang mit familiärer ALS identifiziert. Andere genetische Analysen an ALS / frontotemporale Demenz-Patienten identifiziert Varianten außerhalb der PXX Domäne durchgeführt, die von unbekannter Bedeutung bleiben.

Die Pro506Ala UBQLN2 Mutation in der PS-Familie identifiziert, das in der PXX Domäne befindet, ist nie zuvor berichtet worden ist, war aus Exac Browser Datenbank abwesend und wurde von SIFT in silico Analyse zu schädlichen vorhergesagt. Versuche an Patienten Lymphblasten durchgeführt hat gezeigt, dass Proteinabbauwege nicht richtig reguliert wurden. Unsere Ergebnisse bestätigen die Rolle des UBQLN2 PXX-Darm-Trakt in ALS Pathogenese und das Spektrum der UBQLN2 Mutationen zu SP-Phänotyp erweitern.

---

## Abstract 43

### Subclinical involvement of nonmotor sensory tracts in the brains of SPG3 and SPG4 patients (Poster session I)

*Anna Sobańska<sup>1</sup>, Maria Rakowicz<sup>1</sup>, Anna Sulek<sup>2</sup>, Iwona Stępnia<sup>2</sup>, Ewelina Elert-Dobkowska<sup>2</sup>, Elżbieta Waliniowska<sup>1</sup>, Wioletta Krysa<sup>2</sup>, Wanda Lojkowska<sup>3</sup>, Aleksandra Wierzbicka-Wichniak<sup>1</sup> 1: Department of Clinical Neurophysiology, 2: Department of Genetics, 3: Department of Neurology, Institute of Psychiatry and Neurology, Warsaw, Poland*

Hereditary spastic paraplegias (HSPs) comprise a heterogeneous group of rare, neurodegenerative disorders. The most prominent HSP features: spastic paraparesis, mild somatosensory deficits and bladder dysfunction may be accompanied by additional symptoms i.e.: neuropathy, epilepsy, dementia, deafness. The previous reports concerning subclinical impairments of nonmotor sensory brain structures in spastic paraplegia type 3 (SPG3) and type 4 (SPG4) using visual (VEPs), brain auditory evoked potentials (BAEPs) or EEG have been limited to case reports. In the present study the assessment of such abnormalities based on VEPs, BAEPs and EEG was performed in 28 SPG 4 and 9 SPG3 patients. Additionally, the subjects underwent brain MRI. Disease severity was evaluated with Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS). The EEG examination revealed abnormalities in 9 (35%) SPG4 patients, including epileptiform discharges in six, while it was intact in SPG3 individuals. In 38% of SPG3 and 48% of SPG4 patients VEPs P100 revealed latency prolongation, however of mild degree: SPG3  $127 \pm 7.8$ ms, SPG4  $122.3 \pm 6.4$ ms. BAEPs were distracted accidentally. Moreover, 64% of SPG4 cases showed changes in brain MRI. Regarding the mutation type, the SPG4 patients with microrearrangements presented significantly longer VEPs latencies, contrary to the cases with point mutations. In conclusion, our study shows that SPG3 and SPG4 phenotypes are often combined with subclinical nonmotor sensory symptoms. The more detailed neurological diagnostic tests, the higher possibilities are to find additional symptoms in SPG patients. Thus we question whether HSP patients should be qualified into pure or complicated forms any more.

## Zusammenfassung 43

### Subklinische Beteiligung von nichtmotorisiertem sensiblen Bahnen im Gehirn von SPG3 und SPG4 Patienten (Poster Session I)

*Anna Sobańska<sup>1</sup>, Maria Rakowicz<sup>1</sup>, Anna Sulek<sup>2</sup>, Iwona Stępnia<sup>2</sup>, Ewelina Elert-Dobkowska<sup>2</sup>, Elżbieta Waliniowska<sup>1</sup>, Wioletta Krysa<sup>2</sup>, Wanda Lojkowska<sup>3</sup>, Aleksandra Wierzbicka-Wichniak<sup>1</sup>* 1: Abteilung für Klinische Neurophysiologie, 2: Department of Genetics, 3: Klinik für Neurologie, Institut für Psychiatrie und Neurologie, Warschau, Polen

Hereditäre spastische Paraplegie (HSP) umfassen eine heterogene Gruppe von seltenen, neurodegenerative Erkrankungen. Die prominentesten HSP Merkmale: spastische Spinalparalyse, mild somatosensorischen Defizite und Blasenfunktionsstörungen können durch zusätzliche Symptome d.h. : Neuropathie, Epilepsie, Demenz, Taubheit begleitet werden. Die bisherigen Berichte subklinische Störungen der nichtmotorisiertem sensorischen Hirnstrukturen in spastische Paraplegie Typ 3 (SPG3) und Typ 4 (SPG4) über die Verwendung von visuellen (VEP), Gehirn akustisch evozierte Potentiale (BAEPs) oder EEG haben beschränkt zu Fall berichtet. In der vorliegenden Studie die Beurteilung solcher Anomalien anhand von VEPs, BAEPs und EEG wurde in 28 SPG 4 und 9 SPG3 Patienten durchgeführt. Außerdem unterzog die Themen Gehirn-MRT. Die Schwere der Krankheit wurde mit spastischer Paraplegie Rating Scale (SPRS) bewertet. Die EEG Untersuchung ergab Abnormalitäten in 9 (35%) SPG4 Patienten, einschließlich epileptiform Entladungen in sechs, während sie intakt in SPG3 Individuen war. In 38% der SPG3 und 48% der Patienten SPG4 VEPs P100 ergab Latenz Verlängerung jedoch von leichten Grades: SPG3 127  $\pm$  7.8ms, SPG4 122.3  $\pm$  6.4ms. BAEPs wurden versehentlich abgelenkt. Darüber hinaus 64% der SPG4 Fälle zeigten Veränderungen im Gehirn MRI. die Mutation Typ betrifft, so legte die SPG4 Patienten mit microrearrangements signifikant länger VEPs Latenzen, im Gegensatz zu den Fällen mit Punktmutationen. Abschließend unsere Studie zeigt, dass SPG3 und SPG4 Phänotypen werden oft mit subklinischer nichtmotorisiertem sensorische Symptome kombiniert. Die detaillierteren neurologischen diagnostischen Tests, sind die höheren Möglichkeiten zusätzliche Symptome bei SPG Patienten zu finden. So hinterfragen wir, ob HSP-Patienten in reiner oder komplizierte Formen jeder mehr qualifiziert werden sollen.

---

## Abstract 46

### Gait patterns in patients with Hereditary Spastic Paraparesis (Poster session I)

*Carlo Casali, MD, PhD<sup>1</sup>, Martina Rinaldi<sup>3\*</sup>, Alberto Ranavolo, PhD<sup>4</sup>, , Giovanni Martino<sup>5,6</sup>, Luca Leonardi MD<sup>1</sup>, Carmela Conte PhD<sup>7</sup>, Tiwana Varrecchia<sup>3</sup>, Draicchio Francesco, MD, PhD<sup>4</sup>, Francesco Lacquaniti, MD, PhD<sup>5,6,8</sup>, Francesco Pierelli, MD<sup>1,9</sup>, Mariano Serrao, MD, PhD<sup>1,2\*</sup>*, 1Department of Medico-Surgical Sciences and Biotechnologies, University of Rome Sapienza, Via Faggiana 34, 04100 Latina, Italy 2 Rehabilitation Centre, Policlinico Italia, Piazza del Campidano 6, 00162 Rome, Italy 3Department of Engineering, Roma TRE University, Via Ostiense 159, 00154 Rome, Italy 4 Department of Occupational and Environmental Medicine, Epidemiology and Hygiene, INAIL, Via Fontana Candida 1, 00078 Monte Porzio Catone, Rome, Italy 5 Centre of Space Bio-Medicine, University of Rome Tor Vergata, Via Orazio Raimondo 18, 00173 Rome, Italy 6 Laboratory of Neuromotor Physiology, Istituto Di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Santa Lucia Foundation, Via Ardeatina 306, 00179 Rome, Italy 7 Fondazione Don Gnocchi, piazzale Morandi 6, 20121 Milan, Italy 8

*Department of Systems Medicine, University of Rome Tor Vergata, Via Montpellier 1, 00133 Rome, Italy 9 IRCCS, Neuromed, Via Atinense, 20C, 86077 Pozzilli (IS), Italy*

Herein we describe the gait patterns in Hereditary Spastic Paraparesis (HSP) in terms of time-distance, kinematic, kinetic and electromyographic characteristics, and to identify subgroups of patients according to specific kinematic features of walking. 50 patients with HSP were evaluated by means of computerized gait analysis and compared to a group of 50 matched healthy participants. We computed time-distance parameters of walking, and the range of angular motion (RoM) at hip, knee, and ankle joints, and at the trunk and pelvis. Lower limb joint moments and muscle co-activation values were also evaluated. Three distinct subgroups of HSP patients were identified based on the RoM values. Subgroup 1 was characterized by reduced hip, knee and ankle joint RoMs. Patients of this subgroup were the most severely affected from a clinical standpoint, had the most marked spasticity, and walked at the slowest speed. Subgroup 3 was characterized by an increased hip joint RoM, but knee and ankle joint RoM values were close to control values. These patients were the least affected, and showed the highest walking speed. Finally, subgroup 2 showed reduced knee and ankle joint RoMs, and hip RoM values close to control values. Disease severity and gait speed in subgroup 2 were intermediate between those of subgroups 1 and 3.

Conclusions: We identified three distinctive gait patterns in patients with HSP that correlated robustly with clinical data. The ability to distinguish specific features in gait patterns of patients with HSP may help tailoring pharmacological and rehabilitative treatments to individual needs, and may be used in evaluating possible future treatments.

## Zusammenfassung 46

### Gait Muster bei Patienten mit hereditärer spastischer Paraparese (Poster Session I)

*Carlo Casali, MD, PhD1, Martina Rinaldi3 \*, Alberto Ranavolo, PHD4, Giovanni Martino5,6, Luca Leonardi MD 1, Carmela Conte PhD7, TiwanaVarrecchia3, Draicchio Francesco, MD, PHD4, Francesco Lacquaniti, MD, PhD5,6,8 Francesco Pierelli, MD 1,9 Mariano Serrao, MD, PhD1,2 \*, 1Abteilung von medizinisch-chirurgischen Wissenschaften und Biotechnologien, Universität Rom Sapienza, Via Faggiana 34, 04100 Latina, Italien 2 Rehabilitation Centre, Policlinico Italia, Piazza del Campidano 6, 00162 Rom, Italien 3 Abteilung für Ingenieurwissenschaften, der Universität Roma Tre, Via Ostiense 159, 00154 Rom, Italien 4 Abteilung für Arbeits- und Umweltmedizin, Epidemiologie und Hygiene, INAIL, Via Fontana Candida 1, 00078 Monte PorzioCatone, Rom, Italien 5 Zentrum Space Bio-Medizin, Universität Rom Tor Vergata, Via Orazio Raimondo 18,00173 Rom, Italien 6Laboratory von NeuromotorPhysiology, Istituto Di Ricovero e Cura eine Carattere Scientifico Santa Lucia-Stiftung, Via Ardeatina 306, 00179 Rom, Italien 7 Fondazione Don Gnocchi, piazzale Morandi 6, 20121 Mailand, Italien 8 Institut für Systemische Medizin, Universität Rom Tor Vergata, Via Montpellier 1, 00133 Rom, Italien 9 IRCCS, Neuromed, Via Atinense, 20C, 86077 Pozzilli (IS), Italien*

Hier beschreiben wir die Gangmuster bei hereditärer spastischer Paraparese (HSP) in Bezug auf die Zeit-Abstand, kinematischen, kinetischen und Elektromyographie Eigenschaften und spezifischen kinematischen Eigenschaften des Gehens nach Subgruppen von Patienten zu identifizieren. 50 Patienten mit HSP wurden mittels computergestützten Ganganalyse ausgewertet und im Vergleich zu einer Gruppe von 50 gleichaltrigen gesunden Teilnehmern. Wir berechneten Zeit-Weg-Parameter zu Fuß, und der Bereich der Winkelbewegung (RoM) bei Hüft-, Knie- und Fußgelenke und am Rumpf und Becken. Untere Extremität gemeinsame Momente und Muskel Koaktivierung Werte wurden ebenfalls bewertet. Drei verschiedene Untergruppen von HSP-Patienten wurden auf Basis der ROM-Werte

identifiziert. Untergruppe 1 wurde durch eine reduzierte Hüft-, Knie- und Sprunggelenk ROMS aus. Die Patienten dieser Untergruppe waren die am stärksten von klinischer Sicht beeinträchtigt, hatte die deutlichste Spastik und ging mit der langsamsten Geschwindigkeit. Untergruppe 3 wurde durch eine erhöhte Hüftgelenk RoM gekennzeichnet, aber Knie und Sprunggelenk RoM-Werte waren in der Nähe Werte zu steuern. Diese Patienten waren die am wenigsten betroffen, und zeigte die höchste Gehgeschwindigkeit. Schließlich Untergruppe 2 zeigte reduzierte Knie und Sprunggelenk ROMS und Hüfte RoM Werte nahe Werte zu steuern. Der Schwere der Erkrankung und Ganggeschwindigkeit in der Untergruppe 2 waren die zwischen denen der Untergruppen 1 und 3.

Schlussfolgerungen: Wir identifizierten drei verschiedene Gangmuster bei Patienten mit HSP, die robust mit klinischen Daten korreliert. Die Fähigkeit, können bestimmte Funktionen in Gangmuster von Patienten mit HSP zu unterscheiden helfen, pharmakologische und rehabilitative Behandlung auf die individuellen Bedürfnisse zugeschnitten und können bei der Bewertung der möglichen zukünftigen Behandlungen verwendet werden.

---

## Abstract 48

Diagnostic yield of Next Generation Sequencing panel in Hereditary Spastic Paraplegia patients from South Brazil (Poster session I)

*Jonas Alex Morales Saute<sup>1,3,4</sup>, Daniela Burguez<sup>1</sup>, Márcia Polese Bonatto<sup>3,5</sup>, Laura Bannach Jardim<sup>1,3,4,6</sup>, Maria Luiza Saraiva-Pereira<sup>1,3,5,7</sup>, Ursula da Silveira Matte<sup>2,8</sup>, Marina Siebert<sup>2</sup>.  
1Medical Genetics and 2Experimental Research Center, 3Genetics Identification Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; 4Postgraduate program in Medical Sciences and 5Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.  
Departments of 6Internal Medicine, 7Biochemistry and 8Genetics, UFRGS.*

**Background:** The hereditary spastic paraplegias (HSPs) are a clinically heterogeneous group of disorders characterized by lower extremity spasticity and weakness. HSPs are classified as pure or complicated based on the presence of additional neurologic findings. There is great genetic heterogeneity, with at least 71 loci and 54 HSP-related genes. Our aim was to evaluate the diagnostic yield of a twelve HSP-genes next-generation sequencing (NGS) panel in unrelated families with clinical suspicion of HSP from Rio Grande do Sul, Brazil, and to provide insights about the epidemiological profile of HSPs in our region.

**Methods:** Index cases from consecutive families were recruited since April 2011 at Neurogenetics outpatients' clinics, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Eligibility were suspicion of HSPs and the presence of at least one of the following criteria: familial recurrence, consanguinity or thin corpus callosum. NGS of the 11 most frequent HSP-related genes in other population plus cerebrotendinous xanthomatosis (CTX) was performed with Ion Torrent Personal Genome Machine. Pathogenic or likely pathogenic variants detected by NGS were confirmed by Sanger sequencing.

**Results:** Index cases of 29 families (13 pure and 16 complicated HSPs forms) were analyzed. Molecular diagnosis was confirmed in 38% of cases (11/29); six with pure (all SPG4) and five with complicated HSPs phenotypes (4 SPG11, 1 CTX). In other six cases, a probable diagnosis was indicated by the presence of likely pathogenic variants: four in pure (SPG5, SPG7, SPG11, SPG31) and two in complicated HSPs (SPG7, SPG15). Overall, the evaluated NGS panel provided at least a probable diagnosis of HSPs in 58.6% (17/29) of cases. The diagnostic yield of the 12-gene NGS panel was 66% (all defined diagnosis) for autosomal dominant inheritance (6/9), 58.3% (defined + probable diagnosis) for autosomal recessive inheritance (7/12) and 50% (defined + probable diagnosis) when the pattern of 51 inheritance was not clearly defined (4/8). Forty percent (2/5) of patients with thin corpus callosum were diagnosed as SPG11 cases.

**Conclusion:** The twelve HSP-genes NGS panel presented adequate diagnostic yield for families with suspected HSPs; with a higher yield for recessive-HSP (58.3%) compared to studies using Sanger sequencing of target genes in other populations. In Rio Grande do Sul, the most frequent form of dominant-HSP is SPG4 (6/10, 60%) and of recessive-HSP is SPG11 (4/15, 26%)

**Funding:** Brazilian agencies CNPq and FINEP/PROPA.

## Zusammenfassung 48

### Diagnostische Ausbeute von Next Generation Sequencing-Panel in Spastische Paraplegie Patienten aus Süd-Brasilien (Poster Session I)

*Jonas Alex Morales Saute<sup>1,3,4</sup>, Daniela Burguez<sup>1</sup>, Márcia Polese Bonatto<sup>3,5</sup>, Laura Bannach Jardim<sup>1,3,4,6</sup>, Maria Luiza Saraiva-Pereira<sup>1,3,5,7</sup>, Ursula da Silveira Matte<sup>2,8</sup>, Marina Siebert<sup>2</sup>. 1Ärztlicher Genetik und 2Experimental Research Center, 3Genetics Identification Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasilien; 4Postgraduate Programm in Medical Sciences und 5Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasilien. Abteilungen für 6Internal Medizin, 7Biochemistry und 8Genetics, UFRGS.*

**Hintergrund:** Die hereditären spastischen Paraplegie (HSP) sind eine klinisch heterogene Gruppe von Erkrankungen, die durch unteren Extremität Spastik und Schwäche gekennzeichnet. HSPs werden als reine oder klassifiziert basierend auf der Anwesenheit von zusätzlichen neurologische Befunde kompliziert. Es gibt große genetische Heterogenität, mit mindestens 71 Loci und 54 HSP-Genen. Unser Ziel war es, die diagnostische Ausbeute eines zwölf HSP-Gene-Sequenzierung der nächsten Generation zu evaluieren (NGS) Platte in nicht miteinander verwandten Familien mit klinischen Verdacht auf HSP von Rio Grande do Sul, Brasilien und Erkenntnisse über die epidemiologische Profil von HSPs zu bieten in unserem Region.

**Methoden:** Index Fälle von aufeinander folgenden Familien seit April 2011 an der Neurogenetics Polikliniken rekrutiert wurden, Hospital de Clinicas de Porto Alegre. Die Berechtigung waren wegen des Verdachts der HSPs und die Anwesenheit von mindestens einem der folgenden Kriterien: familiäre Rezidiv, Verwandtschafts oder dünnen Corpus callosum. NGS der 11 häufigsten HSP-Genen in anderen Population sowie Zerebrotendinöse Xanthomatose (CTX) wurde mit Ion Torrent Personal Genome-Maschine durchgeführt. Pathogene oder wahrscheinlich pathogenen Varianten von NGS nachgewiesen wurden durch Sanger-Sequenzierung bestätigt.

**Ergebnisse:** Index Fälle von 29 Familien (13 rein und 16 komplizierte HSP-Formen) wurden analysiert. Molekulare Diagnostik wurde in 38% der Fälle (11/29) bestätigt; sechs mit reinem (alle SPG4) und fünf mit komplizierten HSPs Phänotypen (4 SPG11, 1 CTX). vier in der reinen (SPG5, SPG7, SPG11, SPG31) und zwei in komplizierten HSPs (SPG7, SPG15): In sechs anderen Fällen eine wahrscheinliche Diagnose durch das Vorhandensein von wahrscheinlich pathogenen Varianten angezeigt wurde. Insgesamt mindestens einer wahrscheinlichen Diagnose von HSPs das ausgewertete NGS Platte in 58,6% (17/29) der Fälle vorhanden. Die diagnostische Ausbeute des 12-Gen NGS-Panel betrug 66% (alle definierten Diagnose) für autosomal-dominant vererbt (6/9), 58,3% (definiert + wahrscheinliche Diagnose) für autosomal-rezessiv vererbt (7/12) und 50% (definiert + wahrscheinliche Diagnose), wenn das Muster von 51 Vererbung nicht eindeutig (4/8) definiert wurde. Vierzig Prozent (2/5) der Patienten mit dünnen Corpus callosum wurden als SPG11 Fälle diagnostiziert.

**Fazit:** Die zwölf HSP-Gene NGS-Panel präsentiert ausreichende diagnostische Ausbeute für Familien mit Verdacht auf HSPs; mit einer höheren Ausbeute für rezessiv-HSP (58,3%) im Vergleich zu Studien Sanger-Sequenzierung von Zielgenen in anderen Populationen mit. In Rio Grande do Sul, die häufigste Form von dominant-HSP ist SPG4 (6/10, 60%) und der rezessiven-HSP ist SPG11 (4/15, 26%)

**Finanzierung:** brasilianische Agenturen CNPq und FIPE-HCPA.

## Abstract 49

### Novel REEP1 mutations in hereditary axonopathies, and detection of a strong correlation between genotype, phenotype, and effect of mutant protein (Poster session II)

*Julia Falk<sup>1</sup>, Siri L. Rydning<sup>2</sup>, Ingo Kurth<sup>3</sup>, Chantal M. Tallaksen<sup>2</sup>, Pavel Seeman<sup>4</sup>, Christian Beetz<sup>1</sup>* *1Department of Clinical Chemistry, Jena University Hospital, Jena, Germany 2Department of Neurology, Oslo University Hospital, Oslo, Norway 3Department of Human Genetics, Jena University Hospital, Jena, Germany 4Department of Paediatric Neurology, DNA Laboratory, Charles University Prague and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic*

Mutations in REEP1 may be associated with upper motor neuron signs (in hereditary spastic paraplegia) or lower motor neuron signs (in hereditary motor neuropathy); rare mixed phenotypes have been described, too. Whether these observations are explained by a generally wide susceptibility window or by a true genotype-phenotype correlation is unclear. In patients from the above clinical spectrum we identified several known and novel REEP1 mutations. A meta-analysis based on these findings and on all relevant clinical-genetic reports published to date suggested that lower motor neuron involvement is significantly associated with mutations that affect the C-terminal ~100 residues of the 201-residue REEP1 protein. Overexpression experiments revealed that the corresponding mutants, but not mutants affecting more N-terminal residues, form cytoplasmic aggregates in which REEP1 interaction partners co-accumulate. We suggest that the hydrophobic REEP homology domain, encoded by residues 1 to ~80 and involved in homo- and heteromeric interactions, mediates

this phenomenon, and that a full-length, unmutated C-terminus is required to prevent aggregation. Our findings also corroborate our previous hypothesis that a loss-of-function mechanism causes upper motor neuron pathology, whereas the formation of (toxic?) aggregates leads to lower motor neuron signs. Mixed phenotypes associated with C-terminal variants would then be due to a combination of partial loss-of-function (e.g. incomplete nonsense mediated decay) plus aggregation of residual mutant protein. These observations suggest a true genotype-phenotype correlation for REEP1-associated axonopathies. Functionally understanding why the two distinct populations of motor neurons show differing degrees of vulnerability to loss-of vs. gain-of REEP1 function may eventually pave the way for new therapeutic strategies.

## Zusammenfassung 49

### Neuartige REEP1 Mutationen in erbliche Axonopathien und den Nachweis einer starken Korrelation zwischen Genotyp, Phänotyp und Wirkung des mutierten Proteins (Poster Session II)

*Julia FALK1, Siri L. Rydning2, Ingo Kurth3, Chantal M. Tallaksen2, Pavel Seeman4, Christian Beetz1 1Abteilung für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Jena, Jena, Deutschland 2Abteilung für Neurologie, Universitätsklinikum Oslo, Oslo, Norwegen 3 Abteilung für Humangenetik, Jena Universitätsklinikum Jena, Deutschland 4Department für Pädiatrische Neurologie, DNA-Labor, der Karls-Universität Prag und Universitätsklinik Motol, Prag, Tschechische Republik*

Mutationen in REEP1 kann mit oberen Motoneuron-Zeichen (in Spastische Paraplegie) oder unteren Motoneuron-Zeichen (in erbliche motorische Neuropathie) in Verbindung gebracht werden; seltenen gemischten Phänotypen wurden auch beschrieben. Ob diese Beobachtungen durch eine im Allgemeinen breite Anfälligkeit Fenster oder durch eine echte Genotyp-Phänotyp-Korrelation erklärt werden, ist unklar. Bei Patienten aus der obigen klinischen Spektrum identifizierten wir mehrere bekannte und neuartige REEP1 Mutationen. Eine Meta-Analyse basierend auf diesen Erkenntnissen und auf allen relevanten klinisch-genetische Berichte bisher veröffentlichten vorgeschlagen, dass untere Motoneuron Beteiligung signifikant mit Mutationen assoziiert ist, die die C-terminale ~ 100 Reste des 201-Rest REEP1 Proteins beeinflussen. Überexpression Experimente zeigten, dass die entsprechenden Mutanten, aber nicht mehr Mutanten N-terminale Reste beeinflussen, bilden zytoplasmatischen Aggregaten, in denen REEP1 Interaktionspartner zusammen anhäufen. Wir schlagen vor, dass die hydrophobe REEP Homologie-Domäne, kodiert durch die Reste 1 bis ~ 80 und in homo- und heteromeren Wechselwirkungen beteiligt, dieses Phänomen vermittelt, und dass ein in voller Länge, nicht mutierten C-Terminus ist erforderlich, Aggregation zu verhindern. Unsere Ergebnisse bestätigen auch unsere bisherigen Hypothese, dass ein Verlust-offunction Mechanismus oberen Motoneuron-Pathologie verursacht, während die Bildung von (giftig?) Aggregiert führt Motoneuron-Zeichen zu senken. Mixed Phänotypen mit C-terminalen Varianten assoziiert würde dann auf eine Kombination von Teil loss-of-function zurückzuführen sein (zum Beispiel unvollständige Unsinn vermittelten Zerfall) und Aggregation von Rest mutierten Proteins. Diese Beobachtungen legen nahe, einen echten Genotyp-Phänotyp-Korrelation für REEP1-assoziierten Axonopathien. Funktionell zu verstehen, warum die beiden unterschiedlichen Populationen von motorischen Neuronen zeigen unterschiedliche Grade der Anfälligkeit für loss-of vs. gain-of REEP1 Funktion kann schließlich den Weg für neue therapeutische Strategien zu ebnen.



---

## Abstract 50

### Epistatic effects influence SPG4 HSP age of onset (Oral presentation)

*Timothy Newton<sup>1</sup>, Fiamma Berner<sup>1</sup>, Rachel Allison<sup>1</sup>, Christian Beetz<sup>2</sup>, Evan Reid<sup>1</sup> 1: Cambridge Institute for Medical Research, Cambridge Biomedical Campus, University of Cambridge, UK 2: Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Jena University Hospital, Jena, Germany.*

Patients with SPG4 haploinsufficiency have a wide variation in the age of onset of HSP symptoms, from childhood to later adult life. A curious observation is that patients with whole exon deletions in SPG4 have a significantly earlier age at onset of HSP symptoms compared 52 to those with point mutations. In a collaboration between the Reid and Beetz Labs, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) showed that these deletions can extend into the promoter region and 5' exons of an adjacent gene, DPY30. Patients with deletions also involving DPY30 had an earlier onset of HSP in comparison to patients with a deletion affecting SPG4 alone. This finding suggests that there is an epistatic effect between SPG4 and DPY30, which accounts for the observed earlier age of onset seen in patients with genomic deletions.

DPY30 encodes dpy30, best characterised as a member of the COMPASS complex involved in Histone methylation. However, depletion of dpy30 also leads to mis-localisation of CIMPR, a receptor which cycles between the Golgi and endosomes in order to transport lysosomal enzymes. Interestingly, we have also identified a role for spastin, encoded by SPG4, in endosome to Golgi traffic. In the case of spastin depletion CI-MPR accumulates in enlarged lysosomes. We therefore hypothesise that additive effects upon the endosome to Golgi trafficking pathway, which affects lysosomal biogenesis, may explain the apparent epistatic effect between SPG4 and DPY30.

To examine this hypothesis we tested whether dpy30 depletion affected lysosome size or the traffic and localisation of CI-MPR, and whether any effects were additive to those of spastin. In cells depleted of dpy30 CI-MPR traffic from endosomes to Golgi was reduced, but there were no effects upon either lysosome size or lysosomal CI-MPR accumulation. In cells depleted of both dpy30 and spastin no differences in phenotype severity were observed for CI-MPR endosome to Golgi traffic, or accumulation in lysosomes compared to spastin depletion alone. However, a surprising result was obtained when lysosomal size was examined, where we observed that additional dpy30 depletion in cells lacking spastin reduced lysosomal size. The same effect upon lysosomes was seen when other members of the COMPASS complex were depleted.

As previous work has suggested dpy30 is involved in Golgi export as well as in endosome to Golgi traffic one cause for this reduction in lysosomal enlargement could be the failure to deliver membrane from the Golgi to endolysosomes. This would be predicted to have an additive deleterious effect with spastin upon lysosomal enzyme delivery, but would at the same time reduce lysosomal size. Further work is planned to characterise the role of dpy30 in Golgi exit, and its involvement in lysosomal biogenesis.

## Zusammenfassung 50

### Epistatische Effekte beeinflussen SPG4 HSP Manifestationsalter (Vortrag)

*Timothy Newton<sup>1</sup>, Fiamma Berner<sup>1</sup>, Rachel Allison<sup>1</sup>, Christian Beetz<sup>2</sup>, Evan Reid<sup>1</sup> 1: Cambridge Institute for Medical Research, Cambridge Biomedical Campus der University of Cambridge, UK 2: Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Jena, Jena, Deutschland.*

Patienten mit SPG4 Haploinsuffizienz eine große Variation im Alter von Beginn der HSP Symptome haben, von der Kindheit bis zum späteren Erwachsenenleben. Eine merkwürdige Beobachtung ist, dass Patienten mit einer ganzen Exon-Deletionen in SPG4 im Vergleich eine deutlich früher Alter bei Beginn der HSP Symptome haben 52 solche mit Punktmutationen. In einer Zusammenarbeit zwischen dem Reid und Beetz Labs, Mipa (MLPA) zeigten, dass diese Deletionen in der Promotorregion und 5'-Exons eines benachbarten Gens, DPY30. Patients mit Deletionen auch beteiligt DPY30 hatte einen früheren Beginn verlängern von HSP im Vergleich mit einer Deletion an Patienten SPG4 alleine zu beeinflussen. Dieser Befund legt nahe, dass es eine Effekt epistatische zwischen SPG4 und DPY30, die für die beobachtete früheres Einsetzen in Patienten mit genomische Deletionen gesehen ausmacht.

DPY30 kodiert dpy30, am besten als Mitglied des COMPASS-Komplex in Histon-Methylierung beteiligt gekennzeichnet. Allerdings Erschöpfung der dpy30 führt auch zu einer Fehllokalisierung von CIMPR, ein Rezeptor, der Zyklen zwischen dem Golgi und um Endosomen lysosomale Enzyme zu transportieren. Interessanterweise haben wir auch eine Rolle für Spastin identifiziert, kodiert durch SPG4, in Endosomen zu Golgi-Verkehr. Im Falle von Spastin Verarmungs CI-MPR akkumuliert in vergrößertem Lysosomen. Unsere Hypothese lautet daher, dass additive Wirkungen auf den Endosomen zu Golgi Handel Weg, der lysosomalen Biogenese betroffen sind, kann die scheinbare epistatische Wirkung zwischen SPG4 und DPY30 erklären.

Zur Untersuchung dieser Hypothese, die wir getestet, ob dpy30 Verarmungs Lysosom Größe betroffen oder den Verkehr und die Lokalisierung von CI-MPR, und ob irgendwelche Effekte waren Zusatz zu denen von Spastin. In den Zellen von dpy30 CI-MPR-Verkehr von Endosomen Golgi reduziert wurde aufgebraucht, aber es gab keine Auswirkungen auf entweder Lysosom Größe oder lysosomalen CI-MPR Akkumulation. In Zellen, die beide dpy30 verarmt und Spastin keine Unterschiede im Phänotyp Schwere für beobachtet CI-MPR Endosomen zu Golgi Verkehr oder Akkumulation in Lysosomen im Vergleich zu Spastin Erschöpfung allein. Es wurde jedoch ein überraschendes Ergebnis erhalten, wenn lysosomalen Größe untersucht wurde, in dem wir festgestellt, dass zusätzliche dpy30 Verarmungs in Zellen ohne Spastin lysosomalen Größe reduziert. Der gleiche Effekt auf Lysosomen wurde gesehen, wenn andere Mitglieder des COMPASS-Komplex erschöpft waren.

Wie schon in früheren Arbeiten dpy30 vorgeschlagen hat, wird in Golgi-Export sowie in Endosomen zu Golgi-Verkehr eine Ursache für diese Verringerung der lysosomalen Erweiterung könnte sein, das Scheitern zu liefern Membran vom Golgi zu Endolysosomen beteiligt. Dies würde vorausgesagt werden, ein Additiv schädliche Wirkung mit Spastin auf lysosomalen Enzyms Lieferung zu haben,

aber zugleich würde lysosomalen Größe reduzieren. Weitere Arbeiten sind geplant, um die Rolle der dpy30 in Golgi-Ausgang, und seine Beteiligung an lysosomalen Biogenese zu charakterisieren.

---

## Abstract 58

### Hereditary spastic paraplegia and hereditary ataxia in Norway – overview of a patient material from southeast Norway (Poster session II)

*Siri Lynne Rydning \* 1,2, Iselin M. Wedding \* 1,2, Ann-Helen Richvoldsen 2, Jeanette A. Koht 2,3, Kaja K. Selmer 2,4, Chantal M. E. Tallaksen 1,2* 1 Department of Neurology, Oslo University Hospital, Norway; 2 Faculty of Medicine, University of Oslo, Norway; 3 Department of Neurology, Vestre Viken Hospital Trust, Norway; 4 Department of Medical Genetics, Oslo University Hospital, Norway; \* Equal contribution

**Background and methods:** Patients with hereditary ataxia (HA) and hereditary spastic paraplegia (HSP) are systematically investigated using SPATAX schemes, and included in a research database at Oslo University Hospital, Ullevål. In 2008 the prevalence of these disorders in southeast Norway was estimated to 14.9:100.000; 6.5:100.000 for HA and 7.4:100.000 for HSP. The proportions with molecular diagnosis were 25% (22/87) for HA and 37% (32/65) for HSP (Erichsen et al, Brain, 2009). Molecular investigations have been done continuously, traditionally by a single gene approach, recently with gene panel sequencing available.

**Results:** In total 746 individuals with HA or HSP were included, by March 30th, 2016. Sixtyeight of the 267 HA-probands (25%) and 107 of the 230 HSP-probands (47%) have a molecular diagnosis. The most common AD-HSPs are SPG4 (56 probands), SPG3A (9) and SPG31 (5). The AR-HSPs are SPG11 (7), SPG7 (6), SPG5A (3) and single probands with SPG10, SPG 18, SPG39 and SPG46. For HA, the diagnoses of ADCA are SCA3 (4), SCA 1 (3), SCA14 (2), and single probands with SCA2, SCA5, SCA6, OPA1 and benign hereditary chorea. The most common ARCAs are Friedreich ataxia (24) and Ataxia-telangiectasia (12). Of the undiagnosed 124 HSP and 198 HA-probands, 68% of HSPs are sporadic, 27% AD and 5% AR. All AR-HSP show a complex phenotype, 60% of the AD and sporadic groups have a pure spastic paraparesis. Within the HAs, 57% were sporadic, 29% were AD and 12% were AR. 68% of the sporadic cases and 50% of the dominant cases showed a pure cerebellar ataxia, while all ARCAs were clinically complex.

**Discussion:** Only 20% of the dominant HA have a molecular diagnosis, with only 17% (12) being polyQ-SCA, as opposed to 80% polyQ-SCA in Central Europe. Many of the Norwegian ADCA patients have mild phenotypes consistent with conventional mutation SCAs. FRDA, the most frequent ARCA in Europe, is also less frequent in Norway, with a prevalence in Norway of 1:176 000, interestingly closely corresponding to estimates from migration studies. However, regarding HSP epidemiology, the molecular distribution is the same as reported from the rest of Europe. Founder effects are found for a novel SPG7 mutation, in addition to the A-T mutation originated in Hedmark County.

**Conclusion/further work:** The Norwegian HSP and HA are well characterized and 35% have a molecular diagnosis. The introduction of gene panel sequencing is currently increasing the number of rarer forms of HSPs and HAs. To increase the diagnostic yield and for further studies we are interested in international collaboration.

## Zusammenfassung 58

### Hereditäre spastische Paraplegie und erbliche Ataxie in Norwegen - Überblick über ein Patientenmaterial aus Südost Norwegen (Poster Session II)

*Siri Lynne Rydning \* 1,2, Iselin M. Hochzeit \* 1,2, Ann-Helen Richvoldsen 2, Jeanette A. Koht 2,3, Kaja K. Selmer 2,4, Chantal ME Tallaksen 1,2 1 Klinik für Neurologie, Oslo University Hospital, Norwegen; 2 Medizinische Fakultät, Universität Oslo, Norwegen; 3 Klinik für Neurologie, Vestre Viken Hospital Trust, Norwegen; 4 Abteilung für Medizinische Genetik, Universitätsklinikum Oslo, Norwegen; \* Equal Beitrag*

**Hintergrund und Methoden:** Patienten mit erblichen Ataxie (HA) und Spastische Paraplegie (HSP) werden systematisch mit SPATAX Regelungen untersucht und in einer Forschungsdatenbank in Oslo University Hospital, Ullevål enthalten. Im Jahr 2008 wurde die Prävalenz dieser Erkrankungen im Südosten von Norwegen schätzungsweise 14,9: 100.000; 6,5: 100.000 für HA und 7,4: 100.000 für HSP. Die Proportionen mit der molekularen Diagnostik waren 25% (22/87) für HA und 37% (32/65) für HSP (Erichsen et al, Gehirn, 2009). Molekulare Untersuchungen wurden zur Verfügung kontinuierlich, die traditionell von einem einzigen Gen-Ansatz, die vor kurzem mit Gen-Panel-Sequenzierung durchgeführt.

**Ergebnisse:** Insgesamt 746 Personen mit HA oder HSP enthalten waren, bis zum 30. März 2016. Sixtyeigth der 267 HA-Probandinnen (25%) und 107 der 230 HSP-Probandinnen (47%) haben eine molekulare Diagnostik. Die häufigste AD-HSPs sind SPG4 (56 Probandinnen), SPG3A (9) und SPG31 (5). Die AR-HSPs sind SPG11 (7), SPG7 (6), SPG5A (3) und einzelnen Probanden mit SPG10, SPG 18, SPG39 und SPG46. Für HA sind die Diagnosen von ADCA SCA3 (4), SCA 1 (3), SCA14 (2), und einzelne Probanden mit SCA2, SCA5, SCA6, OPA1 und gutartige erbliche Chorea. Die häufigsten Arcas sind Friedreich-Ataxie (24) und Ataxie-Teleangiektasie (12). Von den nicht diagnostizierten 124 HSP und 198 HA-Probandinnen, 68% der HSPs sind sporadisch, 27% AD und 5% AR. Alle AR-HSP zeigen einen komplexen Phänotyp, 60% der AD und sporadischen Gruppen haben eine reine spastischen Spinalparalyse. Innerhalb der HAs, 57% waren sporadisch, 29% waren AD und 12% waren AR. 68% der sporadischen Fälle und 50% der dominanten Fälle zeigten eine reine Ataxie, während alle Arcas klinisch komplex waren.

**Diskussion:** Nur 20% der dominanten HA haben eine molekulare Diagnostik, mit nur 17% (12) being polyQ-SCA, wie in Mitteleuropa zu 80% polyQ-SCA gegenüber. Viele der norwegischen ADCA Patienten haben milde Phänotypen in Übereinstimmung mit herkömmlichen Mutation SCAs. FRDA, die häufigste ARCA in Europa, ist auch weniger häufig in Norwegen, mit einer Prävalenz in Norwegen von 1: 176 000, interessanterweise in engem Zusammenhang mit Schätzungen von Migrationsstudien entspricht. Jedoch bezüglich HSP Epidemiologie, die molekulare Verteilung ist die gleiche wie von dem Rest von Europa berichtet. Gründer Effekte sind für eine neuartige SPG7 Mutation, zusätzlich zu der A-T-Mutation entstanden in Hedmark County gefunden.

**Schlussfolgerung / Weiterarbeit:** Die norwegische HSP und HA sind gut charakterisiert und 35% haben eine molekulare Diagnostik. Die Einführung von Gen-Panel-Sequenzierung Derzeit steigt die

Anzahl der selteneren Formen der HSP und hat. Um die diagnostische Ausbeute zu erhöhen und für weitere Studien sind wir in der internationalen Zusammenarbeit interessiert.

---

## Abstract 64

### **Congenital perceptive deafness and progressive spastic paraplegia: an unusual association (Poster session II)**

*L. Ruaud (1)(2), C. Cabrol (1)(2), F. Ziegler (3), E. Brischoux-Boucher(1)(2), J. Piard (1)(2), L. Van Maldergem (1)(2) (1) Génétique humaine, CHRU Besançon ; (2) Université de Franche-Comté ; (3) Neurologie, CHI Vesoul*

We present the clinical history of a 39 year-old female patient affected by a concomitant singular association of progressive spastic paraplegia and progressive deafness both starting at 11 years. Alongside with her slowly progressive hearing and motor impairment, primary amenorrhea and partial temporal epilepsy were observed. Her intellectual abilities are normal. Her seizures started at 14 years and were responsive to valproate. Whereas pubarche and thelarche development was normal, she had primary amenorrhea with cycle induction from age 19 years. Spasticity was severe. Palmar keratosis was noted at 39 years. A cochlear implant, received at the age of 35 years resulted in a satisfying recovery. Brain and spinal cord MRI are unremarkable. Skull CT scan performed at 20 years showed a bilateral dilatation of vestibular aqueduct. Hypoplasia of optic disks is noted. A search for inborn errors of metabolism remained uncontributive. Although observed in a single patient, the current association does not correspond to any known entity, to the best of our knowledge, and would benefit from further molecular investigation.

## Zusammenfassung 64

### **Angeborene Taubheit und progressive perceptive spastische Paraplegie: eine ungewöhnliche Assoziation (Poster Session II)**

*L. Ruaud (1) (2), C. Cabrol (1) (2), F. Ziegler (3), E. Brischoux-Boucher (1) (2), J. Piard (1) (2), L Van Maldergem (1) (2) (1) Génétique humaine, CHRU Besançon. (2) Université de Franche-Comté; (3) Neurologie, CHI Vesoul*

Wir präsentieren die klinische Geschichte einer 39-jährige Patientin betroffen durch eine gleichzeitige singulären Vereinigung der progressiven spastische Paraplegie und progressive Taubheit beide ab 11 Jahren. Neben ihr langsam progredienter Schwerhörigkeit und motorischen Beeinträchtigungen, primäre Amenorrhoe und partielle zeitliche Epilepsie beobachtet. Ihre intellektuellen Fähigkeiten sind normal. Ihre Anfälle begann mit 14 Jahren und waren als Reaktion auf Valproat. Während Pubarche und Thelarche Entwicklung normal war, hatte sie primäre Amenorrhoe mit Zyklus Induktion ab dem Alter von 19 Jahren. Spastik war streng. Palmar Keratose wurde auf 39 Jahre festgestellt. Ein Cochlea-Implantat erhielt im Alter von 35 Jahren in einem befriedigenden Erholung geführt. Gehirn und Rückenmark MRT sind unauffällig. Schädel-CT mit 20 Jahren durchgeführt, zeigte eine bilaterale Dilatation von vestibulären Aquädukt. Hypoplasie von optischen Platten wird zur Kenntnis genommen. Eine Suche nach angeborenen Stoffwechselstörungen blieb uncontributive. Obwohl bei einem

einzelnen Patienten beobachtet, entsprechen der aktuellen Zuordnung zu jedem bekannten Unternehmen nicht, auf bestem Wissen und würde von einer weiteren molekularen Untersuchung profitieren.

---

## Abstract 65

### Next generation sequencing of a large panel of genes highlights the genetic heterogeneity in hereditary spastic paraplegias (Oral presentation)

*Sara Morais (1-8), Laure Raymond (4-8), Mathilde Mairey (4-8), Paula Coutinho (1,2), Eva Brandão (10), Paula Ribeiro (10), José Leal Loureiro (10), Jorge Sequeiros (1-3), Alexis Brice (4-7), Isabel Alonso (1-3\*), Giovanni Stevanin (4-9\*) 64 1- UnIGENE, Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Universidade do Porto, Portugal 2- Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Portugal 3- Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Portugal 4- INSERM, U 1127, F-75013, Paris, France 5- CNRS, UMR 7225, F-75013, Paris, France 6- Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR5\_1127, F-75013, Paris, France 7- Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013, Paris, France 8- Ecole Pratique des Hautes Etudes, EPHE, PSL université, F-75013, Paris, France 9- APHP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Département de Génétique, F-75013, Paris, France 10- Serviço de Neurologia, Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, Santa Maria da Feira, Portugal \*Both authors contributed equally to this work*

Hereditary spastic paraplegias (HSP) are a heterogeneous group of neurodegenerative disorders characterized by lower limb spasticity and weakness that can be complicated by other neurological or non-neurological signs/symptoms. Genetically, HSP have four modes of inheritance described and more than 70 genes already associated with the disease. Despite this high number of identified genes, approximately 40 to 60% of the families persist without molecular diagnosis predicting higher genetic heterogeneity.

In Portugal, a cohort of 193 unrelated families with spastic paraplegia has been collected and 98 of them remained without molecular diagnostic after screening the most frequently mutated HSP genes. In order to identify the disease-causing mutation in these families, we used custom next generation sequencing panels to search for mutations in up to 70 known or candidate HSP genes.

In these 98 families we identified the responsible mutation in 21, resulting in a frequency of 21,4%. When considering the full cohort of families the mutation was identified in 42% of them. In 36,7% of the 98 patients we found variants of unknown significance for which conclusion could not be reached based on our current knowledge. Our results demonstrate the importance of testing families with all modes of inheritance for the same set of genes as illustrated by heterozygous mutations in KIF1A or SPG7, and also the importance of testing genes causing overlapping phenotypes. Also, considering novel modes of inheritance or oligogenism among the VUS might help in the future to solve the remaining cases.

Nonetheless, the frequency of families diagnosed is low even taking into consideration that the most frequently mutated HSP genes were previously screened for mutations in these families. These results show that there is still a large set of genes responsible for spastic paraplegia and probably novel mechanisms leading to the disease to be uncovered.

## Zusammenfassung 65

### Next Generation Sequenzierung einer großen Gruppe von Genen, unterstreicht die genetische Heterogenität in hereditären spastischen Paraplegie (Vortrag)

*Sara Morais (1-8), Laure Raymond (4-8), Mathilde Mairey (4-8), Paula Coutinho (1,2), Eva Brandão (10), Paula Ribeiro (10), José Leal Loureiro (10) Jorge, Sequeiros (1-3), Alexis Brice (4-7), Isabel Alonso (1-3 \*), Giovanni Stevanin (4-9 \*) 64 1- UNIGENE, Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Universidade do Porto, Portugal 2- Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Portugal 3- Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Portugal 4- INSERM, U 1127, F-75013, Paris, Frankreich 5- CNRS, UMR 7225, F-75013, Paris, Frankreich 6- Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMRS\_1127, F-75013, Paris, Frankreich 7- Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013, Paris, Frankreich 8- Ecole Pratique des Hautes Etudes, EPHE, PSL Université, F-75013, Paris, Frankreich 9- APHP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Département de Génétique, F-75013, Paris, Frankreich 10- Serviço de Neurologia, Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, Santa Maria da Feira, Portugal \* Beide Autoren trugen gleichermaßen zu dieser Arbeit*

Hereditäre spastische Paraplegie (HSP) sind eine heterogene Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, die durch unteren Gliedmaßen Spastik und Schwäche gekennzeichnet, die durch andere neurologische oder nicht-neurologische Zeichen / Symptome kann kompliziert sein. Genetisch, HSP haben vier Erbgänge beschrieben und mehr als 70 Gene bereits mit der Krankheit in Verbindung gebracht. Trotz dieser hohen Zahl der identifizierten Gene, etwa 40 bis 60% der Familien bestehen, ohne molekulare Diagnostik höhere genetische Heterogenität der Vorhersage.

In Portugal, eine Kohorte von 193 nicht verwandten Familien mit spastischer Paraplegie wurde gesammelt und 98 von ihnen blieben ohne molekulare Diagnostik nach der am häufigsten mutierten Gene HSP-Screening. Um die krankheitsverursachende Mutation in diesen Familien zu identifizieren, haben wir individuelle Next Generation Sequencing-Panels für Mutationen in bis zu 70 bekannt oder Kandidaten HSP-Gene zu suchen.

In diesen Familien 98 identifizierten wir die verantwortliche Mutation in 21, in einer Frequenz von 21,4% ergibt. Wenn die volle Kohorte von Familien erwäge die Mutation in 42% von ihnen identifiziert. In 36,7% der 98 Patienten fanden wir Varianten von unbekannter Bedeutung für die Schlussfolgerung nicht auf unserem derzeitigen Kenntnisstand erreicht werden konnte. Unsere Ergebnisse zeigen, wie wichtig es Familien von Tests mit allen Erbgänge für den gleichen Satz von Genen, wie durch heterozygote Mutationen in KIF1A oder SPG7 dargestellt, und auch die Bedeutung der Gene testen überlappende Phänotypen verursachen. Auch helfen könnten in Zukunft neue Erbgänge oder oligogenism unter den VUS unter Berücksichtigung der übrigen Fälle zu lösen.

Dennoch diagnostiziert die Häufigkeit der Familien ist gering, auch in Betracht gezogen, dass die am häufigsten mutierte HSP-Gene in diesen Familien für Mutationen zuvor gezeigt wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass es noch eine große Anzahl von Genen, die für spastische Paraplegie und wahrscheinlich neue Mechanismen, die zu der Krankheit aufgedeckt werden.

## Abstract 67

### **Pigmentary degenerative maculopathy as prominent phenotype in an Italian SPG56/CYP2U1 family (Poster session II)**

*Luca Leonard, Lucia Ziccardi, Christian Marcotulli, Anna Rubegni, Antonino Longobardi, Mariano Serrao, Eugenia Storti, Francesco Pierelli, Alessandra Tessa, Vincenzo Parisi, Filippo Maria Santorelli, Carlo Casali Department of SBMC, Sapienza University Rome, Rome, Italy. IRCCS "G.B. Bietti" Foundation, Neurophysiology of Vision and Neurophthalmology Unit, Rome, Italy. Molecular Medicine, IRCCS Stella Maris, Pisa, Italy. IRCCS-Neuromed, Pozzilli, IS, Italy.*

SPG56 is an autosomal recessive form of hereditary spastic paraplegia (HSP) associated with mutations in CYP2U1. There is no clear documentation of visual impairment in the few reported cases of SPG56, although this form is complex on clinical ground and visual deficit are extremely frequent in complicated HSP. We report three patients from a consanguineous family harboring the novel homozygous c.1168C>T (p.R390\*) in SPG56/CYP2U1, and showing a pigmentary degenerative maculopathy associated with progressive spastic paraplegia. Furthermore, we characterized precisely the ophthalmologic phenotype through indirect ophthalmoscopy, retinal optical coherence tomography and visual evoked potentials. This is the first formal report of pigmentary degenerative maculopathy associated with a CYP2U1 homozygous mutation.

## Zusammenfassung 67

### **Pigmentäres degenerative Makulopathie als prominente Phänotyp in einer italienischen SPG56 / CYP2U1 Familie (Poster Session II)**

*Luca Leonard, Lucia Ziccardi, Christian Marcotulli, Anna Rubegni, Antonino Longobardi, Mariano Serrao, Eugenia Storti, Franc Pierelli, Alessandra Tessa, Vincenzo Parisi, Filippo Maria Santorelli, Carlo Casali Institut für SBMC, Sapienza Universität Rom, Rom, Italien. IRCCS "G. B. Bietti" Stiftung Neurophysiologie des Sehens und Neurophthalmologie Einheit, Rom, Italien. Molekulare Medizin, IRCCS Stella Maris, Pisa, Italien. IRCCS-Neuromed, Pozzilli, IS, Italien.*

SPG56 ist eine autosomal-rezessive Form der hereditären spastischen Paraplegie (HSP) mit Mutationen in CYP2U1 verbunden. Es gibt keine klare Dokumentation der Sehbehinderung in den wenigen berichteten Fälle von SPG56, obwohl diese Form komplex ist auf die klinische Boden und visuelle Defizit extrem häufig sind in komplizierten HSP. Wir berichten über drei Patienten aus einer blutsverwandten Familie den Roman homozygot c.1168C Beherbergung> T (p.R390 \*) in SPG56 / CYP2U1 und eine pigment degenerative Makulopathie mit progressiver spastischer Paraplegie assoziiert zeigt. Darüber hinaus sind wir für genau die ophthalmologische Phänotyp durch indirekte Ophthalmoskopie, Retinal die optische Kohärenztomographie und visuell evozierten Potentiale. Dies ist der erste offizielle Bericht von pigment degenerative Makulopathie mit einer homozygote Mutation CYP2U1 verbunden.

---



## Abstract 71

### Functional analysis of the axonopathy related mutation N88S in seipin (Poster session II)

*Simon Schumacher<sup>1</sup>, Elena I. Rugarli<sup>1 2 3 1</sup> Institute for Genetics, University of Cologne <sup>2</sup>Center of Molecular Medicine (CMMC), University of Cologne <sup>3</sup>Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), University of Cologne*

Seipin is an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein which consists of 398 or 462 amino acids. Seipin is conserved during evolution and is highly expressed in brain and testis. Loss of function mutations are associated with a rare autosomal recessive form of lipodystrophy. Interestingly, two missense mutations in the seipin gene BSCL2 disrupting the glycosylation site at amino acid 88 and 90 of the seipin protein are associated with hereditary spastic paraplegia (HSP), a progressive neurological disorder. HSP patients suffer from weakness of the lower limbs which is ultimately caused by the degeneration of the axons of the corticospinal tract. However, the reason why axons degenerate remains to be elucidated. Experiments in yeast and other model organisms suggest that seipin plays a crucial role in lipid droplet (LD) formation. Furthermore, it is believed that expression of N88S-seipin leads to aggregates in the ER, which cause ER stress and could ultimately lead to the degeneration of the neurons.

We found that WT-seipin inhibits the formation of LDs, whereas the expression of the misfolded N88S mutant caused an increase in the cellular LD amount. These abnormalities in cellular LD number was accompanied with lower (WT-seipin) or higher (N88S-seipin) triacylglycerol (TAG) and cholesteryl ester (CE) levels in the LDs. Additionally, N88S-seipin aggregates at domains in the ER membrane, which are in close proximity to LDs. Interestingly, proteomic analysis and coimmunoprecipitation experiments revealed a direct interaction of both WT-seipin and N88S-seipin with the ER resident protein ER lipid raft associated 2 (ERLIN2). ERLIN2 forms high molecular homo- and heteromeric complexes together with its homolog ERLIN1. These complexes are believed to localize specifically to lipid rafts, which are tightly packed ER domains consisting of sphingolipids and cholesterol. The erlins were shown to play a role in the ERAD (endoplasmic reticulum associated degradation) of proteins, and have been implicated in HSP. The functional significance of the interaction between seipin and erlins is currently under investigation.

## Zusammenfassung 71

### Funktionelle Analyse der Axonopathie bezogenen Mutation N88S in seipin (Poster Session II)

*Simon Schumacher<sup>1</sup>, Elena I. Rugarli<sup>1 2 3 1</sup> Institut für Genetik der Universität zu Köln <sup>2</sup>Center für Molekulare Medizin (ZMMK), Universität Köln <sup>3</sup>Cologne Exzellenzcluster auf zelluläre Stressantworten in Aging-assoziierten Erkrankungen (CECAD), Universität zu Köln*

Seipin ist ein endoplasmatisches Reticulum (ER) Membranprotein, das aus 398 oder 462 Aminosäuren besteht. Seipin wird während der Evolution konserviert und ist stark in Gehirn und Hoden exprimiert. Funktionsverlust-Mutationen sind mit einer autosomal-rezessiv vererbte Form von

Lipodystrophie. Interessanterweise zwei Missense-Mutationen in dem Gen seipin BSCL2 die Glykosylierungsstelle an Aminosäure 88 und 90 des seipin Protein zu stören mit erblicher spastischer Paraplegie (HSP) verbunden ist, eine fortschreitende neurologische Störung. HSP-Patienten leiden unter Schwäche der unteren Extremitäten, die letztlich durch die Degeneration der Axone des Tractus corticospinalis verursacht wird. Jedoch ist der Grund, warum Axone Reste degeneriert werden erläutert. Experimente in der Hefe und anderen Modellorganismen legen nahe, dass seipin eine entscheidende Rolle bei der Lipidtröpfchen (LD) Bildung spielt. Darüber hinaus wird angenommen, dass die Expression von N88S-seipin zu Aggregaten in der ER führt die ER Stress verursachen und letztlich zur Degeneration der Neuronen führen könnte.

Wir fanden, dass WT-seipin die Bildung von LDs hemmt, wohingegen die Expression des misfolded N88S Mutante eine Erhöhung der zellulären Menge LD verursacht. Diese Anomalien in zellulären LD-Zahl wurde mit niedriger (WT-seipin) oder höher (N88S-seipin) Triacylglycerol (TAG) und Cholesterylester (CE) Niveaus in den LDs begleitet. Zusätzlich N88S-seipin Aggregate an Domänen in 69 der ER-Membran, die LDs in unmittelbarer Nähe sind. Interessanterweise ergab Proteomanalyse und Koimmunpräzipitation Experimente eine direkte Interaktion der beiden WT-seipin und N88Sseipin mit dem ER-Protein ER Lipid Raft 2 zugeordnet (ERLIN2). ERLIN2 bildet hochmolekularen Homo- und heteromeren Komplexe zusammen mit seinem Homolog ERLIN1. Diese Komplexe sind vermutlich spezifisch an Lipid Rafts zu lokalisieren, die dicht gepackten ERdomains sind, die aus Sphingolipiden und Cholesterin. Die erlins wurden eine Rolle in der ERAD (endoplasmatischen Retikulum Abbau) von Proteinen zu spielen gezeigt und sind in HSP verwickelt. Die funktionelle Bedeutung der Wechselwirkung zwischen seipin und erlins wird derzeit untersucht.

---

## Abstract 72

### Exon analysis of 74 genes potentially involved in Hereditary Spastic Paraplegias through targeted next generation sequencing (Poster session II)

*Livia Parodi (A), Mathilde Mairey (A,B), Rémi Valter (A,B), Laure Raymond (A, B, C), Sara Morais (A,B,D), Claire-Sophie Davoine (A), Emeline Mundwiller (A), Guillaume Banneau (C), Eric Leguern (A,C), Yannick Marie (A), Alexis Brice (A), Alexandra Durr (A,C), Giovanni Stevanin (A,B,C) A-Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6 UMR1127, INSERM U1127, CNRS UMR7225), Paris, France B- Equipe de Neurogénétique, Ecole Pratique des Hautes Etudes, PSL Université, Paris, France C- Fédération de Génétique, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France D- UnIGENE, IBMC, Porto, Portugal*

Hereditary spastic paraplegias (HSP) are a group of hereditary neurological diseases caused by progressive degeneration of the corticospinal tracts. They are genetically heterogeneous (76 loci and 59 genes; spastic paraplegia genes, SPG) and are inherited through all known inheritance patterns accounting for a prevalence of 1-5:100 000 in most populations. HSPs are characterized by spastic gait, hyperreflexia, extensor plantar responses and proximal weakness, as the result of lesions in the first motor neuron. The second motor neuron can as well be affected and a cerebellar syndrome is frequently associated, as well as other neurological and extra-neurological signs. This heterogeneity makes classical molecular tests time-consuming and difficult to interpret, and that's why our

laboratory decided to develop a kit that couples a targeted capture and next generation sequencing to analyse 74 genes potentially involved in HSPs.

The kit has been used to sequence and analyse a 283 index patients (218 patients belonging to the SPATAX cohort including 153 French and 98 Portuguese patients, together with 32 Italian patients).

DNA libraries were prepared through KAPA library preparation kit (KAPA Biosystems). The panel included the target regions probes (1042 regions) corresponding to all coding exons belonging to 74 HSP genes and was designed by Roche-NimbleGen (SeqCap EZ). The DNA sequencing was realized using the MiSeq or NextSeq sequencers (Illumina). The alignment and variants detection were done through the Genomics Workbench software (CLC bio, Qiagen). Variants were filtered and prioritized, then verified through Sanger sequencing on patients and on other family members, in order to establish the segregation patterns.

A gene responsible for the disease phenotype was identified in 33,1% of the patients overall analysed. For 36,4% of the patients, no pathogenic variant could be detected. One or more variants with unknown significance was identified among 30,5% of the cohort; in these cases the actual knowledge regarding the gene involved didn't allow to draw a conclusion regarding a possible pathogenic effect, and therefore its role in HSP onset. In addition, we identified a series of 8 patients carrying heterozygous variants in the motor domain of KIF1A inherited in a dominant pattern or de novo which contrast with the classical recessive transmission mode of this gene in SPG30.

Through the coupling of targeted capture and next generation sequencing it was possible to increase the molecular diagnostic rate if compared to more classical strategies based on decision tree and followed by genetic analysis according to the transmission modes. The 70 sequencing of our 283 patients cohort therefore show the importance of testing the same set of genes in patients with different transmission patterns, allowing the detection of multiple and unexpected transmission pathways.

## Zusammenfassung 72

### Exon-Analyse von 74 Genen möglicherweise beteiligt in Hereditäre Spastische Paraplegie durch gezielte Sequenzierung der nächsten Generation (Poster Session II)

*Livia Parodi (A), Mathilde Mairey (A, B), Rémi Valter (A, B), Laure Raymond (A, B, C), Sara Morais (A, B, D), Claire-Sophie Davoine (A), Emeline Mundwiller (A), Guillaume Banneau (C), Eric Leguern (A, C), Yannick Marie (A), Alexis Brice (A), Alexandra Durr (A, C), Giovanni Stevanin (A, B, C) A -Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6 U1127, INSERM U1127, CNRS UMR7225), Paris, Frankreich B- Equipe de Neurogénétique, Ecole Pratique des Hautes Etudes, PSL Université, Paris, Frankreich C- Fédération de Génétique, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, Frankreich D- UNIGENE, IBMC, Porto, Portugal*

Hereditäre spastische Paraplegie (HSP) sind eine Gruppe von erblichen neurologischen durch fortschreitende Degeneration der corticospinal Wege verursachten Krankheiten. Sie sind genetisch heterogen (76 Loci und 59 Gene, spastische Paraplegie Gene, SPG) und werden durch alle bekannten Vererbungsmuster Bilanzierung von einer Prävalenz von 1-5 geerbt: 100 000 in den meisten Populationen. HSPs werden von spastischer Gang, Hyperreflexie, extensor plantar Antworten und proximal Schwäche, als Folge von Läsionen in dem ersten motorischen Neurons gekennzeichnet.

Der zweite Motor Neuron kann ebenfalls betroffen sein und ein zerebelläre Syndrom wird häufig verbunden sind, sowie andere neurologische und außer neurologische Symptome. Diese Heterogenität macht klassische molekulare Tests zeitraubend und schwierig zu interpretieren, und das ist, warum unser Labor ein Set, das Paare eine gezielte Erfassung und Sequenzierung der nächsten Generation zu entwickeln, entschieden 74 Gene zu analysieren potenziell in HSPs beteiligt.

Das Kit wurde verwendet, um eine 283-Index-Patienten (mit 32 italienischen Patienten gehört zur SPATAX Kohorte mit 153 Französisch und 98 portugiesischen Patienten zusammen 218 Patienten) zu sequenzieren und zu analysieren.

DNA libraries wurden durch KAPA Bibliothek Vorbereitung Kit (KAPA Biosystems) hergestellt. Auf dem Podium die Zielregionen Sonden (1042 Regionen) entsprechend allen kodierenden Exons Zugehörigkeit zu 74 HSP-Gene und wurde von Roche-NimbleGen (SeqCap EZ) ausgelegt. Die DNA-Sequenzierung wurde realisiert die MiSeq oder NextSeq Sequenziermaschinen (Illumina). Die Ausrichtung und Varianten Erkennung wurden durch die Genomics Workbench Software (CLC bio, Qiagen) durchgeführt. Varianten wurden gefiltert und priorisiert werden, dann durch die Sanger-Sequenzierung an Patienten überprüft und auf andere Familienmitglieder, um die Segregationsmuster herzustellen.

Ein Gen für die Krankheit verantwortlich Phänotyp wurde in 33,1% der Patienten insgesamt analysiert identifiziert. Für 36,4% der Patienten konnte keine pathogene Variante nachgewiesen werden. Ein oder mehrere Varianten mit unbekannter Signifikanz wurde unter 30,5% der Kohorte identifiziert; in diesen Fällen ist die tatsächliche Wissen in Bezug auf das Gen beteiligt war es nicht möglich eine Aussage über eine mögliche pathogene Wirkung zu ziehen und damit in HSP Beginn seiner Rolle. Außerdem identifizierten wir eine Reihe von 8 Patienten heterozygote Varianten in der Motordomäne von KIF1A in einem dominant vererbt Tragen oder de novo die im Kontrast mit dem klassischen rezessiven Sendemodus dieses Gens in SPG30.

Durch die Kopplung der gezielten Erfassung und Sequenzierung der nächsten Generation war es möglich, die molekulare Diagnoserate zu erhöhen, wenn im Vergleich zu klassischen Strategien basierend auf Entscheidungsbaum und durch genetische Analyse gefolgt nach den Übertragungsarten. Die 70-Sequenzierung der 283 Patienten Kohorte zeigen somit die Bedeutung der den gleichen Satz von Genen in Patienten mit unterschiedlichen Übertragungsmuster zu testen, so dass die Detektion von mehreren und unerwartete Übertragungswege.

## Abstract 77

### The role of Spastin in Lipid Droplet metabolism and its relevance to Hereditary Spastic Paraplegia (Poster session II)

*Nimesha Tadeppalle* 1, 2, *Chrisovalantis Papadopoulos* 1, 2, *Elena Rugarli* 1, 2, 3 *Institute for Genetics, University of Cologne, Germany; 2Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in AgingAssociated Diseases (CECAD), Cologne, Germany; 3Center for Molecular Medicine (CMMC), University of Cologne, Cologne, Germany.*

Hereditary spastic paraplegia (HSP) is a progressive neurodegenerative disease characterized by lower limb spasticity and weakness. It is caused by the dying back of the corticospinal axons in the central nervous system. Most of the autosomal dominant cases of this disease have mutations in the gene SPAST, encoding for spastin, a conserved microtubule severing protein belonging to the AAA (ATPases Associated with various cellular Activities) family. Spastin plays a role in midbody abscission, spindle disassembly, neurite branching and endosomal tubulation. Spastin is mainly present in two isoforms, M1 and M87 including or excluding an N-terminal hydrophobic region, respectively. It has been shown earlier that spastin-M1 is targeted to lipid droplets upon overexpression. Lipid droplets (LDs) are intracellular organelles that originate from the ER. They contain a neutral lipid core of triacylglycerol (TAG) and cholesterol esters (CE) and a monolayer of phospholipids. In this study we generated a spastin knock-out cell line by CRISPR-Cas9 technology in NSC34 cells. We show that spastin knock-out cells upon starvation upregulated the LD-associated protein PLIN2 and the principal lipase ATGL responsible for breakdown of LDs. This was accompanied by increase in all species of TAGs and a reduction in the CE content in cells depleted of spastin. An increase in the number and size of LDs upon starvation was seen also in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) obtained from spastin knock out mice embryos. These results indicate that the absence of spastin affects lipid turnover in cells. This study, along with other recent studies implicating lipid droplet biology in HSP, strongly hints towards the importance of lipid metabolism in the pathogenesis of the disease

## Zusammenfassung 77

### Die Rolle der Spastin in Lipid-Droplet-Metabolismus und seine Bedeutung für Spastische Paraplegie (Poster Session II)

*Nimesha Tadepalle 1, 2, Chrisovalantis Papadopoulos1, 2, Elena Rugarli1, 2, 3 Institut für Genetik der Universität zu Köln, Deutschland; 2Cologne Exzellenzcluster auf zelluläre Stressantworten in AgingAssociated Erkrankungen (CECAD), Köln, Deutschland; 3Center für Molekulare Medizin (ZMMK), Universität zu Köln, Köln, Deutschland.*

Hereditäre spastische Paraplegie (HSP) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die durch unteren Gliedmaßen Spastik und Schwäche gekennzeichnet. Es wird durch das Absterben der corticospinal Axonen im zentralen Nervensystem verursacht. Die meisten der autosomal-dominant Fälle dieser Krankheit haben Mutationen im Gen SPAST, Codierung für Spastin, ein konserviertes Mikrotubuli Abtrennen Protein gehört zur AAA (ATPasen Verbunden mit verschiedenen zellulären Aktivitäten) Familie. Spastin spielt eine Rolle in midbody abscission, Spindeldemontage, Neuriten Verzweigung und endosomalen tubulation. Spastin ist hauptsächlich in zwei Isoformen, M1 und M87 mit oder ohne eine N-terminale hydrophobe Region, respectively. Es wurde früher, dass Spastin-M1 ist mit Lipidtröpfchen auf die Überexpression gezielt gezeigt. Lipidtröpfchen (LDs) sind intrazellulären Organellen, die von der ER stammen. Sie enthalten einen neutralen Lipidkern von Triacylglycerin (TAG) und Cholesterinester (CE) und eine Monoschicht von Phospholipiden. In dieser Studie haben wir einen einen Spastin Knock-out-Zelllinie von CRISPR-Cas9 Technologie in NSC34 Zellen. Wir zeigen, dass Spastin Knock-out-Zellen auf Hunger nach oben reguliert die LD-assozierten Protein PLIN2 und die Haupt Lipase ATGL verantwortlich für Abbau von LDs. Dies wurde durch die Zunahme in allen Arten von TAGs und einer Verringerung der Ce-Gehalt in Zellen verarmt Spastin begleitet. Eine Erhöhung der Anzahl und Größe der LDs auf Hunger wurde auch von Spastin erhalten

embryonale Fibroblasten (MEF) in Maus gesehen Knock-out-Mäuse-Embryonen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Abwesenheit von Lipid Spastin Umsatz in Zellen beeinflusst. Diese Studie, zusammen mit anderen neueren Studien implizieren Lipidtröpfchen in biology HSP, deutet stark auf die Bedeutung des Fettstoffwechsels in der Pathogenese der Krankheit

---

## Abstract 82

### Spastic paraplegia proteins help model the axonal endoplasmic reticulum network (Oral presentation)

*Presenting author – Dr. Cahir J O’Kane Full author list: Belgin Yalçın1 , Martin Stofanko1 , Niamh C. O’Sullivan1 , Lu Zhao1 , Annika Roost1 , Zi Han Kang1 , Matthew R. Thomas1 , Alex Patto1 , Olivier Blard1 , Sophie Zaessinger1 , Valentina Baena,2 Mark Terasaki2 , Cahir J O’Kane\*1 1 Department of Genetics, University of Cambridge, UK 2 University of Connecticut Health Center, Farmington CT, USA*

The phenotypes of Hereditary Spastic Paraplegias (HSPs), with lower limb weakness, and degeneration of distal portions of longer upper motor axons, suggest failures in the engineering that maintains distal portions of axons furthest from the cell body. Some of the most common spastic paraplegia gene (SPG) mutations affect endoplasmic reticulum (ER) membrane proteins that contain intramembrane hairpins that curve and model ER membrane. This suggests the axonal ER network as an important component to maintain function and integrity of long axons, and a possible location of the pathomechanisms of HSP. This network appears physically continuous both locally and throughout the neuron, comparable to a “neuron within a neuron” and providing a route for regional or long-distance communication in axons.

We have used *Drosophila* to explore the model that loss of SPG-encoded hairpin proteins leads to abnormalities of the axonal ER network. Wildtype axons contain only low levels of rough ER markers, but smooth ER marker can easily be detected. We have focused on the roles in axonal ER pattern of reticulons and REEPs, which are together required for formation of most cortical tubular ER in yeast. *Drosophila* has one widely expressed and slowly evolving ortholog for each of the reticulon, REEP1-4 and REEP5-6 families, which we refer to as RtnI1, ReepA and ReepB respectively. We have generated or used mutants that lack one or more of these three orthologs. Loss of either reticulon, or of ReepB, leads to partial loss of smooth ER marker from distal but not proximal axons, recapitulating the susceptibility of longer distal axons in the human diseases. Flies lacking all three reticulon and REEP orthologs are viable, but confocal and electron microscopy show phenotypes consistent with loss of ER membrane curvature in axons – fewer tubules, with larger diameters, and occasional loss of continuity of ER staining.

We therefore propose a role for hairpin-encoding SPG genes in establishing or maintaining the axonal ER network. While altering ER shape can have effects on local cellular homeostasis, it is likely that ER continuity in axons has an important role. A role for this continuity in preventing degeneration could account for the preferential susceptibility of longer distal axons in HSP.

## Zusammenfassung 82

### Spastische Paraplegie Proteine helfen, die axonalen Endoplasmatischen Retikulum Netzwerk-Modell (Vortrag)

*Presenting Autor - Dr. Cahir J O'Kane Vollautorenliste: Belgin Yalçın<sup>1</sup>, Martin Stofanko<sup>1</sup>, Niamh C. O'Sullivan<sup>1</sup>, Lu Zhao<sup>1</sup>, Annika Roost<sup>1</sup>, Zi Han Kang<sup>1</sup>, Matthew R. Thomas<sup>1</sup>, Alex Patto<sup>1</sup>, Olivier Blard<sup>1</sup>, Sophie Zaessinger<sup>1</sup> Valentina Baena, 2 Mark Terasaki<sup>2</sup>, Cahir J O'Kane \* 1 1 Department of Genetics, University of Cambridge, UK 2 University of Connecticut Health Center, Farmington CT, USA*

Die Phänotypen von hereditärer spastischer Paraplegie (HSPs), mit Schwäche der unteren Extremitäten und Degeneration der distalen Abschnitte der längeren oberen motorischen Axonen, schlagen Fehler in der Technik, die distalen Abschnitte von Axonen weitesten von dem Zellkörper beibehält. Einige der häufigsten spastische Paraplegie Gen (SPG) Mutationen beeinflussen endoplasmatischen Retikulum (ER) Membranproteine, die intramembranären Haarnadeln, die Kurve und das Modell ER-Membran enthalten. Dies deutet auf die axonalen ER Netzwerk als wichtiger Bestandteil Funktion und Integrität der langen Axone zu halten und eine mögliche Position der Pathomechanismen von HSP. Dieses Netzwerk wird physisch kontinuierlich sowohl lokal als auch im gesamten Neuron, vergleichbar mit einem "Neuron in einem Neuron" und eine Route für regionale oder Fernkommunikation in Axonen bereitstellt.

Wir haben Drosophila verwendet, um das Modell zu untersuchen, die den Verlust von SPG-codierten haarnadel Proteine Anomalien des axonalen ER Netzwerk führt. Wildtyp Axone enthalten nur geringe Mengen an rauen ER-Marker, aber glatte ER Marker leicht erkannt werden kann. Wir haben in axonalen ER Muster von reticulons und Reeps die Rollen konzentriert, die gemeinsam für die Bildung der meisten kortikalen Rohr ER in Hefe erforderlich sind. Drosophila hat ein weithin exprimiert und langsam ortholog für jede der reticulon sich entwickelnden, REEP1-4 und REEP5-6 Familien, die wir als Rtnl1, Reepa und ReepB sind. Wir haben erzeugt oder verwendet, Mutanten, die eine oder mehrere dieser drei Orthologe fehlt. Der Verlust der beiden reticulon oder von ReepB, führt zu einem teilweisen Verlust der glatten ER Marker von distal aber nicht proximalen Axone, die Empfindlichkeit von mehr distalen Axone in den menschlichen Krankheiten zu rekapitulieren. Fliegen fehlen alle drei reticulon und REEP Orthologe sind lebensfähig, aber die konfokale und Elektronenmikroskopie zeigen Phänotypen im Einklang mit dem Verlust der ER-Membran Krümmung in Axone - weniger Tubuli, mit größerem Durchmesser und gelegentlichen Verlust der Kontinuität der ER-Färbung.

Wir schlagen daher vor, eine Rolle für haarnadel Codierung SPG Gene bei der Einrichtung oder des axonalen ER Netzwerk aufrechterhalten wird. Während verändern Form ER-Effekte auf die lokale zelluläre Homöostase haben kann, ist es wahrscheinlich, dass in Axonen ER Kontinuität eine wichtige Rolle. Eine Rolle für diese Kontinuität bei der Verhinderung von Degeneration könnte für die Vorzugs Anfälligkeit von mehr distalen Axone in HSP-Konto.

---

## Abstract 84

### Clinical and genetic evaluation of hereditary spastic paraplegia (Poster session II)

S. Hinreiner<sup>1</sup>, R. M. Hehr<sup>1</sup>, Z. Kohl<sup>2</sup>, T. Rödl<sup>1</sup>, N. Koch<sup>1</sup>, M. Becher<sup>1</sup>, S. Herbst<sup>1</sup>, J. Winkler<sup>2</sup>, U. Hehr<sup>1</sup> 1. Center for and Department of Human Genetics, University of Regensburg, Regensburg, Germany 2. Division of Molecular Neurology, University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany

**Introduction:** Hereditary spastic paraplegias (HSPs) comprise a clinically and genetically heterogeneous group of neurodegenerative disorders with progressive degeneration of the corticospinal tract. Patients with complicated forms show additional clinical findings, e.g. thin corpus callosum, cognitive impairment or peripheral neuropathy overlapping with a wide spectrum of other underlying genetic conditions.

Currently more than 80 loci have been assigned with causal mutations identified in almost 70 HSP genes, some of them also associated with other important neurodegenerative disorders including hereditary forms of neuropathy and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Genetic testing of HSP patients by conventional Sanger sequencing in the diagnostic setting so far was restricted to the genes, most frequently affected. We here report our results of genetic testing for HSP by linkage analysis and Sanger sequencing with MLPA over the last 15 years, and 78 more recently by next generation multigene panel sequencing (MGPS). A subgroup of 20 patients received extensive neurologic workup in our outpatient clinic for movement disorders. Massive parallel sequencing of multigene panels (MGPS) allows fast and cost-effective genetic diagnostic testing including sequence analysis of genes with small contribution for a wide variety of phenotypes. The diagnostic yield is expected to be further improved by the additional detection of copy number variations (CNVs) within the analyzed genes.

**Results:** In the overall cohort of 278 patients with suspected pure and complicated HSP causal mutations were identified in SPG4 (n=52), SPG3a (n=6), SPG5 (n=2), SPG7 (n=1), SPG11 (n=4), SPG20 (n=1) and SPG31 (n=2) with conventional sanger sequencing and in SPG4 (n=3) with NGS. To further increase the diagnostic yield we had previously validated a gene panel for massive parallel sequencing of 31 HSP genes (core panel) and 43 additional genes (step 2 panel). For a cohort of 12 HSP patients with known mutations all expected HSP causing mutations were reliably detected including nonsense (n=2), missense (n=7) and frameshift (n=1) mutations, one 5bp deletion and one 9bp duplication. Furthermore a quantitative data assessment using our in house JAVA based bioinformatic script was used to search for deletions and/or duplications. One Spastin gene deletion was found in a patient with HSP and subsequently confirmed by MLPA.

**Conclusion:** The increased diagnostic yield of NGS in combination with an extensive clinical evaluation will further support the functional assessment of underlying pathomechanisms and the development of novel gene specific treatment options. Furthermore we demonstrate that MGPS after Nextera enrichment allows sufficient homogeneity of the obtained patient and control data per target to quantitatively search for constitutional deletions covering two or more adjacent targets.



## Zusammenfassung 84

### Klinische und genetische Auswertung von Spastische Paraplegie (Poster Session II)

*S. Hinreiner<sup>1</sup>, RM Hehr<sup>1</sup>, Z. Kohl<sup>2</sup>, T. Rödl<sup>1</sup>, N. Koch<sup>1</sup>, M. Becher<sup>1</sup>, S. Herbst<sup>1</sup>, J. Winkler<sup>2</sup>, U. Hehr<sup>1</sup> 1. Zentrum für und Department of Human Genetics, Universität Regensburg, Regensburg, Deutschland 2. Abteilung für Molekulare Neurologie, Universitätsklinikum Erlangen, Erlangen, Deutschland*

**Einleitung:** Hereditäre spastische Paraplegie (HSP) eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die mit fortschreitende Degeneration der Pyramidenbahn. Patienten mit komplizierten Formen zeigen zusätzliche klinische Befunde, z.B. dünnen Corpus callosum, überlappende kognitive Beeinträchtigung orperipheral Neuropathie mit einem breiten Spektrum anderer zugrundeliegenden genetischen Bedingungen.

Derzeit sind mehr als 80 Loci mit kausalen Mutationen identifiziert in fast 70 HSP-Gene, von denen einige auch im Zusammenhang mit anderen wichtigen neurodegenerativen Erkrankungen einschließlich erblichen Formen der Neuropathie und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) zugeordnet. Genetische Tests von HSP-Patienten durch herkömmliche Sanger-Sequenzierung in der diagnostischen Einstellung zu den Genen wurde bisher eingeschränkt, am häufigsten betroffen. Wir berichten hier über unsere Ergebnisse von Gentests für HSP durch Kopplungsanalyse und Sanger-Sequenzierung mit MLPA in den letzten 15 Jahren und 78 weitere vor kurzem von der nächsten Generation Multigen- Panel-Sequenzierung (MGPS). Eine Untergruppe von 20 Patienten erhielten eine umfangreiche neurologische Aufarbeitung in unserer Ambulanz für Bewegungsstörungen. Massiv parallele Sequenzierung von Multigen- Platten (MGPS) ermöglicht eine schnelle und kosteneffektive genetische Diagnostik einschließlich Sequenzanalyse von Genen, die mit kleinen Beitrag für eine Vielzahl von Phänotypen. Die diagnostische Ausbeute wird erwartet, dass durch die zusätzliche Erfassung der Kopienzahl Varianten (CNVs) innerhalb der analysierten Gene verbessert werden.

**Ergebnisse:** In der gesamten Gruppe von 278 Patienten mit Verdacht auf reinen und komplizierte HSP kausalen Mutationen wurden in SPG4 identifiziert (n = 52), SPG3a (n = 6), SPG5 (n = 2), SPG7 (n = 1), SPG11 (n = 4), SPG20 (n = 1) und SPG31 (n = 2) mit herkömmlichen Sanger-Sequenzierung und in SPG4 (n = 3) mit NGS. Um die diagnostische Ausbeute erhöhen wir vorher ein Gen-Panel für massive parallele Sequenzierung von 31 HSP-Gene bestätigt hatte (Kern-Panel) und 43 weitere Gene (Schritt 2-Panel). Für eine Kohorte von 12 Patienten mit HSP bekannten Mutationen zu erwarten alle HSP verursachenden Mutationen zuverlässig erkannt einschließlich Unsinn (n = 2) waren, Missense (n = 7) und Frameshift (n = 1) Mutationen, ein 5bp Deletion und eine 9bp Vervielfältigung. Weiterhin ist eine quantitative Datenauswertung unser Haus in JAVA-basierte bioinformatischen Skript verwendet für Streichungen zur Suche wurde mit und / oder Vervielfältigungen. Eine Spastin Gendeletion wurde in einem Patienten mit HSP und anschließend bestätigt durch MLPA gefunden.

**Fazit:** Die erhöhte diagnostische Ausbeute von NGS in Kombination mit einem umfangreichen klinischen Evaluierung wird weiter die funktionelle Beurteilung der zugrunde liegenden Pathomechanismen unterstützen und die Entwicklung von neuartigen Gen-spezifischen Behandlungsmöglichkeiten. Des Weiteren zeigen wir, dass MGPs nach Nextera Anreicherung ausreichende Homogenität der erhaltenen Patienten und Kontrolldaten pro Ziel erlaubt quantitativ für

Verfassungs Streichungen benachbarte Ziele, die zwei oder mehr zu suchen.

---

## Abstract 87

### Identification of mutations in AP4S1/SPG52 through next generation sequencing in three families (Poster session II)

*Ivana Ricca<sup>1</sup>, Federica Morani<sup>1</sup>, Anna Rubegni<sup>1</sup>, Renzo Guerrini<sup>2</sup>, Alessandra Tessa<sup>1</sup>, and Filippo M. Santorelli<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Molecular Medicine, Child Neurology & Neurogenetics, IRCCS Stella Maris, University of Pisa; <sup>2</sup>Pediatric Neurology Unit, Children's Hospital "A. Meyer", University of Florence, Italy*

The term hereditary spastic paraplegia (HSP) covers a spectrum of genetically heterogeneous disorders in which lower limb spasticity is the common clinical feature. Many patients with childhood-onset HSP are mistakenly diagnosed with cerebral palsy (CP). We analyzed a group of as yet molecularly undiagnosed HSP patients using SpastoPlex, a customized target resequencing panel (TRP) able to assay the coding exons of 72 genes linked to HSP or related motor diseases.

We identified homozygous, loss-of-function mutations in AP4S1/SPG52 in 4 children (3 families) who had previously received a diagnosis of diplegic/quadruplegic CP. The patients also presented mild facial dysmorphisms, moderate-to-severe intellectual disability and severe speech delay. Two patients manifested febrile seizures and childhood-onset focal seizures. In all the patients, brain MRI showed a peculiar hypoplastic posterior corpus callosum, associated with ventriculomegaly, white matter loss and cerebral atrophy.

Our data suggest that AP-4 deficiency disorders should be suspected in children with spastic paraparesis, cognitive deficit and absent speech accompanied by distinctive MRI features. Seizures might be among the clinical manifestations.

## Zusammenfassung 87

### Identifizierung von Mutationen in AP4S1 / SPG52 durch Sequenzierung der nächsten Generation in drei Familien (Poster Session II)

*Ivana Ricca<sup>1</sup>, Federica Morani<sup>1</sup>, Anna Rubegni<sup>1</sup>, Renzo Guerrini<sup>2</sup>, Alessandra Tessa<sup>1</sup> und Filippo M. Santorelli<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Molekulare Medizin, Kinder Neurologie & Neurogenetik, IRCCS Stella Maris, Universität von Pisa; <sup>2</sup>Pediatric Neurologie Einheit, Kinderkrankenhaus "A. Meyer", Universität von Florenz, Italien*

Der Begriff Spastische Paraplegie (HSP) deckt ein Spektrum von genetisch heterogene Erkrankungen, bei denen der unteren Gliedmaßen Spastik die gemeinsame klinische Funktion. Viele Patienten mit childhood-onset HSP fälschlicherweise mit Zerebralparese (CP) diagnostiziert. Wir analysierten eine Gruppe von bisher nicht diagnostizierten molekular HSP Patienten mit SpastoPlex, eine maßgeschneiderte Ziel Resequenzierung Platte (TRP) in der Lage, die kodierenden Exons von 72 Genen mit HSP oder verwandten Motor Krankheiten verbunden zu untersuchen.

Wir identifizierten homozygot, loss-of-function Mutationen in AP4S1 / SPG52 in 4 Kinder (3 Familien), die zuvor eine Diagnose von diplegischen / Tetraplegiker CP erhalten hatte. Die Patienten auch milde

Gesichts Dismorphiezeichen präsentiert, moderate bis schwere geistige Behinderung und schwere Sprachverzögerung. Zwei Patienten manifestiert Fieberkrämpfen und Kindheit einsetzende fokalen Anfällen. Bei allen Patienten zeigten Gehirn-MRT eine eigentümliche callosum hypoplastischem posterioren corpus, verbunden mit Ventrikulomegalie, weißen Substanz Verlust und Hirnatrophie.

Unsere Daten deuten darauf hin, dass AP-4 Mangelkrankungen sollten bei Kindern mit spastischen Spinalparalyse, kognitives Defizit und abwesenden Rede von unverwechselbaren MRI Funktionen begleitet vermutet werden. Epileptische Anfälle können unter den klinischen Manifestationen sein.

## Abstract 88

### Isolated spastic paraplegia related to new Leukodystrophies genes (Poster session II)

*1DORBOZ I, 2,1RENALDO F, 3Tonduti D, 4Samaan S, 5SLAMA A, 6,1BESNOIT JF, 7ELMALEH M, 8DESPORTES V, 1,9Rodriguez D, 1,2BOESPFLUG TANGUY O 1Paris Diderot University - Sorbonne Paris Cité; Inserm U1141, DHU PROTECT, Robert Debré Hospital, Paris, France. 2Departement of Neuropediatrics and Metabolic Diseases, Robert Debré Hospital, AP-HP, 48, Boulevard Sérurier, 75019, Paris, France. 3Child Neurology Unit, IRCCS-Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta, Milan, Italy 4Molecular Biology, Genetic Department, Robert Debré Hospital, Paris, France 5Department of Biochemistry, Bicetre Hospital, AP-HP, Le Kremlin Bicetre, France. 6Departement of Biochemistry, Robert Debré Hospital, AP-HP, Paris, France 7Departement of Pediatric Radiology, Robert Debré Hospital, AP-HP, Paris, France 8Service de Neurologie Pédiatrique, CHU Lyon, Hôpital Femme Mère Enfant, Bron, France AP-HP, 9Department of Child Neurology, Armand Trousseau Hospital, GHUEP, Paris, France*

Hereditary spastic paraplegia is a clinically and genetically heterogeneous disorders characterized by lower extremity spasticity and weakness. We selected a group of patients with an isolated spastic paraplegia with normal neuroimaging, or in association with nonspecific hypomyelination and in whom no diagnosis had been established. We performed analysis by Leukodystrophy Panel and exome sequencing. We identified mutation in genes involved in known leukodystrophies (POLR3A, RNASEH2B, TUBB4A...) and leukoencephalopathies (NFU1, ISCA2...). Mutation in these genes are usually associated with a severe clinical presentation and anomalies in white matter. This findings highlights the wide range of phenotypic variations that result from mutations in the same genes. The reason for the clinical and biological differences between our patients and those previously described is not clear. It may suggest that other potential factors that might contribute variability in modulating phenotype.

## Zusammenfassung 88

### Isolierte spastische Paraplegie im Zusammenhang mit neuen Leukodystrophie-Gene (Poster Session II)

*1DORBOZ I, 2,1RENALDO F, 3Tonduti D, 4Samaan S, 5SLAMA A, 6,1BESNOIT JF, 7ELMALEH M, 8DESPORTES V, 1,9Rodriguez D, 1,2BOESPFLUG TANGUY O 1Paris Diderot-Universität - Sorbonne Paris Cité; Inserm U1141, DHU*

*PROTECT, Robert Debré-Krankenhaus, Paris, Frankreich. 2*Departement für Neuropädiatrie und Stoffwechselkrankheiten, Robert Debré-Krankenhaus, AP-HP, 48, Boulevard Sérurier, 75019, Paris, Frankreich. *3*Child Neurologie Einheit, IRCCS-Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta, Mailand, Italien *4*Molecular Biologie, Genetik-Abteilung, Robert Debré-Krankenhaus, Paris, Frankreich *5*Department of Biochemistry, Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin Bicetre, Frankreich. *6*Departement für Biochemie, Robert Debré-Krankenhaus, AP-HP, Paris, Frankreich *7*Departement für Kinderradiologie, Robert Debré-Krankenhaus, AP-HP, Paris, Frankreich *8*Service de Neurologie Pédiatrique, CHU Lyon, Hôpital Femme Mère Enfant, Bron, Frankreich *9*Department von Child Neurology, Armand Trousseau Krankenhaus, GHUEP, Paris, Frankreich

Hereditäre spastische Paraplegie ist eine klinisch und genetisch heterogene Erkrankungen, die durch untere Extremität Spastik und Schwäche gekennzeichnet. Wir wählten eine Gruppe von Patienten mit einer isolierten spastische Paraplegie mit normalen bildgebende Verfahren oder in Verbindung mit nicht-spezifischen Hypomyelinisierung und bei denen keine Diagnose gestellt worden war. Wir führten Analyse von Leukodystrophie-Panel und Exoms Sequenzierung. Wir identifizierten Mutationen in Genen in bekannten Leukodystrophie (POLR3A, RNASEH2B, TUBB4A ...) beteiligt und Leukoenzephalopathien (NFU1, ISCA2 ...). Mutation in dieser Gene werden in der Regel mit einer schweren klinischen Präsentation und Anomalien in der weißen Substanz verbunden. Dieser Befund unterstreicht die breite Palette von phänotypischen Veränderungen, die durch Mutationen in den gleichen Genen führen. Der Grund für die klinische und biologische Unterschiede zwischen den Patienten und den zuvor beschriebenen ist nicht klar. Es kann vorkommen, dass andere mögliche Faktoren deuten darauf hin, dass die Variabilität bei der Modulation der Phänotyp beitragen könnten.

---

## Abstract 90

### Advanced neuroimaging in Hereditary Spastic Paraplegias and Friedreich's ataxia: towards objective biomarkers in diseases of motor control (Poster session II)

*1* Vavla M, *2* Montanaro D, *3* Arrigoni F, *4* Rossi G, *3* Nordio A, *3* De Luca A, *2* Agakhanyan G, *5* Martino N, *5* Baratto A, *1* Paparella G, *6* D'Angelo G, *1* Martinuzzi A. *1* Scientific Institute IRCCS "E. Medea", Conegliano and Pieve di Soligo (TV), Italy *2* Fondazione CNR/Regione Toscana "G. Monasterio", Unit of Neuroradiology, Pisa, Italy *3* Neuroimaging Laboratory, Scientific Institute IRCCS "E. Medea", Bosisio Parini, Lecco, Italy. *4* Institute of Clinical Physiology, National Council of Research, Unit of Epidemiology and Biostatistics, Pisa, Italy *5* ULSS7-Pieve di Soligo, Department of Imaging, Conegliano (TV), Italy *6* Neurorehabilitation Department Scientific IRCCS "E. Medea", Bosisio Parini (LC) Italy,

**Introduction:** Hereditary spastic paraplegias (HSP) and Friedreich's Ataxia (FRDA) are genetically determined neurodegenerative conditions affecting the long central tracts and resulting in progressive impairment of central motor control. In both conditions, with few exceptions, traditional brain imaging doesn't provide any help in diagnosis or disease staging. The availability of reliable markers of disease correlating with validated clinical measures would be of great help in early diagnosis and in disease follow up. The objective of the study is firstly to test a composite advanced imaging protocol in HSP or FRDA for its capacity to detect significant disease associated patterns, and secondly to check its potential clinical utility by searching for correlation with defined clinical measures.

**Methods:** We applied a clinical and neuroimaging protocol in a cohort of 22 HSP vs 22 healthy controls (HC) by 1.5 T MRI scanner including DTI, VBM and MRS. Furthermore, we studied a cohort

of 21 FRDA vs 18 HC in a 3T MRI scanner via VBM, DTI and fMRI study. All patients were clinically assessed with severity measures specific to the condition as Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS) in HSP and Scale for the Assessment and Rating of Ataxias (SARA) in FRDA.

**Results:** By discriminant analysis of the DTI pattern of the whole corticospinal tract (CST) we could reliably differentiate HSP subjects from HC with 100% sensitivity/specificity. The SPRS scores correlated with FA and MD indexes for all the anatomical CST subdivisions proposed (from  $p < 0.05$  to  $p < 0.005$ ). In FRDA, we found altered FA and MD parameters through voxeland ROI-based analysis in all three cerebellar peduncles and diffusively in the major cerebral WM tracts. A finger-tapping motor task demonstrated a consistent and significantly higher cerebellar cortex activation (lobule V, IV) in HC compared to FRDA. In FRDA, the FA index in WM tracts (mostly in the cerebellar peduncles) correlated with disease duration and SARA scores.

**Conclusion:** We show that by advanced neuroimaging techniques consistent structural and functional changes can be detected in HSP and FRDA. Given their correlation with clinical scales representing disease severity, there is good chance they may function as ancillary objective disease biomarkers and become useful tools to monitor disease progression and response to possible treatments.

## Zusammenfassung 90

### Erweiterte Bildgebung bei hereditärer spastischer Paraplegie und Friedreich-Ataxie: Auf dem Weg Ziel Biomarker bei Erkrankungen der motorischen Kontrolle (Poster Session II)

1 Vavla M, 2 Montanaro D, 3 Arrigoni F, 4 Rossi G, 3 Nordio A, 3 De Luca A, 2 Agakhanyan G, 5 Martino N, 5 Baratto A, 1 Paparella G, 6 D'Angelo G, 1 Martinuzzi A. 1 E. Scientific Institute IRCCS "Medea", Conegliano und Pieve di Soligo (TV), Italien 2 Fondazione CNR / Regione Toscana "G. Monasterio", Referat für Neuroradiologie, Pisa, Italien 3 Neuroimaging Laboratory, Wissenschaftliches Institut IRCCS "E. Medea", Bosisio Parini, Lecco, Italien. 4 Institut für Klinische Physiologie, Nationalrat der Forschung, Referat für Epidemiologie und Biostatistik, Pisa, Italien 5 ULSS7-Pieve di Soligo, Department of Imaging, Conegliano (TV), Italien 6 Neurorehabilitation Abteilung Scientific IRCCS "E. Medea", Bosisio Parini (LC) Italien,

**Einleitung:** Hereditäre spastische Paraplegie (HSP) und Friedrich Ataxie (FRDA) sind genetisch bedingte neurodegenerative Erkrankungen, die lange Mittelbahnen und was zu progressive Beeinträchtigung der zentralen Motorsteuerung zu beeinflussen. In beiden Bedingungen, mit wenigen Ausnahmen, traditionelle Bildgebung des Gehirns bieten keine Hilfe bei der Diagnose oder Krankheit Inszenierung. Die Verfügbarkeit zuverlässiger Marker der Krankheit mit validierten klinischen Maßnahmen korreliert wäre eine große Hilfe bei der frühen Diagnose und in der Krankheit verfolgen. Das Ziel der Studie ist es zunächst ein Verbund Advanced Imaging-Protokoll in HSP oder FRDA für seine Fähigkeit zu testen signifikante Erkrankung assoziiert Muster zu erkennen und zweitens seine potenziellen klinischen Nutzen zu überprüfen, indem Sie für die Korrelation mit definierten klinischen Maßnahmen zu suchen.

**Methoden:** Wir legten ein klinischen und bildgebenden Verfahren Protokoll in einer Kohorte von 22 HSP vs 22 gesunden Kontrollen (HC) um 1,5 T MRI-Scanner einschließlich DTI, VBM und MRS. Darüber hinaus untersuchten wir eine Kohorte von 21 FRDA vs 18 HC in einem 3T-MRT-Scanner über VBM, DTI und fMRI-Studie. Alle Patienten wurden klinisch mit Strenge Maßnahmen spezifisch

für den Zustand als spastische Paraplegie Rating Scale (SPRS) in HSP und Maßstab für die Beurteilung und Bewertung von Ataxien (SARA) in FRDA bewertet.

**Ergebnisse:** Durch Diskriminanzanalyse des DTI Muster des gesamten corticospinal-Darm-Trakt (CST) konnten wir zuverlässig HSP Themen von HC mit 100% Sensitivität / Spezifität unterscheiden. Die SPRS Scores korreliert mit FA und MD-Indizes für alle anatomischen CST Unterteilungen vorgeschlagen (von  $p < 0,05$  bis  $p < 0,005$ ). In FRDA, fanden wir veränderten FA und MD Parameter durch voxeland ROI-basierte Analyse in allen drei Kleinhirns Stielen und diffusionsfähig in den großen zerebralen WM Wege. Ein Finger-Tapping zeigte motorische Aufgabe eine konsistente und deutlich höhere Kleinhirnrinde Aktivierung (Läppchen V, IV) in HC im Vergleich zu FRDA. In FRDA, der FA-Index im WM Wege (vor allem in den Kleinhirnschenkel) mit einer Krankheitsdauer und SARA-Scores korreliert.

**Fazit:** Wir zeigen, dass durch moderne bildgebende Verfahren im Einklang strukturelle und funktionelle Veränderungen können in HSP und FRDA nachgewiesen werden. In Anbetracht ihrer Korrelation mit klinischen Skalen der Schwere der Erkrankung darstellt, gibt es eine gute Chance, sie können als Nebenziel Krankheit Biomarker fungieren und nützliche Werkzeuge werden bis zur Krankheitsprogression und die Reaktion auf mögliche Behandlungen zu überwachen.

---