

Zusammenfassung

Autosomal rezessiv vererbte geistige Behinderung in Verbindung mit primärer Mikrozephalie ist eine verheerende Störung der Gehirnentwicklung, die mit einem verkleinerten zerebralen Kortex einhergeht und daraus resultierend einem verkleinerten Kopfumfang von -3 SD (Standardabweichung) bis -2 SD bei der Geburt und mit signifikant reduzierten kognitiven und erlernten Fähigkeiten und einem Intelligenzquotienten von 70 oder weniger als 70. Die Prävalenz dieser Erkrankung ist höher in Ländern, in denen Ehen unter Blutsverwandten (konsanguine Eltern) relativ häufig sind wie z.B. in Pakistan, Indien, Syrien und Saudiarabien.

In dieser Arbeit wurde eine pakistanische Familie untersucht, in der in vier Generationen Heiraten unter Blutsverwandten stattgefunden hatte und in der bei drei Familienmitgliedern mentale Retardierung in Verbindung mit Mikrozephalie aufgetreten ist. Genetische Analysen unter Einschluß von Kopplungsanalysen und „whole-exome“ Sequenzierung ergaben eine homozygote missense Mutation in *C1orf131* (NM_152379.3;c.112G>A;p.(Asp38Asn)). Eine Kosegregationsanalyse, die Abwesenheit der Mutation in Datenbanken mit genomischen Varianten sowie die pathogene Natur der Mutation, wie sie mit verschiedenen in silico Programmen vorhergesagt wurde, unterstrichen, dass diese Variante des Proteins die Ursache für die Erkrankung sein könnte.

Die nachfolgenden Untersuchungen zeigten, dass *C1orf131* eine Komponente des Nucleolus ist, wo es eine Komponente des dichten fibrillären Zentrums und des granulären Teils während der Interphase ist. Während der Mitose ist es an der Peripherie der Chromosomen lokalisiert. In Patientenzellen ist die Menge des Proteins reduziert und während der Mitose wurde es nicht an der Chromosomenperipherie beobachtet. Patientenzellen und Zellen, in denen die Proteinmengen nach siRNA Behandlung reduziert waren, zeigten vermindertes Wachstum und eine Beeinträchtigung der nucleolären und mitotischen Funktionen. Weiterhin wurde eine Micronucleibildung beobachtet sowie eine Abnahme der Anzahl der Nucleoli und deformierte Nucleoli. Die Micronucleibildung ist möglicherweise eine Folge von falsch gepaarten Chromosomen und deutet auf eine wesentliche Rolle von *C1orf131* für die Chromosomen während der Mitose hin. Eine Konsequenz dieser Veränderungen könnte auch die beobachtete höhere Apoptoserate in beiden Zelltypen sein. Weiterhin war als eine wesentliche Funktion des Nucleolus, nämlich

die prä-rRNA Prozessierung durch die Inhibierung der Spaltstellen A0 und O2, beeinträchtigt und damit die Ribosomenbiogenese.

Als Bindepartner von C1orf131 wurden vier nucleoläre Proteine, Nucleolin, NPM, NAT10, NSUN2, eine Kinetochorkomponente, hSp24, ein Histon, Histon H1.2, und mit Cep152 ein centrosomales Protein identifiziert und in unabhängigen Pulldownexperimenten bestätigt. Interessanterweise war die Interaktion von mutiertem C1orf131 mit NAT10, Nucleolin und Cep152 beeinträchtigt. Eine Analyse dieser Bindepartner in Zelllysaten aus primären Patientenfibroblasten und aus HeLa Zellen, in denen C1orf131 mit Hilfe von siRNA reduziert war, zeigte reduzierte Mengen für NPM, während die Cep152 Mengen in Patientenfibroblasten erhöht waren. Die veränderte Cep152 Interaktion könnte zu der Zentrosomenfehlfunktion führen, die in einer erhöhten Anzahl von Zentrosomen und Zentriolen sowie in deformierten Zilien resultierte.

Transkriptionsprofile der Mutantenzellen zeigten weiterhin, dass Gene, die wesentlich für die normale Funktion des Zellkerns, der Nucleoli, Mitochondrien, Zilien, Zentrosomen und Chromosomen sind, unterschiedlich zur Kontrolle exprimiert wurden. Darunter waren auch Gene, die essentiell sind für die Mitose, Zellproliferation, Morphogenese der Dentriten, Synapsenbildung und Organisation, Axonbildung und Wanderung, Vermehrung und Differenzierung von Gliazellen, die alle relevant für die Entwicklung des Nervensystems sind. In der Konsequenz werden die beobachteten Abnormalitäten die symmetrische Teilung während der Neurogenese beeinträchtigen und dadurch Mikrozephalie und mentale Retardierung verursachen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine neue Komponente identifiziert, die wichtig für die Gehirnentwicklung und Gehirnfunktion ist. Weiterhin wurden durch die Mutantenanalyse biologische Signalwege identifiziert, die für die Embryonalentwicklung wichtig sind. In der Zukunft sollten mit Hilfe dieser Ergebnisse Strategien für die genetische Beratung und pharmakogenetische Behandlung entwickelt werden können.

Abstract

Autosomal recessive intellectual disability associated with primary microcephaly is a devastating neurodevelopmental disorder manifesting diminutive cerebral cortex consequently with small head circumference of -3 SD (standard deviation) — -2 SD at birth — below the expected mean and significantly reduced early onset cognitive and adaptive behaviors with an intelligence quotient (IQ) of 70 or below 70. The prevalence of this disorder is higher in countries that are commonly practicing consanguineous marriages such as Pakistan, India, Syria and Saudi Arabia. Here, I investigated a four generations consanguineous Pakistani family with three affected members manifesting intellectual disability and microcephaly. Genetic investigations with the help of linkage analysis and whole-exome sequencing revealed a homozygous missense (NM_152379.3;c.112G>A;p.(Asp38Asn)) mutation in *C1orf131*. Co-segregation analysis, absence of mutation in the databases of genomic variants and the pathogenic nature of the mutation predicted by several *in silico* tools corroborated the causality of the proposed variant.

My immunofluorescence data coupled with confocal microscopy confirmed that C1orf131 is a component of the dense fibrillar center and granular component of the nucleoli during interphase and chromosomal periphery during mitosis. The mutant protein was reduced in patient cells and absent from the chromosomal periphery during mitosis. Consequently, it resulted in reduced proliferation and impairment of normal nucleolar and mitotic functions investigated in both primary fibroblasts of the patient and in HeLa cells upon acute depletion of *C1orf131* by siRNA. Micronuclei as a result of misaligned chromosomes, reduced in number of nucleoli and distorted nucleoli were found in both cell types. The presence of micronuclei revealed the role of C1orf131 in chromosome congression and alignment. As a result of these cellular defects, I have noted higher apoptotic rate in both kind of cells. Further I have shown that abnormal function of the nucleoli also affected pre-rRNA processing through inhibiting the cleavage site of A0 and O2, which ultimately resulted in impaired ribosome biogenesis. This data showed the novel and critical role of C1orf131 in ribosome biogenesis and pre-rRNA processing. One of the important aspects of this study is the identification of several novel binding partners of C1orf131 where four nucleolar proteins (nucleolin, NPM, NAT10, NSUN2), one kinetochore component (hSpc24), one histone (Histone H1.2) and interestingly one centrosomal (Cep152) protein were validated by pulldown assays. Interestingly, the binding efficiency of NAT10, nucleolin and Cep152 was

found impaired with the mutant *C1orf131*. Examination of these binding partners in cell lysate of primary fibroblasts derived from the patient and HeLa cells in which *C1orf131* was depleted by siRNA treatment showed decreased amounts of NPM. Increased amounts of Cep152 were noted only in the patient cells. Impaired interaction of Cep152 with mutant *C1orf131* consequently resulted in centrosomal dysfunction which was evident by the presence of supernumerary centrosomes and centrioles along with deformed cilia. Transcriptomic profiling by bulk RNA sequencing of the mutant cells showed several differentially expressed genes crucial for normal functions of nuclei, nucleoli, mitochondria, cilia, centrosome and chromosomes. Among them were also genes necessary for mitosis, cell proliferation, dendritic morphogenesis, synapse assembly and organization, axon guidance, axonogenesis, glial cell proliferation and differentiation and most importantly in nervous system development. Taken together, the overall abnormalities that are listed above will affect symmetrical division of neurogenesis and hence will cause microcephaly and intellectual disability.

In conclusion, my data uncovered a novel and crucial component which is necessary for proper brain function and brain development, and added important pathways necessary for embryonic development. This data will help to design improved strategies of genetic counselling and pharmacogenetics in future.