

Summary

Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH) is a rare neurodevelopmental disorder characterized by the reduced size of the cerebral cortex at birth accompanied by intellectual disability whereas the architecture of the brain does not show any abnormalities. The reduction of the brain size is a consequence of a reduced pool of neurons during embryogenic neurogenesis. MCPH genes code for proteins implicated in cell division and cell cycle regulation thereby being important components controlling brain size. Efforts to uncover the underlying molecular genetic causes increased in recent years. To date 13 genes have been described to be associated with this disease.

We ascertained primary microcephaly families from a remote region of Pakistan. Combination of homozygosity mapping and whole-exome sequencing (WES) identified a novel splice site mutation (c.6673-19T>A) in *CASC5*, a gene encoding a protein important for kinetochore formation and proper chromosome segregation during mitosis. Post-hoc Sanger sequencing of patient cDNA revealed the skipping of exon 25 of *CASC5* causing a frameshift and introducing a premature stop codon (p.Met2225Ilefs*7) which ultimately resulted in a C-terminally truncated protein. Furthermore, we found a down-regulation of *CASC5* mutant mRNA as measured by quantitative RT-PCR. Upon analyzing the patient primary fibroblasts we observed a defective nuclear structure as the major phenotype. Additionally, micronuclei were found. Immunofluorescence analyses of the patient fibroblasts revealed an altered localization of *CASC5* in dividing cells during metaphase in a diffuse manner and it was also found in the cytosol whereas in wild type it was exclusively present at the metaphase plate. Since the nuclear abnormalities are considered as a hallmark of genetic instability, an altered DNA damage response was studied. Upon DNA damage, a higher percentage of γ -H2AX and 53BP1 foci were detected in the mutant fibroblasts as compared to wild type.

Taken together, these results define not only a second and novel pathogenic mutation in *CASC5* but also underscore the function of the gene in proper kinetochore formation. Moreover, we demonstrate the mutation's consequence on chromosome integrity and indicate a role of *CASC5* in genomic maintenance and stability of the cell.

CDK6 localizes to the centrosome during mitosis and is mutated in MCPH. It is responsible for cell cycle transitions with crucial roles in G1 length regulation and

adult brain development. Functional characterization of mutant fibroblasts revealed reduced growth, increased apoptosis and phosphorylated pRB levels. Besides, migration and polarity of fibroblasts and *CDK6*-knockdown cells was impaired. Novel interaction partners of *CDK6* were identified in this study by pull-down experiments. The defects in patient cells carrying the *CDK6* mutation confirm its role in cell cycle progression and demonstrate a novel role for *CDK6* in cell migration and orientation of the centrosome. Further, the novel interaction partner *RUVBL2* indicates an involvement of *CDK6* in the DNA damage response pathway.

Filippi syndrome is a rare, heterogeneous autosomal-recessive disorder. Major phenotypic features are microcephaly, a typical abnormal facial appearance and syndactyly. The genetic cause of this disorder was unknown until homozygosity mapping and WES identified a frameshift mutation c.571dupA (p.Ile191Asnfs*6) in *CKAP2L* in two patients of a Sardinian family. Five further mutations in Filippi patients of unrelated families from all over the world were found in this gene by Sanger sequencing, the majority of them causing a frameshift and introducing a premature stop codon, leading to a truncation of the protein.

In mice, *CKAP2L* plays a pivotal role in cell division of neural progenitors. While the wild-type protein was detected at the spindle poles in mammalian dividing cells, it was absent in primary patient LCLs homozygous for the c.571dupA mutation. Here, an increase in the number of cells with disorganized spindle microtubules owing to multipolar configurations as well as defects in chromosome segregation was observed. These cellular phenotypes are in keeping with data from *in vitro* and *in vivo* knockdown studies performed in human cells and mice, respectively. Loss-of-function mutations in *CKAP2L* are proposed to be the major cause of the Filippi syndrome.

Zusammenfassung

Autosomal-rezessive primäre Microzephalie (MCPH) ist eine seltene Erkrankung des Nervensystems, gekennzeichnet durch einen kleineren Kopfumfang im Vergleich zu gesunden Individuen und bedingt durch eine Verkleinerung der Großhirnrinde von Geburt an, während die Architektur des Gehirns keine Anomalien aufzeigt. Die Reduktion der Gehirngröße wird durch einen verringerten Pool von Neuronen während der embryonalen Neurogenese verursacht. Dieses geht einher mit einer geistigen Behinderung. MCPH-assoziierte Gene kodieren für Proteine, die bei der Zellteilung und der Zellzyklusregulation von Bedeutung sind, wodurch sie wichtige Komponenten bei der Steuerung der Gehirngröße darstellen. Bemühungen, die zugrunde liegenden molekulargenetischen Ursachen aufzudecken, erhöhen sich stetig. Bis heute wurden 13 Gene beschrieben, welche mit der Krankheit in Verbindung stehen.

Wir erfassten primäre Mikrozephalie Familien aus einer abgelegenen Region in Pakistan. Die Kombination von Homozygotie-Kartierung und „whole-exome“-Sequenzierung (WES) identifizierte eine Spleißmutation (c.6673-19T>A) in *CASC5*, einem Gen, welches für ein Protein mit einer wichtigen Rolle für die Kinetochor-Bildung und eine fehlerfreie Chromosomenteilung während der Mitose kodiert. Post-hoc-Sanger-Sequenzierung von Patienten-cDNA ergab das Auslassen von Exon 25 des *CASC5* Gens, was eine Verschiebung des Leserasters und ein vorzeitiges Stopcodon (p.Met2225Ilefs*7) zur Folge hatte, was letztlich zu einer C-terminalen Verkürzung des Proteins führte. Darüber hinaus wurde eine Herunterregulierung der *CASC5*-mutierten mRNA durch quantitative RT-PCR gemessen. Bei der Analyse der primären Fibroblasten von Patienten beobachteten wir Kernform-Veränderungen und Mikronuklei. Immunfluoreszenz-Analysen der Patientenfibroblasten ergab eine Fehllokalisierung von *CASC5* in sich teilenden Zellen während der Metaphase im Vergleich zum Wildtyp. Da Anomalien des Zellkerns als Kennzeichen von genetischer Instabilität betrachtet werden, wurde die Antwort auf DNA-Schädigung untersucht und eine Zunahme von γ -H2AX- und 53BP1-positiven Foci beobachtet.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse nicht nur eine neue, zweite pathogene Mutation in *CASC5*, sondern unterstreichen auch die Bedeutung des Gens für die korrekte Kinetochor-Bildung. Außerdem zeigt die vorliegende Arbeit die Konsequenz der

Mutation für die Chromosomenintegrität und stellt somit auch eine besondere Rolle des Proteins in der Genom-Erhaltung und für die Stabilität der Zelle heraus.

CDK6 lokalisiert während der Mitose am Zentrosom und ist in MCPH mutiert. Es ist für Zellzyklusübergänge mit einer entscheidenden Rolle in der Regulierung der G1-Länge und für die Entwicklung des Gehirns verantwortlich. Die funktionelle Charakterisierung der Mutantenzellen zeigte verschlechtertes Wachstum sowie gesteigerte Apoptose- und Phosphorylierungslevel von pRB. Außerdem war die Migration und Polarität von Fibroblasten und *CDK6*-Knockdown-Zellen beeinträchtigt. Die Defekte in Patientenzellen, welche die *CDK6*-Mutation tragen, bestätigen die Rolle des Gens bei der Zellzyklusprogression und zeigen eine Bedeutung von *CDK6* bei der Zellmigration und der Orientierung der Zentrosomen. Zudem weist der neue Interaktionspartner RUVBL2 auf eine Beteiligung von *CDK6* im DNA-Damage-Response-Weg hin.

Das Filippi-Syndrom ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte heterogene Erkrankung. Wichtige phänotypische Merkmale sind Mikrozephalie, typische veränderte Gesichtszüge und Syndaktylie. Die genetischen Ursachen dieser Störung waren unbekannt, bis Homozygotie-Kartierung und WES bei zwei Patienten einer sardinischen Familie die Frameshift-Mutation c.571dupA (p.Ile191Asnfs*6) im *CKAP2L*-Gen identifizierten. Fünf weitere Mutationen in Filippi-Patienten von nicht miteinander verwandten Familien aus der ganzen Welt wurden durch Sanger-Sequenzierung von *CKAP2L* gefunden. Die meisten von ihnen führten zu einer Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stoppcodon, was zu einer Verkürzung des Proteins führte. In Mäusen spielt *CKAP2L* eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung von neuronalen Vorläuferzellen. Während das Wildtyp-Protein an den Spindelpolen in sich teilenden Säugerzellen beobachtet wurde, war es in Patienten-Lymphblasten abwesend. Hier wurden eine erhöhte Zellzahl mit desorganisierten Spindelmikrotubuli aufgrund einer mehrpoligen Ausgestaltung der Zelle sowie Defekte in der Chromosomenteilung beobachtet. Diese zellulären Phänotypen befinden sich im Einklang mit Daten aus *in vitro*- und *in vivo*-Knockdown-Studien, die mit menschlichen Zellen und Mäusen durchgeführt wurden. Unsere Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Funktionsverlustmutationen von *CKAP2L* die Hauptursache für das Filippi-Syndrome sind.