

1. Summary

The human brain is the most complex and intricate organ in the human body and needs accurate organization of neurogenesis to achieve its complicated structure. Any aberration during brain formation may lead to neurodevelopmental disorders (NDDs), which characterize a variety of genetic and clinical heterogeneities that affect the brain's development and function. Investigating the putative genetic origins of NDDs is imperative to characterize the genotype-phenotype correlations, forecast future problems, and comprehend the molecular process behind the genesis of these disorders. Early switching from symmetric proliferative to asymmetric apical progenitor divisions, reduces the pool of progenitors and number of neurons, ultimately shrinking the cerebral cortex which is the main cause of microcephaly. This may occur due to environmental and genetic factors. Congenital microcephaly (CM) is characterized as a small brain size $< -2SD$ from the mean at the time of birth. Primary microcephaly is a rare genetic disorder with the manifestation of reduced cerebral cortex volume and intellectual disability. Whereas, syndromic microcephaly is characterized by having additional features with other organ systems being affected in addition to CM.

The objective of this study was to understand the underlying pathomechanisms in 4 families afflicted with congenital microcephaly. Digenic inheritance was observed in a consanguineous Pakistani family manifesting syndromic microcephaly, in which I identified homozygous missense mutations in the genes *CFAP20* and *C1orf131*. The detrimental effects of the variants c.185C>G; p.(Pro62Arg) in *CFAP20* and c.529C>T; p.(Arg177Trp) in *C1orf131* were studied using patient-derived fibroblasts to elucidate the pathomechanism. Molecular dynamics (MD) simulations revealed the proline at position 62 to be unstable and 3D conformational changes in mutant CFAP20. Interestingly, CFAP20 was localized at the nucleolus as well as cilia. Both genes shared 17 interacting binding partners. Immunofluorescence and live cell imaging using overexpression of GFP-CFAP20 and GFP-C1ORF131 validated the nucleolar localization of both proteins. Mutations in nucleolar proteins are known to induce nucleolar stress and to trigger autophagy. Transcriptome data revealed downregulation of *BCL2* and upregulation of autophagy inhibitors. This may cause a shutdown of the cell survival mechanism. The observed upregulation of DCC and downregulation of NTN1 may cause DCC-mediated apoptosis and upregulation of TP53TG3D and RRPM pointed to DNA damage response leading to cell death in patient-derived fibroblasts compared to wild-type. Cell death assay revealed a higher expression of caspase 3 and 53BP1 and cell proliferation assay confirmed a lower proliferation rate in patient-derived fibroblasts compared to wild-type cells. My observation highlights the importance of nucleolar proteins for cell proliferation. Any aberration of them may cause cellular senescence and apoptosis during embryonic development with severe consequences for the development of the brain and other organ systems. Previous studies have reported variants in *CFAP20* associated with retinopathy and apoptosis in retinal cells of a null mutant zebrafish model. Defects in *C1orf131* lead to defective ribosome biogenesis and centrosomal dysfunction, proved by supernumerary centrosomes and distorted cilia.

For the remaining families of congenital microcephaly, whole exome sequencing followed by *in silico* analyses has revealed potential candidate genes. Altogether, this study is equipped with novel and useful insights into genetic and functional molecular bases of neurodevelopmental disorders, specifically, syndromic microcephaly. From a future perspective, this study may provide the basis for further genomic and therapeutic research into these and related neurodevelopmental disorders.

2. Zusammenfassung

Das menschliche Gehirn ist das komplexeste und komplizierteste Organ im menschlichen Körper und benötigt eine genaue Organisation der Neurogenese, um seine komplizierte Struktur zu erreichen. Jede Abweichung während der Gehirnbildung kann zu neurologischen Entwicklungsstörungen (NDD) führen, die eine Vielzahl genetischer und klinischer Heterogenitäten kennzeichnen, die die Entwicklung und Funktion des Gehirns beeinträchtigen. Die Untersuchung der mutmaßlichen genetischen Ursachen von NDDs ist unerlässlich, um die Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zu charakterisieren, zukünftige Probleme vorherzusagen und den molekularen Prozess hinter der Entstehung dieser Störungen zu verstehen. Die frühe Umstellung von der symmetrischen proliferativen auf die asymmetrische apikale Vorläuferteilung reduziert den Pool der Vorläuferzellen und die Anzahl der Neuronen, was letztlich zu einer Schrumpfung der Großhirnrinde führt und die Hauptursache für Mikrozephalie ist. Dies kann durch Umwelt- und genetische Faktoren verursacht werden. Kongenitale Mikrozephalie (CM) ist gekennzeichnet durch eine geringe Gehirngröße $< -2SD$ vom Mittelwert zum Zeitpunkt der Geburt. Die primäre Mikrozephalie ist eine seltene genetische Störung, die sich in einem verringerten Volumen der Großhirnrinde und einer geistigen Behinderung äußert. Die syndromale Mikrozephalie hingegen ist durch zusätzliche Merkmale gekennzeichnet, bei denen neben der CM auch andere Organsysteme betroffen sind.

Ziel dieser Studie war es, die zugrundeliegenden Pathomechanismen in 4 Familien zu verstehen, die von kongenitaler Mikrozephalie betroffen sind. In einer konsanguinen pakistanischen Familie mit syndromaler Mikrozephalie wurde ein digenischer Erbgang beobachtet, bei dem ich homozygote Missense-Mutationen in den Genen CFAP20 und C1orf131 identifizierte. Die nachteiligen Auswirkungen der Varianten c.185C>G; p.(Pro62Arg) in CFAP20 und c.529C>T; p.(Arg177Trp) in C1orf131 wurden mit aus Patienten stammenden Fibroblasten untersucht, um den Pathomechanismus zu klären. Molekulardynamiksimulationen (MD) zeigten, dass das Prolin an Position 62 instabil ist und 3D-Konformationsänderungen in der CFAP20-Mutante auftreten. Interessanterweise war CFAP20 sowohl im Nukleolus als auch in den Zilien lokalisiert. Beide Gene teilten 17 interagierende Bindungspartner. Immunfluoreszenz und Live-Cell-Imaging mit Überexpression von GFP-CFAP20 und GFP-C1ORF131 bestätigten die nukleolare Lokalisierung beider Proteine. Mutationen in nukleolaren Proteinen sind dafür bekannt, dass sie nukleolaren Stress induzieren und Autophagie auslösen. Transkriptomdaten zeigten eine Herabregulierung von BCL2 und eine Hochregulierung von Autophagie-Inhibitoren. Dies könnte zu einer Abschaltung des Zellüberlebensmechanismus führen. Die beobachtete Hochregulierung von DCC und die Herabregulierung von NTN1 könnten DCC-vermittelte Apoptose verursachen, und die Hochregulierung von TP53TG3D und RRPM deutet auf eine DNA-Schadensreaktion hin, die in den Fibroblasten des Patienten im Vergleich zum Wildtyp zum Zelltod führt. Der Zelltodtest ergab eine höhere Expression von Caspase 3 und 53BP1, und der Zellproliferationstest bestätigte eine geringere Proliferationsrate in den von Patienten stammenden Fibroblasten im Vergleich zu Wildtypzellen. Meine Beobachtung unterstreicht die Bedeutung der Nukleolarproteine für die Zellproliferation. Jede Abweichung von diesen Proteinen kann während der Embryonalentwicklung zu zellulärer Seneszenz und Apoptose führen, was schwerwiegende Folgen für die Entwicklung des Gehirns und anderer

Organsysteme hat. Frühere Studien haben über Varianten in CFAP20 berichtet, die mit Retinopathie und Apoptose in Netzhautzellen eines Null-Mutanten-Zebrafischmodells in Verbindung stehen. Defekte in C1orf131 führen zu einer gestörten Ribosomenbiogenese und einer zentrosomalen Dysfunktion, die sich in überzähligen Zentrosomen und verzerrten Zilien zeigt.

Für die verbleibenden Familien mit kongenitaler Mikrozephalie hat die Sequenzierung ganzer Exome, gefolgt von In-silico-Analysen, potenzielle Kandidatengene aufgedeckt. Insgesamt bietet diese Studie neuartige und nützliche Einblicke in die genetischen und funktionellen molekularen Grundlagen von neurologischen Entwicklungsstörungen, insbesondere von syndromaler Mikrozephalie. In Zukunft könnte diese Studie die Grundlage für weitere genomische und therapeutische Forschungen zu diesen und verwandten neurologischen Entwicklungsstörungen bilden.