

Elucidating the Genetic Architecture of Autosomal Recessive Primary Microcephaly (MCPH) in the Pakistani Population



Doctoral thesis

for

the award of the doctoral degree

of the Faculty of Mathematics and Natural Sciences

of the University of Cologne

submitted by

Faiza Latif

accepted for publication in the year 2025

Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Nürnberg
(Gutachter)

Prof. Dr. Kay Hofmann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2025

Summary

Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH) is a type of congenital microcephaly (CM) characterized by significant reduction in the size of cerebral cortex along with intellectual disability. Mutations in 32 genes have been known to cause this disorder. Majority of these causative genes affect centriole biogenesis. However, some MCPH genes cause defects in DNA replication and repair mechanism, cytokinesis, Wnt signaling, apical polarity complex, autophagy, centromere, kinetochore function and spliceosome. Thus, MCPH genes affect a wide variety of cellular and molecular mechanisms involved in the regulation of cerebral cortical size during embryonic brain development. The aim of this study is to characterize the genetic basis of MCPH followed by functional assessment for confirmation and validation.

In this study, 10 families of MCPH are investigated to provide novel disease variant(s)/gene(s) involved in MCPH and syndromic microcephaly in order to give an insight into the underlying molecular pathomechanisms. A consanguineous Pakistani MCPH family harbouring a splice site variant in *USB1* was characterized both genetically as well as at the functional level. U6 biogenesis protein 1 encoded by the *USB1* gene is an enzyme involved in the biogenesis of U6 snRNA by shortening its poly(U) tail in many eukaryotes including humans. Mutational consequences of the *USB1* variant were studied at mRNA and protein levels using patient-derived cells. Splicing defects were observed at mRNA level by RT-PCR with a lower quantity of mRNA in patient-derived fibroblasts. Moreover, lower rates of cellular proliferation and increased levels of autophagy and apoptosis were observed in the patient-derived fibroblasts. The results were further validated by analyzing the data generated by whole-proteome analysis (WPA) and long-read nanopore sequencing. A novel localization pattern of USB1 in the nucleolus and centrosome was observed in human fibroblasts. Based on this data, I propose that the USB1 variant affects both the spliceosomal and ribosomal machinery inflicting the development of the embryonic brain.

Syndromic microcephaly is a type of congenital microcephaly which includes cerebral and extra-cerebral morphological or functional abnormalities. In another consanguineous family, MCP2, a neurodevelopmental disorder with movement abnormalities, abnormal gait, and autistic features (NEDMAGA) was identified. NEDMAGA is a form of secondary microcephaly characterized by infantile-onset global developmental delay leading to mild to profound intellectual disability, unsteady gait, mildly delayed broad-based walking, and absence of meaningful language. A

missense variant was identified in *ZSWIM6* as the putative causative factor for NEDMAGA in this family. *ZSWIM6* has already been reported to be associated with NEDMAGA. Whole-exome sequencing followed by Sanger sequencing and subsequent bioinformatics analyses revealed strong novel candidate genes in the remaining 8 families.

Thus, the findings of this study are expected to provide improved diagnosis, carrier screening and genetic counseling to the affected families. Moreover, molecular knowledge can potentially be utilized by pharmaceutical industries to devise more effective and improved therapeutics.

Zusammenfassung

Die autosomal rezessive primäre Mikrozephalie (MCPH) ist eine Form der kongenitalen Mikrozephalie (CM), die durch eine deutliche Verkleinerung der Großhirnrinde zusammen mit einer geistigen Behinderung gekennzeichnet ist. Es ist bekannt, dass Mutationen in 32 Genen diese Störung verursachen. Die meisten dieser ursächlichen Gene betreffen die Zentriolenbiogenese. Einige MCPH-Gene verursachen jedoch auch Defekte bei der DNA-Replikation und dem Reparaturmechanismus, der Zytokinese, der Wnt-Signalübertragung, dem apikalen Polaritätskomplex, der Autophagie, dem Zentromer, der Kinetochorfunktion und dem Spleißosom. Somit beeinflussen MCPH-Gene eine Vielzahl von zellulären und molekularen Mechanismen, die an der Regulierung der Größe der Großhirnrinde, während der embryonalen Gehirnentwicklung beteiligt sind. Ziel dieser Studie ist es, die genetische Grundlage von MCPH zu charakterisieren, gefolgt von einer funktionellen Bewertung zur Bestätigung und Validierung. In dieser Studie wurden 10 MCPH-Familien untersucht, um neue Krankheitsvariante(n)/Gene zu finden, die an MCPH und syndromaler Mikrozephalie beteiligt sind, und um einen Einblick in die zugrunde liegenden molekularen Pathomechanismen zu geben. Eine konsanguine pakistanische MCPH-Familie mit einer Spleißstellenvariante in *USB1* wurde sowohl genetisch als auch auf funktioneller Ebene charakterisiert. Das vom *USB1*-Gen kodierte U6-Biogeneseprotein 1 ist ein Enzym, das in vielen Eukaryonten einschließlich des Menschen an der Biogenese von U6-snRNA durch Verkürzung ihres Poly(U)-Schwanzes beteiligt ist. Die Folgen der Mutation der *USB1*-Variante wurden auf mRNA- und Proteinebene anhand von patienteneigenen Zellen untersucht. Auf mRNA-Ebene wurden mittels RT-PCR Spleißdefekte beobachtet, wobei die mRNA-Menge in den von Patienten stammenden Fibroblasten geringer war. Darüber hinaus wurden in den von Patienten stammenden Fibroblasten geringere Zellproliferationsraten und erhöhte Autophagie- und Apoptosewerte festgestellt. Die Ergebnisse wurden durch die Analyse der Daten aus der Ganz-Proteom-Analyse (WPA) und der Long-Read-Nanopore-Sequenzierung weiter validiert. In menschlichen Fibroblasten wurde ein neuartiges Lokalisierungsmuster von *USB1* im Nukleolus und Zentrosom beobachtet. Auf der Grundlage dieser Daten schlage ich vor, dass die *USB1*-Variante sowohl die spliceosomalen als auch die ribosomalen Mechanismen beeinflusst, die die Entwicklung des embryonalen Gehirns beeinträchtigen.

Syndromale Mikrozephalie ist eine Form der angeborenen Mikrozephalie, die zerebrale und extrazerebrale morphologische oder funktionelle Anomalien umfasst. In einer anderen blutsverwandten Familie, MCP2, wurde eine neurologische Entwicklungsstörung mit Bewegungsanomalien, abnormalem Gang und autistischen Merkmalen (NEDMAGA) festgestellt. NEDMAGA ist eine Form der sekundären Mikrozephalie, die durch eine globale Entwicklungsverzögerung im Kindesalter gekennzeichnet ist, die zu einer leichten bis schweren geistigen Behinderung, einem unsicheren Gang, einer leichten Verzögerung beim Gehen auf breiter Basis und dem Fehlen einer bedeutungsvollen Sprache führt. In dieser Familie wurde eine Missense-Variante in ZSWIM6 als mutmaßlich ursächlich für NEDMAGA identifiziert. Es wurde bereits berichtet, dass ZSWIM6 mit NEDMAGA assoziiert ist. Durch Ganz-Exom-Sequenzierung, gefolgt von Sanger-Sequenzierung und anschließenden bioinformatischen Analysen wurden in den verbleibenden 8 Familien starke neue Kandidatengene entdeckt.

Es wird erwartet, dass die Ergebnisse dieser Studie zu einer verbesserten Diagnose, einem Träger-Screening und einer genetischen Beratung der betroffenen Familien führen werden. Darüber hinaus kann das molekulare Wissen möglicherweise von der pharmazeutischen Industrie genutzt werden, um wirksamere und bessere Therapeutika zu entwickeln.