

**Diplomarbeit**

**Genetische Charakterisierung dreier  
pakistanischer Familien mit autosomal rezessiv  
vererbter primärer Mikrozephalie**

eingereicht von

**Julia Halswick**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Diagnostik- und Forschungsinstitut für Humangenetik**

unter der Anleitung von

**Assoz. Prof. Dr.rer.nat. Christian Windpassinger**

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, 16.02.21*

*Julia Halswick eh*

# Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich beim Schreiben meiner Diplomarbeit und während meines gesamten Studiums begleitet und unterstützt haben.

Zunächst danke ich Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Christian Windpassinger für die gute Betreuung.

Auch das restliche Team des Instituts für Humangenetik stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Danke für die Einführung in die Laborarbeit und die geduldige Hilfe.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützen und es mir ermöglichen meine Träume zu verwirklichen. Danke, dass ihr immer hinter mir steht.

Eine große Hilfe während der Entstehung dieser Arbeit waren meine Schwester Christine, sowie meine Freunde Dominik und Monika. Danke für eure Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagungen .....	ii
Inhaltsverzeichnis .....	iii
Glossar und Abkürzungen .....	v
Abbildungsverzeichnis .....	vi
Tabellenverzeichnis .....	vii
Zusammenfassung .....	viii
Abstract.....	ix
1 Einleitung .....	1
1.1 Autosomal rezessive primäre Mikrozephalie.....	2
1.1.1 Definition und Ätiologie der Mikrozephalie .....	2
1.1.2 Diagnostik und Klinik .....	3
1.1.3 Epidemiologie.....	4
1.2 Syndromale Formen der Mikrozephalie .....	6
1.2.1 Seckel-Syndrom .....	6
1.2.2 Meier-Gorlin-Syndrom.....	7
1.2.3 Mikrozephaler osteodysplastischer primordialer Dwarfismus Typ II (MOPD2).....	7
1.2.4 Taybi-Linder-Syndrom (MOPD1 und 3).....	8
1.2.5 Feingold-Syndrom.....	8
1.3 Gehirnenwicklung und Neurogenese.....	9
1.3.1 Einführung in die Gehirnentwicklung.....	9
1.3.2 Neurogenese .....	10
1.4 Störung der Entwicklung bei MCPH .....	12
1.5 Genloci und Pathogenese bei MCPH.....	13
1.5.1 Mikrozephalin.....	16
1.5.2 ASPM (Abnormal Spindle-Like Microcephaly-Associated Protein).....	17
1.5.3 WDR62 (WD Repeat-Containing Protein 62).....	18
1.5.4 CEP152 (Centrosomal Protein of 152 kDa) .....	19
1.6 Konsanguinität .....	20
2 Material und Methoden .....	21
2.1 Die untersuchten Familien .....	21

2.1.1	MCP15.....	21
2.1.2	MCP16.....	23
2.1.3	MCP17.....	25
2.2	Methoden .....	27
2.2.1	SNP-Array .....	28
2.2.2	Homozygotie-Mapping.....	30
2.2.3	Sequenzierung der Kandidatengene .....	31
2.2.4	Auswertung der Sequenzierdaten .....	34
3	Ergebnisse.....	36
3.1	MCP15 .....	36
3.2	MCP16.....	39
3.3	MCP17.....	42
4	Diskussion .....	44
5	Literaturverzeichnis.....	48

## Glossar und Abkürzungen

A	Adenin
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CMV	Cytomegalievirus
Da	Dalton/atomare Masseneinheit
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E	Embryonaltag
G	Guanin
<i>Großbuchstaben (z.B. ASPM)</i>	Gennamen
GW	Woche nach Befruchtung/Gestationswoche
HGMD	Human Gene Mutation Database
<i>Kleinbuchstaben (z.B. aspm)</i>	Proteinnamen
MCPH	autosomal rezessive primäre Mikrozephalie
MOPD	Mikrozephaler osteodyplastischer primordialer Dwarfismus
MRT	Magnetresonanztomografie
NGS	Next Generation Sequencing
NPZ	Neuroprogenitorzellen
OFC	okzipito-frontaler Umfang
OMIN	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerasekettenreaktion
PZM	perizentrioläre Matrix
RNase	Ribonuklease
SE	Standardeinheiten
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSW	Schwangerschaftswoche
SVZ	subventrikuläre Zone
T	Thymin
UCSC	University of California, Santa Cruz
VZ	ventrikulär Zone
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gemeinsame Endstrecke der Auswirkungen von Mutationen in den Genen der Gehirnentwicklung .....	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung der MCPH-Genloci im Karyogramm. ....	13
Abbildung 3: Stammbaum der Familie MCP15 .....	21
Abbildung 4: Stammbaum der Familie MCP16 .....	23
Abbildung 5: Stammbaum der Familie MCP17 .....	25
Abbildung 6: Ablauf der Arbeitsschritte. ....	27
Abbildung 7: Ablauf des SNP-Arrays .....	28
Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Gelelektrophorese .....	32
Abbildung 9: DNA-Sequenz im SnapGene Viewer .....	34
Abbildung 10: Ergebnisse einer BLAT Search im UCSC Genome Browser .....	35
Abbildung 11: Schematische Darstellung der MCPH-Genloci und übereinstimmender Homozygotie-Regionen von MCP15_1 und MCP15_2 im Karyogramm .....	37
Abbildung 12: Gene im ersten homozygoten Bereich der Betroffenen MCP15_1 und MCP15_2 dargestellt im UCSC Genome Browser .....	37
Abbildung 13: Gene im zweiten homozygoten Bereich der Betroffenen MCP15_1 und MCP15_2 dargestellt im UCSC Genome Browser .....	38
Abbildung 14: Schematische Darstellung der MCPH-Genloci und übereinstimmender Homozygotie-Regionen von MCP16_1 und MCP16_2 im Karyogramm .....	40
Abbildung 15: DNA-Sequenz der Individuen MCP16_1, MCP16_2 und MCP16_3 im SnapGene Viewer .....	41
Abbildung 16: Schematische Darstellung der MCPH-Genloci und übereinstimmender Homozygotie-Regionen von MCP17_1 und MCP17_2 im Karyogramm .....	43

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: OFC-Kontrolltabelle nach Alter .....	5
Tabelle 2: Alle bekannten MCPH-Genloci mit Genname und Lokalisation des jeweiligen Proteins in der Zelle.....	15
Tabelle 3: Klinische Daten der Betroffenen der Familie MCP15. ....	22
Tabelle 4: Klinische Daten der Betroffenen der Familie MCP16. ....	24
Tabelle 5: Klinische Daten der Betroffenen der Familie MCP17. ....	26
Tabelle 6: Positionen der übereinstimmenden homozygoten Bereiche von MCP15_1 und MCP15_2.....	36
Tabelle 7: Positionen der übereinstimmenden homozygoten Bereiche der Betroffenen MCP16_1 und MCP16_2. ....	39
Tabelle 8: Positionen der übereinstimmenden homozygoten Bereiche der Betroffenen MCP17_1 und MCP17_2. ....	42

## Zusammenfassung

Das Thema der vorliegenden Diplomarbeit ist die genetische Charakterisierung dreier pakistanischer Familien mit primärer rezessiv vererbter Mikrozephalie (MCPH). Hierbei handelt es sich um eine selten auftretende Erkrankung, bei der die Betroffenen von Geburt an ein zu kleines Gehirn haben. MCPH wird hier durch die Betrachtung von drei betroffenen Familien aus Pakistan und Untersuchung ihres Erbgutes thematisiert.

Ziel der Arbeit ist es, durch die Auswertung vorhandener Literatur und durch Analyse des Erbgutes, die krankheitsverursachende Mutation in allen drei Familien zu finden.

Die hier verwendete Methode basiert auf der Homozygotie-Strategie. Dazu wird zunächst eine genomweite SNP-Analyse durchgeführt und die daraus gewonnenen Daten auf homozygote Bereiche untersucht. Diese Bereiche werden mit bekannten Genloci verglichen, um so mögliche Kandidatengene ausfindig zu machen. Durch anschließende DNA-Sequenzierung der codierenden Bereiche des Gens soll zur Identifizierung der kausalen Mutation führen. Die resultierenden Varianten werden mittels Segregationsanalyse in der Familie weiter evaluiert.

Dabei wurde als Krankheitsursache für die Betroffenen einer Familie die Mutation c.3978G>A im *ASPM*-Gen ausfindig gemacht, welche eine der häufigsten für Mikrozephalie verantwortliche Mutation ist.

Die verwendete Methode konnte für die anderen beiden Familien keine bereits bekannte Mutation ausfindig machen, daher bietet diese Arbeit Potential für weitere Untersuchungen und es gibt die Möglichkeit in weiterer Folge mittels Whole-Exom-Sequenzierung andere Mutationen zu detektieren.

Obwohl die Methoden der Genetik immer besser werden, gibt es dennoch viele ungeklärte Krankheitsfälle. Die durchgeführten Untersuchungen erhalten ihre Wichtigkeit sowohl für die Betroffenen als auch für die wissenschaftliche Forschung, dadurch, dass mit jedem weiteren Gen, dem eine Funktion zugeordnet werden kann, die Gehirnentwicklung und Störungen dieser besser verstanden werden können. Somit kann durch Beratungs- und Diagnostikfortschritte auch eine höhere Gesundheitsqualität der Betroffenen erreicht werden.

## Abstract

The subject of the present diploma thesis is the genetic characterisation of three Pakistani families with autosomal recessive primary microcephaly (MCPH). This is a rare disease in which the affected person has a brain that is too small from birth. Within this thesis MCPH is investigated by looking at three affected families from Pakistan and examining their genetic material.

The aim of the work is to find the mutations causing the disease in all three families by evaluating existing literature and by analyzing their genetic material.

The method used here is based on the homozygosity based strategy. First, genome wide SNP analysis is performed and the resulting data is examined for homozygous areas. These areas are compared with known gene loci to identify potential candidate genes. The coding regions of these genes are sequenced afterwards. The revealed variants are further tested for segregation within the family.

The mutation c.3978G>A in the *ASPM* gene, which is one of the most common mutations responsible for microcephaly, was found to be the cause of the disease for one family.

The method used was not able to detect any already known mutation for the other two families, so this work offers a lot of potential for further considerations and there is the possibility to perform further research using whole exome sequencing.

Although methods of genetics are rapidly improving, there are still many unsolved cases with rare genetic diseases. The investigations are important both for those affected and for scientific research, because with each additional gene to which a function can be assigned, the brain development and disorders of brain function can be better understood. Thus, through progress in counseling and diagnostics, a higher quality of health of those, who are affected, can be potentially achieved.

# 1 Einleitung

Im menschlichen Gehirn sind in einem Volumen von durchschnittlich 1350cm<sup>3</sup> 100 Millionen Nervenzellen und viele weitere Zellen untergebracht. Dementsprechend komplex ist auch die Gehirnentwicklung. Dabei muss genau die richtige Anzahl an Zellen zur richtigen Zeit und am richtigen Ort gebildet werden. Zu bestimmten Zeiten werden bis zu 250.000 Neuronen pro Minute neugebildet.(1) Es ist selbsterklärend, dass dabei auch Fehlentwicklungen auftreten und somit verschiedenste Fehlbildungen des Gehirns entstehen können. So eine Entwicklungsstörung kann sich dann beispielsweise als Mikrozephalie, also als ein zu kleines Gehirn, manifestieren.(2,3)

Die Humangenetik ist ein spannendes Gebiet, das sich in den letzten Jahren stark weiterentwickelt hat. Neue Technologien ermöglichen es immer genauer, schneller und günstiger das Erbgut eines Menschen zu decodieren. Es werden immer mehr krankheitsverursachende Mutationen gefunden.(2,3)

Auch beim Krankheitsbild Mikrozephalie wurden in den vergangenen Jahren immer mehr Gene identifiziert, in denen Mutationen zu dieser Entwicklungsstörung des Gehirns führen. Seit 1998 das erste Gen zugeordnet wurde, sind viele weitere dazu gekommen.(4) Die Identifikation dieser Krankheitsgene als Ursache der Mikrozephalie hilft den Familien, indem sie eine Erklärung für die Erkrankung haben und dadurch, dass eine passende Unterstützung für die Betroffenen gefunden werden kann. Auch auf die wissenschaftliche Forschung wirkt sich die Genidentifikation positiv aus, indem sie die Entwicklung des Gehirns immer besser nachvollziehbar werden lässt. So können auch Ursachen für andere Anomalien gefunden und nachvollzogen werden. Zudem hilft es auch dabei andere Erkrankungen zu verhindern, denn die Familien können aufgeklärt und das Risiko, dass ein weiteres Kind erkrankt, eingeschätzt werden. Ebenso können die Gene anderer Paare untersucht werden, wenn ein Verdacht auf eine Erkrankung vorliegt, wie beispielsweise bei Verwandtenehen oder Mikrozephaliefällen in der Familie.

In diesem ersten Kapitel werden, die in einer Literaturrecherche erarbeiteten, medizinischen und gesellschaftlichen Hintergründe der Arbeit erläutert. Dazu wird zunächst die Erkrankung autosomal rezessive primäre Mikrozephalie (MCPH) genauer betrachtet. Darauf folgt ein Abschnitt mit syndromalen Formen der Mikrozephalie, da dies eine wichtige Differenzialdiagnose zu MCPH ist. Um die Entstehung der Erkrankung zu verstehen, folgen Abschnitte über die Gehirnentwicklung und Neurogenese. Im Anschluss

werden allgemein die Störungen bei Mikrozephalie und dann genauer Genloci und Pathogenese der MCPH erläutert. Anschließend folgt noch ein Kapitel zur Konsanguinität, da diese direkte Auswirkungen auf den Verbreitungsgrad der Erkrankung zu haben scheint.

## **1.1 Autosomal rezessive primäre Mikrozephalie**

Im folgenden Abschnitt werden zunächst Definition und Ätiologie der Mikrozephalie im Allgemeinen, sowie die Diagnostik und Klinik der MCPH behandelt und im Anschluss wird kurz auf epidemiologische Aspekte eingegangen.

### **1.1.1 Definition und Ätiologie der Mikrozephalie**

Mikrozephalie ist keine Diagnose, sondern ein Symptom, welches als eine Verminderung des okzipito-frontalen Umfanges (OFC) definiert ist.(5) Charakteristisch ist zudem eine aus der Verkleinerung des Gehirns resultierende Intelligenzminderung.(4) Diskutiert wird hierbei als Definition eine Verminderung des OFC um zwei oder drei Standardeinheiten (SE) des geschlechts- und altersbezogenen Mittelwertes. Nimmt man eine Abweichung von -2 SE als Definitionsgrenze an, so sind ca. 2% der Bevölkerung betroffen, die meisten dieser Personen haben aber noch keine Intelligenzminderung, bei einer Abweichung von -3 SE sind die meisten Betroffenen intelligenzgemindert.(6)

Die Mikrozephalie kann in eine primäre und eine sekundäre Form unterteilt werden.(7) Die primäre Mikrozephalie, auch kongenitale Mikrozephalie genannt, liegt schon bei Geburt vor und kann auch bereits vor der 36. Schwangerschaftswoche (SSW) nachgewiesen werden. In der Entwicklungsphase des Gehirns kommt es zu einer Störung und die Anzahl der Neuronen ist vermindert.(5,6) Entwickelt sich die Mikrozephalie erst nach der Geburt, nennt man sie sekundär. Das Gehirn entwickelt sich zunächst normal, wächst dann jedoch nicht adäquat weiter.(7) Desweiteren kommt Mikrozephalie auch syndromal vor.(8)

Die Ätiologie der Mikrozephalie ist sehr heterogen. Die sekundäre Mikrozephalie kann durch Störungen der neuronalen Migration, pränatale Insulte oder degenerative Prozesse verursacht werden.(5) Die primäre Mikrozephalie kann sowohl genetische, als auch nicht-genetische Ursachen haben.(7) Zu den nicht-genetischen Ursachen zählen Infektionen der Mutter während der Schwangerschaft (z.B. CMV oder Syphilis), Einnahme von teratogenen Substanzen während der Schwangerschaft (Alkohol, Drogen, Medikamente), destruktive Geschehnisse (proenzepale Zysten durch Hypoxie oder Ischämie) und Kopfverletzungen des Kindes im Mutterleib.(5) Auch die genetischen Ursachen sind

vielfältig: Chromosomale Aberrationen, mitochondriale Mutationen oder autosomal rezessiv vererbte Mutationen können eine Mikrozephalie zur Folge haben.(5,6)

Im Vordergrund dieser Arbeit steht die autosomal rezessiv vererbte primäre Mikrozephalie (MCPH).

### **1.1.2 Diagnostik und Klinik**

Die primäre Mikrozephalie kann bereits ab der 24. SSW durch Ultraschall oder MRT festgestellt werden.(4)

Das diagnostisch wichtigste Mittel ist die Messung des okzipito-frontalen Kopfumfanges. Dieser sollte dabei direkt über den Ohren gemessen werden. Schwierigkeiten bei der Diagnostik bringen die oft unterschiedliche Kopfform und die vielen verschiedenen Tabellen mit Normwerten mit sich. Beachtet werden sollten Alter, Geschlecht und Ethnizität bei der Auswahl der Kontrolltabelle (Beispieltabelle siehe Tabelle 1). Der OFC gibt Auskunft über die Gehirngröße, da die Schädelknochen durch den Druck des Gehirns von innen wachsen. Mit einem verminderten OFC geht daher ein verkleinertes Gehirn einher. Da 55% des Gehirns aus Cortex bestehen, ist vor allem dieser verschmälert. Dies hat oftmals eine Intelligenzminderung zur Folge.(7) Die grundsätzliche Architektur des Gehirns bleibt bei der Mikrozephalie erhalten, teilweise kommt es zu einer Vereinfachung der Gyri. Vereinzelt sind auch Minderwuchs, Epilepsie oder skelettale Anomalien zu beobachten.(8) Bei einer neurologischen Untersuchung kann man häufig eine Intelligenzminderung feststellen und in einigen Fällen zusätzlich Hyperaktivität und verzögerte Sprachentwicklung diagnostizieren. Der Intelligenzquotient betroffener Personen liegt dabei zwischen 30 und 80.(4)

Um die Ursache der Erkrankung zu finden, ist eine genaue Anamnese wichtig. MCPH ist dann eine Ausschlussdiagnose.(5) Bei der detaillierten Anamnese sollte ein Schwerpunkt auf den Schwangerschaftsverlauf gelegt werden, um mögliche nicht-genetische Ursachen aufzudecken. Ein weiterer Schwerpunkt ist die Familienanamnese, denn das Wissen über konsanguine Eltern und ebenfalls erkrankte Geschwister hilft bei der Diagnosestellung. Neben der Messung des OFC sollten die Erkrankten auch gewogen und gemessen, sowie einer physikalischen Untersuchung unterzogen werden. Dabei sind die Ergebnisse üblicherweise normal. Abweichungen können auf andere Erkrankungen bzw. Syndrome mit Mikrozephalie hindeuten.(4)

Eine Bildgebung des Gehirns kann unter Umständen ebenfalls bei der Diagnosestellung helfen. Dazu sollte ein Ultraschall oder MRT bei den betroffenen Kindern gemacht werden.

Die Intelligenzminderung kann bei älteren Kindern durch Tests quantifiziert werden. Hat man alle nicht-genetischen Ursachen ausgeschlossen und kommt somit zu der vorläufigen Diagnose MCPH, kann man diese durch genetische Testungen bestätigen.(4)

### **1.1.3 Epidemiologie**

MCPH ist eine seltene Erkrankung. Die Inzidenz variiert üblicherweise zwischen 1/30.000 in Japan bis 1/250.000 in Holland. In einigen asiatischen und arabischen Ländern kann die Inzidenz noch höher sein, was auf erhöhte Konsanguinitätsraten zurückzuführen ist. In Pakistan werden Ehen zu 38-59% innerhalb der Familie geschlossen, daher findet sich dort eine Inzidenz von 1/10.000.(9,10) Auch für die Prävalenz ergibt sich damit eine breite Spanne von 1,3 - 150/100.000 Geburten.(11)

Mit Stand 2018 sind 685 Patienten aus 321 Familien in der Literatur erwähnt.(12)

OFC Standardabweichung														
-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12	-13	-14	-15
→ ab hier definitionsgemäß Mikrozephalie														

Alter	OFC in cm															
Geburt	34.6	33.0	31.4	29.7	28.1	26.5	24.9	23.3	21.6	20.0	18.4	16.8	15.2	13.5	11.9	10.3
1 M	37.3	35.8	34.4	32.9	31.4	30.0	28.5	27.0	25.5	24.1	22.6	21.1	19.7	18.2	16.7	15.3
3 M	40.3	38.9	37.5	36.0	34.6	33.2	31.8	30.4	28.9	27.5	26.1	24.7	23.3	21.8	20.4	19.0
6 M	43.5	42.2	40.8	39.5	38.1	36.8	35.5	34.1	32.8	31.4	30.1	28.8	27.4	26.1	24.7	23.4
9 M	45.5	44.2	42.9	41.5	40.2	38.9	37.6	36.3	34.9	33.6	32.3	31.0	29.7	28.3	27.0	25.7
1 J	46.9	45.6	44.3	42.9	41.6	40.3	39.0	37.7	36.3	35.0	33.7	32.4	31.1	29.7	28.4	27.1
1.5 J	48.2	46.9	45.5	44.2	42.8	41.5	40.1	38.8	37.4	36.1	34.7	33.4	32.0	30.7	29.3	28.0
2 J	49.2	47.8	46.5	45.1	43.8	42.4	41.0	39.7	38.3	37.0	35.6	34.2	32.9	31.5	30.2	28.8
2.5 J	50.0	48.6	47.3	45.9	44.6	43.2	41.8	40.5	39.1	37.8	36.4	35.0	33.7	32.3	31.0	29.6
3 J	50.5	49.1	47.8	46.4	45.0	43.7	42.3	40.9	39.5	38.2	36.8	35.4	34.1	32.7	31.3	30.0
3.5 J	51.0	49.6	48.2	46.8	45.4	44.1	42.7	41.3	39.9	38.5	37.1	35.7	34.3	32.9	31.5	30.2
4 J	51.2	49.8	48.4	47.0	45.6	44.2	42.8	41.4	40.0	38.6	37.2	35.8	34.4	33.0	31.6	30.2
4.5 J	51.5	50.1	48.6	47.2	45.7	44.3	42.9	41.4	40.0	38.5	37.1	35.7	34.2	32.8	31.3	29.9
5 J	51.8	50.3	48.9	47.4	46.0	44.5	43.0	41.6	40.1	38.7	37.2	35.7	34.3	32.8	31.4	29.9
5.5 J	52.0	50.5	49.0	47.5	46.0	44.6	43.1	41.6	40.1	38.6	37.1	35.6	34.1	32.6	31.1	29.7
6 J	52.2	50.8	49.3	47.9	46.4	45.0	43.5	42.1	40.6	39.2	37.7	36.3	34.8	33.4	31.9	30.5
7 J	52.5	51.1	49.7	48.3	46.9	45.6	44.2	42.8	41.4	40.0	38.6	37.2	35.8	34.4	33.0	31.7
8 J	52.9	51.5	50.1	48.7	47.3	46.0	44.6	43.2	41.8	40.4	39.0	37.6	36.2	34.8	33.4	32.1
9 J	52.2	50.8	49.3	47.9	46.5	45.1	43.6	42.2	40.8	39.3	37.9	36.5	35.0	33.6	32.2	30.8
10 J	53.6	52.1	50.6	49.1	47.6	46.1	44.6	43.1	41.6	40.1	38.6	37.1	35.6	34.1	32.6	31.1
11 J	53.9	52.4	50.8	49.3	47.7	46.2	44.7	43.1	41.6	40.0	38.5	37.0	35.4	33.9	32.3	30.8
12 J	54.1	52.7	51.2	49.8	48.3	46.9	45.4	44.0	42.5	41.1	39.6	38.2	36.7	35.3	33.8	32.4
13 J	54.4	52.8	51.3	49.7	48.2	46.6	45.0	43.5	41.9	40.4	38.8	37.2	35.7	34.1	32.6	31.0
14 J	55.0	53.4	51.8	50.2	48.6	47.0	45.4	43.8	42.2	40.6	39.0	37.4	35.8	34.2	32.6	31.0
15 J	55.5	53.9	52.3	50.8	49.2	47.6	46.0	44.4	42.9	41.3	39.7	38.1	36.5	35.0	33.4	31.8
16 J	56.0	54.4	52.8	51.2	49.6	48.1	46.5	44.9	43.3	41.7	40.1	38.5	36.9	35.3	33.7	32.1
17 J	56.4	54.8	53.3	51.7	50.2	48.6	47.0	45.5	43.9	42.4	40.8	39.2	37.7	36.1	34.6	33.0
18 J	56.7	55.0	53.2	51.4	49.7	47.9	46.1	44.4	42.6	40.8	39.0	37.3	35.5	33.7	32.0	30.2

**Tabelle 1: OFC-Kontrolltabelle nach Alter in Anlehnung an (5). Grün kennzeichnet die Normalwerte, gelb die Grenzwerte der Diagnose Mikrozephalie, blau die Altersklassen der untersuchten Betroffenen und rot die Werte der Betroffenen.**

## **1.2 Syndromale Formen der Mikrozephalie**

Die wichtigste Differentialdiagnose der MCPH ist die syndromale Mikrozephalie, denn es gibt einige genetische und klinische Überlappungen.(8)

Es sind mehr als 800 Syndrome mit Mikrozephalie bekannt.(13) Dazu gehören das Seckel-Syndrom, Meier-Gorlin-Syndrom, Feingold-Syndrom, Taybi-Lindner-Syndrom und der mikrozephale osteodysplastische Dwarfismus Typ II. Betroffene aller dieser Syndrome zeigen eine milde bis stark ausgeprägte Mikrozephalie. Abzugrenzen von MCPH sind sie durch weitere klinische Auffälligkeiten.(14) Die richtige Diagnostik und damit eine korrekte Zuordnung der Betroffenen zu den entsprechenden Syndromen ist sehr wichtig, um diesen die geeignete Therapie und Unterstützung zukommen lassen zu können.(13) Im Folgenden wird daher beispielhaft die Abgrenzung dieser fünf Syndrome mit Mikrozephalie zu MCPH besprochen.

### **1.2.1 Seckel-Syndrom**

Das Seckel-Syndrom ist wie MCPH eine seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung.(15) Es ist gekennzeichnet durch prä- und postnatale proportionale Wachstumsverminderung, Mikrozephalie, Intelligenzminderung und ein charakteristisches vogelähnliches Gesicht sowie durch die Abwesenheit von viszeralen Malformationen. (14,16,17)

Die Abgrenzung zwischen Seckel-Syndrom und MCPH erfolgte früher durch die Wachstumsrestriktion. Die Mindestgröße eines Individuums mit MCPH entsprach der maximalen Größe einer an Seckel-Syndrom erkrankten Person. Heute ist diese Abgrenzung nicht mehr so genau definiert. Man schreibt dem Seckel-Syndrom eine stärker ausgeprägte Intelligenzminderung und faziale Dysmorphien zu.(17) Der Intelligenzquotient Betroffener liegt zu 50% unter 50, was einer starken Intelligenzminderung entspricht. Die vogelähnliche Erscheinung des Gesichts wird hervorgerufen durch ein relativ prominentes Mittelgesicht im Vergleich zum restlichen Kopf. Durch das verkleinerte Gehirn ist die Stirn schmal und flach. Dazu erscheinen die Augen sehr hervorstehend und die Nase groß, während der Unterkiefer mit kleinen Zähnen etwas zurückliegt.(14)

Zurzeit sind neun Gene bekannt, die das Seckel-Syndrom auslösen. Zwei dieser Gene zählen auch zu den MCPH-Genen (*CENPJ*, *CEP152*), was die Ähnlichkeit beider Erkrankungen noch hervorhebt und die Differentialdiagnose erschwert.

Gene des Seckel-Syndroms spielen eine Rolle in Zellwachstum (*TRAP1*), DNA-Reparatur (*ATR*, *NSMCE2*, *DNA2*, *RBBP8*), Zentrosomenfunktion (*MIN*, *CEP63*) und im Aufbau des Spindelapparates (*CENPJ*, *CEP152*).<sup>(17)</sup>

Die Abgrenzung beider Erkrankungen ist schwierig, daher werden sie inzwischen eher als Erkrankungen eines Spektrums gesehen und nicht mehr deutlich voneinander abgegrenzt.<sup>(15)</sup>

### **1.2.2 Meier-Gorlin-Syndrom**

Das Meier-Gorlin-Syndrom ist definiert durch eine Trias aus Mikrotie, Aplasie der Patellae und Kleinwuchs. Bei Betroffenen des Meier-Gorlin-Syndroms findet man mindestens zwei dieser drei Merkmale, am häufigsten liegt eine Kombination aus Mikrotie und Patellaaplasie vor. Meist wird eine intrauterine Wachstumsretardierung diagnostiziert, die sich postnatal im ersten Lebensjahr fortsetzt. Anschließend wachsen die meisten Kinder normal weiter, ohne jedoch zu den Gleichaltrigen aufzuschließen. Mikrozephalie wird bei 43% der Betroffenen diagnostiziert, wobei meist keine Intelligenzminderung vorliegt.<sup>(14,18)</sup> Ein weiteres Merkmal ist die ausbleibende Brustentwicklung. Ursachen sind Mutationen in den Genen *ORC1*, *ORC4*, *ORC6*, *CDT1* und *CDC6*. Wie MCPH wird es autosomal rezessiv vererbt.<sup>(18)</sup>

Das Syndrom ist sehr selten, aber die genaue Prävalenz ist unbekannt. In der Literatur sind 67 Betroffene beschrieben.<sup>(18)</sup>

### **1.2.3 Mikrozephaler osteodysplastischer primordialer Dwarfismus Typ II (MOPD2)**

Auch diese Erkrankung ist durch eine starke Wachstumsretardierung gekennzeichnet. Dazu findet sich häufig eine faziale Beteiligung ähnlich dem Seckel-Syndrom. Die Mikrozephalie verhält sich bei jungen Kindern noch proportional zur Größe, nimmt aber in der Entwicklung weiter zu.<sup>(14)</sup> Erwachsene mit MOPD2 sind meist nur bis zu 100 cm groß, sie haben einen verminderten Kopfumfang, milde Intelligenzminderung, Knochendysplasien und weitere skelettale Fehlbildungen, zudem haben sie ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Insulinresistenz. Verursacht wird MOPD2 durch eine Mutation im Pericentrin-Gen, das Protein wird dadurch funktionsunfähig. Die Vererbung erfolgt autosomal rezessiv.<sup>(19)</sup>

#### **1.2.4 Taybi-Linder-Syndrom (MOPD1 und 3)**

Das Taybi-Linder-Syndrom fasst Typ I und III des mikrozephalen osteodysplastischen primordialen Kleinwuchses zusammen, auch diese folgen einem autosomal rezessiven Erbgang.(20)

Kennzeichen des Taybi-Linder-Syndroms sind eine extreme Mikrozephalie mit strukturellen Hirnmalformationen, Entwicklungsverzögerungen, faziale Dysmorphien, intrauterine Wachstumsretardierung, skelettale Veränderungen sowie trockene Haut und spärliches Haupthaar.(14) Durch die starken Hirnfehlbildungen sind die Betroffenen sehr anfällig für Epilepsie.(20)

#### **1.2.5 Feingold-Syndrom**

Betroffene des Feingold-Syndroms zeigen eine milde primäre Mikrozephalie sowie Missbildungen der Finger (Verwachsungen, Achsenknickung, hypoplastische Daumen). Oft kommen auch tracheo-ösophageale Fisteln und duodenale oder intestinale Atresien vor. In einigen Fällen liegen zusätzlich Wirbelanomalien, Herzfehler oder Taubheit vor. Intelligenzminderungen sind meist nur schwach ausgeprägt. Der Erbgang dieses Syndroms ist autosomal-dominant. Typ I entsteht durch eine Mutation im *MYCN*-Gen und Typ 2 durch eine Mutation im *MIR17HG*-Gen.(14,21)

## **1.3 Gehirnenwicklung und Neurogenese**

Zum Verständnis der Pathogenese der Mikrozephalie, sind Grundkenntnisse der Gehirnentwicklung und Neurogenese erforderlich. Dieses Kapitel gibt daher einen Überblick über die Abläufe.

### **1.3.1 Einführung in die Gehirnentwicklung**

Die Entwicklung des Gehirns beginnt in der dritten Woche nach Befruchtung (Gestationswoche (GW)) mit der Differenzierung der Neuroprogenitorzellen und setzt sich bis ins junge Erwachsenenalter, teilweise auch lebenslang, fort.(22) Diese Entwicklung kann in drei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase ist gekennzeichnet durch die Bildung der Neuronen und deren Wanderung an den ihnen vorbestimmten Platz. Ab der Hälfte der Gestation schließt sich die zweite Phase an, in welcher sich hauptsächlich neuronale Verbindungen ausbilden.(1) Die dritte Phase hält lebenslang an: Das Gehirn verändert sich weiter, beeinflusst durch Erfahrungen, die der Mensch macht. Diese Phase kennzeichnet sich vor allem durch „Synapse pruning“, einem Rückgang der synaptischen Verbindungen.(1,22)

Am Ende der zweiten GW ist der Embryo eine einfache, zweischichtige Struktur. Die obere Schicht wird von Epiblasten gebildet, die untere besteht aus Hypoblasten. Aus den Epiblasten entwickeln sich alle Strukturen des Embryos, während die Hypoblasten extraembryonales Gewebe, z.B. den fetalen Anteil der Plazenta, bilden. Im Laufe der dritten GW entsteht ein dreischichtiger Embryo, eine Entwicklung, die auch unter dem Begriff Gastrulation zusammengefasst wird. Aus den Epiblasten entstehen dabei drei primäre Stammzellreihen, dazu gehören auch die Neuroprogenitorzellen.(22)

Die Gastrulation beginnt mit der Bildung der Primitivrinne in der oberen Schicht. Zellen dieser oberen Schicht wandern zunächst in die Rinne ein und dann durch sie hindurch, um sich unterhalb wieder an die Schicht anzulegen. Sie bilden die zwei neuen Schichten. Die unterste besteht aus entodermalen Stammzellen, welche später den Gastrointestinal- und Respirationstrakt bilden, während die mittlere Schicht sich aus mesodermalen Stammzellen zusammensetzt. Letztere bauen dann Muskeln, Knochen und Gefäße auf. Die dritte Art der primitiven Stammzellen verbleibt in der obersten Schicht. Sie werden epidermale Stammzellen genannt und differenzieren sich weiter in ektodermale und neuroektodermale Stammzellen. Die ektodermalen Stammzellen bilden Haut, Nägel und Schweißdrüsen, während die neuroektodermalen Stammzellen, auch Neuroprogenitorzellen (NPZ) genannt,

Gehirn und Rückenmark aufbauen. Zu NPZ differenzieren sich die Epiblasten, die an der rostral-caudalen Mittellinie liegen. Mit Bildung dieser Stammzellen ist die Gastrulation abgeschlossen.(22)

Anschließend beginnt die Bildung des Neuralrohrs. Dazu entstehen zunächst zwei wulstartige Erhebungen zu beiden Seiten der NPZ. Diese wachsen immer weiter an, bis sie sich schließlich in der Mitte beginnend zu einem Rohr verschließen. Die NPZ kleiden das Neuralrohr als einlagige Schicht von innen aus. Da der hohle Innenraum später das Ventrikelsystem bildet, liegen die direkt angrenzenden Zellen in der sogenannten Ventrikularzone (VZ).(22)

Am anterioren Ende des Neuralrohrs beginnen sich dann Aussackungen zu bilden. Es entstehen die drei Hirnbläschen, sie teilen sich später in fünf Abschnitte und bilden damit die primäre Organisation des Gehirns. Durch Produktion von Neuronen, Neurogenese genannt, wächst die Masse des Gehirns stark an, sodass sich in der Fetalperiode bereits die Sulci und Gyri des Gehirns zu bilden beginnen.(22)

### **1.3.2 Neurogenese**

Die Neurogenese beginnt am 42. Embryonaltag (E42) und ist Mitte der Schwangerschaft abgeschlossen.(1)

Vor der eigentlichen Neurogenese beginnt die Vermehrung der NPZ. Durch symmetrische Teilung entstehen zwei identische NPZ, die damit den NPZ-Pool vergrößern. Dieser Schritt ist wichtig, da sich ein ausdifferenziertes Neuron nicht mehr teilen kann. Es müssen zu Beginn also genügend NPZ gebildet werden, damit später eine ausreichende Anzahl an Neuronen entstehen kann. Bei diesem Prozess durchlaufen die Zellen vier Phasen, in denen es zu einer Kernwanderung kommt. Zunächst liegen die Kerne basal, also auf der dem Ventrikelsystem abgewandten Seite. In der zweiten Phase wandern sie nach apikal zur ventrikulären Oberfläche. Die dritte Phase kennzeichnet die eigentliche Zellteilung in zwei identische Tochterzellen. Abschließend begeben sich die Zellkerne beider Zellen wieder zurück in die basale Ausgangsposition.(1) Diese symmetrische Zellteilung findet in der Zeit zwischen Ende der Gastrulation bis E42 statt.(22) Dann kommt es zu einem Wechsel zur asymmetrischen Zellteilung, dabei verändert sich auch die Furchungsebene. Bei der symmetrischen Zellteilung ist sie vertikal, nun wechselt sie zu horizontal. Bei dieser horizontalen Teilung entstehen eine Neuroprogenitorzelle und ein postmitotisches Neuron oder eine intermediäre Progenitorzelle. Die intermediäre Progenitorzelle teilt sich dann in zwei postmitotische Neuronen.(1) NPZ und intermediäre Progenitorzellen lassen sich in

zwei Gruppen unterteilen: apikale und basale Zellen. Die apikalen Zellen bilden bipolare Fasern zwischen der apikalen und basalen Oberfläche aus und verbleiben in der VZ. Die basalen Zellen hingegen haben unipolare basale Fasern. Sie wandern aus der VZ aus und bilden die auf der VZ liegende, subventrikuläre Zone (SVZ). Die basalen Zellen teilen sich asymmetrisch weiter. VZ und SVZ bilden zusammen die aktive Proliferationszone, aus der die Pyramidenzellen hervorgehen, welche die sechsschichtige Struktur des Cortex aufbauen.(1) Die Neurogenese ist bei E108 beendet.(22)

Nach Beendigung der Neurogenese wechseln die Neuroprogenitorzellen zur Gliogenese, sodass auch die beiden Hauptgliazellen, Astrozyten und Oligodendrozyten, entstehen.(23)

## 1.4 Störung der Entwicklung bei MCPH

Dieses Kapitel gibt einen kurzen Überblick über die allgemeinen Störungen bei MCPH, damit im Folgenden die genaue Pathogenese erläutert werden kann.

In die komplexe Entwicklung des Gehirns sind viele Gene involviert. Die Proteine der bekannten MCPH-Genloci sind meist wichtige Bestandteile der zellulären Mechanismen, die die Gehirngröße regulieren.(24) Die Gehirngröße ist vor allem abhängig von der Fähigkeit der NPZ, sich selbst zu erneuern.(8)

Ein verfrühter Übergang zur asymmetrischen Teilung führt zu einer verminderten Anzahl an NPZ. Daraus folgt eine Verringerung der Neuronenanzahl und damit geht ein verkleinertes Gehirn einher. Für die normale Gehirnentwicklung muss also ein Gleichgewicht zwischen symmetrischer und asymmetrischer Teilung, aber auch zwischen Apoptose und Proliferation, sowie eine normale Differenzierung der Zellen gegeben sein.(8) Dieser Ablauf ist in Abbildung 1 nochmal grafisch dargestellt.

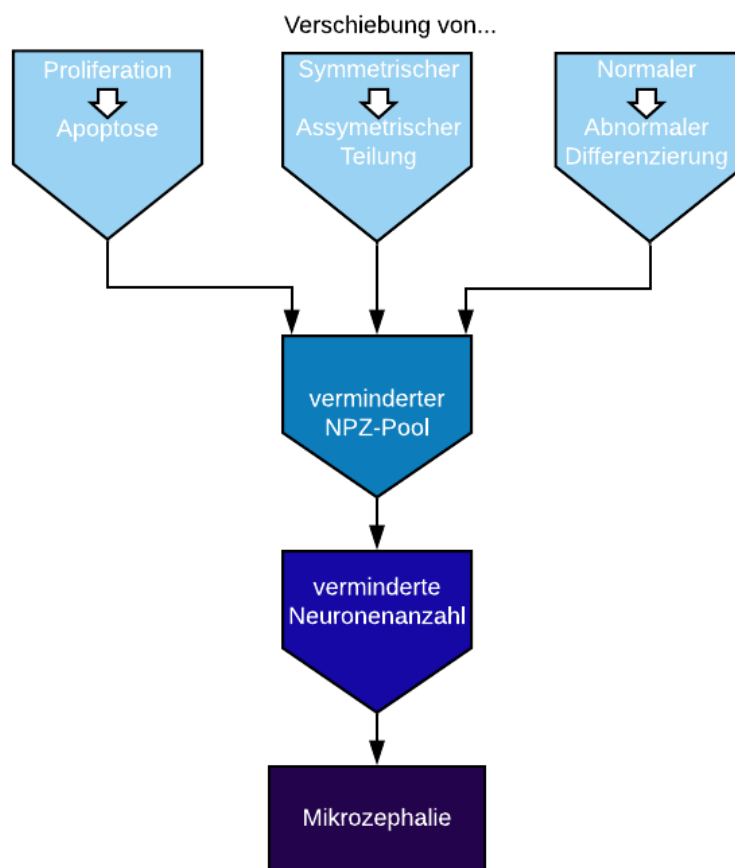


Abbildung 1: Gemeinsame Endstrecke der Auswirkungen von Mutationen in den Genen der Gehirnentwicklung.

## 1.5 Genloci und Pathogenese bei MCPH

In diesem Abschnitt werden die Prozesse, die zur Entstehung von MCPH führen, beleuchtet, ebenso wie bereits bekannte Gene. Im Anschluss werden einige Gene und ihre Rolle in der Entwicklung von MCPH näher beschrieben.

Die Gehirngröße bei Geburt wird durch Proliferations- und Apoptoserate der NPZ während der Neurogenese bestimmt.(9) Proteine aller bekannten Genloci sind in Proliferation und Differenzierung der NPZ oder Apoptose involviert und können daher bei dem Auftreten einer Mutation zu einem verminderten Gehirnwachstum führen.(11)

In der Datenbank OMIM wurden bisher 25 Genloci für MCPH eingetragen, die mit MCPH1- MCPH25 benannt wurden.(25) In Tabelle 2 sind alle Loci mit den zugeordneten Genen sowie den Proteinlokalisationen in der Zelle aufgelistet und in Abbildung 2 finden sich alle Genloci mit ihrer Position im Genom.

Es wird allerdings vermutet, dass noch mehr Gene involviert sind, denn bei 20-30% der Inder und Pakistaner mit MCPH ist die Mutation noch unbekannt. Bei den Westeuropäern und Nordamerikanern sind es sogar 50-75%.(26)

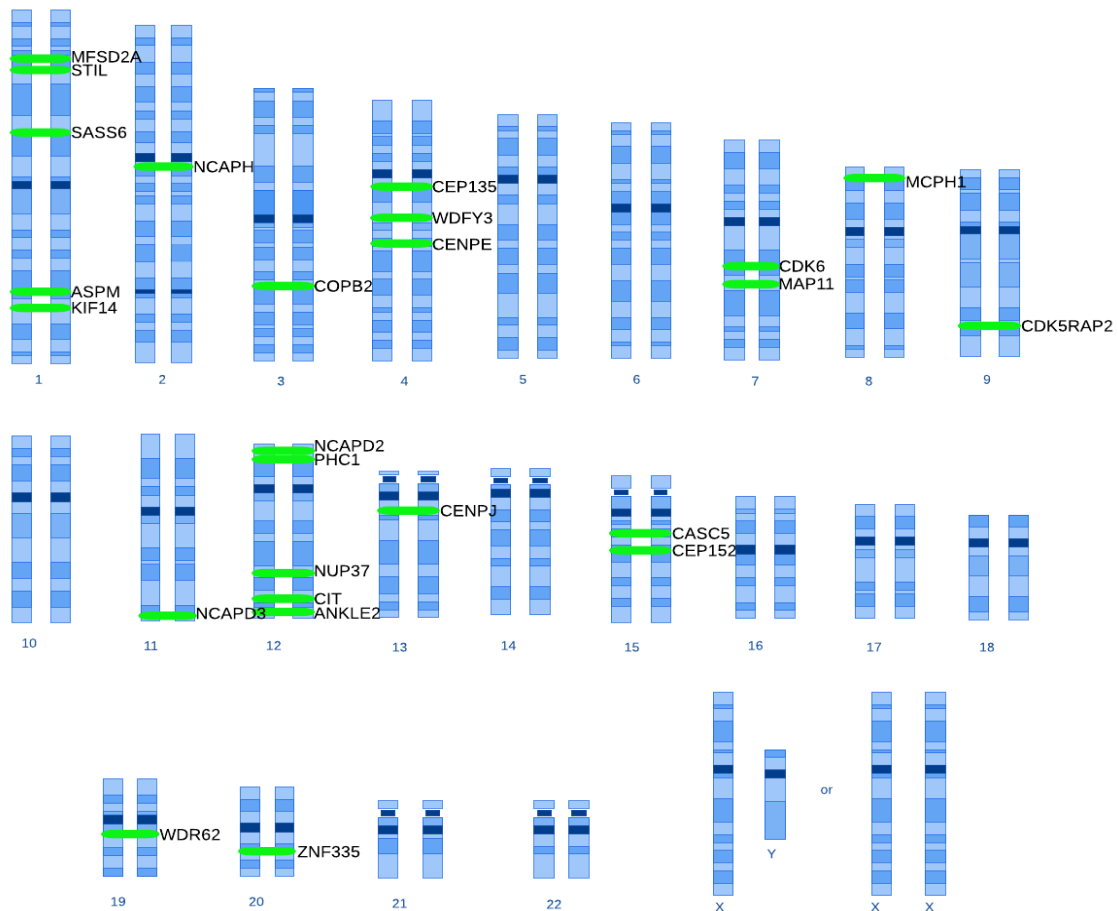


Abbildung 2: Schematische Darstellung der MCPH-Genloci im Karyogramm.

<b>Locus</b>	<b>Gencode</b>	<b>Proteinlokalisierung</b>	<b>Referenz</b>
MCPH1	<i>MCPH1</i> , Microcephalin 1	Zentrosom	(6)
MCPH2	<i>WDR62</i> , WD repeat domain 62	Spindelpole/Nukleus	(6)
MCPH3	<i>CDK5RAP2</i> , CDK5 regulatory subunit associated protein 2	Zentrosom	(6)
MCPH4	<i>CASC5</i> , cancer susceptibility candidate 5/KNL1, kinetochore scaffold 1	Kinetochor	(6)
MCPH5	<i>ASPM</i> , abnormal spindle microtubule assembly	Spindelpole/Nukleus	(6)
MCPH6	<i>CENPJ</i> , centromere protein J	Zentrosom	(6)
MCPH7	<i>STIL</i> , <i>SCL/TAL1</i> interrupting locus	Zentriole	(6)
MCPH8	<i>CEP135</i> , centrosomal protein 135	Zentrosom	(6)
MCPH9	<i>CEP152</i> , centrosomal protein 152	Perizentrioläre Matrix	(6)
MCPH10	<i>ZNF335</i> , zinc finger protein 335	Bestandteil der H3K4 Methyltransferase	(6)
MCPH11	<i>PHC1</i> , polyhomeotic homolog 1	Bestandteil von Polycomb	(6)
MCPH12	<i>CDK6</i> , cyclin dependent kinase 6	Spindelpole/Zytosol und Nukleus	(6)
MCPH13	<i>CENPE</i> , centromere protein E	Zentromer	(6)
MCPH14	<i>SASS6</i> , <i>SAS-6</i> , centriole assembly protein	Zentriole	(6)
MCPH15	<i>MFSE2A</i> , major facilitator superfamily domain containing 2A	Endothel der Blut-Hirn-Schranke	(6)
MCPH16	<i>ANKLE2</i> , ankyrin repeat and LEM domain containing 2	Kernhülle	(6,27)
MCPH17	<i>CIT</i> , citron rho-interacting serine/threonine kinase	Mittelkörper bei der Zytokinese	(6)
MCPH18	<i>WDFY3</i> , WD repeat and FYVE domain containing 3	Nukleus/Zytoplasma	(28)
MCPH19	<i>COPB2</i> , coatamer protein complex subunit beta 2	Golgiapparat, Zytoplasma	(29)

<b>Locus</b>	<b>Genname</b>	<b>Proteinlokalisierung</b>	<b>Referenz</b>
MCPH21	<i>NCAPD2</i> , chromosome-associated protein D2/non-SMC condensing I complex subunit D2	Nukleus/Zytoplasma	(30)
MCPH22	<i>NCAPD3</i> , chromosome-associated protein D3/non-SMC condensing II complex subunit D3	Nukleus/Zytoplasma	(30)
MCPH23	<i>NCAPH</i> , chromosome-associated protein H/non-SMC condensing I complex subunit H	Nukleus/Zytoplasma	(30)
MCPH24	<i>NUP37</i> , nucleoporin 37	Nukleus	(31)
MCPH25	<i>MAP11</i> , microtubule associated protein 11	Spindelpole	(32)

**Tabelle 2: Alle bekannten MCPH-Genloci mit Genname und Lokalisation des jeweiligen Proteins in der Zelle.**

Alle Gene werden in den NPZ während der frühen Gehirnentwicklung stark exprimiert.(8)  
 Viele MCPH-Proteine sind während der Interphase am Zentrosom oder während der Mitose an den Spindelpolen zu finden. Schlussfolgernd kann man davon ausgehen, dass Zentrosome eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von MCPH spielen.(6)

Zentrosomen sind Zellorganellen, welche in viele Prozesse einer Zelle involviert sind.(8)  
 Ein Zentrosom ist jeweils aus einem Paar Zentriolen aufgebaut, die von einer perizentriolären Matrix (PZM) umgeben sind. Die Zentriolen bestehen jeweils aus neun Mikrotubulitriplets, welche einen Zylinder bilden. Die Zentriolen organisieren auch die PZM, welche für die Bildung und Verankerung von zytoplasmatischen Mikrotubuli notwendig ist.(8)

Zunächst liegt je ein Zentrosom pro Zelle vor. In der S-Phase des Zellzyklus kommt es dann zu einer Zentrosomenverdopplung. Die beiden Zentrosomen trennen sich kurz vor Beginn der Mitose und wandern zu den gegenüberliegenden Zellpolen. Zur gleichen Zeit läuft ein Prozess ab, welcher zusätzliche Proteine in die PZM einwandern lässt. Diesen bezeichnet man als Zentrosomenreifung. Diese Proteine führen zu einer erhöhten Produktion von Mikrotubuli, als Vorbereitung auf die Zellteilung.(8)

Die Zentrosomen modulieren viele zelluläre Prozesse, dazu gehören Aufbau und Erhalt von Zellform, Polarität, Adhäsion, Mobilität, Zilien, Genomstabilität und interzellulärem Transport. Weitere Aufgaben sind Spindelposition und -orientierung, sowie

Zellzyklusprogression und DNA-Schadenantwort. Defekte beeinträchtigen daher den Ablauf des Zellzyklus und der Zellteilung. Dies kann zu Aneuploidie, Zellarrest, Zelltod oder auch unkontrolliertem Zellwachstum führen.(8)

Die meisten MCPH-Proteine interagieren auf verschiedenen Stufen mit den Zentrosomen. *cenpj*, *stil* und *cep135* sind Zentriolenkomponente, während Mikrocephalin, *cdk5rap2* und *cep152* Bestandteile der PZM sind. Auch *wdr62*, *aspm* und *cdk6* sind zu bestimmten Zeiten am Zentrosom zu finden. Andere Proteine, wie *cas5* und *phc1* interagieren mit Zentrosomenbestandteilen. Zudem sind viele Proteine miteinander verbunden und bilden somit ein Netzwerk.(8)

Die MCPH Proteine haben durch ihre Interaktionen mit den Zentrosomen Kontrolle über einige zelluläre Prozesse. Sie haben Einfluss auf Zentriolenentstehung, Zentrosomenreifung, den Zellzyklus, Spindelposition und Mitose. Diese Prozesse können alle zu Veränderungen des Gehirnwachstums führen, indem sie das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Zelltod, symmetrischer und asymmetrischer Teilung sowie normaler und abnormer Differenzierung stören.(8)

Die Wirkweise einiger anderer bekannter Gene kann man allerdings nicht in die Zentrosomenfunktion einordnen, es scheint also noch weitere Mechanismen zu geben.(6)

Modelle der MCPH-Pathogenese haben zum Beispiel gezeigt, dass Defekte auch in Chromosomenkondensation, Mikrotubulibeweglichkeit, Zellzyklus-Kontrollpunkten oder DNA-Schaden-Antwort während der Neurogenese liegen können.(4)

Mutationen im *ASPM*- und *WDR62*-Gen sind am häufigsten und machen bereits 55-60% aller Fälle aus.(33) Die meisten Mutationen sind frameshift- oder nonsense-Mutationen, die zu verkürzten und daher nicht funktionsfähigen Proteinen führen.(8)

Zum besseren Verständnis der Pathogenese von MCPH werden im Folgenden einige ausgewählte Gene und ihre Proteine besprochen.

### **1.5.1 Mikrocephalin**

Mikrocephalin ist das erste Gen, welches zu MCPH zugeordnet wurde.(8) Es liegt auf Chromosom 8p23 und besteht aus 14 Exons. Das Gen ist 241.905 Basenpaare (bp) groß und das daraus ausgelesene Protein ist 835 Aminosäuren lang.(9)

Es befindet sich im Zellkern und wandert zyklisch zum Zentrosom aus. Es ist ein multifunktionales Protein, da es eine Rolle in Spindelbildung, DNA-Reparatur und Aktivierung der Kontrollpunkte des Zellzyklus spielt.(6)

Das Protein besitzt drei BRCT-Domänen, die alle Proteine der Zellzykluskontrolle, DNA-Schadenantwort und DNA-Reparatur gemeinsam haben.(8) Die N-terminale BRCT1 Domäne gibt die Lokalisation am Zentrosom vor, während die beiden anderen BRCT-Domänen sich am entgegengesetzten Ende befinden und für die DNA-Reparatur sorgen, indem sie mit einem Transkriptionsfaktor interagieren.(6)

Durch Mikrocephalin befindet sich chk1 (Checkpointkinase 1) am Zentrosom, welches die Phosphorylierung von cdc25 (cell division cycle 25) hemmt. Ein Fehlen des Proteins führt zu einer verfrühten cdc25-Phosphorylierung und somit zur cdk1 (Cyclin-abhängige Kinase 1)-Aktivierung, was einen zu frühen Eintritt in die Mitose triggert. Es kommt zur zeitlichen Entkopplung von Mitose und Zentrosomenzyklus und somit abnormer Spindel- und Chromosomenanordnung.(6) Im Mausmodell wurde nachgewiesen, dass der Verlust von Mikrocephalin zu verfrühtem Mitoseeintritt, veränderter Spindelorientierung und verfrühtem Wechsel von symmetrischer zu asymmetrischer Teilung führt.(8)

Zusätzlich scheint das Protein in die Chromosomenkondensation involviert zu sein. Ein Funktionsverlust führt zu verfrühter Kondensation.(6)

Im Gen *MCPHI* wurden sieben verschiedene Mutationen gefunden. Viermal kommt es durch einen Basenaustausch zum Einbau einer anderen Aminosäure in das Protein. Dreimal kommt es zur Verschiebung des Leserasters (Frameshiftmutation), davon sind zwei Mutationen zusätzlicher Einbau von einer Base und eine Mutation eine große Deletion. Dies führt in beiden Fällen zu einem funktionsunfähigen Protein.(26)

### **1.5.2 ASPM (Abnormal Spindle-Like Microcephaly-Associated Protein)**

Mutationen im *ASPM*-Gen treten mit 25-50% am häufigsten auf.(8) Das Gen liegt auf Chromosom 1q31.3.(9) Es ist 62.567 bp groß, enthält 28 Exons und das Protein besteht aus 3.477 Aminosäuren. Die *aspm*-Konzentration ist am höchsten im Zellkern, während der Mitose wird es an den Spindelpolen gefunden.(8) Das Protein ist wichtig für die Spindelorientierung und damit für das Verhältnis von asymmetrischer zu symmetrischer Zellteilung. *aspm* fördert die symmetrische Zellteilung. Es wird beim Wechsel zur asymmetrischen Zellteilung weniger exprimiert. Eine Mutation führt daher zu einer Verminderung der symmetrischen Zellteilung und damit zu einer reduzierten NPZ-Zahl.(33)

Es sind bereits 161 verschiedene Mutationen bei insgesamt 638 Betroffenen aus 282 Familien im *ASPM*-Gen gefunden worden. Die meisten Mutationen finden sich in Exons (147 Mutationen), davon sind 73 einzelne Nukleotidsubstitutionen, die in den meisten

Fällen nonsense sind, also zu einem Abbruch des Aminosäurestrangs führen. 65 Mutationen sind Deletionen, die in der Regel zu einem Verschieben des Leserasters führen. Die restlichen neun Mutationen sind Duplikationen oder Insertionen von einem Nukleotid. Es sind zwölf Mutationen in Introns bekannt, diese liegen in einem Bereich, der verantwortlich für das korrekte Splicing ist.

Drei der bekannten Mutationen treten häufig auf: c.3978G>A, c.9557C>G und c.7782\_7783del. Erstere wurde in 60 verschiedenen Familien gefunden.(34) Bei der Mutation c.3978G>A wird an der Position 3978 des codierenden DNAstrangs die Base Guanin durch Adenin ersetzt. An dieser Stelle wird dann anstatt Tryptophan ein Stoppcodon in die Aminosäuresequenz eingebaut und die Synthese bricht ab. c.9557C>G steht für den Austausch von Cytosin durch Guanin an der Position 9557. Dies führt zum Einbau einer anderen Aminosäure. Die letzte Mutation ist eine Deletion von zwei Basen.(26)

### **1.5.3 WDR62 (WD Repeat-Containing Protein 62)**

Bei ca. 10% der MCPH-Betroffenen findet sich die Mutation im *WDR62*-Gen, was es zur zweithäufigsten Mutation macht.(8) Die Position des Gens ist 19q13.12 und es ist 50.230 bp lang. Das entsprechende Protein, bestehend aus 1.523 Aminosäuren, ist wichtig für Protein-Protein-Interaktionen, die durch viele WD40-Domänen vermittelt werden.(8,33) Auch dieses Protein ist hauptsächlich im Kern zu finden und akkumuliert während der Mitose an den Spindelpolen. Der Verlust des Proteins führt zur Zerstreuung der Bestandteile der perizentriolären Matrix, die entscheidend für die Verankerung der Mikrotubuli und damit für die Spindelorientierung ist. Durch die falsche Orientierung der Spindel kommt es zu einer vermehrten asymmetrischen Teilung, sodass die Progenitorzellen frühzeitig zu Neuronen differenzieren.(8)

Bekannt sind 13 verschiedene Mutationen in diesem Gen. Sechs davon führen zu einem Austausch einer Aminosäure, wobei eine Aminosäure durch ein Stoppcodon ausgetauscht wird und das Protein somit verkürzt ist. Sieben Mutationen führen zu Leserasterverschiebungen (Frameshiftmutationen) durch Deletionen oder Insertionen von ein, zwei, vier bzw. 17 Basenpaaren. Diese führen zu einem verfrühten Abbruch der Proteinsynthese, die verkürzten Proteine sind nicht funktionsfähig.(26)

#### **1.5.4 CEP152 (Centrosomal Protein of 152 kDa)**

Das Gen *CEP152* wurde 2010 dem Genlocus MCPH4 zugeordnet.(35) Mutationen in *CEP152* gehören zu den Ursachen für MCPH und das Seckel-Syndrom.(8) Das Gen ist lokalisiert auf Chromosom 15q21.1. Die 72.835 Basen des Gens kodieren 1.710 Aminosäuren, die ein 152 kDa Protein bilden. Das Protein ist wichtig für die Organisation der Mikrotubuli und damit für die Form der Zelle, deren Polarität, Beweglichkeit und für die Zellteilung.(9) Es interagiert mit einigen anderen Proteinen, darunter auch *cep63*, *cdk5rap2* und *wdr62*, mit denen es eine Ringstruktur an der Mutterzentriole bildet. Diese wird für die Zentrosomenduplikation benötigt.(26)

Bisher sind nur zwei Mutationen im *CEP152* bekannt: ein Austausch von A durch C und einer von C durch T. Erstes führt zu einem Einbau von der Aminosäure Prolin statt Glutamin an der Position 265, dies durchbricht einen Bereich des Proteins, der wichtig für die Struktur des Proteins ist. Bei der zweiten Mutation wird Arginin an der Position 987 durch ein Stoppcodon ersetzt, was zu einem verkürzten Protein führt.(26)

## **1.6 Konsanguinität**

Das Thema Konsanguinität wurde in diese Arbeit aufgenommen, da konsanguine Verbindungen und erhöhte Inzidenz von MCPH in starkem Zusammenhang stehen.

Eine konsanguine Verbindung ist eine Ehe zwischen Cousine und Cousin zweiten Grades oder näher. Konsanguinität wird in westlichen Ländern abgelehnt, ist aber in vielen Ländern des mittleren Ostens, Afrikas und Asiens üblich bzw. wird auch bevorzugt.(36) Weltweit leben >20% der Menschen in Bevölkerungsgruppen, die konsanguine Verbindungen bevorzugen.(37) In diesen gilt die Heirat außerhalb der Familie als gefährlich.(36) Weitere Gründe sind ökonomische Vorteile, Schutz des Eigentums, enge Familienverbundenheit und eine geringe Scheidungsrate.(10)

Pakistan hat eine hohe MCPH-Inzidenz mit 1/10.000. Dort liegt die Rate der konsanguinen Verbindungen bei 38-59%, dabei sind Verbindungen zwischen Cousine und Cousin ersten Grades am häufigsten. Konsanguinität ist meistens assoziiert mit niedrigem sozioökonomischen Status und Bildungsstatus, einem Leben in ländlichen Gebieten und junger Heirat.(10)

Verwandtenehen führen zu Problemen mit rezessiv vererbten Erkrankungen, denn sie erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens zweier mutierter Allele in einem Individuum der nächsten Generation. Cousinen und Cousins ersten Grades haben zu 12,5% gleiche Gene, sodass das Risiko einer genetischen Erkrankung um 3% steigt. Ebenso ist die Anzahl der Totgeburten und Schwangerschaftsabbrüche in konsanguinen Gemeinschaften erhöht.(38)

Eine Studie zeigte zudem, dass auch die Wahrscheinlichkeit für häufige Erkrankungen, wie Diabetes, Krebs, Herzerkrankungen, Asthma und Bluthochdruck, ansteigt.(37)

## 2 Material und Methoden

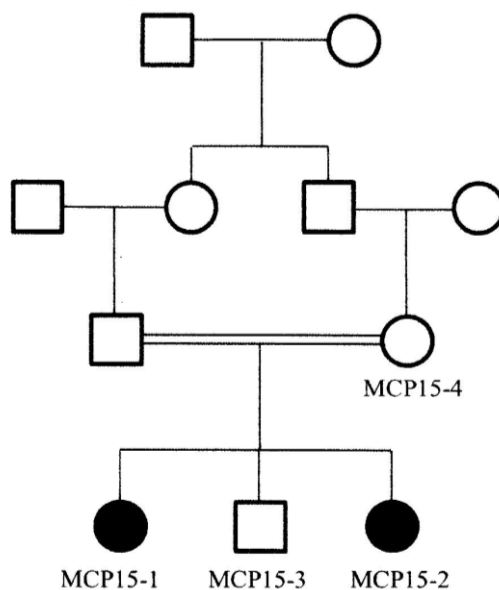
### 2.1 Die untersuchten Familien

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen drei pakistanische, konsanguine Familien, in denen jeweils mindestens zwei Mitglieder an Mikrozephalie erkrankt sind. Dr. Muzammil Ahmad Khan von der Hamad Medical Corporation in Doha hat die Familien rekrutiert. Durch Blutabnahmen wurden Proben mehrerer Familienmitglieder gewonnen. Nach der Aufreinigung wurden sie an das Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz geschickt. Zusätzlich wurden die klinischen Daten der Betroffenen und Stammbäume der Familien übermittelt.

In den folgenden Abschnitten werden die drei Familien mit ihren Stammbäumen vorgestellt und die betroffenen Familienmitglieder anhand der klinischen Daten beschrieben.

#### 2.1.1 MCP15

In der ersten konsanguinen, pakistanischen Familie, die im Rahmen dieser Arbeit beleuchtet wird, sind zwei weibliche Personen phänotypisch von Mikrozephalie betroffen. Bei den Betroffenen handelt es sich um zwei von drei Kindern eines konsanguinen Ehepaares, die Cousine und Cousin ersten Grades sind.



**Abbildung 3: Stammbaum der Familie MCP15. Betroffene Personen sind im Stammbaum schwarz markiert, gesunde weiß. Die Quadrate stehen für Männer und Kreise für Frauen. Die Verwandtschaft zwischen Eltern wird durch eine doppelte, horizontale Linie markiert.**

Die beiden Betroffenen sind weiblich und acht (MCP15\_2) bzw. zwölf (MCP15\_1) Jahre alt. Sie haben beide einen Kopfumfang von 46 cm. MCP15\_1 hat somit laut Tabelle 1 eine OFC Standardabweichung von -6 und MCP15\_2 eine Standardabweichung von -5. Eine klinische Auffälligkeit, die beide Mädchen betrifft, ist die stumpfe Mimik. Verhalten und Entwicklung von MCP15\_2 ist ansonsten unauffällig. MCP15\_1 hingegen spricht nicht und hat Epilepsie.

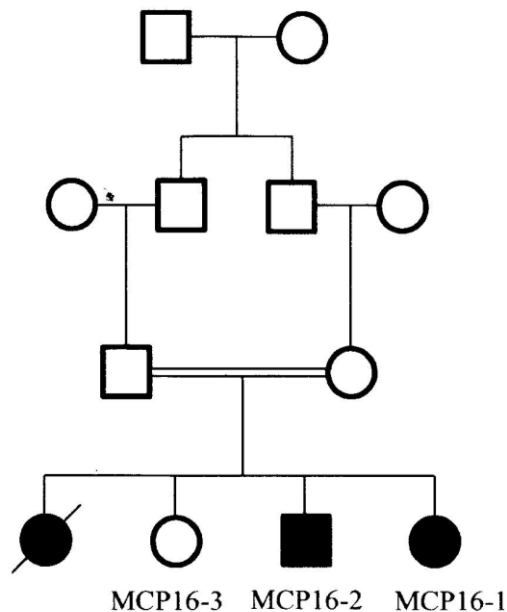
Die klinischen Daten beider Betroffenen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

	<b>MCP15_1</b>	<b>MCP15_2</b>
<b>Geschlecht</b>	weiblich	weiblich
<b>Alter</b>	12 Jahre	8 Jahre
<b>Kopfumfang</b>	46 cm	46 cm
<b>OFC Standardabweichung</b>	-6 SE	-5 SE
<b>Sprache</b>	nein	ja
<b>Gehen</b>	normal	normal
<b>Epilepsie</b>	Ja	nein
<b>Essen/Trinken</b>	selbstständig	selbstständig
<b>Wiedererkennen der Eltern</b>	ja	ja
<b>Verhalten</b>	freundlich	freundlich
<b>Mimik</b>	stumpf	stumpf

**Tabelle 3: Klinische Daten der Betroffenen der Familie MCP15.**

### 2.1.2 MCP16

Die Betroffenen dieser Familie stammen ebenfalls aus einer konsanguinen Verbindung zwischen Cousine und Cousin ersten Grades. Drei der vier Kinder zeigen phänotypische Mikrozephalie, wobei eines bereits verstorben ist und daher keine DNA-Probe dieses Kindes vorhanden ist.



**Abbildung 4: Stammbaum der Familie MCP16. Betroffene Personen sind im Stammbaum schwarz markiert, gesunde weiß. Die Quadrate stehen für Männer und Kreise für Frauen. Die Verwandtschaft zwischen Eltern wird durch eine doppelte, horizontale Linie markiert. Durchgestrichene Symbole stehen für bereits verstorbene Familienmitglieder.**

Die erkrankten Kinder sind ca. neun und elf Jahre alt und haben jeweils einen Kopfumfang von 42 cm. Das bedeutet, dass MCP16\_1 einen verminderten OFC von -7 SE hat, MCP16\_2 hat eine Abweichung von -8 SE (siehe Tabelle 1). Sie zeigen kein aggressives Verhalten und können selbstständig essen und trinken. Nur das neunjährige Mädchen spricht, die motorische Entwicklung ist bei beiden Kindern unauffällig.

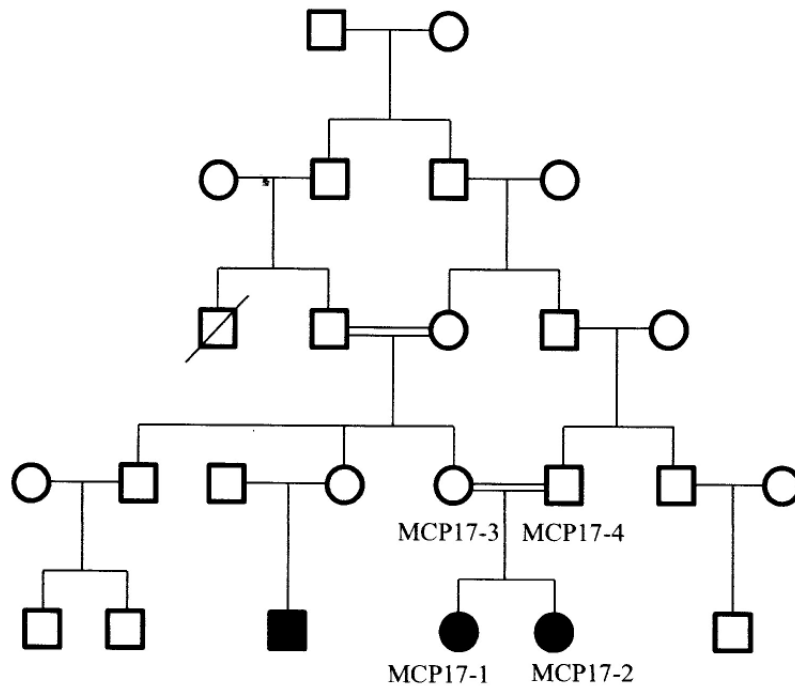
In Tabelle 3 sind alle klinischen Daten der Betroffenen zusammengefasst.

	<b>MCP16_1</b>	<b>MCP16_2</b>
<b>Geschlecht</b>	weiblich	männlich
<b>Alter</b>	9-10 Jahre	11-12 Jahre
<b>Kopfumfang</b>	42 cm	42 cm
<b>OFC Standardabweichung</b>	-7 SE	-8 SE
<b>Sprache</b>	ja	nein
<b>Gehen</b>	normal	normal
<b>Epilepsie</b>	nein	nein
<b>Essen/Trinken</b>	selbstständig	selbstständig
<b>Verhalten</b>	freundlich	freundlich
<b>Krankheitsbeginn</b>	kongenital	kongenital

**Tabelle 4: Klinische Daten der Betroffenen der Familie MCP16.**

### 2.1.3 MCP17

In dieser Familie sind drei Individuen betroffen. Die beiden weiblichen Betroffenen sind Schwestern, der dritte Betroffene ist ihr Cousin. Von ihm liegt keine DNA-Probe vor. Die Eltern der beiden Schwestern sind Cousins und Cousine ersten Grades. Ebenso hat die Mutter konsanguine Eltern.



**Abbildung 5: Stammbaum der Familie MCP17. Betroffene Personen sind im Stammbaum schwarz markiert, gesunde weiß. Die Quadrate stehen für Männer und Kreise für Frauen. Die Verwandtschaft zwischen Eltern wird durch eine doppelte, horizontale Linie markiert. Durchgestrichene Symbole stehen für bereits verstorbene Familienmitglieder.**

Die beiden betroffenen Mädchen sind elf (MCP17\_1) und neun (MCP17\_2) Jahre alt. MCP17\_1 hat einen verminderten OFC von -12 SE mit einem Kopfumfang von 35,5cm. MCP17\_2 hat einen Kopfumfang von 33cm, welcher um -13 SE vermindert ist (vgl. Tabelle 1). Beide Mädchen haben eine verzögerte sprachliche Entwicklung, da sie noch nicht klar sprechen können. Weitere Auffälligkeiten sind das leicht aggressive Verhalten und eine stumpfe Mimik.

Alle klinischen Daten zu MCP17\_ und MCP17\_2 sind in folgender Tabelle 4 aufgelistet.

	<b>MCP17_1</b>	<b>MCP17_2</b>
<b>Geschlecht</b>	weiblich	weiblich
<b>Alter</b>	11 Jahre	9 Jahre
<b>Kopfumfang</b>	35,5 cm	33 cm
<b>OFC Standardabweichung</b>	-12 SE	-13 SE
<b>Sprache</b>	verzögerte Entwicklung	verzögerte Entwicklung
<b>Gehen</b>	normal	normal
<b>Epilepsie</b>	nein	nein
<b>Essen/Trinken</b>	selbstständig	selbstständig
<b>Wiedererkennen der Eltern</b>	ja	ja
<b>Verhalten</b>	leicht aggressiv	leicht aggressiv
<b>Mimik</b>	stumpf	stumpf

**Tabelle 5: Klinische Daten der Betroffenen der Familie MCP17.**

## 2.2 Methoden

Im folgenden Teil werden die Methoden, die in dieser Arbeit verwendet werden, erklärt. Zur Identifikation der krankheitsauslösenden Gene werden Kandidatengene sequenziert, welche durch ein Homozygotie-Mapping ausgewählt werden. Diese Strategie kann nur bei einer rezessiv vererbten Erkrankung und vermuteter Konsanguinität angewandt werden. Es wird dann angenommen, dass die Mutation von beiden Elternteilen vererbt wurde und nun homozygot in einer größeren homozygoten Region liegt. Diese Regionen werden mit einem SNP-Array identifiziert.(39)

Werden Kandidatengene identifiziert, werden sie sequenziert. Es wurde der Weg der Sanger Sequenzierung gewählt, die inzwischen als die traditionelle Variante angesehen wird, im Gegensatz zu den neuen NGS (New Generation Sequencing)-Methoden. Dafür werden zunächst eine Polymerasekettenreaktion (PCR) und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dann werden die Proben auf die Sequenzierung vorbereitet und anschließend in einem Sequenziergerät ausgelesen. Abbildung 6 zeigt eine Übersicht der benötigten Arbeitsschritte.

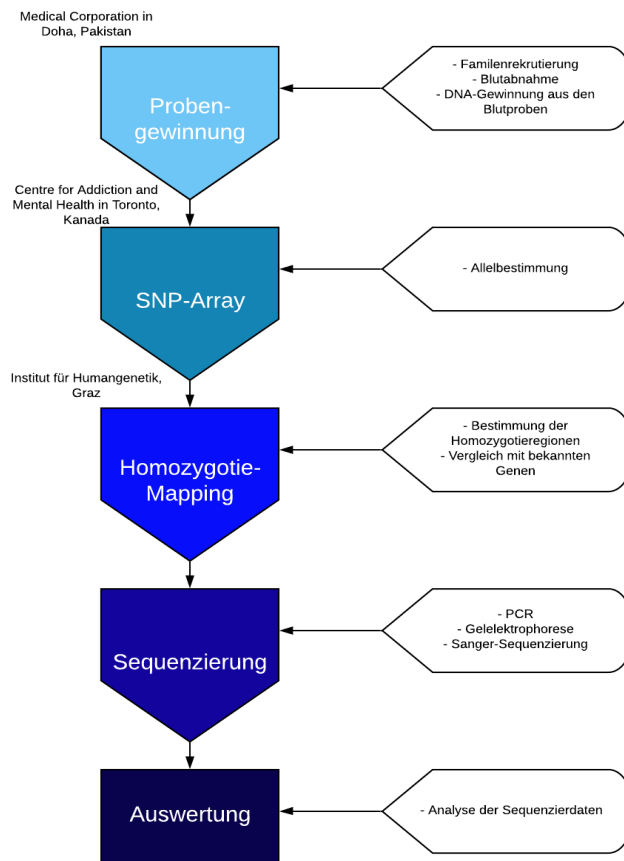


Abbildung 6: Ablauf der Arbeitsschritte.

## 2.2.1 SNP-Array

SNP steht für Single Nucleotide Polymorphism. Es sind Positionen im Genom, an denen einzelne Basenpaare bei mehr als einem Prozent der Bevölkerung mutiert sind. Sie machen 90% der Unterschiede in der DNA zwischen zwei Menschen aus.(40,41)

SNPs führen zur Entstehung verschiedener Allele, also unterschiedlicher Varianten eines Gens, wenn sie im codierenden Bereich liegen. Hat ein Organismus zwei identische Allele eines Gens, ist er für dieses homozygot. Sind sie unterschiedlich, ist er heterozygot.(40)

Die Schritte eines SNP-Arrays sind in Abbildung 7 zusammengefasst.

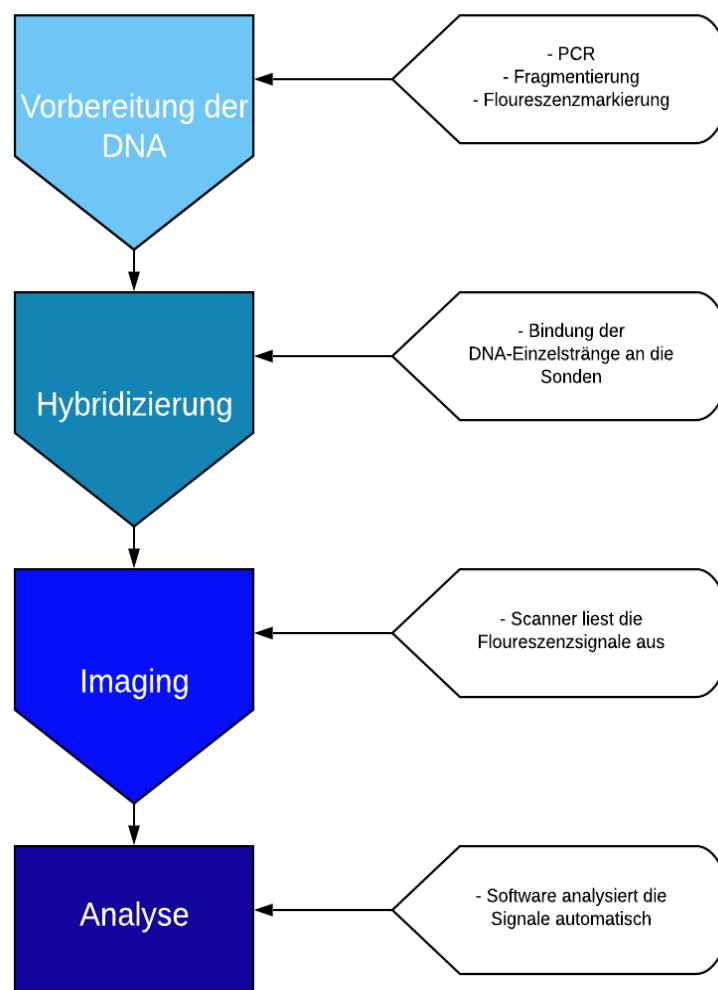


Abbildung 7: Ablauf des SNP-Arrays.

Für das SNP-Array muss die zu untersuchende Nukleinsäure vorbereitet werden. Dazu wird sie mit PCR amplifiziert und anschließend enzymatisch fragmentiert. Die Fragmente werden mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Anschließend wird die DNA auf einen vorgefertigten Chip, auf dem Nukleinsäuren mit bekannter Sequenz, sogenannte Sonden, befestigt sind, aufgebracht. Bindet eine Nukleinsäure an eine Sonde,

Hybridisierung genannt, zeigt der Fluoreszenzmarker die Anwesenheit des SNPs an. Ein Scanner liest den Chip aus und die gewonnenen Images werden durch eine Software automatisch analysiert und in Daten umgewandelt.(42,43)

Die Proben der Individuen wurden am Centre for Addiction and Mental Health in Toronto, Kanada mit Hilfe des Infinium™ CoreExome-24v1.3 Beadchips von Illumina typisiert. Dieser enthält 551.004 Marker. Die daraus gewonnenen Daten wurden an das Institut für Humangenetik in Graz übermittelt.

### **2.2.2 Homozygotie-Mapping**

Aufgrund der rezessiven Vererbung müssen die Betroffenen die Mutation homozygot tragen. Mit den Daten des SNP-Arrays können die homozygoten Bereiche bestimmt werden. Die Daten wurden in das Illumina GenomeStudio 2.0.4 (44) geladen, welches die B-Allel-Frequenz in Punkten anzeigt. Liegt die Frequenz bei 50% ist der Bereich heterozygot, da beide Allele vorliegen. Liegt nur ein Allel homozygot vor, ist die B-Allel-Frequenz 0 oder 100%, je nachdem, ob Allel A oder B homozygot vorliegt. Das Programm zeigt dann für jedes Chromosom jedes Betroffenen ein Diagramm.

Durch Vergleich der homozygoten Bereiche der Individuen werden infrage kommende Regionen festgelegt. Diese Bereiche müssen bei den Betroffenen der Familie übereinstimmen und es muss ein identer Haplotyp vorliegen, während die gesunden Individuen in diesem Bereich nicht homozygot sind. Dabei werden nur Bereiche ab einer Länge von zwei Millionen Basenpaaren in Betracht gezogen.

Die in der Literaturrecherche gefundenen Gene, welche bekannte Mutationen enthalten, werden mit den homozygoten Bereichen verglichen, um Kandidatengene zu erhalten.

## 2.2.3 Sequenzierung der Kandidatengene

Die Sequenzierung wird zunächst nur bei je einer betroffenen Person pro Familie durchgeführt. Zur Bestätigung wird das Exon mit einer gefundenen Mutation dann auch bei den anderen Betroffenen und Nicht-Betroffenen der Familie sequenziert. Dazu muss zunächst eine PCR gemacht werden, als Überprüfung wird eine Gelelektrophorese angeschlossen. Danach kann die eigentliche Sequenzierung durchgeführt werden.

### 2.2.3.1 Polymerasekettenreaktion

Eine PCR dient der Vervielfältigung der DNA. Die Reaktion läuft in drei Schritten in einem Reaktionsgefäß ab. In das Reaktionsgefäß werden dazu die DNA, Primer, DNA-Polymerase und freie Nukleotide gegeben. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhöhung der Temperatur auf 94°C denaturiert. Dann können sich bei 50-65°C die Primer anlagern, an denen dann bei 72°C die Synthese der neuen Stränge begonnen wird. Der Prozess wird 30-35-mal wiederholt, dann liegt ausreichend DNA für die Sequenzierung vor.(45)

Zu Beginn werden Primer mit dem Online-Tool „Primer3“ (46) erstellt und dann bei der Firma Microsynth AG bestellt. Mit LiChrosolv water der Firma Merck werden sie auf eine Endkonzentration von 10 µM gebracht.

Benötigte Volumina für eine Reaktion mit Endvolumen 12 µl:

- 0,5 µl forward Primer
- 0,5 µl reverse Primer
- 6 µl HotStarTaq® Master Mix (Qiagen)
- 4 µl RNase free PCR grade H<sub>2</sub>O (Qiagen)
- 1 µl DNA (DNA-Gehalt 50-100 ng/µl)

Nach dem Mischen aller Bestandteile werden die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gegeben und das Programm „hs57“ gestartet.

Programm „hs57“:

- |    |      |             |             |
|----|------|-------------|-------------|
| 1. | 94°C | 15 Minuten  | } 34 Zyklen |
| 2. | 94°C | 30 Sekunden |             |
| 3. | 57°C | 30 Sekunden |             |
| 4. | 72°C | 45 Sekunden |             |
| 5. | 72°C | 7 Minuten   |             |
| 6. | 4°C  | unendlich   |             |

### 2.2.3.2 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Produkte wird eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Gelelektrophorese ist ein Trennverfahren. Die DNA-Moleküle wandern dabei in einem elektrischen Feld durch ein Agarosegel, welches als Sieb fungiert.(47)

Dazu werden die Proben, nach Zugabe eines Farbmarkers, und ein Standard in ein einprozentiges Agarosegel gegeben. Dieses wird hergestellt, indem 1g LE-Agarose (Bioenzyme) in 100 ml 1xTAE-Buffer aufgelöst und 10 µl GelRed™ (Biotium) hinzugefügt wird. Dann werden für 30 Minuten 130 V Spannung angelegt. Anschließend wird das Gel unter UV-Licht betrachtet.

Die DNA-Fragmente sind geladene Moleküle und werden daher durch das Anlegen der Spannung und den Siebeffekt des Agarosegels nach Größe aufgetrennt. Kleine Fragmente wandern weiter als Größere.(47)

Abbildung 8 zeigt den Ablauf einer Gelelektrophorese. In Teil 6 der Abbildung sieht man das Ergebnis. An den Positionen zwei und drei ist jeweils nur eine Bande zusehen, was bedeutet, dass alle DNA-Fragmente die gleiche Länge haben. Anhand des Standards an Stelle eins kann man die Länge dieser Fragmente ablesen und mit der erwarteten Länge abgleichen. Sind die Fragmente länger oder kürzer als erwartet, muss die PCR überprüft und wiederholt werden. Dies muss ebenfalls geschehen, wenn an einer Position keine Bande zu sehen ist. Das bedeutet, dass kein Fragment vorliegt.

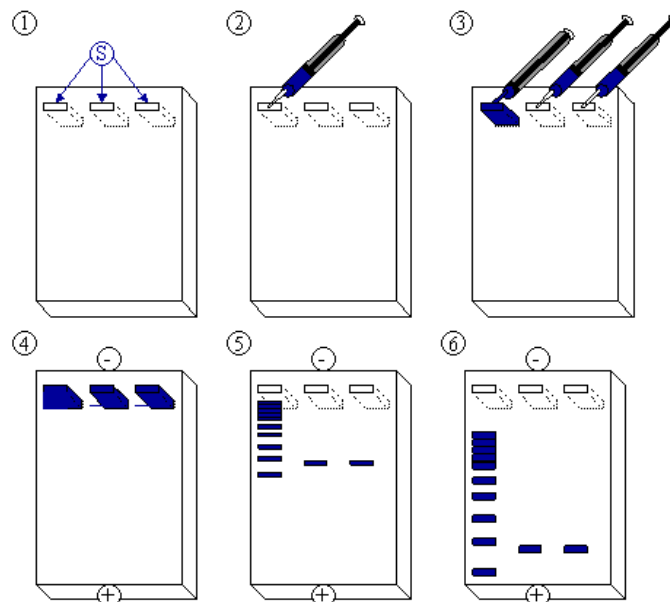


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Gelelektrophorese(48).

### 2.2.3.3 Sanger-Sequenzierung

Zunächst wird die Sequenzierreaktion angesetzt. Es werden wie bei der PCR DNA, Primer, DNA-Polymerase und freie Nukleotide benötigt. Die Reaktion erfolgt ebenfalls in einem Dreischrittprozess. Neben den normalen Desoxynukleosid-Triphosphaten werden hier auch Didesoxynukleosid-Triphosphate eingebaut, was zu einem Abbruch der Synthese führt. Zusätzlich sind sie mit einem Fluoreszenzstoff markiert, welcher für jedes Nukleotid spezifisch ist. So entstehen verkürzte Fragmente an deren Ende immer ein spezifisch markiertes Nukleotid gebunden ist. Die Fragmente werden dann nach dem Prinzip der Elektrophorese aufgetrennt. Ein Detektor nimmt die unterschiedlichen Signale auf.(45)

Volumina für eine Reaktion mit dem Endvolumen 10µl:

- 0,5 µl Big Dye® Terminator v3.1 (Life Technologies)
- 1,4 µl 5x Sequencing Buffer (Life Technologies)
- 0,3 µl forward oder reverse Primer
- 7,3 µl LiChrosolv water (Firma Merck)
- 0,5 µl PCR-Produkt

Die Proben werden erneut in den Thermocycler gegeben und das Programm „BigDye“ gestartet.

Programm „BigDye“:

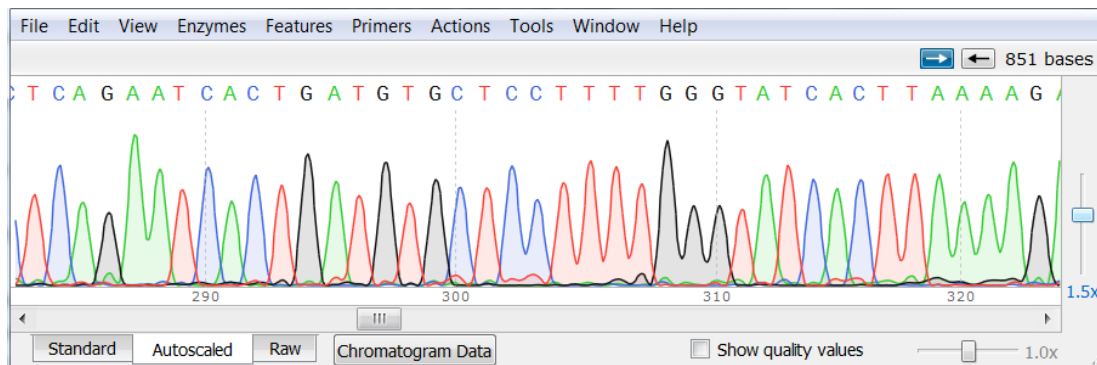
1. 96°C	30 Sekunden	} 25 Zyklen
2. 50°C	15 Sekunden	
3. 60°C	4 Minuten	
4. 4°C	unendlich	

Anschließend folgt eine Aufreinigung mit Sephadex™ G-50 Superfine (GE Healthcare Life Sciences). Dazu werden die Proben 1:1 mit RNase free H<sub>2</sub>O (Quiagen) verdünnt. CentriSep™ Säulchen werden zu zwei Dritteln mit Sephadex gefüllt und anschließend bei 750 rcf für 120 Sekunden zentrifugiert. So entstehen Säulchen in den Strips, in denen dann ungewollte Produkte hängen bleiben. Die Proben werden auf die Säulchen pipettiert und erneut zentrifugiert. Die aufgereinigten Proben werden in eine 96-Well-Platte überführt. Durch erneutes Zentrifugieren wird sichergestellt, dass die Proben luftblasenfrei sind. Anschließend werden sie mit dem ABI PRISM™ 3130x/Genetic Analyser ausgewertet. Als Auftrennungsmatrix wird POP-7™ Polymer (Life Technologies) verwendet.

## 2.2.4 Auswertung der Sequenzierdaten

Die Auswertung, der durch Sanger-Sequenzierung generierten Daten, erfolgt mit Hilfe des Programms SnapGene Viewer (49) und dem UCSC Genome Browser (50).

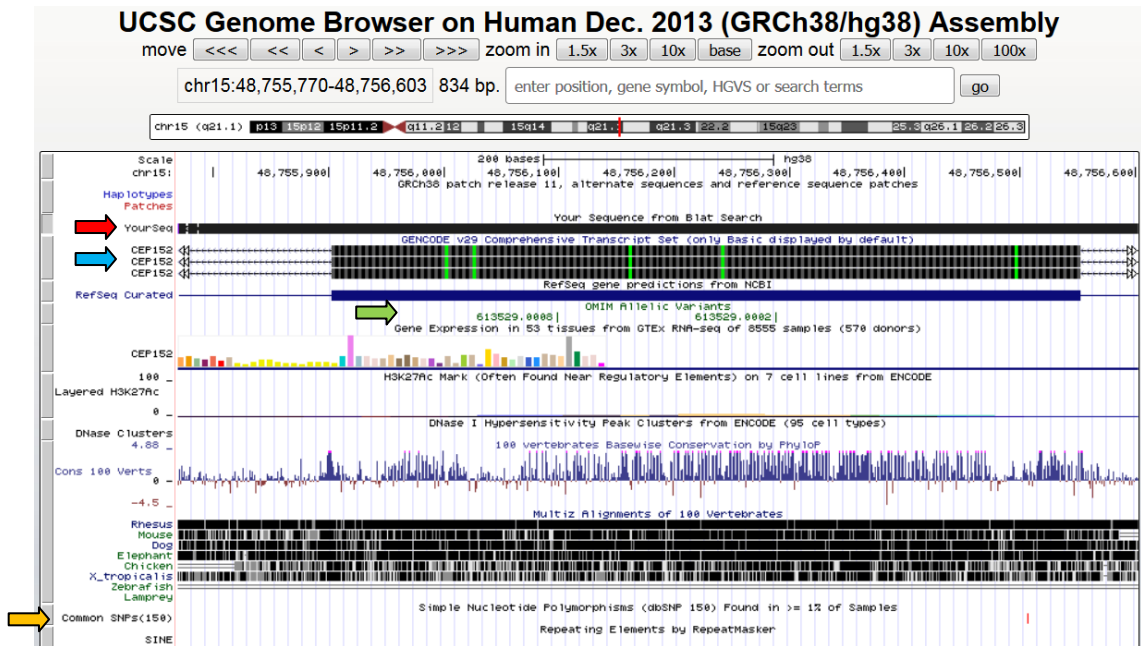
Der SnapGene Viewer bringt die Daten in ein Kurvendiagramm. Jeder Peak repräsentiert eine Base. An der Farbe des Peaks erkennt man die Base. Die Basenfrequenz wird außerdem in Buchstaben darüber angegeben (A = Adenin, T = Thymin, C = Cytosin, G = Guanin).



**Abbildung 9: DNA-Sequenz im SnapGene Viewer (49). Jede Base ist durch eine Farbe markiert: Adenin (A) grün, Thymin (T) rot, Cytosin (C) blau, Guanin (G) schwarz. Oberhalb ist die Basenfrequenz in Buchstaben angegeben, unterhalb als Kurvendiagramm.**

Zum Vergleich mit dem Referenzgenom (Human GRCh38/hg38) wird die Basenabfolge kopiert und über die BLAT-Funktion im UCSC Genome Browser (51) eingefügt. Die Website zeigt die zu vergleichende Sequenz an und unterhalb den Bereich im Referenzgenom (Abbildung 10).

Anschließend wird durch Recherche in den Datenbanken OMIM (52) und HGMD (53) sichergestellt, dass es sich bei gefundenen Mutationen nicht um bekannte SNPs handelt.



**Abbildung 10: Ergebnisse einer BLAT Search im UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>). Oberhalb ist die DNA-Sequenz, die eingegeben wurde (roter Pfeil), darunter die Referenz-DNA (blauer Pfeil), in diesem Fall liegt im untersuchten DNA-Bereich das Gen CEP152. Der Genome Browser zeigt zudem in OMIM(52) gelistete Varianten (grüner Pfeil) und im unteren Bereich der Seite häufige SNPs (oranjer Pfeil) an.**

### 3 Ergebnisse

Im folgenden Teil werden die Ergebnisse der genetischen Charakterisierung der drei pakistanischen Familien besprochen. Für jede Familie werden die Ergebnisse des Homozygotie-Mappings, welches auf Basis der SNP-Arrays der vorhandenen Proben durchgeführt wurde, separat aufgeführt. Daran schließt die Beschreibung der Ergebnisse der Sequenzierung der Kandidatengene an.

#### 3.1 MCP15

Der Vergleich der homozygoten Bereiche bei Familie MCP15 mit bekannten Genen ergibt keine Überschneidung. In Tabelle 6 sind die beiden homozygoten Bereiche mit ihren Positionsnummern aufgeführt. Dies sind die einzigen homozygoten Bereiche im Genom der beiden Individuen MCP15\_1 und MCP15\_2, welche beide vorweisen und die nicht bei den anderen Mitgliedern der Familie, deren Proben vorliegen (MCP15\_3 und MCP15\_4), zu finden sind. In Abbildung 11 ist dieser Sachverhalt graphisch dargestellt. Keiner der bekannten 25 Genloci liegt im homozygoten Bereich der Betroffenen. Bei dieser Familie kann daher die Methode der Sanger-Sequenzierung nicht angewendet werden, denn diese benötigt bekannte Kandidatengene.

Chromosom	Positionsnummer		Kandidatengene
	von	bis	
1	49 210 570	53 102 133	-
18	52 837 953	55 260 070	-

Tabelle 6: Positionen der übereinstimmenden homozygoten Bereiche von MCP15\_1 und MCP15\_2.

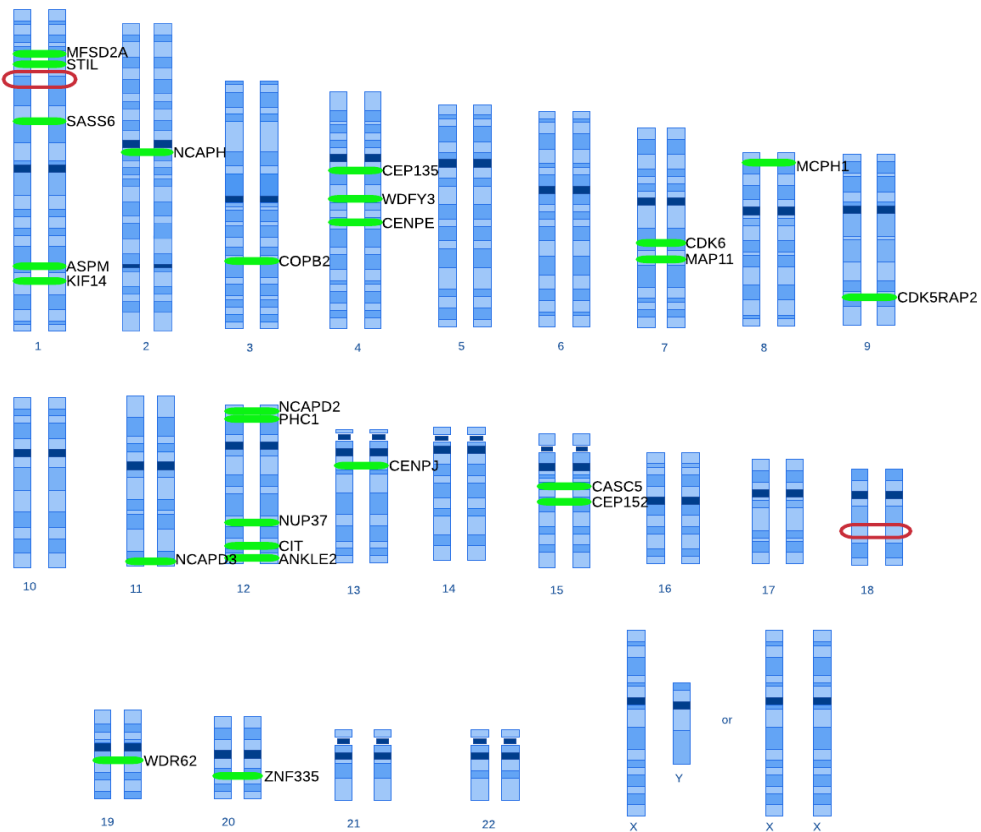


Abbildung 11: Schematische Darstellung der MCPH-Genloci (grün) und übereinstimmender Homozygotie-Regionen (rot) von MCP15\_1 und MCP15\_2 im Karyogramm.

In Abbildung 12 und Abbildung 13 sind die Gene, die in den beiden übereinstimmenden homozygoten Bereiche der Betroffenen MCP15\_1 und MCP15\_2 liegen, im UCSC Genome Browser dargestellt. Keines dieser Gene ist bisher bekannt für MCPH.

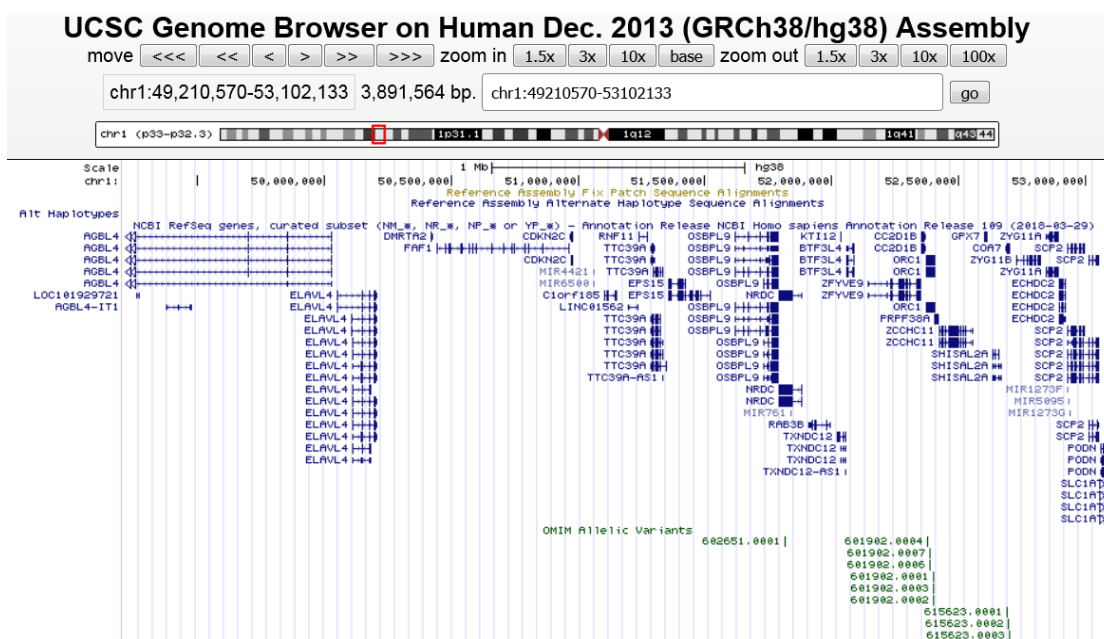


Abbildung 12: Gene im ersten homozygoten Bereich der Betroffenen MCP15\_1 und MCP15\_2 dargestellt im UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>).



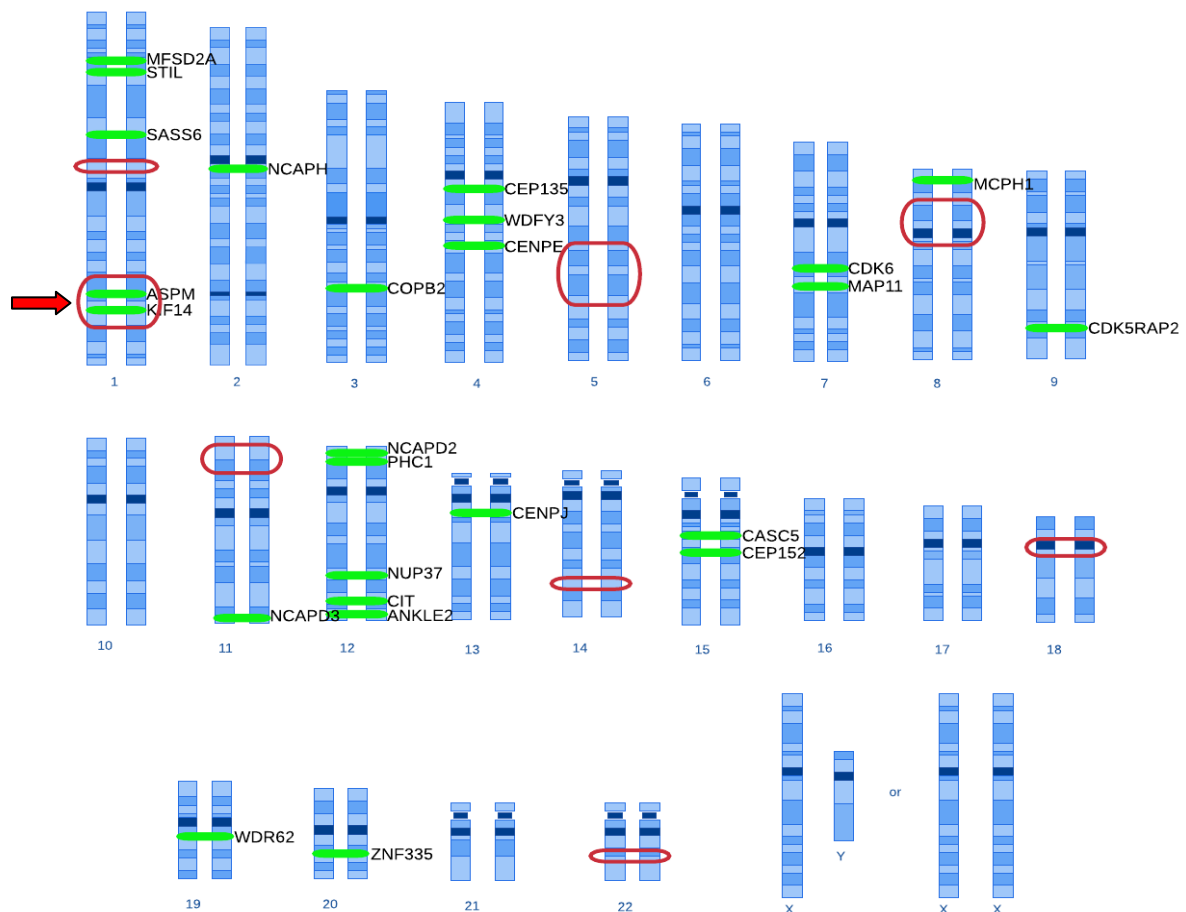
### 3.2 MCP16

Im Genom der beiden Individuen MCP16\_1 und MCP16\_2 wurden acht homozygote Bereiche gefunden, die beide Betroffenen aufweisen, aber keines der anderen untersuchten Familienmitglieder. Diese sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Aus dem Vergleich der homozygoten Bereiche mit bekannten MCPH-Genen ergeben sich zwei mögliche Kandidatengene: *ASPM* und *KIF14*. Diese liegen in einem homozygoten Bereich auf Chromosom 1 (siehe auch Abbildung 14). Begonnen wurde mit der Sequenzierung von *ASPM*, da dort die häufigsten Mutationen vorkommen.

Chromosom	Positionsnummer		Kandidatengene
	von	bis	
1	184 580 250	209 100 322	<i>ASPM, KIF14</i>
1	111 794 733	115 688 400	-
5	96 413 667	134 999 199	-
8	28 597 765	52 353 904	-
11	9 800 601	19 885 687	-
14	79 284 333	82 739 350	-
18	13 246 168	27 301 274	-
22	40 688 917	42 178 441	-

**Tabelle 7: Positionen der übereinstimmenden homozygoten Bereiche der Betroffenen MCP16\_1 und MCP16\_2.**



**Abbildung 14: Schematische Darstellung der MCPH-Genloci (grün) und übereinstimmender Homozygotie-Regionen (rot) von MCP16\_1 und MCP16\_2 im Karyogramm. Mit einem roten Pfeil gekennzeichnet ist die Homozygotieregion, in der die Kandidatengene liegen.**

Bei Familienmitglied MCP16\_1 wurde die Mutation c.3978G>A im Exon 17 gefunden. Daraufhin wurde eine Segregationsanalyse durchgeführt, was bedeutet, dass auch bei den anderen Proben dieser Familie das Exon 17 des Gens *ASPM* sequenziert wurde. Abbildung 15 zeigt die Genomsequenz von MCP16\_1, MCP16\_2 und MCP16\_3 im SnapGeneViewer.(49)

Im Exon 17 des *ASPM*-Gens des Individuums MCP16\_1 liegt die Mutation c.3978G>A vor, ein Basenaustausch, durch den es zum Austausch W1326X kommt. Guanin ist durch Adenin ersetzt. Es ist das Basentriplet Nummer 1.326, welches normalerweise für die Aminosäure Tryptophan (W) codiert. Durch die Mutation resultiert nun ein Stoppcodon (X). Es ist eine nonsense Mutation, welche zur Folge hat, dass die Proteinsynthese verfrüht abgebrochen wird und ein verkürztes Protein entsteht.



**Abbildung 15: DNA-Sequenz der Individuen MCP16\_1, MCP16\_2 und MCP16\_3 im SnapGene Viewer(49).**

Dieselbe Mutation wurde auch beim Familienmitglied MCP16\_2 nachgewiesen, während bei der nichtbetroffenen Schwester (MCP16\_3) die Wildtypvariante vorliegt.

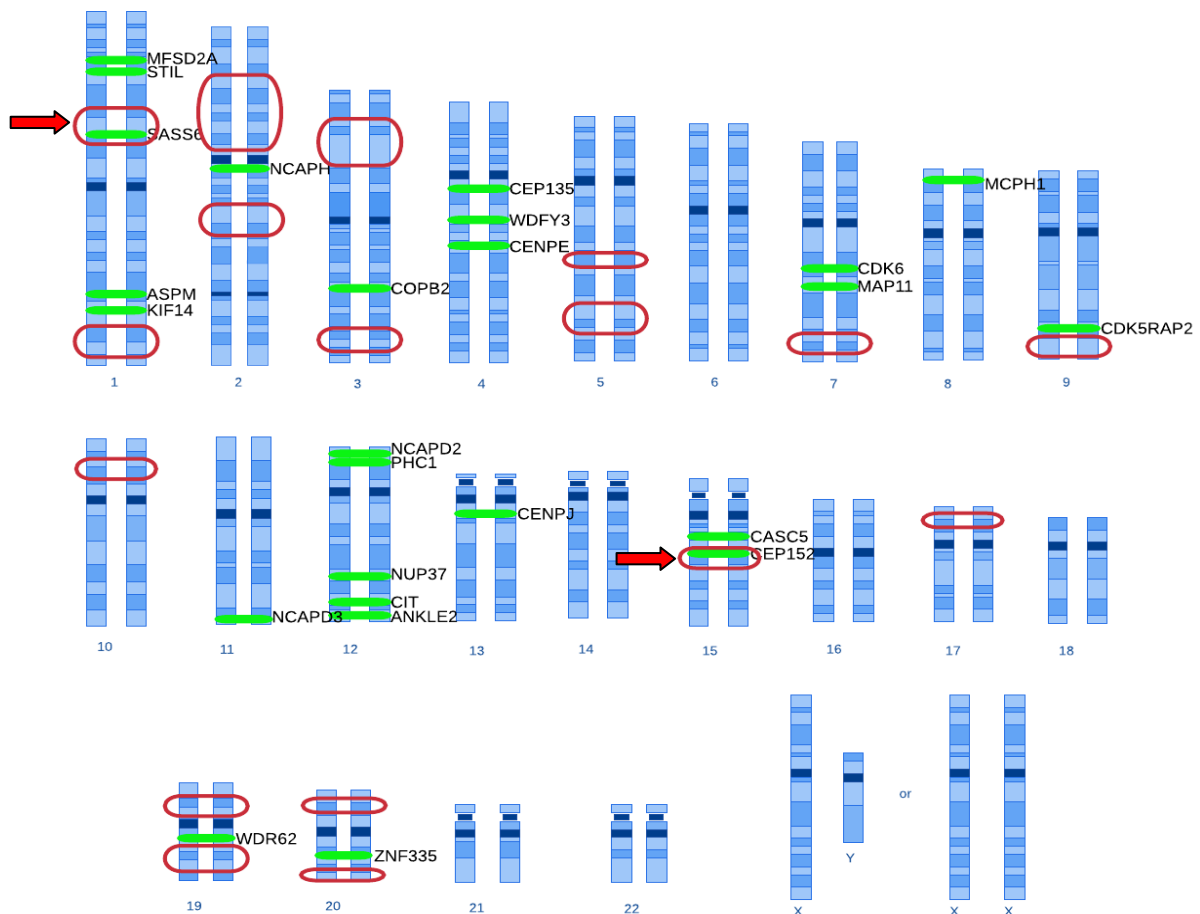
Die Mutation W1326X im *ASPM*-Gen wurde erstmals 2004 in einer konsanguinen Familie aus Indien beschrieben.(54)

### 3.3 MCP17

Bei der Familie MCP17 hat das Homozygotie-Mapping 17 homozygote Bereiche (siehe Tabelle 8) ergeben. Diese Bereiche weisen beide erkrankten Individuen (MCP17\_1 und MCP17\_2) auf, aber nicht die Eltern (MCP17\_3 und MCP17\_4), welche nicht betroffen sind. Der Vergleich mit bekannten Genloci hat zwei infrage kommende Gene ergeben: *SASS6* und *CEP152*. Diese liegen auf zwei unterschiedlichen Chromosomen. *SASS6* liegt in einem homozygoten Bereich auf Chromosom 1 und *CEP152* auf Chromosom 15, graphisch dargestellt in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden..**

Chromosom	Positionsnummer		Kandidatengene
	von	bis	
1	87 611 710	107 964 274	<i>SASS6</i>
1	214 083 466	234 664 631	-
2	42 299 028	79 246 108	-
2	121 937 079	134 791 174	-
3	7 970 956	27 620 980	-
3	176 830 302	186 647 652	-
5	111 807 579	115 975 656	-
5	148 712 150	162 886 028	-
7	139 718 147	147 938 808	-
9	132 967 196	138 850 610	-
10	15 656 674	26 901 421	-
15	46 639 808	53 300 731	<i>CEP152</i>
17	5 682 867	9 445 259	-
19	8 815 249	20 497 400	-
19	38 485 224	51 595 583	-
20	7 664 282	9 836 779	-
20	59 324 052	63 025 520	-

**Tabelle 8: Positionen der übereinstimmenden homozygoten Bereiche der Betroffenen MCP17\_1 und MCP17\_2.**



**Abbildung 16: Schematische Darstellung der MCPH-Genloci (grün) und übereinstimmender Homozygotie-Regionen (rot) von MCP17\_1 und MCP17\_2 im Karyogramm. Mit einem roten Pfeil gekennzeichnet sind die Homozygotieregionen, in denen Kandidatengene liegen.**

Die Sequenzierung wurde am Individuum MCP17-1 durchgeführt. Begonnen wurde mit der Analyse des Gens *SASS6*. Diese ergab allerdings keine Mutationen. Daraufhin wurde das Gen *CEP152* sequenziert. Auch in diesem Gen wurde keine Mutation gefunden.

In beiden Genen wurde je ein häufiger SNP nachgewiesen.

In Exon 7 des Gens *SASS6* handelt es sich um den SNP rs10563016. Zirka 20% der Bevölkerung haben die beiden Basen AG doppelt vorliegen, 80% nur einfach. MCP17-1 gehört zu den 80% der Bevölkerung, bei der die beiden Basen nur einfach vorliegen.

Im Gen *CEP152* findet sich der SNP rs58156069. Die Mehrheit der Bevölkerung hat die Base Cytosin, doch bei 39% ist statt Cytosin Thymin zu finden. Zu diesen 39% gehört auch MCP17-1. Diese häufig vorkommenden SNPs sind keine Erklärung für die Erkrankung.

In den beiden Kandidatengenen der Familie MCP17 wurde damit keine Mutation gefunden, die die Mikrozephalie erklären könnte.

## 4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Methode der Sanger Sequenzierung in Kombination mit SNP-Array Analyse bei Mutationen in bekannten Genen schnell und komplikationslos zum Ziel führt, aber an ihre Grenzen stößt, wenn es sich um Mutationen in bisher nicht bekannten Krankheitsgenen handelt.

Als Krankheitsursache für die Betroffenen der Familie MCP16 wurde die Mutation c.3978G>A im *ASPM*-Gen ausfindig gemacht.

Das *ASPM*-Gen (Abnormal Spindle-Like Microcephaly-Associated Protein) liegt auf dem q-Arm des Chromosom 1 und codiert für ein Protein aus 3.477 Aminosäuren. Mutationen im *ASPM*-Gen sind die häufigsten. Sie werden in bis zur Hälfte der Fälle als kausale Mutationen identifiziert.(8,9) Insgesamt sind bereits 161 verschiedene Mutationen in diesem Gen bekannt, davon treten drei gehäuft auf. Dazu gehört auch die im Genom der Betroffenen von Familie MCP16 gefundene Mutation c.3978G>A. Diese wurde bereits in 60 verschiedenen Familien identifiziert.(34) Dabei wird Guanin durch Adenin ersetzt, was dazu führt, dass ein Stoppcodon entsteht. Es ist eine nonsense Mutation, die zum Abbruch der Proteinsynthese führt.(33)

Das Protein *aspm* ist wichtig für die Spindelorientierung und fördert die symmetrische Zellteilung. Durch die Mutation sind die Proteine nicht funktionsfähig und die asymmetrische Zellteilung findet vermehrt statt.(33) Der frühe Wechsel von symmetrischer zu asymmetrischer Zellteilung führt dazu, dass nicht genügend NPZ vorliegen. Bei der asymmetrischen Zellteilung entsteht im Gegensatz zur symmetrischen Zellteilung nur eine NPZ, sodass nicht ausreichend Neuronen entstehen können.(1)

Bei den beiden Betroffenen MCP16\_1 und MCP16\_2 hat das zu einer deutlichen Reduzierung des Kopfumfanges von 7 bzw. 8 SE geführt. MCP16\_2 zeigt infolge dessen auch eine deutliche Verzögerung der Sprachentwicklung, da er mit ca. elf Jahren noch nicht sprechen kann. MCP16\_1 scheint weniger eingeschränkt zu sein durch ihre Erkrankung. Bedauerlicherweise liegt jedoch von keinem der Betroffenen ein neuropsychologisches Untersuchungsergebnis vor, um den Grad der Intelligenzminderung zu spezifizieren.

Für die Familie MCP16 war die Sanger Sequenzierung die richtige Vorgehensweise. Die Untersuchung der anderen beiden Familien hat allerdings gezeigt, dass diese Methode nicht immer funktioniert. Der Vergleich der homozygoten Bereiche der Individuen der

Familie MCP15 hat keine Kandidatengene und somit keinen Bereich für eine Sanger Sequenzierung ergeben.

Bei der Familie MCP17 wurden die Kandidatengene *SASS6* und *CEP152* sequenziert, Diese sind keine sehr häufigen Genloci. Für das Gen *SASS6* ist bisher nur eine Mutation beschrieben und im Gen *CEP152* sind nur zwei verschiedene Mutationen gefunden worden.(26) Bei den Betroffenen der Familie MCP17 wurden jedoch weder bekannte Mutationen noch neue Mutationen in den beiden Genen gefunden, daher bringt diese Vorgehensweise auch hier keine Aufklärung.

Die Fälle der Familien MCP15 und MCP17 zeigen die Grenzen der hier angewandten Methode. Allerdings bedeutet dies nicht, dass generell kein Ergebnis für die Erkrankten möglich ist. Vermutlich liegen die Mutationen der Betroffenen in bisher noch nicht bekannten Genen, kleineren homozygoten Bereichen, sie sind gemischt heterozygot oder nicht alle Betroffenen einer Familie haben die gleiche kausale Mutation. Die Mutationen könnten auch in einem Intron der Kandidatengene liegen, denn auch diese werden mit der angewandten Methode nicht erfasst. Es gibt viele Möglichkeiten, die allerdings mit den hier gezeigten Methoden nicht herausgefiltert werden können. Es gibt dennoch Methoden um die Mutationen ausfindig zu machen, denn seit der Einführung der Sequenzierung in den 1970er Jahren hat sich viel verändert. Die 1977 eingeführte Sequenziermethode von Frederick Sanger, wurde zunächst durch die Etablierung der Kapillarelektrophorese optimiert, sodass in einem Lauf eine Millionen Basen ausgelesen werden konnten.(55)

Bis 2011 standen allerdings nur Methoden zur Verfügung, mit denen einzelne Gene untersucht werden konnten. Dies führte dazu, dass die Analysen bei Erkrankungen mit mehreren infrage kommenden Genen sowohl einen zeitlichen als auch finanziellen Aufwand bedeuteten. Dann wurde das Next Generation Sequencing (NGS) eingeführt, bei dem Millionen von Sequenzierreaktionen gleichzeitig ablaufen und somit das ganze Genom eines Menschen in einem Untersuchungsgang analysiert werden kann. Auch in den letzten Jahren konnte die Geschwindigkeit der Sequenzierung und Analyse weiter gesteigert werden, während die Kosten deutlich geringer wurden. Im Humangenomprojekt wurde zum ersten Mal ein gesamtes menschliches Genom sequenziert, dies hat damals insgesamt 13 Jahre gedauert und ca. 2,7 Millionen US-Dollar gekostet. Heute braucht eine solche Sequenzierung nur noch wenige Tage und ist schon für 1000 US-Dollar möglich.(55,56)

Mit dieser neuen Methode kann man das gesamte Genom sequenzieren, Whole Genome Sequenzieng (WGS) genannt, allerdings ist es auch möglich nur die Exome auszulesen

(Whole Exome Sequencing, WES). Für einige Erkrankungen gibt es auch vorgefertigte Oberflächen, mit denen nur die für die Krankheit relevanten Gene ausgelesen werden, dies wird Candidate Gene Sequencing genannt.(56)

Allerdings wird die Datenanalyse mit größerem Sequenzierumfang deutlich aufwendiger und daher im Gegensatz zu der eigentlichen Sequenzierung teurer. Doch die Wahrscheinlichkeit krankheitsrelevante Mutationen zu finden steigt deutlich.(55)

Bei einem WGS werden durchschnittlich drei Millionen Abweichungen gefunden, aus denen dann die potentiell krankheitsrelevanten Varianten herausgefiltert werden, indem nur Varianten in Exons oder Exon-Intron-Grenzen, sowie nur solche, die auch zu Veränderungen auf Proteinebene führen, beachtet werden. Es bleiben ca. 6.000 Varianten übrig, die mit Datenbanken abgeglichen werden. Ausgeschlossen werden damit Varianten, die in der gesunden Bevölkerung mit einer Allelfrequenz  $> 1\%$  vorkommen. Nach dieser Ergebnisanalyse werden noch etwa 350 Varianten als potentiell krankheitsauslösend eingestuft.(56)

Etwa 95% der 22.300 Gene des Menschen werden bei einem WES sequenziert, die Materialkosten liegen dabei inzwischen unter 500 Euro. Mit NGS können neue krankheitsrelevante Gene entdeckt werden, die in dieser Arbeit verwendete Methode hingegen beachtet nur bereits im Zusammenhang mit der Erkrankung beschriebene Gene.(55) Doch auch das NGS hat Grenzen. Beispielsweise müssen alle Abschnitte ausreichend oft sequenziert werden, um Varianten sicher identifizieren zu können. Doch dies ist nicht immer der Fall. Zudem liegen die krankheitsrelevanten Bereiche nicht immer in kodierenden Bereichen, die nichtkodierenden Bereiche schließt man jedoch normalerweise in der Datenanalyse aus. Werden diese nicht ausgeschlossen, ist die Menge der möglichen Varianten zu groß. Ein weiteres Problem sind strukturelle Aberrationen, zum Beispiel Inversionen, Translokationen oder Chromosomenstückverluste, welche nur unzureichend beim NGS erfasst werden.(56) Fehleranfällig ist vor allem die Vervielfältigung der DNA-Abschnitte, denn etwa jedes tausendste Basenpaar ist fehlerhaft. Ergebnisse sollten daher mit einer anderen Sequenziermethode validiert werden. Durch die kurze Länge der Fragmente kann es auch zu einer fehlerhaften Rekonstruktion von hochrepetitiven DNA-Abschnitten kommen.(55)

Inzwischen gibt es auch ein Third Generation Sequencing, dabei wird eine Einzelmolekülsequenzierung durchgeführt, um bekannte Schwachstellen zu überwinden. Der fehleranfälligste Schritt, die Amplifikation der DNA-Fragmente, ist dabei nicht notwendig.(55)

Dieser gewaltige Fortschritt der Genetik in den letzten Jahren zeigt sich deutlich im Wachstum der Datenbanken. Die Einträge in der Datenbank OMIM, zum Beispiel, haben sich in den letzten 10 Jahren mehr als verdoppelt, es gibt nun fast 5000 registrierte Phänotypen, bei denen die molekulare Grundlage geklärt ist.(55)

Die Entwicklungen bringen aber nicht nur Vorteile, sondern auch einige Herausforderungen, die in den nächsten Jahren gemeistert werden müssen. Sowohl ethisch als auch datenrechtlich gibt es einige Diskussionspunkte. Da das gesamte Genom des Menschen nun mit wenig Aufwand und Kosten ausgelesen werden kann, wird es immer mehr Bestandteil der diagnostischen Routine. Die Anwendung wird sich nicht nur auf die typischen Erbkrankheiten beschränken.(55)

Ethisch zu bedenken ist der Umgang mit Zufallsbefunden, denn beim NGS werden nicht nur Mutationen gefunden, die ursächlich mit der Grunderkrankung in Zusammenhang stehen.(56)

Für die beiden Familien, die durch diese Arbeit keine Ergebnisse erhalten haben, ist die Entwicklung des NGS allerdings ein klarer Vorteil. Ein WES ihrer DNA und dessen Auswertung sollte angeschlossen werden, um auch für diese Betroffenen ein krankheitsauslösendes Gen ausfindig zu machen.

Die vorliegende Arbeit bietet daher noch viel Potential für weitere Überlegungen und Anschlussuntersuchungen, denn für die Betroffenen sollte die Ursache ihrer Erkrankung abgeklärt werden. Der Familie MCPH16 kann nun erklärt werden, dass beide Eltern Überträger der Mutation c.3978G>A im *ASPM*-Gen sind und daher ihre Kinder an MCPH erkrankt sind. Außerdem muss ihnen erläutert werden, dass ein hohes Risiko besteht, dass auch weitere Kinder erkranken oder zumindest ebenfalls Überträger sein könnten.

## 5 Literaturverzeichnis

- (1) Budday S, Steinmann P, Kuhl E. Physical biology of human brain development. *Front Cell Neurosci* 2015 Jul 8;9:257.
- (2) Morris-Rosendahl DJ, Kaindl AM. What next-generation sequencing (NGS) technology has enabled us to learn about primary autosomal recessive microcephaly (MCPH). *Mol Cell Probes* 2015 Oct;29(5):271-281.
- (3) Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010 Jan;11(1):31-46.
- (4) Zaqout S, Morris-Rosendahl D, Kaindl AM. Autosomal Recessive Primary Microcephaly (MCPH): An Update. *Neuropediatrics* 2017 Jun;48(3):135-142.
- (5) Woods CG, Parker A. Investigating microcephaly. *Arch Dis Child* 2013 Sep;98(9):707-713.
- (6) Duerinckx S, Abramowicz M. The genetics of congenitally small brains. *Semin Cell Dev Biol* 2018 Apr;76:76-85.
- (7) Woods CG. Human microcephaly. *Curr Opin Neurobiol* 2004 Feb;14(1):112-117.
- (8) Barbelanne M, Tsang WY. Molecular and cellular basis of autosomal recessive primary microcephaly. *Biomed Res Int* 2014;2014:547986.
- (9) Faheem M, Naseer MI, Rasool M, Chaudhary AG, Kumosani TA, Ilyas AM, et al. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Med Genomics* 2015;8 Suppl 1:S4-8794-8-S1-S4. Epub 2015 Jan 15.
- (10) Jabeen N, Malik S. Consanguinity and its sociodemographic differentials in Bhimber District, Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *J Health Popul Nutr* 2014 Jun;32(2):301-313.
- (11) Hashmi JA, Al-Harbi KM, Ramzan K, Albalawi AM, Mehmood A, Samman MI, et al. A novel splice-site mutation in the ASPM gene underlies autosomal recessive primary microcephaly. *Ann Saudi Med* 2016 Nov-Dec;36(6):391-396.
- (12) Letard P, Drunat S, Vial Y, Duerinckx S, Ernault A, Amram D, et al. Autosomal recessive primary microcephaly due to ASPM mutations: An update. *Hum Mutat* 2018 Mar;39(3):319-332.
- (13) Rump P, Jazayeri O, van Dijk-Bos KK, Johansson LF, van Essen AJ, Verheij JB, et al. Whole-exome sequencing is a powerful approach for establishing the etiological diagnosis in patients with intellectual disability and microcephaly. *BMC Med Genomics* 2016 Feb 4;9:7-016-0167-8.

- (14) Verloes A, Drunat S, Gressens P, Passemard S. Primary Autosomal Recessive Microcephalies and Seckel Syndrome Spectrum Disorders. Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9587/> 2009 Sep 1 [Updated 2013 Oct 31].
- (15) Vascone C, Di Meglio F, Di Meglio L, Turco LC, Vitale SG, Cignini P, et al. Antenatal diagnosis of Seckel Syndrome: a rare case report. *J Prenat Med* 2014 Apr-Jun;8(3-4):70-72.
- (16) Akkurt MO, Pakay K, Akkurt I, Temur M, Korkmazer E. Prenatal diagnosis of Seckel syndrome at 21 weeks' gestation and review of the literature. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017 Dec 28:1-4.
- (17) Marakhonov AV, Konovalov FA, Makaov AK, Vasilyeva TA, Kadyshev VV, Galkina VA, et al. Primary microcephaly case from the Karachay-Cherkess Republic poses an additional support for microcephaly and Seckel syndrome spectrum disorders. *BMC Med Genomics* 2018 Feb 13;11(Suppl 1):8-018-0326-1.
- (18) de Munnik SA, Hoefsloot EH, Roukema J, Schoots J, Knoers NV, Brunner HG, et al. Meier-Gorlin syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2015 Sep 17;10:114-015-0322-x.
- (19) Pachajoa H, Ruiz-Botero F, Isaza C. A new mutation of the PCNT gene in a Colombian patient with microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type II: a case report. *J Med Case Rep* 2014 Jun 13;8:191-1947-8-191.
- (20) Pierce MJ, Morse RP. The neurologic findings in Taybi-Linder syndrome (MOPD I/III): case report and review of the literature. *Am J Med Genet A* 2012 Mar;158A(3):606-610.
- (21) Celli J, van Bokhoven H, Brunner HG. Feingold syndrome: Clinical review and genetic mapping. *Am J Med Genet* 2003 11/01; 2018/08;122A(4):294-300.
- (22) Stiles,Joan, Jernigan T,L. The Basics of Brain Development.
- (23) Jiang X, Nardelli J. Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiol Dis* 2016 Aug;92(Pt A):3-17.
- (24) Cox J, Jackson AP, Bond J, Woods CG. What primary microcephaly can tell us about brain growth. *Trends Mol Med* 2006 Aug;12(8):358-366.
- (25) Available at: <https://omim.org/phenotypicSeries/PS251200>. Accessed 21.April, 2020.
- (26) Naveed M, Kazmi SK, Amin M, Asif Z, Islam U, Shahid K, et al. Comprehensive review on the molecular genetics of autosomal recessive primary microcephaly (MCPH). *Genet Res (Camb)* 2018 Aug 8;100:e7.
- (27) Asencio C, Davidson IF, Santarella-Mellwig R, Ly-Hartig TB, Mall M, Wallenfang MR, et al. Coordination of kinase and phosphatase activities by Lem4 enables nuclear envelope reassembly during mitosis. *Cell* 2012 Jul 6;150(1):122-135.

- (28) Kadir R, Harel T, Markus B, Perez Y, Bakhrat A, Cohen I, et al. ALFY-Controlled DVL3 Autophagy Regulates Wnt Signaling, Determining Human Brain Size. *PLoS Genet* 2016 Mar 23;12(3):e1005919.
- (29) Harrison-Lavoie KJ, Lewis VA, Hynes GM, Collison KS, Nutland E, Willison KR. A 102 kDa subunit of a Golgi-associated particle has homology to beta subunits of trimeric G proteins. *EMBO J* 1993 Jul;12(7):2847-2853.
- (30) Martin CA, Murray JE, Carroll P, Leitch A, Mackenzie KJ, Halachev M, et al. Mutations in genes encoding condensin complex proteins cause microcephaly through decatenation failure at mitosis. *Genes Dev* 2016 Oct 1;30(19):2158-2172.
- (31) Braun DA, Lovric S, Schapiro D, Schneider R, Marquez J, Asif M, et al. Mutations in multiple components of the nuclear pore complex cause nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 2018 Oct 1;128(10):4313-4328.
- (32) Perez Y, Bar-Yaacov R, Kadir R, Wormser O, Shelef I, Birk OS, et al. Mutations in the microtubule-associated protein MAP11 (C7orf43) cause microcephaly in humans and zebrafish. *Brain* 2019 Mar 1;142(3):574-585.
- (33) Mahmood S, Ahmad W, Hassan MJ. Autosomal Recessive Primary Microcephaly (MCPH): clinical manifestations, genetic heterogeneity and mutation continuum. *Orphanet J Rare Dis* 2011 Jun 13;6:39-1172-6-39.
- (34) Letard P, Drunat S, Vial Y, Duerinckx S, Ernault A, Amram D, et al. Autosomal recessive primary microcephaly due to ASPM mutations: An update. *Hum Mutat* 2018 Mar;39(3):319-332.
- (35) Guernsey DL, Jiang H, Hussin J, Arnold M, Bouyakdan K, Perry S, et al. Mutations in centrosomal protein CEP152 in primary microcephaly families linked to MCPH4. *Am J Hum Genet* 2010 Jul 9;87(1):40-51.
- (36) Bittles A. Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *Clin Genet* 2001 Aug;60(2):89-98.
- (37) Bener A, Mohammad RR. Global distribution of consanguinity and their impact on complex diseases: Genetic disorders from an endogamous population. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2017 October 2017;18(4):315-320.
- (38) Shawky RM, Elsayed SM, Zaki ME, Nour El-Din SM, Kamal FM. Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2013 April 2013;14(2):157-164.
- (39) Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 2012 May;20(5):490-497.
- (40) Taschenlehrbuch Humangenetik. 9.th ed. Stuttgart: Thieme; 2017.
- (41) Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999 Jul 8;234(2):177-186.

- (42) Infinium CoreExome-24 Kit. Available at: <https://emea.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/infinium-core-exome.html?langsel=/de/>. Accessed 10.Januar 2019.
- (43) Eccleston JL, Koh C, Markello TC, Gahl WA, Heller T. An apparent homozygous deletion in maltase-glucoamylase, a lesson in the evolution of SNP arrays. *Mol Genet Metab* 2012 Dec;107(4):674-678.
- (44) Available at: [http://emea.support.illumina.com/array/array\\_software/genomestudio/downloads.html?langsel=/de/](http://emea.support.illumina.com/array/array_software/genomestudio/downloads.html?langsel=/de/). Accessed 04.Juni, 2018.
- (45) C.P. Schaaf JZ. 15 Genetische Labordiagnostik. Basiswissen Humangenetik Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013. p. 141-155.
- (46) Available at: <http://primer3.ut.ee/>. Accessed 20.Juni, 2018.
- (47) Gressner AM, Arndt T. Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. : Springer-Verlag; 2013.
- (48) Available at: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agarose-Gelelektrophorese.png>. Accessed 27.April, 2020.
- (49) Available at: [http://www.snapgene.com/products/snapgene\\_viewer/](http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/). Accessed August, 2018.
- (50) Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 2002 Jun;12(6):996-1006.
- (51) Kent WJ. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res* 2002 Apr;12(4):656-664.
- (52) Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM<sup>®</sup>. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). Available at: <https://omim.org/>. Accessed August, 2018.
- (53) The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. Available at: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Accessed August, 2018.
- (54) Kumar A, Blanton SH, Babu M, Markandaya M, Girimaji SC. Genetic analysis of primary microcephaly in Indian families: novel ASPM mutations. *Clin Genet* 2004 Oct;66(4):341-348.
- (55) August,Dietrich, Grimbacher,Bodo. Entwicklung der genetischen Diagnostik.
- (56) Hempel,M., Haack,T.B., Eck,S., Prokisch,H. Next generation sequencing.