

Diplomarbeit

**Genetische Charakterisierung der primären
Mikrozephalie bei zwei konsanguinen
pakistanischen Familien**

eingereicht von
Markus Kuster

zur Erlangung des akademischen Grades
**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**
an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am
Institut für Humangenetik

unter der Anleitung von Betreuer
**Assoz. Prof. Dr.rer.nat.
Christian Windpassinger**

Graz, am 23. August 2016

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ausdrücklich, 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.

Markus Kuster eh.

Graz am 23. August 2016

Vorwort

Schon immer faszinierte mich der Themenkomplex der Humangenetik. Schon während meines Studiums für Molekularbiologie an der *Karl-Franzens-Universität Graz* sammelte ich viele interessante Erfahrungen und vielseitige Eindrücke über das breit gefächerte Gebiet der Genetik. Auch mit meinem Wechsel in das Studium für Humanmedizin an der *Medizinischen Universität Graz* ging dieses Interesse nicht verloren. Vielmehr erkannte ich, dass sich die vielschichtigen Aspekte der Humangenetik in meinem weiteren beruflichen Werdegang als hilfreich erweisen würden. Da mich in meinem Studium für Humanmedizin die Ergründung der genetischen Ursachen von Krankheiten immer interessierte, entschloss ich mich aufgrund meiner allgemeinen Faszination für den Bereich der Genetik dazu, meine Diplomarbeit am *Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz* zu verfassen.

Keine andere Wissenschaft erlebte in letzter Zeit solch rasante Entwicklungen wie die Humangenetik: Im Zuge technischer Errungenschaften werden immer schneller, neue – und für die Medizin unverzichtbare – Erkenntnisse gewonnen. Es scheint immer offensichtlicher zu werden, dass viele Krankheiten der Humanmedizin in verschiedenen genetischen Störungen wurzeln. Krankheiten entstehen häufig dadurch, wenn in unserem Körper bzw. in den Zellen unseres Körpers etwas aus dem Gleichgewicht geraten ist. Beispielsweise wird ein Protein in einer Zelle zu stark oder zu wenig exprimiert. In vielen Fällen liegt diesem Umstand eine genetische Mutation zugrunde, die sich dann schlussendlich in einem symptomatischen Krankheitsbild äußert.

Bei näherer Betrachtung diverser Krankheiten wird deutlich, welche außerordentliche Rolle die Genetik in der Humanmedizin spielt: Nahezu alle Bereiche der Medizin werden zunehmend von umfassenden Erkenntnissen der Humangenetik in positiver Weise beeinflusst und ergänzt. Diese Erkenntnisse

legen im besten Fall den Grundstein für neuartige Behandlungsmethoden in der Medizin. Beispielsweise lassen sich dank einer genetischen Analyse der Information des Erbguts in den veränderten Zellen zunehmend spezifischere Therapien für die von einer Erkrankung betroffenen Individuen entwickeln. Dementsprechend stand für den deutschen Biologen Cornelius Courts schon 2012 außer Frage, dass die genetischen Techniken und Methoden immerhin einen Bereich der Medizin revolutionieren werden. (Vgl. Courts, 2012, p. Online)

Dieser Umstand scheint sich in einer Zeit des zunehmend technisch-wissenschaftlichen Fortschritts noch zu verstärken – und auch die zukünftigen Entwicklungen auf dem Gebiet der Humangenetik wirken äußerst vielversprechend. Dadurch wird es in naher Zukunft in der Humanmedizin vielleicht sogar möglich werden, gezieltere Strategien und effizientere Therapien zu entwickeln, welche das Leben und die Lebensumstände von noch viel mehr betroffenen Menschen nachhaltig verbessern. Was heute noch in den Kinderschuhen steckt – und derzeit lediglich innerhalb kleiner Kreise erprobt wird – könnte schon morgen – in einer nachhaltigen Wirkung bestätigt – für verschiedene Krankheiten eingesetzt werden. Auch wenn die umfassende Umsetzung meiner Gedanken noch in ferner Zukunft zu liegen scheint: Bald könnte es für alle Menschen dieser Welt Realität werden, dass beispielsweise durch einen Virus, der als Vektor dient, ein fehlendes oder defektes Gen in die Zelle eingeschleust wird, um auf diese Weise ein vom Körper nicht selbstständig hervorgebrachtes Protein zu erzeugen. Es scheint nur eine Frage der Zeit zu sein, bis diese Therapiemethode auf weitere Krankheiten ausgedehnt wird – und einer breiten Masse an betroffenen Menschen zur Verfügung steht. Doch dies scheint nur eine innovative Therapiemethode zu sein, die das Feld der Genetik in ihrer Bedeutung für den medizinischen Alltag und für die gesamte Menschheit so interessant und herausfordernd macht.

Doch die umfassenden Möglichkeiten der Veränderung der Medizin durch humangenetische Erkenntnisse scheinen nicht ohne weitreichende ethische Herausforderungen zu existieren, die es zu bewältigen gilt. Auch wenn ethische Fragestellungen nicht das unmittelbare Ziel dieser Arbeit sein sollen, so ist es mir

dennoch wichtig, den Umstand ethischer Herausforderungen nachfolgend am Beispiel der Präimplantationsdiagnostik (PID) näher zu erläutern. Manche Errungenschaften der Genetik üben einen wesentlich Einfluss auf die weitere Entwicklung der Menschheit insgesamt aus. Das Instrument der PID ist zwar hilfreich, bietet aber auch eine Gefahr des Missbrauchs. Daher wird es für die Menschheit zukünftig unabdingbar werden, einen einheitlichen ethischen Konsens bezüglich der Anwendung neuer genetischer Methoden anzustreben, denn: Neue Erkenntnisse und zukünftige Entwicklungen beinhalten immer die Gefahr einer ethisch fragwürdigen Anwendung. Auch wenn das Streben nach wissenschaftlichen Erkenntnissen nur schwer als nicht ethisch vertretbar einzustufen ist, so zeigt uns die Geschichte über die Natur der Menschen, dass viele wissenschaftliche Erkenntnisse und technische Errungenschaften auch zur missbräuchlichen Verfolgung individuell und kollektiv fragwürdiger Interessen dienen können. Aus diesem Grund scheint die Herausbildung eines ethischen Bewusstseins in der Gesellschaft durch ethische Richtlinien unabdingbar. Dieses Wissen über die ethischen Herausforderungen humangenetischer Einflüsse auf die Medizin sollte für alle Menschen, die in diesen Bereichen tätig sind oder sein wollen, immer Teil der Gedankenwelt ihres Schaffens sein. Dementsprechend war die ethisch kritische Reflexion der in dieser Arbeit behandelten Erforschung und Beschreibung neuer Genabschnitte für das Krankheitsbild Mikrozephalie, ein ständiger Begleiter meiner Tätigkeit.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich nicht nur bei dieser Arbeit, sondern das ganze Studium hindurch unterstützt haben. Sie haben mich immer ermutigt weiterzumachen – auch wenn der Weg zu gewissen Zeiten schwer war. Es gibt in jedem Abschnitt unseres Lebens bestimmte Zeiten in denen es einfacher zu gehen scheint – und Zeiten in denen es schwieriger zu sein scheint seine eigenen Ziele zu erreichen. In weniger einfachen Zeiten erscheint uns unser Weg schwieriger und das Ziel weiter entfernt. Trübe Gedanken nehmen zu – und es wird in diesen Zeiten immer deutlicher, präsenter und verlockender denn je, seinen eingeschlagenen Weg frühzeitig zu ändern, sich umzuorientieren, oder sogar mit etwas aufzuhören. Genau in diesen tristen Zeiten scheint es besonders wichtig, liebe Menschen um sich zu haben, die ein offenes Ohr für die persönlichen Sorgen haben. Es ist wichtig zu wissen, dass diese lieben Menschen uns wo es nur geht unterstützen und Mut zusprechen. Dabei nehmen sie auch unsere Ängste und Zweifel, die in vielen Fällen oft unbegründet sind. Dank dieser lieben Menschen scheinen weniger einfache Zeiten um einiges einfacher zu werden. Die Perioden des Selbstzweifels scheinen verkürzt und auch in ihrer Häufigkeit geringer aufzutreten. Ängste, Zweifel und trübe Gedanken verschwinden und man erkennt, dass das, was man tut, richtig ist. Es wird zunehmend klar, dass man doch eine große Freude für das hat, was man tut. Es steht außer Frage: Diese schwierigen Zeiten gehören zu unser aller Leben. Daher ist es umso wichtiger immer an sich zu glauben und dem treu zu sein, was man wirklich gerne macht. Liebe Menschen helfen einem dabei! In diesem Sinne möchte ich einen Teil dieser Diplomarbeit genau jenen Menschen widmen.

Bedanken möchte ich mich allen voran bei meinem Betreuer Christian Windpassinger für seine Unterstützung, Engagement und Themenfindung. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Humangenetik – allen voran bei Institutsvorstand Prof. Dr. Michael Speicher – für die mir zur Verfügung gestellte Infrastruktur, aber auch für die Möglichkeit meine Diplomarbeit am Institut schreiben zu dürfen, bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Freund Christian Lang, auf den ich immer zählen kann wenn ich was brauche egal zu welcher Zeit und mir immer mit Rat und Tat zur Seite steht wenn wieder einmal etwas schiefgelaufen ist oder ich nicht mehr weiter wusste. Dankbar bin ich ihm auch für seine aufbauenden Worte und offenen Ohren, die mir geholfen haben, viele Dinge aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten. Zudem danken möchte ich Katharina Gehmacher und ihrer bezaubernden Tochter Olivia. Während mich Katharina nicht nur bei der Arbeit mit Rat und Tat unterstützte und mir meine unzähligen Fragen immer beantwortete, nahm mir ihre Tochter Olivia mit jedem Lächeln alle Sorgen auf einmal. Weiters danken möchte ich meiner Mama, Gertraud Kuster. Durch ihre lebenslange Unterstützung ermöglichte sie mir überhaupt erst, einen Lebensweg einzuschlagen, der mich dort hinführte wo ich heute bin. Nicht unerwähnt lassen möchte ich an dieser Stelle Lynn Baufeld, die mich durch ihre Expertise allen voran im Laborumfeld mit Rat und Tat unterstützte. Abschließend bedanken möchte ich mich noch bei all meinen Verwandten, aber auch bei meinen lieben Freundinnen und Freunden, die mich während meines Studiums ständig begleitet und unermüdlich unterstützt haben:

Danke, dass ihr an mich geglaubt habt!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	18
	1.1 Das Gehirn.....	19
	1.1.1 Anatomischer Aufbau und Funktion.....	19
	1.1.2 Embryonale Entwicklung.....	22
	1.2 Definition der Mikrozephalie.....	25
	1.2.1 Autosomal-rezessive primäre Mikrozephalie (MCPH).....	27
	1.3 Pathogenese von MCPH anhand ausgewählter Gene.....	30
	1.3.1 ASPM (MCPH5).....	33
	1.3.2 STIL (MCPH7).....	33
	1.3.3 CDK6 (MCPH12).....	35
	1.4 Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen bei Erkrankungen mit rezessiven Erbgang.....	38
	1.4.1 Konsanguinität.....	39
	1.4.2 Homozygotie-Mapping.....	40
	1.4.3 SNP-Analyse.....	40
	1.4.4 Exom-Sequenzierung.....	41
2	Material und Methoden.....	45
	2.1 Familien.....	45
	2.1.1 MCP 4 (ASPM).....	46
	2.1.2 MCP 5 (CDK6).....	49
	2.2 Formalgenetik.....	52
	2.3 SNP-Analyse.....	53

	2.4 Sanger Sequenzierung.....	54
	2.5 Validation der Mutation.....	57
3	Ergebnisse.....	58
	3.1 MCP 4.....	58
	3.1.1 Kandidatengenfindung, MCP 4.....	58
	3.1.2 Sanger-Sequenzierung, MCP 4.....	61
	3.2 MCP 5.....	64
	3.2.1 Kandidatengenfindung, MCP 5.....	64
	3.2.2 Sanger-Sequenzierung, MCP 5.....	66
4	Diskussion.....	69
	4.1 Familie MCP 4.....	71
	4.2 Familie MCP 5.....	73
	4.3 Zika-Virus.....	76
	4.4 Gegenüberstellung der Methoden zur Charakterisierung krankheitsverursachender Varianten.....	78
	4.5 Ethische Überlegungen.....	80
5	Literaturverzeichnis.....	82
6	Abbildungsnachweis.....	87
7	Tabellennachweis.....	90
8	Anhang.....	91

Abkürzungen und deren Erklärungen

ASPM	(engl. Abnormal Spindle-like, Microcephaly-associated) (Siehe "OMIM #605481," 2013, p. Online)
BMP	Knochenmorphogenetische Proteine (engl. Bone Morphogenic Protein)
bp	Basenpaar (engl. base pair)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (engl. Cyclin-Dependent Kinase)
CDK6	Cyclin-abhängige Kinase 6 (engl. Dyclin-Dependent Kinase 6) (Siehe "OMIM #603368," 2014, p. online)
CEP152	Zentrosomales Protein 135 kD (engl. Centrosomal Protein 135 kD) (Siehe "OMIM #611423," 2014, p. online)
CEP152	Zentrosomales Protein 152 kD (engl. Centrosomal Protein 152 kD) (Siehe "OMIM #613529," 2015, p. online)
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism Database
DNS	Desoxyribonukleinsäure
(DNA)	(engl. Deoxyribonucleic Acid)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. Fibroblast Growth Factor)
HGMD	Human Gene Mutation Database
IQ	Intelligenzquotient
kbp, kb	Kilo-Basenpaare (engl. kilo base pairs)
LOH	Loss of Heterozygosity
Mbp, Mb	Mega-Basenpaare (engl. Mega base pairs)
MR	mentale Retardierung
mRNA	Boten-RNS (engl. messenger RNA)
MCPH	Autosomal-rezessive primäre Mikrozephalie (engl. Microcephaly Primary Hereditary)

NGS	Nächste Generation der DNA-Sequenzierung (engl. Next Generation Sequencing)
NE	Neuroepithel (eng. Neuroepithelium)
OFC	Okzipital-frontaler Umfang
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man, eine Wissensdatenbank menschlicher Gene und genetischer Defekte (engl. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders) (Siehe Johns Hopkins University, n.d., p. online)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PHC1	Polyhomeotic-like 1
PID	Präimplantationsdiagnostik
rcf	relative centrifugal force
RNS	Ribonukleinsäure
(RNA)	(engl. Ribonucleic Acid)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (engl. Reverse transcription polymerase chain reaction)
<i>STIL</i>	SCL/TAL1 interrupting locus gene (Siehe "OMIM #181590," 2015, p. online)
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus (engl. Single Nucleotide Polymorphism)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization)
Wt	Wildtyp-Ausprägung
ZNS	Zentralnervensystem
(CNS)	(eng. Central Nervous System)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Orientierende Darstellung des Gehirns.....	20
Abbildung 2: Funktion des Gehirns.....	21
Abbildung 3: Mikrozephalie im Zusammenhang mit unterschiedlichen syndromalen Erkrankungen.....	27
Abbildung 4: Zellteilung: Asymmetrisch und Symmetrisch.....	31
Abbildung 5: Lokalisation von MCPH-Genen während der Zellteilung.....	35
Abbildung 6: Zellveränderungen durch Veränderungen von CDK6.....	37
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Methoden zur Charakterisierung krankheitsverursachender Varianten bzw. Mutationen.....	44
Abbildung 8: Stammbaum, MCP 4.....	48
Abbildung 9: Beispielhafte Ausprägungen der Erkrankung, Individuum MCP 4..	48
Abbildung 10: Stammbaum, MCP 5.....	49
Abbildung 11: Beispielhafte Ausprägung der Erkrankung, Individuum MCP 5.2..	51
Abbildung 12: Beispielhafte Ausprägung der Erkrankung, Individuum MCP 5.3..	51
Abbildung 13: SNP-Analyse, MCP 4.1, MCP 4.2, MCP 4.3.....	59
Abbildung 14: USCS RefSeq Gene, MCP 4.....	60
Abbildung 15: DNA-Sequenz von MCP 4.2 (Mutation homozygot).....	62
Abbildung 16: DNA-Sequenz von MCP 4.4 (Mutation heterozygot).....	63
Abbildung 17: DNA-Sequenz von MCP 4.8, Wildtyp-Ausprägung (Wt).....	63
Abbildung 18: SNP-Analyse, MCP 5.1.....	65
Abbildung 19: USCS RefSeq Gene, MCP 5.....	66
Abbildung 20: DNA-Sequenz von MCP 5.1 (homozygot).....	67
Abbildung 21: DNA-Sequenz von MCP 5.4 (heterozygot).....	68
Abbildung 22: Dreidimensionale Abbildung von CDK6.....	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der bekannten MCPH Gene.....	32
Tabelle 2: Biometrische und klinische Merkmale, MCP 4.3 und MCP 4.2.....	47
Tabelle 3: Biometrische und klinische Merkmale, MCP 5.....	50
Tabelle 4: Zyklen der Amplifikation mit ihrer Dauer und Temperatur.....	55
Tabelle 5: Dauer der Zyklen für die Sequenzierung der Exons und ihr Temperaturprofil.....	56
Tabelle 6: Ergebnis der Sequenzierung (Exon 24).....	62
Tabelle 7: Ergebnis der Sequenzierung (MCP 5).....	67

Zusammenfassung

Die vorliegende Diplomarbeit behandelt das Thema der Mikrozephalie auf Grundlage der Betrachtung von zwei konsanguinen pakistanischen Familien. Im Zuge dieser Arbeit soll das Auftreten von Mikrozephalie, bei einigen Familienmitgliedern von zwei unterschiedlichen pakistanischen Familien, mit Hilfe genetischer Methoden, Analysen und Techniken, wissenschaftlich untersucht werden.

Nach Durchführung einer Sanger-Sequenzierung und einer anschließenden Literaturrecherche zeigte sich, dass die identifizierte Mutation im *CDK6*-Gen bereits im Jahr 2013 erstmalig von Hussain et al. bei einer Familie aus dem Norden Pakistans ausfindig gemacht wurde. Aufgrund der überlappenden LOH-Bereiche und der identen Mutation in *CDK6* bei beiden Familien wurde eine vergleichende Haplotyp-Analyse durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse zeigte, dass es sich bei dieser Familie um einen genetisch verwandten Stamm der von Hussain et al. beschriebenen Familie handelte. Durch die Auswertung aller methodischen Erkenntnisse soll diese Arbeit ein weiteres Mal die gleiche autosomal rezessive Mutation im *CDK6*-Gen in der betroffenen Familie ausfindig machen.

In der zweiten untersuchten Familie soll aufgrund der Erkenntnisse aus der Literaturrecherche und Interpretation des vorliegenden Phänotyps abgeklärt werden, ob das Auftreten von Mikrozephalie bei dieser Familie durch eine Mutation im *ASPM*-Gen bedingt sein könnte. Das Ziel der Arbeit ist die wissenschaftliche Abklärung einer kausalen Mutation im jeweiligen genetischen Material beider pakistanischen Familien, die bei den betroffenen Individuen zur Ausprägung einer autosomal-rezessiven primären Mikrozephalie (MCPH) führten. Angelehnt an die allgemeine Praxis zur Identifikation krankheitsverursachender Mutationen sollen im ersten Schritt die homozygoten Bereiche des genetischen Materials der Familien mittels einer SNP-Analyse ausfindig gemacht werden. Im zweiten Schritt sollen die aus einer Datenbank-Recherche ermittelten

Kandidatengene durch eine anschließende Sanger-Sequenzierung überprüft – und eine homozygote Mutation in den jeweiligen Genen ausfindig gemacht werden.

Abstract

This diploma-thesis deals with the topic of microcephaly based on the consideration of two consanguineous Pakistani families. With the help of human genetic methods and techniques, this work scientifically investigates the appearance of microcephaly affecting some family members of two different Pakistani families. According to the results of a Sanger sequencing followed by a Literature review, the identified mutation in the *CDK6*-gene was linked to a causal mutation of a family from the north of Pakistan firstly encountered by Hussain et al. In 2013. Due to the overlapping LOH regions and due to the identical mutation in *CDK6* affecting both families, a comparative Haplotype analysis was performed. The result of the analysis showed a genetical relation between the family presented in this work and the family examined by Hussain et al. As a result of the evaluation of all methodical findings, this work should determine the same autosomal recessive mutation in the *CDK6*-gene of the affected family once again.

For the second family presented, the findings of a literature review and interpretation of the phenotype showed that the occurrence of microcephaly could be caused by a mutation in the *ASPM*-gene. Therefore, the aim of this work is the scientific investigation of a causal mutation in the genetic material of each of the two Pakistani families that may have resulted in an autosomal recessive primary microcephaly (MCPH) for the affected individuals.

Based on the common practice to identify disease-causing mutations, the homozygous regions in the genetic material of both families are determined by a SNP-Analysis in the first step. In the second step, all candidate-genes are verified by a Sanger sequencing to identify a homozygous mutation in the relevant genes.

Angaben von bereits erfolgten Veröffentlichungen

–

1 Einleitung

Wie bereits in meinem Vorwort erwähnt nimmt die Bedeutung der Genetik in der Humanmedizin stetig zu, denn **„Genetik gewinnt in der Medizin zunehmend an Bedeutung, teils weil heute mehr über die Grundlagen der Vererbung bekannt ist, teils weil infolge der Unterdrückung vieler Infektionskrankheiten [...] die genetischen Leiden relativ häufiger sind als früher. Darüber hinaus merken jetzt viele Ärzte, daß dieses Fach fesselnd interessant sein kann.“** (Clarke and Bier, 1980, p. 13)

Was unser Gehirn alles leistet bzw. täglich bewerkstelligen muss um unseren Alltag gelingen zu lassen, drückt sich nicht nur in kognitiven Prozessen, sondern auch in Dingen wie Kommunikation, Emotionen, Lernen, Motorik, Wahrnehmung und vieles mehr aus. Erst wenn unser Gehirn durch irgendeinen Grund, sei es durch eine erworbene Schädigung oder durch einen Defekt bei der Geburt, nicht mehr einwandfrei funktioniert, merken wir erst die enorme Beeinträchtigung für das tägliche Leben, die in unglücklichen Fällen auch mit dem Tod enden kann.

1.1 Das Gehirn

1.1.1 Anatomischer Aufbau und Funktion

Das menschliche Gehirn wird in unterschiedliche Bereiche aufgeteilt: In das Telencephalon (Groß- oder Endhirn), Diencephalon (Zwischenhirn), Cerebellum (Kleinhirn), Mesencephalon (Mittelhirn), Pons (Brücke) und Medulla oblongata (verlängertes Mark). Die drei letzt genannten Bereiche werden zusammen auch als Hirnstamm bezeichnet. Die Areale Medulla oblongata, Cerebellum und Pons werden auch als Rhombencephalon (Rautenhirn) zusammengefasst. Das Metencephalon (Hinterhirn) wird von Pons und Cerebellum gebildet. Bedingt durch die embryonale Entwicklung ergeben sich im Gehirn, nach Abschluss des Wachstums, zwei topographische Achsen nämlich einerseits die Meynert-Achse und andererseits die Forel-Achse. In der Anatomie ist es üblich ein Organ nach verschiedenen Ansichten zu klassifizieren. Um über die von außen sichtbaren wichtigen Feinheiten Aufschluss zu geben wird eine Lateral-, Medial- und Basalansicht unterschieden. In der Lateralansicht (Ansicht von der Seite) überwiegt der Großhirnanteil. Darunter kommt das Kleinhirn, dem sich vorne das verlängerte Mark und die Brücke anschließen, zum Vorschein. Die Klassifizierung der Großhirnhemisphäre erfolgt anhand unterschiedlicher Lappen: Frontal-, Parietal-, Temporal- und Okzipitallappen. An der Oberfläche der Hemisphären erkennt man viele Sulci (Furchen) und Gyri (Windungen). Die wichtigsten bzw. am deutlichsten erkennbaren sind die Zentralfurche (Sulcus centralis) und der Sulcus lateralis. Bei der näheren Betrachtung der Gyri sind die markantesten Strukturen der Gyrus precentralis und Gyrus postcentralis. In der Ansicht von unten (Basalansicht) auf die Hirnbasis kommt der Hirnstamm in seiner ganzen Ausprägung zum Vorschein. Weiters sind das Kleinhirn, die verschiedenen

Einleitung

Hirnnerven mit ihren Austrittsstellen, das Chiasma opticum und Anteile vom Hypothalamus sichtbar. Durchtrennt man median das Gehirn in zwei Hälften kommt man zur Medialansicht. Hier wird der quer durchtrennte Balken (Corpus callosum) und die unmittelbar darüberliegende Großhirnhemisphäre erkennbar. Darunter liegt das Zwischenhirn mit dem III. Ventrikel. Der Hypothalamus formt den Boden des III. Ventrikels. Dem Zwischenhirn schließt sich nach kaudal das Mittelhirn, die Brücke und das verlängerte Mark an. Dem verlängerten Mark und der Brücke folgt das Cerebellum. (Vgl. Trepel, 2012, pp. 109–113)

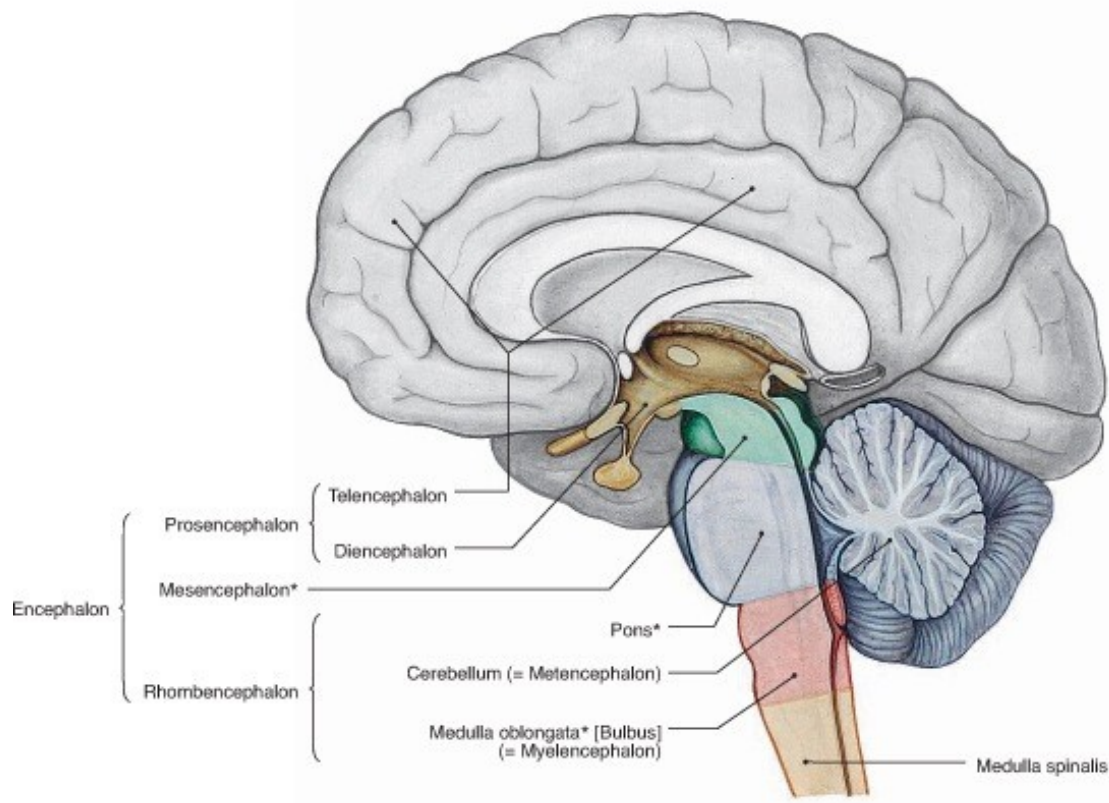


Abbildung 1: Orientierende Darstellung des Gehirns
(Sobotta et al., 2010, p. 231 [Abb. 12.31])

Wie in Abbildung 2: Funktion des Gehirns ersichtlich, befindet sich in der Region zwischen verlängertem Mark und Brücke des Gehirns der größte Anteil der Hirnnervenkerne, die als Ausgangspunkt bzw. Umschaltstelle der verschiedenen

Hirnnerven dienen. Des Weiteren befinden sich in dieser Region noch verschiedene Leitungsbahnen. Besonders erwähnenswert der Lemniscus lateralis (Teil der zentralen Hörbahn, der auditorische Impulse vermittelt) und medialis (leitet sensiblen Impulse zum Thalamus) sowie der Tractus vestibulospinalis (Teil der extrapyramidalmotorischen Bahn). (Vgl. Trepel, 2012, pp. 116–135)

Im Mittelhirn befinden sich unterschiedliche Faserbündel (kortikospinale Bahn und weitere). Darüber hinaus befinden sich in dieser Region auch verschiedene Kernkomplexe. Die wichtigsten sind die Substantia nigra und die Formatio reticularis (FR). Die Kernregionen der Substantia nigra bilden ein wichtiges Zentrum für die Motorik. Sie spielt aber auch beim Bewegungsantrieb eine wesentliche Rolle. Auch die adäquate Reaktion auf Sinnesreize fällt in das Aufgabengebiet dieser Region. Kommt es zu Störungen in dieser Kernregion führt dies zur Entstehung des Parkinson-Syndroms. In der FR sind verschiedene, lebenswichtigen Zentren wie etwa das Atem-, Kreislauf-, Brech-, Weck- und motorische Zentrum. (Vgl. Trepel, 2012, pp. 137–153)

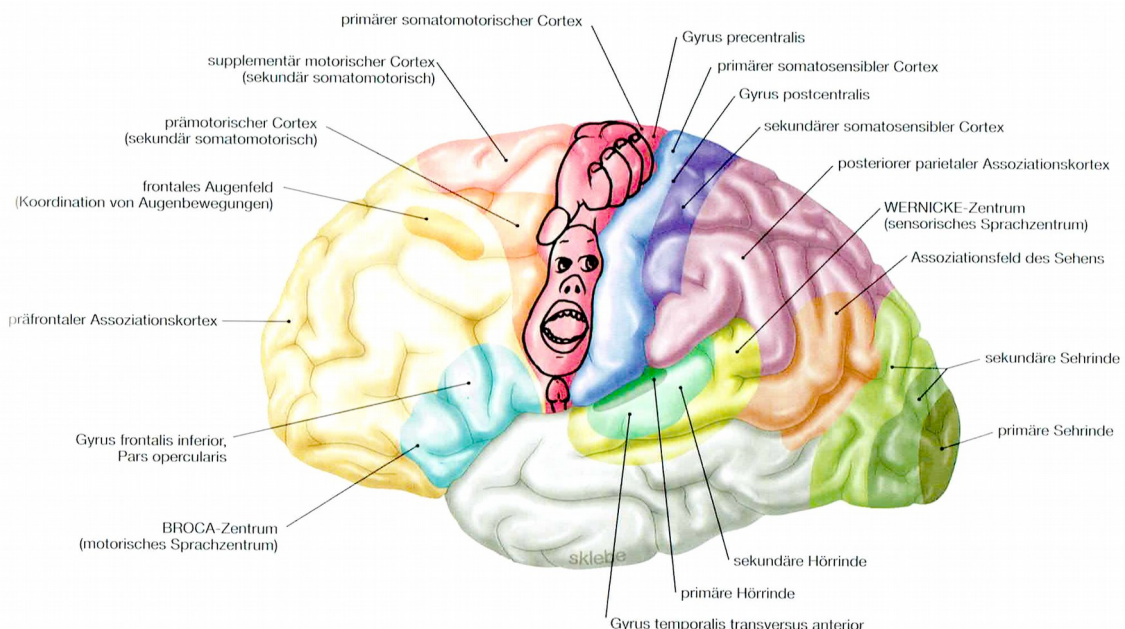


Abbildung 2: Funktion des Gehirns
(Sobotta et al., 2010, p. 237 [Abb. 12.42])

Das Kleinhirn (Cerebellum) bildet ein wichtiges Zentrum für das Lernen, Koordinieren und Feinabstimmen von Bewegungen. (Vgl. Trepel, 2012, p. 175)
Die Aufgliederung des Zwischenhirns (Diencephalon) erfolgt in vier Bereiche: Epithalamus, Thalamus, Subthalamus und Hypothalamus. Einige Kerngebiete des Hypothalamus sind für die Regulation sämtlicher vegetativer und endokriner Vorgänge in unserem Körper verantwortlich. Darunter fällt beispielsweise die Atmung, die Aufrechterhaltung des Kreislaufes aber auch die Bilanzierung des Flüssigkeitshaushaltes und Steuerung des Hormonhaushaltes. (Vgl. Trepel, 2012, pp. 179–195)

Allgemein lässt sich der Cortex cerebri, aus entwicklungsgeschichtlicher Perspektive, in Paleokortex, Archikortex und Neokortex klassifizieren, wobei der Neokortex phylogenetisch den jüngsten Teil bildet. Der Cortex cerebri bildet die äußere Schicht des Großhirns (Telencephalon). Der Cortex ist Sitz verschiedener Zentren, beispielsweise beinhaltet er die visuellen, akustischen und motorischen Areale. (Vgl. Trepel, 2012, pp. 219–220)

1.1.2 Embryonale Entwicklung

Bei der Entwicklung unseres Gehirns steht am Beginn die Entstehung der Neuralplatte. Diese Entwicklung wird durch den Einfluss von Chorda und Mesoderm gewährleistet (Chorda-Mesoderm-Komplex). Die Transformation zum Neuralrohr erfolgt zwischen dem 19. und 32. Tag der Schwangerschaft. Diese Transformation bildet die Grundlage für die Entstehung des Gehirns und Rückenmarks. Bevor sich das neugeformte Neuralrohr verschließt, emigrieren Zellen der Neuralleisten, die das Grundgerüst für das periphere Nervensystem bilden. Die Transformation von ektodermalen Zellen zu neuroektodermale Zellen beruht auf verschiedenen Signalmolekülen und das komplexe Zusammenwirken unterschiedlicher Faktoren.

Am Neuralrohr können ab dem 25. Tag der Schwangerschaft verschiedene bläschenartige Strukturen ausgemacht werden, die als Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon bezeichnet werden. Eine weitere Unterteilung des Prosencephalons in Telencephalon und Diencephalon ist ab der 5. Schwangerschaftswoche möglich sowie die Segmentierung des Rhombencephalons in Metencephalon und Myelencephalon. In der 6. Schwangerschaftswoche entstehen am seitlichen Bereich des Telencephalons wieder zwei bläschenartige Strukturen, aus denen sich die Großhirnhemisphären entwickeln. Aus dem Myelencephalon gehen die Hirnnerven IX. bis XII. hervor. Der untere Bereich des Myelencephalon ähnelt von seinem Aufbau bzw. seiner Strukturierung bereits dem Rückenmark.

Aus molekulargenetischer Sicht spielen bei der Entwicklung des Nervensystems verschiedene Gene und ihre exprimierten Proteine eine wesentliche Rolle. Die Proteine entfalten ihre Wirkung auf komplexe Art und Weise um eine reibungslose Neurogenese zu gewährleisten. Viele dieser Gene wurden zuerst am Genom von Mäusen bzw. der Drosophila untersucht und die Steuerung der Entwicklung des Nervensystems durch diese Gene wird auch beim Menschen vermutet. Allgemein wird die Entstehung des ZNS in verschiedene Bereiche gegliedert und auf das komplexe Zusammenwirken dieser Bereiche zurückgeführt: Induktion, Proliferation, Differenzierung, Zellwanderung und Apoptose. Kleinste Abweichungen, Fehler oder Mutationen in diesen Genen, die für die Steuerung dieser Prozesse verantwortlich sind, führen zur Bildung fehlerhafter Proteine, welche sich auf die Steuerung des Zellzyklus bzw. auf den Kommunikationsweg und auf die Signalwirkung negativ auswirken. Dieser Umstand kann zur Entstehung von Pathologien beitragen. Eine besondere Rolle in der Neurogenese spielt das bone morphogenic protein (BMP). Dieses Protein ist Bestandteil des TGF- β Signalweges und für die Hemmung der Umwandlung von ektodermalen Zellen in neuronale Zellen verantwortlich. Es gibt unterschiedliche Mechanismen, die die Sekretion des Proteins BMP unterdrücken. Einerseits werden vom Chordafortsatz Noggin, Chordin und Follistatin gebildet, die die hemmende Wirkung des BMP unterdrücken, indem diese Substanzen die Sekretion dieses

Proteins hemmen. Andererseits wird in einem frühen Stadium der Neurogenese der Fibroblast Growth Factor (FGF) gebildet, der sich unmittelbar auf die Entstehung des Proteins BMP auswirkt, indem er die Transkription bzw. Expression von BMP unterdrückt. Darüber hinaus existieren noch andere Proteine, die für die Differenzierung bzw. Entwicklung des ZNS verantwortlich sind. (Vgl. Universität Fribourg et al., 2005, p. online)

An dieser Stelle möchte ich noch die Rolle von Pax-Genen, insbesondere von Pax6, während des Zellzyklus bzw. der Neurogenese kurz näher beleuchten. Pax6 wird während der Entwicklung des Cortex exprimiert und ist eine wesentliche Voraussetzung für eine gesunde Entwicklung des Cortex. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass Pax6 direkt die Expression von CDK6 unterdrückt. Die Hemmung von Cyclin unterdrückt die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins. Dadurch wird die Transkription von Genen limitiert, die den Zellzyklus direkt fördern. (Vgl. Mi et al., 2013)

1.2 Definition der Mikrozephalie

Die Definition der Mikrozephalie erfolgt anhand des okzipital-frontalen Umfanges (OFC). Bei den betroffenen Individuen zeigt sich ein um zwei oder mehr Standardabweichungen reduzierter Kopfumfang (OFC) im Vergleich zum Altersdurchschnitt und unter der Berücksichtigung von Alter und Geschlecht. Anhand dieser Aspekte ist es möglich, eine Mikrozephalie zu klassifizieren. Eine Mikrozephalie kann isoliert, also ohne weitere offensichtliche Pathologien, auftreten oder in Verbindung mit anderen Auffälligkeiten, die dann als syndromale Form der Mikrozephalie bezeichnet werden. Kann bereits bei der Geburt eine Mikrozephalie diagnostiziert werden, wird sie als primäre Mikrozephalie bezeichnet. Entwickelt sich jedoch erst in der frühen Kindheit oder im Laufe der weiteren Entwicklung eine Mikrozephalie wird der Terminus sekundäre Mikrozephalie verwendet. An dieser Stelle muss festgehalten werden, dass sich hinsichtlich der Definition bzw. der Nomenklatur die Literatur und AutorInnen uneins sind. Die Termini primär und sekundär werden nicht einheitlich verwendet, sondern unterschiedlich definiert. Einige AutorInnen sind der Meinung, dass der Terminus primär nur dann verwendet werden soll, wenn die Mikrozephalie aufgrund genetischer Ursachen entstanden ist und sekundär, wenn andere erworbene Ursachen (z.b.: Umweltfaktoren) dafür verantwortlich sind. Beispielsweise kann sich auch durch Infektionen oder andere störende Einflüsse während der Schwangerschaft eine Mikrozephalie entwickeln, die bei der Geburt bereits ausgeprägt ist, aber keine genetische Ursache hat. Die einen würden diese Form als primäre die anderen als sekundäre Mikrozephalie bezeichnen. (Vgl. Abuelo, 2007, pp. 118–119)

Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden Formen ist, dass es sich bei der primären Mikrozephalie gewöhnlich um eine statische entwicklungsbedingte

Störung handelt. Bei der sekundären Mikrozephalie hingegen zeigt sich eine progressive neurodegenerative Entwicklung. (Vgl. Woods et al., 2005)

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Mikrozephalie entweder isoliert auftreten kann oder im Kontext von Syndromen (beispielsweise Angelman- oder Rett-Syndrom) und sowohl durch genetische Faktoren als auch durch Umwelteinflüsse wie beispielsweise Strahlung, übermäßiger Alkoholkonsum während der Schwangerschaft, intrauterine Infektionen bedingt sein kann. Zudem korreliert der Grad des verminderten OFC mit der Schwere der mentalen Retardierung (MR), je kleiner der Kopfumfang, desto niedriger ist der mittlere Intelligenzquotient (IQ). Die genetischen Faktoren, die eine isolierte Mikrozephalie verursachen, beruhen hauptsächlich auf einem autosomal-rezessivem Erbgang. Es gibt auch autosomal-dominante und X-chromosomal vererbte Formen der Mikrozephalie und noch andere Erbgänge. (Vgl. Abuelo, 2007, pp. 118–119)

Wie zu Beginn des Absatzes erwähnt, kann Mikrozephalie im Zuge anderer Grunderkrankungen auftreten und Teil von einem Syndrom sein. Für diese Art der Mikrozephalie wird auch der Terminus Syndromale-Mikrozephalie verwendet. Die Diversität an Syndromaler-Mikrozephalie ist genauso groß wie die unterschiedlichen Pathomechanismen bzw. Mutationen, die zur Ausprägung einer Mikrozephalie führen können. Abbildung 3 zeigt die Mikrozephalie im Zusammenhang mit unterschiedlichen syndromalen Erkrankungen und gibt damit einen Überblick über unterschiedliche syndromale Erkrankungen, die das Auftreten von Mikrozephalie mit sich bringen kann.

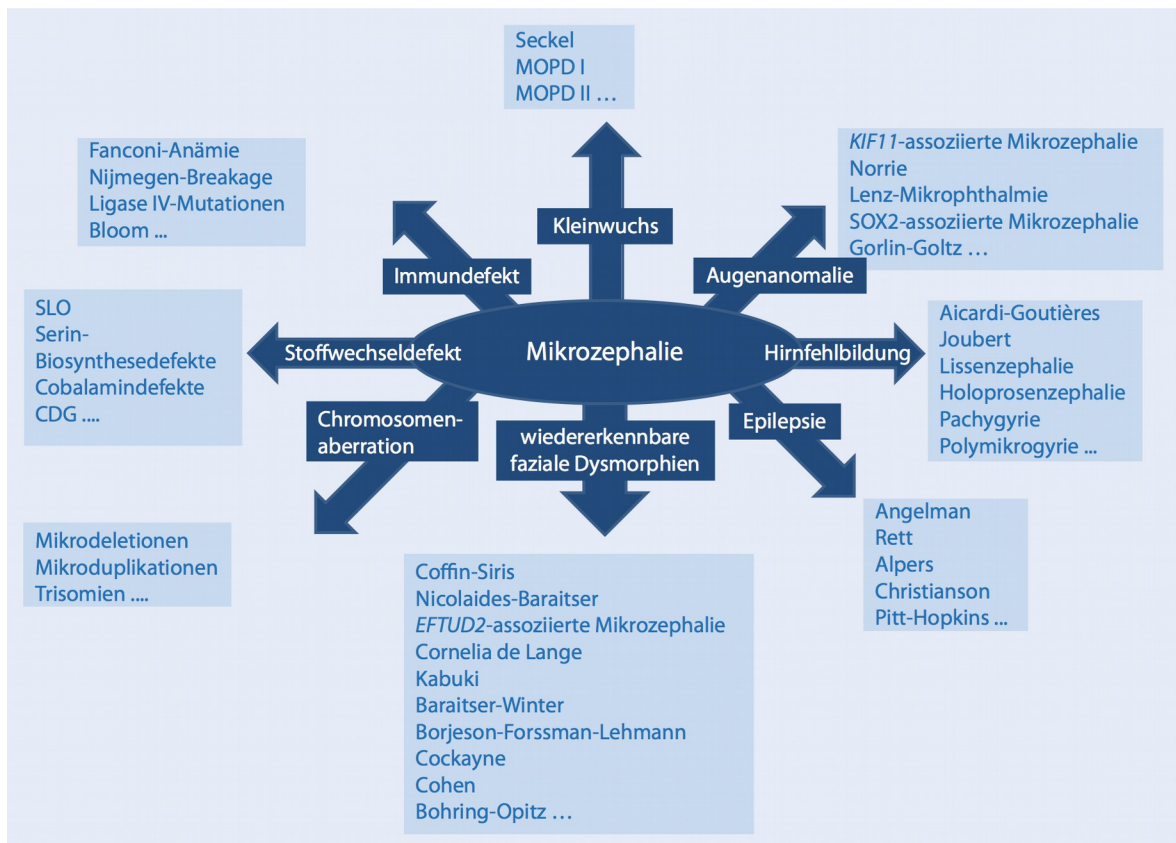


Abbildung 3: Mikrozephalie im Zusammenhang mit unterschiedlichen syndromalen Erkrankungen (Wieczorek, 2015, p. 369 [Abb. 1])

1.2.1 Autosomal-rezessive primäre Mikrozephalie (MCPH)

Aus historischer Sicht erfolgte die Definition der autosomal-rezessiven primären Mikrozephalie (MCPH) anhand folgender Kriterien: Ein reduzierter OFC von < -3 , ein verkleinertes Hirnvolumen und eine mentale Retardierung (MR) mit einem Intelligenzquotienten (IQ) zwischen 30 und 70 bzw. 80. Es wurden keine weiteren neurologischen Auffälligkeiten gefunden bzw. diagnostiziert. Die MCPH ist eine genetisch sehr uneinheitliche und seltene Erkrankung. (Vgl. Woods et al., 2005; Passemar, 2009 nach Kaindl et al., 2010, p. 364)

Bei der Suche nach primärer Mikrozephalie in der Literatur bzw. bei der

intensiveren Beschäftigung mit diesem Thema findet man in der Literatur auch den älteren Terminus „microcephaly vera“ oder „wahre Mikrozephalie“. Nun gab es neben der autosomal-rezessiven primären Mikrozephalie noch weitere Bezeichnungen, die alle dazu gedacht waren, denselben Phänotyp zu beschreiben. Ein charakteristisches bzw. bestimmendes Merkmal der „wahren Mikrozephalie“ war früher die schräg abfallende Stirn. Dieses Charakteristikum war nicht in allen Fällen von MCPH vorhanden. Mit dem Fortschreiten der Zeit berücksichtigte der Terminus „microcephaly vera“ alle Neugeborenen mit angeborener Mikrozephalie und die damit einhergehenden neurologischen Merkmale. Aufgrund der mangelnden Spezifität konnte diese Bezeichnung nun nicht mehr für die Diagnose verwendet werden und ebnete den Weg für eine neue diagnostische Bezeichnung: Autosomal-rezessiv primäre Mikrozephalie (MCPH).

Die Inzidenz der Mikrozephalie wird beispielsweise in Japan auf 1 : 30.000, in den Niederlanden auf 1 : 250.000 und in Schottland auf 1 : 2.000.000 geschätzt.

Allgemein kann festgehalten werden, dass die weiße Bevölkerung im Vergleich zu Asiaten und Arabern weniger häufig an MCPH erkrankt. Das gehäufte Auftreten von MCPH in asiatischen und arabischen Ländern ist auf die konsanguine Heirat zurückzuführen, die in diesen Ländern aus kulturellen Gründen weit verbreitet ist. (Vgl. Woods et al., 2005)

Die Inzidenz von MCPH steigt in Regionen, wo eine Heirat unter genetisch verwandten Familienmitgliedern allgemein üblich ist, auf bis zu 1:10,000 an. (Vgl. Finlay, 1995; Cox J, 2006 nach Faheem et al., 2015, p. 2)

Nach einem kurzen Rückblick in die Geschichte von MCPH bzw. Mikrozephalie erfolgt heute die klinische Definition der MCPH anhand der zwei folgenden Eigenschaften: Erstens, ein angeborener reduzierter OFC von mindestens 4 Standardabweichungen im Vergleich zum Durchschnitt, die hauptsächlich den Cortex betrifft. Zweitens, eine geistige Beeinträchtigung, die nicht auf andere neurologische Ursachen, wie spastische Lähmung oder progressiven kognitiven Verfall, zurückzuführen ist. Der Großteil an Patienten, die an MCPH leiden, haben eine normale bzw. altersentsprechende Größe, Gewicht, äußeres Erscheinungsbild und zeigen ein unauffälliges chromosomales Bild und eine unauffällige Darstellung

des Gehirns. Die MCPH wird in der 32. Schwangerschaftswoche am Ultraschallbild ersichtlich, ist beim Zeitpunkt der Geburt vorhanden und schreitet im Laufe der Entwicklung nicht fort. Die Messung des OFC ist das am häufigsten verwendete Mittel, um eine MCPH zu diagnostizieren. (Vgl. Faheem et al., 2015, p. 2)

Hinsichtlich des Phänotyps zeigen unterschiedliche Studien, dass das Spektrum an Phänotypen bei Menschen mit Mutationen in den MCPH Genen uneinheitlicher ist, als vorerst angenommen. Folgende Symptome bzw. Merkmale können zusätzlich zu den bereits erwähnten Diagnosekriterien mit inkonsequenter Häufigkeit bzw. Ausprägungswahrscheinlichkeit vorhanden sein: Krämpfe (tonisch-klonisch, generalisiert), aggressives Verhalten, Schlafstörungen und Pyramidenbahnzeichen. Des Weiteren leiden Betroffene an einer verzögerten sprachlichen und motorischen Entwicklung, einem Aufmerksamkeitsdefizit und einer Hyperaktivitätsstörung. Aus endokrinologischer Sicht kann ein Minderwuchs mit Pubertas praecox vorhanden sein. Am Gehirn können folgende Fehlbildungen vorhanden sein: Eine Balkenagenesie (Corpus-callosum-Agenesie), eine fokale Mikrogyrie und Dysplasie, eine Verminderung der weißen Substanz, infratentoriale Fehlbildungen und andere. Fehlbildungen außerhalb des Gehirns können an den Nieren und Extremitäten vorhanden sein (beispielsweise eine Agenesie der Nieren, polyzystische Nieren und eine Syndaktylie. (Vgl. Kaindl et al., 2010, p. 367)

1.3 Pathogenese von MCPH anhand ausgewählter Gene

Für die Pathogenese der MCPH konnten bis jetzt Mutationen in zwölf verschiedenen Genen aufgefunden gemacht werden (Siehe Tabelle 1: Zusammenfassung der bekannten MCPH Gene).

Die Größe des Gehirns bei der Geburt wird weitgehend von der Proliferationsrate und Apoptose während der Neurogenese bestimmt. Neuronale Stammzellen gehen aus symmetrischen und asymmetrischen Zellteilungen hervor. Eine Störung bzw. Beeinträchtigung der Teilung der neuronalen Stammzellen und/oder eine fehlerhafte DNA-Reparatur könnten sich für eine merkliche Reduktion des Cortex verantwortlich zeigen. Die mit MCPH assoziierten Gene und ihre Proteine spielen in der Regulation des Zellzyklus und in der DNA-Reparatur eine wichtige Rolle. Die wesentlichsten Aufgaben der Proteine: Sie sind dafür verantwortlich, dass die Kontrollpunkte im Zellzyklus fehlerfrei funktionieren. Zudem bewerkstelligen sie auch die Chromosomenkondensation. Des Weiteren sind die Proteine auch für die tadellose Funktion des Zentrosoms und der Spindel verantwortlich. Die Proteine vollführen die korrekte Trennung der Tochterzellen und sie sind auch an der Umsetzung der Apoptose beteiligt. (Vgl. Kaindl et al., 2010, p. 365)

Die Mehrzahl der Neuronen lassen sich neuronalen Stammzellen zuordnen und sind damit die vorherrschenden Zellen des Neuroepithels (NE). Bei der symmetrischen Zellteilung sind die Spindeln während der Mitose zur Ebene des NE hin orientiert. Dieser Vorgang bringt zwei neuronale Stammzellen hervor und erhöht auf diese Weise den Stammzellen-Pool (Siehe Abbildung 4).

Eine asymmetrische Zellteilung ereignet sich aufgrund der senkrechten Ausrichtung der Spindeln während der Mitose zum NE. Dieser Vorgang führt zur Entstehung eines postmitotischen Neurons und einer Stammzelle. Dieser Art der Teilung hingegen hält den Pool an Stammzellen konstant. Es ist naheliegend, dass jegliche Störung, die dieses Gleichgewicht zwischen den unterschiedlichen Arten

der Zellteilungen zu kippen droht, die Anzahl an Stammzellen und neuronalen Zellen drastisch vermindert und so zu einem verkleinerten Gehirn führt. Auch der Zeitpunkt der Zellteilungen während der Neurogenese ist ein entscheidender Faktor und hat ebenfalls Einfluss auf die endgültige Anzahl der Neuronen. Abgesehen von diesem Mechanismus ist es wichtig, andere Ursachen für die Entstehung einer MCPH zu erwähnen, wie etwa Störungen in der Zellproliferation, eine gesteigerte Apoptose und eine ungewöhnliche neuronale Migration und/oder Differenzierung. (Vgl. Faheem et al., 2015, p. 2) (Vgl. Barbelanne and Tsang, 2014)

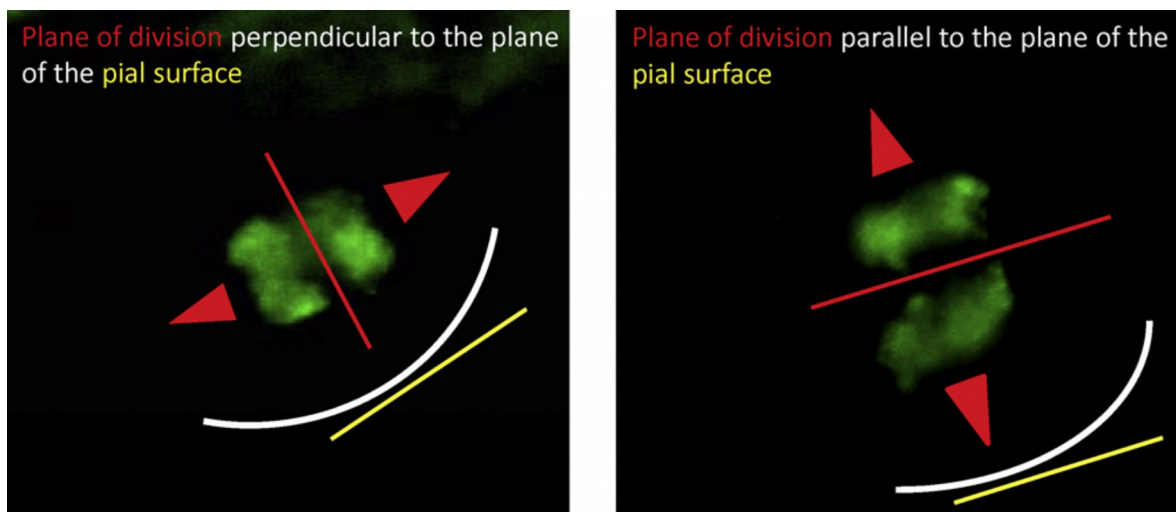


Abbildung 4: Zellteilung: Asymmetrisch und Symmetrisch
(Kaindl et al., 2010, p. 375 [Fig. 4])

In Abbildung 4 wird eine symmetrische und asymmetrische Zellteilung gegenübergestellt. Die rote Linie repräsentiert die Spindel, die gelbe Linie das Neuroepithel (NE) und das rote Dreieck das Zentrosom. Die Ausrichtung der Spindel zum Neuroepithel hängt von der Position des Zentrosoms ab. Eine parallele Anordnung der Spindel zum NE führt zu einer symmetrischen Zellteilung und so zu einem Anstieg des Pools an Stammzellen. Eine senkrechte Ausrichtung der Spindel zum NE hat eine asymmetrische Zellteilung zur Folge. Diese Art der Teilung hält den Pool an Stammzellen konstant. (Vgl. Kaindl et al., 2010, p. 365)

Gene	Cellular location	Role/effect on brain development
<i>Microcephalin</i>	Nucleus	Involved in chromosomal condensation, reduced MCPH1 enhances the production of early born neurons, which comprise deep layers (IV–VI), and reduces the late-born neurons, which produce the thinner outer cortex layer (II–III).
<i>WDR62</i>	Nucleus/Centrosomes/Neuronal precursors/ Post-mitotic neurons	Cerebral cortical development, proliferation and migration of neuronal precursors, mutation in <i>WDR62</i> affects its role in proliferating and migrating neural precursors and causes severe brain malformations.
<i>CDK5RAP2</i>	Centrosome	Regulates microtubule function, mutation in <i>CDK5RAP2</i> reduces the progenitor pool/decreases the number of neurons and reduces cell survival.
<i>CASC5</i>	Kinetochore	Vital for the spindle checkpoint of the mitotic cycle, <i>CASC5</i> underscores the role of kinetochore integrity in the proper volumetric development of the human brain.
<i>ASPM</i>	Pericentrosomal	Orientation of mitotic spindles during embryonic neurogenesis, <i>ASPM</i> mutations can decrease the size of the brain by influencing the orientation of the mitotic spindle.
<i>CENPJ</i>	Centrosome/ NE of the frontal cortex	Controls centriole length/microtubule function, its deletion causes an increased incidence of multiple spindle poles, apoptosis and mitosis arrest
<i>STIL</i>	Pericentrosomal	Apoptosis regulator/cell cycle progression, its mutation in zebrafish causes an embryonic lethal defect, and <i>STIL</i> knockout mice (<i>Stl^{-/-}</i>) exhibit numerous developmental abnormalities/decreased size/defective midline neural tube.
<i>CEP135</i>	Centrosome	Maintains organisation/structure of the centrosome, <i>CEP135</i> knockdown showed decreased growth rate/disorganised microtubules.
<i>CEP152</i>	Centrosome	Centriole duplication/shape to cell/polarity/motility, conversion of glutamine into proline disturbs potential coiled-coiled protein domain/reduced head size.
<i>ZNF335</i>	Nucleus	Progenitor cell division/differentiation, mutated <i>ZNF335</i> gene causes degeneration of neurons, knockdown of <i>ZNF335</i> caused a small brain size with an absent cortex/disrupted proliferation and differentiation of neuronal cells.
<i>PHC1</i>	Nucleus	Regulates cell cycle, <i>PHC1</i> mutation highlights the role of chromatin remodelling in the pathogenesis of Primary Microcephaly.
<i>CDK6</i>	Cytoplasmic/ nuclear	Controls cell cycle/organises microtubules, <i>CDK6</i> mutation affects apical neuronal precursor cells proliferation/reduces progenitor pool/decreases neuronal production/primary microcephaly.

Tabelle 1: Zusammenfassung der bekannten MCPH Gene
(Faheem et al., 2015, p. 3 [Spalten 2, 4 und 5 aus Table 1])

1.3.1 *ASPM* (MCPH5)

Mutationen im *ASPM*-Gen sind die häufigste Ursache für das Auftreten von MCPH. Diese sind für ca. 25 – 50 % der Fälle an MCPH verantwortlich. (Vgl. Barbelanne and Tsang, 2014, p. 5)

ASPM ist wesentlich für das einwandfreie funktionieren der mitotischen Spindel in den embryonalen Neuroblasten. Das Gen besteht aus 62.567 bp, 28 Exons und das Genprodukt bzw. Protein aus 3477 Aminosäuren mit einer vermutlichen Mikrotubuli interagierenden Domäne am N-Terminus. Studien zeigten vier neue Mutationen im *ASPM*-Gen bei 33 pakistanischen Familien. Mutationen im *ASPM*-Gen führen zu einer Trunkierung des Proteins mit unterschiedlichen Auswirkungen. Es kann zu einer Deletion, Duplikation, zu einem Basenpaar- bzw. Aminosäure-Austausch oder zu einer Variation im Bereich der Introns kommen. Das Fehlen bzw. die Verminderung von *ASPM* in der menschlichen Zelle wirkt sich auf die Orientierung der Spindel aus und hat einen Einfluss auf die Symmetrie der Zellteilung. Aufgrund einer Mutation im *ASPM*-Gen bzw. fehlerhafter Proteine kommt es zu einer asymmetrischen Zellteilung. Dieser Vorgang führt allgemein zu einer fehlerhaften bzw. defekten Zellteilung. Überwiegt im Verhältnis die asymmetrische Zellteilung gegenüber der symmetrischen aufgrund einer Mutation im *ASPM*-Gen kommt es zu einer Verringerung an neuronalen Zellen. (Vgl. Faheem et al., 2015, pp. 5–6) (Vgl. Barbelanne and Tsang, 2014, p. 5)

1.3.2 *STIL* (MCPH7)

SCL/TAL1 interrupting locus (*STIL*) gene hat eine Größe von 63.018 bp und besteht aus 20 Exons. Das Gen ist der 7. identifizierte Locus, der mit MCPH

assoziiert wird (MCPH7). Bei einer indischen Familie wurden drei Mutationen im *STIL*-Gen gefunden. Die Gene, die für die Trunkierung des Proteins verantwortlich sind, befinden sich am Chromosom 1 (1p33-p32.3). (Vgl. Kumar et al., 2009, pp. 286–287)

STIL wird im gesamten Cytosol exprimiert, hauptsächlich aber in der perinukleären Region. Damit die Zelle korrekt in die Phase der Mitose eintreten kann, ist die einwandfreie Funktion von *STIL* unabdingbar. Weiters ist das Gen auch für die Regulation der Apoptose und für die einwandfreie Funktion des Zentrosoms verantwortlich. Darüber hinaus ist *STIL* in der frühen embryonalen Entwicklung und während der Zellteilung allgegenwärtig. Studien mit Zebrabärblingen zeigten, dass *STIL* für die einwandfreie Verdoppelung der Zentrosomen und für die korrekte Organisation der Spindel während der Mitose verantwortlich ist. Des Weiteren wurde ersichtlich, dass eine Mutation des *STIL*-Gens in Zebrabärblingen zum Tod des Embryos führt.

Bei der Unterdrückung der Funktion des *STIL*-Gens in Mäusen stellte sich heraus, dass dies zu zahlreichen Wachstumsstörungen und zu Störungen in der weiteren Entwicklung des Embryos führt. Mutationen des *STIL*-Gens in Mäusen äußerten sich in folgender Art und Weise: Eine verminderte Größe des Embryos, eine eingeschränkte bzw. fehlgeleitete Entwicklung, eine gesteigerte Apoptose, eine eingeschränkte Proliferationsrate und eine ungewöhnliche Expression unterschiedlicher Gene während der embryonalen Entwicklung. Diese Mutationen waren nicht mit dem Leben vereinbar und führten zum Tod der Embryos. (Vgl. Faheem et al., 2015, p. 6)

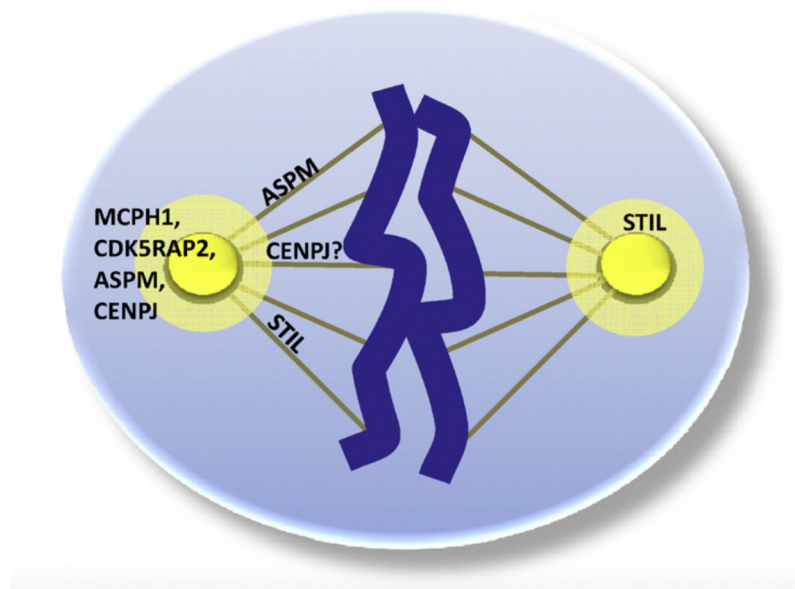


Abbildung 5: Lokalisation von MCPH-Genen während der Zellteilung
(Kaindl et al., 2010, p. 376 [Fig. 6])

Abbildung 5 zeigt die verschiedenen MCPH-Gene und ihre Platzierung während der Zellteilung. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass der Großteil der MCPH-Proteine am Zentrosom wirken. STIL hingegen entfaltet seine Wirkung in der perizentriolären Region.

1.3.3 CDK6 (MCPH12)

Hussain et al. waren die Ersten, die erst kürzlich eine neu-identifizierte Mutation im Gen für *CDK6* beschrieben haben. Eine homozygote Mutation (c.589G>A) in diesem Gen führt zur Ausprägung von Mikrozephalie und ist der 12. identifizierte Locus am langen Arm des Chromosom 7 (MCPH12). (Vgl. Barbelanne and Tsang, 2014, p. 6) (Vgl. Faheem et al., 2015, p. 8)

Im Zuge dieser Arbeit konnte ein weiteres Mal dieselbe Mutation im *CDK6*-Gen (c.589G>A) bei einer pakistanischen Familie nachgewiesen werden (Siehe 3.2.2

Sanger-Sequenzierung, MCP 5 auf Seite 66).

Diese Missense-Mutation führt zu einem Aminosäure-Austausch von Alanin zu Threonin (p.A197T). (VGL. Hussain et al., 2013, p. 5200)

Die Mutation wirkt sich ungünstig auf die Organisation der Mikrotubuli und der Spindel aus. Darüber hinaus wirkt sich die Mutation auf die Form des Zellkerns (Deformierung) und auf die Anzahl der Zentrosomen aus (>2). Des Weiteren beeinflusst eine Mutation im Gen für *CDK6* auch das Wachstum bzw. die Vermehrung von apikalen neuronalen Stammzellen. Der Einfluss dieser Mutation bewirkt ein Ungleichgewicht zwischen symmetrischer und asymmetrischer Zellteilung. Daraufhin kommt es zu einer Verminderung an Stammzellen und so zu einem verringerten neuronalen Wachstum, welches schlussendlich zu einer Mikrozephalie führen kann. (Vgl. Faheem et al., 2015, p. 8)

Abbildung 6 zeigt (A) eine Zelle in der Interphase und Metaphase mit jeweils einer normalen Anordnung der Mikrotubuli, einer gewöhnlichen Ausbildung der Spindel und einer üblichen Anzahl an Zentromeren.

Im Bild darunter (B) wird eine mitotische Zelle mit drei Zentrosomen dargestellt. Zwei Zentrosome befinden sich auf der einen Seite, ein weiteres Zentrosom liegt am gegenüberliegenden Pol der sich teilenden Zelle.

Bild (C) zeigt eine fehlerhafte Organisation bzw. Anordnung der Mikrotubuli und eine falsche Ausrichtung der Spindel in einer mitotischen Zelle (D). Das Bild (E) zeigt eine Zelle mit unorganisierten Spindeln und in (F) wird ein deformierter Zellkern dargestellt, der ein Zentrosom beherbergt. (Vgl. Hussain et al., 2013, p. 5207)

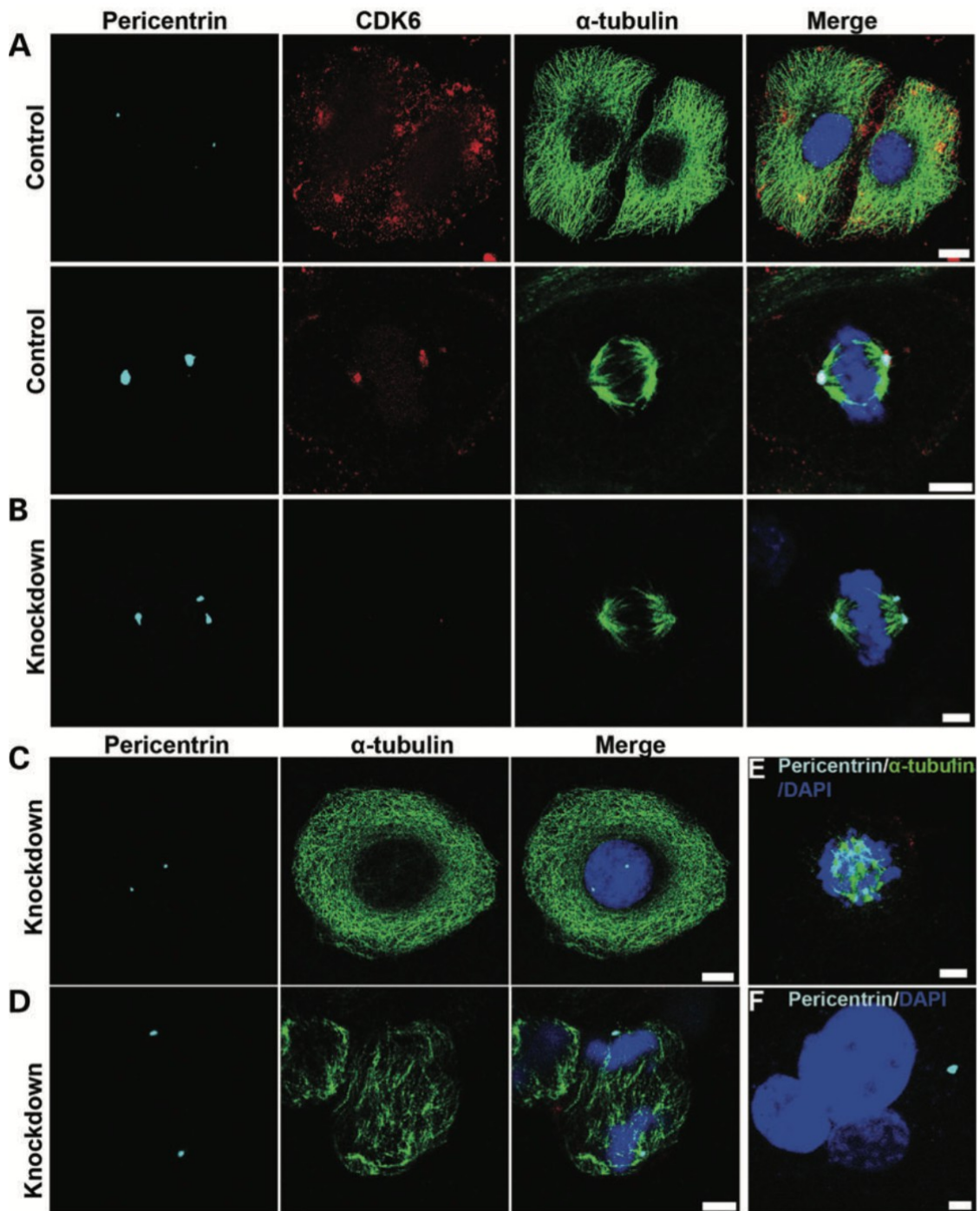


Abbildung 6: Zellveränderungen durch Veränderungen von CDK6
 (Hussain et al., 2013, p. 5207 [Abnormalities in centrosome, microtubule network and nuclear shape in CDK6-knockdown cells])

1.4 Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen bei Erkrankungen mit rezessiven Erbgang

Die Anzahl an seltenen, monogenen Erkrankungen wird auf mehr als 5000 geschätzt. Bei der Hälfte dieser Erkrankungen konnte bis jetzt kein Gen für die Ursache gefunden werden. Die Identifizierung von Genen, die für diese Erkrankungen verantwortlich sind, ermöglicht eine molekulare Diagnose und bietet einen ersten Schritt, die physiologische Rolle des Proteins und der Pathogenese zu verstehen. Diese Erkenntnis kann genutzt werden, um erste therapeutische Ansätze zu entwickeln. In der Vergangenheit erfolgte die Identifizierung von vererbbaaren krankheitsverursachenden Genen durch eine Sanger-Sequenzierung von Kandidatengenen. Die Auswahl an Kandidatengenen erfolgte durch die Assoziation ähnlicher Gene mit der gleichen Erkrankung oder dadurch, dass die prognostizierte Protein Funktion wesentlich für die Physiologie der Erkrankung ist. Darüber hinaus konnte auch eine Kandidatengensuche an einer bestimmten Position im Genom einen Hinweis auf die gesuchten Gene geben. Die wichtigsten Methoden um Gene zu finden, die in Verdacht stehen, eine Krankheit zu verursachen, beruhen auf Karyotypisierung, Linkage-Analyse bzw. Kopplungsanalyse, Homozygotie-Mapping und SNP-Analyse. Next Generation Sequencing (NGS) verändert die Möglichkeiten nach Krankheitsgenen zu suchen und bietet heute eine hohe Rate an bezahlbarer Sequenzierung von DNA und RNA. Besonders vererbbaare Erkrankungen profitieren von dieser Entwicklung. Die schnelle Sequenzierung des ganzen Genoms eines Patienten beseitigt die Notwendigkeit, zuerst nach Kandidatengenen zu suchen. NGS verkürzt den Prozess der Identifikation eines krankheitsverursachenden Gens, indem nur mehr ein Schritt (whole genome sequencing) notwendig ist und nicht mehr zwei (Kandidatengensuche und anschließende Sanger-Sequenzierung). (Vgl. Gilissen et al., 2012, pp. 490–491)

1.4.1 Konsanguinität

In der klinischen Genetik wird eine konsanguine Ehe folgenderweise definiert: Ein Bund zwischen zwei verwandten Menschen, die mindestens Cousin bzw. Cousine zweiten Grades sind. In den meisten westlichen Kulturen ist eine Heirat zwischen zwei verwandten Menschen nicht erwünscht und mit großer Abscheu bzw. Abneigung behaftet. In anderen Kulturen hingegen ist eine Heirat zwischen Verwandten, vorzugsweise zwischen Cousins/Cousinen ersten Grades, sogar erwünscht und allgemein wird eine Heirat außerhalb der Familie als riskant angesehen, welche die Gefahr birgt, ganze Familie zu zerreißen. Diese Kulturen finden sich vor allem in Regionen Nordafrikas, Zentral-, Süd- und Westasiens. 20 bis 50 % der Ehen die hier geschlossen werden sind von konsanguinem Charakter. Die höchsten Raten an konsanguinen Ehen finden sich in Süd-Indien und Pakistan. (Vgl. Bittles, 2001, p. 89)

In Pakistan werden mehr als die Hälfte der Ehen (56 %) zwischen Cousins/Cousinen ersten und zweiten Grades geschlossen. (National Institute of Population Studies (NIPS) [Pakistan] and ICF International, 2013, p. 65)

Die Nachkommen, die aus einer konsanguinen Heirat hervorgehen, weisen ein erhöhtes Risiko einer genetischen Erkrankung auf. Die Wahrscheinlichkeit eine Mutation aufgrund der Expression von autosomal rezessiven Genen vererbt zu bekommen, ist bei gemeinsamen Vorfahren höher. Je enger die biologische Verwandtschaft zwischen den Eltern ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für die Nachkommen identische Kopien rezessiver Gene zu erhalten, die sich als Nachteil für die betroffene Person erweisen kann. Beispielsweise wird für Cousins/Cousinen ersten Grades angenommen, dass sie sich 12,5 % (1/8) ihrer Gene teilen. Bei ihren Nachkommen liegen im Durchschnitt 6,25 % (1/16) aller Genloci homozygot bzw. autozygot vor. Darüber hinaus haben Nachkommen aus konsanguinen Ehen ein erhöhtes Risiko an multifaktoriellen Erkrankungen mit komplexen Erbgängen zu erkranken. Die Schätzung des Risikos für die Nachkommen an irgendeiner Störung bzw. an einer genetischen Erkrankung zu

leiden, setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: Einerseits aus dem Grundrisiko, welches für die gesamte Bevölkerung gleich hoch ist und andererseits aus dem zusätzlichen Risiko, welches aus der unmittelbaren Verwandtschaft der Eltern resultiert. Infolgedessen liegt das Risiko für die Nachkommen von Cousins/Cousinen ersten Grades an einer angeborenen Störung zu leiden etwa 1,7 bis 2,8 % über dem Durchschnitt der Allgemeinbevölkerung. (Vgl. Bennett et al., 2002, p. 100; 104–105)

1.4.2 Homozygotie-Mapping

Im Falle einer seltenen, rezessiv vererbten Erkrankung mit dem zusätzlichen Verdacht einer Konsanguinität, wird zuerst angenommen, dass die Ursache für die Erkrankung ein homozygot vorliegendes Gen ist, das sich innerhalb eines homozygoten Bereiches befindet und von beiden Eltern vererbt wurde. Dieser Umstand ermöglicht es, homozygote Varianten eines Gens im Genom des Patienten zu suchen. Diese großen homozygoten Bereiche können mithilfe von SNPs identifiziert werden.

Der Hauptunterschied zur Linkage-Analyse bzw. Kopplungsanalyse ist, dass Varianten eines Gens nur ausgewählt werden, wenn sie sich innerhalb eines homozygoten Bereiches befinden. Diese Methode reduziert die Menge an möglichen Varianten und steigert so die Wahrscheinlichkeit, ein krankheitsverursachendes Gen zu finden. (Vgl. Gilissen et al., 2012, p. 492)

1.4.3 SNP-Analyse

Wie bereits erwähnt macht man sich die Konsanguinität zunutze, um seltene genetische Erkrankungen zu identifizieren. Je höher der Grad der Konsanguinität,

desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, in diesen homozygoten Regionen seltene, krankheitsverursachende Gene zu finden. Der Grad der Konsanguinität wird maßgeblich vom homozygoten Anteil in einem Genom, oder auch „identical by decent“ genannt, bestimmt.

Um diese Bereiche im genetischen Material zu finden, macht man sich genomweites Homozygotie-Mapping zunutze. Die Verwendung von SNP-Arrays machte die Methode günstiger, unkomplizierter zum Durchführen, steigerte die Effizienz und erhöhte die Qualität der Patientenbetreuung bzw. Behandlung. (Vgl. Alkuraya, 2010, p. 236)

Bei der Anwendung dieser Methode kommt die Annahme zum Tragen, dass SNPs, die sich in der Umgebung der vermuteten Mutation befinden, während der Zellteilung nicht rekombiniert wurden, und somit auch homozygot sind. (Vgl. Hildebrandt et al., 2009, p. 1)

Ein SNP wird folgenderweise definiert: SNP ist eine Variation einer einzelnen Base, die mit einer Häufigkeit von mehr als 1 % im Genom einer bestimmten Population vorkommt. (Vgl. Brookes, 1999, p. 177)

1.4.4 Exom-Sequenzierung

Technologische Fortschritte in Next-Generation-Sequencing (NGS) eröffnen der medizinischen Wissenschaft neue Wege in der Erforschung von seltenen und häufigen Erkrankungen. Dieser Fortschritt ebnet den Weg für eine erfolgreiche Ursachenforschung zur Entstehung der Erkrankung. So können neue Möglichkeiten für eine Behandlung erschlossen werden.

Whole Genome Sequencing ermöglicht die parallele Sequenzierung einer Vielzahl von Nukleotiden bzw. Basen in nur einem Durchlauf und generiert auf diese Weise eine enorme Menge an Daten zu Genotypen und Phänotypen. Dennoch ist die Anwendung dieser Technologie zur Zeit noch zu kostspielig um sie in der Routinediagnostik für die Suche nach krankheitsverursachenden Genen bzw.

Mutationen einzusetzen. Darüber hinaus stellt die Interpretierung dieser Daten und die anschließende Umsetzung bzw. Anwendung für den klinischen Alltag eine Herausforderung dar.

Im Vergleich zu Whole Genome Sequencing ist die Exom-Sequenzierung eine kostengünstigere Alternative. Die Technologie basiert auf der Sequenzierung von proteincodierenden Bereichen des Genoms bzw. von Exons. Die proteincodierenden Bereiche reflektieren mit einer Größe von 30 MB nur 1 % des menschlichen Genoms. Dennoch enthalten diese 1 % des menschlichen Genoms 85 % aller krankheitsverursachender Gene bzw. Mutationen.

Des Weiteren kann die Technologie auch bei heterozygoten Varianten angewendet werden und setzt somit keine homozygoten Bereiche voraus, um neue und seltene Mutationen bzw. krankheitsverursachende Gene zu finden. Der Erfolg dieser Methode ist davon abhängig, dass die Mutation in diesem Bereich des Genoms lokalisiert ist und von der Fähigkeit, das krankheitsverursachende Gen neben den anderen eruierten Varianten des Exoms überhaupt zu erkennen. Bei der Vielzahl an erhaltener Varianten ist die Gefahr groß, dass man den Überblick verliert.

Deshalb ist es notwendig, Strategien zu entwickeln, die die Anzahl der kausalen Varianten auf ein überschaubares Maß reduziert. Eine mögliche Strategie wäre die Verwendung von Filtern, um krankheitsverursachende Varianten zu identifizieren. Zusätzliche Filter sind notwendig um falsch positive Ergebnisse zu beseitigen. (Vgl. Majewski et al., 2011, pp. 580–582)

Bei der Sequenzierung des Exoms werden normalerweise zwischen 20.000 und 50.000 Varianten identifiziert. Wie zuvor erwähnt, muss die Anzahl erhaltener Varianten nach bestimmten Qualitätskriterien gefiltert werden, um die Anzahl auf ein überschaubares Maß zu reduzieren. Um falsch positive Ergebnisse zu reduzieren, wird die Gesamtanzahl an unabhängigen Reads, die eine Variante aufweisen, und der Prozentsatz an Reads, die eine Variante zeigen, überprüft. Anschließend werden die Varianten, die sich in einer Region außerhalb des kodierenden Bereichs befinden, herausgefiltert. Ebenso werden synonyme Varianten unter der Annahme, dass diese einen geringen Einfluss auf das Protein haben und sich innerhalb eines kodierenden Bereichs befinden, ausgefiltert.

Mithilfe der zuvor erwähnten Methoden und mit dem Ausschluss bereits bekannter Varianten mittels Daten aus der Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) kann die Anzahl auf 150–500 potenziell pathogen wirkende, nichtsynonyme Varianten reduziert werden. (Vgl. Gilissen et al., 2012, p. 491) Abbildung 7 zeigt schematisch die unterschiedlichen Schritte, die angewendet werden um krankheitsverursachende Gene bzw. Mutationen und deren Loci zu identifizieren.

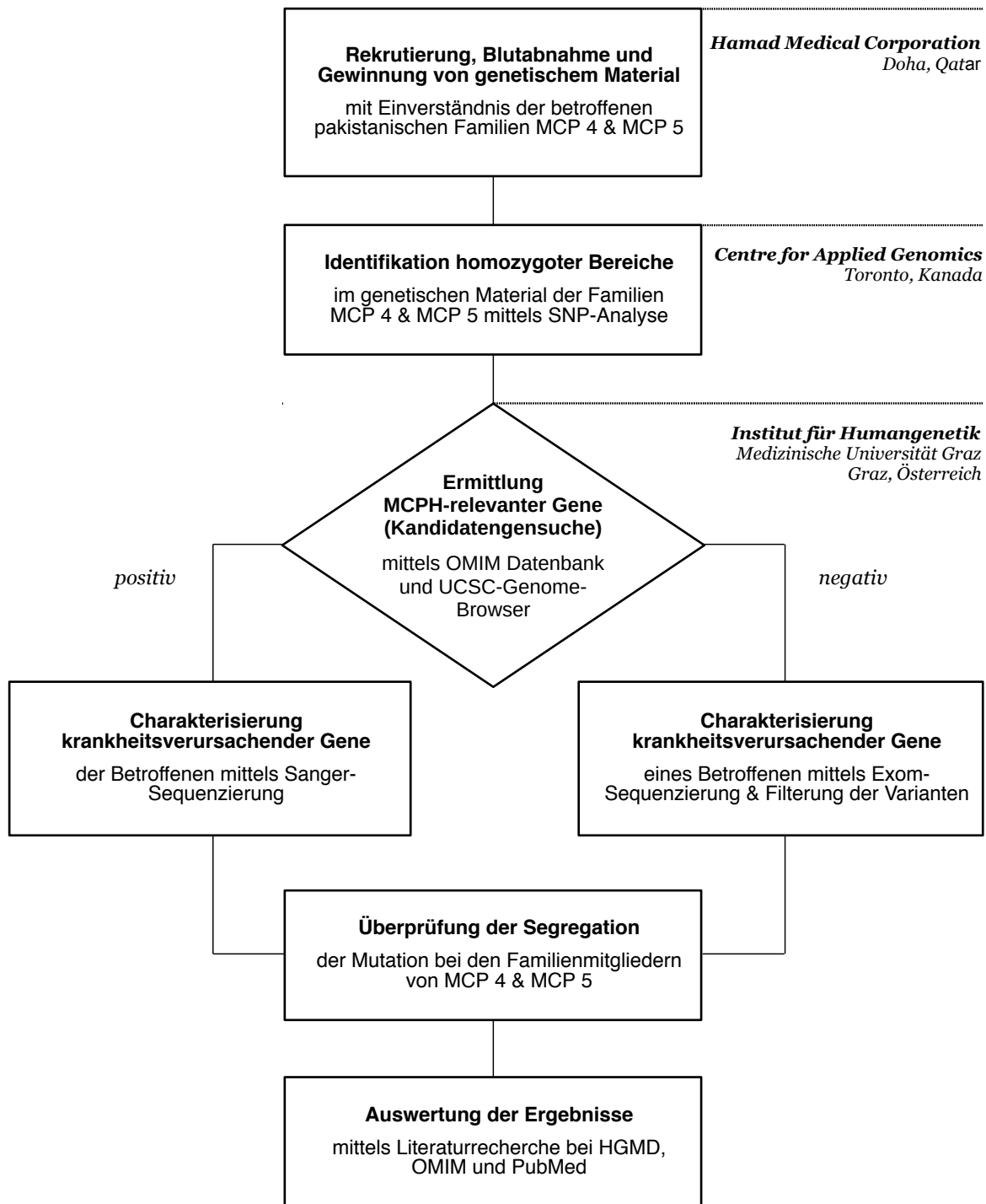


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Methoden zur Charakterisierung krankheitsverursachender Varianten bzw. Mutationen (Eigene Darstellung nach Projektdaten, ergänzt durch Rupp, 2012, p. 16 [Fig. 1.2])

2 Material und Methoden

2.1 Familien

Für diese Arbeit wurden zwei unterschiedliche konsanguine pakistanische Familien herangezogen, wo zumindest eine Person an Mikrozephalie erkrankt ist. Die Familien wurden mit der Hilfe von Muzammil Ahmad Khan von der *Hamad Medical Corporation* in Doha gefunden. Die Patientinnen und Patienten wurden über die weiteren Schritte aufgeklärt. Dabei unterschrieben die Mitglieder der Familie eine Einverständniserklärung, in welcher sie der weiteren Verwendung der klinischen Daten und der Familien-Stammbäume zustimmten. Mittels Blutabnahmen wurden Proben von betroffenen und nicht-betroffenen Individuen einer Familie gewonnen, anschließend aufgereinigt und an das *Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz* übermittelt.

Für die Durchführung aller humangenetischen Tätigkeiten am *Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz* wurde seitens der *Quaid-i-Azam University (Islamabad ethical board)* im gemeinsamen Projekt ein Ethikvotum mit der Bezeichnung „Quaid-I-Azam U IRB#1Biomedical; IORG0002926; IRB00003532“ kommuniziert. Zudem wurde seitens der *Gomal University (Gomal Centre of Biochemistry and Biotechnology)* ein Ethikvotum mit der Bezeichnung „GU-GCBB-IRB#01, Biomedical/Neurologic“ weitergegeben.

2.1.1 MCP 4 (*ASPM*)

Die Familie MCP 4 lebt im Dorf Fateh im Bezirk Dera Ismail Khan (auch D.I. Khan) dem südlichsten der 26 Bezirke der Provinz Khyber Pakhtunkhwa in Pakistan und wurde von dort für die Studie rekrutiert. Das traditionelle System des Dorfes zieht bevorzugt Hochzeiten zwischen Mitgliedern eines Klans vor (konsanguine Ehe). Dieses System der Heirat unter Familienmitgliedern birgt das erhöhte Risiko, an einer genetisch bedingten Krankheit zu leiden. Der Stammbaum der Familie besteht aus fünf Generationen mit vier betroffenen männlichen Individuen, drei in der fünften Generation und ein Individuum in der vierten Generation. Die Analyse des Stammbaumes ermittelte als Ursache für die Erkrankung, eine autosomal rezessive Form der Vererbung. Alle betroffenen Individuen leiden an einer primären Mikrozephalie, die anhand der Messung des okzipital-frontalen Umfanges (OFC) diagnostiziert wurde. Bei der Ätiologie der Erkrankung konnten Umweltfaktoren, Infektionen und syndromale Merkmale bzw. Besonderheiten ausgeschlossen werden. Mutter und Vater der betroffenen Individuen zeigten keine Symptome. Es wurde Blut von den betroffenen Patienten, deren Eltern und von den Nicht-Betroffenen Geschwistern abgenommen. Bei der näheren Untersuchung der Patienten wurden keine weiteren physiologischen Auffälligkeiten gefunden und die Erkrankung selbst war nicht progressiv. Somit kann die Erkrankung als eine nicht-syndromale Form der primären Mikrozephalie charakterisiert werden. Die erkrankten Personen hatten als Merkmal eine abfallende Stirn und einen vorstehenden bzw. ausladenden Mund. Der Intelligenzquotient wurde in einem Bereich geschätzt, der einer schweren mentalen Retardierung (MR) entspricht. Weitere klinische Merkmale sind aus der nachfolgenden Tabelle 2 zu entnehmen.

Klinische Befunde	Patient MCP 4.3	Patient MCP 4.2
Geschlecht	Männlich	Männlich
Alter	25	22
Kopfumfang (cm)	47	45,2
Verhalten	Aggressiv	Aggressiv
Epilepsie	Nein	Nein
Wachstum	Normal	Normal
Wiedererkennung von Eltern und Zuhause	Nein	Ja
Lernschwäche	Ja	Ja
Kardivaskuläre, pulmonale oder abdominale Auffälligkeiten	Normal	Normal
Selbstverletzung	Nein	Nein

Tabelle 2: Biometrische und klinische Merkmale, MCP 4.3 und MCP 4.2
(Selbst erstellt)

Abbildung 8 zeigt alle Individuen der Familie. Während die von der Erkrankung betroffenen Personen mit schwarzen Symbolen kenntlich gemacht wurden, zeigen die weißen Symbole jene Personen, die nicht von Mikrozephalie betroffen sind. Die Rechtecke symbolisieren männliche und die Kreise verkörpern weibliche Individuen. Eine Verwandtschaft zwischen den Elternteilen wird mit zwei horizontalen Linien dargestellt.

Material und Methoden

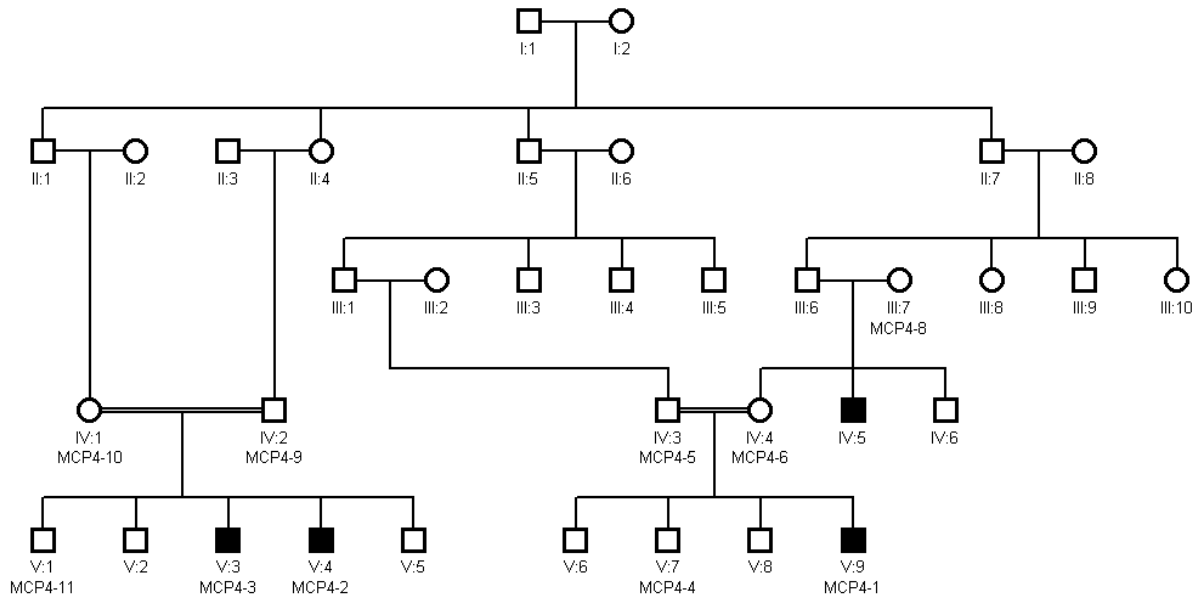


Abbildung 8: Stammbaum, MCP 4

(Eigene Darstellung auf Basis der Daten von Muzammil Ahmad Khan)

Wie in Abbildung 8 ersichtlich, ist in der vierten Generation eine Person betroffen und in der fünften Generation drei Individuen. Es ist davon auszugehen, dass das gehäufte Auftreten der Erkrankung, besonders in der fünften Generation, auf die Verwandtschaft der Eltern (IV. Generation) zurückzuführen ist.



Abbildung 9: Beispielhafte Ausprägungen der Erkrankung, Individuum MCP 4

(Bereitstellung der Bilder durch Muzammil Ahmad Khan)

2.1.2 MCP 5 (*CDK6*)

Wie aus dem Stammbaum dieser Familie ersichtlich sind drei Individuen aus der vierten Generation von Mikrozephalie betroffen. Der Stammbaum wird in Abbildung 10 näher beschrieben.

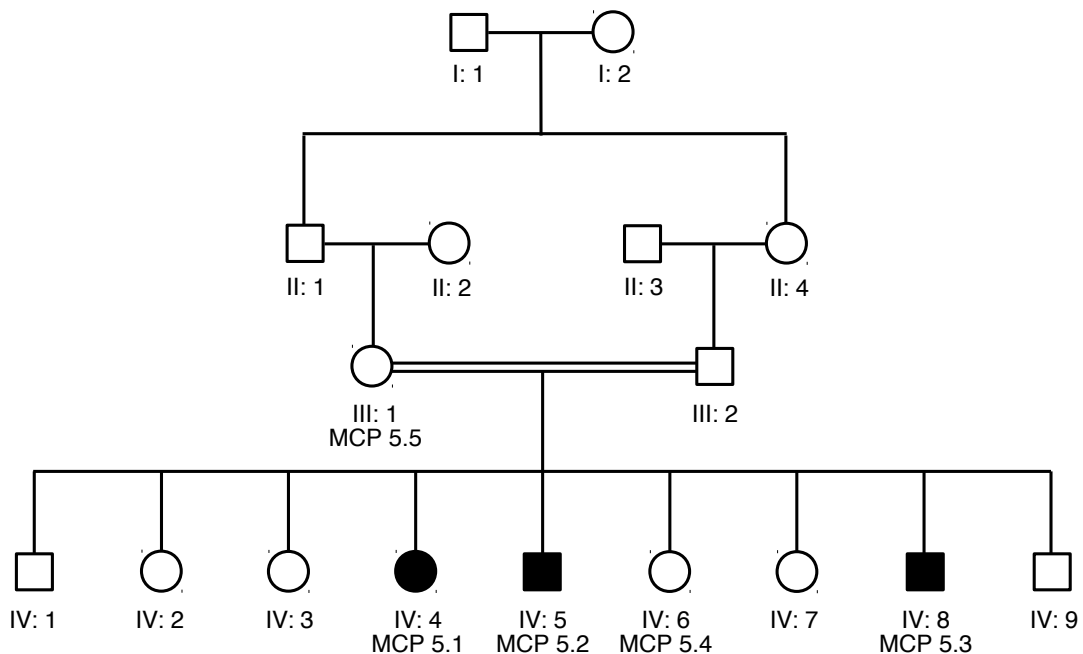


Abbildung 10: Stammbaum, MCP 5

(Selbst erstellt auf Basis der Daten von Muzammil Ahmad Khan)

Nach sorgfältiger klinischer Untersuchung konnte festgestellt werden, dass bei der Ätiologie der Erkrankung weder Umweltfaktoren bzw. Infektionen noch Syndromale Merkmale bzw. Besonderheiten eine Rolle spielten. Bei der Auswertung des okzipital-frontalen Umfanges (OFC), zeigten sich Mikrozephalie Merkmale bei allen betroffenen Individuen. Betroffene Personen präsentieren sich mit einer abfallenden Stirn und einem vorstehenden beziehungsweise ausladenden Mund. Das Verhalten der betroffenen Personen war im Allgemeinen aggressiv und

der IQ war in einem Bereich von 20–25 zu 35–40 was einer schweren mentalen Retardierung entspricht. Darüber hinaus besteht auch eine Lernschwäche, die sich unter anderem mit einer verzögerten sprachlichen Entwicklung präsentiert. Zum besseren Überblick wurden weitere klinische Merkmale in Tabelle 3 zusammengefasst.

Klinische Befunde	Patient MCP 5.4	Patient MCP 5.5	Patient MCP 5.8
Geschlecht	Weiblich	Männlich	Männlich
Alter	15	13	7
Kopfumfang (cm)	35.8	33.8	31.0
Verhalten	Aggressiv	Aggressiv	Aggressiv
Epilepsie	Nein	Nein	Nein
Wachstum	Normal	Normal	Normal
Lernschwäche	Vorhanden	Vorhanden	Vorhanden
Kardiovaskuläre, pulmonale oder abdominale Auffälligkeiten	Normal	Normal	Normal
Wiedererkennung von Eltern und Zuhause	Nein	Ja	Ja
Selbstverletzung	Nein	Nein	Nein

Tabelle 3: Biometrische und klinische Merkmale, MCP 5
(Selbst erstellt)

In Abbildung 10 werden alle von der Erkrankung betroffenen Individuen einer Familie mit schwarzen Symbolen kenntlich gemacht, Personen die nicht von der Erkrankung betroffen, werden mit weißen Symbolen dargestellt. Die Rechtecke symbolisieren männliche Personen und die Kreise verkörpern weibliche Individuen. Eine Verwandtschaft zwischen den Elternteilen wird mit zwei horizontalen Linien dargestellt.

Bei der Betrachtung des Stammbaumes wird augenscheinlich, dass das erstmalige Auftreten von Mikrozephalie bei den drei Individuen in der IV. Generation mit der Verwandtschaft der Eltern (III. Generation) korreliert.



Abbildung 11: Beispielhafte Ausprägung der Erkrankung, Individuum MCP 5.2
(Bereitstellung der Bilder durch Muzammil Ahmad Khan)



Abbildung 12: Beispielhafte Ausprägung der Erkrankung, Individuum MCP 5.3
(Bereitstellung der Bilder durch Muzammil Ahmad Khan)

2.2 Formalgenetik

Wie aus dem Stammbaum der jeweiligen Familien ersichtlich, ist von der Erkrankung nicht jede Generation bzw. jedes Individuum einer Familie betroffen. Somit können Erbgänge die dominant verlaufen, ausgeschlossen werden. Auch Y-gonosomale und X-gonosomale Erbgänge scheinen bei der Entstehung der Erkrankung keine Rolle zu spielen, da in den unterschiedlichen Stammbäumen sowohl männliche als auch weibliche Individuen betroffen sind. Bei der näheren Betrachtung der Stammbäume wird ersichtlich, dass es sich um einen autosomal rezessiven Erbgang handeln muss.

Andere Individuen in den betroffenen Familien haben keine Auffälligkeiten, da sie entweder nicht betroffen sind bzw. da sie Träger einer Wildtyp-Ausprägung sind oder die Mutation heterozygot vorliegt. Demnach sind sie zwar gesund, können aber die Mutation auf ihre Nachkommen übertragen. Wenn zufällig beide Eltern des Kindes Überträger einer Mutation sind, so besteht eine Wahrscheinlichkeit von 50 %, dass die Nachkommen für die Erkrankung heterozygot aber gesund sind, eine Wahrscheinlichkeit von 25 %, dass sie homozygot für die Wildtyp-Ausprägung sind und eine weitere Wahrscheinlichkeit von 25 % das ihr Erbgut die homozygote Mutation aufweist und es so zur Ausprägung der Krankheitsmerkmale kommt (Mikrozephalie).

2.3 SNP-Analyse

Die betroffenen Individuen aus den unterschiedlichen Familien (MCP 4 und MCP 5) wurden am *Centre for Applied Genomics* in Toronto, Kanada unter Zuhilfenahme des *Infinium HumanCoreExome-24 BeadChips* von *Illumina* genotypisiert. Die Typisierung wurde nach den Richtlinien des Protokolls „Illumina Infinium HTS Assay Protocol Guide (15045738 A)“ (Siehe Illumina, 2013) vorgenommen. Anschließend wurden die aus diesem Prozess gewonnenen Rohdaten an das *Institut für Humangenetik* in Graz übermittelt. Die Analyse der Daten erfolgte mithilfe der *Illumina GenomeStudio Software 2011.1* mit dem *Genotyping Module Version 1.8* (zum downloaden unter http://support.illumina.com/array/array_software/genomestudio.html)

Für eine vom verwendeten Array und der verwendeten Auswertungssoftware unabhängige Darstellung der homozygoten Bereiche wurden zwei SNPs ausfindig gemacht. Zuerst wurde das erste heterozygote proximale SNP ermittelt. Nachfolgend wurde das erste heterozygote distale SNP, welches an die Loss-of-Heterozygosity-Region (LOH) grenzt, ausfindig gemacht.

2.4 Sanger Sequenzierung

Im nächsten Schritt wurden unter dem Einsatz der Sanger-Sequenzierung, die zuvor eruierten Kandidatengene sequenziert, um potentielle Gene beziehungsweise Mutationen für die Erkrankung zu finden. Die für die folgende Sequenzierung erforderlichen Exon-Primer wurden einerseits mit dem Exon Primer Tool (Siehe Strom, n.d.) (*Institute of Human Genetics, Helmholtz Center Munich*) (<http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>) und andererseits mit dem UCSC- Genome Browser Tool „Primer3“ (Untergasser et al., 2012) erstellt. Anschließend wurden die benötigten Primer von der schweizerischen Firma *Microsynth AG* geliefert. Um ein zufriedenstellendes Ergebnis zu liefern, wurden die dafür benötigten Primer mit LiChrosolv water der Firma *Merck* auf eine Konzentration von 10µM verdünnt.

Für die PCR zur Vervielfältigung werden folgende Komponenten benötigt:

- 0,5 µl DNA (~50ng/µl)
- 0,5 µl reverse Primer (10µM)
- 0,5 µl forward Primer (10µM)
- 4,5 µl RNase free PCR grade H₂O (Qiagen)
- 6,0 µl HotStarTaq® Master Mix (Qiagen)

$\Sigma = 12 \mu\text{l}$

Im nächsten Schritt wurden am Thermocycler die richtige Temperatur und die dazugehörigen Zyklen ausgewählt. Siehe Tabelle 4.

Temperatur	Dauer	Anmerkungen
94°C	15 Minuten	
95°C 57°C 72°C	25 Sekunden 30 Sekunden 60 Sekunden	34 Zyklen
6°C	∞	

Tabelle 4: Zyklen der Amplifikation mit ihrer Dauer und Temperatur
(Selbst erstellt)

Darauffolgend wurden die erhaltenen PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese auf mögliche Fehler untersucht, die während der Amplifikation auftreten könnten. Für die Herstellung des Agarosegels wurden 1g LE-Agarose (Biozyme) in 100 ml 1×TAE-Buffer aufgelöst und 10µl GelRed™ (Biotium) hinzugefügt.

Für die im nächsten Schritt stattfindende Sanger-Sequenzierung wurde folgender Ansatz hergestellt:

- 0,5 µl PCR-Produkt (~25-50ng/µl)
- 0,3 µl forward Primer (10µM)
- 0,5 µl BigDye® Terminator v3.1 (*Life Technologies*)
- 1,4 µl 5X Sequencing Buffer (*Life Technologies*)
- 7,3 µl LiChrosolv water (*Firma Merck*)

Σ= 10µl

Die weitere Bearbeitung am Thermocycler folgte unter diesen Bedingungen (Temperaturprofil und Zyklen, Tabelle 5):

Temperatur	Dauer	Anmerkungen
95°C 50°C 60°C	30 Sekunden 15 Sekunden 4 Minuten	24 Zyklen
6°C	∞	

Tabelle 5: Dauer der Zyklen für die Sequenzierung der Exons und ihr Temperaturprofil
(Selbst erstellt)

Im weiteren Vorgehen wurden die Ansätze mit RNase free H₂O (Quiagen) 1 :1 verdünnt und dann mithilfe von Sephadex™ G-50 Superfine (GE Healthcare Life Sciences) aufgereinigt, um damit die Farbrückstände zu extrahieren. Sephadex™ G-50 wurde in CentriSep™ Säulchen gefüllt. Um das überschüssige Wasser zu entfernen, wurde es für 120 Sekunden bei 750 rcf zentrifugiert. Die vom Wasser befreiten Säulchen wurden nun auf neue Sammelröhrchen gebracht. Die zuvor mit RNase free H₂O (Quiagen) verdünnten Ansätze aus der Sequenzierreaktion werden per Pipette mittig auf die Säulchen aufgebracht und dann für 120 Sekunden bei 750 rcf zentrifugiert. Im letzten Schritt werden die von Farbrückständen befreiten PCR-Produkte per Pipetten von den Sammelröhrchen auf eine 96well-Plate übertragen. Die Auswertung erfolgte mit dem ABI PRISM™ 3130×/ Genetic Analyser und als Auftrennungsmatrix kam POP-7™ Polymer (Life Technologies) zum Einsatz.

2.5 Validation der Mutation

Die infrage kommenden Kandidatengene werden auf mögliche Mutationen untersucht. Die dabei eruierten Sequenzen werden unter der Zuhilfenahme des Blat Tools (Kent, 2002) mit dem UCSC Genome Browser angezeigtem Referenzgenom (Build GRCh/hg19) in Relation gestellt. Zuerst wurde ausfindig gemacht, ob es sich bei den gefundenen Mutationen um bereits bekannte SNPs handelt. Um dies zu bestätigen, wurde mittels den Datenbanken OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man (Hamosh et al., 2005), HGMD® - Human Gene Mutation Database (Stenson et al., 2003) und mittels PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) über Einträge von dbSNPs und mögliche Veröffentlichungen recherchiert. Mittels Sanger-Sequenzierung wurden die von der Krankheit betroffen und nicht-betroffenen Familienmitglieder hinsichtlich dieser Mutation untersucht. Positive Ergebnisse dienen der Bestätigung der Segregation innerhalb einer Familie.

3 Ergebnisse

3.1 MCP 4

Der Stammbaum der Familie besteht aus fünf Generationen mit vier betroffenen männlichen Individuen, drei in der fünften Generation und ein Individuum in der vierten Generation (Abbildung 8). Die Eltern zeigten keine Symptome bzw. mentale Auffälligkeiten. Bei den betroffenen Personen dieser Familie handelt es sich um eine nicht-syndromale Form der Mikrozephalie mit aggressiven Verhalten, ausgeprägter Lernschwäche und Schwierigkeiten bei der Wiedererkennung von vertrauten Objekten und Personen.

3.1.1 Kandidatengenfindung, MCP 4

Aufgrund des Phänotyps und aufgrund der Tatsache, dass ein homozygoter Bereich am Chromosom 1 vorhanden war und nach darauffolgender Literaturrecherche, entschieden wir uns gleich nach einer Mutation im Gen für *ASPM* zu suchen. Weiters zeigte die restliche SNP-Analyse keine weiteren signifikanten homozygoten Bereiche im restlichen Genom, die mit Mikrozephalie in Zusammenhang stehen. Laut Literatur ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei einem großen homozygoten Bereich am Chromosom 1 um eine Mutation von *ASPM* handelt relativ groß. Zudem sind Mutationen im Gen für *ASPM* in der Literatur ausführlich beschrieben und sehr häufig für die Ausprägung von Mikrozephalie verantwortlich.

In der Abbildung 13 werden die betroffenen Individuen MCP 4.1, MCP 4.2 und MCP 4.3 dargestellt. Die Daten für SNP-Analyse wurden mithilfe von Infinium HumanCoreExome-24 BeadChips von Illumina in Toronto, Kanada ausgewertet. Die gewonnenen Daten der betroffenen Personen wurden anschließend mittels Illumina GenomeStudio Software 2011.1 mit dem Genotyping Module Version 1.8 analysiert.

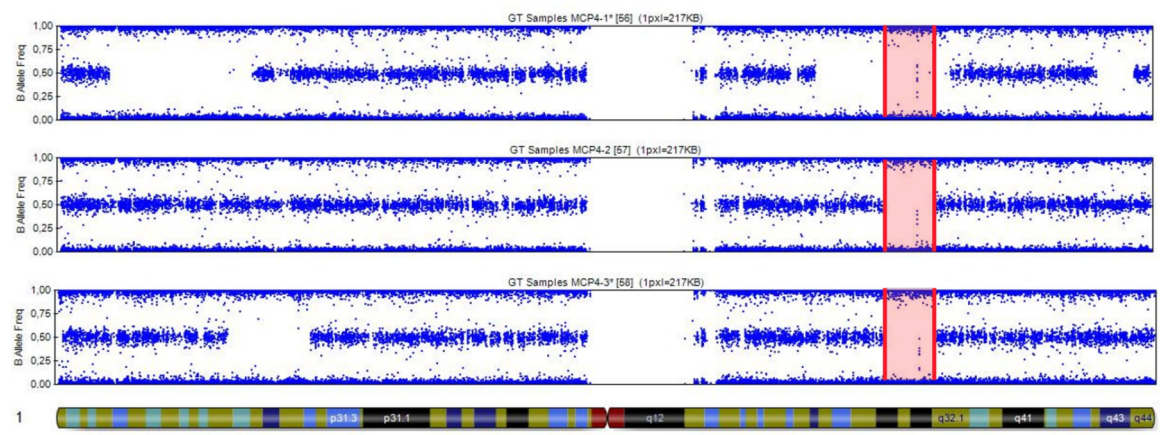


Abbildung 13: SNP-Analyse, MCP 4.1, MCP 4.2, MCP 4.3

(Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Centre for Applied Genomics)

Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse der SNP-Analyse für die betroffenen Individuen MCP 4.1, MCP 4.2 und MCP 4.3 in Abbildung 13, so zeigen die roten Hervorhebungen die homozygoten Bereiche am Chromosom 1 bei den jeweiligen Familienmitgliedern. Der gemeinsame Bereich liegt am Chromosom 1 in der Region q31.1-q32.1. und weist eine Größe von 11,846,731 bp auf (Chr 1: 187,862,656-199,709,386).

Ergebnisse

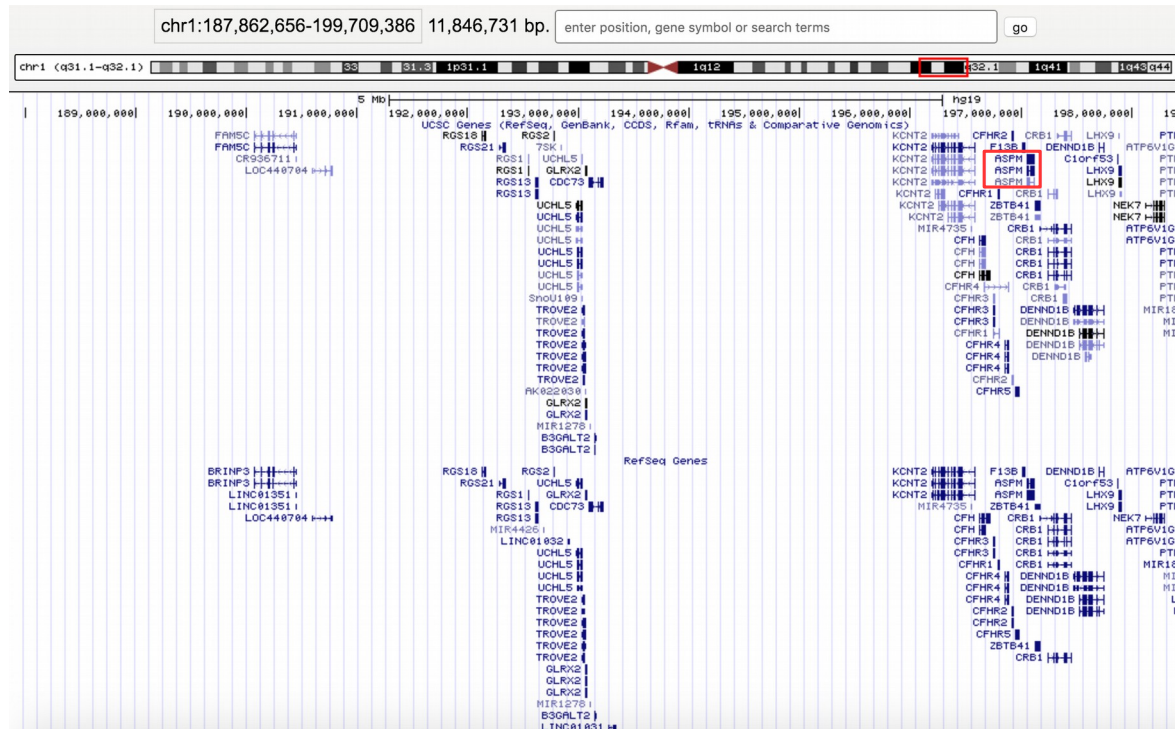


Abbildung 14: USCS RefSeq Gene, MCP 4
(Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, USCS Browser)

In Abbildung 14: USCS RefSeq Gene, MCP 4 wird der homozygote Bereich am Chromosom 1 dargestellt. Das mit Mikrozephalie assoziierte Kandidatengen *ASPM* wurde mit einer roten Markierung kenntlich gemacht.

3.1.2 Sanger-Sequenzierung, MCP 4

Anschließend erfolgte die Sequenzierung aller Exons des Gens *ASPM* bei den betroffenen Individuen der Familie (MCP 4.1, MCP 4.2 und MCP 4.3). Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte eine Mutation im Exon 24 (c.9730C>T), wo es zu einem Aminosäure-Austausch kommt (siehe Abbildung 15).

Bei der betroffenen Person MCP 4.2 kam es zu einem Basen-Austausch (chr1: 197059425G>A, NM_018136). Durch das Auftreten dieser Mutation kommt es zum Austausch R3244* wobei Arginin durch ein Stopp-Codon ersetzt wird. Es ist davon auszugehen, dass dieser Umstand zu einer fehlerhaften Funktion des Proteins führt.

In weiterer Folge wird das Codon von einem Aminosäure-codierenden zu einem Stopp-Codon verändert. Im Anschluss wurde diese Mutation im Exon 24 bei allen Familienmitgliedern gesucht. Betroffene Personen weisen die Mutation homozygot auf, Personen die nicht betroffen sind können entweder heterozygot sein oder eine Wildtyp-Ausprägung haben. Alle untersuchten Familienmitglieder werden in Tabelle 6 hinsichtlich ihres Mutations-Status dargestellt.

Ergebnisse

	Betroffen/ nicht betroffen	Status der Mutation
MCP4.1	Betroffen	n.A.
MCP4.2	Betroffen	homozygot
MCP4.3	Betroffen	n.A.
MCP4.4	Nicht betroffen	heterozygot
MCP4.5	Nicht betroffen	heterozygot
MCP4.6	Nicht betroffen	heterozygot
MCP4.7	Nicht betroffen	heterozygot
MCP4.8	Nicht betroffen	wildtyp
MCP4.9	Nicht betroffen	n.A.
MCP4.10	Nicht betroffen	n.A.
MCP4.11	Nicht betroffen	wildtyp

Tabelle 6: Ergebnis der Sequenzierung (Exon 24)
(Selbst erstellt)

Tabelle 6 zeigt das Ergebnis der Sequenzierung. Die gefundene Mutation im Exon 24 des *ASPM*-Gens wurde bei Mitgliedern der Familie überprüft.

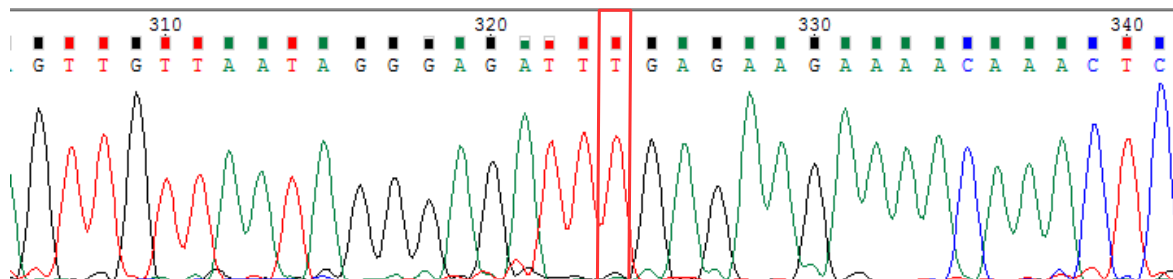


Abbildung 15: DNA-Sequenz von MCP 4.2 (Mutation homozygot)
(Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Peak Scanner Software)

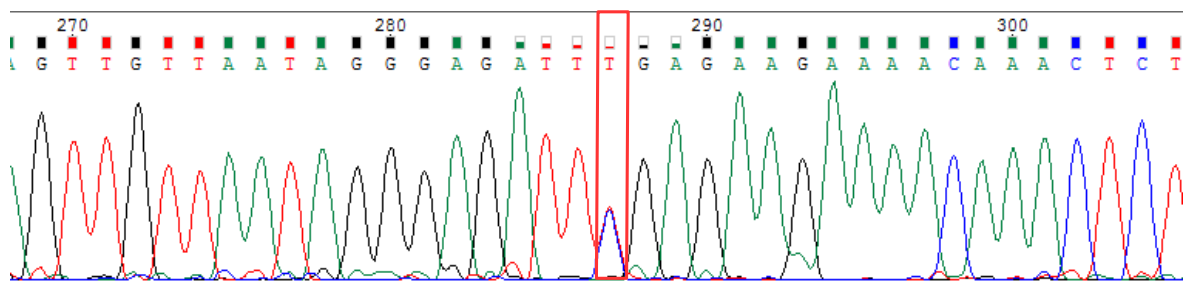


Abbildung 16: DNA-Sequenz von MCP 4.4 (Mutation heterozygot)
(Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Peak Scanner Software)

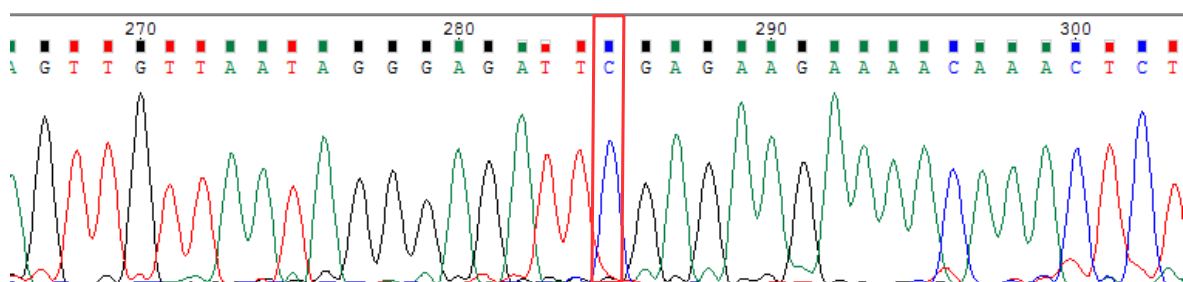


Abbildung 17: DNA-Sequenz von MCP 4.8, Wildtyp-Ausprägung (Wt)
(Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Peak Scanner Software)

Abbildung 15, Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen die DNA-Sequenz des betroffenen Gens *ASPM*, Exon 24 mittels Peak Scanner Software bei verschiedenen Mitgliedern der Familie MCP 4. Die Darstellung erfolgt anhand eines homozygot betroffenen Individuums, eines Nicht-Betroffenen Individuums, wo die Mutation heterozygot vorliegt und einer Person, die Träger der Wildtyp-Form ist.

Am Beispiel von MCP 4.4, eines Nicht-Betroffenen Individuums, liegt die Mutation heterozygot vor. Keine Mutation kann man bei MCP 4.8 nachgewiesen werden, da eine Wildtyp-Form vorliegt. Die im Zuge dieser Arbeit identifizierte Mutation ist schon bekannt und wird in der Literatur beschrieben. (Siehe Gul et al., 2007), (Siehe Tan et al., 2014), (Siehe Sajid Hussain et al., 2013)

3.2 MCP 5

Der Stammbaum der Familie MCP 5 besteht aus vier Generationen (Abbildung 10). In der IV. Generation kommt es zum erstmaligen Auftreten von Mikrozephalie bei den drei Individuen MCP 5.1, MCP 5.2 und MCP 5.3. Die Eltern der betroffenen Personen zeigen keine Symptome. Die einzige Auffälligkeit ist die Konsanguinität der Eltern, die sehr wahrscheinlich das Auftreten von Symptomen bei den Kindern begünstigt. Die betroffenen Familienmitglieder weisen ein aggressives Verhalten und eine mentale Retardierung auf. Zudem besteht eine ausgeprägte Lernschwäche mit Schwierigkeiten bei der Wiedererkennung von vertrauten Objekten und Personen. Es handelt sich um eine nicht-syndromale Form der Mikrozephalie.

3.2.1 Kandidatengenfindung, MCP 5

Bei der Analyse der SNP-Daten war eine homozygote Region am Chromosom 7 erkennbar. Nach einer anschließenden Literaturrecherche, wurden wir darauf aufmerksam, dass eventuell das erst kürzlich mit Mikrozephalie assoziierte Gen *CDK6* am Chromosom 7 für den Phänotyp bei den betroffenen Familienmitgliedern verantwortlich sein könnte. Mithilfe einer Sanger-Sequenzierung konnte eine Mutation ausfindig gemacht werden. Daraufhin erfolgte eine Literaturrecherche, um herauszufinden ob es sich dabei um eine bereits beschriebene oder neue Mutation handelt. Es zeigte sich, dass bereits Hussain et al. die gefundene Mutation identifiziert hat. (Vgl. Hussain et al., 2013) Aufgrund der überlappenden LOH-Bereiche und der identen Mutation in *CDK6* in beiden Familien entschieden wir uns für eine vergleichende Haplotyp-Analyse.

Diese ergab einen identen Haplotyp von 16 konsekutive SNPs, was auf einen gemeinsamen Vorfahren schließen lässt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass ein Founder-Effect zu tragen kommt. Somit könnten wir ein weiteres Mal eine mögliche Mutation im *CDK6*-Gen nachweisen.

In Abbildung 18 wird der homozygote Bereich am Chromosom 7 bei dem betroffenen Individuum MCP 5.1 dargestellt. Die aus der SNP-Analyse gewonnenen Daten wurden mithilfe von *Infinium HumanCoreExome-24* BeadChips von *Illumina* in Toronto, Kanada ausgewertet. Die eruierten Daten der betroffenen Personen wurden anschließend mittels *Illumina GenomeStudio Software 2011.1* mit dem *Genotyping Module Version 1.8* analysiert.

Betrachtet man das Ergebnis der SNP-Analyse des betroffenen Individuums MCP 5.1 in Abbildung 18, so markiert die rote Hervorhebung die homozygote Region am Chromosom 7.

Der gemeinsame Bereich liegt am Chromosom 7 in der Region q21.11-q21.3. und weist eine Größe von 15,707,368 bp auf (Chr 7: 77,982,085-93,689,452).

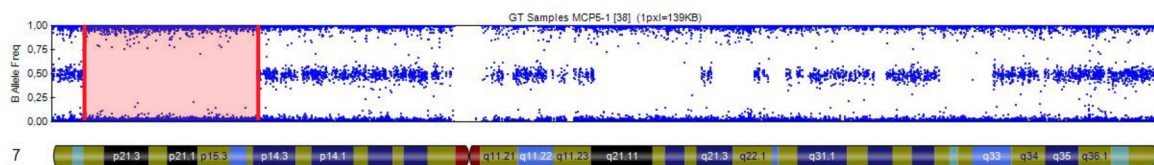


Abbildung 18: SNP-Analyse, MCP 5.1

(Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Centre for Applied Genomics)

Ergebnisse

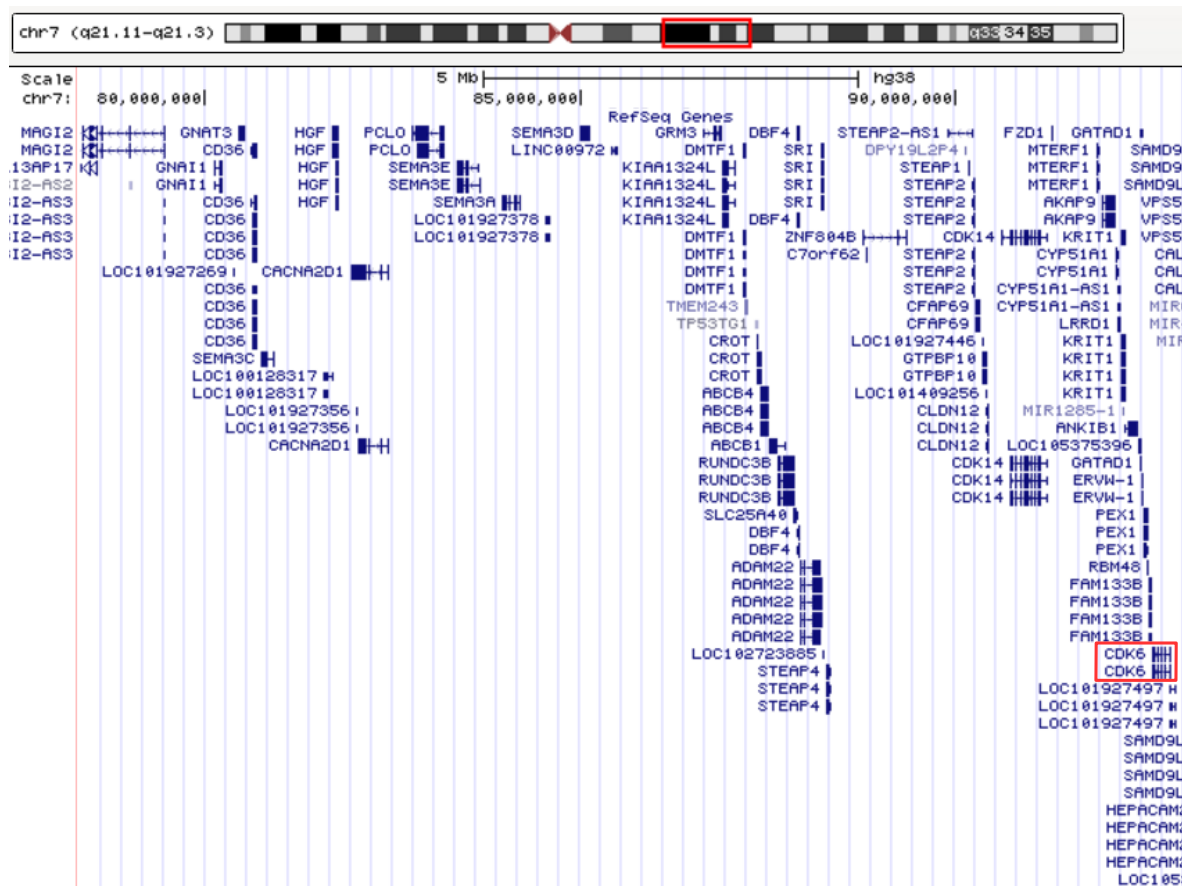


Abbildung 19: USCS RefSeq Gene, MCP 5
(Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, USCS Browser)

In Abbildung 19: USCS RefSeq Gene, MCP 5 werden alle Gene, die sich in der homozygoten Region am Chromosom 7 befinden dargestellt. Das erst kürzlich mit Mikrozephalie assoziierte Kandidatengen *CDK6* wird mit einer roten Markierung gekennzeichnet.

3.2.2 Sanger-Sequenzierung, MCP 5

Daraufhin erfolgte die Sequenzierung der Exons des Gens *CDK6* bei allen betroffenen Personen (MCP 5.1, MCP 5.2 und MCP 5.3). Individuen, die von der

Erkrankung betroffen sind weisen eine homozygote Mutation auf, Personen die nicht betroffen sind zeigen entweder eine heterozygote Mutation oder sie besitzen die Wildtyp-Ausprägung. In Tabelle 7 werden alle untersuchten Familienmitglieder hinsichtlich ihres Mutations-Status dargestellt.

	Betroffen/ nicht betroffen	Status der Mutation
MCP5.1	Betroffen	Homozygot
MCP5.2	Betroffen	Homozygot
MCP5.3	Betroffen	Homozygot
MCP5.4	Nicht Betroffen	Heterozygot
MCP5.5	Nicht Betroffen	Heterozygot

Tabelle 7: Ergebnis der Sequenzierung (MCP 5)
(Selbst erstellt)

Tabelle 7 zeigt die Segregation der Mutation im Exon 5 des Gens für *CDK6*.
Nachfolgend wurde die Segregation der Mutation bei den Familienmitgliedern überprüft.

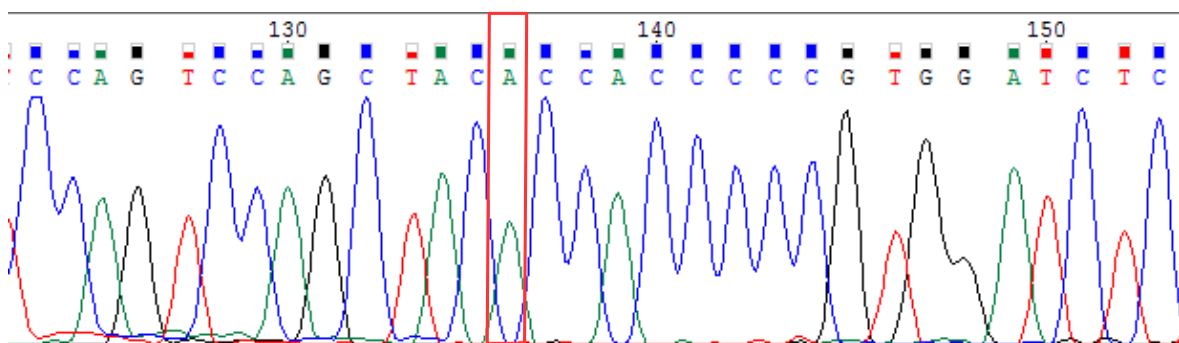


Abbildung 20: DNA-Sequenz von MCP 5.1 (homozygot)
(Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Peak Scanner Software)

Ergebnisse

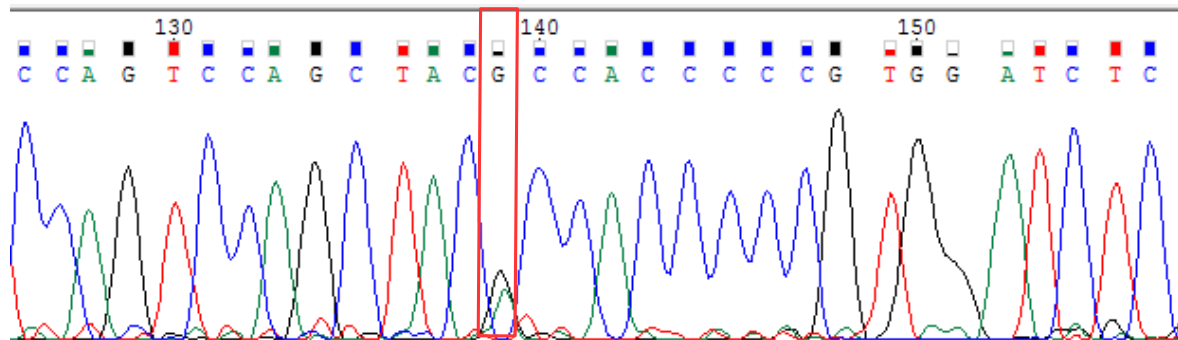


Abbildung 21: DNA-Sequenz von MCP 5.4 (heterozygot)
(Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Peak Scanner Software)

In Abbildung 20 und Abbildung 21 wird die DNA-Sequenz von *CDK6*, mittels Peak Scanner Software, bei zwei Individuen MCP 5.1 und MCP 5.4 dargestellt. Die Darstellung der Sequenz erfolgt anhand einer homozygot betroffenen Person (Abbildung 20) und eines Individuums wo die Mutation heterozygot vorliegt (Abbildung 21). Bei dem betroffenen Individuum kam es zu einem Basen-Austausch: c.589G>A (NM_001145306). Es kommt zu einem Aminosäure-Austausch Ala197Thr wobei die Aminosäure Alanin durch Threonin ersetzt wird. Dieser Umstand führt zu einer möglichen fehlerhaften Ausprägung bzw. Funktion des Proteins. Hussain und Mitarbeiter identifizierten als erster diese neue Mutation im Gen für *CDK6*. (Vgl. Hussain et al., 2013, p. 5200)

Zur zusätzlichen Überprüfung, um mögliche weitere Mutationen in den mit MCPH assoziierten Genen ausfindig zu machen, wurde eine Exom-Sequenzierung bei einem betroffenen Individuum durchgeführt. Die Analyse ergab jeweils eine Mutation in den Genen *ASPM* und *STIL*, wobei diese heterozygot vorlagen. Bei *ASPM* befindet sich die Mutation in einem Intron und beim *STIL*-Gen handelt es sich um ein SNP. Somit dürften die identifizierten Mutationen keine Auswirkung auf den Phänotyp haben.

4 Diskussion

Am Ende dieser Arbeit gilt allgemein festzustellen, dass noch nicht alle Pathomechanismen, die zur letztendlichen Entstehung und Ausbildung einer Mikrozephalie beitragen können, ausreichend untersucht und angemessen erforscht wurden. Unter diesen Gesichtspunkten bildet die Summe aller Erkenntnisse dieser Arbeit dennoch eine grobe Zusammenfassung der wissenschaftlich wahrscheinlichsten Erklärungsmodelle in Hinblick auf das Auftreten von Mikrozephalie. Während sich diese Diplomarbeit allen voran mit ausgewählten und für die Zielsetzung dieser Arbeit relevanten Genen auseinandersetzt, liegt es auf der Hand, dass für ein umfassendes Verständnis der Auswirkungen und Mechanismen bei der Krankheitsentstehung von Mikrozephalie alle relevanten Gene vollständig erforscht werden sollten. Würde man die Krankheitsentstehung völlig verstehen, wäre die Physiologie dahinter geklärt. Lediglich auf diese Weise wäre es zukünftig möglich, wirkungsvollere und spezifischere Behandlungsmethoden zu entwickeln. Die Größe des menschlichen Gehirns wird weitgehend von der Proliferationsrate und Apoptose während der Neurogenese bestimmt. Neuronale Stammzellen gehen aus symmetrischen und asymmetrischen Zellteilungen hervor. Eine Störung oder Beeinträchtigung dieser Teilung der neuronalen Stammzellen und/oder eine fehlerhafte DNA-Reparatur können in weiterer Folge für eine merkliche Reduktion des Cortex verantwortlich sein. (Vgl. Kaindl et al., 2010, p. 365)

Das gegenwärtige Erklärungsmodell zur Entstehung der Mikrozephalie geht von einer Störung oder einem Ungleichgewicht in der asymmetrischen und symmetrischen Zellteilung aus. Durch Mutationen in einigen MCPH-Genen kommt es zu einem verfrühten Auftreten einer asymmetrischen Zellteilung. Auf diese Weise wird der neuronale Stammzellen-Pool vermindert oder lediglich auf einem konstanten Level gehalten.

Bei der Charakterisierung und Identifizierung von meist seltenen krankheitsverursachenden Genen bzw. Mutationen können verschiedene Lösungswege angewendet werden, um eine seltene und rezessive Erbkrankheit zu eruieren. Im Zuge dieser Arbeit wurde für die Identifizierung von Genen, die mit MCPH in Zusammenhang stehen, zuerst ein Homozygotie-Mapping durchgeführt. Eine darauffolgende Literaturrecherche führt zur Feststellung der für die Krankheit wahrscheinlichsten Kandidatengene. Mittels einer Sanger-Sequenzierung kann die kausale Variante bei den Betroffenen identifiziert werden. Für die Familien MCP 4 (*ASPM*) und MCP 5 (*CDK6*) konnte mithilfe dieser Methoden die zuvor ermittelten Kandidatengene bestätigt werden: Es wurde in jedem der beiden Gene eine homozygote Mutation gefunden, welche zur Ausbildung einer Mikrozephalie führt.

4.1 Familie MCP 4

Der Stammbaum der Familie MCP 4 besteht aus fünf Generationen mit vier betroffenen Individuen. Bei genauerer Betrachtung lassen sich drei Individuen in der fünften Generation und ein Individuum in der vierten Generation ausmachen. Die Eltern der betroffenen Personen zeigen keine Auffälligkeiten. Bei der genaueren Untersuchung der PatientInnen wurden keine weiteren physiologischen Auffälligkeiten gefunden – und die Erkrankung selbst ist nicht progressiv. Auffälligstes Merkmal für alle betroffenen Individuen ist eine abfallende Stirn und ein vorstehender bzw. ausladender Mund. Der Intelligenzquotient aller betroffenen Individuen entspricht einer schweren mentalen Retardierung. Des Weiteren zeigen die betroffenen Individuen ein aggressives Verhalten und Schwierigkeiten bei der Wiedererkennung von vertrauten Personen und Objekten. Aus diesen und weiteren Erkenntnissen geht hervor, dass es sich hierbei um eine nicht-syndromale Form der Mikrozephalie handelt.

Aufgrund des vorliegenden Phänotyps begrenzten wir die Suche nach einer möglichen Mutation auf das *ASPM*-Gen. Zudem zeigte das Homozygotie-Mapping einen homozygoten Bereich am Chromosom 1, indem sich das Kandidatengen *ASPM* befand. Anzumerken gilt an dieser Stelle, dass sich die erste Erwähnung von *ASPM* im Zusammenhang mit dem Auftreten von MCPH bereits im Jahr 2002 findet. (Siehe Bond et al., 2002)

Bereits zu dieser Zeit wurden bei 24 konsanguinen Familien aus dem Norden Pakistans die autosomal-rezessive primäre Mikrozephalie auf kausale Varianten im MCPH5-Locus zurückgeführt. Im Zuge der weiteren Analyse haben Bond et al. vier Mutationen im *ASPM*-Gen entdeckt. Die ersten zwei Mutationen befanden sich am Exon 3. Beide Mutationen 719 - 720 delCT und 1258 - 1264 delTCTCAAG verursachen ein Frameshift. Dieser Umstand bewirkt eine vorzeitige Beendigung der Translation. Auch die Mutation 9159 delA am Exon 21 bewirkt eine frühzeitige

Beendigung der Translation durch denselben Mechanismus. Eine weitere Mutation 7761T>G am Exon 18 hat eine unverzügliche Protein-Trunkierung zur Folge. In der weiteren Untersuchung wurden die Auswirkungen der Mutationen im *ASPM*-Gen auf die Proteine untersucht. Dabei wurde ersichtlich, dass *ASPM* während der embryonalen Entwicklung besonders stark während der kortikalen Neurogenese exprimiert wird. Weiters zeigten Untersuchungen mit *Drosophila melanogaster* das *ASPM* bzw. *asp* auch für ein reibungsloses Funktionieren der Mitose und Meiose mitverantwortlich ist. Bond et al. konnten nachweisen, dass Störungen in diesen Vorgängen sich negativ auf die Organisation der Spindel und Mikrotubuli auswirken. (Vgl. Bond et al., 2002, pp. 316–318)

Im Zuge dieser Arbeit konnte die Mutation Arg(R)3244* (NM_018136), wobei Arginin durch ein Stopp-Codon ersetzt wurde, bei den betroffenen Personen in der Familie MCP 4, nachgewiesen werden. Diese kausale Variante wurde bereits in den wissenschaftlichen Veröffentlichungen von Gul et al., Hussain et al. und Tan et al. erwähnt und näher beschrieben (Siehe Gul et al., 2007), (Siehe Sajid Hussain et al., 2013) (Siehe Tan et al., 2014).

Laut Mutation-Taster (Siehe Schwarz et al., 2014) führt die Änderung der Aminosäure Abfolge, das ein Stopp-Codon zur Folge hat, sehr wahrscheinlich zu einer fehlerhaften Funktion des Proteins. Es ist davon auszugehen, dass diese Mutation (Stopp-Codon) die einwandfreie Funktion und Struktur des Proteins negativ beeinflusst.

Durch die Verwendung ausgewählter Methoden, Analysen und Sequenzierungen konnte in der Familie MCP 4 erfolgreich die genetische Ursache bzw. kausale Variante, die für die Ausbildung eine Mikrozephalie bei den betroffenen Personen verantwortlich ist, gefunden werden.

4.2 Familie MCP 5

Bei der Familie MCP 5 sind die Familienmitglieder MCP 5.1, MCP 5.2 und MCP 5.3 von MCPH betroffen. Auch bei dieser Familie zeigen die Eltern keine Symptome einer Mikrozephalie. Die einzige Auffälligkeit ist die Konsanguinität der Eltern, die das Auftreten von Symptomen bei den Kindern begünstigt. Die betroffenen Personen weisen ein aggressives Verhalten und eine mentale Retardierung auf. Zudem ist eine Lernschwäche vorhanden und es bestehen Schwierigkeiten bei der Wiedererkennung von vertrauten Objekten und Personen. Betroffene Individuen präsentieren sich mit einer abfallenden Stirn und einem vorstehenden beziehungsweise ausladenden Mund. Aus diesen und weiteren Erkenntnissen konnte angeleitet werden, dass es sich hierbei um eine nicht-syndromale Form der Mikrozephalie handelt.

Bei der Auswertung der Daten aus der vorhergehenden SNP-Analyse wurde ein homozygoter Bereich am Chromosom 7 ersichtlich. Eine anschließende Literaturrecherche ergab, dass sich in diesem Bereich das erst kürzlich mit MCPH assoziierte Gen *CDK6* befindet. Mittels einer anschließenden Sanger-Sequenzierung konnte eine Mutation gefunden werden. Die im Anschluss an die Sanger-Sequenzierung folgende Literaturrecherche ergab, dass die Mutation bereits von Hussain et al. beschrieben wurde.

Wegen der überlappenden LOH-Bereiche und der identen Mutation in *CDK6* in beiden Familien wurde eine vergleichende Haplotyp-Analyse veranlasst. Die Analyse ergab einen identen Haplotyp von 16 konsekutive SNPs was auf einen gemeinsamen Vorfahren schließen lässt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass ein Founder-Effect zu tragen kommt.

Aufgrund der Interpretation und der Auswertung aller methodischen Erkenntnisse konnten wir somit ein weiteres Mal die Mutation im *CDK6*-Gen nachweisen. Hussain et al. konnten 2013 als erste Wissenschaftler nachweisen, dass eine

Mutation im *CDK6*-Gen für die Ausbildung einer Mikrozephalie verantwortlich ist. Dabei identifizierten Hussain et al. einen neuen MCPH-Locus (MCPH12) am Chromosom 7 (q21.11-q21.3). Die Mutation wurde bei einer Familie aus der Provinz Punjab in Pakistan ausfindig gemacht. Die Familie besteht aus acht Generationen und 10 Kinder aus der sechsten bis achten Generation sind von der Erkrankung betroffen. Auffällig ist eine schräg abfallende Stirn und eine mentale Retardierung von mildem Charakter. Die Mutation, die sich für die Mikrozephalie verantwortlich zeigt, ist eine Missense-Mutation im *CDK6*-Gen (c.589G>A, NM_001145306). Aufgrund der Missense-Mutation kommt es zu einem Aminosäure-Austausch: Die Aminosäure Alanin wird durch ein Threonin ersetzt (p.Ala197Thr). (Vgl. Hussain et al., 2013, p. 5200)

Im Zuge dieser Arbeit konnte ein weiteres Mal die gleiche Mutation bei den betroffenen Individuen MCP 5.1, 5.2 und 5.3 bestätigt werden.

Laut Mutation-Taster (Siehe Schwarz et al., 2014) bewirkt die Missense-Mutation eine Änderung in der Abfolge der Aminosäuren. Es ist davon auszugehen, dass sich dieser Umstand vermutlich negativ auf die Funktion und Struktur des Proteins auswirkt. Mittels dieser ausgewählten Methoden bzw. Sequenzierungen konnte in dieser Familie erfolgreich die Missense-Mutation bzw. die genetische Ursache für die Mikrozephalie bei den betroffenen Individuen ausfindig gemacht werden.

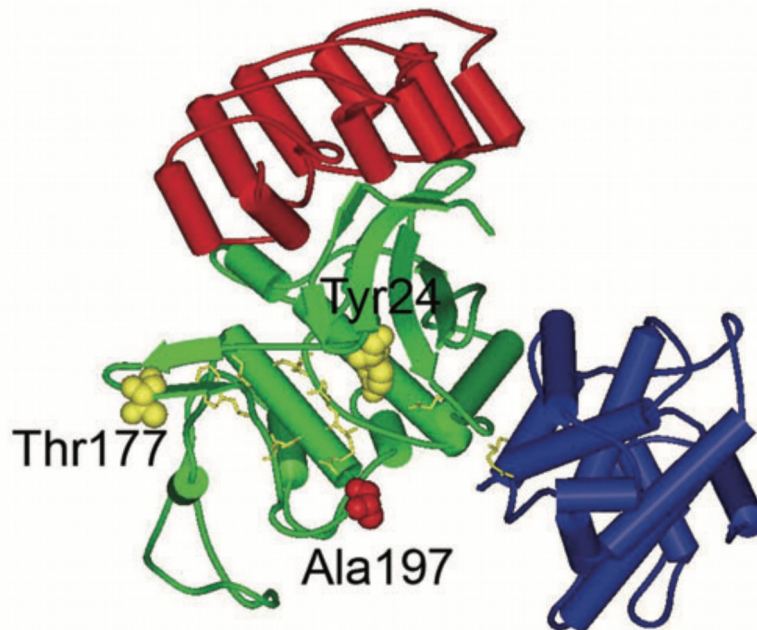


Abbildung 22: Dreidimensionale Abbildung von CDK6
(Hussain et al., 2013, p. 5202 [Figure 2])

Abbildung 22 zeigt die dreidimensionale Struktur von CDK6. Die rote Teil-Struktur im oberen Bereich des Bildes zeigt die Region für die Inhibierung (INK4). Die blaue Teil-Struktur im rechten Bildbereich zeigt die Region für die Aktivierung (Cyklin K). Die Ansammlung kleiner roter Punkte innerhalb des Bildes verweisen auf die Mutation p.Ala197Thr. Die Aktivierung des Enzyms erfolgt durch eine Phosphorylierung von Thr 177 (gelbe Punkte links im Bild). Im Gegenzug führt eine Phosphorylierung von Tyr 24 (gelbe Punkte in der Mitte des Bildes) zur Inaktivierung des Enzyms. (Vgl. Hussain et al., 2013, p. 5202)

4.3 Zika-Virus

Laut einem WHO Statement vom 28. Jänner 2016 und 1. Februar 2016 wurde dem WHO Emergency Committee Informationen bereitgestellt, die einen Zusammenhang zwischen den aufgetretenen Fällen von Mikrozephalie bzw. anderen neurologischen Störungen und den Auswirkungen des Zika-Virus vermuten lässt. Laut Angaben der WHO wurde im Mai 2015 in Brasilien das erste Mal über eine Zika-Virus Infektion berichtet. Seit dieser erstmaligen Erwähnung hat sich die Anzahl der Zika-Erkrankungen nicht nur innerhalb Brasiliens erheblich gesteigert, sondern die Infektion darüber hinaus innerhalb der Region über 22 andere Länder ausgebreitet. (Vgl. World Health Organization (WHO), 2016a, p. Online), (Vgl. World Health Organization (WHO), 2016b, p. Online) Neben den bereits diskutierten genetischen und umweltbedingten Ursachen für das Auftreten von Mikrozephalie scheint es durch den Zika-Virus nun eine weitere Ursache für die Erkrankung zu geben.

Das Zika-Virus, welches der Familie der Flaviviridae zuzuordnen ist, wird hauptsächlich durch Aedes Mücken übertragen. Erstmals wurde das Virus im Jahr 1947 in einem Wald in Uganda isoliert. Bei erwachsenen Menschen verläuft die Infektion für gewöhnlich asymptomatisch bzw. weist einen milden Verlauf auf. Bei dieser Personengruppe ist die Infektion selbstlimitierend. Folgende Symptome können dennoch auftreten: Arthralgien, Hautausschlag, Fieber und Konjunktivitis. Einige Regionen Brasiliens weisen eine hohe Durchseuchung mit dem Zika-Virus auf. Besonders dort gab es im Jahr 2015 eine erhöhte Anzahl an Neugeborenen mit Mikrozephalie. (Vgl. Martines et al., 2016, p. 1)

In diesem Zusammenhang auffallend ist eine starke Korrelation zwischen dem vermehrten Auftreten von Mikrozephalie bei Neugeborenen und der Durchseuchung der betroffenen Region mit dem Zika-Virus. Obwohl die Infektion bei Erwachsenen mild verläuft, hat eine Infektion durch den Virus für Feten

schwerwiegende Konsequenzen: Werdende Mütter, deren Säuglinge eine Mikrozephalie aufweisen, hatten während der Schwangerschaft Anzeichen einer Zika-Infektion – die meisten schwangeren Frauen wurden jedoch nicht auf eine Infektion getestet. Das Virus Genom konnte bei zwei schwangeren brasilianischen Frauen in der Amnionflüssigkeit nachgewiesen werden. Nachdem die Schwangerschaft abgebrochen wurde, zeigte die anschließende Biopsie, dass die Feten eine Mikrozephalie aufwiesen und das der Grund für die Erkrankung auf eine Zika-Infektion zurückzuführen ist. Der Virus Nachweis erfolgte mittels RT-PCR und elektronenmikroskopische Aufnahmen. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich herausgefunden, dass das Zika-Virus menschliche Gehirnzellen aus pluripotenten Stammzellen befällt. (Vgl. Martines et al., 2016, p. 1)

Aus den Erkenntnissen dieser Betrachtungen erscheint es ratsam, bereits vor der genetischen Untersuchung eine ausführliche Anamnese durchzuführen. Auf diese Weise sollten spezifische Umweltfaktoren und diverse andere Ursachen ausgeschlossen werden, bevor man eine aufwendige genetische Untersuchung beginnt um eine mögliche Mutation zu finden. Wie anhand der Zika-Infektionen deutlich wird, können zukünftig auch unerwartete und zuvor unbekannte Faktoren – wie etwa eine Virus-Infektion – zu einer bestimmten Erkrankung führen. Darüber hinaus scheint das Umfeld der von einer Krankheit betroffenen Menschen besonders wichtig. In diesem Sinne sollte man sich vor jeder Untersuchung auch selbst vor Ort ein Bild von der individuellen Situation der betroffenen Familie machen. Dies scheint auch ein Nachteil interdisziplinärer, länderübergreifender Zusammenarbeit: Der Umstand, dass man in arbeitsteiligen Projekten nicht selbst bei den betroffenen Menschen sein kann, um mehr medizinische Informationen zu bekommen, führt schlussendlich zu einer Absenz von – aus meiner Sicht zur Bestimmung der Situation wichtigen – zusätzlichen klinischen Daten.

4.4 Gegenüberstellung der Methoden zur Charakterisierung krankheitsverursachender Varianten

Um krankheitsverursachende Gene für die betroffenen Familienmitglieder methodisch zu identifizieren, existieren in der wissenschaftlichen Praxis verschiedene Ansätze. Die Abfolge der diversen Methoden ist maßgeblich von den Resultaten der vorangegangenen Ansätze wie beispielsweise dem Homozygotie-Mapping und der anschließenden Kandidatengen-Identifizierung abhängig. Bei den betroffenen Familien in dieser Arbeit wurden jeweils mehrere homozygote Bereiche im genetischen Material der Familienmitglieder ausfindig gemacht. Die Entscheidung, welches Kandidatengen am wahrscheinlichsten für die Ausbildung des Phänotyps verantwortlich ist, wurde aufgrund der klinischen Erscheinung des Phänotyps getroffen. Neben diesen Kriterien wird auch anhand einer Literaturrecherche die Entscheidung bei der Auswahl eines Kandidatengens mitbeeinflusst. Bei dieser Literaturrecherche wird ersichtlich, wie häufig ein Kandidatengen mit der Erkrankung assoziiert ist. Im Fall der Familien MCP 4 und MCP 5 konnte auf diese Weise in den Kandidatengenen *ASPM* und *CDK6* eine bereits bekannte Mutation gefunden werden.

Allgemein müssen bei der Identifizierung einer Mutation in einem bestimmten Gen folgende Überlegungen berücksichtigt werden: Um ein kausales Gen ausfindig zu machen sollten zuvor bereits aussagekräftige klinische Informationen über den Phänotyp und die Erkrankung im Allgemeinen ermittelt werden. Dabei ist es vorteilhaft, wenn man auf die umfassenden Informationen aller Familienmitglieder einer ganzen Familie mit vielen betroffenen Individuen zurückgreifen kann: Je höher die Anzahl an betroffenen Personen in einer Familie, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit den Bereich im Genom zu finden, in dem sich das krankheitsverursachende Gen vermutlich aufhält. An dieser Stelle soll festgehalten

werden, dass die Sanger-Sequenzierung derzeit als eine der zielführendsten – und damit sinnvollsten – Methoden bei der Identifizierung krankheitsverursachender Gene gesehen wird. Nicht zuletzt aufgrund der hohen Qualität der Daten und Ergebnisse, die bei jeder Amplifikation erreicht wird bzw. werden kann.

Im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung liegt ein großer Vorteil der Exom-Sequenzierung in jenem Umstand, dass für die Identifizierung genetischer Veränderungen im Genom schon das genetische Material einer einzigen betroffenen Person ausreichend ist. Wenn man aufgrund des Phänotyps bzw. aufgrund des Ergebnisses aus dem Homozygotie-Mapping auf kein Kandidatengen schließen kann, oder wenn mehrere Kandidatengene in der engeren Auswahl sind, so kann die Identifizierung einer Mutation in einem vermutlich krankheitsverursachendem Gen mittels Sanger-Sequenzierung sehr kosten- und zeitintensiv werden.

Dem gegenüber muss bei der Anwendung einer Exom-Sequenzierung jedenfalls berücksichtigt werden, dass in manchen Fällen keine Mutation bzw. kein kausales Gen identifiziert werden kann, da es sich bei der Exom-Sequenzierung um eine Sequenzierung handelt, die nicht imstande ist, das gesamte Genom eines Menschen in voller Bandbreite zu untersuchen.

Ein weiterer Nachteil der Exom-Sequenzierung bzw. von NGS, der an dieser Stelle auch erwähnt werden sollte, ist der Umstand, dass durch die Sequenzierung zusätzliche genetische Informationen generiert werden können, die von großer Bedeutung für die betroffenen Individuen sein können. Im Vergleich dazu ist bei der Sanger-Sequenzierung die allgemeine Wahrscheinlichkeit geringer, dass ungewollte und erwünschte genetische Informationen auffindig gemacht werden, da man sich bei der Sequenzierung nur auf die zuvor ermittelten homozygoten Bereiche konzentriert.

4.5 Ethische Überlegungen

Die ständige Verbesserung der Leistungsfähigkeit von Sequenzierungstechnologien reduziert die Kosten genetischer Untersuchungen. Dieser Umstand stellt die Gesellschaft jedoch auch vor neuen Herausforderungen und konfrontiert sie mit ethischen Fragestellungen, die es zukünftig zu beantworten gilt. Durch die Möglichkeiten der Exom-Sequenzierung werden gegebenenfalls mehr Mutationen bzw. krankheitsverursachende Gene entdeckt als ursprünglich erwünscht. Diese unerwünschte zusätzliche Information kann aber für die betroffenen Personen möglicherweise schwerwiegende Folgen haben. Es ist daher notwendig die Patienten vor einer genetischen Untersuchung, die eine Exom-Sequenzierung beinhaltet, genauestens aufzuklären bzw. ein Bewusstsein dafür zu schaffen, dass neben der eigentlichen Abklärung genetischer Veränderungen möglicherweise auch zusätzliche Varianten oder Mutationen entdeckt werden könnten. Aus diesem Grund ist es ratsam mit den Patienten bereits vor einer genetischen Untersuchung eine individuelle Strategie zu finden, wie man mit diesen nicht gesuchten und ungewollten Informationen später umgehen soll. (Vgl. Clarke, 2014, pp. 17–18)

Das Auffinden nicht gesuchter bzw. ungewollter genetischer Informationen als Nebenprodukt der genetischen Abklärung können sich auf die zwischenmenschlichen Beziehungen einer ganzen Familie auswirken. Darüber hinaus können diese Informationen auch auf das Leben der Kinder einen negativen Einfluss haben. (Vgl. Davey, 2014, p. 458)

Es gibt weitaus mehr Fragestellungen, mit denen sich betroffene Personen auseinandersetzen sollen – und schlussendlich muss jede Betroffene oder jeder Betroffener ohne Zwang autonom und individuell entscheiden wie er oder sie mit dieser zusätzlichen Information umgehen möchte. Besonders schwierig scheint die Situation dann, wenn durch die Sequenzierung Mutationen entdeckt werden, die einen schicksalhaften Einfluss auf das Leben der Betroffenen und deren

Nachkommen haben kann. Hier stellt sich die Frage, inwieweit ein Recht auf Nichtwissen in dieser fatalen Situation – insbesondere bezüglich einer auch andere Individuen wie beispielsweise Nachkommen betreffenden Information – bewusst missachtet werden kann, darf oder soll.

Auch wenn die Sanger-Sequenzierung derzeit noch eine der verbreitetsten Methoden bei der Suche nach Mutationen zu sein scheint: Durch den zunehmenden Einsatz der Exom-Sequenzierung zur Identifizierung von kausalen Varianten scheint die Auseinandersetzung mit ethischen Fragestellungen zukünftig unumgänglich, denn: Lediglich eine kritische Reflexion dieser ethischen Überlegungen innerhalb der Gesellschaft können die Grenzen persönlicher Freiheit definieren.

5 Literaturverzeichnis

- Abuelo, D., 2007. Microcephaly Syndromes. *Semin. Pediatr. Neurol.* 14, 118–127. doi:10.1016/j.spen.2007.07.003
- Alkuraya, F.S., 2010. Homozygosity mapping: One more tool in the clinical geneticist's toolbox. *Genet. Med.* 12, 236–239. doi:10.1097/GIM.ob013e3181ceb95d
- Barbelanne, M., Tsang, W.Y., 2014. Molecular and Cellular Basis of Autosomal Recessive Primary Microcephaly. *BioMed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/547986
- Bennett, R.L., Motulsky, A.G., Bittles, A., Hudgins, L., Uhrich, S., Doyle, D.L., Silvey, K., Scott, C.R., Cheng, E., McGillivray, B., Steiner, R.D., Olson, D., 2002. Genetic Counseling and Screening of Consanguineous Couples and Their Offspring: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J. Genet. Couns.* 11, 97–119. doi:10.1023/A:1014593404915
- Bittles, A., 2001. Consanguinity and its relevance to clinical genetics: Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *Clin. Genet.* 60, 89–98. doi:10.1034/j.1399-0004.2001.600201.x
- Bond, J., Roberts, E., Mochida, G.H., Hampshire, D.J., Scott, S., Askham, J.M., Springell, K., Mahadevan, M., Crow, Y.J., Markham, A.F., Walsh, C.A., Woods, C.G., 2002. ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat. Genet.* 32, 316–320. doi:10.1038/ng995
- Brookes, A.J., 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234, 177–186. doi:10.1016/S0378-1119(99)00219-X
- Clarke, A.J., 2014. Managing the ethical challenges of next-generation sequencing in genomic medicine. *Br. Med. Bull.* 111, 17–30. doi:10.1093/bmb/ldu017
- Clarke, C.A., Bier, L., 1980. *Humangenetik und Medizin*. Teubner, Stuttgart.
- Courts, C., 2012. Next Generation Sequencing – Die ultimative genetische Technik. *blooDNAcid*.
- Davey, S., 2014. Next generation sequencing: considering the ethics. *Int. J.*

Immunogenet. 41, 457–462. doi:10.1111/iji.12155

- Faheem, M., Naseer, M.I., Rasool, M., Chaudhary, A.G., Kumosani, T.A., Ilyas, A.M., Pushparaj, P.N., Ahmed, F., Algahtani, H.A., Al-Qahtani, M.H., Saleh Jamal, H., 2015. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Med. Genomics* 8, 1–11. doi:10.1186/1755-8794-8-S1-S4
- Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H.G., Veltman, J.A., 2012. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 20, 490–497. doi:10.1038/ejhg.2011.258
- Gul, A., Tariq, M., Khan, M.N., Hassan, M.J., Ali, G., Ahmad, W., 2007. Novel protein-truncating mutations in the *aspm* gene in families with autosomal recessive primary microcephaly. *J. Neurogenet.* 21, 153–163. doi:10.1080/01677060701508594
- Hamosh, A., Scott, A.F., Amberger, J.S., Bocchini, C.A., McKusick, V.A., 2005. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 33, D514–D517. doi:10.1093/nar/gki033
- Hildebrandt, F., Heeringa, S.F., Rüschenhoff, F., Attanasio, M., Nürnberg, G., Becker, C., Seelow, D., Huebner, N., Chernin, G., Vlangos, C.N., Zhou, W., O'Toole, J.F., Hoskins, B.E., Wolf, M.T.F., Hinkes, B.G., Chaib, H., Ashraf, S., Schoeb, D.S., Ovunc, B., Allen, S.J., Vega-Warner, V., Wise, E., Harville, H.M., Lyons, R.H., Washburn, J., MacDonald, J., Nürnberg, P., Otto, E.A., 2009. A Systematic Approach to Mapping Recessive Disease Genes in Individuals from Outbred Populations. *PLoS Genet.* 5. doi:10.1371/journal.pgen.1000353
- Hussain, M.S., Baig, S.M., Neumann, S., Peche, V.S., Szczepanski, S., Nürnberg, G., Tariq, M., Jameel, M., Khan, T.N., Fatima, A., Malik, N.A., Ahmad, I., Altmüller, J., Frommolt, P., Thiele, H., Höhne, W., Yigit, G., Wollnik, B., Neubauer, B.A., Nürnberg, P., Noegel, A.A., 2013. CDK6 associates with the centrosome during mitosis and is mutated in a large Pakistani family with primary microcephaly. *Hum. Mol. Genet.* 22, 5199–5214. doi:10.1093/hmg/ddt374
- Illumina, 2013. Infinium® HTS Assay Protocol Guide [WWW Document]. URL http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/human_omniexpress-24/infinium_hts_assay_protocol_user_guide_15045738_a.pdf (accessed 6.14.16).
- Johns Hopkins University, n.d. About OMIM [WWW Document]. OMIM. URL

<http://www.omim.org/about> (accessed 7.10.16).

Kaindl, A.M., Passemard, S., Kumar, P., Kraemer, N., Issa, L., Zwirner, A., Gerard, B., Verloes, A., Mani, S., Gressens, P., 2010. Many roads lead to primary autosomal recessive microcephaly. *Prog. Neurobiol.* 90, 363–383. doi:10.1016/j.pneurobio.2009.11.002

Kent, W.J., 2002. BLAT—The BLAST-Like Alignment Tool. *Genome Res.* 12, 656–664. doi:10.1101/gr.229202

Kumar, A., Girimaji, S.C., Duvvari, M.R., Blanton, S.H., 2009. Mutations in STIL, Encoding a Pericentriolar and Centrosomal Protein, Cause Primary Microcephaly. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 286–290. doi:10.1016/j.ajhg.2009.01.017

Majewski, J., Schwartzentruber, J., Lalonde, E., Montpetit, A., Jabado, N., 2011. What can exome sequencing do for you? *J. Med. Genet.* 48, 580–589. doi:10.1136/jmedgenet-2011-100223

Martines, R.B., Bhatnagar, J., de Oliveira Ramos, A.M., Davi, H.P.F., Iglezias, S.D., Kanamura, C.T., Keating, M.K., Hale, G., Silva-Flannery, L., Muehlenbachs, A., Ritter, J., Gary, J., Rollin, D., Goldsmith, C.S., Reagan-Steiner, S., Ermias, Y., Suzuki, T., Luz, K.G., de Oliveira, W.K., Lanciotti, R., Lambert, A., Shieh, W.-J., Zaki, S.R., 2016. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *The Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(16)30883-2

Mi, D., Carr, C.B., Georgala, P.A., Huang, Y.-T., Manuel, M.N., Jeanes, E., Niisato, E., Sansom, S.N., Livesey, F.J., Theil, T., Hasenpusch-Theil, K., Simpson, T.I., Mason, J.O., Price, D.J., 2013. Pax6 Exerts Regional Control of Cortical Progenitor Proliferation via Direct Repression of Cdk6 and Hypophosphorylation of pRb. *Neuron* 78, 269–284. doi:10.1016/j.neuron.2013.02.012

National Institute of Population Studies (NIPS) [Pakistan], ICF International, 2013. Pakistan Demographic and Health Survey 2012-13. NIPS and ICF International, Islamabad, Pakistan; Calverton, Maryland, USA.

OMIM Entry #181590 - SCL/TAL1-INTERRUPTING LOCUS; STIL [WWW Document], 2015. URL <http://omim.org/entry/181590?search=STIL&highlight=stil> (accessed 7.8.16).

OMIM Entry #603368 - CYCLIN-DEPENDENT KINASE 6; CDK6 [WWW Document], 2014. URL <http://omim.org/entry/603368?search=Cdk6&highlight=cdk6> (accessed 7.8.16).

OMIM Entry #605481 - ABNORMAL SPINDLE-LIKE, MICROCEPHALY-

- ASSOCIATED; ASPM [WWW Document], 2013. . OMIM. URL <http://omim.org/entry/605481> (accessed 7.8.16).
- OMIM Entry #611423 - CENTROSOMAL PROTEIN, 135-KD; CEP135 [WWW Document], 2014. URL <http://www.omim.org/entry/611423?search=CEP135&highlight=cep135> (accessed 7.10.16).
- OMIM Entry #613529 - CENTROSOMAL PROTEIN, 152-KD; CEP152 [WWW Document], 2015. URL <http://www.omim.org/entry/613529?search=CEP152&highlight=cep152> (accessed 7.10.16).
- Rupp, V., 2012. Systematic characterisation of consanguineous Pakistani families displaying various forms of alopecia (Masterarbeit). Technische Universität Graz, Graz.
- Sajid Hussain, M., Marriam Bakhtiar, S., Farooq, M., Anjum, I., Janzen, E., Reza Toliat, M., Eiberg, H., Kjaer, K., Tommerup, N., Noegel, A., Nürnberg, P., Baig, S., Hansen, L., 2013. Genetic heterogeneity in Pakistani microcephaly families: Pakistani microcephaly mutations. *Clin. Genet.* 83, 446–451. doi:10.1111/j.1399-0004.2012.01932.x
- Schwarz, J.M., Cooper, D.N., Schuelke, M., Seelow, D., 2014. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods* 11, 361–362. doi:10.1038/nmeth.2890
- Sobotta, J., Paulsen, F., Waschke, J. (Eds.), 2010. Kopf, Hals und Neuroanatomie, 23. Aufl. ed, Atlas der Anatomie des Menschen. Elsevier, Urban & Fischer, München.
- Stenson, P.D., Ball, E.V., Mort, M., Phillips, A.D., Shiel, J.A., Thomas, N.S.T., Abeysinghe, S., Krawczak, M., Cooper, D.N., 2003. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum. Mutat.* 21, 577–581. doi:10.1002/humu.10212
- Strom, T.M., n.d. Primer Design - ExonPrimer [WWW Document]. URL <https://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html> (accessed 3.23.16).
- Tan, C.A., del Gaudio, D., Dempsey, M.A., Arndt, K., Botes, S., Reeder, A., Das, S., 2014. Analysis of ASPM in an ethnically diverse cohort of 400 patient samples: perspectives of the molecular diagnostic laboratory. *Clin. Genet.* 85, 353–358. doi:10.1111/cge.12172
- Trepel, M., 2012. Neuroanatomie: Struktur und Funktion, 5th ed. Elsevier, Urban & Fischer, München.
- Universität Fribourg, Universität Lausanne, Universität Bern, Schweizerischer Virtueller Campus, 2005. Kurz gefasst [WWW Document]. Online

Embryol. Für Stud. Med. URL
<http://www.embryology.ch/allemand/vcns/resumecns01.html>
(accessed 6.15.16).

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115. doi:10.1093/nar/gks596

Wieczorek, D., 2015. Neue syndromale Krankheitsbilder mit Mikrozephalie. *Med. Genet.* 27, 369–376. doi:10.1007/s11825-015-0071-1

Woods, C.G., Bond, J., Enard, W., 2005. Autosomal Recessive Primary Microcephaly (MCPH): A Review of Clinical, Molecular, and Evolutionary Findings. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 717–728.

World Health Organization (WHO), 2016a. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/en/> (accessed 7.26.16).

World Health Organization (WHO), 2016b. WHO to convene an International Health Regulations Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/emergency-committee-zika/en/> (accessed 7.27.16).

6 **Abbildungsnachweis**

Abbildung 1: Orientierende Darstellung des Gehirns (Sobotta et al., 2010, p. 231 [Abb. 12.31]).....	20
Abbildung 2: Funktion des Gehirns (Sobotta et al., 2010, p. 237 [Abb. 12.42]).....	21
Abbildung 3: Mikrozephalie im Zusammenhang mit unterschiedlichen syndromalen Erkrankungen (Wieczorek, 2015, p. 369 [Abb. 1]).....	27
Abbildung 4: Zellteilung: Asymmetrisch und Symmetrisch (Kaindl et al., 2010, p. 375 [Fig. 4]).....	31
Abbildung 5: Lokalisation von MCPH-Genen während der Zellteilung (Kaindl et al., 2010, p. 376 [Fig. 6]).....	35
Abbildung 6: Zellveränderungen durch Veränderungen von CDK6 (Hussain et al., 2013, p. 5207 [Abnormalities in centrosome, microtubule network and nuclear shape in CDK6-knockdown cells]).....	37
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Methoden zur Charakterisierung krankheitsverursachender Varianten bzw. Mutationen (Eigene Darstellung nach Projektdaten, ergänzt durch Rupp, 2012, p. 16 [Fig. 1.2])	44
Abbildung 8: Stammbaum, MCP 4 (Eigene Darstellung auf Basis der Daten von Muzammil Ahmad Khan).....	48
Abbildung 9: Beispielhafte Ausprägungen der Erkrankung, Individuum MCP 4	

(Bereitstellung der Bilder durch Muzammil Ahmad Khan).....	48
Abbildung 10: Stammbaum, MCP 5 (Selbst erstellt auf Basis der Daten von Muzammil Ahmad Khan).....	49
Abbildung 11: Beispielhafte Ausprägung der Erkrankung, Individuum MCP 5.2 (Bereitstellung der Bilder durch Muzammil Ahmad Khan).....	51
Abbildung 12: Beispielhafte Ausprägung der Erkrankung, Individuum MCP 5.3 (Bereitstellung der Bilder durch Muzammil Ahmad Khan).....	51
Abbildung 13: SNP-Analyse, MCP 4.1, MCP 4.2, MCP 4.3 (Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Centre for Applied Genomics).....	59
Abbildung 14: USCS RefSeq Gene, MCP 4 (Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, USCS Browser).....	60
Abbildung 15: DNA-Sequenz von MCP 4.2 (Mutation homozygot) (Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Peak Scanner Software).....	62
Abbildung 16: DNA-Sequenz von MCP 4.4 (Mutation heterozygot) (Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Peak Scanner Software).....	63
Abbildung 17: DNA-Sequenz von MCP 4.8, Wildtyp-Ausprägung (Wt) (Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Peak Scanner Software).....	63
Abbildung 18: SNP-Analyse, MCP 5.1 (Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Centre for Applied Genomics).....	65
Abbildung 19: USCS RefSeq Gene, MCP 5 (Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, USCS Browser).....	66
Abbildung 20: DNA-Sequenz von MCP 5.1 (homozygot) (Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Peak Scanner Software).....	67
Abbildung 21: DNA-Sequenz von MCP 5.4 (heterozygot)	

(Eigene Darstellung nach Bildschirmfoto, Peak Scanner Software).....68

Abbildung 22: Dreidimensionale Abbildung von CDK6

(Hussain et al., 2013, p. 5202 [Figure 2]).....75

7 Tabellennachweis

Tabelle 1: Zusammenfassung der bekannten MCPH Gene (Faheem et al., 2015, p. 3 [Spalten 2, 4 und 5 aus Table 1]).....	32
Tabelle 2: Biometrische und klinische Merkmale, MCP 4.3 und MCP 4.2 (Selbst erstellt).....	47
Tabelle 3: Biometrische und klinische Merkmale, MCP 5 (Selbst erstellt).....	50
Tabelle 4: Zyklen der Amplifikation mit ihrer Dauer und Temperatur (Selbst erstellt).....	55
Tabelle 5: Dauer der Zyklen für die Sequenzierung der Exons und ihr Temperaturprofil (Selbst erstellt).....	56
Tabelle 6: Ergebnis der Sequenzierung (Exon 24) (Selbst erstellt).....	62
Tabelle 7: Ergebnis der Sequenzierung (MCP 5) (Selbst erstellt).....	67

8 Anhang

—