

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie
und dem Institut für Zell- und Neurobiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Hereditäre Mikrozephalien:
Charakterisierung des Pathomechanismus der Autosomal-
rezessiven primären Mikrozephalie Typ 3
und klinisch-genetischer Aspekt bei Angelman-Syndrom

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gerda Neubert

aus Rostock

Datum der Promotion: 26. Februar 2016

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	4
2. Abstract	5
3. Einleitung	6
3.1 Definition, Klassifizierung und Ätiologie der Mikrozephalie	6
3.2 Primäre Mikrozephalie: Autosomal-rezessive primäre Mikrozephalie (MCPH)	7
3.2.1 Epidemiologie, Phänotyp und Pathogenese der MCPH	7
3.2.2 MCPH3 und CDK5RAP2	9
3.3 Sekundäre Mikrozephalie: Angelman-Syndrom	11
3.4 Zielsetzung	12
4. Material und Methoden	13
4.1 Humane Proben	13
4.2 Murine Proben	13
4.3 Murine embryonale Stammzellen	13
4.4 Neurale Differenzierung der murinen embryonalen Stammzellen	13
4.5 Nicht-neurale Differenzierung der murinen embryonalen Stammzellen	14
4.6 Lentivirus-vermittelte <i>Cdk5rap2</i> -Runterregulierung	15
4.7 Humane Zytogenetik und Array-CGH	15
4.8 Quantifizierung von Zellviabilität, Proliferation und Apoptose	15
4.9 RNA-Extraktion und quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion	16
4.10 Immunzytologie	16
4.11 Massenspektroskopie	17
4.12 Co-Immunpräzipitation	17
4.13 Western Blot	18

5. Ergebnisse	18
5.1 Primäre Mikrozephalie: Cdk5rap2 in Proliferation und Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen	18
5.1.1 <i>RNA-Polymerase II</i> als Referenzgen für Expressionsanalysen	18
5.1.2 Cdk5rap2 in undifferenzierten und neural differenzierenden mESZ	19
5.1.3 Auswirkungen einer <i>Cdk5rap2</i> -Runterregulierung	20
5.1.4 Potentielle Interaktionspartner von Cdk5rap2	22
5.2 Sekundäre Mikrozephalie: Patientin mit Angelman-Syndrom und schweren Infektionen	23
5.2.1 Klinische Beschreibung	23
5.2.2 Humangenetische Befunde	23
6. Diskussion	25
7. Literaturverzeichnis	30
8. Abkürzungsverzeichnis	35
9. Eidesstattliches Erklärung	38
10. Anteilserklärung an den ausgewählten Publikationen	39
11. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	41
11.1 Publikation 1: Loss of CDK5RAP2 affects neural but not non-neural mESC differentiation into cardiomyocytes	41
11.2 Publikation 2: Reference genes in the developing murine brain and in differentiating embryonic stem cells	56
11.3 Publikation 3: Angelman syndrome and severe infections in a patient with de novo 15q11.2–q13.1 deletion and maternally inherited 2q21.3 microdeletion	62
12. Lebenslauf	66
13. Vollständige Publikationsliste	67
14. Danksagung	68

1. Zusammenfassung

Als Mikrozephalie wird der klinische Befund eines reduzierten frontookzipitalen Kopfumfanges um mehr als zwei Standardabweichungen bzw. auf einen Wert unterhalb der 3. Perzentile bezeichnet. Hereditäre Mikrozephalien können sich pränatal (primäre Mikrozephalie) oder postnatal (sekundäre Mikrozephalie) manifestieren, isoliert auftreten oder Teil eines Syndroms sein. Gegenstand meiner Promotionsarbeit waren Untersuchungen zur Pathogenese der Autosomal-rezessiven primären Mikrozephalie Typ 3 (MCPH3) mit biallelen Mutationen des *CDK5RAP2*-Gens als Beispiel einer isoliert auftretenden primären Mikrozephalie und des Angelman-Syndroms als Beispiel einer syndromalen sekundären Mikrozephalie.

Die MCPH zeichnet sich durch eine Entwicklungsstörung des Gehirns mit einem zu geringen Wachstum vorwiegend des Neokortex (graue Substanz) aus, welches sie als Modellerkrankung zur Erforschung der Neurogenese prädestiniert. Ziel dieses Teils meiner Promotionsarbeit war die Etablierung eines *in vitro* Modells für MCPH3 anhand neural differenzierender muriner embryonaler Stammzellen (mESZ) und die Identifizierung und Charakterisierung potentieller Interaktionspartner von *Cdk5rap2*. Trotz ubiquitärer *CDK5RAP2*-Expression manifestiert sich die MCPH isoliert neural, weshalb wir die neurale und nicht-neurale Differenzierung von *Cdk5rap2*-runterregulierten mESZ näher untersuchten. Nach Induktion der neuralen Differenzierung imponierten in diesen Zellkulturen ein Proliferationsdefekt, ausgeprägte Apoptose zu Beginn der Differenzierung, Störungen der Rosettenbildung, verfrühte Differenzierung und progressiver Zellverlust, wohingegen sich bei der Differenzierung in kontraktile Kardiomyozyten keinerlei Auffälligkeiten im Vergleich zur Kontrollsituation zeigten. Da für Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Real-time PCR kein geeignetes Referenzgen zur Verfügung stand, war die Auswahl eines solchen mit dem Ergebnis der Empfehlung von *RNA-Polymerase II* wichtige Voraussetzung für die weitere Arbeit. Durch massenspektroskopische Analysen konnten etwa 50 potentielle *Cdk5rap2*-Interaktionspartner identifiziert werden, deren Charakterisierung ein fortlaufendes Projekt unserer Arbeitsgruppe ist. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit der aktuellen Hypothese zur Pathogenese der MCPH, die von einem vorzeitigen Übergang von symmetrischer zu asymmetrischer Zellteilung mit Reduktion des Stammzellpools durch verfrühte Differenzierung und vermehrtem Zelltod ausgeht. Sie legen darüber hinaus nahe, dass Störungen der Zellpolarität und der Ausdifferenzierung

eine zusätzliche Komponente darstellen. Unser *in vitro* Modell bietet vielfältige experimentelle Möglichkeiten, die künftig zum weiteren Verständnis physiologischer und pathogenetischer Zusammenhänge beitragen können.

Das Angelman-Syndrom zeichnet sich durch sekundäre Mikrozephalie, mentale Retardierung, Sprachstörungen, Ataxie, Epilepsie und Verhaltensauffälligkeiten aus. Unsere Patientin dagegen fiel früh mit rekurrierenden, teils schweren Infektionen auf und entwickelte dann Symptome, die mit dem Angelman-Syndrom vereinbar waren. Ziel dieses Teils meiner Promotionsarbeit war die Identifizierung der zugrundeliegenden genetischen Ursache. Die Patientin trägt eine für das Angelman-Syndrom typische *de novo* Deletion in 15q11.2–q13.1 und eine Mikrodeletion in 2q21.3, deren Krankheitsrelevanz nicht ausgeschlossen werden kann. Eine Infektanfälligkeit in diesem Rahmen ist äußerst ungewöhnlich. Wir tragen hiermit zur Erweiterung des Phänotyps des Angelman-Syndroms mit zusätzlicher Symptomatik bei.

2. Abstract

Microcephaly describes the clinical finding of a reduced occipital-frontal circumference by at least two standard deviations. Hereditary microcephaly appears congenital (primary) or postnatal (secondary), isolated or in the context of a syndrome. My dissertation project addresses two types of hereditary microcephaly: (i) Autosomal recessive primary microcephaly type 3 (MCPH3) with mutations of the *CDK5RAP2* gene as an example for isolated primary microcephaly and (ii) the Angelman syndrome as an example for syndromal secondary microcephaly.

MCPH is a disorder that affects particularly the *in utero* neocortical development and is thus a model disease for research on neurogenesis. The aim of this part of my project was the establishment of an MCPH3 *in vitro* model with murine embryonic stem cells (mESC) in neural differentiation and the identification and characterisation of putative *Cdk5rap2* interaction partners. Despite ubiquitous *CDK5RAP2* expression MCPH affects particularly the brain, thus we studied neural and non-neural differentiation of *Cdk5rap2*-depleted mESC. After induction of neural differentiation in these cell lines, we observed imposing proliferation defect and apoptosis, progressive loss of differentiating cells, premature differentiation, and failure of rosette-formation, whereas differentiation into beating cardiomyocytes revealed no abnormality compared to the control situation. A suitable reference gene for further gene expression analysis using quantitative Real-time PCR was not available, so we evaluated candidate genes and recommend *RNA-*

polymerase II for this approach. By mass spectrometry approximately 50 putative Cdk5rap2 interaction partners could be identified. Their characterisation is an on-going project of our group. Our results are in line with the current hypothesis of MCPH pathogenesis, which describes a premature switch from symmetric to asymmetric cell division leading to a reduction of neural progenitor pool due to premature differentiation and increased cell death. In addition, our results imply a role of Cdk5rap2 in cell polarity and differentiation. Our *in vitro* model provides multiple experimental possibilities addressing the further understanding of physiological and pathogenic mechanisms.

The Angelman syndrome is characterized by secondary microcephaly, mental retardation, speech disorder, ataxia, epilepsy, and conspicuous behaviour. Our patient was affected by recurrent, partly severe, infections at early age and developed symptoms leading to clinical diagnosis of Angelman syndrome subsequently. The aim of this part of my project was to explore the underlying genetic cause. Genetic analysis revealed a *de novo* deletion in 15q11.2-q13.1 typical for Angelman syndrome and a microdeletion in 2q21.3. Relevance for the latter cannot be excluded. An infect susceptibility in the context of Angelman syndrome is very uncommon. In conclusion, this report broadens the phenotype spectrum.

3. Einleitung

3.1 Definition, Klassifizierung und Ätiologie der Mikrozephalie

Der Begriff Mikrozephalie beschreibt den klinischen Befund eines im Vergleich zum Altersdurchschnitt um mehr als zwei Standardabweichungen (SD) reduzierten fronto-okzipitalen Kopfumfanges (KU) unter Beachtung von Geschlecht und ethnologischer Herkunft. Im deutschsprachigen Raum werden vornehmlich Perzentilen verwendet und ein KU unterhalb der 3. Perzentile als Mikrozephalie bezeichnet. Die primäre Mikrozephalie, welche bereits bei Geburt vorhanden ist, wird von der sekundären, sich postnatal manifestierenden Mikrozephalie unterschieden. Es sei angemerkt, dass diese Nomenklatur uneinheitlich verwendet wird und im Zusammenhang mit der Mikrozephalie die Begriffe „primär“ auch als genetisch bedingt und „sekundär“ auch als erworben definiert werden (Übersicht in (1)). In vielen Fällen geht das eine (kongenital-genetisch) mit dem anderen (postnatal-umweltbedingt) einher, es gibt aber auch eindrucksvolle Ausnahmen, wie beispielsweise das Angelman-Syndrom (2), dem ein Gendefekt zugrunde liegt, eine Mikrozephalie aber erst im Laufe der Kindheit

ausgebildet wird. Ich verwende in dieser Arbeit die Begriffe „primär“ für angeborene und „sekundär“ für sich postnatal manifestierende Mikrozephalien.

Eine Mikrozephalie kann isoliert oder im Rahmen von Syndromen auftreten und sowohl genetisch bedingt sein als auch durch Umweltfaktoren entstehen. Zu den genetisch bedingten Mikrozephalien zählen zum einen die isoliert auftretende Mikrozephalie, wie die autosomal-rezessiv, autosomal-dominant oder x-chromosomal vererbte primäre Mikrozephalie, und zum anderen die im Rahmen von hereditären Syndromen auftretende Mikrozephalie, wie beispielsweise beim Angelman- oder Rett-Syndrom sowie bei der Trisomie 21. In der vorliegenden Arbeit habe ich mich mit den Ursachen zweier Formen genetisch bedingter Mikrozephalie beschäftigt, der Autosomal-rezessiven primären Mikrozephalie Typ 3 und dem Angelman-Syndrom. Auf diese beiden Erkrankungen möchte ich daher im Folgenden näher eingehen.

3.2 Primäre Mikrozephalie: Autosomal-rezessive primäre Mikrozephalie (MCPH)

3.2.1 Epidemiologie, Phänotyp und Pathogenese der MCPH

Die Autosomal-rezessive primäre Mikrozephalie (MCPH) ist eine seltene, genetisch heterogene Erkrankung, die sich durch eine isolierte Entwicklungsstörung insbesondere des zerebralen Kortex auszeichnet. Die Inzidenz wird weltweit auf 1:30.000 - 1:250.000 geschätzt (Übersicht in (3)). MCPH wurde initial durch folgende klinische Merkmale definiert: Reduktion des KU konnatal um mindestens 3 SD, mentale Retardierung ohne weitere neurologischen Anomalien sowie altersentsprechende Körpergröße und Körpergewicht (Übersicht in (4)). Aus Studien mit ausführlichen klinischen und radiologischen Untersuchungen geht allerdings hervor, dass Patienten mit MCPH ein weit heterogeneres Bild zeigen als anfangs angenommen. Die o.g. Hauptkriterien konnten erweitert werden, weil sich zeigte, dass auch eine Reduktion des KU um mindestens 2 SD mit weiterer relativer Reduktion in den ersten Lebensjahren, eine vereinfachte gyrale Struktur und eine milde Epilepsie mit MCPH assoziiert sind. Darüber hinaus sind folgende weitere Symptome und radiologische Auffälligkeiten inkonstant bei Patienten mit MCPH diagnostiziert worden, wobei sich die hierunter genannten Hirnfehlbildungen insbesondere bei Patienten mit MCPH2 zeigten: Verzögerte motorische und sprachliche Entwicklung, Pyramidenbahnzeichen, Hyperaktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung, Aggressivität, Schlafprobleme, Epilepsie, konnatale Hörstörung, Minderwuchs, Pubertas praecox, Syndaktylie, renale Agenesie, polyzystische Nieren, Corpus-callosum-Agenesie, fokale Dysplasie, Mikrogyrie,

Lissenzephalie, Schizenzephalie, subkortikale Heterotopie, zerebellare Hypoplasie, Dymorphie des Hippocampus, perisylvische Polymikrogyrie, Kolpozephalie, vergrößerte Hypophyse, infratentorielle Anomalien und eine Reduktion der weißen Substanz (Übersicht in (3), (5, 6)). Als Ursache der MCPH konnten bisher Mutationen in zwölf Genen identifiziert werden (Tabelle 1). Es besteht eine zusätzliche genetische Heterogenität, da viele klinisch diagnostizierte MCPH-Betroffene bislang noch keinem bekannten Genlocus zugeordnet werden konnten.

Die bisher beschriebenen MCPH-Proteine werden ubiquitär exprimiert und sind zellzyklus-abhängig am Zentrosom bzw. den mitotischen Spindelpolen lokalisiert (Übersicht in (3, 7, 8)). Als zentrosomale Proteine sind sie an der Regulation des Zellzyklus, dessen Kontrollpunkten und der DNA-Reparatur ebenso beteiligt wie an Chromosomenkondensation, Ausbildung und Dynamik des Spindelapparates, Anheftung der Kinetochoren an die Spindel sowie Trennung der durch Mitose entstandenen Tochterzellen und Apoptose (Übersicht in (3)). Durch Genmutationen entstehen abnorme Proteine, die den korrekten Ablauf dieser zellulären Prozesse nicht gewährleisten können. Dies hat weitreichende Folgen in der Neurogenese und somit für die physiologische Entwicklung des Gehirns. Vereinfacht zusammengefasst geht die Entwicklung des zerebralen Kortex des Säugetiers von pluripotenten neuroepithelialen Stammzellen aus, die sich zunächst zur Erweiterung des Stammzellpools symmetrisch proliferierend in jeweils zwei weitere neuroepitheliale Stammzellen teilen. Im weiteren Verlauf der Neurogenese erfolgt die Zellteilung zunehmend asymmetrisch in eine neue Stammzelle und ein Neuron, wobei Letzteres direkt entsteht oder indirekt über radiale Gliazellen respektive basale Vorläuferzellen generiert wird. Basale Vorläuferzellen teilen sich meist einmalig differenzierend in zwei Neurone (Übersicht in (9)). Bei der Unterscheidung zwischen symmetrischer und asymmetrischer Zellteilung scheinen Zellpolarität, Zellzykluslänge und die Orientierung des Spindelapparates von entscheidender Bedeutung zu sein (Übersicht in (8, 9)). Man geht davon aus, dass dem MCPH-Phänotyp mit verringertem Hirnvolumen und verschmälertem Neokortex eine durch Mutation der zentrosomalen MCPH-Proteine bedingte Störung dieser frühen neurogenen Entwicklungsprozesse zugrunde liegt.

Gegenstand der hier dargestellten Forschungsarbeiten ist der genetische Subtyp 3 der MCPH (MCPH3) und das entsprechend fehlerhaft translatierte Protein Cyclin-dependent-kinase-5-regulatory-subunit-associated-Protein 2 (CDK5RAP2), weshalb ich im Folgenden näher auf selbige eingehen möchte.

Tabelle 1. Übersicht über die genetischen Ursachen der MCPH (in Anlehnung an (10)).

Typ	Protein	Gen	Genort	OMIM	Referenz
MCPH1	Mikrocephalin	<i>MCPH1</i>	8q23.1	#251200	(11)
MCPH2	WD-repeat-containing-Protein 62	<i>WDR62</i>	19q13.12	#604317	(12, 13)
MCPH3	Cyclin-dependent-kinase-5-regulatory-subunit-associated-Protein 2	<i>CDK5RAP2</i>	9q33.2	#604804	(14)
MCPH4	Cancer-susceptibility-candidate 5	<i>CASC5</i>	15q15.1	#604321	(15)
MCPH5	Abnormal-spindle-like, microcephaly-associated-Protein	<i>ASPM</i>	1q31.3	#608716	(16)
MCPH6	Centromeric-Protein J	<i>CENPJ</i>	13q12.12	#608393	(14)
MCPH7	SCL/TAL1-interrupting-locus-Protein	<i>STIL</i>	1p33	#612703	(17)
MCPH8	Centrosome-associated-Protein 135 kDa	<i>CEP135</i>	4q12	#614673	(18)
MCPH9	Centrosome-associated-Protein 152 kDa	<i>CEP152</i>	15q21.1	#614852	(19)
MCPH10	Zinc-finger-Protein 335 kDa	<i>ZNF335</i>	20q13.12	#615095	(20)
MCPH11	Polyhomeotic-like-Protein 1	<i>PHC1</i>	12p13.31	#615414	(21)
MCPH12	Cyclin-dependent-kinase-6-Protein	<i>CDK6</i>	7q21.11	#616080	(22)

3.2.2 MCPH3 und CDK5RAP2

Nach seiner Entdeckung (23, 24) und Assoziation zur Erkrankung MCPH3 (OMIM#604804; (14)) erlangte CDK5RAP2 zunehmend Beachtung, weil seine Erforschung tiefere Einblicke in die physiologische Gehirnentwicklung, insbesondere die des zerebralen Kortex erlaubt. Bislang wurden bei Patienten mit MCPH3 eine Nonsense-Mutation in Exon 4 (c.246T>A, p.Tyr82X) (14, 25), eine Spleiß-Mutation in Intron 26 (c.4005-15A>G) (14), eine Nonsense-Mutation in Exon 8 (c.700G>T, p.Glu234X) (26), eine Nonsense-Mutation in Exon 30 (c.4441C>T, p.Arg1481X) (27), eine ‚compound‘ heterozygote Mutation in Exon 7 und Intron 26 (Deletion mit Leserasterverschiebung und späterem Stoppcodon: c.524_528del, p.Gln175ArgfsX42; Spleiß-Mutation: c.4005-1G>A) (28) und eine ‚compound‘ heterozygote Mutation in Exon 30 und Exon 34 (bekannte Nonsense-Mutation: c.4441C>T, p.Arg1481X (27); Nonsense-Mutation: c.5227C>T p.Gln1743X) (29) nachgewiesen. *CDK5RAP2* wird ubiquitär exprimiert und konnte in der Maus und im Menschen insbesondere in stark proliferierenden Geweben und in frühen Embryonalstadien nachgewiesen werden (14, 23, 24, 30, 31). Es ist über den gesamten Zellzyklus hinweg innerhalb der

perizentriolären Matrix lokalisiert und findet sich während der Mitose an den Spindelpolen (14, 32). Die Expression von *Cdk5rap2* wird zellzyklus-abhängig reguliert (33). Es wird von Pericentrin (30) und dynein-abhängig (34) an das Zentrosom rekrutiert und spielt eine wichtige Rolle für die Funktion des Zentrosoms als Organisationszentrum der Mikrotubuli, indem es als Voraussetzung der Mikrotubulibindung die Rekrutierung des γ -Tubulin-Ringkomplexes an das Zentrosom vermittelt (32) und an dynein-abhängigen und -unabhängigen Transportmechanismen von perizentriolären Matrixproteinen für die Spindelpolformation beteiligt ist (35). Durch seinen regulativen Einfluss auf die Verbindung von Mutter- und Tochterzentriole und auf die Verbindung der beiden Zentrosomen bis zu ihrer Trennung im Zuge der Ausbildung der Mitosespindel begrenzt *Cdk5rap2* die Amplifikation von Zentrosomen (33, 36). Eine gestörte Zentrosomenfunktion hat u.a. Auswirkungen auf die Spindelorientierung, die in Zusammenhang mit der Umschaltung von symmetrischer zu asymmetrischer neuraler Stammzellteilung gebracht wird (Übersicht in (8)). CDK5RAP2 ist darüber hinaus für die korrekte Funktion des Spindelkontrollpunkts erforderlich, durch den der Eintritt in die Anaphase erst dann ermöglicht wird, wenn alle Chromosomen korrekt mit den Spindelfasern verbunden sind (37). In Lymphozyten betroffener Patienten konnten wir abnorme Zentrosomen, Spindeldefekte und unpräzise ausgerichtete Metaphase-Chromosomen nachweisen (27). Es gibt u.a. eine durch ionisierende Strahlung erzeugte *Cdk5rap2*-defiziente Mauslinie (*Hertwig's anemia*), die neben einer Mikrozephalie auch multiple Organdefekte, einen hämatologischen Phänotyp (Anämie und Leukopenie) und eine Neigung zur Ausbildung von Tumoren aufweist (38-40). Die aktuell diskutierte Hypothese zur Pathogenese beinhaltet einen vorzeitigen Übergang von symmetrischer zu asymmetrischer Zellteilung der neuralen Vorläuferzellen in der Germinalmatrix, welcher eine Reduzierung des Stammzellpools durch verfrühte Differenzierung und eine verminderte Gesamtzahl an Neuronen nach sich zieht. Daneben scheint auch vermehrter Zelltod zur Manifestation beizutragen (Übersicht in (3), (30, 38, 41)). Eine Störung der Umschaltung zwischen symmetrischer und asymmetrischer Zellteilung und der damit einhergehenden Veränderung der Spindelorientierung dürfte allerdings nicht allein diesen Phänotyp bedingen, da im Mausmodell auch eine Mikrozephalie ohne Defekt der Spindelorientierung nachgewiesen wurde (Übersicht in (42, 43)).

3.3 Sekundäre Mikrozephalie: Angelman-Syndrom

Das Angelman-Syndrom (OMIM#105839) ist eine genetisch bedingte neurologische Entwicklungsstörung, die mit mentaler Retardierung, schweren Sprachstörungen, fazialen Dysmorphien, sekundärer Mikrozephalie, Ataxie, Epilepsie und Verhaltensauffälligkeiten wie leicht zu provozierendem Lachen einhergeht. Weitere, bei weniger als 80% der Patienten vorhandene Symptome umfassen u.a. Zungenprotrusion, vermehrten Speichelfluss und Schluckschwierigkeiten, Muskelhypotonie, Hypopigmentierung, abnorme Schlaf-Wach-Rhythmik, Skoliose und Konstipation (Übersicht in (44)). Die häufigste genetische Ursache ist eine *de novo* Deletion von 5-7 Mb im Bereich 15q11.2-q13 des Chromosoms mütterlicher Herkunft. Daneben konnten auch Mutationen des Ubiquitinligase E3A-Gens (*UBE3A*) im Bereich 15q11.2, eine paternale uniparentale Disomie sowie Imprintingdefekte, die das betroffene maternale Chromosom durch Mikrodeletionen oder Veränderungen der DNA-Methylierung epigenetisch paternal erscheinen lassen, ursächlich verantwortlich gemacht werden (Tabelle 2). Die Ausprägung der Kardinalsymptome geht hauptsächlich auf den Funktionsverlust des *UBE3A* zurück (Übersicht in (44)). Es ist an der Proteinqualitätskontrolle durch proteasomale Degradierung beteiligt, spielt jedoch auch eine Rolle als Koaktivator der Steroidhormontranskription und interagiert mit zahlreichen Proteinen der Zellzyklusregulation, der synaptischen Funktion und Plastizität (Übersicht in (45)). *UBE3A* gehört zu einer Gruppe von Genen, die der genetischen Prägung (Imprinting) unterliegen, d.h. dessen Expression davon abhängt, ob es sich um das Chromosom mütterlicher oder väterlicher Herkunft handelt. *UBE3A* unterliegt gewebe-spezifischem Imprinting und wird im Gehirn vorwiegend maternal exprimiert, sodass es nur bei entsprechenden Veränderungen des Chromosoms mütterlicher Herkunft zur Ausprägung eines Angelman-Syndroms kommt (Übersicht in (45)). Ist das väterliche Chromosom betroffen, so resultiert daraus die Manifestation eines Prader-Willi-Syndroms (OMIM#176270).

Tabelle 2. Genetische Ursachen des Angelman-Syndroms (in Anlehnung an (44)).

Bereich	Art der Veränderung	Häufigkeit
15q11.2-q13	Deletion von 5-7 Mb	65-75%
15q11.2	<i>UBE3A</i> -Mutation	5-11%
Chromosom 15	Paternale uniparentale Disomie	3-7%
Imprinting-Zentrum	Mikrodeletionen oder Veränderungen der DNA-Methylierung	3%

3.4 Zielsetzung

Hereditäre Mikrozephalien unterliegen unterschiedlicher Pathogenese. Im Rahmen meiner Promotion habe ich mich mit den Ursachen zweier hereditärer Mikrozephalien auseinandergesetzt, mit der MCPH3 als Beispiel für eine primäre Mikrozephalie und dem Angelman-Syndrom als Beispiel für eine sekundäre Mikrozephalie.

Obgleich Patienten mit MCPH vorwiegend neurologische Symptome aufweisen, beruhen die einleitend dargestellten bisherigen Erkenntnisse zur zellulären Funktion von CDK5RAP2 auf Studien an nicht-neuralen Zellen, vorwiegend an humanen Tumorzellen und murinen embryonalen Fibroblasten. Die Diskrepanz zwischen ubiquitärer Expression und isoliert neuralem Phänotyp ist nur unzureichend verstanden. Ziel war daher die Etablierung eines *in vitro* Modells zur Charakterisierung von Cdk5rap2-defizienten mESZ in Proliferation und Differenzierung als wichtige Grundlage zur präzisen Beschreibung des Defektes bei MCPH3.

Darüber hinaus weckte eine Patientin in unserer Klinik mit sekundärer Mikrozephalie und klinischem Verdacht auf Angelman-Syndrom mein Interesse, da sie in den ersten Lebensmonaten wiederholt unter schwersten Infektionen litt und keine Berichte über eine solche ungewöhnliche Symptomkonstellation vorlagen.

Die Ziele meiner Dissertationsarbeit waren im Einzelnen:

- Etablierung und systematische Charakterisierung eines *in vitro* Modells für die Autosomal-rezessive primäre Mikrozephalie Typ 3
- Identifizierung und Charakterisierung von putativen Interaktionspartnern des Cdk5rap2-Proteins
- Identifizierung der genetischen Ursache bei einer Patientin mit schweren Infektionen, globaler Retardierung und sekundärer Mikrozephalie

4. Material und Methoden

4.1. Humane Proben

Das Einverständnis der Eltern der Patientin für die Publikation der klinischen Daten und die Durchführung humangenetischer Untersuchungen liegt vor. Blutentnahmen für Forschungszwecke wurden parallel zu denen durchgeführt, die klinisch notwendig waren. Die DNA wurde anschließend aus den EDTA-Blutproben mit Standardmethoden extrahiert. Alle Untersuchungen wurden durch die Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin genehmigt (EA1/212/08).

4.2 Murine Proben

C57Bl/6 Mäuse wurden in der Tierhaltung der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, erworben. Der Tag der Insemination wurde als Embryonaltag 0 (E0) bezeichnet, der Tag der Geburt als postnataler Tag 0 (P0). Der zerebrale Kortex von Mäusen im Alter von E10, E12, E14, E16, P0, P5, P10, P20 und P56 präpariert, das Gewebe schock-gefroren und bei -80 °C für weitere Analysen aufbewahrt. Alle Experimente wurden im Einklang mit den Bedingungen des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin durchgeführt (T0309/09).

4.3 Murine embryonale Stammzellen

Undifferenzierte murine embryonale Stammzellen (mESZ) der Linie W4/129S6 wurden in Dulbecco's-modified-Eagle's-Medium mit 4,5 g/l Glukose (DMEM; Gibco, Darmstadt, Deutschland) und 15% fetalem Kälberserum (FBS; Gibco), 2 mM Glutamin (Gibco), 50 U/ml Penicillin (Gibco), 50 µg/ml Streptomycin (Gibco), 1% nicht-essenziellen Aminosäuren (Gibco), 0,1 mM β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 1000 U/ml murinem Leukämie-inhibierenden Faktor (mLIF; unterhält den Stammzellcharakter (46); Chemicon, Hofheim, Deutschland), kultiviert. Das Medium für W4/shRNAi- und W4/scramble-Kulturen (siehe 4.6) enthielt zusätzlich 2 µg/ml Puromycin (Sigma-Aldrich) zur Selektion shRNAi-infizierter Zellen. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und alle 2-3 Tage passagiert (47).

4.4 Neurale Differenzierung der murinen embryonalen Stammzellen

Die Induktion der Differenzierung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Visan et al. 2012 (48). Am Tag vor Induktion der Differenzierung wurden die Zellen mit hoher Dichte ($7,8 \times 10^4$ Zellen/cm²) in unter 4.3. beschriebenem Erhaltungsmedium auf nicht-

beschichteten Zellkulturplatten ausplattiert und an Tag 1 auf mit Poly-L-Ornithin (15 µg/ml in phosphatgepufferter Salzsäure (1x PBS); Sigma-Aldrich) beschichteten Glasträgern in Zellkulturplatten in N2B27-Medium mit einer Dichte von 6×10^3 Zellen/cm² übertragen. Das N2B27-Medium bestand zur einen Hälfte aus DMEM/F12-GlutaMAX™-Medium (Gibco), welchem N2-Zusatz (1:100; Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), 20 µg/ml Insulin (Sigma-Aldrich), 300 µg/ml Rinderserumalbumin Fraktion V (Sigma-Aldrich), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurden, und zur anderen Hälfte aus Neurobasal™ Medium (Gibco), welchem B27-Zusatz (1:50; Invitrogen) und 0,1 mM β-Mercaptoethanol beigefügt wurden. Das Medium für W4/shRNAi- und W4/scramble-Kulturen enthielt zusätzlich 1 µg/ml Puromycin. An Tag 1 der Differenzierungsinduktion enthielt das N2B27-Medium zusätzlich 0,2% FBS für eine bessere Zelladhäsion und 1 µg/ml Laminin (Sigma-Aldrich) zur Stimulation der Bildung neuraler Vorläuferzellen (NVZ) (49). Der Mediumwechsel an Tag 5 wurde mit N2B27-Medium durchgeführt, welches 1 µg/ml Laminin enthielt. Es folgte ein Mediumwechsel an Tag 7 mit N2B27-Medium, welches mit 1 µg/ml Laminin und 10 ng/ml humaner Rinderfibroblastenwachstumsfaktor 2 (bFGF), einem wichtigen Faktor zur Formation von neuralem Gewebe bei Säugetieren (Übersicht in (50)), versetzt war. Die weiteren Medienwechsel erfolgten alle 2-3 Tage mit 10 ng/ml bFGF in N2B27-Medium (Abbildung 1) (47).

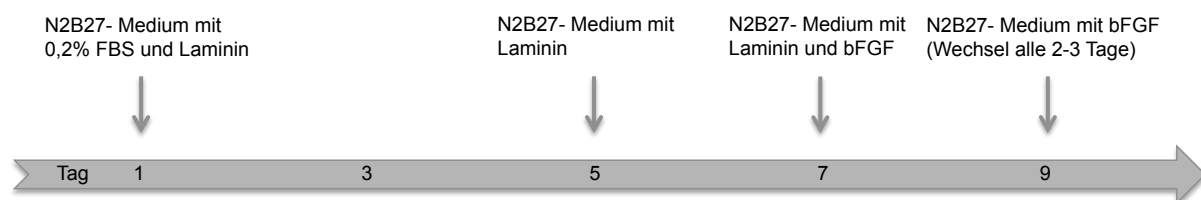


Abbildung 1. Prozedur der Induktion der neuralen Differenzierung bei mESZ.

4.5 Nicht-neurale Differenzierung der murinen embryonalen Stammzellen

Die nicht-gerichtete und die in spontan kontraktile Kardiomyozyten (51) gerichtete Differenzierung von mESZ erfolgte unter Abwesenheit von mLIF nach den in unserer Publikation (47) beschriebenen Verfahren in Erhaltungsmedium. Das Medium für W4/shRNAi- und W4/scramble-Kulturen enthielt zusätzlich 2 µg/ml Puromycin.

4.6 Lentivirus-vermittelte *Cdk5rap2*-Runterregulierung

Stabil *Cdk5rap2*-runterregulierte mESZ-Zelllinien wurden mit MISSION® shRNAi lentiviral transduction particles (W4/shRNAi; Sigma-Aldrich) nach dem modifizierten Protokoll des Herstellers generiert, wobei vier unterschiedlich lokalisierte shRNAi-Konstrukte (47) und als negative Kontrolle MISSION® non-target shRNAi lentiviral transduction particles (W4/scramble; Sigma-Aldrich) zur Anwendung kamen. Auf eine 96-Well-Platte wurden je Well 7×10^4 Zellen in 110 μ l Medium ausplattiert, welches aus DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 10% FBS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin, 1% nicht-essenziellen Aminosäuren, 0,1 mM β -Mercaptoethanol, 1000 U/ml mLIF und 4 μ g/ml Hexadimethrinbromid (zur Verbesserung der Transduktionseffizienz; Sigma-Aldrich) zusammengesetzt war. Nach 24-stündiger Inkubation mit den Transduktionspartikeln bei 37 °C und 5% CO₂ erfolgte der erste Mediumwechsel mit Erhaltungsmedium. Bis Tag 5 nach Infektion wurde alle 24 Stunden ein Wechsel mit Erhaltungsmedium durchgeführt, welchem nun 2 μ g/ml Puromycin zur Selektion der infizierten Zellen beigefügt waren. Im Verlauf erfolgte die Expansion der Zellkulturen sowie die Etablierung einzelner stabil *Cdk5rap2*-runterregulierter Klone für weitere Untersuchungen (47).

4.7 Humane Zytogenetik und Array-CGH

Für die konventionelle Chromosomenanalyse wurden Lymphozyten der Patientin in der Metaphase fixiert und nach Standardmethodik in GTG-Bänderung mit einer Auflösung von etwa 10 Mb analysiert. Die aus ihren Lymphozyten und denen der Eltern extrahierte DNA wurde verwendet, um eine Microarray-basierte komparative genomische Hybridisierung (Array-CGH) mittels 244K-Oligonukleotid Array der Firma Agilent (Santa Clara, CA, USA) nach Anweisungen des Herstellers durchzuführen. Für die Analyse der elterlichen DNA wurde eine individualisierte Array-CGH verwendet. Mittels Array-CGH lassen sich submikroskopische unbalancierte chromosomale Veränderungen mit einer Auflösung von 100 kb aufspüren, die mit Hilfe der CGHPRO Software (Max Planck Institut, Berlin, Deutschland) evaluiert und anschließend nach den Erläuterungen zum humanen Genom, Version NCBI36.1/HG18, lokalisiert wurden (52).

4.8 Quantifizierung von Zellviabilität, Proliferation und Apoptose

Die Zellviabilität undifferenzierter mESZ wurde mit Hilfe des CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA), die differenzierender

mESZ unter Anwendung des CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) jeweils nach den Empfehlungen des Herstellers bestimmt. Die Ermittlung der Proliferationsrate erfolgte einerseits durch manuelle Zellzählung in einem Neubauer Hämocytometer und andererseits mittels Cell Proliferation BrdU-ELISA (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers. Zur Quantifizierung apoptotischer Zellen wurde der ApoONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega) angewendet. Die Daten wurden mit Microsoft Excel (Microsoft, Bellevue, WA, USA) und GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) weiter aufbereitet (47).

4.9 RNA-Extraktion und quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Aus den jeweiligen Hirngeweben und Zellen wurde RNA entsprechend den Herstellerempfehlungen für TRI-Reagent® (Sigma-Aldrich) extrahiert, sowie Konzentration, Reinheit und Integrität geprüft. Die reverse Transkription von 1 µg RNA zu cDNA erfolgte mit dem ThermoScript® RT-PCR System (Invitrogen). Die qPCR wurde im Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems Inc., Norwalk, CT, USA) durchgeführt. Die Reaktionslösung mit einem Volumen von jeweils 13 µl beinhaltete 1 µl 1:10 verdünnte cDNA, 1xTaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® *UNG* (Roche, Branchburg, NJ, USA), 385 nM Vorwärtsprimer, 385 nM Rückwärtsprimer und 230 nM Sonde. Die genaue Basenfolge der Primer und Sonden ist in unseren Publikationen angegeben (47, 53). Die Läufe wurden jeweils in Triplets mit 3-6 Mäuseproben pro Gruppe bzw. mit 6 Zellkulturproben pro Gruppe durchgeführt. Bei Überschreiten der Fluoreszenzschwelle erfolgte die Aufzeichnung der jeweiligen Anzahl an Quantifizierungszyklen (C_q -Werte) durch die 7500 Fast System SDS Software (Applied Biosystems Inc.). Berechnungen und Statistik nach der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ - Methode wurden mit Microsoft Excel (Microsoft) und GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software Inc.) durchgeführt (53).

4.10 Immunzytologie

Die auf Glaträgern ausplattierten Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd fixiert, dreimal mit 1x PBS gespült und anschließend zur Blockierung unspezifischer Bindungen und Permeabilisierung der Zellen 30 Minuten in Puffer A (0,2% Gelatine und 0,25% Triton X-100 in 1x PBS, mit 10% Eselserum versetzt) inkubiert. Über Nacht wurden die Zellen mit dem Erstantikörper und anschließend 2 Stunden mit dem

entsprechenden Zweitantikörper (47) jeweils in Puffer A inkubiert. Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; 1:1000, Sigma-Aldrich) markiert. Die fluoreszenzgefärbten Zellpräparate wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Olympus BX51 und der Magnafire 2.1B Software (Olympus, Hamburg, Deutschland) analysiert und fotografiert. Zur anschließenden Bildbearbeitung diente Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Inc., San José, CA, USA). Die Quantifizierung der Zellclustergröße und -anzahl erfolgte nach Fixation und Markierung der Zellkerne mit DAPI an Tag 5 und 8 nach Induktion der neuralen Differenzierung. Hierzu wurden jeweils sieben Ausschnitte à 2,312 mm² fotografiert und mit ImageJ Software (Open Source, National Institute of Health, USA) analysiert (47).

4.11 Massenspektroskopie

Zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner von Cdk5rap2 wurden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) Proteinbanden in Kollaboration mit Prof. Joachim Klose, Institut für Humangenetik, Charité - Universitätsmedizin Berlin, mittels Massenspektroskopie durch Elektrosprayionisation (ESI-MS) analysiert. Die Proteinidentifikation erfolgte mit dem TurboSEQUEST-Algorithmus (University of Washington, Seattle, WA, USA) und der MASCOT Software, Version 2.1 (Matrix Science Ltd, London, UK).

4.12 Co-Immunpräzipitation

Zur Proteinextraktion wurden murine Gehirne präpariert, in Puffer (20 mM Tris HCl pH 8, 137 mM NaCl, 10% Glycerol, 2 mM Ethylendiamintetraacetat, 0,2% Triton X-100) mit Proteaseinhibitoren (10 µl 10 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Sigma-Aldrich) und 1 Tablette Complete Mini (Roche Diagnostics)) lysiert und homogenisiert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers unter Verwendung eines Bicinchoninsäure-basierten Kits (BCA Protein Assay Kit; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Über Nacht wurden jeweils 500 µl Proteinextrakt mit 10 µl N-terminalem Cdk5rap2-Antikörper unserer Arbeitsgruppe (31) auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde EZview Red Protein A Affinity Gel (Sigma-Aldrich) hinzugefügt und die Proben weitere 4 Stunden bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Hiernach wurde nicht gebundenes Protein mehrfach ausgewaschen. Zur Proteindenaturierung und Ablösung von den Gelperlen wurden die Proben 5 Minuten im Wasserbad auf 95°C erhitzt und anschließend 5 Minuten auf Eis

gestellt. Auftrennung und Detektion der potentiellen Interaktionspartner von Cdk5rap2, die durch dieses Verfahren gebunden an Cdk5rap2 aus dem Proteinlysate angereichert wurden, erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

4.13 Western Blot

Zur Proteinextraktion wurden die Zellen in Radioimmunopräzipitationspuffer (RIPA) mit o.g. Proteaseinhibitoren homogenisiert und die Proteinkonzentrationen mit dem BCA Protein Assay Kit bestimmt. Die Proteinproben wurden in Laemmli-Puffer denaturiert, mittels SDS-PAGE separiert und mit Hilfe einer Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cell (BioRad, München, Deutschland) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit primärem und entsprechendem sekundären Antikörper inkubiert (31, 47). Die Visualisierung und Detektion auf einem Röntgenfilm erfolgte auf Grundlage der Chemolumineszenz.

5. Ergebnisse

Im Folgenden möchte ich zuerst auf die Ergebnisse der Experimente zur Etablierung und Charakterisierung eines *in vitro* Modells für MCPH3 (47) sowie die Auswahl eines entsprechend geeigneten Referenzgens für Genexpressionsanalysen eingehen (53), dann auf die Identifizierung und Charakterisierung potentieller Interaktionspartner des Cdk5rap2 und anschließend von Klinik und Genetik unserer Patientin mit sekundärer Mikrozephalie berichten (52).

5.1 Primäre Mikrozephalie: Cdk5rap2 in Proliferation und Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen

5.1.1 RNA-Polymerase II als Referenzgen für Expressionsanalysen an mESZ

Eine wichtige Voraussetzung für Studien der Genexpression mittels qPCR ist die Normierung auf ein parallel analysiertes Referenzgen, welches in allen verwendeten Zell- bzw. Gewebeproben und unter den entsprechenden experimentellen Bedingungen möglichst stabil exprimiert wird. Unsere fünf Kandidaten als interner Standard für mESZ waren die Gene *β-Aktin*, *ribosomales Protein 18s*, *Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*, *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase* und *RNA-Polymerase II (RpII)*. Zur Evaluation der Expressionsstabilität dienten vier Kriterien: 1. Quartile der C_q -Werte, 2. *Fold Change* (fold change = $2^{-\Delta C_q}$; $\Delta C_q = C_q - \text{Mittelwert } C_q$) (54), 3.

Variationskoeffizient (Variationskoeffizient = $SD / \text{Mittelwert } C_q$) (55), 4. (Maximum $C_q - 2 SD$) - Mittelwert C_q (55). Unter den Kandidaten erwies sich *Rpl1* hiernach als das in mESZ am stabilsten exprimierte Gen. Für weitere Details zu geeigneten Referenzgenen für Genexpressionsanalysen, die das murine Gehirn in seiner Entwicklung betreffen, verweise ich auf den zweiten Teil unserer Publikation (53).

5.1.2 Cdk5rap2 in undifferenzierten und neural differenzierenden mESZ

Nach der Etablierung eines geeigneten Referenzgens für Expressionsanalysen an mESZ lag unser Fokus auf der Charakterisierung von *Cdk5rap2* in mESZ. Undifferenzierte proliferierende mESZ wuchsen in der Mehrzahl in semiadhärenten Zellgruppen und waren zu 97% immunopositiv für den Stammzellmarker Octamer-binding-transcription-factor-Protein (Oct4). In den ersten Tagen nach Induktion der neuralen Differenzierung entwickelten sich hieraus rosettenähnliche Konglomerate, aus denen ab Tag 8 ein zunehmendes Aussprossen langgestreckter Zellausläufer zu beobachten war, die im weiteren Verlauf ein dichtes Netzwerk zwischen den expandierenden Zellverbänden bildeten. Die rosettenähnlichen Konglomerate bestehend aus NVZ mit apikal-basaler Polarität sind vergleichbar mit der Formation des Neuralrohrs (56). Während an Tag 5 noch 91% der Konglomerate Oct4-immunopositiv waren, sank ihr Anteil bis Tag 8 auf 2%, wobei sich in der gleichen Zeit zunehmend frühe Neurone ausbildeten, identifizierbar durch Mikrotubule-associated-Protein 2 (Map2). Reife Neurone, immunopositiv für Neuronal-nuclei-Protein (NeuN), waren ab Tag 8 mit steigender Anzahl in der Peripherie der rosettenähnlichen Konglomerate nachweisbar. Erste Glial-fibrillary-acidic-Protein (Gfap) immunopositive Gliazellen konnten ab Tag 15 detektiert werden. Proliferierende Zellen befanden sich fortwährend im Zentrum (Abbildung 2).

Wir konnten zeigen, dass *Cdk5rap2* in undifferenzierten mESZ, ebenso wie in murinen Fibroblasten (33) und humanen Lymphozyten (27), über den gesamten Zellzyklus mit den zentrosomalen Proteinen Pericentrin und γ -Tubulin kolokalisiert und seine Expression zellzyklus-abhängig reguliert wird. Auch im Verlauf der neuralen Differenzierung blieb diese Kolokalisation bestehen. Während das in der immunzytologischen Färbung punktförmige, zentrosomale *Cdk5rap2*-Signal über die Zellcluster undifferenzierter mESZ gleichmäßig verteilt erschien, war *Cdk5rap2* im Stadium der Rosettenbildung (etwa ab Tag 5) streng zentralisiert darstellbar. Mit dem Fortschritt der Neurogenese (Tag 8-12) zeigte sich eine zentral eher ringförmige

Anordnung des Cdk5rap2-Signals (Abbildung 2). Diese basalen, ab Tag 5 zu beobachtenden Cdk5rap2-immunopositiven Zentrosomen könnten als sogenannte *basal bodies* fungieren. Von ihnen gingen azetyliertes- α -tubulin-immunopositive primäre Zilien aus, die in das Lumen der Rosetten reichten. Mit immunzytologischen Färbungen konnten wir Cdk5rap2 in undifferenzierten mESZ, NVZ, frühen Neuronen und Gliazellen, nicht aber in reifen Neuronen nachweisen, was unseren Erkenntnissen aus Untersuchungen des murinen und humanen Neokortex in der Entwicklung entspricht (31). Die *Cdk5rap2*-Expression, quantifiziert mittels qPCR, sank mit Induktion der Differenzierung, erreichte aber mit Einsetzen der Gliogenese erneut hohe Level (47).

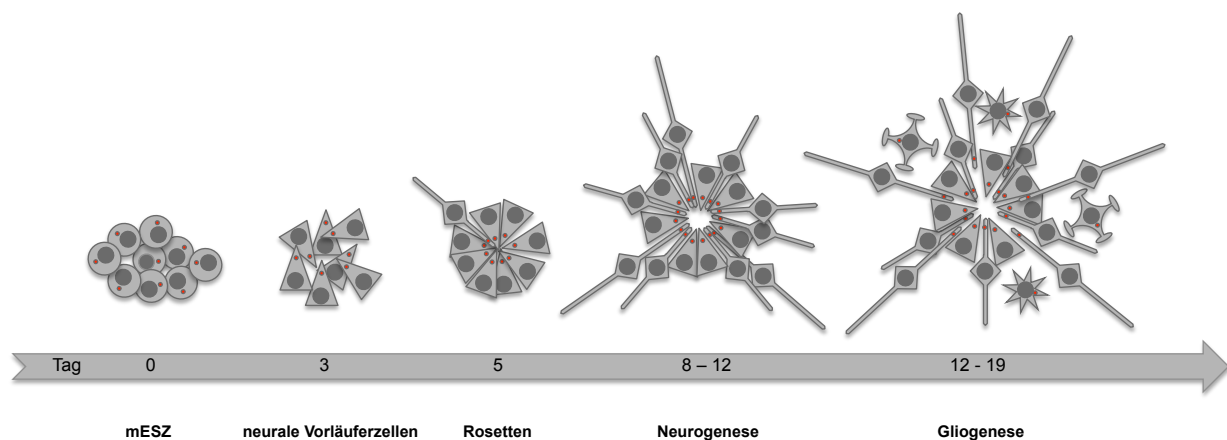


Abbildung 2. Schematische Übersicht über die neurale Differenzierung der mESZ.

Tag 1 entspricht dem Tag der Differenzierungsinduktion. Kleine rote Kreise = Cdk5rap2-Signal, kreisförmige Zellen = undifferenzierte mESZ, dreieckige = NVZ, rhaboide mit kurzen Ausläufern = frühe Neurone, rhaboide mit langen Ausläufern = reife Neurone, sternförmige = Gliazellen. Die Abbildung ist Teil unserer Publikation (47).

5.1.3 Auswirkungen einer *Cdk5rap2*-Runterregulierung

Um eine effiziente durch lentivirale shRNAi vermittelte *Cdk5rap2*-Runterregulierung in mESZ zu erreichen, testeten wir den Effekt von vier, unterschiedliche Sequenzen erkennenden shRNAi-Konstrukten. Wir bestätigten die *Cdk5rap2*-Runterregulierung durch immunzytologische Färbungen, qPCR sowie Western Blot und selektierten Einzelzellklone des shRNAi-Konstrukt B mit einer Reduktion auf ~20% (starke Runterregulierung) bzw. ~40% (mittelstarke Runterregulierung) für weitere Analysen. Als negative Kontrollen dienten nicht infizierte und mit unspezifischer shRNAi infizierte Zellklone.

Wir untersuchten zunächst die Auswirkungen der *Cdk5rap2*-Runterregulierung auf undifferenzierte mESZ, da die Entstehung von MCPH mit einem Defekt der Zellproliferation in Verbindung gebracht wurde. Im Vergleich zur Kontrollsituation war die Proliferationsrate kongruent zur Stärke der *Cdk5rap2*-Runterregulierung vermindert. Eine Korrelation zur Apoptoserate war nicht zu beobachten. Ebenfalls korrelierend mit dem sinkenden *Cdk5rap2*-Gehalt stellten sich die Interphase-Zellen *Cdk5rap2*-immunonegativ dar, wohingegen die wenigen mitotischen Zellen der *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellklone ein im Vergleich zur Kontrollsituation erheblich abgeschwächtes *Cdk5rap2*-Signal mit kolokalisiertem Pericentrin, intakten Mitosespindeln sowie einem weiterhin kolokalisierten γ -Tubulin zeigten, dessen Signal sich aber weniger punktuell darstellte. Eine Veränderung der Gesamtmenge an γ -Tubulin zeigte sich im Western Blot nicht.

Nach Induktion der neuralen Differenzierung bei stark *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellklonen imponierten ein massiv ausgeprägter Proliferationsdefekt und eine Störung der Rosettenformation mit Kontaktverlust von Zellen zum Zellkonglomerat. Sie überlebten nur den Beginn des Differenzierungsprozesses und waren bis Tag 8 abgestorben, weshalb wir auch die Effekte einer Runterregulierung auf etwa 40% der *Cdk5rap2*-Expression näher untersuchten. Diese mittelstark *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellklone formierten im Vergleich zur Kontrollsituation zwar deutlich weniger rosettenähnliche Zellkonglomerate, überlebten aber im Gegensatz zu den stark *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellklonen die Differenzierung und bildeten normal große Zellkonglomerate aus (Abbildung 3). Wir stellten fest, dass das verminderte Wachstum der *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellkulturen sowohl auf reduzierte Proliferation als auch auf vermehrte Apoptose, insbesondere in den ersten Tagen, zurückzuführen ist. Nach Induktion neuraler und nicht-gerichteter Differenzierung konnte der Stammzellmarker Oct4 bei *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellklonen länger nachgewiesen werden. Eindrucksvoll war die Erhöhung des relativen Anteils von Oct4: an Tag 6 nach nicht-gerichteter Differenzierung beispielsweise waren 86-100% der überlebenden Zellen Oct4-immunopositiv im Vergleich zu 41-48% in der Kontrollsituation. Diese Beobachtungen sprechen für den Verlust soeben in die Differenzierung eingetretener Zellen bei kompensatorisch erhöhter Fraktion proliferierender Zellen. Bei sh3, einem mittelstark *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellklon, konnten an Tag 15 mehr NeuN-immunopositive reife Neurone dokumentiert werden als in der Kontrollsituation, was durch vorzeitige Ausdifferenzierung bedingt sein könnte. NeuN-immunopositive

Neurone formierten sich in abnormalen Zellverbänden am Rande der Konglomerate (Abbildung 3).

Aufgrund der rein neuralen Manifestation von MCPH trotz ubiquitärer *CDK5RAP2*-Expression untersuchten wir, ob die Differenzierung von mESZ in kontraktile Kardiomyozyten (51) durch *Cdk5rap2*-Runterregulierung beeinflusst wird. Die kardiiale Differenzierung von sh1, einem stark *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellklon, zeigte keine Auffälligkeiten im Vergleich zu derjenigen nicht infizierter und mit unspezifischer shRNAi infizierter Zellklone (47).

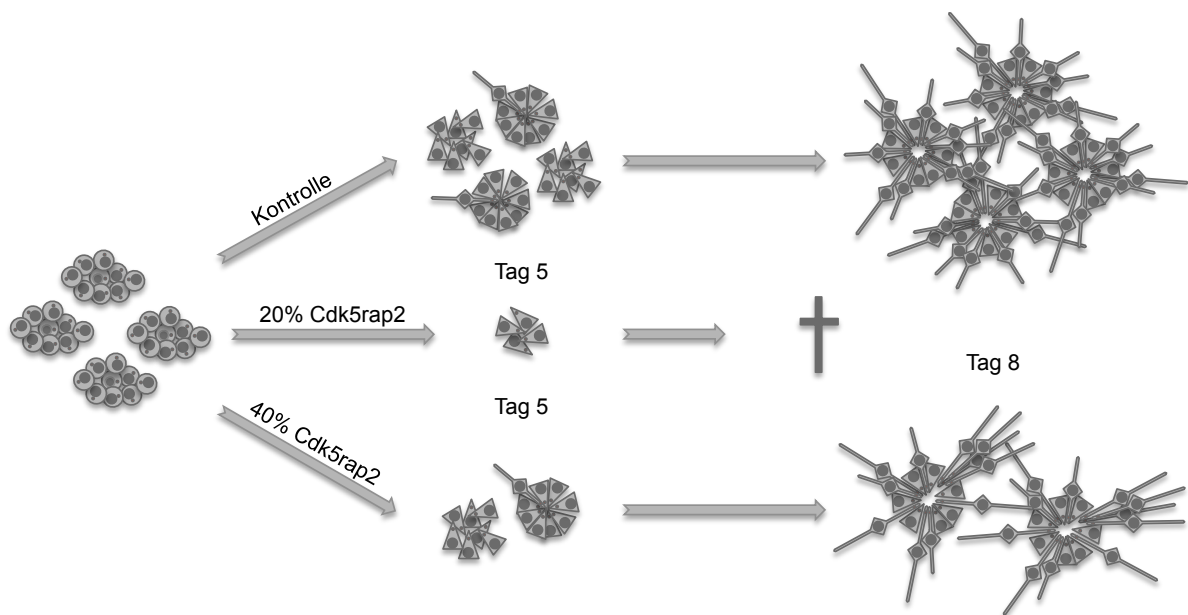


Abbildung 3. Systematische Übersicht zu den Auswirkungen einer *Cdk5rap2*-Runterregulierung in mESZ nach Induktion der neuralen Differenzierung. Die obere Reihe beschreibt die Kontrollsituation ohne Lentivirus-Infektion und bei Infektion mit unspezifischer siRNAi. Die mittlere Reihe stellt die Situation in stark *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellklonen dar, die untere Reihe diejenige in mittelstark *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellklonen. Die Symbole entsprechen denen der Abbildung 2. Das Kreuz bildet das Absterben der Zellkultur ab.

5.1.4 Potentielle Interaktionspartner von *Cdk5rap2*

Durch Co-Immunpräzipitation und massenspektroskopische Analysen in Kollaboration mit Prof. Joachim Klose, Institut für Humangenetik, Charité - Universitätsmedizin Berlin, konnten etwa 50 potentiell mit *Cdk5rap2* interagierende Proteine erfasst werden, deren Funktionen insbesondere in den Bereichen Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zytoskelettaufbau und Vesikeltransport liegen. Wir begannen die Charakterisierung

potentieller Interaktionspartner durch Western Blot und mRNA-Expressionsanalysen mittels qPCR sowohl mit Zellproben unseres *in vitro* Modells für MCPH3 als auch mit murinen Gehirnproben. Diesbezügliche Experimente werden in unserer Arbeitsgruppe fortgeführt.

5.2 Sekundäre Mikrozephalie: Patientin mit Angelman-Syndrom und schweren Infektionen

5.2.1 Klinische Beschreibung

Unsere Patientin wurde als erstes Kind nicht-blutsverwandter Eltern termingerecht, ohne Komplikationen, eutroph und mit normalem KU (35 cm, 50. Perzentile) geboren. Anfangs fiel sie durch einen schwachen Saugreflex, Muskelhypotonie und faziale Dysmorphien auf. Im Säuglings- und Kleinkindalter litt sie unter schweren Infektionen, wie einer *Staphylococcus aureus*-Sepsis, einer bakteriellen Meningitis und einer Osteomyelitis des Unterkiefers, und hatte im Rahmen zahlreicher kleinerer Infektionen Fieberkrämpfe. Im Alter von 20 Monaten war sie ein auffallend fröhliches Mädchen. Sie hatte eine globale Entwicklungsverzögerung, sekundäre Mikrozephalie (KU 43 cm, 2,2 cm unterhalb der 3. Perzentile), verminderte Körpergröße und Körpergewicht, Hypopigmentierung, Konstipation und Schlafprobleme entwickelt. Zu diesem Zeitpunkt konnte sie nur mit Unterstützung sitzen. Mit 3 Jahren und 9 Monaten war das Laufen an der Hand und mit Nancy-Hilton-Orthesen möglich. Bei der letzten Untersuchung im Alter von dreieinhalb Jahren wog sie 14,5 kg (25. Perzentile), war 95 cm groß (10.-25. Perzentile) und hatte einen KU von 46,5 cm (0,8 cm unterhalb der 3. Perzentile). Die Patientin hat das Sprechen bislang nicht erlernt, eine schwere Hörstörung konnte aber ausgeschlossen werden. Obgleich sie wiederholt unter Fieberkrämpfen litt, entwickelte sie bisher keine Epilepsie. Zahlreiche weitere Untersuchungen, insbesondere eine intensive immunologische Diagnostik, blieben ohne pathologischen Befund. Es wurden genetische Untersuchungen veranlasst. Klinisch bestand der Verdacht auf ein Angelman-Syndrom, wobei die schweren Infektionen damit nicht in Einklang zu bringen waren.

5.2.2 Humangenetische Befunde

Der Befund einer konventionellen Chromosomenanalyse war unauffällig, woraufhin eine Array-CGH-Untersuchung initiiert wurde. Auf diese Weise konnte eine Deletion von etwa 5 Mb im Bereich 15q11.2 – q13.1 (chr15:21,213,950-26,208,646 (hg18)), welcher

das *UBE3A*-Gen enthält (Abbildung 4A), nachgewiesen werden. Auch hinsichtlich ihrer Größe ist dies eine häufige Mutation in Zusammenhang mit dem Angelman-Syndrom (Übersicht in (44)). Zusätzlich konnte eine Mikrodeletion mit der Länge von 364 kb im Bereich 2q21.3 (chr2:135,606,958-135,970,874 (hg18)) identifiziert werden. Die Mikrodeletion schließt mehrere Exons der Gene *RAB3GAP1*, welches mit dem Warburg-Mikro-Syndrom (#614225) assoziiert ist, und *ZRANB3*, für das ein Krankheitsbezug bisher nicht hergestellt werden konnte, ein (Abbildung 4B). Hinsichtlich der ausgeschriebenen Namen der Gene verweise ich auf das Abkürzungsverzeichnis im Anhang.

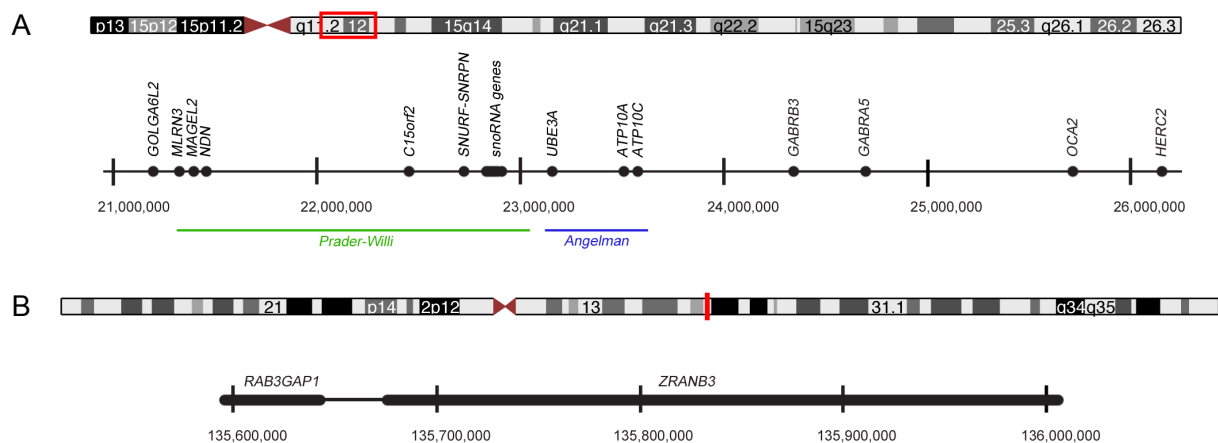


Abbildung 4. Position der deletierten Gene unserer Patientin. A. Bereich 15q11.2–q13.1. Die grüne Linie umfasst die Gene, deren Funktionsverlust auf dem Chromosom väterlicher Herkunft mit dem Prader-Willi-Syndrom einhergeht. Die blaue Linie umfasst jene Gene, die, wie in unserem Fall, mit der Entstehung des Angelman-Syndroms vergesellschaftet sind, wenn sie auf dem Chromosom mütterlicher Herkunft mutiert oder deletiert sind. **B. Mikrodeletion im Bereich 2q21.3.** Die Abbildung ist Teil unserer Publikation (52). Daten und Graphik basieren auf dem UCSC Genome Browser (NCBI36/hg18). Die Positionen der Gene sind durch Skalierung der Basenpaare wiedergegeben.

6. Diskussion

Die Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen mit Mikrozephalien konnte bislang nicht vollständig geklärt werden, dessen Erforschung würde jedoch auch wertvolle Erkenntnisse zu fundamentalen physiologischen Mechanismen erlauben. Gegenstand meiner Promotion war die Untersuchung der Ursachen zweier Formen genetisch bedingter Mikrozephalie, zum einen der MCPH auf Ebene der zellulären Grundlagenforschung und zum anderen des Angelman-Syndroms auf klinisch-genetischer Ebene.

Die MCPH ist eine seltene genetisch bedingte Erkrankung, die sich vordergründig durch eine Entwicklungsstörung des zerebralen Kortex mit verringerter Anzahl von Neuronen auszeichnet (Übersicht in (3, 7)). Das derzeitige Erklärungsmodell zur Pathogenese der MCPH geht von einem vorzeitigen Übergang von symmetrischer zu asymmetrischer Zellteilung während der Neurogenese mit dem Resultat eines verringerten Stammzellpool durch verfrühte neuronale Differenzierung aus. Wir konnten für MCPH3 zeigen, dass zudem ein akkumulierender Proliferationsdefekt sowie vermehrter Zelltod neuraler Vorläuferzellen und früher Neurone eine Rolle spielen. Hierzu etablierten wir ein *in vitro* Modell mit undifferenzierten und neural differenzierenden mESZ, welches die neurale Entwicklung bei Patienten mit MCPH3 überzeugend imitiert, um die Auswirkungen einer *Cdk5rap2*-Runterregulierung insbesondere auf Proliferation und Differenzierung zu untersuchen (47).

Eine wichtige Voraussetzung für etwaige Genexpressionsanalysen mittels qPCR war die Auswahl eines in diesem experimentellen System stabil exprimierten Referenzgens. Für mESZ erwies sich *Rpl1* nach mehreren parallel angewandten Analysestrategien als geeignet. Für die Einordnung und Empfehlungen, die murines Gehirngewebe in der Entwicklung betreffen, verweise ich auf den zweiten Teil unserer Publikation (53).

In unserem *in vitro* Modell für MCPH3 konnten wir die Kolokalisation von *Cdk5rap2* mit γ -Tubulin (32) und Pericentrin (30) erstmals auch in mESZ bestätigen. Dessen Expression in Oct4-immunopositiven proliferierenden Zellen, frühen Neuronen und Gliazellen, nicht aber in reifen Neuronen, steht im Einklang mit unseren Untersuchungen am murinen und humanen Neokortex (31). Nach Induktion der neuralen Differenzierung von mESZ setzte eine auffällige Umverteilung der punktförmig zentrosomalen *Cdk5rap2*-Signale in der immunzytologischen Färbung ein: Während diese anfangs im Stadium undifferenzierter mESZ gleichmäßig über die Zellverbände verteilt waren, konnte nach Induktion der neuralen Differenzierung eine Ansammlung im

Zentrum der rosettenähnlichen Konglomerate beobachtet werden, die sich später im Zuge der Entwicklung reifer Neurone und Gliazellen wieder auflöste. Die Entwicklung von NVZ aus mESZ und Anordnung in rosettenähnlichen Konglomeraten mit anschließender neuraler Ausdifferenzierung ähnelt hinsichtlich der Verteilung apikaler und basaler Proteine sowie Zellorganellen stark der Situation im embryonalen Neuralrohr (56, 57). Eine solch spezifische Zentralisation des Cdk5rap2-Signals in Assoziation zu Zentrosomen und sog. *basal bodies* legt deshalb die Vermutung nahe, dass Cdk5rap2 auch eine Bedeutung für die Organisation der Zellverbände im Differenzierungsprozess zukommt, es beispielsweise, wie auch für andere zentrosomale Proteine gezeigt wurde (58), eine Rolle in der Polarisierung der Zelle innehält.

Die *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellklone imponierten bereits in undifferenziertem Stadium durch eine reduzierte Proliferationsrate in Korrelation mit dem Gehalt an Cdk5rap2. Die vergleichenden Immunfärbungen zeigten nur in den wenigen mitotischen Zellen ein zentrosomales Cdk5rap2-Signal, welches abgeschwächt und wie auch in humanen Lymphozyten (27) mit Pericentrin sowie γ -Tubulin kolokalisiert war, dessen unscharfer Begrenzung des in den Kontrollzellen auffallend punktuellen Signals eine mangelhafte Rekrutierung des γ -Tubulin-Ringkomplex (32, 35) zugrunde liegen könnte, da der Gesamtgehalt an γ -Tubulin im Western Blot unverändert war. Durch Cdk5rap2-Defizienz ausgelöste Defekte der Mitosespindeln, wie sie für humane Lymphozyten (27), die *Hertwig's anemia* Maus (38), HeLa- und HEK-Zellen (35, 59) beschrieben wurden, konnten wir in mESZ nicht beobachten. Allerdings zeigten die wenigen mitotischen Zellen der Kultur auch immer ein schwaches Cdk5rap2-Signal.

Nach Induktion der Differenzierung akkumulierten die Auswirkungen der *Cdk5rap2*-Runterregulierung hinsichtlich des Proliferationsdefektes. Zusätzlich konnten wir eine erhöhte Apoptoserate und ein „Ausbrechen“ der frühen differenzierenden Zellen aus dem Zellverband beschreiben. Die Effekte waren umso stärker ausgeprägt, je weniger Cdk5rap2 der Zellklon enthielt. In stark *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellklonen kam es zu einer massiven Störung der Rosettenbildung mit Absterben der Kultur, was o.g. Ausführungen zur Rolle von Cdk5rap2 für die Polarisierung unterstützt. Auch mittelstark *Cdk5rap2*-runterregulierte Zellklone entwickelten deutlich weniger differenzierende Konglomerate. Proliferierende NVZ sind essentiell für den Erhalt des kontinuierlichen Nachschubs an Zellen, die in die Differenzierung eintreten. Eine solch starke Affektion der Proliferation durch Cdk5rap2-Defizienz steht im Einklang mit Beobachtungen am

murinen Neokortex, für den eine Reduktion von apikalen Vorläuferzellen und ein vorzeitiger Austritt aus dem Zellzyklus gezeigt wurden (30, 38). Dass auch eine vorzeitige Ausdifferenzierung mit daraus folgender Reduzierung des Stammzellpools bei der Entwicklung von MCPH3 eine Rolle zu spielen scheint (30), können wir durch unsere Beobachtungen in mittelstark *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellkulturen unterstreichen, in denen an Tag 15 vermehrt NeuN-immunopositive reife Neurone trotz insgesamt reduzierter Zellzahl identifizierbar waren.

Es bleibt unklar, warum Patienten mit MCPH3 trotz ubiquitärer Expression von *Cdk5rap2*, das auch im reifenden Hippocampus und Cerebellum menschlicher Föten sowie in zahlreichen weiteren Organen nachgewiesen werden konnte (31), nur in Ausnahmefällen von Schädigungen außerhalb des Neokortex betroffen sind. Die Induktion der Differenzierung unserer *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellklone sowohl nicht-gerichtet als auch in spontan kontraktile Kardiomyozyten zeigte ebenfalls keinerlei Auffälligkeiten im Vergleich zur Kontrollsituation. Eine Erklärung für diesen singulären Phänotyp könnte die Beteiligung von Mechanismen sein, die wie die apikal-basale Polarisierung von essentieller Bedeutung für die neurale Differenzierung sind (Übersicht in (9)). Zumindest jedoch scheint der Verlust von CDK5RAP2 in anderen Geweben ausgleichbar zu sein.

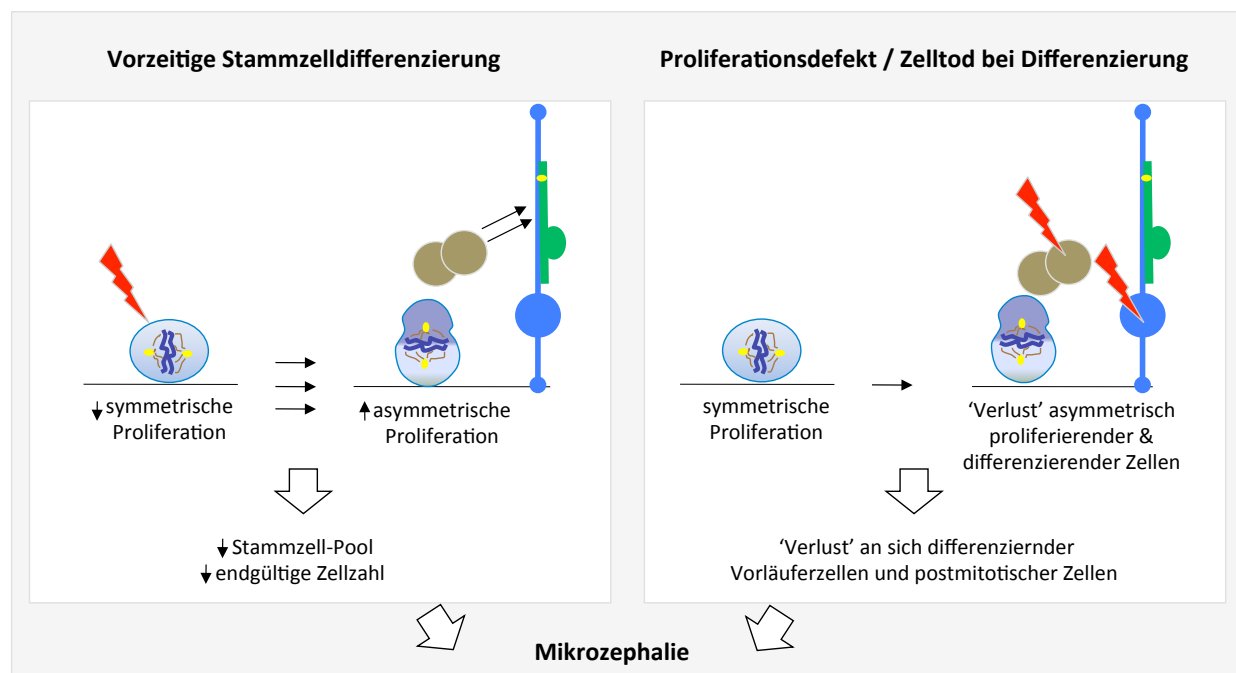


Abbildung 5. Schematische Darstellung des möglichen Pathomechanismus der MCPH. Die Abbildung ist Teil unserer Publikation (47) in Anlehnung an die deutsche Version hiervon (60).

Insgesamt stützen unsere Ergebnisse die eingangs dargestellte Hypothese zur Pathogenese von MCPH3, die die Auswirkungen der Genmutation in Zusammenhang mit vorzeitiger neuraler Differenzierung mit dem Resultat eines verringerten neuronalen Stammzellpool stellen. Durch die auf unserem *in vitro* Modell für MCPH3 basierenden Erkenntnisse können wir diesen Erklärungsansatz jedoch dahingehend erweitern, dass auch progressiver Zellverlust im frühen Verlauf der Differenzierung durch einen akkumulierenden Proliferationsdefekt und vermehrten Zelltod neuraler Vorläuferzellen sowie früher Neurone einen wichtigen Beitrag zur Manifestation der MCPH3 zu leisten scheint (Abbildung 5). Die in unserem *in vitro* Modell für MCPH3 nachgewiesene Akkumulierung des Defektes während der neuralen Differenzierung impliziert darüber hinaus, dass eine Cdk5rap2-Defizienz auch Störungen der Zellpolarität sowie der neuronalen Ausreifung und Migration hervorzurufen scheint, die u.a. entscheidend von der intrazellulären Positionierung des Zentrosoms beeinflusst werden (61).

Unsere Patientin mit sekundärer Mikrozephalie zeigte nicht allein Symptome, die im Kleinkindalter die klinische Diagnose eines Angelman-Syndroms nahe legten, sondern fiel bereits als Säugling mit rekurrierenden, teilweise schweren Infektionen auf. Eine daraufhin umfangreich durchgeführte immunologische Diagnostik blieb jedoch ohne pathologischen Befund. Die fortbestehende Infektionsneigung des Mädchens ist im Zusammenhang mit dem Angelman-Syndrom sehr ungewöhnlich und bisher nur im Fall eines 5-jährigen Jungen beschrieben worden, der an infektiöser Mononukleose verstarb (62). Die bei unserer Patientin und ihren Eltern initiierten humangenetischen Untersuchungen brachten eine *de novo* Mutation von rund 5 Mb im Bereich 15q11.2–q13.1 sowie eine von der gesunden Mutter vererbte Mikrodeletion mit einer Länge von 364 kb im Bereich 2q21.3 ans Licht. Während die erste Mutation auch in Bezug auf ihre Größe eine häufige Mutation im Zusammenhang mit dem Angelman-Syndrom darstellt (Übersicht in (44, 63)), ist die Mikrodeletion bisher nicht als Polymorphismus beschrieben worden, sodass eine klinische Relevanz nicht ausgeschlossen werden kann. Die Mikrodeletion enthält Exons der Gene *RAB3GAP1*, dessen Mutation mit dem Warburg Mikrosyndrom assoziiert ist, und *ZRANB3*, welches keinen vorbeschriebenen Krankheitsaspekt besitzt. Der Verlust des im Gehirn vorwiegend maternal imprinteten Gens *UBE3A*, welches eine Ligase des Ubiquitin-Proteasom-Systems kodiert, ist essentiell mit der Manifestation des Angelman-Syndroms assoziiert (Übersicht in (44)). Die Gene der 5-Mb-Deletion, die nicht dem Imprinting unterliegen, können zur

Ausprägung des Phänotyps beitragen, wie in unserem Falle der Verlust des *OCA2*-Gens, welches mit okulokutanem Albinismus Typ II (OMIM#203200, autosomal-rezessiv) assoziiert ist und aufgrund einer postulierten Semidominanz für die Hypopigmentierung bei Patienten mit Angelman-Syndrom verantwortlich gemacht wird. Da jedoch auch Patienten mit alleiniger *UBE3A*-Mutation und Hypopigmentierung bekannt sind, scheint daneben ein *UBE3A*-abhängiger Mechanismus zu existieren. Ein Ansatz hierfür ist die Beobachtung einer Minderexpression des Melanocortin-1-Rezeptors in einer *Ube3a*-defizienten Mauslinie (Übersicht in (45)). Mit erhöhter Infektionsneigung sind die genetischen Veränderungen bisher nicht in Verbindung gebracht worden. Wir tragen mit diesem Fallbericht zum Verständnis des Phänotyps des Angelman-Syndroms mit zusätzlicher Symptomatik bei. Die zunehmende Anwendung der Array-CGH-Untersuchung und die Publikation ähnlicher Fälle könnte zur Klärung beitragen. Einen Krankheitswert der Mikrodeletion können wir nicht vollständig ausschließen.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass *UBE3A* auch mit dem mit MCPH5-assoziiertem Protein *ASPM* interagiert, insbesondere während der Mitose am Zentrosom lokalisiert ist und an der Regulation der Chromosomensegregation beteiligt ist (64). Singhmar et al. 2011 konstatierten in Anbetracht ihrer Ergebnisse in *UBE3A*-runterregulierten HEK-Zellen, dass es in Folge von Aneuploidie durch fehlerhafte Chromosomensegregation vermehrt zu Zelltod käme, wodurch die Balance zwischen Proliferation und Zelltod in der neuronalen Entwicklung gestört würde und liefern so einen Erklärungsansatz, der bei der Ausprägung der Mikrozephalie im Angelman-Syndrom eine Rolle spielen könnte. Direkte oder indirekte Interaktionen zwischen den MCPH-assoziierten Proteinen zu entschlüsseln, könnte einen tieferen Einblick in die molekularen Zusammenhänge bieten. Es war deshalb unser Anliegen, potentielle Interaktionspartner von *Cdk5rap2* ausfindig zu machen. Dessen Charakterisierung, die weiterhin in unserer Arbeitsgruppe fortgeführt wird, könnte einen Beitrag zu einem besseren molekularen Verständnis leisten. Die Etablierung unseres auf mESZ basierenden *in vitro* Modells für MCPH3 eröffnet eine Vielzahl von experimentellen Möglichkeiten, *Cdk5rap2* und die Auswirkungen einer *Cdk5rap2*-Defizienz im Detail zu studieren und auf diese Weise wertvolle Erkenntnisse zu grundlegenden physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen der Gehirnentwicklung zu gewinnen.

7. Literaturverzeichnis

1. Abuelo D. Microcephaly syndromes. *Seminars in pediatric neurology*. 2007;14(3):118-27.
2. Seltzer LE, Paciorkowski AR. Genetic disorders associated with postnatal microcephaly. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics*. 2014;166C(2):140-55.
3. Kaindl AM, Passemard S, Kumar P, Kraemer N, Issa L, Zwirner A, et al. Many roads lead to primary autosomal recessive microcephaly. *Progress in neurobiology*. 2010;90(3):363-83.
4. Woods CG, Bond J, Enard W. Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings. *American journal of human genetics*. 2005;76(5):717-28.
5. Bilguvar K, Ozturk AK, Louvi A, Kwan KY, Choi M, Tatli B, et al. Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *Nature*. 2010;467(7312):207-10.
6. Farag HG, Froehler S, Oexle K, Ravindran E, Schindler D, Staab T, et al. Abnormal centrosome and spindle morphology in a patient with autosomal recessive primary microcephaly type 2 due to compound heterozygous WDR62 gene mutations. *Orphanet journal of rare diseases*. 2013;8(1):178.
7. Thornton GK, Woods CG. Primary microcephaly: do all roads lead to Rome? *Trends in genetics : TIG*. 2009;25(11):501-10.
8. Megraw TL, Sharkey JT, Nowakowski RS. Cdk5rap2 exposes the centrosomal root of microcephaly syndromes. *Trends in cell biology*. 2011;21(8):470-80.
9. Florio M, Huttner WB. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development*. 2014;141(11):2182-94.
10. Kaindl AM. Autosomal recessive primary microcephalies (MCPH). *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*. 2014.
11. Jackson AP, Eastwood H, Bell SM, Adu J, Toomes C, Carr IM, et al. Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain. *American journal of human genetics*. 2002;71(1):136-42.
12. Nicholas AK, Khurshid M, Desir J, Carvalho OP, Cox JJ, Thornton G, et al. WDR62 is associated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly. *Nature genetics*. 2010;42(11):1010-4.

13. Yu TW, Mochida GH, Tischfield DJ, Sgaier SK, Flores-Sarnat L, Sergi CM, et al. Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture. *Nature genetics*. 2010;42(11):1015-20.
14. Bond J, Roberts E, Springell K, Lizarraga SB, Scott S, Higgins J, et al. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nature genetics*. 2005;37(4):353-5.
15. Genin A, Desir J, Lambert N, Biervliet M, Van Der Aa N, Pierquin G, et al. Kinetochore KMN network gene CASC5 mutated in primary microcephaly. *Human molecular genetics*. 2012;21(24):5306-17.
16. Bond J, Roberts E, Mochida GH, Hampshire DJ, Scott S, Askham JM, et al. ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nature genetics*. 2002;32(2):316-20.
17. Kumar A, Girimaji SC, Duvvari MR, Blanton SH. Mutations in STIL, encoding a pericentriolar and centrosomal protein, cause primary microcephaly. *American journal of human genetics*. 2009;84(2):286-90.
18. Hussain MS, Baig SM, Neumann S, Nurnberg G, Farooq M, Ahmad I, et al. A truncating mutation of CEP135 causes primary microcephaly and disturbed centrosomal function. *American journal of human genetics*. 2012;90(5):871-8.
19. Guernsey DL, Jiang H, Hussin J, Arnold M, Bouyakdan K, Perry S, et al. Mutations in centrosomal protein CEP152 in primary microcephaly families linked to MCPH4. *American journal of human genetics*. 2010;87(1):40-51.
20. Yang YJ, Baltus AE, Mathew RS, Murphy EA, Evrony GD, Gonzalez DM, et al. Microcephaly gene links trithorax and REST/NRSF to control neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell*. 2012;151(5):1097-112.
21. Awad S, Al-Dosari MS, Al-Yacoub N, Colak D, Salih MA, Alkuraya FS, et al. Mutation in PHC1 implicates chromatin remodeling in primary microcephaly pathogenesis. *Human molecular genetics*. 2013;22(11):2200-13.
22. Hussain MS, Baig SM, Neumann S, Peche VS, Szczepanski S, Nurnberg G, et al. CDK6 associates with the centrosome during mitosis and is mutated in a large Pakistani family with primary microcephaly. *Human molecular genetics*. 2013;22(25):5199-214.
23. Ching YP, Qi Z, Wang JH. Cloning of three novel neuronal Cdk5 activator binding proteins. *Gene*. 2000;242(1-2):285-94.
24. Nagase T, Kikuno R, Hattori A, Kondo Y, Okumura K, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIX. The complete sequences of

100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes. 2000;7(6):347-55.

25. Hassan MJ, Khurshid M, Azeem Z, John P, Ali G, Chishti MS, et al. Previously described sequence variant in CDK5RAP2 gene in a Pakistani family with autosomal recessive primary microcephaly. BMC medical genetics. 2007;8:58.
26. Pagnamenta AT, Murray JE, Yoon G, Sadighi Akha E, Harrison V, Bicknell LS, et al. A novel nonsense CDK5RAP2 mutation in a Somali child with primary microcephaly and sensorineural hearing loss. American journal of medical genetics. Part A. 2012;158A(10):2577-82.
27. Issa L, Mueller K, Seufert K, Kraemer N, Rosenkotter H, Ninnemann O, et al. Clinical and cellular features in patients with primary autosomal recessive microcephaly and a novel CDK5RAP2 mutation. Orphanet journal of rare diseases. 2013;8:59.
28. Tan CA, Topper S, Ward M, Melver C, Stein J, Reeder A, Arndt K, et al. The first case of CDK5RAP2-related primary microcephaly in a non-consanguineous patient identified by next generation sequencing. Brain & development. 2013.
29. Li MH, Arndt K, Das S, Weiss EM, Wu Y, Gwal K, et al. Compound heterozygote CDK5RAP2 mutations in a Guatemalan/Honduran child with autosomal recessive primary microcephaly, failure to thrive and speech delay. American journal of medical genetics. Part A. 2015;167(6):1414-7.
30. Buchman JJ, Tseng HC, Zhou Y, Frank CL, Xie Z, Tsai LH. Cdk5rap2 interacts with pericentrin to maintain the neural progenitor pool in the developing neocortex. Neuron. 2010;66(3):386-402.
31. Issa L, Kraemer N, Rickert CH, Sifringer M, Ninnemann O, Stoltenburg-Didinger G, et al. CDK5RAP2 Expression During Murine and Human Brain Development Correlates with Pathology in Primary Autosomal Recessive Microcephaly. Cerebral cortex. 2013;23(9):2245-60.
32. Fong KW, Choi YK, Rattner JB, Qi RZ. CDK5RAP2 is a pericentriolar protein that functions in centrosomal attachment of the gamma-tubulin ring complex. Molecular biology of the cell. 2008;19(1):115-25.
33. Barrera JA, Kao LR, Hammer RE, Seemann J, Fuchs JL, Megraw TL. CDK5RAP2 regulates centriole engagement and cohesion in mice. Developmental cell. 2010;18(6):913-26.
34. Jia Y, Fong KW, Choi YK, See SS, Qi RZ. Dynamic recruitment of CDK5RAP2 to centrosomes requires its association with dynein. PloS one. 2013;8(7):e68523.

35. Lee S, Rhee K. CEP215 is involved in the dynein-dependent accumulation of pericentriolar matrix proteins for spindle pole formation. *Cell cycle*. 2010;9(4):774-83.
36. Graser S, Stierhof YD, Nigg EA. Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. *Journal of cell science*. 2007;120(Pt 24):4321-31.
37. Zhang X, Liu D, Lv S, Wang H, Zhong X, Liu B, et al. CDK5RAP2 is required for spindle checkpoint function. *Cell cycle*. 2009;8(8):1206-16.
38. Lizarraga SB, Margossian SP, Harris MH, Campagna DR, Han AP, Blevins S, et al. Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. *Development*. 2010;137(11):1907-17.
39. Barker JE, Bernstein SE. Hertwig's anemia: characterization of the stem cell defect. *Blood*. 1983;61(4):765-9.
40. Russell ES, McFarland EC, Peters H. Gametic and pleiotropic defects in mouse fetuses with Hertwig's macrocytic anemia. *Developmental biology*. 1985;110(2):331-7.
41. Fish JL, Kosodo Y, Enard W, Paabo S, Huttner WB. Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(27):10438-43.
42. Fietz SA, Huttner WB. Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis-a polarized perspective. *Current opinion in neurobiology*. 2011;21(1):23-35.
43. Peyre E, Morin X. An oblique view on the role of spindle orientation in vertebrate neurogenesis. *Development, growth & differentiation*. 2012;54(3):287-305.
44. Williams CA, Driscoll DJ, Dagi AI. Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2010;12(7):385-95.
45. Bird LM. Angelman syndrome: review of clinical and molecular aspects. *The application of clinical genetics*. 2014;7:93-104.
46. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. 1988;336(6200):684-7.
47. Kraemer N, Ravindran E, Zaqout S, Neubert G, Schindler D, Ninnemann O, et al. Loss of CDK5RAP2 affects neural but not non-neural mESC differentiation into cardiomyocytes. *Cell cycle*. 2015;14(13):2044-57.

48. Visan A, Hayess K, Sittner D, Pohl EE, Riebeling C, Slawik B, et al. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells as a tool to assess developmental neurotoxicity in vitro. *Neurotoxicology*. 2012;33(5):1135-46.
49. Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mechanisms of development*. 1996;59(1):89-102.
50. Levine AJ, Brivanlou AH. Proposal of a model of mammalian neural induction. *Developmental biology*. 2007;308(2):247-56.
51. Seiler AE, Spielmann H. The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity in vitro. *Nature protocols*. 2011;6(7):961-78.
52. Neubert G, von Au K, Drossel K, Tzschach A, Horn D, Nickel R, et al. Angelman syndrome and severe infections in a patient with de novo 15q11.2-q13.1 deletion and maternally inherited 2q21.3 microdeletion. *Gene*. 2013;512(2):453-5.
53. Kraemer N, Neubert G, Issa L, Ninnemann O, Seiler AE, Kaindl AM. Reference genes in the developing murine brain and in differentiating embryonic stem cells. *Neurological research*. 2012;34(7):664-8.
54. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*. 2004;37(1):112-4, 6, 8-9.
55. Zampieri M, Ciccarone F, Guastafierro T, Bacalini MG, Calabrese R, Moreno-Villanueva M, et al. Validation of suitable internal control genes for expression studies in aging. *Mechanisms of ageing and development*. 2010;131(2):89-95.
56. Abranches E, Silva M, Pradier L, Schulz H, Hummel O, Henrique D, et al. Neural differentiation of embryonic stem cells in vitro: a road map to neurogenesis in the embryo. *PloS one*. 2009;4(7):e6286.
57. Sathananthan AH. Neural stem cells in neurospheres, embryoid bodies, and central nervous system of human embryos. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*. 2011;17(4):520-7.
58. Manning JA, Colussi PA, Koblar SA, Kumar S. Nedd1 expression as a marker of dynamic centrosomal localization during mouse embryonic development. *Histochemistry and cell biology*. 2008;129(6):751-64.
59. Kim S, Rhee K. Importance of the CEP215-pericentrin interaction for centrosome maturation during mitosis. *PloS one*. 2014;9(1):e87016.

60. Kraemer N, Morris-Rosendahl DJ, Kaindl AM. Primäre autosomal-rezessive Mikrozephalie (MCPH). Neuropädiatrie in Klinik und Praxis. 2013;12(1):5-12.
61. Kuijpers M, Hoogenraad CC. Centrosomes, microtubules and neuronal development. Molecular and cellular neurosciences. 2011;48(4):349-58.
62. Herbst J, Byard RW. Sudden death and Angelman syndrome. Journal of forensic sciences. 2012;57(1):257-9.
63. Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. Nature genetics. 1997;15(1):70-3.
64. Singhmar P, Kumar A. Angelman syndrome protein UBE3A interacts with primary microcephaly protein ASPM, localizes to centrosomes and regulates chromosome segregation. PloS one. 2011;6(5):e20397.

8. Abkürzungsverzeichnis

Zur Kennzeichnung von Genen wurden in der vorliegenden Arbeit die Abkürzungen in kursiver Schreibweise verwendet, zu derjenigen von Proteinen die in nicht-kursiver Schreibweise. Humane Gene bzw. Proteine sind durch Großbuchstaben kenntlich gemacht, murine Gene bzw. Proteine entsprechend durch Kleinbuchstaben.

Array-CGH	Microarray-basierte komparative genomische Hybridisierung („microarray-based comparative genomic hybridization“)
ASPM	Abnormal-spindle-like-microcephaly-associated-Protein
ATP10A/C	ATPase-class-V-type-10A/-10C
b	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
bFGF	Rinderfibroblastenwachstumsfaktor 2
C15orf2	Chromosome-15-open-reading-frame-Protein 2
CASC5	Cancer-susceptibility-candidate 5
CDK5RAP2	Cyclin-dependent-kinase-5-regulatory subunit-associated-Protein 2
CDK6	Cyclin-dependent-kinase-6-Protein
CEP 152	Centrosome-associated-Protein 152 kDa
CEP 135	Centrosome-associated-Protein 135 kDa
CENPJ	Centromeric-Protein J

C _q -Wert	Anzahl der Quantifizierungszyklen
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's-modified-Eagle's-Medium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
E	Embryonaler Tag
FBS	fetales Kälberserum („fetal bovine serum“)
g	Gramm
GABRA5	GABA _A -Receptor alpha 5
GABRB3	GABA _A -Receptor beta 3
Gfap	Glial-fibrillary-acidic-Protein
GOLGA6L2	Golgin-subfamily-A-member-6-like-Protein
GTG-Bänder	G-Bänder, durch Behandlung mit Trypsin und Giemsa Färbung („G-bands by trypsin using Giemsa“)
HERC2	HECT-and-RLD-domain-containing-E3-ubiquitin-Proteinligase 2
KU	frontookzipitaler Kopfumfang
l	Liter
m	Meter
M	Molar
Map2	Microtubule-associated-Protein 2
MAGEL2	Magel-like-Protein 2
MCPH	Autosomal-rezessive primäre Mikrozephalie („microcephaly primary hereditary“)
mESC	„murine embryonic stem cells“
mESZ	murine embryonale Stammzellen
MKRN3	Makorin 3
NDN	Necdin
NeuN	Neuronal-nuclei-Protein
NVZ	neurale Vorläuferzellen
OCA2	Oculocutaneous-albinism-II-Protein
Oct4	Octamer-binding-Protein 4
OMIM	Online-Datenbank für Gene und Erbkrankheiten des Menschen („Online Mendelian Inheritance in Man“)
P	Postnataler Tag

PBS	phosphatgepufferte Salzsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid
qPCR	quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion
RAB3GAP1	RAB3-GTPase-activating-Protein, katalytische Untereinheit 1
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
RpII	RNA-Polymerase II
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
shRNAi	kleine haarnadelförmige interferierende RNA („short hairpin RNA interference“)
SNRPN	Small-nuclear-ribonucleoprotein-Polypeptid N
SNURF	SNRPN-upstream-reading-frame-Protein, transcript variant 2
STIL	SCL/TAL1-interrupting-locus-Protein
U	Unit
UBE3A	Ubiquitin-Proteinligase E3A
WDR62	WD-repeat-containing-Protein 62 kDa
ZNF335	Zinc-finger-Protein 335 kDa
ZRANB3	Zinc-finger-RNA-binding-domain-containing-Protein 3

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Gerda Neubert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Hereditäre Mikrozephalien: Charakterisierung des Pathomechanismus der Autosomal-rezessiven primären Mikrozephalie Typ 3 und klinisch-genetischer Aspekt bei Angelman-Syndrom“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, den 5. August 2015

Gerda Neubert

10. Anteilserklärung an den ausgewählten Publikationen

Ich, Gerda Neubert, hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Nadine Kraemer, Ethiraj Ravindran, Sami Zaqout, Gerda Neubert, Detlev Schindler, Olaf Ninnemann, Ralph Gräf, Andrea E. M. Seiler, Angela M. Kaindl, **Loss of CDK5RAP2 affects neural but not non-neural mESC differentiation into cardiomyocytes**, *Cell Cycle* 2015; 14(13):2044-57.

Beitrag im Einzelnen:

Quantifizierung der *Cdk5rap2*-Expression mittels qPCR in undifferenzierten mESZ (W4-Kontrollkulturen, W4/scramble- und verschiedene W4/shRNAi-Kulturen), Durchführung von Differenzierungsreihen und Anfertigung immunzytologischer Färbungen, Mitetablierung eines Transfektionsprotokolls zur Überexpression von *Cdk5rap2*, Charakterisierung potentieller Interaktionspartner (Immunpräzipitation und Quantifizierung der mRNA-Expression mittels qPCR in Abhängigkeit vom *Cdk5rap2*-Gehalt), Mitwirken an der Anfertigung der Abbildungen.

Publikation 2:

Nadine Kraemer, Gerda Neubert, Lina Issa, Olaf Ninnemann, Andrea E. M. Seiler, Angela M. Kaindl, **Reference genes in the developing murine brain and in differentiating embryonic stem cells**, *Neurological Research* 2012; 34(7):664-8.

Beitrag im Einzelnen:

Quantifizierung der Expression möglicher Referenzgene murin und *in vitro* mittels qPCR, Qualitätsprüfung der RNA-Proben und reverse Transkription zu cDNA-Proben für die qPCR, Aufarbeitung der Daten mit Hilfe von Microsoft Excel und Graph Pad Prism, Erarbeitung möglicher Analysestrategien und anhand dessen Evaluation der Expressionsstabilität möglicher Referenzgene sowohl murin als auch *in vitro*, Schreiben des Manuskriptes, Anfertigen der Abbildungen und Tabellen.

Publikation 3:

Gerda Neubert, Katja von Au, Katrin Drossel, Andreas Tzschach, Denise Horn, Renate Nickel, Angela M. Kaindl, **Angelman syndrome and severe infections in a patient with de novo 15q11.2–q13.1 deletion and maternally inherited 2q21.3 microdeletion**, *Gene* 2012; 512(2):453-5.

Beitrag im Einzelnen:

Re-Evaluation des klinischen Falles, Exploration der genetischen Veränderungen und deren Krankheitsrelevanz, Schreiben des Manuskriptes, Anfertigen der Abbildungen, Bearbeitung des Manuskriptes zur Wiedervorlage bei *Gene*.

Berlin, den 5. August 2015

Gerda Neubert

11. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

11.1 Publikation 1

Loss of CDK5RAP2 affects neural but not non-neural mESC differentiation into cardiomyocytes

Nadine Kraemer, Ethiraj Ravindran, Sami Zaqout, Gerda Neubert, Detlev Schindler, Olaf Ninnemann, Ralph Gräf, Andrea E. M. Seiler, Angela M. Kaindl

<http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1044169>

Autosomal-rezessive primäre Mikrozephalie Typ 3 (MCPH3), verursacht durch biallele Mutationen des *CDK5RAP2*-Gens, zeichnet sich durch eine isolierte Entwicklungsstörung insbesondere des Neokortex aus, was sie als Modellerkrankung für die Entstehung von Mikrozephalien und Untersuchungen des Gehirnwachstums prädestiniert. Man geht derzeit davon aus, dass ein verfrühter Wechsel von symmetrischer zu asymmetrischer Zellteilung mit konsekutiver Reduktion des neuronalen Stammzellpools der Entwicklung primärer Mikrozephalien zugrunde liegt. Aufgrund des isoliert neuronalen Phänotyps trotz ubiquitärer *CDK5RAP2*-Expression und Berichten von Patienten mit postnatal progredienter Mikrozephalie, entwickelten wir ein MCPH3 *in vitro* Modell mit murinen embryonalen Stammzellen, welches in geeigneter Weise die neuronale Entwicklung bei Patienten mit MCPH nachahmt, um neben der Stammzellproliferation detailliert und vergleichend die neurale und nicht-neurale Zelldifferenzierung zu untersuchen. In den *Cdk5rap2*-runterregulierten Zellkulturen zeigten sich ein ausgeprägter akkumulierender Proliferationsdefekt, Störungen der Rosettenbildung, eine verfrüht einsetzende neurale Differenzierung und progressiver Zellverlust insbesondere zu Beginn der neuronalen Differenzierung. Derartige Defizite waren nach Induktion einer nicht-gerichteten Differenzierung bzw. der Differenzierung in spontan kontraktile Kardiomyozyten nicht zu beobachten. Dies spiegelt die Tatsache des rein neuronalen Phänotyps der Patienten mit MCPH wider.

Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit der derzeitigen Hypothese zur Pathogenese der MCPH. Sie legen darüber hinaus nahe, dass Störungen der Zellpolarität und der neuronalen Ausreifung mit progressivem Zellverlust und vermindertem Zellüberleben zur Pathogenese beitragen. Unser MCPH3 *in vitro* Modell bietet vielfältige experimentelle Möglichkeiten, die künftig zum weiteren Verständnis physiologischer und pathogenetischer Zusammenhänge beitragen können.

11.2 Publikation 2

Reference genes in the developing murine brain and in differentiating embryonic stem cells

Nadine Kraemer, Gerda Neubert, Lina Issa, Olaf Ninnemann, Andrea E. M. Seiler, Angela M. Kaindl

<http://dx.doi.org/10.1179/1743132812Y.0000000060>

Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Real-time PCR sind ein wichtiger Bestandteil biomedizinischer Forschung. Eine Normierung auf ein im jeweiligen experimentellen System möglichst stabil exprimiertes Referenzgen ist hierfür essentiell. Aufgrund starker Variabilität der Expressionsstabilität, u.a. abhängig von der Art des Gewebes und den experimentellen Bedingungen, steht kein universelles Referenzgen zur Verfügung. In der vorliegenden Publikation beschreiben wir die Evaluation fünf häufig verwendeter Referenzgene durch parallele Anwendung verschiedener Analysestrategien und präsentieren so die erste systematische Untersuchung des zeitlichen Einflusses auf die Expressionsstabilität potentieller Referenzgene in murinen embryonalen Stammzellen und in murinem Neocortex im Verlauf der Differenzierung bzw. während der Entwicklung. Wir können für undifferenzierte und neural differenzierende murine embryonale Stammzellen *RNA-Polymerase II* als Referenzgen empfehlen und für Expressionsanalysen am murinen Neokortex im Verlauf der Entwicklung *Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* oder *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase*.

11.3 Publikation 3

Angelman syndrome and severe infections in a patient with de novo 15q11.2–q13.1 deletion and maternally inherited 2q21.3 microdeletion

Gerda Neubert, Katja von Au, Katrin Drossel, Andreas Tzschach, Denise Horn, Renate Nickel, Angela M. Kaindl

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.061>

Das Angelman-Syndrom ist eine genetisch bedingte Erkrankung, die sich insbesondere durch sekundäre Mikrozephalie, mentale Retardierung, Sprachstörungen, Ataxie und Verhaltensauffälligkeiten wie leicht zu provozierendem Lachen auszeichnet. In der vorliegenden Publikation beschreiben wir die Suche nach der genetischen Ursache bei einer Patientin, die zwar einen klinischen Phänotyp entwickelte, der mit der Diagnose eines Angelman-Syndroms vereinbar war, die aber zudem unter rezidivierenden, teilweise schweren Infektionen litt, ein Symptom, das im Zusammenhang mit dem Angelman-Syndrom bislang nicht beschrieben wurde. Sie trägt eine für die Manifestation des Angelman-Syndrom typische *de novo* Deletion von etwa 5 Mb im Bereich 15q11.2–q13.1 und eine mütterlich vererbte Mikrodeletion im Bereich 2q21.3, bei der eine Krankheitsrelevanz nicht auszuschließen ist. Wir fassen diesen Fall als Erweiterung des Phänotyps des Angelman-Syndroms mit zusätzlicher Symptomatik auf.

12. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13. Vollständige Publikationsliste

Originalpublikationen:

1. Kraemer N, Ravindran E, Zaqout SI, Neubert G, Schindler D, Ninnemann O, Gräf R, Seiler AE, Kaindl AM, **Loss of CDK5RAP2 affects neural but not non-neural mESC differentiation into cardiomyocytes**, *Cell Cycle* 2015; 14(13):2044-57. Impact Factor (5-Jahres-IF ab 2010): 5,034.
2. Kraemer N, Neubert G, Issa L, Ninnemann O, Seiler AE, Kaindl AM, **Reference genes in the developing murine brain and in differentiating embryonic stem cells**, *Neurological Research* 2012; 34(7):664-8. Impact Factor (5-Jahres-IF ab 2010): 1,443.
3. Neubert G, von Au K, Drossel K, Tzschach A, Horn D, Nickel R, Kaindl AM, **Angelman syndrome and severe infections in a patient with de novo 15q11.2-q13.1 deletion and maternally inherited 2q21.3 microdeletion**, *Gene* 2013; 512(2):453-5. Impact Factor (5-Jahres-IF ab 2010): 2,205.
4. Kraemer N, Issa-Jahns L, Neubert G, Ravindran E, Mani S, Ninnemann O, Kaindl AM, **Novel alternative splice variants of mouse *Cdk5rap2***, *PLOS ONE*, accepted manuscript ahead of print. Impact Factor (5-Jahres-IF ab 2010): 3,860.

Kongressbeiträge:

1. Neubert G, von Au K, Drossel K, Horn D, Nickel R, Kraemer N, Kaindl AM, **Patientin mit Angelman-Syndrom und schweren Infektionen bei zusätzlicher 2q21.3 Mikrodeletion**. Posterpräsentation bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, Bielefeld, 2011.

14. Danksagung

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Angela M. Kaindl, durch deren unerschöpfliches Engagement in Klinik und Labor diese Arbeit erst ermöglicht wurde. Sie eröffnete mir neue, zunächst völlig unbekannte Perspektiven der ärztlichen Tätigkeit und stand mir jederzeit mit einem offenen Ohr und konstruktiven Rückmeldungen zur Seite. Ebenso danke ich meiner Betreuerin Nadine Krämer von ganzem Herzen für ihre geduldige Einführung in die Techniken der *in vitro* Forschung, die Begleitung meiner Experimente und den regen inhaltlichen Austausch. Im Labor stets zur Seite standen mir außerdem Lina Jahns (geb. Issa), Angelika Zwirner und Julia König. Vielen Dank hierfür! Nicht unerwähnt lassen möchte ich darüber hinaus meine Schwester Elsa für die Erstkorrektur der Manuskripte und meinen Opa Reinhart, der als lebenslanger Forschergeist und voller Interesse auch an für ihn weit entfernten wissenschaftlichen Themen immer ein Vorbild sein wird.