

Rafiullah Rafiullah

Dr. sc. hum.

Identification and characterization of genes underlying intellectual disability and autism spectrum disorders

Subject: Human Genetics

Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. Gudrun Rappold

Summary

Intellectual disability is a neurodevelopmental disorder with an intelligence quotient less than 70, in which the affected individuals show a deficit in cognitive as well as in adaptive skills. The high heterogeneity, clinical variability and in many cases the unknown underlying genetic cause make it one of the most challenging and expensive diseases in terms of pre- and postnatal diagnosis. In some cases the early diagnosis of the underlying cause of the disease may help to find a treatment to prevent the manifestation of the phenotype. Intellectual disability and some related disorders e.g. autism spectrum disorder are highly prevalent in males with a ratio of affected males compared to females of 4:1. The underlying molecular mechanism of this sex bias prevalence still remains largely unexplained. My PhD project was designed in two parts:

First, a small cohort of consanguineous families with multiple affected individuals from Baluchistan, Pakistan was enrolled. Trios, consisting of the healthy parents and the proband from 11 families were selected for whole exome sequencing. Subsequent Sanger sequencing of the detected presumably damaging variants in affected and unaffected family members identified a possible genetic cause of the phenotype in eight families, whereas the genetic bases of the disease in three families remained unsolved. Already reported mutations were identified in three families which include a homozygous missense mutation (p.H325R) in the *BTBD* gene, a homozygous nonsense mutation (p.W19X) in the *SRD5A3* gene and a compound heterozygous mutation (p.R201H and p.R68Q) in the *GLB1* gene. Rare pathogenic variants were identified in two genes in a family which include a rare hemizygous variant (p.R797C) and frame shift insertions (p.P214delinsfs and p.A215fs) in the *PLXNB3* and *SLC25A14* genes, respectively. One family revealed a compound heterozygous rare variant (p.G2980S and p.P2262A) in the *CSMD1* gene and another family with seven affected individuals revealed a homozygous

missense variant (p.R53Q) in *LMAN2L*, both are candidate genes for autosomal recessive intellectual disability. Three dimensional homology modeling revealed that the identified mutation resides at the interface of the putatively, but still unknown binding partner of *LMAN2L* and thus may affect the protein-protein interaction. Novel mutations were identified in the two remaining families which include a novel homozygous missense mutation (p.R412H) in the *TPO* gene and a novel homozygous missense mutation (p.G75R) in the *ARL13B* gene. The identical mutation (p.G75R) was also identified in an additional family. The identified mutation *ARL13B*-p.G75R behaved like wild-type in terms of sonic hedgehog signaling as well as GTPase activity; however the mutant showed a marked loss of guanine nucleotide exchange factor activity for *ARL3* and thus may affect the downstream pathways. Strikingly, a sex-dimorphic severity of ataxia was observed in both families with mutations in the *ARL13B* gene where the females were severely affected. *Arl13b* did not show a significant sex-dimorphic expression in the cerebellum of mice, but a significant regulatory effect of dihydrotestosterone on the *ARL13B* expression was uncovered in SH-SY5Y cells. As testosterone levels differ markedly during the early development of the male and female brain, this might also influence the *ARL13B* expression or other downstream genes.

In the second part, the transcriptional factors *Foxp1* and *Foxp2* were investigated as a model for the sex biased prevalence of autism spectrum disorder together with intellectual disability. A sex-dimorphic expression of *Foxp1* and *Foxp2* was uncovered in the striatum and cortex at E17.5 and P7.5 in wild-type mice while no significant dimorphic expression was observed in other brain region at other developmental stages. To investigate whether the genes are regulated by steroid hormone dependent pathways, androgen receptor knockout mice were generated, which revealed an altered expression of both *Foxp1* and *Foxp2* in the striatum and cortex at E17.5 and P7.5. To further explore the contribution of both dihydrotestosterone and 17-beta estradiol to the regulation of *FOXP1*, SH-SY5Y cells were treated with different physiological concentrations at different time points; a regulatory effect of both dihydrotestosterone and 17-beta estradiol was uncovered. This regulatory effect was abolished when the cells were treated with either 17-beta estradiol or dihydrotestosterone along with

their respective antagonists. Thus the current study contributes to the understanding of how testosterone may influence gene expression during the brain development.

Zusammenfassung

Geistige Behinderung ist eine Entwicklungsstörung des Nervensystems mit einem Intelligenzquotienten von weniger als 70, bei der betroffene Individuen Defizite sowohl in Gedächtnis- als auch Lernfähigkeit zeigen. Große Unterschiede in Erscheinungsform und klinischer Ausprägung, sowie die in vielen Fällen unbekannt genen Ursachen machen diese Störung zu einer der schwierigsten und kostenintensivsten Krankheiten in Bezug auf prä- und postnatale Diagnostik. In einigen Fällen hilft die frühzeitige Erkennung der Ursache bei der Suche nach einer Behandlungsmöglichkeit, welche die Manifestation des Krankheitsbildes verhindern kann. Geistige Behinderung und einige verwandte Störungen wie Autismus treten überwiegend bei Männern mit einem Geschlechterverhältnis von 4:1 (männlich:weiblich) auf. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dieser Geschlechtsunterschiede sind bis heute weitgehend unerforscht. Meine Doktorarbeit war in zwei Teile untergliedert:

Zuerst wurde eine kleine Gruppe von blutsverwandten Familien mit mehreren betroffenen Individuen von Baluchistan, Pakistan untersucht. Trios von insgesamt elf Familien, bestehend aus den gesunden Elternteilen und einem betroffenen Probanden, wurden für Exom-weite Sequenzierungen ausgewählt. Eine darauffolgende Sanger-Sequenzierung der detektierten und vermutlich schädlichen Varianten in betroffenen und unbetroffenen Familienmitgliedern konnte in acht Familien eine genetische Ursache für das Krankheitsbild finden, während die genetischen Ursachen der restlichen drei Familien ungelöst blieben. Bereits bekannte Mutationen, die in drei der Familien gefunden wurden, beinhalteten eine homozygote Missense-Mutation (p.H325R) im *BTD* Gen, eine homozygote Nonsense-Mutation (p.W19X) im *SRD5A3* Gen und eine compound-heterozygote Mutation (p.R201H und p.R68Q) im *GLB1* Gen. Seltene krankheitserregende Varianten welche in zwei Genen einer weiteren Familie gefunden wurden, waren die hemizygoten Variante (p.R797C) und die Frame-shift Insertionen (p.P214delinsfs und p.A215fs) in den *PLXNB3* und *SLC25A14* Genen. Eine Familie zeigte eine seltene compound-heterozygote Variante (p.G2980S und p.P2262A) im *CSMD1* Gen während eine andere Familie mit sieben betroffenen Individuen eine homozygote Missense-Variante (p.R53Q) in *LMAN2L* besaß; beides Kandidatengene für autosomal rezessive intellektuelle Störung. Eine dreidimensionale-Homology-Modellierung ließ erkennen, dass die identifizierten Mutationen an der Schnittstelle des mutmaßlichen, aber noch nicht bekannten Interaktionspartner von *LMAN2L* sitzen, was dementsprechend die Protein-Protein Interaktion beeinträchtigen könnte. Die identifizierten Mutationen der übrigen beiden Familien beinhalteten

eine neue Missense-Mutation (p.R412H) im *TPO* Gen und eine neue homozygote Missense-Mutation (p.G75R) im *ARL13B* Gen. Eine identische Mutation (p.G75R) wurde auch in einer weiteren Familie gefunden. Die Mutation *ARL13B*-p.G75R verhielt sich bezogen auf Hedgehog-Signalweg und GTPase Aktivität wildtypisch; die hingegen ebenfalls gefundene deutlich reduzierte Aktivität von *ARL3* als GTP-Austauschfaktor könnte jedoch untergeordnete Signalwege beeinflussen. Interessanterweise konnte ein geschlechtsdimorpher Schweregrad der Ataxie in beiden Familien mit Mutationen im *ARL13B* Gen beobachtet werden, wobei die weiblichen Individuen schwerwiegender betroffen waren. *ARL13b* zeigte keinen signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschied in der Expression im Cerebellum von Mäusen, jedoch konnte ein signifikanter regulatorischer Effekt von Dihydrotestosteron auf die Expression von *ARL13B* in SH-SY5Y Zellen analysiert werden. Da die Mengen an Testosteron während der Frühentwicklung des männlichen und weiblichen Gehirns deutlich voneinander abweichen, könnte dies auch die Expression von *ARL13B* und anderen untergeordneten Genen beeinflussen.

Im zweiten Teil der Doktorarbeit wurden die Transkriptionsfaktoren *Foxp1* und *Foxp2* als Model für die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Prävalenz von Autismus-Spektrum-Störungen zusammen mit geistiger Behinderung untersucht. Eine geschlechtsdimorphe Expression von *Foxp1* und *Foxp2* wurde im Striatum und Cortex an E17.5 und P7.5 in Wildtypmäusen gezeigt, während keine signifikante geschlechtsdimorphe Expression in anderen Gehirnregionen zu anderen Entwicklungszeitpunkten gezeigt werden konnte. Um zu untersuchen, ob die Gene durch Steroidhormon-abhängige Signalwege reguliert werden, wurden Androgenrezeptor Knockout-Mäuse generiert, welche eine veränderte Expression von *Foxp1* und *Foxp2* im Striatum und Cortex an E17.5 und P7.5 zeigten. Für die weitere Untersuchung des Beitrags von sowohl Dihydrotestosteron als auch 17-beta-Estradiol zur Regulierung von *FOXP1*, wurden SH-SY5Y Zellen mit verschiedenen physiologischen Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten behandelt. Ein regulatorischer Effekt konnte aufgehoben werden, wenn die Zellen entweder mit 17-beta-Estradiol oder Dihydrotestosteron zusammen mit den entsprechenden Antagonisten behandelt wurden. Demensprechend trägt die vorliegende Studie zu einem besseren Verständnis der Rolle von Testosteron während der Gehirnentwicklung bei.