

The ASD-associated CNV 16p11.2: Functional study of the candidate gene *QPRT*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15 der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von Denise Haslinger, geboren in Braunau am Inn, Österreich

Bei Autismus-Spektrum-Störungen (ASS) handelt es sich um genetisch komplexe Störungen mit hoher Erbllichkeit. Als zugrundeliegender Pathomechanismus von ASS werden unter anderem Veränderungen der neuronalen Entwicklung diskutiert. Der Phänotyp von ASS ist definiert durch Einschränkungen in der sozialen Interaktion und Kommunikation sowie repetitives und stereotypes Verhalten. Genkopiepolymorphismen (englisch „copy number variations“/CNVs), also Deletionen oder Duplikationen einer chromosomalen Region, wurden wiederholt in Probanden mit ASS identifiziert. Hierbei ist in ASS die Region 16p11.2 mit am häufigsten von CNVs betroffen. Einige Gene aus diesem chromosomalen Abschnitt wurden bereits funktionell charakterisiert. Dennoch können die Befunde der bisherigen Einzelgenstudien nicht alle Aspekte erklären, die durch 16p11.2 CNVs hervorgerufen werden. Ziel dieser Studie war es daher, ein weiteres neuronal assoziiertes Kandidatengen dieser Region zu identifizieren und im Anschluss funktionell im Kontext der neuronalen Differenzierung zu charakterisieren.

Das SH-SY5Y Neuroblastom-Zellmodell wurde auf Transkriptom- und morphologischer Ebene auf seine Eignung als Modell für neuronale Differenzierung untersucht und bestätigt. Eine Analyse der Expressionen aller Gene der 16p11.2-Region zeigte, dass das Gen *Quinolinat-Phosphoribosyltransferase* (*QPRT*) eine vergleichsweise hohe Expression mit der stärksten und robustesten Regulierung über die Zeit aufwies. Eine *de novo* Deletion der 16p11.2-Region wurde in einem Patienten im Vergleich zu seinen Eltern validiert. In Patienten-spezifischen lymphoblastoiden Zelllinien derselben Familie konnten wir eine Gendosis-abhängige Expression von *QPRT* auf RNA-Ebene bestätigen. In SH-SY5Y-Zellen korrelierte die Expression von *QPRT* signifikant mit der Entwicklung von Neuriten während der Differenzierung. Um

QPRT funktionell zu charakterisieren, benutzten wir drei verschiedene Methoden zur Reduktion der *QPRT*-Genexpression: (i) knock down (KD) durch siRNA, (ii) chemische Inhibition durch Phthalsäure und (iii) knock out (KO) über CRISPR/Cas9-Geneditierung. Eine Reduktion von *QPRT* durch siRNA führte zu einer schwachen Veränderung der neuronalen Morphologie differenzierter SH-SY5Y-Zellen. Die chemische Inhibition sowie der genetische KO von *QPRT* waren letal für differenzierende aber nicht für proliferierende Zellen. Eine Metabolitenanalyse zeigte keine Veränderungen des *QPRT*-assoziierten Tryptophanstoffwechsels. Gene, welche auf Transkriptomebene im Vergleich zwischen KO- und Kontrollzellen differenziell reguliert vorlagen, waren häufig an Prozessen der neuronalen Entwicklung sowie an der Bildung, Stabilität und Funktion synaptischer Strukturen beteiligt. Die Liste differenziell regulierter Gene enthielt außerdem überdurchschnittlich viele ASS-Risikogene und ko-regulierte Gengruppen waren assoziiert mit der Entwicklung des dorsolateralen präfrontalen Cortex, des Hippocampus sowie der Amygdala.

In dieser Studie zeigten wir einen kausalen Zusammenhang zwischen *QPRT* und der neuronalen Differenzierung *in vitro* sowie einen Einfluss von *QPRT* auf die Regulation von ASS-assoziierten Genen und Gen-Netzwerken. Funktionell standen diese Gene im Kontext mit synaptischen Vorgängen, welche durch Veränderungen zu einem Exzitations-Inhibitions-Ungleichgewicht und letztendlich zum Zelltod von Neuronen führen können. Unsere Ergebnisse heben in Summe die wichtige Rolle von *QPRT* in der Krankheitsentstehung von ASS, insbesondere in Trägern einer 16p11.2 Deletion, hervor.