

# Erweiterte Diagnostik bei neuromuskulären Erkrankungen: vom Genpanel zum Whole Genome Sequencing



Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Ann-Kathrin Zaum**

geboren in  
Neuss

Würzburg, Oktober 2018

Eingereicht am: 24.10.2018

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ricardo Benavente

Gutachterin: PD Dr. Simone Rost

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: 30.01.2019

Doktorurkunde ausgehändigt am:

**Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5  
der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie**

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: **„Erweiterte Diagnostik bei neuromuskulären Erkrankungen: vom Genpanel zum Whole Genome Sequencing“**, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Würzburg, Oktober 2018

---

Ann-Kathrin Zaum

# Zusammenfassung

Muskeln und Nerven bilden eine essentielle funktionelle Einheit für den Bewegungsapparat. Neuromuskuläre Erkrankungen lassen sich unterteilen in Krankheiten, denen ein muskuläres Problem zu Grunde liegt, wie zum Beispiel Muskeldystrophien (Muskeldystrophie Duchenne, DMD) und Myopathien (Myofibrilläre Myopathie, MFM), und in Erkrankungen aufgrund von Nervenschädigungen, wie zum Beispiel Neuropathien und spastische Paraplegien (SPG).

In den vier Teilen der vorliegenden Arbeit konnte sowohl das genetische wie auch das phänotypische Spektrum von neuromuskulären Krankheiten erweitert werden. Die dafür verwendeten Methoden reichen von der Sanger-Sequenzierung einzelner Gene über Next-Generation Sequencing (NGS)-Panel-Diagnostik, zu Whole Exome Sequencing (WES) und schließlich zu Whole Genome Sequencing (WGS). Zusätzlich wurde cDNA zur Detektion von Veränderungen im Transkriptom sequenziert.

Im ersten Teil wurde der klinische Phänotyp der Seipinopathien erweitert, der jetzt auch amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und multifokale motorische Neuropathie (MMN) beinhaltet. Dafür wurde eine Panel-Analyse durchgeführt, die eine bekannte Mutation in *BSCL2* aufdeckte. Aufgrund des hiermit erweiterten Phänotyps der Seipinopathien sollten Mutationen in *BSCL2* auch bei anderen Verdachtsdiagnosen, wie ALS oder MMN, berücksichtigt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass in der Diagnostik SPGs und Charcot-Marie-Tooth Erkrankungen (CMTs) eine Überlappung zeigen und bei der Diagnose von Verdachtsfällen Gene aus beiden Krankheitsbereichen berücksichtigt werden sollten. Die Suche mit Hilfe eines Phänotyp-Filters hat sich dabei als erfolgreich erwiesen. Ungelöste Fälle sollten aber in regelmäßigen Abständen neu analysiert werden, da immer neue Gene mit den Phänotypen assoziiert werden.

Der zweite Teil befasst sich mit der Untersuchung von DMD-Patienten mit bisher ungeklärtem Genotyp. Durch eine RNA-Analyse des gesamten DMD-Transkripts wurden tief-intronische Mutationen aufgedeckt, die Einfluss auf das Spleißen haben. Durch diese Mutationen wurden intronische Sequenzen als Pseudoexons in die mRNA eingefügt. Diese Mutationsart scheint häufig unter ungeklärten DMD-Fällen zu sein, in unserer Kohorte von 5 DMD-Patienten wurden in zwei Fällen Pseudoexons entdeckt. Eine Besonderheit besteht darin, dass in der RNA-Analyse immer noch ein Rest Wildtyp-Transkript vorhanden war, wodurch die Patienten vermutlich einen milderen Becker-Phänotyp aufweisen. Ein weiterer ungeklärter DMD-Fall konnte durch die Sequenzierung der gesamten genomischen Sequenz

aufgeklärt werden. Es wurde eine perizentrische Inversion entdeckt (46,Y,inv(X)(p21.1q13.3). Dies zeigt, dass WGS auch zur Detektion von großen Strukturvariationen geeignet ist.

Im dritten Teil wurden Spleißmutationen untersucht. Spleißmutationen wurden bisher nicht in *TMEM5*-assoziierter alpha-Dystroglykanopathie beschrieben und somit als neue Mutationsart für diese Erkrankung nachgewiesen. Dabei wurde auch die funktionelle Exostosin-Domäne in *TMEM5* bestätigt. Eine RNA-Untersuchung verschiedener Spleißmutationen zeigte, dass Spleißmutationen häufig zu einem veränderten Transkript führen, auch wenn diese Mutationen weiter von der Konsensussequenz entfernt sind. Spleißmutationen sollten daher häufiger in der Diagnostik berücksichtigt und überprüft werden.

Im letzten Teil wurde eine strukturierte Diagnostik von MFM-Patienten beschrieben und neue Kandidaten-Gene für MFM vorgestellt. Es ist zu vermuten, dass auch Mutationen in Genen, die bisher für Kardiomyopathien, Kollagen Typ VI-Myopathien und Neuropathien beschrieben sind, einen MFM-Phänotyp verursachen können. Diese Ergebnisse erweitern das genetische Spektrum der MFM, was sich auf die Diagnostik dieser Erkrankungen auswirken sollte.

Im Laufe dieser Arbeit konnten damit die neuromuskulären Erkrankungen vieler Patienten genetisch geklärt werden. Neue Phänotypen und genetische Ursachen wurden beschrieben und es wurde gezeigt, dass sich WGS technisch für die Diagnostik, auch zur Detektion von großen Strukturvarianten, eignet.

## Summary

Muscles and nerves form an essential functional unit for the locomotor system. Neuromuscular disorders are divided in diseases that have a muscular origin, such as muscular dystrophies (Duchenne muscular dystrophy, DMD) and myopathies (myofibrillar myopathies, MFM) and diseases based on neuron denervation, for instance neuropathies and spastic paraplegias (SPG).

The four parts of the present work expand the genetic and phenotypic spectrum of neuromuscular disorders. The used methods range from Sanger sequencing of single genes to panel next-generation sequencing (NGS) diagnostics, whole exome sequencing (WES) and finally to whole genome sequencing (WGS). Additionally, cDNA was sequenced to detect transcriptome changes.

In the first part, the clinical phenotype of seipinopathies has been expanded to include amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and multifocal motor neuropathy (MMN). An NGS panel was sequenced in three patients suffering from ALS, MMN and neuropathy. A known mutation in *BSCL2* was detected which expands the phenotype of seipinopathies. Therefore, mutations in *BSCL2* should be considered in patients with diagnosis such as ALS and MMN. Moreover, it was demonstrated that SPGs and Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) show a genetic overlap and genes of both diseases should be considered in genetic analysis. The use of a phenotype filter for variant analysis was successful. However, unsolved cases should be re-analysed in intervals, as new genes are frequently connected to phenotypes.

The second part concerns DMD patients with unresolved genotype. RNA-analysis of the whole DMD transcripts revealed deep-intronic variants that influence splicing and insert intronic sequences as pseudoexons in the mRNA. This kind of mutation appears to be common, as two of our five analysed patients had pseudoexons. What is particular about these cases is the fact that a rest of wild type DMD transcript remained, which possibly contributes to a milder Becker phenotype in the patients. In another unsolved DMD case WGS was performed and a pericentric inversion including *DMD* was discovered (46,Y,inv(X)(p21.1q13.3), which demonstrates that WGS is capable of detecting large structural anomalies.

In the third part splice mutations were analysed. Splice mutations were unknown for *TMEM5*-related alpha-dystroglycanopathy and are now a new kind of mutation in this disease. At the same time the functional exostosin domain in *TMEM5* was confirmed. RNA analysis of

further splice mutations showed a frequent influence on splicing even if the mutation was far from the canonical splice site. Therefore, splice mutations should be verified and considered in diagnostics more often.

The last part describes a structured approach when diagnosing MFH patients and introduces new candidate genes for MFH. It appears that mutations in genes formerly associated with cardiomyopathies, collagen type VI-related myopathies and neuropathies can cause an MFH phenotype. These results expand the genetic spectrum of MFH which should be considered in diagnostics.

In the course of this dissertation the neuromuscular diseases of many patients could be solved genetically. New phenotypes and genotypes were described and it was proven that WGS is technically suitable for genetic diagnostic, even for the detection of large structural variants.

# Inhaltsverzeichnis:

Zusammenfassung .....	I
Summary .....	III
1 Zielsetzung der Arbeit .....	1
2 Einleitung .....	2
2.1 Next-Generation Sequencing Techniken .....	2
2.2 Nerven und Nervensystem.....	4
2.3 Muskeln .....	5
2.4 Neuromuskuläre Erkrankungen .....	6
2.4.1 Amyotrophe Lateralsklerose .....	6
2.4.2 Multifokal motorische Neuropathie .....	7
2.4.3 Hereditäre Neuropathien .....	7
2.4.4 Spastische Paraplegien .....	9
2.4.5 Duchenne Muskeldystrophie.....	10
2.4.6 Dystroglykanopathien .....	12
2.4.7 Myofibrilläre Myopathien .....	13
3 Methoden.....	15
3.1 Molekulargenetik.....	15
3.1.1 RNA-Isolierung aus Blut.....	15
3.1.2 RNA-Isolation aus Muskelgewebe.....	15
3.1.3 cDNA-Synthese.....	15
3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion .....	16
3.1.5 Sanger-Sequenzierung.....	16
3.1.6 MLPA.....	16
3.1.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	17
3.2 Next-Generation Sequencing.....	17
3.2.1 Nextera Anreicherung .....	17
3.2.2 Whole Genome Sequencing nach Nextera.....	18
3.3 Bioinformatische Auswertung der NGS-Daten.....	18
3.3.1 Analyse der Daten .....	18
3.3.2 Vorhersageprogramme .....	19
3.3.3 Schema zum Einstufen .....	20
4 Ergebnisse und Diskussion.....	22
4.1 Hereditäre Neuropathien.....	22
4.1.1 Erweiterter Phänotyp bei <i>BSCL2</i> -Neuropathie .....	22

4.1.2	ALS-Kohorten Screening nach <i>BSCL2</i> -Mutation .....	30
4.1.3	Spastische Paraplegien in der Diagnostik .....	30
4.2	Tief-intronische Varianten in <i>DMD</i> .....	38
4.2.1	Pseudoexons in <i>DMD</i> .....	38
4.2.2	Whole Genome Sequenzierung zeigt perizentrische Inversion in <i>DMD</i> .....	44
4.3	Spleißmutationen in muskulären Erkrankungen.....	52
4.3.1	Neuer Phänotyp und neue Mutationsart der <i>TMEM5</i> -assoziierten alpha-Dystroglykanopathie .....	52
4.3.2	Weitere Spleißmutationen .....	55
4.4	Neue Kandidatengene für die Myofibrillären Myopathien .....	60
5	Fazit und Ausblick .....	66
6	Literaturverzeichnis.....	71
7	Internet-Quellen und Datenbanken .....	82
7.1	Internet-Quellen.....	82
7.2	Datenbanken .....	83
8	Abkürzungsverzeichnis .....	84
9	Abbildungsverzeichnis .....	86
10	Tabellenverzeichnis.....	88
11	Liste der Publikationen.....	89
11.1	Anlage 1.....	89
11.2	Anlage 2.....	89
11.3	Anlage 3.....	89
11.4	Anlage 4.....	90
12	Sonderdrucke der Publikationen .....	91
12.1	Anlage 1.....	91
12.2	Anlage 2.....	92
12.3	Anlage 3.....	93
12.4	Anlage 4.....	94
13	Danksagung.....	115

# 1 Zielsetzung der Arbeit

Die Arbeit befasst sich mit der humangenetischen Untersuchung verschiedener Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen, insbesondere Myopathien, Dystrophinopathien und Neuropathien. Es wurden Next-Generation Sequencing (NGS) Methoden von aufsteigendem Umfang verwendet, denen RNA-Analysen gegenübergestellt wurden. Die NGS-Methoden steigerten sich von Genpanel-Analysen über Whole Exome Sequenzierung (WES) zur Whole Genome Sequenzierung (WGS). RNA-Analysen sollten neben dem WGS tief-intronische Varianten aufdecken und Hinweise auf eine veränderte Proteinsequenz geben. Ziel war es, möglichst vielen Patienten eine genetische Diagnose für ihre Erkrankung zu liefern und neue Krankheitsmechanismen zu entdecken, sowie neue Methoden für die humangenetische Diagnostik zu erproben.

## 2 Einleitung

Die Humangenetik ist eine noch junge und sich rasch weiterentwickelnde Fachdisziplin der Medizin. Seit dem Ende der 50er Jahre ist es möglich, gewisse genetische Erkrankungen mittels Chromosomenanalyse zu untersuchen (Theile 1976). Im Laufe der Zeit wurden stetig weitere Verfahren entwickelt, mit denen ein wachsendes Spektrum von Erkrankungen diagnostiziert werden kann. Seit der Entwicklung der Sanger-Sequenzierung (Sanger, Nicklen, and Coulson 1977) im Jahre 1977 werden vermehrt die Sequenzen des Genoms untersucht, hiermit werden neue Gene identifiziert und nach den genetischen Ursachen von Krankheiten gesucht. Mit dem Abschluss des Humangenomprojekt im Jahr 2004 war die erste Version eines vollständigen menschlichen Genoms bekannt, das nur etwa 20.000-25.000 Gene enthält (International Human Genome Sequencing 2004). Seit dem Beginn des 21. Jahrhunderts wurden immer neue Technologien entwickelt, die sogenannten Next-Generation Sequencing (NGS)-Techniken, die das Sequenzieren des menschlichen Erbgutes schneller und günstiger machen. Diese Technologien ermöglichen es, dass heute mehr Patienten humangenetisch untersucht werden und immer größere Teile des Genoms auch in der Diagnostik analysiert werden können.

### 2.1 Next-Generation Sequencing Techniken

Die erste Next-Generation-Sequencing (NGS)-Technologie war die, im Jahr 2005 etablierte, Pyrosequenzierung im Anschluss an eine Emulsions-PCR im Pikoliter-Format von 454 Life Sciences (Margulies et al. 2005). Von der konventionellen Sanger-Sequenzierung unterscheiden sich die neuen NGS-Technologien dadurch, dass sie deutlich mehr Daten in einer kürzeren Zeit produzieren, dabei sind die Fehlerraten jedoch höher und die Längen der sequenzierten Stücke (Reads) kürzer (Goodwin, McPherson, and McCombie 2016; Liu et al. 2012). Es gibt viele verschiedene Arten von NGS-Techniken, die im Wesentlichen jedoch alle aus vier Grundschritten bestehen: Erstellung der Library, Sequenzierung, Detektion und Datenanalyse (Metzker 2010) (Abbildung 1). Die Library besteht aus allen zu sequenzierenden DNA-Abschnitten (Templates), die für die Sequenzierung vorbereitet werden müssen. Dazu werden sie auf eine bestimmte Länge fragmentiert und mit Adapter-Sequenzen für die anschließende Sequenzierung ligiert (Goodwin, McPherson, and McCombie 2016). Für die Sequenzierung nur eines Teils des Genoms, wie bei der Panel-

## 2 Einleitung

Sequenzierung oder dem Whole Exome Sequencing (WES), erfolgt zusätzlich eine Selektion einer bestimmten Auswahl an Sequenzen (Metzker 2010). Die fertige Library wird dann an einem NGS-Sequencer sequenziert, dabei unterscheiden sich je nach Anbieter und Gerät die Sequenzierungsmethoden. Wird die Sequenz eines Reads nicht nur von einer Seite abgelesen, sondern auch von der reversen Seite, wird dies paired-end-Sequenzierung genannt. Die Detektion der Basenabfolge kann auf sehr unterschiedliche Art und Weise erfolgen, meist werden die Signale optisch detektiert. Die anschließende Datenanalyse wird mit zunehmender Menge an Sequenzdaten immer anspruchsvoller (Goodwin, McPherson, and McCombie 2016).

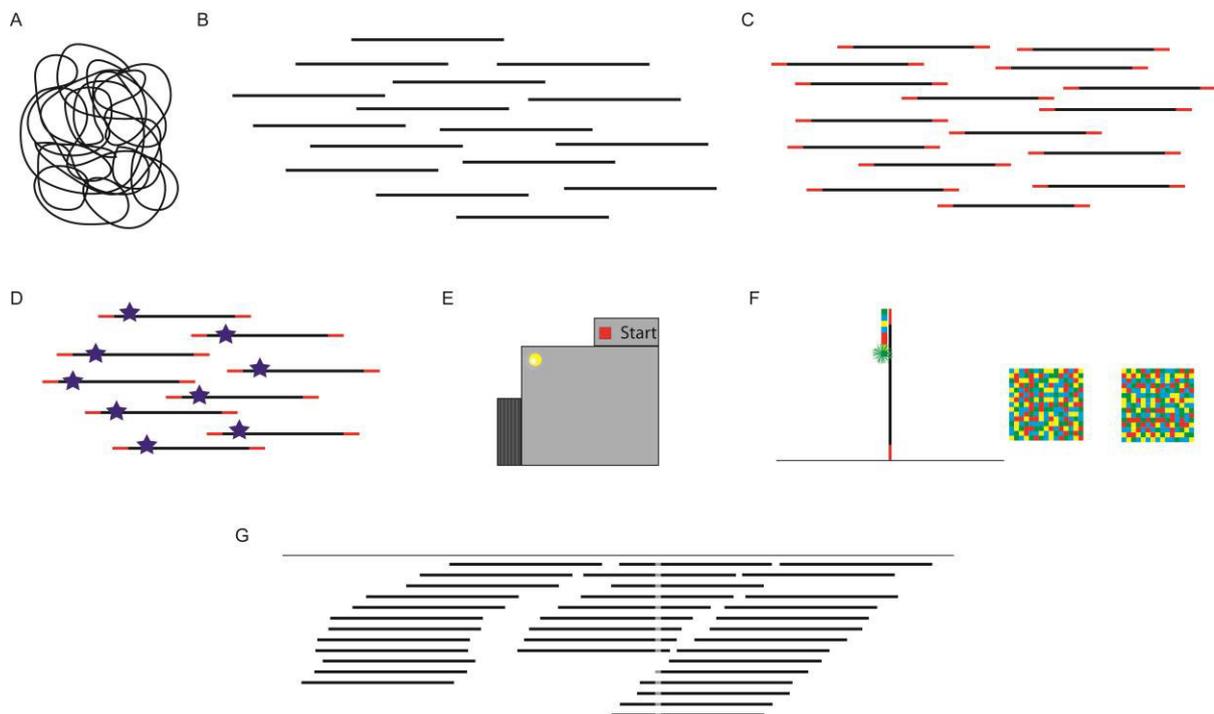


Abbildung 1: Schematische Darstellung der vier NGS-Sequenzier-Schritte. 1. Erstellung einer Library: A. genomische DNA, B. fragmentierte genomische DNA, C. Templates werden mit Adapter-Sequenzen versehen, D. bei Panel-Sequenzierung wird ein Teil der Templates selektiert. 2. Sequenzierung: E. die fertige Library wird am Sequencer aufgetragen, 3. Detektion: F. beispielhaft ist dargestellt, dass jede Base in einer anderen Farbe fluoresziert und dies optisch detektiert wird, 4. Datenanalyse: G. Daten werden gegen eine Referenz aligniert und Varianten werden gecallt.

NGS-Technologien eignen sich am besten zur Identifikation von Einzelnukleotid-Variationen (SNV, englisch: single nucleotide variation). Die am weitesten verbreitete Methode, das sogenannte „sequencing by synthesis“, erreicht eine Genauigkeit von 99,5 % (Bentley et al. 2008). Die Detektion von Kopienzahl-Veränderungen (CNV, englisch: copy number variation) ist bei den meisten NGS-Verfahren schwieriger, da kurze Reads verwendet werden, die die großen Strukturveränderungen zum Teil nicht ganz abbilden und somit nicht detektieren können. Hierzu entwickelten sich in den letzten Jahren Methoden, die die Sequenzierung von langen Reads, bis zu mehreren tausend Basenpaaren, ermöglichen. Damit

## 2 Einleitung

erweitert sich die Einsetzbarkeit von NGS-Technologien, die schon im klinischen Alltag angekommen sind (Goodwin, McPherson, and McCombie 2016).

## 2.2 Nerven und Nervensystem

Die Steuerungszentrale des Körpers ist das Nervensystem, dessen Grundbausteine die Neuronen sind (Abbildung 2). Diese bestehen aus Dendriten, die die afferenten Signale empfangen, dem Soma, das den Zellkörper des Neurons bildet und dem Axon, das die efferenten Signale an andere Nervenzellen oder Organe weiterleitet. Zur schnelleren Signalleitung sind die Axone von Myelinhüllen umgeben. Die Demyelinisierung von Nerven führt zu einer langsameren Nervenleitgeschwindigkeit und kann Krankheiten verursachen. Das Nervensystem umfasst sowohl motorische wie auch sensorische Nervenbahnen. Die motorischen Bahnen lassen sich in das erste und zweite Motoneuron (MN) unterteilen. Das Soma des ersten MN befindet sich im Gehirn, im präzentralen Gyrus. Von dort verlaufen die Axone der Neurone zu den Hirnnervenkernen, oder in der sogenannten Pyramidenbahn zu den Vorderhornganglionzellen des Rückenmarks. Hier werden sie auf das zweite MN umgeschaltet. Das Axon des zweiten MN gelangt über die Vorderhornwurzel zu den motorischen Endplatten und ist darüber mit den quergestreiften Muskelfasern verbunden (Abbildung 4). Eine Schädigung des ersten MN führt zu spastischen Lähmungen, verstärkten Muskeleigenreflexen und pathologischen Reflexen (Pyramidenbahnzeichen). Ist das zweite MN geschädigt, so zeigen sich schlaffe Lähmungen, fehlende oder zumindest reduzierte Muskeleigenreflexe und nach gewisser Zeit Muskelatrophien. Zusammen mit dem extrapyramidalen System, zu dem auch das Kleinhirn gehört, zeigt das motorische System ein komplexes Zusammenspiel für den reibungslosen Ablauf von willkürlicher und unwillkürlicher Bewegung (Mattle and Mumenthaler 2015). Für die Willkürbewegung startet im ersten MN die Initiation der Bewegung. Durch Depolarisation der Membran gelangt ein Aktionspotential über das Rückenmark zum zweiten MN und zu dessen terminalen Axonenden. Gelangt das Aktionspotential zu diesen Axonterminalen wird Acetylcholin in den synaptischen Spalt, der zwischen Muskel und Nervenende besteht, freigegeben. Die postsynaptische Membran der Muskelzelle enthält Acetylcholin-Rezeptoren, durch Bindung von Acetylcholin kommt es zur Depolarisation, die sich weiter über die Muskelzelle ausbreitet. Der Übergang zwischen Nerven und Muskel, der die Erregung von Nerven auf Muskel überträgt, wird neuromuskuläre Endplatte genannt (Mattle and Mumenthaler 2015; Gekle 2015).

## 2 Einleitung

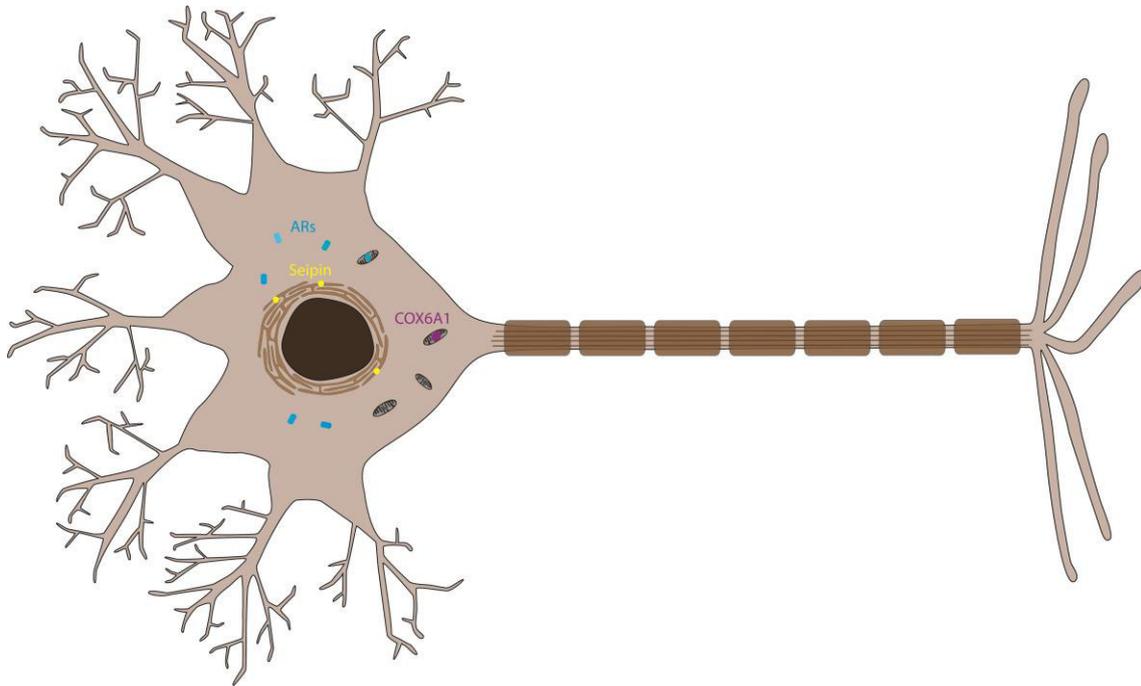


Abbildung 2: Skizzierte Darstellung einer Nervenzelle. Eingezeichnet sind beispielhaft für die in dieser Arbeit erwähnten Proteine: Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (ARs) (Antonellis and Green 2008), Seipin (Windpassinger et al. 2004) und COX6A1 (Berg et al. 2018) an ihren zellulären Lokalisationen.

## 2.3 Muskeln

Muskeln sind die Erfolgsorgane der Bewegung des Körpers. Es werden die quergestreifte und die glatte Muskulatur unterschieden. Die glatte Muskulatur befindet sich vor allem in den Wänden der Blutgefäße, des Intestinaltraktes und der Bronchien. Die Skelettmuskulatur und die Herzmuskulatur sind die quergestreifte Muskulatur, die ihren Namen aus der regelmäßigen Anordnung der Sarkomere hat. Die Sarkomere bilden die kontraktile Einheiten der Muskeln. Ein Skelettmuskel besteht aus Muskelfaserbündeln, diese bestehen aus Myofibrillen und diese setzen sich aus Sarkomeren zusammen (Gekle 2015). Ein Sarkomer beschreibt die Einheit von Z-Scheibe zu Z-Scheibe. In der Z-Scheibe sind die Aktin-Filamente (dünnes Myofilament) verankert. Mittig zwischen zwei Z-Scheiben befindet sich die M-Bande. Von der M-Bande ausgehend erstrecken sich die Myosin-Filamente (dickes Myofilament) in beide Richtungen zwischen die Aktin-Filamente zur nächsten Z-Scheibe (Abbildung 3). Während der Kontraktion des Muskels wandern die Myosin-Filamente unter ATP-Hydrolyse weiter am Aktin-Filament Richtung Z-Scheibe entlang. Auf diese Weise kontrahiert der Muskel (Spuler 2004). Die in 2.2 beschriebene Einheit aus MN und dem von diesen innervierten Muskelfasern wird motorische Einheit genannt. Die durch Acetylcholin ausgelöste Depolarisation löst in der Muskelmembran ein Aktionspotenzial aus, das sich über das tubuläre System und dann über das longitudinale System über die gesamte Muskelzelle

## 2 Einleitung

verteilt. Es kommt zum Einstrom von Calcium in das Muskelzellinnere. Die erhöhte Calcium-Konzentration im Intrazellulärraum ermöglicht die Bindung von Aktin- und Myosin-Filamenten und damit das Ineinander-Gleiten beider Filamente (Gekle 2015; Mattle and Mumenthaler 2015). Die Kontraktion des Muskels ist ein komplexes System und von vielen Faktoren abhängig. Defekte in diesem System, wie der Verlust eines Strukturproteins oder der Defekte eines Kanals oder der Mitochondrien, verursachen die verschiedensten Krankheiten, von denen die meisten eine genetische Ursache haben (Mattle and Mumenthaler 2015).

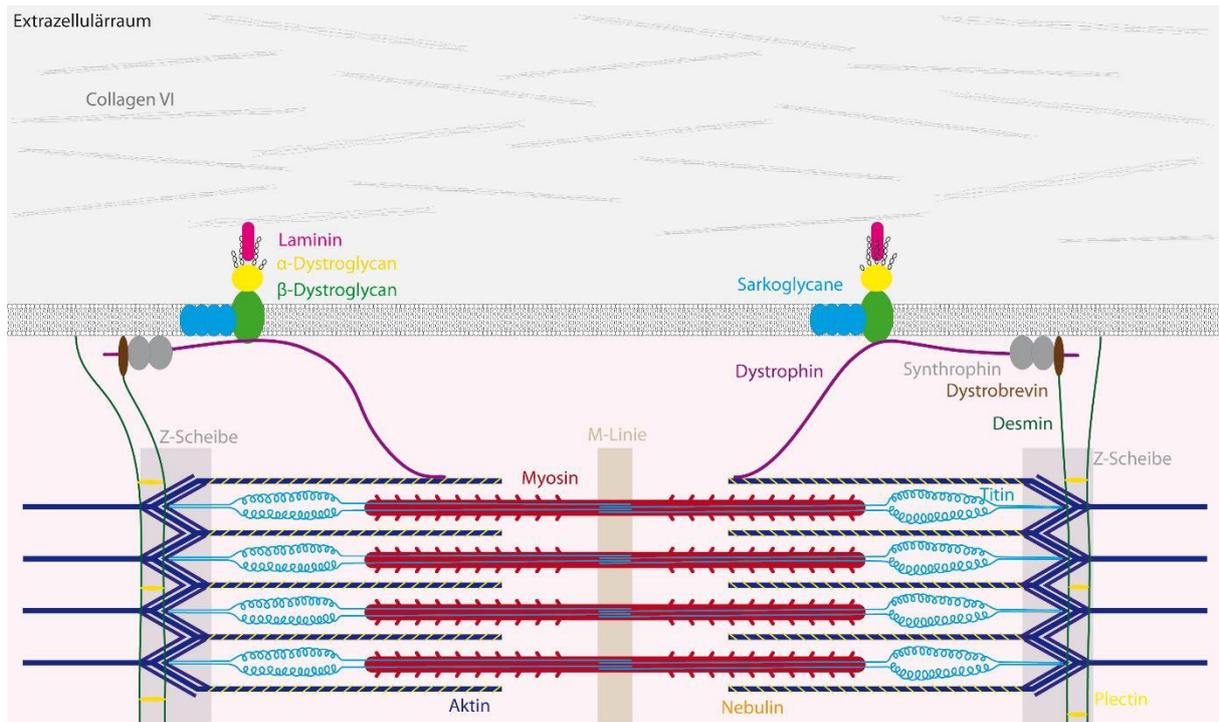


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines quergestreiften Muskels. Dargestellt ist ein Sarkomer von Z-Scheibe zu Z-Scheibe. Ein Teil der in dieser Arbeit erwähnten Proteine sind in ihrer Lokalisation und Funktion skizziert. Nach Informationen aus Henderson et al. (Henderson et al. 2017) und Lin et al. (Lin, Song, and Sadayappan 2017).

## 2.4 Neuromuskuläre Erkrankungen

Wie schon in 2.2 und 2.3 beschrieben bilden Muskeln und Nerven eine funktionelle Einheit, mit dem Zusammentreffen in der motorischen Endplatte. Neuromuskuläre Erkrankungen sind daher vielfältig, einige, für diese Arbeit relevante, sind im Folgenden beschrieben.

### 2.4.1 Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, in deren Verlauf das erste und zweite Motoneuron degenerieren. Zu den häufigsten Symptomen gehören daher Muskelatrophien, Faszikulationen, gesteigerte Muskeleigenreflexe und spastische Lähmungen. Die ALS verläuft rasch progredient und die Krankheitsdauer beträgt

## 2 Einleitung

oft nur wenige Jahre und führt zum frühen Tod. Mit einer Inzidenz von 3 pro 100.000 Einwohner in Deutschland ist sie keine seltene Erkrankung, allgemein sind häufiger Männer betroffen als Frauen. Der größte Teil der Fälle, etwa 90 %, sind sporadisch und nicht genetisch (Mattle and Mumenthaler 2015; Hacke, Poeck, and Wick 2016). Die Diagnose einer ALS wird klinisch gestellt, wenn die sogenannten El-Escorial-Kriterien erfüllt sind (Brooks 1994), die jetzt in einer modifizierten Version angewendet werden (Brooks et al. 2000). *SOD1* war das erste bekannte ALS-Gen, es ist in 20 % der erblichen Fälle mutiert (Rosen et al. 1993).

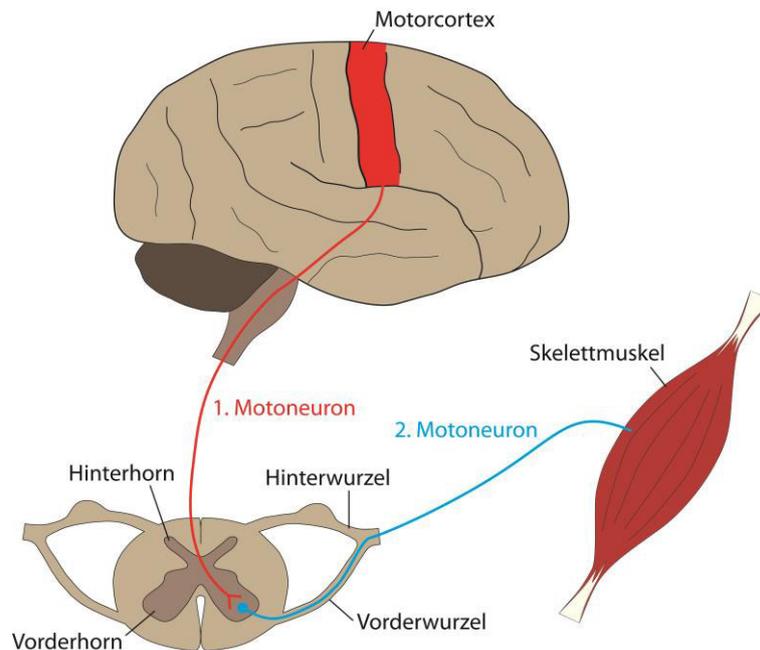


Abbildung 4: Skizzierte Darstellung des Verlaufs des ersten und zweiten Motoneurons.

### 2.4.2 Multifokal motorische Neuropathie

Die multifokale motorische Neuropathie (MMN) ist eine seltene Neuropathie, die durch Antikörper vermittelt wird. Die Patienten zeigen asymmetrische motorische Atrophien und Paresen, die progredient verlaufen. Charakteristisch sind die Nervenleitungsblöcke, die in der Elektroneurografie auffallen. Differentialdiagnostisch ist eine MMN bei einem Verdacht auf ALS auszuschließen (Hacke, Poeck, and Wick 2016).

### 2.4.3 Hereditäre Neuropathien

Polyneuropathien (PNP) bezeichnen allgemein Erkrankungen des peripheren Nervensystems. Diese sind sowohl klinisch wie auch ätiologisch sehr heterogen, aus diesem Grund existieren die verschiedensten Klassifikationen. Die hereditären Neuropathien sind im Vergleich zu den erworbenen Formen, wie zum Beispiel der diabetischen und alkoholischen PNP, seltene Erkrankungen (Mattle and Mumenthaler 2015; Hacke, Poeck, and Wick 2016). Die erblichen

## 2 Einleitung

Neuropathien werden unterschieden in die hereditäre Neuropathie mit Druckparese (HNPP), hereditäre sensorische und autonome Neuropathie (HSAN), hereditäre motorische Neuropathie (HMN) und die häufigste Form der hereditären motorisch-sensorische Neuropathie (HMSN). Synonym werden die HMSN meist als Charcot-Marie-Tooth Erkrankungen (CMT) bezeichnet (Schara 2015). Die Prävalenz der CMT wird allgemein auf 1:2500 geschätzt, neueste Daten aus Irland gehen von einer Prävalenz-Rate von 10,52 pro 100.000 aus (Pareyson, Saveri, and Pisciotta 2017; Lefter, Hardiman, and Ryan 2017). Genetisch sind die HMSN ebenfalls sehr heterogen, die häufigste Mutation ist eine Duplikation im *PMP22* Gen, die für 40 bis 50 % der CMT-Fälle verantwortlich ist (Pareyson, Saveri, and Pisciotta 2017). Wurde diese Mutation ausgeschlossen, gestaltet sich die genetische Diagnose schwierig, da bisher über 60 Gene bekannt sind (Rossor et al. 2013), deshalb werden nur etwa 60 % der Fälle gelöst (Murphy et al. 2012). Die Symptome der Patienten genau zu beschreiben und elektrophysiologisch zu untersuchen ist entscheidend für eine Identifizierung der pathogenen Mutation. Allerdings kann die gleiche Mutation unterschiedliche Phänotypen verursachen, sogar innerhalb einer Familie (Schara 2015; Pareyson, Saveri, and Pisciotta 2017). Die CMTs werden in über 6 Klassen eingeteilt, die sich in ihrer Form der Vererbung (autosomal-rezessiv oder dominant), dem Erstmanifestationsalter und den Symptomen unterscheiden. CMT1, 2, 3, 5 und 6 werden hauptsächlich autosomal-dominant vererbt. CMT4 wird autosomal-rezessiv vererbt, ebenso wie CMT3 in manchen Fällen. Die CMT1, 2 und 5 treten erst im Erwachsenenalter auf, wohingegen die CMT3, 4 und 6 im Kindesalter beginnen. Die Nervenleitgeschwindigkeit ist in den CMT1, 3, 4 und 6 reduziert und in den CMT2 und 5 normal oder nur leicht verlangsamt. Die Sensibilität ist in der Regel nur leicht beeinflusst, außer in den CMT3 und 4. Bei der CMT4 sind auch zusätzliche Organsysteme betroffen, es kann zu Seh- und Hörstörungen kommen. Für die CMT5 sind spastische Paraparesen charakteristisch. Neben den beschriebenen Manifestationen gibt es weitere klinische und genetische Phänotypen, so wie X-chromosomale CMT-Formen (Hacke, Poeck, and Wick 2016).

### 2.4.3.1 *BSCL2*

*BSCL2* (OMIM: \*606158) kodiert für Seipin, ein Transmembranprotein des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Windpassinger et al. 2004). Die genaue molekulare Funktion von Seipin ist noch unbekannt, es ist jedoch bekannterweise an der Calcium-Homöostase im ER beteiligt und interagiert mit SERCA (Bi et al. 2014). Darüber hinaus ist Seipin an der Lipolyse beteiligt (Zhou et al. 2015) und moduliert die Lipidspeicherung über einen mitochondrialen Metabolismus (Ding et al. 2018).

## 2 Einleitung

Als Erstes wurde *BSCL2* als ursächliches Gen für kongenitale generalisierte Lipodystrophie (Berardinelli–Seip-Syndrom 2, *BSCL2*) beschrieben (Magre et al. 2001). Diese wird autosomal-rezessiv vererbt. Über 20 verschiedene Mutationen sind beschrieben, die alle zu einem loss-of-function führen (Magre et al. 2001; Ito and Suzuki 2009).

Im Jahr 1966 wurde das Silver-Syndrom beschrieben, die betroffenen Patienten zeigen neben einer spastische Paraplegie vor allem eine Atrophie der kleinen Handmuskeln (Silver 1966).

Die genetische Ursache für das Silver-Syndrom wurde erst später entdeckt, es wird verursacht durch heterozygote Mutationen ebenfalls in *BSCL2* (Patel et al. 2001; Windpassinger et al. 2004). Auch andere Erkrankungen mit überlappendem oder anderem Phänotyp werden durch die gleichen Mutationen verursacht. Die distale HMN V ist charakterisiert durch Schwäche und Atrophie der distalen Muskeln der oberen Extremitäten sowie eine Fußheber-Schwäche oder Fußdeformitäten. CMT Typ 2 tritt mit distaler Muskelschwäche und -atrophie der unteren und zum Teil der oberen Extremitäten, sowie einer spastischen Paraparese der unteren Extremitäten in Erscheinung, eine Beteiligung der Handmuskeln zeigt sich nicht. Zusammenfassend werden diese Krankheitsbilder als Seipinopathien beschrieben (Ito and Suzuki 2009).

Für die Seipinopathien sind in *BSCL2* drei verschiedene Missense-Mutationen an nur zwei Positionen beschrieben (p.Asn88Ser, p.Ser90Leu, p.Ser90Trp) (Windpassinger et al. 2004; Choi et al. 2013). Eine weitere, vierte mögliche Mutation wurde in einem Patienten mit distaler HMN beschrieben (Hsiao et al. 2016). Im Jahr 2006 wurde gezeigt, dass das vorherrschende Protein 462 Aminosäuren lang ist (Lundin et al. 2006). Da ursprünglich ein kürzeres Protein beschrieben wurde, werden die bekannten *BSCL2*-Mutationen in der Literatur basierend auf dem alten Transkript (NM\_032667), das 398 Aminosäuren lang ist, beschrieben (Magre et al. 2001). Die beschriebenen Mutationen an den Aminosäurepositionen 88 und 90 zerstören die Glykosylierungsstelle des Proteins (Windpassinger et al. 2004). Funktionelle Studien haben gezeigt, dass mutiertes Seipin nicht richtig gefaltet wird, was zu Aggregaten innerhalb der Zelle führt, die ER-Stress auslösen und damit eine Apoptose der Motoneurone verursachen. Im Gegensatz zur kongenitalen Lipodystrophie wird hier ein toxischer gain-of-function Mechanismus vermutet (Ito and Suzuki 2007; Windpassinger et al. 2004; Ito and Suzuki 2009).

### 2.4.4 Spastische Paraplegien

Die spastischen Paraplegien (SPG) sind eine seltene Erkrankung, bei der nur das erste MN degeneriert (Abbildung 4). Daher ist das Hauptsymptom die symmetrische spastische Parese.

## 2 Einleitung

Bei der unkomplizierten Form betreffen die Symptome meist nur die unteren Extremitäten. In Abgrenzung kommen bei der komplizierten SPG zusätzliche neurologische Symptome wie Taubheit, Demenz, Ataxie vor. Beide Formen können entweder im frühen Kindesalter oder im Erwachsenenalter beginnen, meist ist die Krankheit langsam progredient. In etwa drei Viertel der Fälle wird eine erbliche Komponente vermutet (Hacke, Poeck, and Wick 2016). Es gibt viele verschiedene Formen der SPG und sie sind sehr heterogen, daher ist eine Überlappung der Symptome mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie CMT und ALS möglich (Lo Giudice et al. 2014; de Souza et al. 2017). Die häufigste Form (40-50 %) der erblichen SPG werden durch Mutationen im *SPAST*-Gen verursacht. *SPAST* kodiert das Protein Spastin, ein Mitglied einer ATPase-Familie mit verschiedenen Aktivitäten (Hazan et al. 1999).

### 2.4.5 Duchenne Muskeldystrophie

Im Allgemeinen werden zwei Typen der Muskeldystrophie unterschieden. Schon im 19. Jahrhundert wurden Patienten mit „Paralyse und muskulärer Degeneration“ durch den französischen Neurologen Duchenne de Boulogne beschrieben (Duchenne 1867), die schwere Form der Muskeldystrophie wird daher bis heute Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (DMD) genannt. Etwa hundert Jahre später, im Jahre 1955, beschrieb der deutsche Arzt Peter Emil Becker die mildere Form der Muskeldystrophie, heute bekannt als Muskeldystrophie vom Typ Becker (BMD) (Becker and Kiener 1955). Zusammen bilden beide Krankheitsbilder die Dystrophinopathien. Diese sind seltene X-chromosomal-rezessive Erkrankungen, die etwa 1:4700 männliche Neugeborene betreffen (Helderman-van den Enden et al. 2013). Die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (DMD) ist gekennzeichnet durch eine früh beginnende (vor dem 5. Lebensjahr) progrediente Muskelschwäche, vor allem der unteren Extremitäten. Patienten verlieren die Gehfähigkeit ungefähr mit 10 Jahren. Im zunehmenden Alter sind auch kardiale und respiratorische Muskeln betroffen, was meist zu einem frühen Tod um das 20. Lebensjahr führt. Der Verlauf der Muskeldystrophie vom Typ Becker (BMD) ist milder als bei DMD und zeigt einen variablen Verlauf, der von einer milden Muskelschwäche der unteren Extremitäten bis zu starken Beeinträchtigungen, ähnlich der DMD, reichen kann. Die Lebenserwartung muss nicht verkürzt sein, kann aber durch kardiale Probleme beeinflusst werden. Zusätzlich weisen 30 % der DMD- und BMD-Patienten eine mentale Retardierung auf. Obwohl die Dystrophinopathien X-chromosomale Erkrankungen sind und die betroffenen Patienten in der Regel männlich sind, können auch Konduktorinnen kardiale Symptome oder Muskelschwäche zeigen (Schara 2015).

## 2 Einleitung

Erst im Jahre 1987 konnte das ursächliche Gen (*DMD*) (Koenig et al. 1987) und dessen Protein (Dystrophin) (Hoffman, Brown, and Kunkel 1987) entdeckt werden. Das *DMD*-Gen befindet sich auf dem Nichtmatrizenstrang des kurzen Arms des X-Chromosoms (p21.1). Es besitzt 79 Exons und kodiert für 3685 Aminosäuren (Ensembl GRCh37 Release 93: ENST00000357033.4). Mit über 2,24 Millionen Basenpaaren (ENSG00000198947) ist es das größte Gen des Menschen, das sich durch besonders große Introns auszeichnet (Zerbino et al. 2018). Die Größe des *DMD*-Gens, sowie das spezielle Mutationsspektrum, machen die genetische Diagnostik bis heute schwierig. Die häufigsten Mutationsformen sind große Deletionen, gefolgt von Punktmutationen und Duplikationen (Abbildung 5). Aus diesem Grund ist die *DMD*-Diagnostik in zwei Stufen unterteilt. Zunächst werden Deletionen oder Duplikationen mittels MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) untersucht; kann hierbei kein CNV gefunden werden, wird die komplette kodierende Sequenz des *DMD*-Gens sequenziert. Trotz dieser Diagnostik bleiben zwei bis sieben Prozent der *DMD*-Fälle ungelöst (Okubo et al. 2016; Dent et al. 2005). Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die kodierende Sequenz nur etwa 0,5 % des gesamten Gens ausmacht und der Rest, wie die großen Introns, nicht untersucht wird.

Im Muskel hat das große Protein Dystrophin die Funktion, die extrazelluläre Matrix mit dem kontraktilem Apparat zu verbinden und Stabilität zu verleihen (Guiraud et al. 2015). Der C-Terminus von Dystrophin bindet an beta-Dystroglykan und ist damit mit der extrazellulären Matrix verbunden (Jung et al. 1995). Weiter N-terminal folgen eine Cystein-reiche Domäne und die Central Rod Domäne. Der N-Terminus von Dystrophin bindet an Aktin (Guiraud et al. 2015) (Abbildung 3).

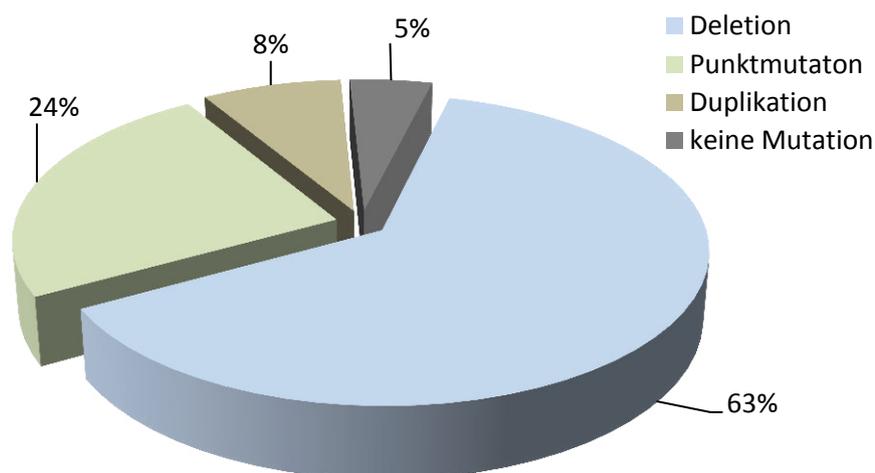


Abbildung 5: Mutationsspektrum in *DMD*. Die abgebildeten Daten sind Mittelwerte aus den Publikationen von Dent und Kollegen (Dent et al. 2005) und Okubo und Kollegen (Okubo et al. 2016). In der Kombination beider Daten ergibt sich ein Anteil von 5 % genetisch ungelöster Fälle.

## 2 Einleitung

Der Unterschied zwischen BMD und DMD besteht auf molekularer Ebene darin, dass das offene Leseraster (englisch: open reading frame; ORF) bei DMD unterbrochen ist und daher ein nicht funktionelles Dystrophin gebildet wird. Bei der BMD sind dagegen *in-frame* Mutationen ursächlich, die den ORF nicht zerstören und ein verkürztes, teilweise funktionsfähiges Dystrophin verursachen (Monaco et al. 1988; Hoffman et al. 1988). Diese Erklärung wurde zum ersten Mal 1988 publiziert und wird heutzutage als Reading-Frame-Rule bezeichnet (Monaco et al. 1988; Chelly et al. 1990). Diese Regel trifft auf 91 % der Fälle zu, wie eine Untersuchung in der Leiden-Datenbank zeigte. Lediglich 7 % aller Patienten haben eine *in-frame* Deletion oder Duplikation, aber einen DMD-Phänotyp, sowie 2 % eine *out-of-frame* Mutation, aber einen BMD-Phänotyp. Die Gründe hierfür können sehr unterschiedlich sein. Zum Beispiel können die, nur auf genomischer Ebene beschriebenen, Mutationen Einflüsse auf das Spleißverhalten haben, die nicht bekannt sind (Aartsma-Rus et al. 2006).

### 2.4.6 Dystroglykanopathien

Dystroglykanopathien gehören zu den angeborenen Glykosylierungsstörungen. Die Glykosylierung beschreibt einen Prozess der posttranslationalen Modifikation, der die Vielfalt und Komplexität des Proteoms erhöht. Durch die kovalente Bindung von Kohlenhydraten an Proteine entstehen Glykoproteine. Hauptsächlich werden O-Glykosylierung und N-Glykosylierung unterschieden. In der N-Glykosylierung werden Kohlenhydrate an das Stickstoffatom der Seitenkette von Asparagin kovalent gebunden, dieser Prozess beginnt im endoplasmatischen Retikulum und wird dann im Golgi-Apparat fortgesetzt. Bei der O-Glykosylierung werden die Oligosaccharide an Hydroxygruppen von Serin oder Threonin gehängt, dieser Vorgang findet im Golgi-Apparat statt. Die glykosidische Bindung erfolgt dabei durch verschiedenste Glykosyltransferasen, die sehr zahlreich sind und 1-2 % des gesamten Genoms ausmachen. Fehler in der Glykosylierung können zu schweren Krankheiten, wie zum Beispiel Muskeldystrophien, führen (Berg et al. 2018).

Dystroglykan ist ein großes Glykoprotein, das vom *DAG1*-Gen kodiert wird (Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1993). Aus einer mRNA des Dystroglykans entsteht durch posttranslationale Modifikation (Proteolyse und Glykosylierung) ein 156 kDa großes extrazelluläres Protein (alpha-Dystroglykan) und ein 47 kDa großes Transmembranprotein (beta-Dystroglykan). Alpha-Dystroglykan bindet extrazellulär an Laminin (Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992) wohingegen beta-Dystroglykan an Dystrophin bindet (Jung et al. 1995). Auf diese Weise verbinden alpha- und beta-Dystroglykan, im Dystrophin-

## 2 Einleitung

assoziiertem-Glykoprotein-Komplex, die extrazelluläre Matrix mit dem Sarkolemm (Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992) (Abbildung 3).

Fehler in der Glykosylierung von Dystroglykan verursachen Dystroglykanopathien, welche ein breites Spektrum an Krankheiten mit unterschiedlichen klinischen Phänotypen und verschiedenen ursächlichen Genen beschreiben (Toda et al. 2003). Durch den Verlust der Glykosylierung kann alpha-Dystroglykan nicht mehr an Laminin binden (Chiba et al. 1997).

### 2.4.6.1 *TMEM5* (Transmembran protein 5)

*TMEM5* (Transmembrane protein 5, OMIM: \*605862) ist ein Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 12 (12q14.2), es besteht aus sechs Exons und kodiert 443 Aminosäuren. Im Jahr 2017 haben Manya und Kollegen eine Namensänderung von *TMEM5* zu *RXYLT1* (Ribitol Xylosyltransferase 1) vorgeschlagen, da dieser Name die Funktion des Proteins besser beschreibe (Manya and Endo 2017).

Erst im Jahr 2012 ist *TMEM5* mit alpha-Dystroglykanopathien in Verbindung gebracht worden (Vuillaumier-Barrot et al. 2012). Das Gen kodiert für ein Transmembranprotein (Yokoyama-Kobayashi et al. 1999), das im Signalweg der O-Glykosylierung von alpha-Dystroglykan als Xylosyltransferase (eine Form der Glykosyltransferase) wirkt (Manya et al. 2016). Darüber hinaus enthalten die Exons 4 bis 6 (Aminosäuren 218-353) eine mögliche Exostosin-Domäne (Vuillaumier-Barrot et al. 2012). Die Exostosin-Familie gehört zu den Tumorsuppressorgenen, die Glykosyltransferase-Aktivität zeigen (Lind et al. 1998).

*TMEM5* ist mit einer autosomal-rezessiven Form von kongenitaler Muskeldystrophie-Dystroglykanopathie A10 (OMIM: #615041) assoziiert. Alle bisher publizierten Mutationen beschreiben einen Aminosäureaustausch oder eine vorzeitige Termination der Aminosäuresequenz. Die meisten Mutationen häufen sich in einer Region, in der die Exostosin-Domäne vermutet wird.

Patienten mit Mutationen in *TMEM5* haben einen variablen Phänotyp, der von milden bis schweren Fällen, bei denen die Patienten früh versterben (Jae et al. 2013), reicht. Erste Patienten wurden mit Pflasterstein-Lissenzephalie, viszeralen Missbildungen, Neuralrohrdefekt und Gonadenfehlentwicklung beschrieben (Vuillaumier-Barrot et al. 2012).

### 2.4.7 Myofibrilläre Myopathien

Myofibrilläre Myopathien (MFM) beschreiben eine Gruppe von genetisch sehr heterogenen Krankheiten, die sich durch morphologische Gemeinsamkeiten in der Muskelhistologie auszeichnen. Im Jahr 1996 schufen Nakano und Kollegen den Begriff „myofibrillar myopathy“, zu dem sie eine Gruppe von Erkrankungen zählten, die alle eine Desintegration

## 2 Einleitung

der myofibrillären Struktur, beginnend an den Z-Scheiben, zeigen. Die Aggregation dieser myofibrillären Proteine beobachteten sie mit dem Elektronenmikroskop (Nakano et al. 1996). Myofibrillen bilden die kontraktile Einheit der quergestreiften Muskelfasern und bestehen aus sich wiederholenden Einheiten von Sarkomeren (siehe 2.3). Die klinischen Symptome von MFM sind charakterisiert durch eine langsam progressive Muskelschwäche, welche distal (77 %) und proximal (96 %) auftritt. Die distale Muskelschwäche ist jedoch in etwa 29 % der Patienten stärker ausgeprägt als die proximale Muskelschwäche. Weitere häufige Symptome sind periphere Neuropathien (14 %) und Kardiomyopathien (16 %), bei Beteiligung der Atemmuskulatur kann Atemnot auftreten. Der Krankheitsbeginn ist sehr variabel und reicht von sieben bis 77 Jahren, mit dem durchschnittlichen Krankheitsbeginn bei  $56 \pm 16$  Jahren (Selcen, Ohno, and Engel 2004; Selcen 2011). *BAG3*-assoziierte MFM und Desminopathien beginnen in der ersten oder zweiten Lebensdekade, wohingegen sich der größte Teil der MFM erst nach dem 40. Lebensjahr manifestiert (Selcen and Engel 1993).

Bis heute ist die gemeinsame histologische und morphologische Charakteristik, der zerfallenden Z-Scheiben-Struktur, die Verbindung zwischen den heterogenen Krankheiten der MFM. Nur für etwa 50 % der Fälle ist eine genetische Ursache bekannt (Kley, Olive, and Schroder 2016). Mittlerweile sind 13 Gene (*ACTA1* OMIM: \*102610, *BAG3* OMIM: \*603883, *CRYAB* OMIM: \*123590, *DES* OMIM: \*125660, *DNAJB6* OMIM: \*611332, *FHL1* OMIM: \*300163, *FLNC* OMIM: \*102565, *HSPB8* OMIM: \*608014, *LDB3* OMIM: \*605906, *LMNA* OMIM: \*150330, *MYOT* OMIM: \*604103, *PLEC* OMIM: \*601282, und *TTN* OMIM: \*188840) beschrieben. Die meisten Formen der MFM folgen einem autosomal-dominanten Erbgang. Einzelne Gene bilden Ausnahmen und zeigen eine heterogene Vererbung. *PLEC*-Mutation verursachen Epidermolysis bullosa simplex mit Muskeldystrophie und werden autosomal-rezessiv vererbt (Winter et al. 2016). Aber auch *CRYAB*, *DES* und *MYOT* zeigen neben der klassischen dominanten Vererbung eine infantile rezessive Form (Kley, Olive, and Schroder 2016; Goldfarb et al. 1998; Lacson et al. 1994). *FHL1* ist das einzige bekannte X-chromosomale Gen, welches MFM verursacht (Selcen et al. 2011). Als letztes wurde *LMNA* als neues MFM-Gen beschrieben und ist damit das 13. bekannte MFM-Gen (Dhawan et al. 2017).

Die Tatsache, dass MFM immer noch eine klinische Diagnose ist, die in der Hälfte der Fälle ohne genetische Ursache bleibt, legt die Vermutung nahe, dass es noch unbekannte MFM-Gene gibt oder bisher unbekannte Mutationsarten.

## 3 Methoden

Im Folgenden werden einige ergänzende Angaben zu methodische Details gemacht, die die angehängten Veröffentlichungen ergänzen sollen.

### 3.1 Molekulargenetik

Die Durchführung der RNA-Isolation, cDNA-Synthese und Sanger-Sequenzierung erfolgte wie beschrieben in Anlage 1, 2 und 3. Im Folgenden sind einige ergänzende Details aufgeführt.

#### 3.1.1 RNA-Isolierung aus Blut

Für die Aufreinigung intrazellulärer RNA aus Vollblut wurde das PAXgene Blood RNA Kit (PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Schweiz) verwendet. Es wurden 2,5 ml Blut in ein PAXgene Blood RNA-Röhrchen (PreAnalytiX GmbH) abgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### 3.1.2 RNA-Isolation aus Muskelgewebe

Frisches Muskelgewebe wurde nach Biopsie auf Trockeneis transportiert und bei -70 °C gelagert. Für die RNA-Isolation wurde das Muskelgewebe ebenfalls auf Trockeneis gelagert und ein etwa 9 mm<sup>3</sup> (3 mm x 3 mm x 3 mm) großes Stück mit einem Skalpell abgetrennt. Anschließend wurde das Muskelstück mit flüssigem Stickstoff gekühlt und geklopft, zur groben Zerkleinerung des Materials. Schließlich wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert, dabei wurde ein Dispergierer (ULTRA-TURRAX T8, IKA, Staufen, Deutschland) verwendet. Die RNA wurde anschließend in 35 µl H<sub>2</sub>O eluiert und bei -70 °C gelagert.

#### 3.1.3 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde, wie in Anlage 2 und 3 beschrieben, nach Angaben des Herstellers mit SuperScript II RT (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) synthetisiert. Dafür wurde ein Anfangsvolumen von 11 µl RNA verwendet.

## 3 Methoden

### 3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Standardmethode in der Molekulargenetik, die verwendet wird zur Vervielfältigung von definierten DNA-Bereichen. PCRs wurden nach Standard-Protokollen (siehe Anlage 1, 2 und 3) durchgeführt, zur Kontrolle der cDNA, zur Amplifikation von gewünschten Gen-Abschnitten vor der anschließenden Sanger-Sequenzierung oder zur Amplifikation von cDNA-Fragmenten zur Überprüfung des korrekten Spleißens. Die Primer für die PCR wurden mit der Software Primer3Plus (Untergasser et al. 2012) erstellt und bei der Firma Metabion (Planegg, Deutschland) bestellt.

### 3.1.5 Sanger-Sequenzierung

Sequenzierungen nach der Sanger-Methode wurden wie beschrieben (Anlage 1, 2 und 3) durchgeführt. Es wurde BigDye Terminator Sequencing mix v1.1 (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet und die Proben wurden auf einem ABI3130xl Genetic Analyzer (ThermoFisher) sequenziert. Analysiert wurden die Daten mit der Software Gensearch (PhenoSystems SA, Braine-le-Château, Belgien).

### 3.1.6 MLPA

Die Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) ist eine Methode zum Detektieren von Kopienzahl-Variationen (CNVs) in der gDNA.

Wie in Anlage 2 beschrieben, wurde die MLPA für *DMD* (SALSA MLPA P034 DMD mix 1 und SALSA MLPA P035 DMD mix 2) nach Angaben des Herstellers (MRC-Holland, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt und anschließend an einem ABI3130xl Genetic Analyzer (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) aufgetrennt. Danach wurden die Daten mit der Software Coffalyser.Net (MRC-Holland) ausgewertet.

Auch bei Patienten mit einem Verdacht auf spastische Paraplegie wurde eine MLPA für die häufigsten Formen (*SPAST* und *ATLI*) durchgeführt. Es wurde der Probenmix SALSA MLPA P165 HSP verwendet. Die Proben wurden, wie oben beschrieben, nach den Angaben des Herstellers (MRC-Holland) bearbeitet, an einem ABI3130xl Genetic Analyzer (ThermoFisher) aufgetrennt und ebenfalls mit der Software Coffalyser.Net (MRC-Holland) analysiert.

### 3 Methoden

#### 3.1.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen erfolgte mit dem Kit QIAEX® (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Es wurde DNA aus 1,5 - 2 % Agarosegelen extrahiert und in 20 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.2 Next-Generation Sequencing

Next-Generation Sequencing wurde an MiSeq oder NextSeq500 Sequenzern (Illumina, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Für alle Anreicherungsverfahren wurden Nextera-Protokolle (Illumina) verwendet, die sich nur in wenigen Punkten unterscheiden.

#### 3.2.1 Nextera Anreicherung

Die Nextera Anreicherung ist eine NGS-Anreicherungsverfahren mit einer enzymatischen Fragmentierung der DNA zur Herstellung von DNA-Librarys. Es wurden vier Sequenzierpanels (Tabelle 1), basierend auf der Nextera-Anreicherung, mit unterschiedlicher Anzahl an angereicherten Genen, und eine Whole Genome Sequenzierung verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Nextera Anreicherungen

Name	Sonden für		
TruSight Exome	2 761 Gene	Nextera Rapid Capture	Anlage 1
Muskelpanel	65 Gene		Anlage 2
Muskelpanel	65 Gene		Anlage 3
Whole Exome	> 214 000 Exons		4.1.3
TruSight One	4 811 Gene	TruSight One	Anlage 4

Die in Anlage 1 beschriebene Anreicherung des TruSight Exome wurde in der vorangegangenen Masterarbeit („Workflow optimization for the data analysis of clinical-exomes“) durchgeführt und im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter analysiert und veröffentlicht (Anlage 1). Das Muskelpanel ist ein kundenspezifisches Genpanel (Kress et al. 2017), während TruSight Exome und TruSight One von Illumina (San Diego, CA, USA) designte Genpanels sind (siehe Abschnitt 7). Das TruSight One Panel wurde nach dem TruSight One Protokoll angereichert, während Muskelpanel, TruSight Exome und Whole Exome nach dem Nextera Rapid Capture Protokoll angereichert wurden (siehe auch Abschnitt 7). Beide Protokolle unterscheiden sich nur in zwei Punkten (Tabelle 2).

### 3 Methoden

Tabelle 2: Unterschiede zwischen TruSight One Protokoll und Nextera Rapid Capture Protokoll

Protokoll-Punkt	TruSight One	Nextera Rapid Capture
Volumen Tagment DNA Enzym	5 µl	15 µl
Zyklen zweite PCR Amplifikation	10 Zyklen	12 Zyklen

#### 3.2.2 Whole Genome Sequencing nach Nextera

Für die Sequenzierung eines gesamten Genoms (Whole Genome Sequencing, WGS) wurde die Anreicherung „Nextera DNA Library Prep“ (siehe 7) von Illumina (San Diego, CA, USA) verwendet und leicht modifiziert:

Zuerst wurde die DNA nach einem Standardprotokoll gefällt. Dies dient dem Entfernen von EDTA, das die nachfolgende Tagmentierung stören kann. Die Konzentration der DNA wurde mit Hilfe einer fluorometrischen Messung am Qubit (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) auf 5 ng/µl eingestellt. Tagmentierung der genomischen DNA und die anschließende Aufreinigung der tagmentierten DNA erfolgten nach Angaben des Protokolls. Für die anschließende Amplifikation der tagmentierten DNA wurde anstatt des im Protokoll beschriebenen Nextera PCR-Master Mix der Library Amp Mix aus dem Kit für die Nextera Rapid Capture Anreicherung verwendet. Danach erfolgte, wieder wie im Protokoll beschrieben, die Aufreinigung der amplifizierten DNA. Zur Qualitätskontrolle wurde DNA nach der Tagmentierung und nach der Amplifikation an einem Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) analysiert. Die Library zeigte eine durchschnittliche Fragmentgröße von 990 bp und eine Konzentration von 8,96 ng/µl.

Zur Sequenzierung wurde die Library auf zwei Mid-Output Flowcells an einem NextSeq500 (Illumina) sequenziert. Im ersten Lauf wurde die Library auf eine finale Konzentration von 1,1 pM und im zweiten Lauf auf 1,5 pM eingestellt.

### 3.3 Bioinformatische Auswertung der NGS-Daten

NGS-Technologien haben die Menge an Sequenz-Daten stark ansteigen lassen, sodass die Analyse der Daten immer komplexer und aufwändiger wird. Mit diesem Problem beschäftigt sich die Bioinformatik.

#### 3.3.1 Analyse der Daten

Alle Sequenz-Daten, die am MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) generiert wurden, wurden intern automatisch in fastq-Dateien konvertiert, auf die einzelnen Patienten verteilt

### 3 Methoden

(demultiplexen) und dann gegen das humane Referenzgenom (GRCh37) aligniert. Für NextSeq500 Daten geschahen die Konvertierung und das Demultiplexen in fastq-Dateien extern mittels eines Scripts (bcl2fastq). Die fastq-Dateien wurden dann mit der Software GensearchNGS (PhenoSystems SA, Braine-le-Château, Belgien) gegen das humane Referenzgenom (GRCh37) aligniert. Mit GensearchNGS wurden die Varianten außerdem gecallt, gefiltert und analysiert, wie in den Anlage 1 und Anlage 4 beschrieben.

Für die Analyse des WGS wurden beide Läufe mit GensearchNGS aligniert und dann zu einem Alignment zusammengefügt („merge“). In diesem Gesamt-Alignment wurden dann alle Varianten im *DMD*-Gen gecallt, die eine minimale Frequenz von 10 % und eine minimale Abdeckung von 5 Reads aufwiesen. Für die anschließende Variantenanalyse wurden nach hemizygoten Varianten (Frequenz > 75 %) mit einer Allelhäufigkeit (MAF) von unter 5 % gefiltert. Die Abdeckung (Coverage) des *DMD*-Gens wurde mit Software-internen Tools analysiert. Die einzelnen Varianten wurden mit Hilfe der Software Alamut Visual (Interactive Biosoftware, Rouen, Frankreich), den darin enthaltenen *in-silico* Programmen und ergänzenden Datenbanken validiert. Die MAF wurde in der Regel mit der Genome Aggregation Database (gnomAD) (Lek et al. 2016) bestimmt, dabei wurde vor allem die MAF der „nicht-finnischen Europäer“ (NFE) angegeben.

### 3.3.2 Vorhersageprogramme

#### 3.3.2.1 Combined Annotation–Dependent Depletion (CADD)

Die CADD Methode kombiniert verschiedene Annotationen zu einem Score (C-Score), der eine Aussage über den negativen Einfluss einer Variante trifft. Alle Varianten, auch intronische, bekommen einen vergleichbaren Score zugewiesen. Der C-Score macht eine Vorhersage darüber, wie pathogen eine Variante im Vergleich zu allen möglichen Varianten ist. Ein C-Score von 10 besagt, dass die Variante zu den 10 % der pathogensten Varianten gehört (Kircher et al. 2014):

$$\text{Anteil pathogenster Varianten} = 10^{\frac{-(C\text{-Score})}{10}}$$

#### 3.3.2.2 Spleißstellen-Vorhersageprogramme

Für die Analyse von Spleißstellen wurden die integrierten Vorhersageprogramme aus Alamut Visual 2.10 (Interactive Biosoftware, Rouen, Frankreich) verwendet (siehe Abschnitt 7). Die Schwellenwerte für das Anzeigen der Vorhersagen wurden für alle Einzelprogramme auf „0“ gesetzt. Für das Tool SpliceSiteFinder-like wurde die Matrix aus Zhang et al. (Zhang 1998) und der Algorithmus aus Shapiro et al. (Shapiro and Senapathy 1987) von Alamut kombiniert.

### 3 Methoden

SpliceSiteFinder-like sowie der Human Splicing Finder (Desmet et al. 2009) verwenden Methoden, die auf Positions-Gewichts-Matrizen beruhen. Die weiteren verwendeten Tools sind: MaxEntScan (Yeo and Burge 2004), GeneSplicer (Pertea, Lin, and Salzberg 2001) und NNSplice (Reese et al. 1997).

#### 3.3.2.3 Missense-Vorhersageprogramme

Zur Interpretation von Missense-Mutationen wurden die vier in Alamut Visual 2.10 (Interactive Biosoftware, Rouen, Frankreich) integrierten Vorhersageprogramme verwendet (siehe Abschnitt 7). Der Algorithmus von Align GVGD stuft Varianten aufgrund der Grantham-Differenz (Grantham 1974) ein (Tavtigian et al. 2006). Das SIFT-Tool berücksichtigt die Schwere eines Aminosäureaustausches und die Protein-Konservierung in homologen Sequenzen (Vaser et al. 2016). MutationTaster ist ein Vorhersageprogramm, das nicht nur Missense-Mutationen, sondern auch kleine Deletionen, synonyme Mutationen und zum Teil intronische Mutationen beurteilt (Schwarz et al. 2010). PolyPhen2 ist ein Programm, das mit der Hilfe von drei Struktur-basierten und acht Sequenz-basierten Faktoren bewertet (Adzhubei et al. 2010).

#### 3.3.3 Schema zum Einstufen

Zum systematischen Einstufen der Varianten wurden diese nach dem Schema in Abbildung 6 in die sechs Kategorien („artefact“, „benign“, „likely benign“, „uncertain“, „likely pathogenic“ und „pathogenic“) eingestuft. Diese Klassen wurden dann für die einzelnen Varianten in GensearchNGS (PhenoSystems SA, Braine-le-Château, Belgien) gespeichert, sodass eine eigene interne Datenbank (zurzeit > 11 000 Varianten) mit bekannten Varianten entstand. Die Variantenkategorien basieren auf den Kategorien der Richtlinien des American College of Medical Genetics and Genomics (Richards et al. 2015), Einstufungskriterien wurden vereinfacht. Die Kategorie „artefact“ dient der Kennzeichnung von falsch positiven Varianten, die durch den Sequenzer entstanden sind. Mittlerweile existieren in GensearchNGS weitere Variantenklassen („undefined“, „uncertain important“, „false reference“), die in Abbildung 6 nicht erwähnt sind, da sie zu Beginn dieser Arbeit noch nicht existierten. Diese zusätzlichen Kategorien sollen weitere häufige Variantenarten einordnen. Unklare Artefakte, die ihre Ursache in einer geringen Abdeckung oder einem möglicherweise fehlerhaften Alignment (zum Beispiel bei Pseudogenen) haben werden als „undefined“ eingestuft. Varianten, deren Pathogenität zwischen „uncertain“ und „likely pathogenic“ liegt, werden als „uncertain important“ gespeichert. Eine häufige Form der Varianten sind „false reference“ Varianten, die nicht im Referenzgenom enthalten sind, aber trotzdem das häufigste

### 3 Methoden

Allel darstellen. Da sich das humane Referenzgenom noch in Bearbeitung befindet, ist es wahrscheinlich, dass solche Varianten in späteren Genom-Versionen (z.B. GRCh 38) nicht mehr als Varianten angezeigt werden.

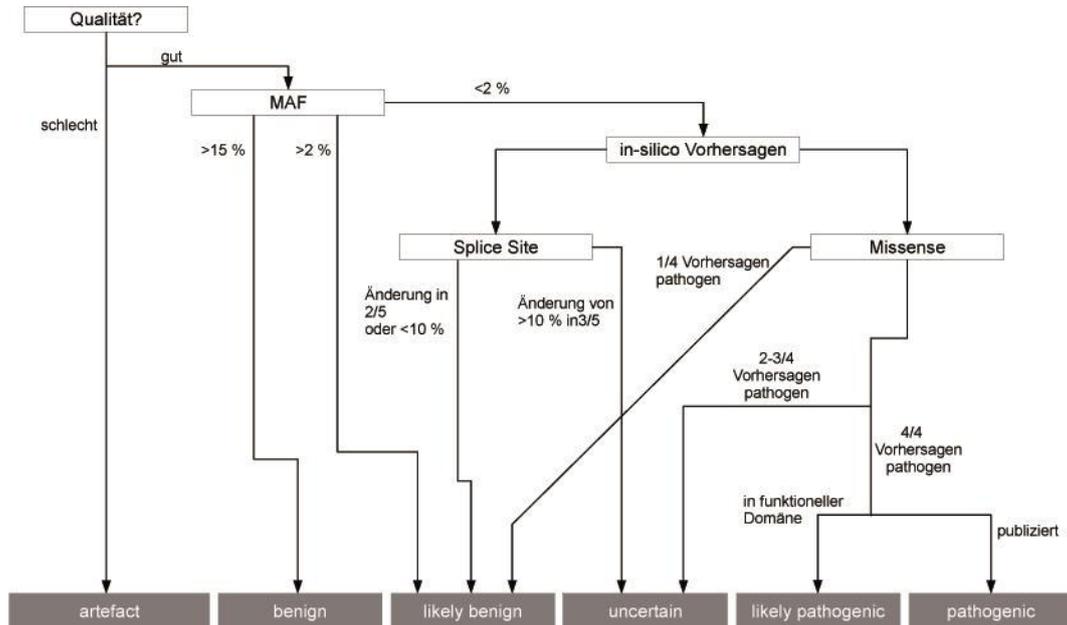


Abbildung 6: Schema zum systematischen Einstufen von Varianten. Nicht aufgeführt sind Nonsense- und Frameshift-Varianten, diese wurden als „likely pathogenic“ eingestuft.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Hereditäre Neuropathien

Hereditäre Neuropathien sind divers und können einen überlappenden Phänotyp zeigen. Im folgenden Abschnitt werden Neuropathien mit einem erweiterten Phänotyp-Spektrum und die allgemeine Diagnostik erörtert.

#### 4.1.1 Erweiterter Phänotyp bei *BSCL2*-Neuropathie

In Anlage 1 (Musacchio et al. 2017) werden vier Familien mit einem breiten phänotypischen Spektrum von spastischen Paraplegien beschrieben (Abbildung 7). Sieben Patienten, sowie fünf asymptotische Verwandte wurden neurologisch, elektrophysiologisch und genetisch untersucht. In drei Familien war jeweils nur ein Familienmitglied betroffen und die Eltern gesund.

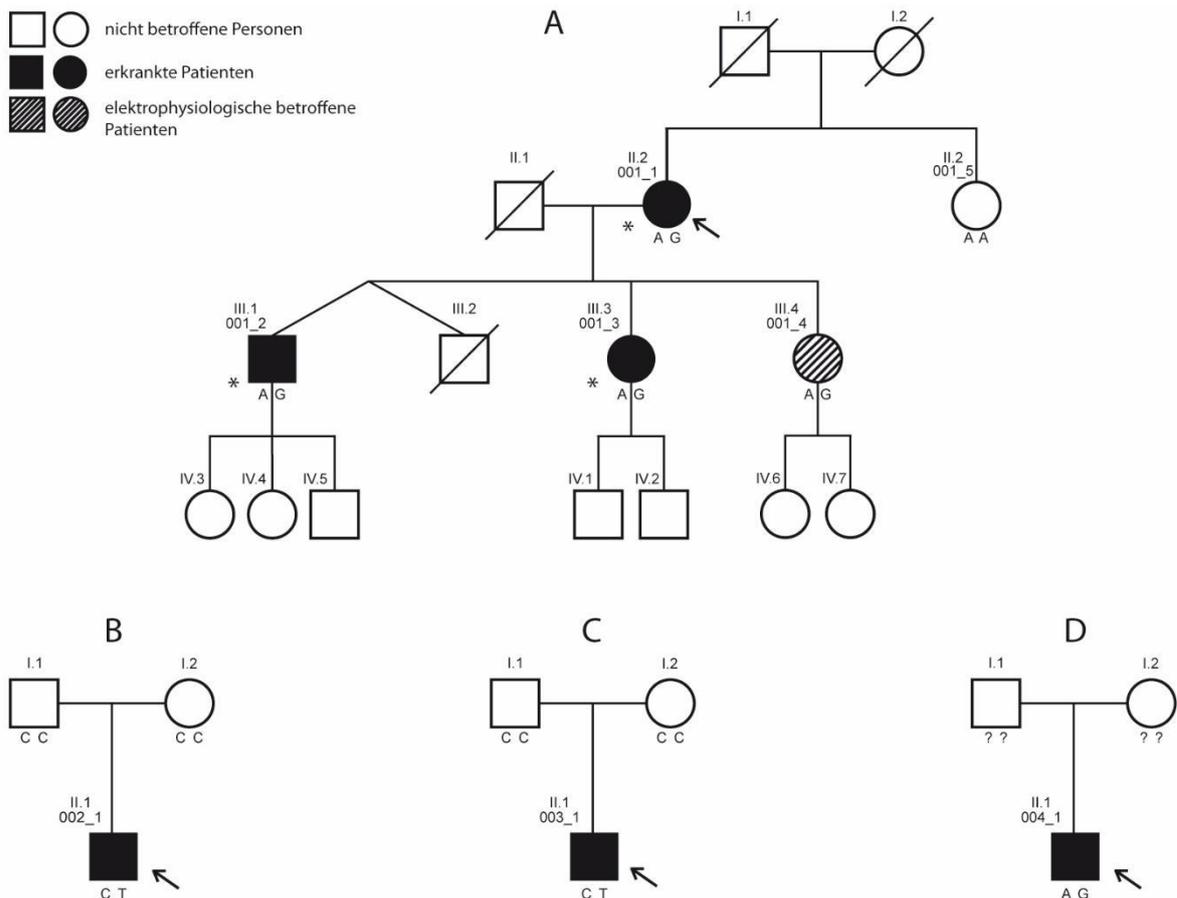


Abbildung 7: Stammbäume der untersuchten Neuropathie-Familien. Die Legende erklärt die verwendeten Symbole. Pfeile markieren die Index-Patienten. Familien 001 (A) und 004 (D) haben die Mutation p.(Asn88Ser) und Familien 002 (B) und 003 (C) haben die Mutation p.(Ser90Leu). Für alle sequenzierten Personen ist der Genotyp abgebildet. Die Eltern in Familie 004 wurden nicht genetisch untersucht, ihr Genotyp ist daher unbekannt. Von Patienten, die mit einem Sternchen markiert sind wurde eine NGS-Analyse des TruSight Exome Panels durchgeführt. Die Abbildung wurde modifiziert aus Musacchio et al. (Musacchio et al. 2017).

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

In Familie 001 zeigte sich ein besonders variabler Phänotyp. Die Index-Patientin (001\_1) zeigte zum ersten Mal mit 61 Jahren Symptome. Beginnend mit einer langsam progressiven Schwäche der rechten Hand, entwickelte sie im Verlauf Atrophien der kleinen Handmuskeln (*Mm. interossei dorsales I*) und eine symmetrische distale Armparese. An den unteren Extremitäten zeigten sich gesteigerte Reflexe. Da in der Elektroneurografie Nervenleitblöcke aufgefallen waren, wurde bei ihr die Diagnose einer multifokalen motorischen Neuropathie (MMN) gestellt. Nach Diagnosestellung der MMN wurde sie, wie bei MMN üblich, mit Immunglobulinen behandelt. Unter dieser Therapie nahmen ihre Symptome nicht zu, die Nervenleitblöcke verschwanden.

Der zweite Betroffene der Familie (001), Patient 001\_2, zeigte zuerst Faszikulationen an den Beinen, dann am ganzen Körper. Weiterhin klagte er über schmerzhafte Krämpfe an den unteren Extremitäten. Wie seine Mutter (001\_1) zeigte er eine Atrophie der kleinen Handmuskeln, gesteigerte Reflexe, jedoch keinen Leitungsblock. Seine Erkrankung war sehr rasch progredient, sodass sich eine zunächst nur milde distale Tetraparese in wenigen Wochen in eine schwere Form wandelte. Zwei Jahre später war er auf einen Rollstuhl angewiesen und wurde nachts nicht-invasiv beatmet. Er erfüllte nach neurologischer und elektrophysiologischer Untersuchung die El-Escorial-Kriterien (Brooks et al. 2000), und litt nach dieser Definition an ALS. Bei ihm wurde daher ein C9orf72-Repeat zur möglichen Diagnose einer FTDALS1 (frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis) untersucht und ausgeschlossen. Ein Zwillingsbruder des Patienten 001\_1 war im frühen Erwachsenenalter an einem Unfall verstorben. Seine jüngere Schwester (001\_3) litt ebenfalls an einer Schwäche und Atrophie der kleinen Handmuskeln, sowie Faszikulationen und schmerzhaften Krämpfen an den unteren Extremitäten. Die ältere Schwester (001\_4) zeigte zur Zeit der Untersuchung noch keine Atrophie der Handmuskeln, aber Faszikulationen und gesteigerte Reflexe der unteren Extremitäten. Die ebenfalls untersuchte Schwester der Index-Patientin (001\_5) zeigte keine klinischen oder elektrophysiologischen Symptome.

Da in der Familie (001) unterschiedliche Diagnosen bestanden, von ALS über MMN bis zu einer subklinischen Neuropathie, die Atrophie der Handmuskeln aber ein gemeinsames Symptom war, wurde eine gemeinsame genetische Ursache vermutet. Zur Klärung dieser gemeinsamen genetischen Ursache wurde eine Panel-Analyse der Patienten 001\_1, 001\_2 und 001\_3 durchgeführt. Dazu wurde das TruSight Exome bei allen drei Patienten angereichert und analysiert (siehe 3.2.1). Für die elektronische Analyse der Daten wurde zunächst eine Liste mit 54 Genen zusammengestellt, die mit dHMN, ALS und CMT assoziiert waren (Tabelle 3).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3: 54 untersuchte Gene, die mit dHMN, ALS und CMT assoziiert sind und im TruSight Exome enthalten sind.

Gene								
AARS	ALS2	ANG	BSCL2	CHMP2B	DCTN1	DNM2	DYNC1H1	EGR2
ERBB4	FGD4	FIG4	FUS	GARS	GDAP1	GJB1	HOXD10	HSPB1
HSPB3	HSPB8	IGHMBP2	INF2	KARS	KIF1B	LITAF	LMNA	LRSAM1
MAPT	MED25	MFN2	MPZ	MTMR2	NDRG1	NEFL	OPTN	PLEKHG5
PMP22	PRPS1	PRX	PSEN1	RAB7A	REEP1	SBF2	SETX	SH3TC2
SIGMAR1	SLC52A3	SOD1	SPG11	TARDBP	TRPV4	UBQLN2	VAPB	VCP

Anschließend wurde zuerst nach gemeinsamen Varianten in allen drei Patienten in diesen Genen gesucht. Dabei fiel eine heterozygote Variante (NM\_001130702.2:c.263A>G; p.(Asn88Ser)) in *BSCL2* (OMIM: \*606158) auf (Abbildung 8), die bereits in der Literatur in Patienten mit einer autosomal-dominanten spastischen Paraplegie 17 (OMIM: #270685) beschrieben war. Im Anschluss wurde die Variante in allen Patienten der Familie mittels Sanger-Sequenzierung getestet. In den Patienten 001\_1, 001\_2 und 001\_3 konnte die Variante aus den NGS-Daten bestätigt werden, in der nur leicht betroffenen Tochter (001\_4) wurde die Variante ebenfalls nachgewiesen. In der neurologisch gesunden Schwester (001\_5) wurde die Mutation nicht gefunden.

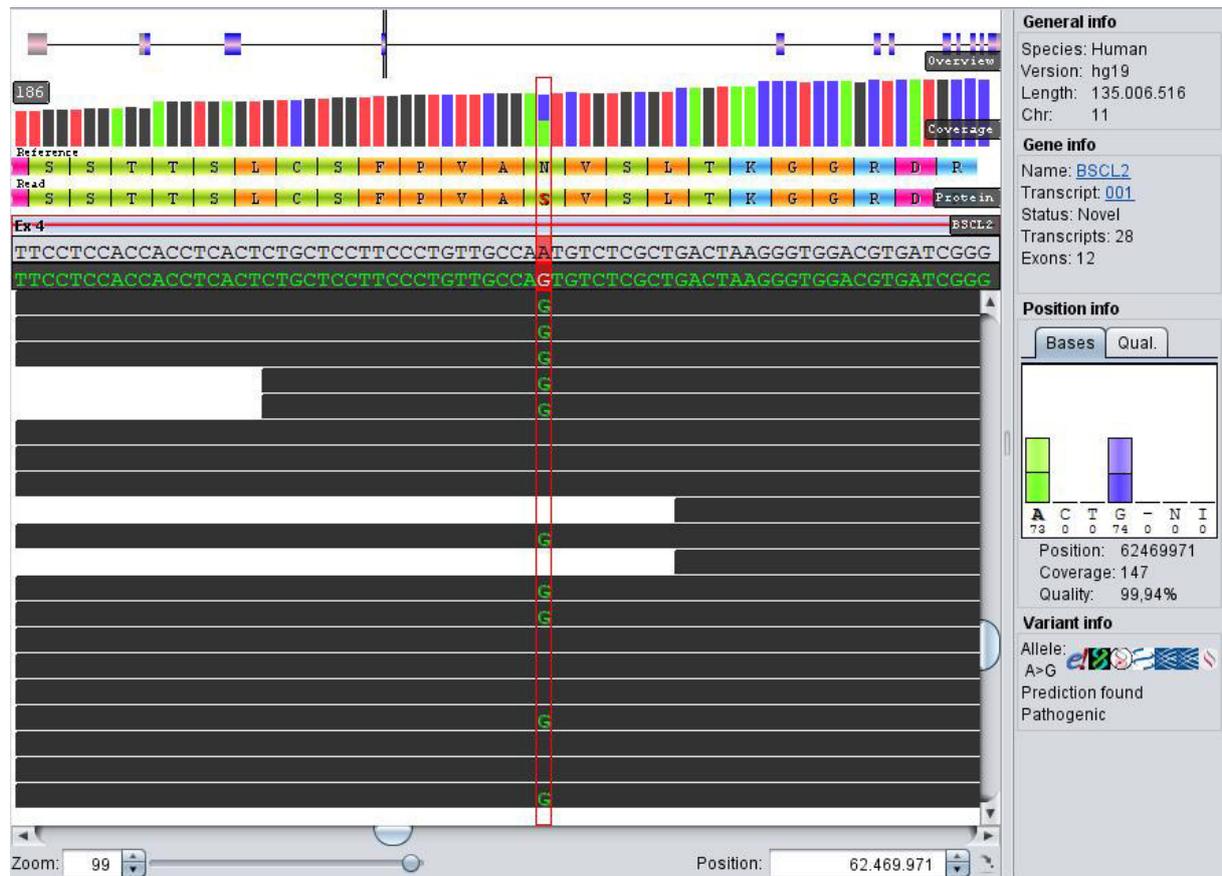


Abbildung 8: NGS-Daten aus GensearchNGS für *BSCL2*. Abgebildet ist das Alignment im „Viewer“. Oben im „Overview“ ist die Struktur des Gens mit Exons (blaue Kästen) und Introns (grau Linien) dargestellt. Danach folgt die „Coverage“ und die Proteinsequenz. Die grau hinterlegte Sequenz zeigt die Referenz-Sequenz. Die schwarz hinterlegte Sequenz in grüner Schrift ist die Sequenz, die sich aus den Daten des Patienten ergibt. Die schwarzen Balken stellen je einen Read dar, die

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Buchstaben in den Reads zeigen an, welche Basen von der Referenz-Sequenz abweichen. In der Mitte des Bildes ist die Variante (NM\_001130702.2:c.263A>G; p.(Asn88Ser)) der Patienten markiert. In der rechten Spalte sind allgemeine Informationen zur Sequenz zu sehen, zum Gen und Transkript, sowie zur Verteilung der Basen an der markierten Position.

Patienten 002\_1 und 003\_1 zeigten beide vor ihrem 10. Lebensjahr leichte Symptome einer distalen Muskelschwäche der unteren Extremitäten. Im Laufe der Zeit entwickelten beide eine beidseitige, distal betonte spastische Lähmung und eine Atrophie der kleinen Hand- und Fußmuskeln. Bei beiden Patienten ist die Krankheit nur langsam progredient, sodass die Gehfähigkeit erhalten geblieben ist. Die Eltern beider Patienten sind neurologisch gesund.

Patient 004\_1 zeigte, wie die Patienten aus Familie 001, erst mit über 40 Jahren Symptome einer Muskelschwäche in beiden Händen. Mit der Zeit kam eine Spastik der unteren Extremitäten hinzu, sowie eine Atrophie an den oberen und unteren Extremitäten. Er gab an, dass in seiner Familie keine neurologischen Erkrankungen bekannt seien, seine Eltern standen nicht für eine neurologische Untersuchung zur Verfügung.

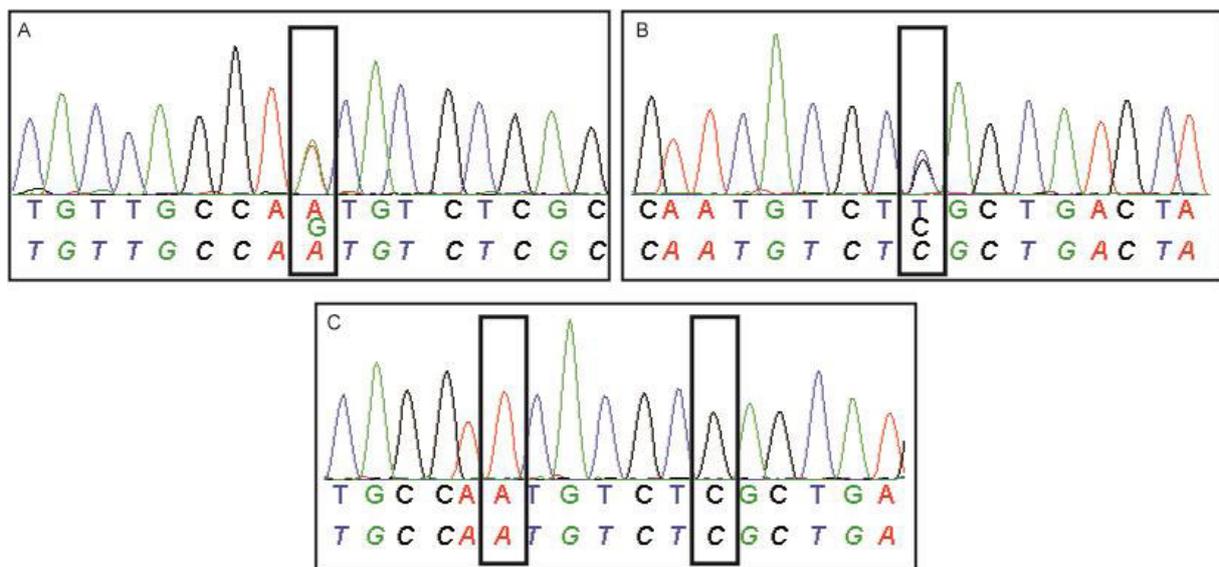


Abbildung 9: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung von *BSCL2*. A zeigt das Elektropherogramm einer Mutation an der Position c.263A>G (p.Asn88Ser), wie sie in den Patienten 001\_1, 001\_2, 001\_3, 001\_4 und 004\_1 gefunden wurde. B zeigt das Elektropherogramm einer Mutation an Position c.269C>T (p.Ser90Leu), wie es in den Patienten 002\_1 und 003\_1 gefunden wurde. C zeigt ein Elektropherogramm einer gesunden Kontrolle, die weder an der Position c.263 noch c.269 (schwarze Rahmen) eine Mutation hat, wie die Eltern von 002\_1 und 003\_1 und 001\_5.

In den Familien 002, 003 und 004 war jeweils nur ein Index-Patient betroffen, das klinische Bild war eindeutig einer Seipinopathie zuzuordnen. Daher wurde in diesen Familien nur das Exon 3 des *BSCL2*-Gens mittels Sanger-Sequenzierung untersucht.

In Familien 002 und 003 konnte jeweils die Mutation p.(Ser90Leu) (NM\_001130702.2:c.269C>T) in den Index-Patienten, jedoch nicht in den Eltern detektiert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei beiden Patienten jeweils um eine Neumutation handelt. Im Index-Patienten 004\_1, wurde die Variante p.(Asn88Ser) (NM\_001130702.2:c.263A>G), wie in Familie 001, gefunden. Die Eltern dieser Patienten standen für eine genetische Untersuchung nicht bereit.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Die schon in der Einleitung (2.4.3) erwähnte Komplexität der Einteilung der erblichen Neuropathien zeigt sich in dem hier beschriebenen Krankheitsbild besonders. Es lässt sich weder ein einheitlicher Phänotyp noch eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation beschreiben. Die hier beschriebenen Patienten zeigen, wie auch in der Literatur, dass klinisch sowohl das erste, wie auch das zweite, Motorneuron betroffen sein kann. Es scheint auch keine Unterschiede im Phänotyp zwischen den Mutationen p.(Asn88Ser) und p.(Ser90Leu) zu geben. Zwar scheinen die Patienten mit der p.(Ser90Leu)-Mutation auch in den hier beschriebenen Fällen früher betroffen zu sein. Ein schwererer Verlauf kann diesen Fällen jedoch nicht zugeschrieben werden, da die schnellste Progression der Patient 001\_2 mit der Mutation p.(Asn88Ser) zeigte. Das phänotypische Spektrum der gleichen Mutation kann auch innerhalb einer Familie sehr unterschiedlich sein, wie Familie 001 zeigt. Während Patient 001\_2 einen rasch progredienten ALS-Phänotyp hat, ist seine Schwester (001\_4) nur von leichten Symptomen betroffen. Daher sollte bei der klinischen Diagnose nicht nur auf das charakteristische Symptom der Handmuskelatrophie geachtet werden, sondern auch bei reduzierter Penetranz oder anderen Krankheitsbildern, wie ALS und MMN, an *BSCL2* gedacht werden.

Bemerkenswert an den vorgestellten Fällen ist, dass zum ersten Mal eine *BSCL2*-Mutation in einem Patienten mit einer klinisch wahrscheinlichen ALS nachgewiesen werden konnte. Dies bedeutet, dass das klinische Bild der Motorneuronen-Seipinopathien noch weiter ausgedehnt werden muss und jetzt auch ALS sowie MMN enthält. Als Windpassinger und Kollegen im Jahr 2004 die Aggregate beschrieben, die sich in den Zellen durch mutiertes Seipin bilden, mutmaßten sie, dass Mutationen in Seipin aufgrund der Komplexität der Proteinfaltung auch Einfluss auf andere Motorneuronen-Erkrankungen, wie ALS, haben könnten (Windpassinger et al. 2004). Diese Vermutung konnte durch den Patienten 001\_2 bestätigt werden. Auch in weiteren neurodegenerativen Erkrankungen wird mittlerweile eine fehlerhafte Proteinfaltung diskutiert (Ito and Suzuki 2009; Kumar et al. 2016). Auch ein Overlap mit MMN wurde in Familie 001 beobachtet. Die Antikörper-Gabe der Patientin 001\_1 wurde nach der *BSCL2*-Diagnose eingestellt, ohne dass eine Verschlechterung der Symptome eintrat. Das Symptom der Leitungsblöcke ist im Zusammenhang mit diesen Erkrankungen aber nicht neu und wurde schon in einem Patienten mit Silver-Syndrom beschrieben (Windpassinger et al. 2003).

Diese Variabilität lässt zum einen vermuten, dass es noch weitere Phänotypen im Spektrum der hereditären Neuropathien geben könnte, die genetisch durch eine *BSCL2*-Mutation begründet sind. Zum anderen muss es weitere, noch unbekannte, zusätzliche Faktoren geben, die für die unterschiedliche Ausprägung verantwortlich sind. Der schwere Phänotyp des

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Patienten 001\_2, im Vergleich zu seiner Familie könnte, zum Beispiel durch Modifier-Gene begründet sein.

### 4.1.1.1 Suche nach genetischen Modifiern

Zur weiteren Klärung des schweren Phänotyps des Sohnes (001\_2), wurde in diesem Patienten nach Modifier-Mutationen gesucht. Dafür wurden Varianten analysiert, die nur im Sohn und nicht in den anderen, ebenfalls sequenzierten, Familienmitgliedern (001\_1 und 001\_3), vorhanden waren. Zuerst wurde überprüft, ob Patient 001\_2 weitere Varianten in *BSCL2* hatte. Dabei wurden beide Transkripte (NM\_032667 und NM\_001122955) berücksichtigt, alle Varianten, die eine MAF von unter 5 % aufweisen und in Exons oder nur maximal 20 bp im Intron liegen, wurden untersucht. Außer der beschriebenen Mutation gab es keine zusätzlichen Varianten. Auch wenn alle Filter entfernt wurden, hatte der Patient nur zwei intronische Polymorphismen (NM\_032667.6(*BSCL2*):c.574-49T>C, MAF: 75 % und NM\_032667.6(*BSCL2*): c.573+69A>G, MAF: 74 %) im Intron 5, die vermutlich angereichert wurden, weil das Intron 5 sehr klein ist (189 bp).

Im nächsten Schritt wurde eine neue Funktion von GensearchNGS getestet, mit der direkt in der Variantenliste Assoziationen in Protein-Netzwerken berücksichtigt werden. Bei der Suche nach Varianten mit Gen-Namen oder Phänotypen werden auch Varianten in Genen berücksichtigt, deren Proteine miteinander interagieren. Dafür wird die Datenbank String (<https://string-db.org/>) verwendet (Szklarczyk et al. 2017). Es wurden maximal 10 Interaktionspartner berücksichtigt und ein minimaler Score von 0,7 erwartet. Insgesamt wurden 5 verschiedene Modifier-Suchläufe durchgeführt, die in Tabelle 4 mit den verwendeten Filtereinstellungen gezeigt sind. Insgesamt wurden vier unterschiedliche Varianten in diesen fünf Läufen entdeckt, die in Tabelle 5 aufgelistet sind. Zuletzt wurden auch Varianten mit InterVar (Li and Wang 2017) überprüft. Dieses Tool stuft Varianten automatisch basierend auf den ACMG/AMP Richtlinien von 2015 (Richards et al. 2015) ein.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4: Übersicht über die gefundenen Varianten in verschiedenen Modifier-Suchläufen und die zugehörigen Filtereinstellungen. Als ROI wurde bei allen Suchen das Manifest des TruSight Exome Panels verwendet. Bei InterVar bezeichnen die interessanten Varianten alle Varianten, die als „uncertain“, „likely pathogenic“ oder „pathogenic“ eingestuft wurden, Artefakte wurden entfernt.

Filter	1	2	3	4	5	InterVar
ROI	Ja	ja	ja	ja	ja	Ja
MAF	< 2%	< 2%	< 2%	< 2%	< 2%	< 2%
Exon distance	< 21 bp	< 21 bp	< 21 bp	< 21 bp	< 21 bp	< 21 bp
Frequenz	-	> 30 %	> 30 %	> 30 %	> 30 %	> 30 %
Gen	BSCL2	-	-	-	-	-
Phänotyp	-	ALS	ALS	Neuro- pathy	Neuro- pathy	-
Netzwerk	ja	-	ja	-	ja	-
Varianten insgesamt	1	11	38	17	48	104
interessante Varianten	0	1	2	2	2	23

Auffällig ist, dass insgesamt in den fünf Suchläufen wenig interessante Varianten entdeckt wurden und in der Suche mit InterVar ein Viertel aller Varianten als „uncertain significance“ eingestuft wurde. Keine Variante wurde als „likely pathogenic“ oder „pathogenic“ eingestuft. Bei den 23 unklaren Varianten in InterVar fiel auf, dass bei 8 Varianten der einzige angegebene Grund eine sehr geringe MAF in Populationsdatenbanken ist (Kriterium PM2 der ACMG/AMP Richtlinien). In vier Fällen gibt es nur einen schwachen Hinweis auf eine benigne Variante und in zwei Fällen sind keine Kriterien erfüllt. Dies zeigt, dass Varianten von diesem Programm automatisch als „uncertain“ eingestuft werden, wenn es zu wenig oder gar keine Informationen über eine Variante gibt. Beim Umgang mit diesen Daten sollte dies berücksichtigt werden. Für die hier erhobenen Daten heißt dies, dass von den 23 verdächtigen Varianten ein großer Teil keine Information oder nur einer Allelfrequenz besitzt und auch für die restlichen Varianten nicht genügend Informationen vorhanden sind für eine automatische Klassifizierung.

Bei der manuellen Klassifizierung (siehe 3.3.3) wurde auch die Abwesenheit von Hinweisen, die auf eine Pathogenität hinweisen, als ein Hinweis gegen ihre Pathogenität gesehen, wie das Einstufen der Variante durch Vorhersageprogramme als „benign“ (entspricht etwa Kriterium PP3 der ACMG/AMP Richtlinien), daher wurden hier sehr viel weniger Varianten als auffällig markiert.

Der Vorteil der automatischen Einstufung liegt darin, dass durch das konservative Einstufen weniger Varianten übersehen werden und zu einem späteren Zeitpunkt, wenn eventuell mehr

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Informationen vorhanden sind, eine abschließende Einstufung möglich ist. Der Nachteil liegt darin, dass so viele Varianten als unklar eingestuft werden, dass sich in der Masse schwer gute Kandidaten finden lassen.

Tabelle 5: Die vier unterschiedlichen Varianten aus den fünf Modifier-Suchläufen. Für gnomAD sind die Frequenzen der nicht-finnischen Europäer (NFE) aufgelistet, darunter befindet sich die Anzahl an homozygoten Trägern in den NFE in gnomAD. Es wurden vier Vorhersageprogramme für Missense Mutationen berücksichtigt: 1: Align GVGD, 2: SIFT, 3: MutationTaster, 4: Polyphen2.

Variante	Domain	gnomAD	Vorhersageprogramme				InterVar
			1	2	3	4	
NM_000095.2(COMP): c.2048G>T p.(Arg683Leu)	546-743 TSP_C domain	0,006% 0	C65	delet- erious	disease causing	probably damaging	uncertain
NM_006059.3(LAMC3): c.3371C>T p.(Ser1124Phe)	-	1,1% 8	C0	delet- erious	polymor- phism	probably - possibly damaging	likely benign
NM_001145320.1(ADAMTSL2): c.2613G>A p.(Val871=)	-	-	mögliche neue kryptische Donor- Spleißstelle				likely benign
NM_006996.2(SLC19A2): c.1256G>A p.(Arg419His)	-	0% 0	C0	tolerated	disease causing	probably - possibly damaging	uncertain

Nur zwei Varianten (NM\_000095.2(COMP):c.2048G>T und NM\_006996.2(SLC19A2):c.1256G>A) wurden mit beiden Methoden als „uncertain“ eingestuft. *COMP* (OMIM: \*600310) kodiert für ein Protein der extrazellulären Matrix, dass die Fibrillenbildung von Kollagenen unterstützt (Halasz et al. 2007). *SLC19A2* (OMIM: \*603941) kodiert für einen Thiamin-Transporter (Fleming et al. 1999). Auch wenn Thiamin (Vitamin B1) ein wichtiges Vitamin für das Nervensystem ist (Berg et al. 2018), kann für beide Varianten keine Aussage über ihren Einfluss auf das Krankheitsbild des Patienten getroffen werden.

Da Modifier nur in Zusammenhang mit einer pathogenen Variante einen Effekt haben, können sie mit einer viel häufigeren Frequenz in der Bevölkerung vorkommen, als die hier berücksichtigten 2 %. Werden auch Varianten mit höherer MAF miteingeschlossen, kommen noch mehr Varianten in Betracht, über die keine Aussage getroffen werden kann. Zur sicheren Annahme eines Modifiers wäre ein zweiter Betroffener mit vergleichbarem Phänotyp wichtig. Gäbe es einen zweiten Betroffenen könnte nach gemeinsamen Varianten in beiden Betroffenen gesucht werden, die nicht in den leichter betroffenen Verwandten vorkommen. Auf diese Weise wäre die Suche stark eingegrenzt und es könnten passende Modifier identifiziert werden.

### 4.1.2 ALS-Kohorten Screening nach *BSCL2*-Mutation

Zur Identifikation eines zweiten Patienten mit einer ALS-Verlaufsform der Seipinopathie wurden 90 ALS-Patienten auf eine *BSCL2*-Mutation untersucht. Dafür wurde in allen Patienten das Exon 3 in *BSCL2* (NM\_032667) sequenziert. In keinem der 90 Patienten konnte eine Variante an den bekannten Positionen der Glykosylierungsstellen in *BSCL2* gefunden werden. In den Sequenzier-Daten war die Position eines häufigen Polymorphismus (NM\_032667.6:c.294+11G>T) enthalten. Dieser wurde mit einer MAF von 23,08 % in der ALS-Kohorte gefunden. In Populationsdatenbanken ist dieser SNV mit einer MAF von 22,09 % (gnomAD, NFE) beschrieben. Auch hier lässt sich daher keine Abweichung von der Normalbevölkerung feststellen.

Da die bekannten *BSCL2*-Mutationen kein weiteres Mal in fast 100 ALS-Patienten gefunden wurden, ist *BSCL2* keine häufige Ursache einer ALS und ebenfalls scheint die ALS-Verlaufsform der Seipinopathie selten zu sein. Da kein zweiter Betroffener identifiziert wurde, war eine weitere Suche oder Validierung von Modifiern nicht möglich.

### 4.1.3 Spastische Paraplegien in der Diagnostik

Wie in 2.4.4 beschrieben sind SPGs eine weitere seltene Form der erblichen Neuropathien, die zum Teil eine phänotypische Überlappung mit den CMTs zeigen. Im Laufe dieser Arbeit wurden insgesamt 14 Fälle mit Verdacht auf spastische Paraplegien (SPG) untersucht. Zuerst wurde für die Diagnostik das TruSight One Panel (3.2.1) verwendet, aber ab dem zehnten Patienten wurde WES (3.2.1) durchgeführt. Zusätzlich wurde bei allen Patienten eine SPAST-MLPA (3.1.6) durchgeführt, da die häufigste Form der SPG die SPG4 (*SPAST*) ist, für die auch CNVs beschrieben sind (Beetz et al. 2006). In Tabelle 6 ist eine Übersicht aller Fälle dargestellt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6: Untersuchte SPG-Fälle

Anreicherung	Patient	SPAST-MLPA	gefundene Mutation
TruSight One	SPG_1	unauffällig	-
TruSight One	SPG_2	unauffällig	<i>FARS2</i>
	SPG_3	Deletion	<i>SPAST</i> Deletion
	SPG_4	unauffällig	-
	SPG_5	Deletion	<i>SPAST</i> Mutation und Deletion
	SPG_6	unauffällig	<i>POLG, MME</i>
TruSight One	SPG_7	unauffällig	-
TruSight One	SPG_8	unauffällig	<i>KIF5A</i>
	SPG_9	unauffällig	<i>GARS</i>
Whole Exome	SPG_10	unauffällig	-
Whole Exome	SPG_11	unauffällig	-
Whole Exome	SPG_12	unauffällig	<i>KIF5A</i>
	SPG_13	unauffällig	<i>COX6A1</i>
Whole Exome	SPG_14	unauffällig	<i>ZFYVE27</i>

Für die Variantensuche wurden Varianten in UTR-Bereichen ausgeschlossen ( $\text{type} \neq 5' \text{UTR}$ ,  $\text{type} \neq 3' \text{UTR}$ ) und die Varianten nach der Variantenfrequenz ( $\text{Frequency} < 15\%$ ), der Allelfrequenz ( $\text{MAF} < 2\%$ ) und dem Abstand zum Exon ( $\text{Exon distance} < 21$ ) gefiltert. Zusätzlich wurde ein Phänotyp-Filter verwendet. Hierfür wurde zuerst nach Varianten in Genen gesucht, die in der Human Phenotype Ontology (HPO; <http://www.human-phenotype-ontology.org>) (Kohler et al. 2017) mit dem Phänotyp HP:0001258 (spastic paraplegia) assoziiert sind, und dann nach dem Begriff „charcot“, da es keinen einheitlichen HPO-Term für die CMTs gibt, diese aber phänotypisch mit den SPGs überlappen können. Im Folgenden werden die fünf WES-Fälle näher vorgestellt und zwei TruSight One-Fälle mit verwandten Mutationen.

Für die Patienten SPG\_10 und SPG\_11 konnte keine ursächliche Variante identifiziert werden. Für den Patienten SPG\_10 wurde keine Variante pathogener als „likely benign“ eingestuft. Patient SPG\_11 hatte lediglich in der Suche nach CMT-Varianten eine Variante, die als „uncertain“ eingestuft wurde (NM\_001605.2(AARS):c.2791G>A, p.(Gly931Ser)), aber noch nicht beschrieben ist. Diese heterozygote Variante wird pathogen vorhergesagt und liegt in einer funktionellen Domäne, ist allerdings in der Bevölkerung mit 1,03 % (gnomAD,

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

NFE) und insgesamt 21 homozygoten Trägern zu häufig für eine autosomal-dominante Erkrankung. Das Gen *AARS* ist eines von 37 Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (ARs), die jeweils eine Aminosäure für die folgende Translation auf tRNAs transferieren. Häufig sind Mutationen in ARs in autosomal-dominanten neurologischen Erkrankungen beschrieben (Antonellis and Green 2008; Meyer-Schuman and Antonellis 2017; Boczonadi, Jennings, and Horvath 2018). Auch in anderen Patienten, in denen nur das TruSight One Panel analysiert wurde, fielen Mutationen in ARs auf. Patient SPG\_9 hat eine heterozygote Variante (NM\_002047.1(*GARS*): c.1532T>A, p.(Leu511Gln)), die mit widersprüchlichen Aussagen „pathogen“ und „benign“ vorhergesagt wird und sehr selten (0,008 % gnomAD, NFE) ist. Die Variante ist noch unbekannt, Mutationen in *GARS* sind aber beschrieben für autosomal-dominante CMT2D (OMIM: \*600287). Funktionelle Studien für Varianten in der gleichen Domäne (p.Asp500Asn), wie die Variante des Patienten (p.(Leu511Gln)), belegen jedoch keinen Effekt auf die Enzymaktivität (Griffin et al. 2014), daher ist die Variante vermutlich nicht ursächlich für den Phänotyp des Patienten.

Patient SPG\_2 hat zwei heterozygote Varianten in *FARS2* (NM\_001318872.1(*FARS2*): c.988C>T, p.(Arg330Cys) und c.1255C>T, p.(Arg419Cys)). Nur die zweite Variante (p.(Arg419Cys) ist bereits in Patienten mit autosomal-rezessiver SPG77 beschrieben. Diese Patienten haben zusätzlich eine Deletion auf Chromosom 6p25.1, die das Exon 6 enthält. Sie zeigen eine globale Entwicklungsverzögerung (Vernon et al. 2015), welche bei Patient SPG\_2 jedoch nicht vorhanden ist; stattdessen ist eine motorische Entwicklungsverzögerung seit dem zweiten Lebensjahr vorhanden, welche inzwischen zu einer spastische Paraparese der unteren Extremitäten geführt hat. Die erste Variante (p.(Arg330Cys)) befindet sich in einer sogenannten Linker-Domäne und die zweite Variante (p.(Arg419Cys)) in der Anticodonbinde-Domäne (Vantroys et al. 2017). Eine Visualisierung beider Varianten zeigt, dass sie sich in räumlicher Nähe befinden (Abbildung 10). Durch beide Varianten entsteht je ein neues Cystein, sodass es zur Ausbildung einer Disulfidbrücke kommen könnte, die die Anticodonbinde-Stelle zerstören könnte. Der Phänotyp der *FARS2*-Erkrankungen ist variabel (Vantroys et al. 2017) und der Phänotyp von SPG\_2 passt zu den von Yang publizierten Fällen, die eine Mutation in der katalytischen Domäne zeigen (Yang et al. 2016).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

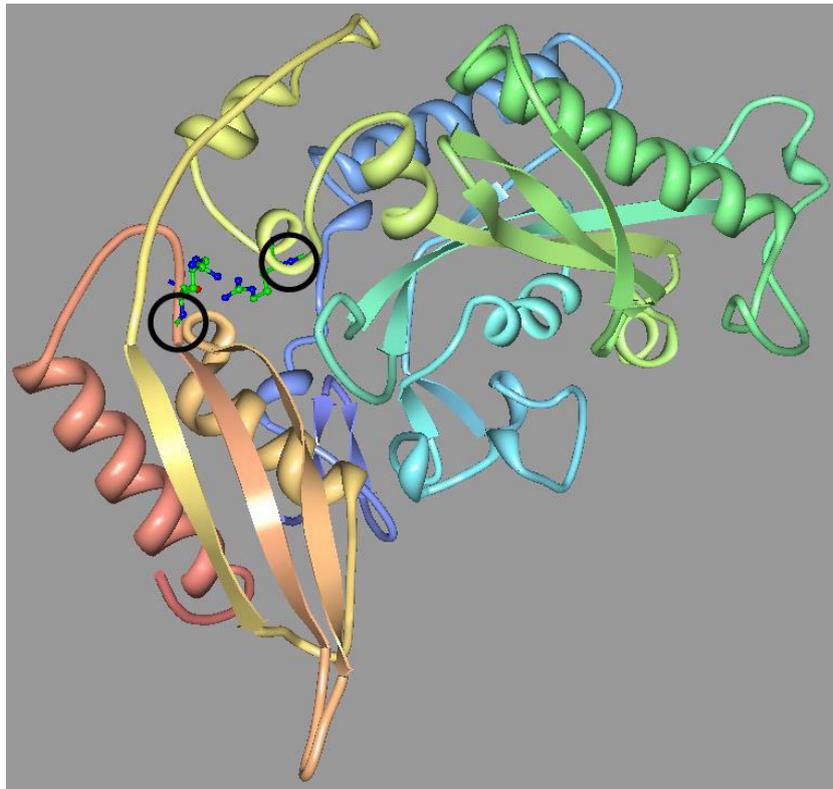


Abbildung 10: Proteinstruktur von FARS2. Das Bild wurde mit der Software RCSB PDB Protein Workshop erstellt (Xu and Zhang 2009; Moreland et al. 2005) und zeigt die Struktur 3CMQ (Klipcan et al. 2008) aus der PDB (www.rcsb.org). Die Aminosäuren Arg330 und Arg419 sind als Aminosäuren dargestellt und ihre Positionen auf der Proteinsequenz wurden mit einem Kreis markiert.

Die Varianten des Patienten scheinen daher ursächlich zu sein und erweitern somit sowohl den klinischen wie auch den molekularen Phänotyp der FARS2-Erkrankungen. Zur weiteren Klärung der Varianten wäre eine Analyse der Eltern sinnvoll, durch die geklärt werden könnte, ob die Variante compound heterozygot oder *in-cis* vorliegt.

ARs sind eine große Gen-Gruppe und die untersuchte Kohorte von Patienten hat gezeigt, dass eine Analyse bei Verdacht auf SPG sinnvoll ist.

Der Patient SPG\_12 zeigte eine unklare heterozygote Variante in *KIF5A* (NM\_004984.3(*KIF5A*): c.2990A>T, p.(Asn997Ile)). Mutationen in *KIF5A* sind beschrieben für autosomal-dominante SPG10. Die Variante des Patienten wird von Vorhersageprogrammen überwiegend als pathogen vorhergesagt, ist sehr selten (0,003 % gnomAD, NFE), jedoch bisher nicht als pathogen beschrieben. Außerdem befindet sich die Variante (p.(Asn997Ile)) recht weit C-terminal gelegen, die bisher beschriebenen Mutationen befinden sich in N-terminal gelegenen Domänen (Goizet et al. 2009; Crimella et al. 2012). Neuere Ergebnisse zeigen einen Zusammenhang von C-terminalen Mutationen mit familiärerer ALS (Brenner et al. 2018). In der Familie des Patienten ist zusätzlich der Vater mit einer SPG betroffen, Anzeichen für einen ALS-Phänotyp sind nicht bekannt. Da

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Mutationen auch im C-terminalen Bereich krankheitsverursachend sein können, könnte die Variante des Patienten ursächlich sein. Eine Segregationsanalyse könnte weitere Hinweise geben.

In Patient SPG\_13 wurde eine homozygote Variante in *COX6A1* (NM\_004373.3(COX6A1): c.103+1G>C) gefunden. Spleißstellen-Vorhersageprogramme sagen einen Verlust der Donor-Spleißstelle des Introns 1 voraus (Abbildung 11). Mutationen in *COX6A1* (OMIM: \*602072) sind assoziiert mit einer autosomal-rezessiven Form von CMT. Die Variante ist sehr selten (0,008 % gnomAD, NFE) und wurde noch nicht homozygot gesehen. Die Variante war nicht beschrieben und ist jetzt in ClinVar hinterlegt. *COX6A1* kodiert für eine von 13 Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase, die einen wichtigen Bestandteil der Atmungskette in den Mitochondrien zur ATP-Gewinnung darstellt (Berg et al. 2018). Bisher wurde nur eine 5-bp Deletion in *COX6A1* in zwei japanischen Familien und einer tschechischen Patientin beschrieben, die in der Nähe der Akzeptor-Spleißstelle des Intron 2 liegt (c.247-7\_247-3delCACTC) (Tamiya et al. 2014; Lassuthova et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *COX6A1* im Blut der publizierten Patienten signifikant reduziert ist. Außerdem wurden in *Cox6a1*-null Mäusen neurogene muskuläre Atrophien und Schwierigkeiten beim Laufen beobachtet (Tamiya et al. 2014). Da die Variante des Patienten SPG\_13 ebenfalls das Spleißen betrifft, aber sogar die Konsensussequenz der Spleißstelle zerstört (Abbildung 11) und weiter N-terminal liegt, als die beschriebene Variante, ist sie sehr wahrscheinlich ursächlich für die Erkrankung. Alle beschriebenen Varianten sind sehr seltene, homozygote Varianten, jedoch nur in den japanischen Familien war eine Konsanguinität bekannt (Tamiya et al. 2014). In der tschechischen Patientin (Lassuthova et al. 2016) und im Patient SPG\_13 ist eine Konsanguinität nicht berichtet worden.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

c.103+1G>C	Referenz-Sequenz	mutierte Sequenz
SpliceSiteFinder-like	[0-100]  71,8	[0-100]  46,2
MaxEntScan	[0-12]	[0-12]
NNSPLICE	[0-1]	[0-1]
GeneSplicer	[0-24]	[0-24]
Human Splicing Finder	[0-100]  76,9	[0-100]
	AGGGCTCAGGACTGGGGCC	AGGGCTCAGCTACTGGGGCC
SpliceSiteFinder-like	[0-100]	[0-100]
MaxEntScan	[0-16]	[0-16]
NNSPLICE	[0-1]	[0-1]
GeneSplicer	[0-21]	[0-21]
Human Splicing Finder	[0-100]  76,2	[0-100]  72,1

Abbildung 11: *In-Silico* Vorhersagen aus Alamut Visual für die Variante COX6A1:c.103+1G>C in SPG\_13. Abgebildet sind die Vorhersagen der 5 Spleißstellen-Vorhersageprogramme (3.3.2.2) für die Referenz-Sequenz (Mitte) und die mutierte Sequenz (rechts). Es ist ein Verlust der Donor-Spleißstelle abgebildet, für die mutierte Sequenz sagt nur ein Vorhersageprogramm eine Spleißstelle vorher und dieser Wert liegt unterhalb des Schwellenwerts.

Die auffälligste Variante in Patient SPG\_14 ist eine heterozygote Missense-Variante in *ZFYVE27* (NM\_001002261.3(*ZFYVE27*):c.415C>T, p.(Arg139Cys)). Die Variante ist sehr selten (0,002 % gnomAD, NFE) und wurde noch nicht beschrieben. Die Variante liegt in keiner bekannten Domäne und Vorhersageprogramme beurteilen die Pathogenität der Variante nicht einheitlich (Tabelle 7). *ZFYVE27* kodiert für Protrudin, ein Membranprotein, das an der Verlängerung von Nervenfortsätzen beteiligt ist (Shirane and Nakayama 2006). Eine heterozygote Missense-Mutation (p.(Gly191Val)) wurde in einer Familie aus Deutschland mit SPG33 beschrieben. Es wurde gezeigt, dass Protrudin mit Spastin interagiert und diese Interaktion durch die Mutation gestört wird (Mannan et al. 2006). Diesem Bericht wurde jedoch von Martignoni und Kolleginnen widersprochen, die keinen funktionellen Verlust beobachteten und eine bestehende Interaktion des mutierten Protrudin und Spastin zeigen konnten. Außerdem erklärten sie, die Variante sei zu häufig in der Bevölkerung für eine krankheitsverursachende Mutation (Martignoni, Riano, and Rugarli 2008). Hashimoto und Kollegen haben 2014 weitere Belege für die Ursächlichkeit der Variante vorgelegt. Sie zeigten, dass Protrudin mit vielen anderen SPG-Proteinen interagiert, dass es die Funktion und Form des ER reguliert und dass die beschriebene Mutation (p.Gly191Val) in Zellen die Anfälligkeit für ER-Stress erhöht (Hashimoto et al. 2014). Damit bleibt es unklar, ob *ZFYVE27* verantwortlich für SPG ist. Weitere Belege sind nötig zur Klärung, ob die Variante die Ursache für die Erkrankung des Patienten SPG\_14 ist.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7: Variantenübersicht der untersuchten SPG-Fälle

Patienten	Variante	Domäne	HGMD	gnomAD Homozygote	Align GVD	SIFT	Mutation Taster	Poly Phen2	InterVar
<b>SPG_2</b>	NM_001318872.1(FARS2): c.988C>T p.(Arg330Cys)	329-333 Helix	-	0,002527 % 0	C0	deleterious	-	probably damaging	uncertain
<b>SPG_9</b>	NM_001318872.1(FARS2): c.1255C>T p.(Arg419Cys)	358-450 FDX-ACB	CM153470	0,001445 % 0	C0	deleterious	-	probably damaging	likely pathogenic
<b>SPG_11</b>	NM_002047.2(GARS): c.1694T>A p.(Leu565Gln)	565-567 Turn	-	0,004005 % 0	C0	deleterious	disease causing	benign	uncertain
<b>SPG_12</b>	NM_001605.2(AARS): c.2791G>A p.(Gly931Ser)	-	-	0,7558 % 21	C0	deleterious	disease causing	probably damaging	benign
<b>SPG_13</b>	NM_004984.3(KIF5A): c.2990A>T p.(Asn997Ile)	907-1032 Globular	-	0,002165 % 0	C0	deleterious	disease causing	probably damaging	uncertain
<b>SPG_14</b>	NM_004373.3(COX6A1): c.103+1G>C Intron 1	1-24 Mitochondrion	-	0,004756 % 0	Donor-Spleißstelle von Intron 1, Skippen von Exon 1 ist sehr wahrscheinlich				uncertain
<b>SPG_14</b>	NM_001002261.3(ZFYVE27): c.415C>T p.(Arg139Cys)	-	-	0,004554 % 0	C0	tolerated	disease causing	probably damaging	uncertain

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Die Analyse der 14 Patienten mit Verdacht auf SPG hat gezeigt, dass bei der genetischen Analyse immer auch Gene aus dem Bereich der Polyneuropathien berücksichtigt werden sollten, da es einige Überlappungen gibt und die klinische Diagnose nicht immer ganz genau ist. Mit der Phänotyp-Suche nach den beiden Phänotypen (SPG und CMT) konnte für acht der 14 Patienten (57%) eine wahrscheinliche Ursache gefunden werden. Das Risiko bei der Suche nach Phänotypen besteht darin, dass immer nur aktuell bekannte Gene untersucht werden. Daher ist es sinnvoll, Patienten ohne Mutation nach einer gewissen Zeit neu zu analysieren, da neu publizierte Gene erst zeitverzögert in die HPO eingefügt werden und so zur Suche zur Verfügung stehen. Eine Umstellung der Diagnostik von Panel-Sequenzierung (TruSight One 3.2.1) auf WES war sinnvoll, da somit alle Gene analysiert werden können. Allerdings ist nur *COX6A1* nicht im TruSight One Panel enthalten, alle anderen Mutationen wären somit auch mit diesem Panel detektiert worden. Da in einigen SPG-Formen CNVs als krankheitsverursachend beschrieben sind (Lo Giudice et al. 2014) ist es möglich, dass CNVs einen Teil der ungeklärten Fälle verursachen. Obwohl auch Panel- und WES-Diagnostik Hinweise auf CNVs liefern können, ist diese Methode nicht ausreichend zuverlässig und es ist möglich, dass Mutationen übersehen wurden.

## 4.2 Tief-intronische Varianten in *DMD*

Wie in 2.4.5 beschrieben, bleibt ein nicht insignifikanter Teil der *DMD*-Fälle genetisch ungelöst. Ziel war es hier, Mutationen in bisher ungeklärten Fällen zu finden und dabei neue Mutationsarten nachzuweisen, die in der Standard-Diagnostik nicht detektiert werden. Es wurden tief-intronische Varianten und große Strukturveränderungen gefunden.

### 4.2.1 Pseudoexons in *DMD*

Der in Anlage 2 (Zaum et al. 2017) veröffentlichte Patient fiel im Alter von acht Wochen durch zufällig erhobene, stark erhöhte CK-Werte (> 15 000 IU/l) auf. Im Alter von fünf Jahren wurde eine Muskelbiopsie und Immunhistochemie durchgeführt, in der keine Expression von Dystrophin nachgewiesen werden konnte. Daraufhin wurde die Diagnose einer Muskeldystrophie gestellt. Mittlerweile ist der Junge 13 Jahre alt und kann ohne Hilfe laufen und Treppensteigen, aber er zeigt eine leichte Belastungsintoleranz und eine ausgeprägte Pseudohypertrophie der Waden.

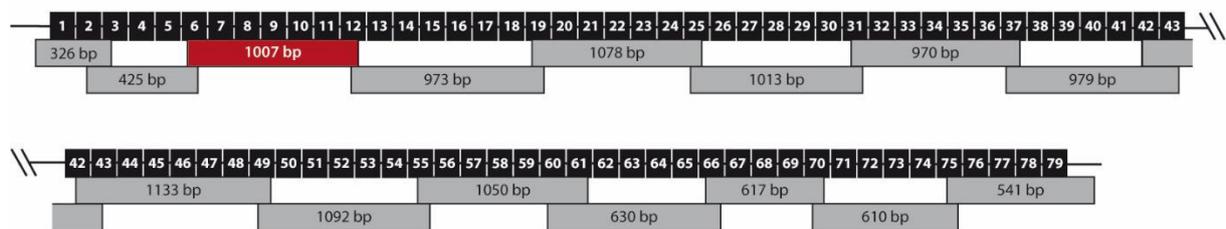


Abbildung 12: Einteilung der kompletten mRNA des *DMD*-Gens in 15 überlappende Fragmente. Die schwarzen Kästchen zeigen die Exons des *DMD*-Gens. Zur besseren Sichtbarkeit wurde die Abbildung in zwei Zeilen dargestellt. Die grauen Kästen stellen die überlappenden PCR-Fragmente mit deren Größe dar. Das vergrößerte Fragment ist rot markiert.

Eine *DMD* Standard-Diagnostik, bestehend aus Komplettssequenzierung der kodierenden Sequenz und MLPA von *DMD*, ergab keine Mutation. Auch eine NGS-basierte Sequenzierung von 64 weiteren, mit Muskelerkrankungen assoziierten, Genen (Muskelpanel; 3.2.1) ergab keine Mutation. Da weiterhin der Verdacht auf eine Muskeldystrophie bestand wurde die komplette mRNA des *DMD*-Gens untersucht. Dafür wurde RNA aus Muskelgewebe isoliert und in cDNA re-transkribiert. Die Sequenz der mRNA wurde in 15 überlappenden Fragmenten (Abbildung 12) amplifiziert und mit Hilfe der Gelelektrophorese auf ihre Größe überprüft. Es ergab sich, dass das Fragment, welches die Exons 6 bis 12 amplifiziert, größer war als erwartet (ca. 1100 bp statt 1007 bp). In einer Analyse am Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) zeigte sich zusätzlich ein schwaches Produkt der erwarteten Größe (Abbildung 13).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

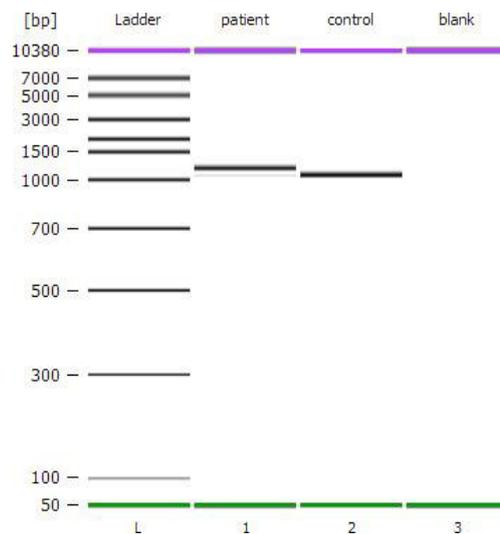


Abbildung 13: RT-PCR-Produkt des Fragments der Exons 6 – 12 in *DMD*. Zur detaillierteren Auftrennung wurde das vergrößerte PCR-Produkt auf einen Bioanalyzer 2100 (Agilent) aufgetragen. Aufgetragen wurden die Probe des Patienten (patient), der Kontrolle (control) und ein Leerwert (blank). Erwartet wurde ein Fragment der Größe 1007 bp. Die Probe des Patienten zeigt zwei Banden, eine starke Bande bei etwa 1100 bp und eine sehr schwache Bande auf Höhe der erwarteten Größe, die Kontrolle zeigt ebenfalls eine Bande der erwarteten Größe und der Leerwert zeigt keine Bande.

Daraufhin wurde dieses cDNA-Fragment sequenziert. In der Sequenz der Sanger-Sequenzierung zeigte sich nach der Sequenz des Exons 7 eine Überlagerung von zwei Sequenzen. Eine Analyse ergab, dass die schwächere Sequenz der des Exons 8 entsprach. Die stärkere Sequenz bestand aus 77 bp einer unbekannt Nukleotid-Abfolge, der dann die Sequenz des Exons 8 folgte (Abbildung 14). Ein Abgleich der unbekannt Nukleotide mit der Referenz-Sequenz des *DMD*-Gens zeigte, dass die Sequenz aus dem Intron 7 stammt (c.650-39499 bis c.650-39575).

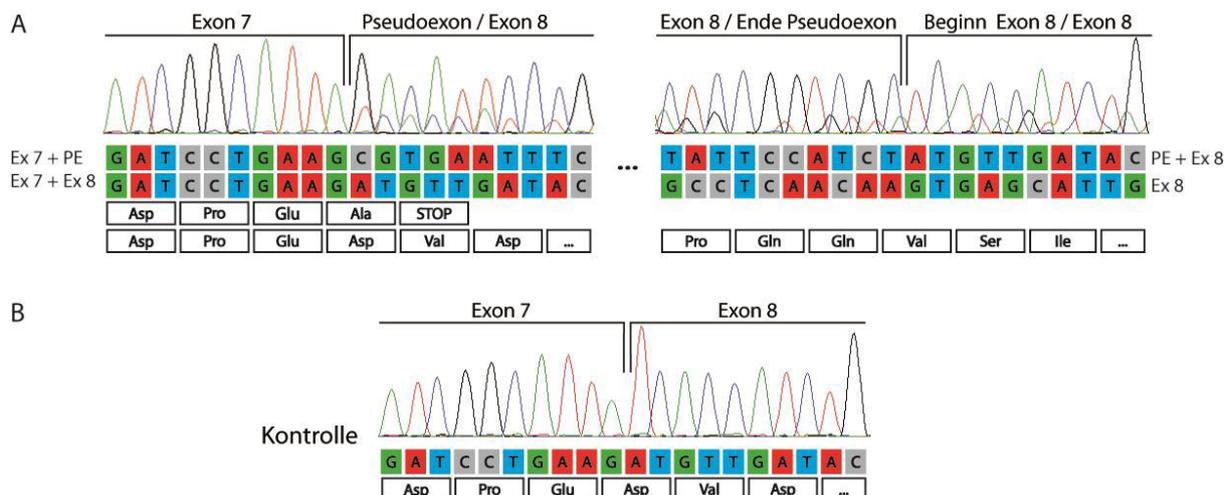


Abbildung 14: Elektropherogramme der cDNA-Sequenzierung des vergrößerten Fragments der Exons 6 – 12 in *DMD*. A. Im linken Teil ist zu sehen, wie bis zum Ende der Sequenz des Exons 7 nur eine Sequenz sequenziert wurde. Dann zeigt sich eine doppelte Sequenz. Diese besteht zum Anfang aus der Sequenz des Pseudoexons und des Beginns des Exons 8. Nach der Sequenz des Pseudoexons folgt die Sequenz des Exons 8 (rechter Teil). B. In einer nicht betroffenen Kontrolle zeigte sich ein normales Spleißen der Exons 7 und 8. Unter den Elektropherogrammen sind die Nukleotidsequenzen und Proteinsequenzen dargestellt.

Zur weiteren Klärung der Insertion wurde der entsprechende Bereich im Intron 7 in der genomischen DNA sequenziert. Es zeigte sich am Anfang und am Ende der inserierten

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Sequenz je ein hemizygoter Basenaustausch (NM\_004006.2(DMD):c.650–39575A>C und c.650-39498A>G). Eine Analyse der beiden Positionen mit bioinformatischen Programmen sagt für beide die Existenz einer kryptischen Spleißstelle voraus (Abbildung 15).

Das Besondere in diesem Fall ist, dass die erste Variante (c.650-39575A>C) ein häufiger Polymorphismus (MAF = 13,91 %) ist, an dessen Stelle auch in der Referenz-Sequenz eine kryptische Akzeptor-Spleißstelle vorhergesagt wird (Abbildung 15). Der Polymorphismus, den auch der Patient hat, verursacht eine leicht reduzierte Wahrscheinlichkeit für eine Spleißstelle.

Die zweite Variante (c.650-39498A>G) ist weder in Populationsdatenbanken noch in der Literatur beschrieben, durch den Austausch wird das Entstehen einer neuen kryptischen Donor-Spleißstelle mit großer Wahrscheinlichkeit vorhergesagt (Abbildung 15).

Es lässt sich vermuten, dass die Existenz beider kryptischer Spleißstellen in Kombination zu dem Einfügen eines Pseudoexons in die mRNA führt (Abbildung 15). Dies konnte in der cDNA-Sequenzierung gezeigt werden (Abbildung 14).

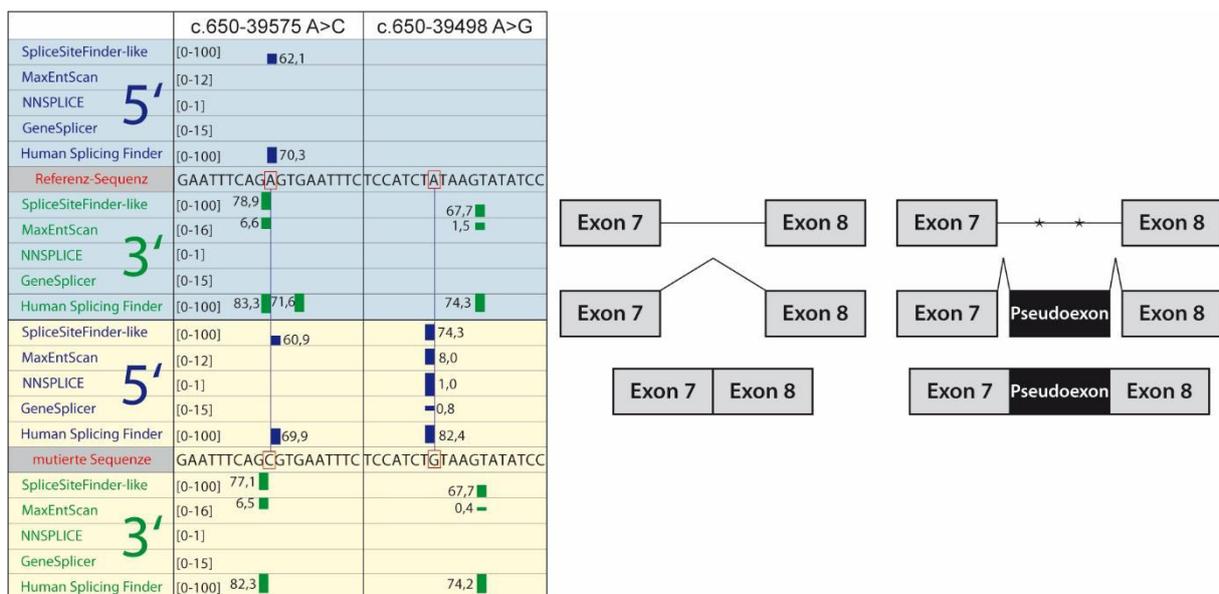


Abbildung 15: Spleißstellen-Vorhersagen und Spleißverhalten im Intron 7 in *DMD*. Links: *In-Silico* Vorhersagen aus Alamut Visual für die zwei tief-intronischen Varianten am Anfang (c.650-39575 A>C) und am Ende (c.650-39498 A>G) der inserierten Sequenz. Abgebildet sind für beide Positionen die Vorhersagen für die Referenz-Sequenz (oben) und die mutierte Sequenz (unten). Rechts: Schematische Darstellung des Spleißens der Exons 7 und 8. Links dargestellt ist das Spleißen im Wildtyp: auf die Sequenz des Exons 7 folgt die Sequenz des Exons 8. Rechts dargestellt ist das durch die zwei tief-intronischen Varianten beeinflusste Spleißen. Graue Boxen sind Exons, waagerechte Linien stellen Introns dar und Sterne symbolisieren Mutationen.

Obwohl die Spleißstelle mit großer Wahrscheinlichkeit vorhergesagt wurde, wurde in der Sequenzierung der cDNA eine zweite Sequenz gesehen, die der Wildtyp-Sequenz entspricht (Abbildung 14). Daher ist davon auszugehen, dass in einem Großteil der Transkripte, das Pseudoexon zwischen die Exons 7 und 8 in die mRNA eingefügt wird, was zu einem Frameshift und vorzeitigem Stopp führt (p.Asp217Alafs\*, Abbildung 14). In einem

## 4 Ergebnisse und Diskussion

geringeren Teil der Transkripte erfolgt das Spleißen jedoch wie im Wildtyp. Vermutlich ist die erste kryptische Spleißstelle hypomorph. Sie ist ein häufiger Polymorphismus, wird nur von drei von fünf Programmen vorhergesagt und besteht auch im Wildtyp. Auf diese Weise kann zum Teil das gesamte, vollständige Dystrophin translatiert werden.

Durch diese Tatsache lässt sich vermutlich auch der milde klinische Phänotyp des Patienten erklären. Laut der Reading-Frame-Rule verursacht die Frameshift-Mutation des Patienten (p.Asp217Alafs\*) einen Duchenne-Phänotyp. Da der Junge aber auch mit 13 Jahren noch selbstständig laufen kann, leidet er, laut Definition, an der milderen BMD. Auf der einen Seite scheint der Rest an Wildtyp-Dystrophin ausreichend zu sein, sodass es nicht zum schweren Phänotyp der DMD kommt. Auf der anderen Seite muss der Rest an Wildtyp-Protein so gering sein, dass er im Western Blot nicht nachweisbar war. Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass die Amplifikation bei der Sequenzierung von cDNA eine deutlich sensitivere Methode darstellt als die Proteinanalyse im Western Blot.

### 4.2.1.1 Weitere Pseudoexons in DMD

In der Literatur sind einige Fälle von Pseudoexons in *DMD* beschrieben. Zum ersten Mal wurde ein sogenanntes „extra exon“, das durch eine nachgewiesene tief-intronische Mutation verursacht wurde, von Ikezawa und Kollegen beschrieben. Der beschriebene Patient litt an DMD und in einer Multiplex-PCR konnte keine Deletion oder Duplikation entdeckt werden. Durch Analyse der mRNA zeigte sich dann eine zusätzliche Sequenz, ausgelöst durch eine tief-intronische Mutation am 3' Ende der inserierten Sequenz im Intron 25 (Ikezawa et al. 1999). Tuffery-Giraud und Kollegen beschrieben die ersten Patienten mit einem Becker-Phänotyp. Obwohl die Insertion des Pseudoexons einen Frameshift verursachte, zeigten sie keinen Duchenne-Phänotyp. Es konnte ebenfalls, wie in unserem Patienten, ein Rest von Wildtyp-Transkript nachgewiesen werden (Tuffery-Giraud et al. 2003). Pseudoexons sind daher ein Grund, warum die Reading-Frame-Rule nicht immer zu trifft. Dies zeigte sich auch in einem von Greer und Kollegen beschriebenen Fall: ein Patient mit Duchenne-Phänotyp hatte eine *in-frame* Deletion der Exons 45 bis 47. Durch eine Analyse der mRNA fiel auf, dass im Intron 44 ein Pseudoexon entstand, das den ORF zerstört. Die Deletion von Spleiß-Silencer-Elementen und der Zusammenschluss mit dem Intron 47 hat vermutlich zur Entstehung neuer kryptischer Spleißstelle geführt (Greer et al. 2015).

Der Mechanismus der Pseudoexon-Insertion scheint nicht selten zu sein, auch in unserer Kohorte, in der wir nur die RNA aus Muskelgewebe von insgesamt fünf Patienten (plus Kontrollen, nicht aufgelistet) untersucht haben, konnten wir Pseudoexons in zwei Patienten nachweisen (Tabelle 8).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 8: Untersuchte DMD-Fälle ohne Kontrollen

Fälle	Immunhistochemie	Ergebnis
DMD_1	Kein Dystrophin	keine Veränderung
DMD_2	Kein Dystrophin	Pseudoexon in Intron 7
DMD_3	unbekannt	keine Veränderungen
DMD_4	Dystrophin reduziert	Material nicht ausreichend
DMD_5	unbekannt	Pseudoexon in Intron 62

Wie in Tabelle 8 zu sehen ist, konnten wir in einem weiteren Patienten (DMD\_5) ein Pseudoexon nachweisen.

Dieser Patient zeigte eine schon beschriebene Mutation in Intron 62 (c.9225-647A>G), die zu einem 67 bp langen Pseudoexon führt (Daoud et al. 2009; Juan-Mateu et al. 2013). Zum Patient DMD\_5 sind uns leider keine weiteren klinischen Details bekannt. Die in der Literatur veröffentlichten Patienten mit der gleichen Mutation weisen alle einen Becker-Phänotyp auf (Juan-Mateu et al. 2013) und es wurde zusätzlich eine mentale Retardierung der betroffenen Patienten in einer Veröffentlichung beschreiben (Daoud et al. 2009). Patient DMD\_5 wurde auf die gleiche Weise analysiert, wie der in 4.2.1 beschriebene Patient (DMD\_2). Hier waren die amplifizierten cDNA-Fragmente der Exons 60 bis 66 in der Gelelektrophorese größer als erwartet. Auch hier zeigte die Sequenzierung der cDNA zwei überlappende Sequenzen nach dem Exon 62, die nicht in einer Kontrolle zu sehen waren (Abbildung 16).

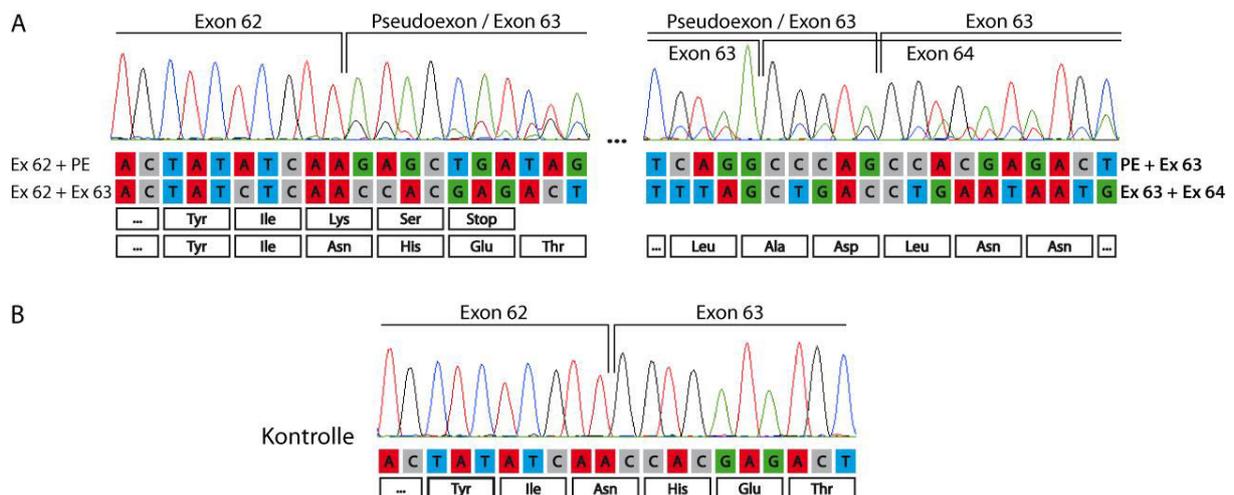


Abbildung 16: Elektropherogramme der cDNA-Sequenzierung des vergrößerten Fragments der Exons 60 – 66 in DMD. A. Im linken Teil ist bis zum Ende des Exons 62 nur eine Sequenz zu erkennen. Dann zeigt sich eine doppelte Sequenz. Diese besteht zum Anfang aus der Sequenz des Pseudoexons und dem Beginn des Exons 63. Nach der Sequenz des Pseudoexons folgt die Sequenz des Exons 63, in der zweiten Sequenz folgt nach dem Exon 63 das Exon 64 (rechter Teil). B. In einer nicht betroffenen Kontrolle zeigte sich ein normales Spleißen der Exons 62 und 63. Unter den Elektropherogrammen sind die Nukleotidsequenzen und Proteinsequenzen dargestellt.

Wie schon im ersten Patienten (4.2.1) zeigte sich in der cDNA, neben der Sequenz des Wildtyps, in einem Teil der Transkripte eine intronische Sequenz (Intron 62), die zu einem

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Frameshift führt (p.Asn3075Lysfs\*3, siehe Abbildung 16). Auch in beiden Publikationen wurde neben der Sequenz, die das Pseudoexon enthielt, ein Rest des Wildtyp-Transkripts entdeckt (Daoud et al. 2009; Juan-Mateu et al. 2013). Dies wäre eine Erklärung für den milderen Becker-Phänotyp der publizierten Fälle und würde auch für den von uns untersuchten Patienten auf einen milderen Phänotyp hoffen lassen. Die Sequenzierung eines Teils des Introns 62 in genomischer DNA zeigte dann einen hemizygoten Basenaustausch im Intron 62 (c.9225-647A>G), der zur Entstehung einer kryptischen Spleißstelle führt. Diese kann zusammen mit einer kryptischen Akzeptor-Spleißstelle, 67 bp weiter upstream (c.9225-713) in der Referenz-Sequenz, zur Erkennung des Pseudoexon in Intron 62 führen (Abbildung 17).

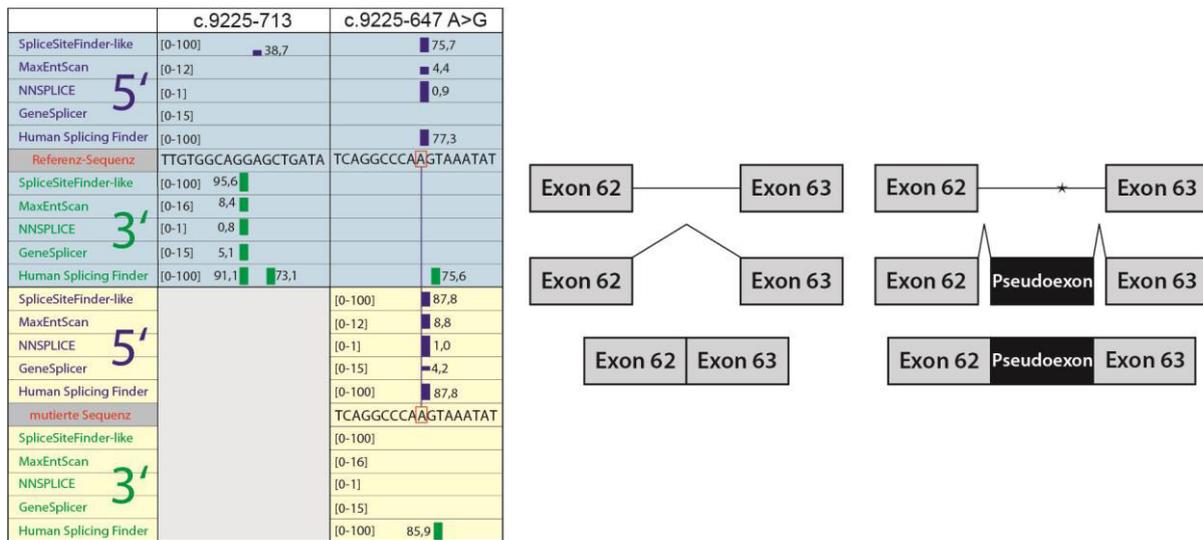


Abbildung 17: Spleißstellen-Vorhersagen und Spleißverhalten im Intron 62 in *DMD*. Links sind die *in-silico* Spleißstellen-Vorhersageprogramme aus Alamut Visual abgebildet, für die bestehende kryptische Spleißstelle (c.9225-713) und für die hemizygoten Mutation des Patienten (c.9225-647 A>G). Rechts ist schematisch dargestellt, wie die Mutation zur Insertion des Pseudoexons in die mRNA führt. Die Mutation ist durch ein Sternchen dargestellt. Graue Boxen sind Exons und waagerechte Linien stellen Introns dar.

Die Analyse von mRNA aus betroffenem Gewebe, wie hier Muskelgewebe, ist eine nützliche und wertvolle Methode zur Klärung von ungelösten genetischen Erkrankungen. Bedauerlicherweise ist es bei Muskelerkrankungen, aber auch bei Neuropathien, schwierig, an entsprechende Proben in guter Qualität zu gelangen, da es nötig ist, Material des betroffenen Organsystems zu untersuchen. Eine Biopsie ist ein invasiver Eingriff für die oft noch sehr jungen Patienten, der meist in erster Linie den Verlust von bestimmten Proteinen mittels Western Blot nachweisen soll. Dabei steht die Sicherung der klinischen Diagnose und nicht die genetische Diagnostik im Vordergrund. Gewebeproben, welche zu diesem Zweck entnommen wurden, enthalten oft nicht genügend Material für eine weitere RNA-Analyse. Dieses Problem wird dadurch verstärkt, dass durch den dystrophen Umbau der Muskeln, in Folge der zugrunde liegenden Muskelerkrankung, in einem Biopsat häufig nur wenig

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Muskelgewebe vorhanden ist. Dies zeigte sich auch in einem der untersuchten Patienten (DMD\_4), dessen zu Verfügung stehendes Muskelbiopsat sehr klein war und daher nicht genügend RNA für die Analyse des gesamten *DMD*-Gens isoliert werden konnte.

Im nächsten Abschnitt wird eine alternative Methode zur Suche nach tief-intronischen Mutationen beschrieben, die das Problem der schwierigen Probenbeschaffung, durch die direkte Sequenzierung der Introns mittels WGS aus genomischer DNA aus dem Blut (4.2.2), umgeht.

### 4.2.2 Whole Genome Sequenzierung zeigt perizentrische Inversion in *DMD*

Der in diesem Abschnitt beschriebene Patient zeigte klinisch deutliche Zeichen einer Muskeldystrophie. Seine CK-Werte waren stark erhöht (13 000 UI/l), sein ebenfalls betroffener Bruder litt an einer DMD, die extern mittels Muskelbiopsie bestätigt wurde. Bei dem Patienten selbst wurde die Standard *DMD*-Diagnostik (Komplett-Sequenzierung des kodierenden Bereiches und MLPA) durchgeführt, ohne dass eine Mutation gefunden wurde. Da der Verdacht auf eine DMD weiterhin bestand, jedoch kein Muskelgewebe des Patienten für eine RNA-Analyse vorhanden war, wurde das gesamte Genom des Patienten, wie in 3.2.2 beschrieben, sequenziert und analysiert (3.3.1). Wie beschrieben wurde nur *DMD* untersucht, da nur hierfür eine Einverständniserklärung vorlag. Andere Bereiche des Genoms wurden elektronisch ausgeblendet und damit ignoriert.

In den intronischen und regulatorischen Bereichen des *DMD*-Gens wurde zum einen nach SNVs und zum anderen nach Hinweisen auf CNVs in der Abdeckung des *DMD*-Gens gesucht.

#### 4.2.2.1 Suche nach SNVs

Es wurden die Varianten aus den WGS-Daten mit den in 3.2.2 genannten Filtereinstellungen gecallt, so wurden insgesamt 138 Varianten identifiziert. Von diesen hatten nur 21 eine MAF von unter 1 % und nur 8 waren nicht hemizygot in der gnomAD-Datenbank (Lek et al. 2016) zu finden. Da es nicht wahrscheinlich ist, dass eine Variante, die ursächlich für DMD ist, hemizygot in einer allgemeinen Populationsdatenbank enthalten ist, wurden nur die 8 Varianten, die nicht hemizygot gesehen wurden, weiter analysiert.

Da alle gefundenen Varianten tief-intronisch liegen, musste die Analyse für diese Mutationen angepasst werden. Es wurde der vorhergesagte Einfluss auf das Spleißen mit den in Alamut Visual integrierten *in-silico* Tools (siehe 3.3.2.2) untersucht. Dafür wurde der Anteil der

## 4 Ergebnisse und Diskussion

mutierten Sequenz von der Referenz-Sequenz von jedem Vorhersageprogramm berechnet und von allen fünf Programmen der Mittelwert gebildet.

Anschließend wurde überprüft, ob die Varianten sich in konservierten Bereichen des Gens befinden. Dafür wurde die Konservierung der Varianten in 15 Spezies der Eutheria in Ensembl GRCh37 Release 93 (Zerbino et al. 2018) überprüft. Zuletzt wurde für alle Varianten der C-Score nach der CADD-Methode (siehe 3.3.2.1, CADD GRCh37 v1.4) berechnet.

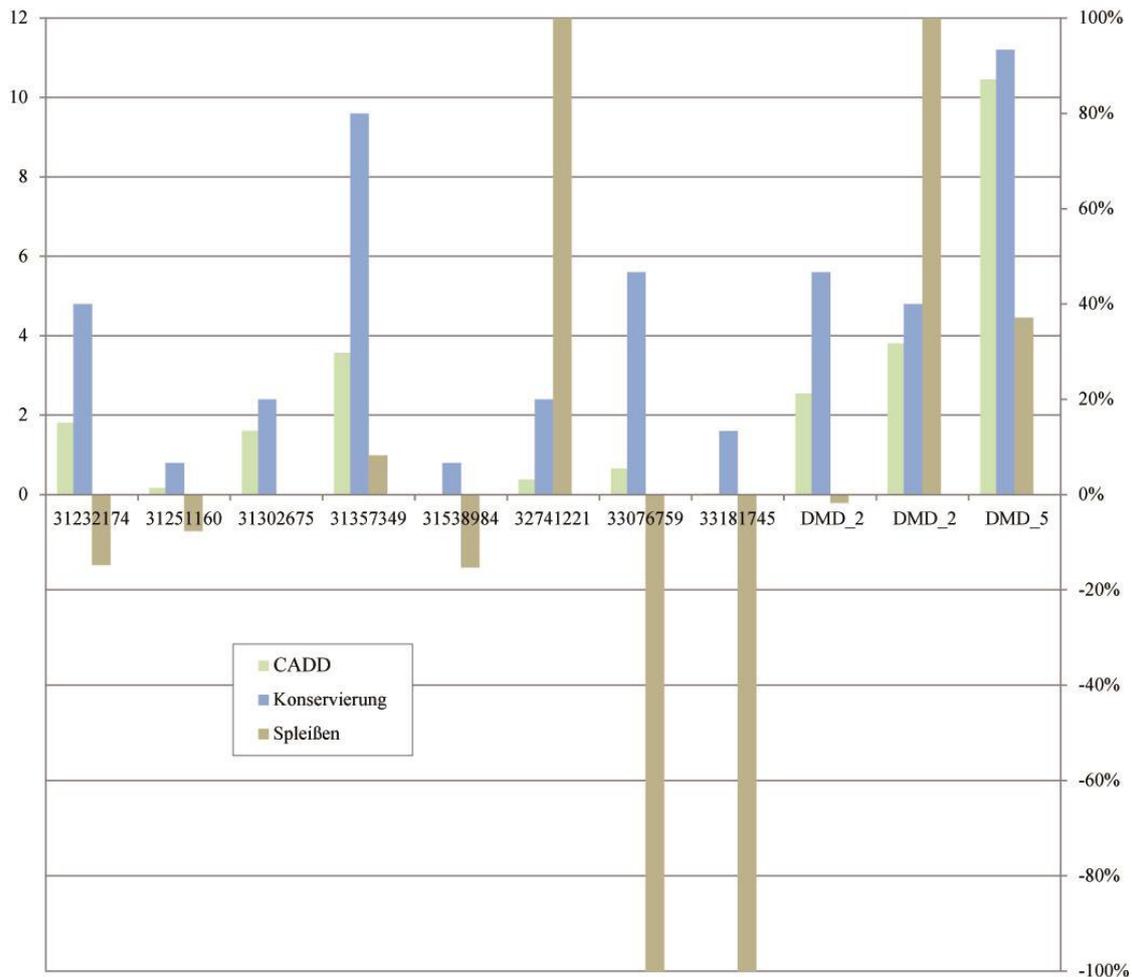


Abbildung 18: Grafische Darstellung der untersuchten tief-intronischen Varianten in *DMD*. Die linke Y-Achse zeigt die Werte des C-Scores, die rechte Konservierung und Spleißstelle. Negative Spleiß-Werte bedeuten, dass die Vorhersagen für die Spleißstelle im Vergleich zur Referenz-Sequenz geringer sind. Ein Wert von -100 % bedeutet, dass in der Referenz von Vorhersageprogramm eine Wahrscheinlichkeit vorhergesagt wurde, die in der mutierten Sequenz nicht mehr existiert. Die letzten drei Varianten sind die bestätigten Pseudoexons aus 4.2.1.

Da die Konservierung mit in die Berechnung des C-Scores einfließt, ist es nicht überraschend, dass diese beiden Werte miteinander korrelieren. Für keine Variante zeigte sich eine Kombination aus hohem C-Score und neuer Spleißstelle (Abbildung 18). Nur für eine Variante (g.32741221) wurde das Entstehen einer neuen kryptischen Spleißstelle vorhergesagt (Abbildung 19). In der Nähe (65 bp) dieser möglichen kryptischen Donor-Spleißstelle fand sich zusätzlich auch noch eine schwach vorhergesagte Akzeptor-Spleißstelle (Abbildung 19).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Hier zeigten sich in den Vorhersageprogrammen allerdings deutlich geringere Wahrscheinlichkeiten, als in den Fällen, in denen es zur Insertion von Pseudoexons gekommen ist, wie in 4.2.1 und 4.2.1.1 beschrieben. Ohne eine RNA-Analyse ist es mit den Daten aus bioinformatischen Vorhersagen daher leider nicht möglich zu klären, ob die Variante ursächlich ist.

	g.32741287	g.32741221 C>A
SpliceSiteFinder-like	[0-100]	
MaxEntScan	[0-12]	
NNSPLICE	[0-1]	
GeneSplicer	[0-15]	
Human Splicing Finder	[0-100]	
Referenz-Sequenz	TACATGCAGAAAAGCAT	GTATGGAAGGAAATTCCT
SpliceSiteFinder-like	[0-100] 75,0 <span style="color: green;">■</span>	65,7 <span style="color: green;">■</span>
MaxEntScan	[0-16] 4,0 <span style="color: green;">■</span>	
NNSPLICE	[0-1]	
GeneSplicer	[0-15]	
Human Splicing Finder	[0-100] 81,1 <span style="color: green;">■</span> 65,3 <span style="color: green;">■</span>	74,7 <span style="color: green;">■</span>
SpliceSiteFinder-like		[0-100] 72,7 <span style="color: blue;">■</span>
MaxEntScan		[0-12] 3,6 <span style="color: blue;">■</span>
NNSPLICE		[0-1] 0,2 <span style="color: blue;">■</span>
GeneSplicer		[0-15]
Human Splicing Finder		[0-100] 75,5 <span style="color: blue;">■</span>
mutierte Sequenz		GTATGGAAGTAAATTCCT
SpliceSiteFinder-like		[0-100] 59,4 <span style="color: green;">■</span>
MaxEntScan		[0-16]
NNSPLICE		[0-1]
GeneSplicer		[0-15]
Human Splicing Finder		[0-100] 70,4 <span style="color: green;">■</span>

Abbildung 19: Spleißstellen-Vorhersageprogramme aus Alamut Visual für die tief-intronischen *DMD*-Varianten. Abgebildet sind die vorhergesagten Wahrscheinlichkeiten für die hemizygoten Variante des Patienten (g.32741221 C>A, c.650-23811 G>T) und für eine bestehende kryptische Spleißstelle (g.32741287, c.650-23877). Die vorhergesagten Wahrscheinlichkeiten für eine Akzeptor-Spleißstelle für die Variante des Patienten (rechts) sind so gering, dass sie unter dem Schwellenwert liegen und sind deswegen nicht verlässlich.

### 4.2.2.2 Suche nach CNVs

Eine weitere Untersuchung wurde bezüglich der Abdeckung des *DMD*-Gens mit Hilfe des „Coverage statistics“-Tools aus GensearchNGS durchgeführt. Dabei fiel eine große Deletion im Intron 44 des *DMD*-Gens auf (Abbildung 20).

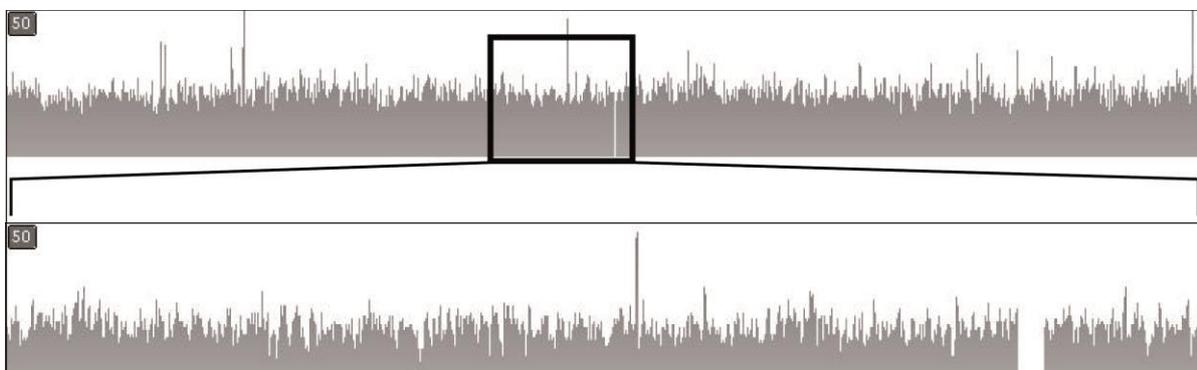


Abbildung 20: Abdeckung des *DMD*-Gens. Oben ist die Abdeckung über das gesamte *DMD*-Gen zu sehen. Die obere Kante zeigt eine Abdeckung von 50 Reads. Das Rechteck zeigt den Bereich des Introns 44. Unten ist nur die Abdeckung des Introns 44 dargestellt. Zu erkennen ist eine Lücke in der Abdeckung.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

In der Visualisierung des Alignments zu Beginn und Ende der vermeintlichen Deletion war zu erkennen, dass einige Reads mit einer unbekannt Sequenz in die Deletion hineinragten (rosa hinterlegt, Abbildung 21).

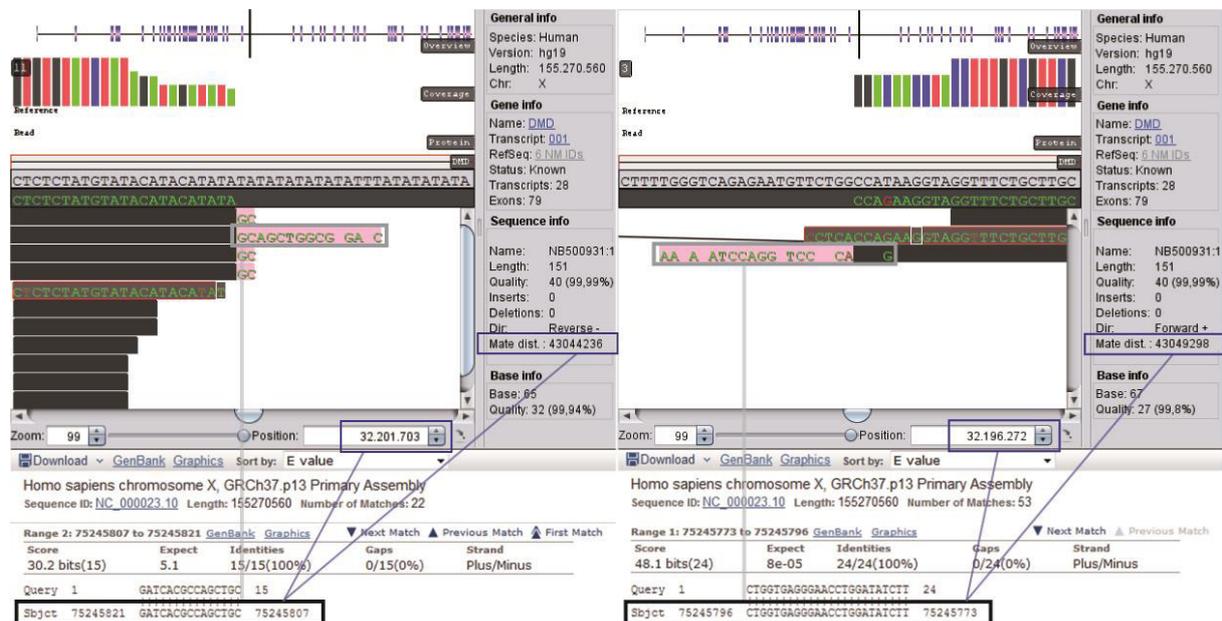


Abbildung 21: Alignment an Beginn und Ende der Deletion im Intron 44 in *DMD*. Oben sind Ausschnitte aus dem „Viewer“ von GensearchNGS für den Beginn und das Ende der Deletion zu sehen. Read-Sequenzen, die nicht zur Referenz-Sequenz passen werden im „Viewer“ rosa hinterlegt. Markiert sind in hellgrau die Sequenzen, die nicht zur Referenz passen, und in dunkelblau die aktuelle genomische Position sowie die Distanz des aktuell ausgewählten Reads zu seinem Partner-Read („Mate dist.“). Darunter ist das Ergebnis des Blastens der Sequenz aus der hellgrauen Markierung abgebildet. Markiert ist hier die Sequenz (sie entspricht der revers komplementären Sequenz, da das Alignment im Viewer in *DMD*-Richtung gezeigt ist) und die Position.

Am Ende der Deletion (Abbildung 21, rechtes Bild) zeigte sich auch 4 Basenpaare nach der rosa hinterlegten Sequenz in allen Reads eine Variante T>G (Abbildung 21, hellgraue Markierung). Der Bereich, der nicht zur Referenz passt, erstreckt sich daher vermutlich bis zu dieser Position. Zur Identifizierung der beiden unbekannt Sequenzen wurden die hellgrau eingerahmten Sequenzen aus Abbildung 21 mit dem Online Tool BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA) untersucht. Es zeigte sich, dass die Sequenz vom Anfang identisch war mit einer Sequenz auf dem X-Chromosom von Position g.75245807 bis g.75245821. Die Sequenz ist relativ kurz und wurde ebenfalls an anderer Stelle im Genom gefunden, sodass sie nur einen relativ hohen E-Wert (Expect, E value) von 5,1 bekam. Die Sequenz vom Ende der Alignment-Lücke (Abbildung 21, rechts) wurde nur einmal in der Referenz-Sequenz gefunden (g.75245796 bis g.75245773, E-Wert:  $8 \times 10^{-5}$ ). Trotz des hohen E-Werts der ersten Sequenz ist ein Zusammenhang beider Sequenzen sehr wahrscheinlich, denn beide alignieren in die gleiche genomische Region, der Abstand beträgt nur wenige Basenpaare. Dazu kommt, dass die Partner-Reads („mate pair“, Abbildung 21) der Reads im Bereich der Deletion ungewöhnlich weit entfernt sind. Normalerweise beträgt die Entfernung, je nach Größe der angereicherten Library, 0 bis

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

wenige 100 bp, maximal 500 bp. In diesem Fall war die Entfernung etwa 43 000 000 bp (Abbildung 21: 43 049 298 bp und 43 044 236 bp). Die Addition der Entfernung der Partner-Reads mit der genomischen Position der Reads an der Stelle der Deletion (g.32196272 und 32201703), ergibt den Bereich, indem die unbekannt Sequenzen mit BLAST identifiziert wurden (g.75245773 bis g.75245821), mit nur einem kleinen Rest, der dem üblichen Abstand der Partner-Reads entspricht (100 bis 300 bp).

Da dies für beide Bruchpunktpaare gilt, legt dies die Vermutung nahe, dass es zu einer Inversion des X-Chromosoms gekommen ist. Die Bruchpunkte befinden sich im Intron 44 des *DMD* (Xp21.1) und an einer Position 43 000 000 bp weiter upstream (Xq13.3). Gleichzeitig ist es an beiden Bruchpunkten zum Verlust von 7 bp beziehungsweise 5,5 kb gekommen (Abbildung 22).

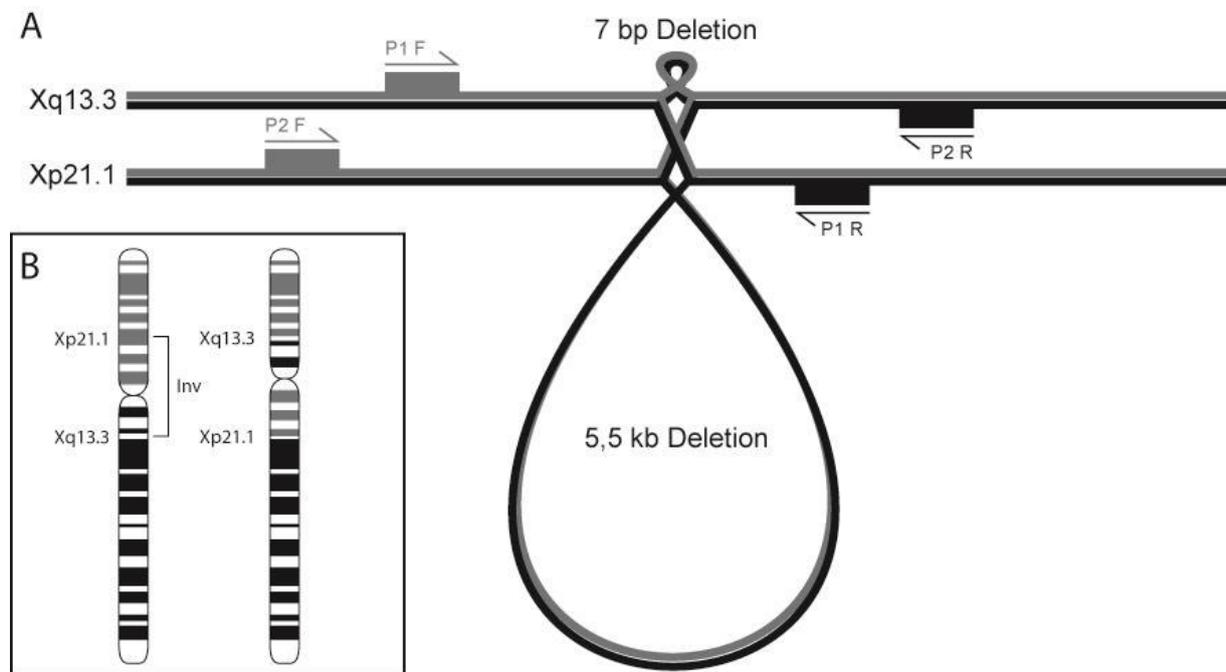


Abbildung 22: Schematische Darstellung der perizentrischen Inversion. A zeigt die Inversion mit den entstehenden Deletionen an den Bruchpunkten und die Position der Primer für die Sanger-Sequenzierung. B Schematische Darstellung des X-Chromosoms vor und nach der Inversion. Zur besseren Darstellung sind die Banden des p-Arms in grau abgebildet und die des q-Arms in schwarz.

Eine Inversion an den genannten Bruchpunkten würde zu einer perizentrischen Inversion (46,Y,inv(X)(p21.1q13.3)) führen. Diese ist vermutlich ursächlich für den DMD-Phänotyp des Patienten, da ein großer Teil des C-terminalen Dystrophins fehlen würde (Abbildung 22 B). Eine Illustration der Inversion zeigt, dass es noch wenige Basenpaare lange Homologien zwischen der *DMD*-Sequenz und Xq13.3 gibt, sodass die Bruchpunkte hier zwischen g.75245798 und g.75245806 liegen (Abbildung 23).

Zur weiteren Abklärung dieser Hypothese wurde der Bereich über die Bruchpunkte sequenziert. Dafür wurden Primer vor und hinter die Bruchpunkte gelegt (siehe Abbildung

## 4 Ergebnisse und Diskussion

22). Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, zeigt die Sanger-Sequenzierung, dass auf die reverse Sequenz des *DMD*-Introns 44 (Nichtmatrizenstrang) die Sequenz aus dem Bereich Xq13.3 folgt (Matrizenstrang) und umgekehrt. Die komplexe Umlagerung konnte somit als perizentrische Inversion bestätigt werden.

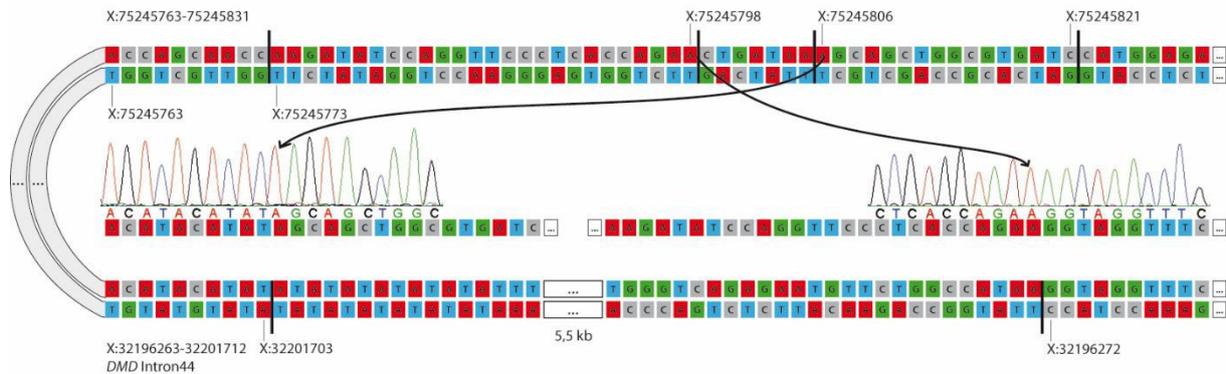


Abbildung 23: Sanger-Sequenzierung der Inversionsbruchpunkte. Oben ist die Sequenz von Xq13.3 dargestellt (g.75245763-g.75245831), unten die Sequenz aus dem Intron 44 des *DMD* Gens. Zu erkennen ist die Inversion, wie sie sich aus den WGS Daten ableiten lässt. Ab der Position g.75245798 folgt die Sequenz (revers, *DMD*-Richtung) ab g.32196272, nach der Position g.32201703 (*DMD*-Richtung) folgt die Sequenz ab g.75245806. In diesem Modell kommt es im Intron 44 zu einer 5,5 kb großen Deletion und im Bereich Xq13.3 zu einer 7 bp großen Deletion. Der Übergang der Bruchpunkte konnte mit einer Sanger-Sequenzierung bestätigt werden, die Elektropherogramme sind über die vorhergesagte Sequenz des Patienten dargestellt.

Perizentrische Inversionen im *DMD*-Gen (46,Y,inv(X)(p21.1q26) wurden zum ersten Mal 1996 von Shashi und Kollegen publiziert (Shashi et al. 1996). Aufgrund ihrer Größe lassen sich perizentrische Inversionen in der Regel mit einer einfachen Chromosomenanalyse identifizieren. In neueren Veröffentlichungen wurden sie aber auch mit FISH identifiziert (Saito-Ohara et al. 2002; Tran et al. 2013). Alle veröffentlichten perizentrischen Inversionen (46,Y,inv(X)(p21.1q26); 46,Y,inv(X)(p21.2q22.2); 46,Y,inv(X)(p21.2;q28)) sind größer als die von uns beschriebene (46,Y,inv(X)(p21.1q13.3), siehe Abbildung 22 B). Zum Teil werden am zweiten Bruchpunkt neue Gene vermutet, die ursächlich sein könnten für schwerere Phänotypen der Patienten (Saito-Ohara et al. 2002; Tran et al. 2013). Im Bereich des Bruchpunktes auf Xq13.3, wie beim hier beschriebenen Patienten vorkommend, sind keine Gene bekannt. Ein Alignment aus Ensembl GRCh37 Release 93 (Zerbino et al. 2018) mit 37 Eutheria inklusive 6 Primaten-Spezies zeigt allerdings, dass der Bereich in Hominoidea sehr konserviert ist und in den restlichen Spezies kein passendes Alignment existiert (Abbildung 24 A). Dies könnte ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang dieser Region mit höheren kognitiven Fähigkeiten sein.

Allgemein werden Inversionen als Ursache für DMD gelegentlich beschrieben, dabei gibt es die verschiedensten komplexen strukturellen Umlagerungen. Inversionen können verantwortlich sein für nicht-kontinuierliche Duplikationen (oder Triplikationen) und Deletionen. In diesen Fällen kann eine MLPA oder Array-CGH Hinweise auf Inversionen

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

liefern (Xu et al. 2018; Baskin et al. 2014; Ishmukhametova et al. 2013). Aber auch eine Analyse der mRNA kann auf eine Inversion hinweisen, wenn kodierende Sequenzen betroffen sind. Dabei kann es auch zum Entstehen neuer Pseudoexons kommen (Madden et al. 2009). Eine Analyse der Bruchpunkte ist allerdings schwierig, da sich diese in der Regel in den großen Introns des *DMD*-Gens befinden. Zur Eingrenzung der Region wurden bisher Array-CGH (Baskin et al. 2014; Ishmukhametova et al. 2013; Flanigan et al. 2011) oder FISH (Tran et al. 2013) verwendet. Zur genaueren Identifizierung der Bruchpunkte eignen sich Long-Range-PCRs (Baskin et al. 2014). Eine praktische Methode zur Entdeckung von Bruchpunkten ist die Sequenzierung der gesamten Sequenz des *DMD*-Gens inklusive Introns, die bisher nur von Xu und Kollegen mit einem kommerziellen Kit durchgeführt wurde (Xu et al. 2018). Die Methode erlaubt nicht nur die Inversion, sondern auch die Bruchpunkte genau zu bestimmen, ebenso wie in dem hier beschriebenen Fall, in dem ein WGS durchgeführt wurde. Nicht in allen veröffentlichten Fällen war es möglich die genauen Bruchpunkte der Inversionen zu bestimmen. Auffällig ist dabei, dass bisher nur in einem anderen Fall ein Bruchpunkt im Intron 44 (g.32152732) beschrieben wurde (Oshima et al. 2009). Da das Intron 44 mit 248401 bp das größte Intron in *DMD* ist, wäre zu erwarten gewesen, dass es mehr Inversionsereignisse zeigt. Daher lässt sich vermuten, dass unter den bisher ungeklärten *DMD*-Patienten noch mehr solcher oder ähnlicher Intron 44-Inversionsereignisse existieren, die mit den bisher angewandten Methoden noch nicht nachgewiesen werden konnten.

Der zugrundeliegende Mechanismus, der die strukturellen Umgruppierungen erklärt, ist noch nicht abschließend geklärt, aber es gibt einige Modelle und Theorien. Bei nicht rekurrenten Mutationen (wie den beschriebenen Inversionen) wird eine Rekombination während der Replikation vermutet. Wenn es während der Replikation zu einem Bruch im Matrizenstrang kommt, kann der freie Strang in einen homologen anderen Bereich eindringen und hier die Replikation fortführen. Dieser Vorgang kann sich wiederholen. Diese homologen Bereiche können auch sehr kurze (bis zu 2 bp) Mikrohomologien sein (Hastings, Ira, and Lupski 2009; Lee, Carvalho, and Lupski 2007).

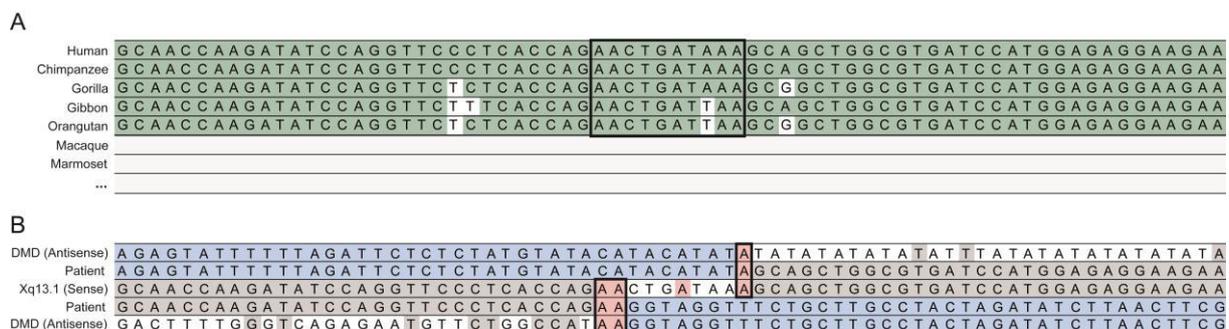


Abbildung 24: Alignment der Bruchpunkte der perizentrischen Inversion. A zeigt das Alignment von fünf Hominoidea-Spezies aus Ensembl der Region g.75245767 bis g.75245836. Zwei Primaten (Makaken und Marmosetten), sowie 30

## 4 Ergebnisse und Diskussion

zusätzliche Spezies, haben kein Alignment im angegebenen Bereich. Schwarz umrahmt sind die Positionen an denen es zu den Bruchpunkten kommt. B zeigt die zwei Bruchpunkte (schwarzer Rahmen) auf dem X-Chromosom mit Homologien. In der Mitte befindet sich die Sequenz des Sense Stranges der Position g.75245767 bis g.75245836 (Xq13.3). Umgebend liegen die Sequenzen des Patienten und am Rand sind die Sequenzen aus dem Intron 44 des *DMD*-Gens (vor und nach der Deletion) aufgezeigt. Gleiche Sequenzen des Patienten mit der Region Xq13.3 sind in grau hinterlegt, gleiche Sequenzen mit dem *DMD* Intron in blau. In rot hinterlegt und schwarz umrahmt sind die Bruchpunkte mit den jeweiligen Mikrohomologien. Für den ersten Bruchpunkt zeigen sich Mikrohomologien von 2 bp, für den zweiten nur 1 bp. Auffällig ist, dass in der Mitte der deletierten Sequenz auf Xq13.3 ein zentrales A liegt, das in allen Sequenzen vorkommt.

Der hier beschriebene Fall ist vermutlich nicht rekurrent, da in 16 weiteren ungeklärten *DMD*-Fällen die Inversion nicht nachgewiesen werden konnte. Welcher Mechanismus der Inversion zu Grunde liegt kann nicht abschließend geklärt werden. Zwar zeigen sich an einem Bruchpunkt (Abbildung 24 B) kurze Mikrohomologien, am anderen Bruchpunkt beträgt diese Homologie aber nur 1 bp. Eine Chromosomenanalyse könnte bestätigen, dass eine vollständige Inversion  $\text{inv}(X)(p21.1q13.3)$  vorliegt.

Neben der Chromosomenanalyse war die Sequenzierung der gesamten genomischen Sequenz des *DMD* die einzige Methode zur Detektion der beschriebenen Mutation. In der Standard-Diagnostik zeigten sich keine Auffälligkeiten, da alle kodierenden Bereiche vorhanden sind. Mit diesen Methoden kann nicht nachgewiesen werden, dass die untersuchten Bereiche an einem anderen Ort, in anderer Reihenfolge oder unterbrochen existieren. Es ist auch fraglich, ob eine RNA-Analyse in diesem Fall zu einem eindeutigen Ergebnis geführt hätte. Vermutlich hätte sich keine *DMD*-mRNA nachweisen lassen, da diese nur bis zum Exon 44 gebildet und dann abgebaut wird.

Dieser Fall zeigt somit, dass auch RNA-Analysen nicht in jedem Fall zur Detektion einer Mutation führen und dass WGS-Analysen komplexe genomische Umlagerungen bis ins Detail aufklären können, sogar bei bekannten und molekulargenetisch vermeintlich geklärten Erkrankungen wie *DMD*, für die Inversionen bisher selten beschrieben wurden.

## 4.3 Spleißmutationen in muskulären Erkrankungen

Spleißmutationen sind oft schwer zu diagnostizieren, da sie einen Nachweis auf RNA-Ebene bedürfen. Es gibt jedoch Hinweise, dass Spleißmutationen viel häufiger vorkommen, als gedacht (Lopez-Bigas et al. 2005). In diesem Abschnitt werden daher verschiedene Spleißmutationen untersucht.

### 4.3.1 Neuer Phänotyp und neue Mutationsart der *TMEM5*-assoziierten alpha-Dystroglykanopathie

Der Index-Patient, der in Anlage 3 (Zaum et al. 2018) beschrieben ist, zeigte eine kongenitale Muskeldystrophie. Kognitive und motorische Meilensteine waren verlangsamt, erst mit 18 Monaten begann der Junge zu gehen. Im Alter von zwei Jahren zeigte eine Laboruntersuchung erhöhte CK-Werte (2000 IU/l), die daraufhin veranlasste Muskelbiopsie des *M. quadriceps femoris* zeigte eine fehlende Expression des alpha-Dystroglykans mit normaler Expression der restlichen Proteine des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes (DGC). Die Entwicklung der Muskeldystrophie des Patienten ist nicht progressiv, im Alter von 15 Jahren kann er immer noch Treppen steigen und zeigt lediglich eine leichte Schwäche des *M. triceps brachii* und *M. psoas major*. Sein IQ ist leicht verringert (IQ 74) und er besucht eine Sprachförderschule. Ein kraniales MRT (1,5 Tesla) ergab keine sichtbaren strukturellen Veränderungen des Gehirns. Zur Abklärung der Muskeldystrophie wurden 65 Muskelgene (Muskelpanel, 3.2.1) untersucht, dabei fiel eine homozygote Variante in *TMEM5* (NM\_014254.1: c.914+6T>G) auf. Die Variante befindet sich in der Nähe zur Donor-Spleißstelle des Exons 5. *In-silico* Vorhersageprogramme sagen die Existenz der Spleißstelle mit einer leicht geringeren Wahrscheinlichkeit vorher, als in der nicht mutierten Sequenz (Abbildung 25).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

		c.914+6T>G	
SpliceSiteFinder-like	[0-100]	78,6	45,4
MaxEntScan	[0-12]	9,5	
NNSPLICE	[0-1]	1,0	
GeneSplicer	[0-15]		
Human Splicing Finder	[0-100]	83,7	59,0
Referenz-Sequenz	TTCAGCAAGAGAACA GTAAGTCTATGCTTATT		
SpliceSiteFinder-like	[0-100]	73,6	67,5
MaxEntScan	[0-12]	5,4	1,7
NNSPLICE	[0-1]	0,7	
GeneSplicer	[0-15]		
Human Splicing Finder	[0-100]	81,8	73,1
mutierte Sequenz	TTCAGCAAGAGAACA GTAAGGCTCTATGCTTATT		

Abbildung 25: *In-silico* Spleißstellen-Vorhersageprogramme aus Alamut Visual für die *TMEM5*-Variante. Abgebildet sind nur die vorhergesagten Wahrscheinlichkeiten für eine Donor-Spleißstelle, für die Referenz-Sequenz (oben) und die mutierte Sequenz (unten). Die grau hinterlegte Sequenz ist die Sequenz des Exons, danach folgt die intronische Sequenz. Die zweiten vorhergesagten Wahrscheinlichkeiten, an der Position der Variante, haben insgesamt sehr niedrige Werte, sodass sie zum Teil unter den Schwellenwert fallen und daher vermutlich keinen Einfluss auf das Spleißen haben.

Zur Kontrolle des Effekts der Spleißvariante wurde die mRNA des Patienten untersucht. RNA wurde aus Vollblut isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Exons 4 bis 6 des Gens *TMEM5* wurden amplifiziert, es zeigten sich beim Patienten zwei PCR-Produkte, im Vergleich zur gesunden Kontrolle: ein kürzeres PCR-Produkt (etwa 450 bp), ebenso wie ein sehr schwaches PCR-Produkt der erwarteten Größe (600 bp), wie in der Kontrolle (Abbildung 26 A). Die anschließende Sequenzierung der cDNA des Patienten zeigte, dass in einem Großteil der Transkripte die Sequenz des Exons 5 fehlt. Nur als schwache Überlagerung ist die Sequenz des Exons 5 zu erkennen (Abbildung 26 B). Die gesunde Kontrolle zeigte eine normale Sequenzabfolge der Exons des *TMEM5* in der cDNA.

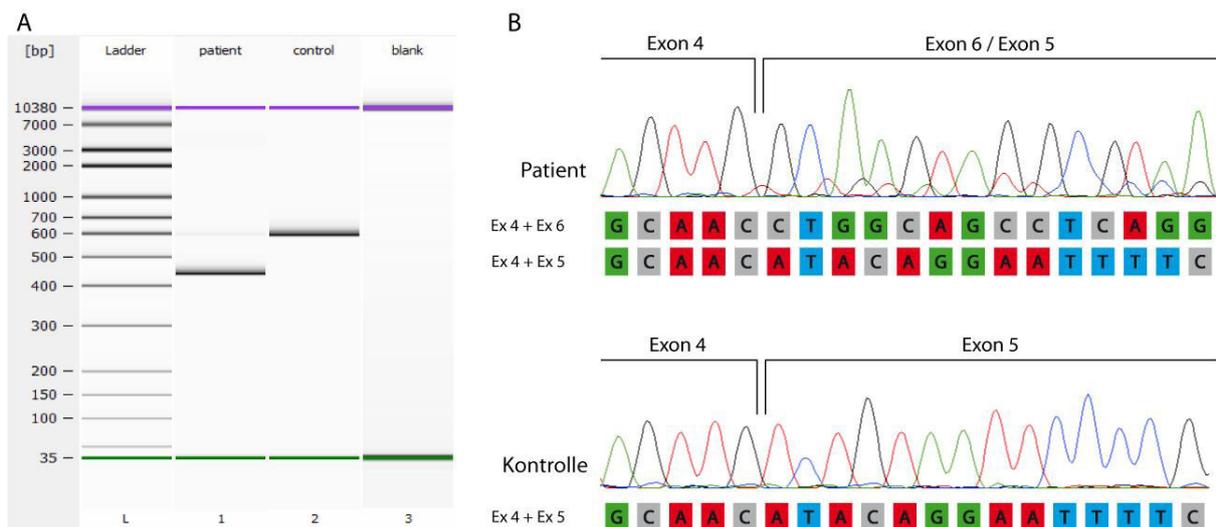


Abbildung 26: Ergebnisse der *TMEM5*-mRNA des Patienten und einer gesunden Kontrolle. A: PCR-Produkte des Patienten und der Kontrolle wurden auf einen Bioanalyzer 2100 (Agilent) aufgetragen. B: Die PCR-Produkte wurden nach der Sanger Methode sequenziert, abgebildet sind die Elektropherogramme von Patient und Kontrolle mit den entsprechenden daraus abgeleiteten Sequenzen.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die homozygote Spleißvariante des Patienten zu einer reduzierten Effektivität der Spleißstelle führt. Die Spleißstelle kann in den meisten Fällen nicht genutzt werden und demzufolge fehlt die Sequenz des Exons 5 in der mRNA. Da dieses Exon aus einem Vielfachen von 3 Basen besteht, wird das Leseraster nicht verschoben, sondern es kommt zu einer in-frame Deletion des Exons 5. In manchen Fällen scheint die Spleißstelle weiterhin genutzt zu werden, da ein geringer Anteil an Wildtyp-mRNA-Sequenz zu sehen ist. Zur Validierung wurde die Segregation der Mutation in der Familie des Patienten überprüft. Seine konsanguinen Eltern sind beide heterozygote Mutationsträger, während sein gesunder Bruder den Wildtyp geerbt hat.

Tabelle 9: Bisher veröffentlichte Mutationen in *TMEM5*.

Nr.	Mutation	Zygotität	Zuerst beschrieben in
1	p.(Gly94Glufs*33)	homozygot	(Vuillaumier-Barrot et al. 2012)
2	p.(Arg266Glyfs*8)	homozygot	
3	p.(Tyr339Cys)	homozygot oder compound-heterozygot mit 5	
4	p.(Arg340Leu)	compound-heterozygot mit 5	
5	p.(Asp355Valfs*33)	compound-heterozygot mit 4 oder 3	
6	p.(Ala47Argfs*42)	homozygot	(Jae et al. 2013)
7	p.(Arg340*)	homozygot	

Bisher sind alle sieben beschriebenen *TMEM5*-Mutationen Missense-Mutationen oder trunkierende Mutationen (Vuillaumier-Barrot et al. 2012; Jae et al. 2013), fast alle Mutationen liegen in der vorhergesagten Exostosin-Domäne oder deletieren diese komplett. Nur eine Frameshift-Mutation befindet sich zwei Aminosäuren hinter der Domäne (p.(Asp355Valfs\*33) siehe Abbildung 27), aber auch diese Mutation liegt in unmittelbarer Nähe zur Domäne, sodass ein Einfluss wahrscheinlich scheint.

Die in Anlage 3 beschriebene Mutation des Patienten ist die erste Spleißmutation in *TMEM5*. Auch diese neue Variante hat einen Einfluss auf die beschriebene Exostosin-Domäne. Der Verlust des Exons 5 führt zum Verlust eines großen Teils (42 %) der Domäne (Abbildung 27). Das Clustern aller bekannten Mutationen in diesem Bereich des Genes lässt darauf schließen, dass die Exostosin-Domäne essentiell ist für die Funktion des Proteins. Für Exostosin-Proteine wurden Glykosyltransferase-Eigenschaften nachgewiesen (Lind et al. 1998) und *TMEM5* hat ebenfalls die Funktion einer Glykosyltransferase in der langen und komplexen Glykosylierung des alpha-Dystroglykans (Manya et al. 2016). Das Auftauchen einer neuen Mutationsart (Spleißmutation), die ebenfalls diese Domäne beeinflusst, lässt es als sicher erscheinen, dass der Bereich der Exostosin-Domäne des *TMEM5*-Gens (218-353) der katalytisch aktive Teil des Proteins und für dessen Funktion essentiell ist.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

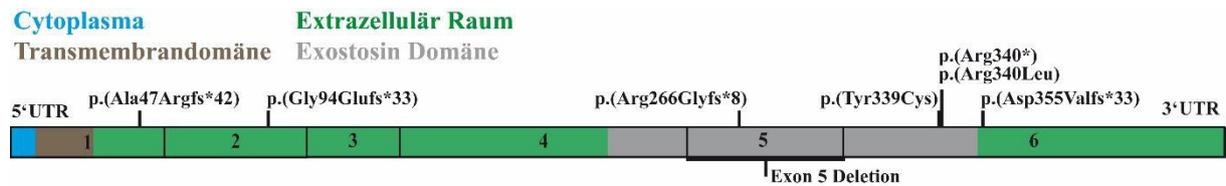


Abbildung 27: Verteilung der Mutationen in *TMEM5* und funktionelle Domänen.

Obwohl die Mutation des Patienten homozygot ist, konnte ein Rest des Wildtyp-Transkriptes nachgewiesen werden. Dies lässt sich durch eine Restaktivität der Donor-Spleißstelle erklären. Die Mutation zerstört die Funktionsfähigkeit der Spleißstelle nicht vollständig, zum Teil wird sie vom Spleißosom erkannt und gespleißt. Der geringe Rest an Wildtyp-Transkript ist vermutlich die Erklärung, warum der Patient einen relativ milden Phänotyp hat. In der Literatur sind einige schwere Fälle beschrieben, die zum Teil zu einem frühen Tod führten (Jae et al. 2013). Das häufige Symptom der Typ II-Lissenzephalie, konnte bei dem Patienten im kranialen MRT nicht nachgewiesen werden. Es konnten auch keine weiteren Strukturveränderungen festgestellt werden. Ob seine leichte Intelligenzminderung durch die Mutation in *TMEM5* begründet ist, lässt sich nicht klären, auch wenn dies möglich scheint, da *TMEM5* im Gehirn exprimiert wird und in anderen Patienten einen Einfluss von *TMEM5*-Mutationen auf die Struktur des Gehirns beschrieben wurde. Eine Prognose für die weitere Entwicklung des Patienten ist abschließend leider nicht zu stellen.

### 4.3.2 Weitere Spleißmutationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene weitere potentielle Spleißmutation auf ihren Einfluss auf die mRNA hin untersucht (Tabelle 10). Dazu wurde RNA aus Blut oder Muskel isoliert und in cDNA re-transkribiert. Es fiel auf, dass die meisten Spleißvarianten einen Einfluss auf das Spleißverhalten haben, auch wenn diese weiter von der Spleißstelle entfernt sind und *in-silico* Programme nur einen geringen Einfluss auf die Spleißstelle vorhersagen. Genauso konnten in Fällen mit einer deutlichen Spleißstellen-Vorhersage kein verändertes Spleißen in der mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 28).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 10: Übersicht über analysierte Spleißvarianten

Gen	cDNA	Position	Verdacht	Einfluss auf Transkripte
<b>FBN2</b>	NM_001999.3(FBN2): c.7595-13T>C	Intron 59	Verlust Akzeptor-Spleißstelle	Exon 60 fehlt in einem geringen Teil
<b>COL6A2</b>	NM_001849.3(COL6A2): c.954+3A>C	Intron 9	Verlust Donor-Spleißstelle	Exon 9 fehlt in der Hälfte
<b>PLA2G6</b>	NM_003560.2(PLA2G6): c.1428-10C>G	Intron 10	Verlust Akzeptor-Spleißstelle	drei verschiedene Spleißvarianten entstehen
<b>FLNC</b>	NM_001458.4(FLNC): c.6390C>T	Exon 39	kryptische Spleißstelle	kein verändertes Spleißverhalten
<b>TMEM5</b>	NM_014254.1(TMEM5): c.914+6T>G	Intron 5	Verlust Donor-Spleißstelle	Exon 5 fehlt in einem Großteil

Die untersuchten Spleißvarianten liegen bis 13 bp im Intron. Für diesen Fall (*FBN2*, c.7595-13T>C) ist der vorhergesagte Einfluss auf die Akzeptor-Spleißstelle sehr gering. Die *in-silico* Programme reduzieren ihre vorhergesagten Wahrscheinlichkeiten um weniger als 10 % im Vergleich zum Wildtyp. Trotzdem war in der Sanger-Sequenzierung der cDNA zu erkennen, dass die Sequenz des Exons 60 in einem Teil der Transkripte fehlte (Abbildung 28). Hauptsächlich wird das Wildtyp-Transkript gebildet, aber es ist eine doppelte Sequenz zu erkennen, die zeigt, dass eine zweite Sequenz existiert. Diese ist etwas schwächer als die Wildtyp-Sequenz (niedrigere Peaks im Elektropherogramm) und zeichnet sich durch ein Fehlen der Sequenz des Exons 60 aus. Obwohl die Variante tiefer intronisch liegt als erwartet, konnte ein Einfluss auf das Spleißverhalten nachgewiesen werden. Diese Variante zeigt auch, dass nicht nur Varianten an den kanonischen Spleißstelle oder wenige Basen ins Intron Einfluss auf das Spleißverhalten haben, sondern dass auch weiter von den Exons entfernte Varianten, jenseits von kryptischen Spleißstelle, einen Einfluss haben können. Dies sollte bei der Diagnostik berücksichtigt werden, indem Varianten auch über 10 bp im Intron hinein betrachtet werden.

In den folgenden zwei Fällen (*COL6A2*, *PLA2G6*) konnte Ähnliches beobachtet werden. Die Wahrscheinlichkeiten für eine Spleißstelle werden mit abnehmender Entfernung zum Exon mehr beeinflusst. Für die Variante in *PLA2G6* (c.1428-10C>G) beträgt die Differenz zur Referenz-Sequenz nur etwa 20 %, bei *COL6A2* (c.954+3A>C) liegt der Unterschied bei knapp über 40 % (Abbildung 28). Im Gegensatz dazu steht die Variante in *FLNC* (c.6390C>T), diese Variante ist eine synonyme Variante. Es sollte daher nicht der Verlust einer bestehenden Spleißstelle überprüft werden, sondern das mögliche Entstehen einer neuen Spleißstelle getestet werden. An der Position c.6390 in der Referenz-Sequenz wird von keinem Vorhersageprogramm eine Wahrscheinlichkeit über dem Schwellenwert von 70 vorhergesagt. Nach dem synonymen Austausch (c.6390C>T, p.(Gly2130=)) wird von allen *in-silico* Programmen das Entstehen einer neuen kryptischen Donor-Spleißstelle mit hohen

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Wahrscheinlichkeiten vorhergesagt (im Durchschnitt >70 %) (Abbildung 28). Als einziges Beispiel wurde die RNA in diesem Fall aus Muskelgewebe, im Gegensatz zu Blut, gewonnen, da *FLNC* vor allem in Muskelgewebe exprimiert wird. Die Sequenzierung der cDNA ergab kein verändertes Spleißverhalten. Die heterozygote Variante der Patientin ist auch in der cDNA zu erkennen, ansonsten gibt es keine Abweichungen von der Wildtyp-Sequenz. Daher wird die vorhergesagte kryptische Spleißstelle in diesem Fall sehr wahrscheinlich nicht genutzt.

In allen Fällen wurde cDNA gesunder Personen mit analysiert, als Kontrolle zum Ausschluss eines allgemeinen alternativen Spleißens. Nur im Fall der *FLNC*-Variante wurde ein Patient mit einer bekannten Mutation in einem anderen Gen als Kontrolle verwendet. Die Kontrollen zeigten immer ein Wildtyp-Spleißverhalten, mit der Ausnahme der *PLA2G6*-Variante. In diesem Fall wurde in der cDNA-Sequenz des Patienten nach dem Ende des Exons 10 eine Überlagerung von drei Sequenzen beobachtet. Diese verschiedenen Transkripte konnten nur durch Gelelektrophorese getrennt und mit anschließender separater Eluation sequenziert werden. Es zeigte sich, dass neben dem schwachen Wildtyp-Transkript zwei alternative Spleißvarianten existieren. In der einen Variante fehlt die Sequenz des folgenden Exons 11, es folgt direkt die Sequenz des Exons 12. In der zweiten Variante folgt auf die Sequenz des Exons 10 eine Sequenz des Introns 10, hier werden vermutlich tief-intronische kryptische Spleißstellen (an den Positionen c.1427+680 bis c.1427+734) verwendet und auf diese Weise ein Pseudoexon in das Transkript hinein gespleißt. Interessanterweise war dieser Fall der einzige, bei dem auch die Kontrolle die schwache Existenz eines alternativen Transkriptes zeigte. Hier zeigte sich ebenfalls die Insertion einer Teilsequenz des Introns 10, jedoch viel schwächer als im Patienten. Dieses Transkript ist daher vermutlich eine benigne Variante des alternativen Spleißens in *PLA2G6*, die alternative intronische Spleißstellen verwendet. Durch die Variante (c.1428-10C>G) des Patienten wird sowohl diese Spleißvariante verstärkt, wie auch das Skippen des gesamten Exons 11, das in Kontrollen nicht beobachtet wurde.

In diesen fünf Fällen (Tabelle 10) konnte gezeigt werden, dass *in-silico* Vorhersageprogramme Spleißstellen nicht mit Sicherheit vorhersagen können. Je näher eine mögliche Mutation der Exongrenze ist, desto wahrscheinlicher wird ein Effekt auf diese Spleißstelle vorhergesagt, was vermutlich an den zugrunde liegenden Algorithmen der Programme liegt. Die untersuchten Fälle lassen darauf schließen, dass Vorhersagen für bestehende Spleißstellen von Vorhersageprogrammen mit größerer Sicherheit getroffen werden können, als für neue kryptische Spleißstellen. Die einzige untersuchte kryptische Spleißstelle hatte keinen Effekt auf das Spleißen, wurde aber mit hohen Wahrscheinlichkeiten

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

vorhergesagt. In allen restlichen Fällen konnte in den Patienten ein verändertes Spleißen festgestellt werden, auch wenn die Vorhersageprogramme nur einen geringen Unterschied vorhersagten und auch wenn die Varianten weiter entfernt waren als erwartet. Da die Anzahl der untersuchten Fälle gering ist, kann keine verlässliche Aussage getroffen werden, es lässt sich jedoch eine deutliche Tendenz erkennen. Schlussfolgernd sollten in der Diagnostik Spleißvarianten stärker berücksichtigt werden, da diese häufige Art der Mutation mit den gängigen Diagnostikmethoden (DNA-Sequenzierung) nicht zweifelsfrei bewiesen werden kann. Dadurch entsteht die Möglichkeit bisher ungelöste Fälle zu klären.

Die Angaben über die Häufigkeit von Mutationen, die einen Effekt auf das Spleißen haben variieren von 15% bis 60 % (Krawczak, Reiss, and Cooper 1992; Lopez-Bigas et al. 2005; Vaz-Drago, Custodio, and Carmo-Fonseca 2017). Aus diesen Zahlen lässt sich schließen, dass Spleißvarianten häufiger sind, als oft angenommen und bisher noch nicht ausreichend untersucht und beschrieben sind, wie das Beispiel des Patienten mit *TMEM5*-Mutation zeigt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

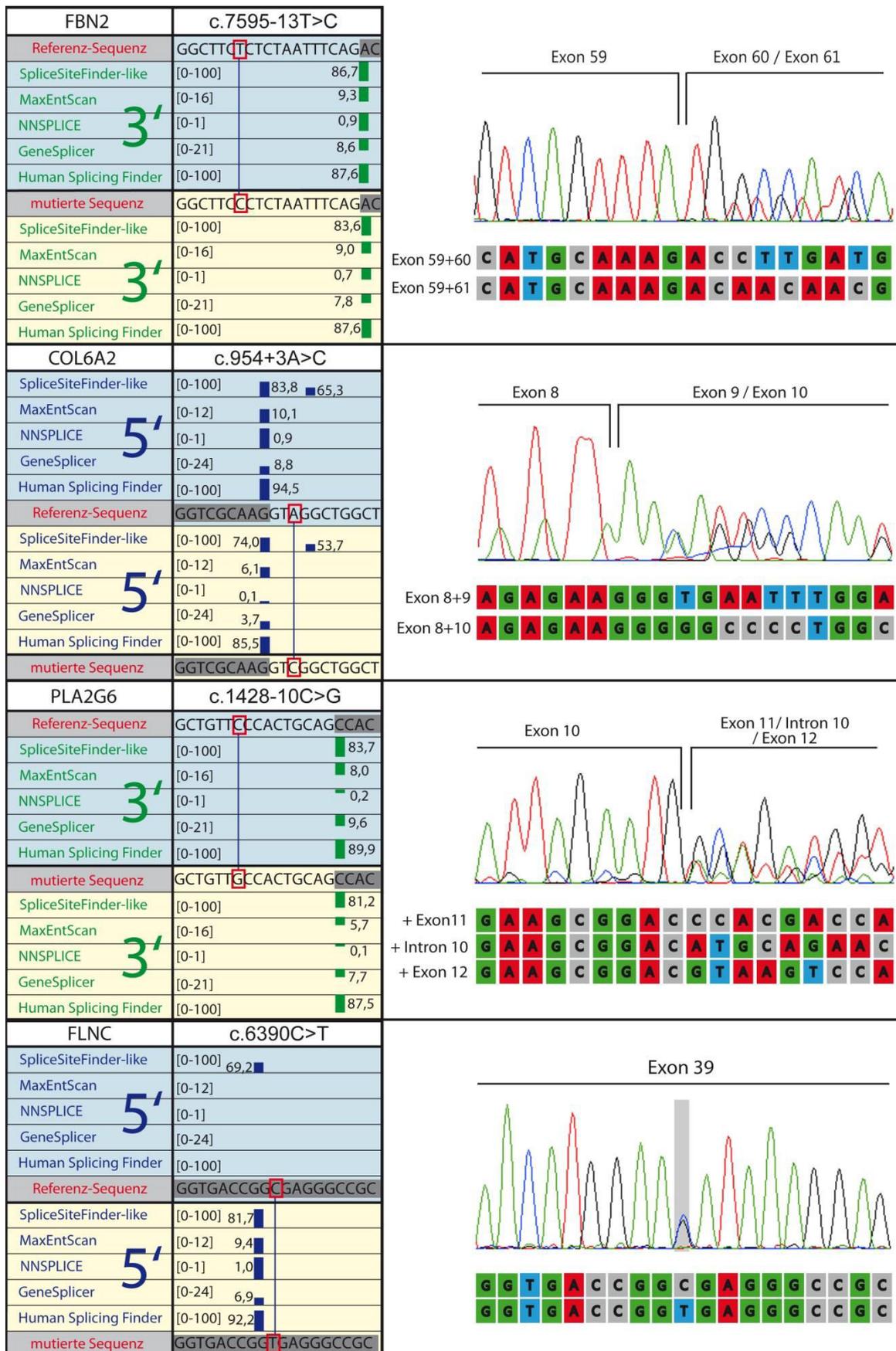


Abbildung 28: Übersicht über untersuchte Spleißvariationen. Auf der linken Seite befinden sich die Vorhersagen der *in-silico* Programme aus Alamut Visual. Auf der rechten Seite sind die Elektropherogramme der cDNA-Sequenzierungen der einzelnen Varianten zu sehen.

## 4.4 Neue Kandidatengene für die Myofibrillären Myopathien

In Anlage 4 wird die Analyse von zehn MFM-Patienten beschrieben. Bei allen zehn Patienten besteht die klinische Diagnose einer MFM. Mutationen in bisher bekannten MFM-Genen (*BAG3*, *CRYAB*, *DES*, *DNAJB6*, *FHL1*, *FLNC*, *LDB3*, *MYOT*) konnten in einer früheren Studie (Semmler et al. 2014) in einem Teil der Patienten ausgeschlossen werden. Ziel der jetzigen Folgestudie war die Identifizierung neuer Kandidatengene in bekannten Krankheits-assoziierten Genen.

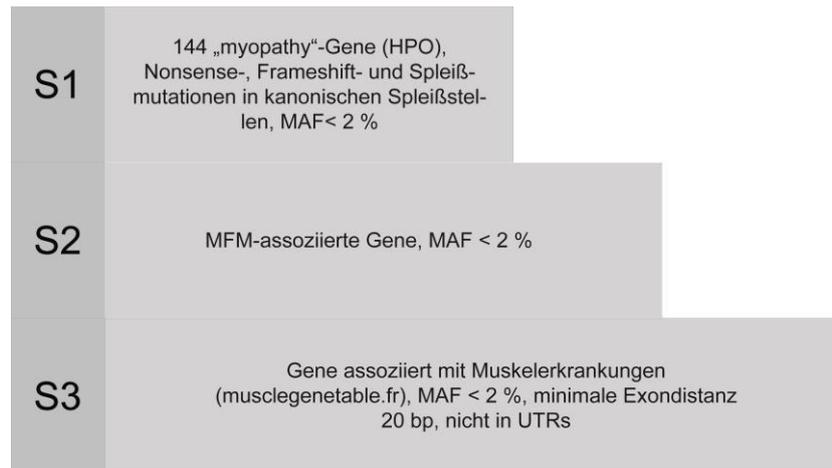


Abbildung 29: Stufenschema zur Identifizierung von kausalen Varianten in MFM-Patienten

Die Analyse wurde in drei Stufen eingeteilt (Abbildung 29). Zuerst (S1) wurde nach Varianten in 144 Genen gesucht, die in der HPO mit „myopathy“ assoziiert sind (Stand: Mai 2018) und im TruSight One Panel enthalten sind. Dann wurde in Stufe 2 (S2) nach Varianten in 14 Genen gesucht, für die eine Assoziation mit MFM bekannt ist oder vermutet wird (*ACTA1*, *BAG3*, *CRYAB*, *DES*, *DNAJB6*, *FHL1*, *FLNC*, *HSPB8*, *LDB3*, *MYOT*, *PLEC*, *TTN*, *CFL2*, *CSRP3*). Von diesen 14 Genen sind für 12 Gene Patienten mit MFM beschrieben, zwei Gene (*CFL2*, *CSRP3*) wurden hinzugefügt, da sie mit einem myofibrillärem Phänotyp in Verbindung stehen (Arber et al. 1997; Ockeloen et al. 2012). Die Gene aus dieser Stufe wurden zum Teil bereits in der vorangegangenen Studie (Semmler et al. 2014) untersucht, da jedoch nicht einheitlich alle Gene in allen Patienten untersucht wurden und unterschiedliche Methoden verwendet wurden, wurden die bekannten MFM-Gene erneut untersucht. In Stufe 3 (S3) wurden Varianten in Genen gesucht, die im Allgemeinen mit Muskelerkrankungen in Verbindung stehen. Dafür wurde die „Muscle gene table“ der World Muscle Society (siehe Abschnitt 7) verwendet.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 11: Varianten der 10 MFM-Patienten. Die am wahrscheinlichsten ursächlichen Varianten sind dargestellt, zusammen mit Informationen zur Häufigkeit, Pathogenität und *in-silico* Vorhersagen. Informationen zu Proteindomänen stammen von Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), außer bei *TTN*-Varianten, hier stammen die Informationen von der Internetseite der Cardiovascular Genetics and Genomic Group, Royal Brompton & Harefield NHS Trust (<https://www.cardiodb.org/titin/>). Kursive Schreibweise bei Domänen bedeutet, dass die Variante nicht in der Domäne, aber in der Nähe liegt. Die Allelfrequenzen aus gnomAD entsprechen denen der Gesamtbevölkerung.

Patienten	Variante	Domäne	HGMD	gnomAD Homozygote	Align GVDG	SIFT	Mutation Taster	Poly Phen2	InterVar
<b>MFM_1</b>	NM_001458.4(FLNC): c.6595G>A p.(Gly2199Arg)	2162-2243: Intradomain insert; mediate targeting to Z lines	-	0,003683% 0	C15	deleterious	disease causing	benign	uncertain
<b>MFM_2</b>	NM_005691.3(ABCC9): c.4570_4572delinsAAAT p.(Leu1524Lysfs*5)	1312-1546: ABC transporter 2	CX041212	-	-	-	-	-	pathogenic
<b>MFM_3</b>	NM_005476.5(GNE): c.1598G>A p.(Gly533Glu)	406-722: N-acetyl- mannosamine kinase	-	0,008657% 0	C65	deleterious	disease causing	probably damaging	uncertain
<b>MFM_4</b>	NM_015915.4(ATL1): c.292del p.(Asp98Ilefs*10)	-	-	-	-	-	-	-	likely pathogenic
<b>MFM_5</b>	NM_001267550.2(TTN): c.4147C>G p.(Pro1383Ala)	near Z-disk region, Ig- like 5	-	0,001222% 0	-	-	disease causing	-	uncertain
<b>MFM_6</b>	NM_001267550.2(TTN): c.86413_86417delinsATGG p.(Asp28805Metfs*6)	A-band region	-	-	-	-	-	-	likely pathogenic
<b>MFM_7</b>	NM_001848.2(COL6A1): c.739-1G>T	<i>257-592: Triple-helical region</i>	-	-	Akzeptor-Spleißstelle von Intron 6, Skippen von Exon 7 ist wahrscheinlich	-	-	-	pathogenic
<b>MFM_8</b>	NM_004369.3(COL6A3): c.1688A>G p.(Asp563Gly)	445-620: VWFA 3	CM1310911	0,2085% 0	C65	deleterious	disease causing	probably damaging	uncertain
<b>MFM_9</b>	NM_002148.3(HOXD10): c.311C>T p.(Thr104Ile)	-	-	-	C15	deleterious	disease causing	benign	uncertain
<b>MFM_10</b>	NM_000257.2(MYH7): c.1063G>A p.(Ala355Thr)	85-778: Myosin motor	CM031268	-	C0	deleterious	disease causing	probably damaging	likely pathogenic
<b>MFM_10</b>	NM_001267550.2(TTN): c.51436+1G>A	A-band region, Fibronectin type-III 12	-	0,0004088% 0	Donor-Spleißstelle von Intron 271, Skippen von Exon 271 ist wahrscheinlich	-	-	-	pathogenic
<b>MFM_10</b>	NM_001267550.2(TTN): c.54710T>C p.(Leu18237Pro)	A-band region, Fibronectin type-III 20	-	0,06332% 0	-	-	disease causing	-	uncertain

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Die Varianten wurden auf Grundlage ihrer Häufigkeit in der Normalbevölkerung, der vorhergesagten Pathogenität und des bekannten Einflusses auf Proteinstrukturen analysiert und bewertet. Die am wahrscheinlichsten pathogenen Varianten für jeden Patienten sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Zusätzlich wurden alle Varianten mit InterVar (Li and Wang 2017) eingestuft. Eine ausführliche Beschreibung und Diskussion aller genannten Varianten ist in Anlage 4 erfolgt. Aufgrund der für die Variantensuche ausgewählten Gene ist es nicht verwunderlich, dass die meisten gefundenen Varianten in Genen liegen, die mit Myopathien assoziiert sind.

Drei der gefundenen Varianten sind als pathogen publiziert (Varianten in *ABCC9*, *COL6A1* und *MYH7*). Die Mutationen in *ABCC9* (c.4570\_4572delinsAAAT) (Bienengraeber et al. 2004) und *MYH7* (c.1063G>A) (Richard et al. 2003) sind beschrieben für Patienten mit Kardiomyopathien. Mutationen in *MYH7* sind auch in manchen Formen nicht-kardialer Myopathien beschrieben (Tajsharghi and Oldfors 2013) und es wurden MFM-ähnliche Muskelbiopsie-Befunde publiziert (Tasca et al. 2012). Für *ABCC9* sind keine Skelettmuskel-Myopathien beschrieben, obwohl der Kanal, der von *ABCC9* kodiert wird, auch im Skelettmuskel exprimiert wird (Davis-Taber et al. 2000). Wie in 2.4.7 beschrieben, sind Kardiomyopathien ein Symptom der MFM, das nicht selten vorkommt. All diese Belege deuten darauf hin, dass auch Gene für die bisher nur oder hauptsächlich Kardiomyopathien beschrieben sind, wie *ABCC9* und *MYH7*, ursächlich für MFM sein können.

Die Mutation in *COL6A1* (c.739-1G>T) wurde bisher noch nicht beschrieben, jedoch ist an der gleichen Position eine Mutation publiziert (c.739-1G>A), die einen nachgewiesenen Einfluss auf das Spleißen hat und damit die Stabilität der Tripelhelix-Region und der Kollagen Typ VI-Dimere stören kann. Die Mutation wurde in einer Familie mit Bethlem-Myopathie beschrieben (Lucioli et al. 2005). Die für Kollagen Typ VI-Myopathien üblichen Kontrakturen wurden nicht nur in der publizierten Familie und im Patienten MFM\_6 beobachtet, sondern auch in anderen MFM-Formen beschrieben (Selcen et al. 2011). Diese Hinweise legen es nahe, dass die Kollagen Typ VI-Gene ebenfalls zum Spektrum der MFM gehören könnten.

Auch zwei Varianten, die in Genen für Neuropathien liegen, wurden beobachtet (*ATLI* und *HOXD10*), hier ist *ATLI* ein guter Kandidat. Obwohl die *ATLI*-Variante (c.292del) noch nicht beschrieben wurde, ist sie wahrscheinlich pathogen, es handelt sich um eine seltene Frameshift-Mutation in einem Gen, in dem Frameshift-Mutationen beschrieben sind (Guelly

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

et al. 2011; Tessa et al. 2002). *HOXD10* ist noch nicht ausreichend erforscht und es liegen daher zu wenige Informationen vor. Zwar deutet vieles auf eine Pathogenität der *HOXD10*-Variante (c.311C>T) hin, aber bisher ist nur ein Fall mit einer Mutation in *HOXD10* beschrieben (Shrimpton et al. 2004). Auch periphere Neuropathien sind für MFM häufig beschrieben (siehe 2.4.7), daher lässt es sich nicht ausschließen, dass auch umgekehrt Neuropathien einen muskulären MFM-Phänotyp verursachen können.

In *TTN* wurden zwei Varianten in zwei Patienten entdeckt, eine Frameshift- und eine Spleißvariante. Erbliche Myopathie mit frühem Atemversagen (HMERF, englisch: Hereditary myopathy with early respiratory failure) ist eine Erkrankung, die durch Mutationen in *TTN* verursacht wird und zu den MFM-Formen gehört (Ohlsson et al. 2012), auch wenn erst wenige Fälle beschrieben sind. Die bisher beschriebenen Mutationen in HMERF sind heterozygote Missense-Mutationen. Da Titin, das von *TTN* kodierte Protein, jedoch in enger Verbindung zur Z-Scheibe steht (Abbildung 3), ist auch bei Mutationen an anderen Positionen denkbar, dass sie einen MFM-Phänotyp verursachen. Aufgrund der Größe von *TTN* wurde dies eventuell noch nicht ausreichend untersucht. Zusätzlich sind für beide Patienten Missense-Mutationen gefunden worden (Tabelle 11), diese sind ebenfalls selten, liegen in funktionellen Domänen, werden als pathogen vorhergesagt und könnten ebenfalls einen Einfluss auf die Funktion von Titin haben. Außerdem sind für Titin auch autosomal-rezessive Myopathien beschrieben (Carmignac et al. 2007). Diese Varianten wurden daher zur Vollständigkeit mit in die Tabelle aufgenommen und als unklare Variante klassifiziert.

Es zeigt sich somit, dass es deutliche Hinweise gibt, dass auch Mutationen in anderen Myopathie- und Neuropathie-Genen MFM-Phänotypen verursachen können, dies sollte bei der Diagnose von ungeklärten MFM-Fällen berücksichtigt werden.

Bei der Analyse der zehn Patienten konnte nicht für alle Patienten eine wahrscheinlich ursächliche Mutation gefunden werden, so wie bei MFM\_3. Dieser Patient hat nur eine heterozygote Variante in *GNE*. Obwohl *GNE* mit autosomal-rezessiven Myopathien assoziiert ist, ist dieses Gen ein guter Kandidat für MFM. Die *GNE*-Myopathien sind durch ihre typischen filamentösen Einschlüsse im Muskel eine Differentialdiagnose zur MFM (Selcen and Engel 1993). Der Patient könnte weitere Varianten in Genen haben, die im TruSight One Panel nicht enthalten sind. Es wäre jedoch auch denkbar, dass er zusätzliche tief-intronische Varianten oder CNVs im *GNE* hat, die mit der Panel-Diagnostik nicht erfasst werden.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund dessen könnte die heterozygote *GNE*-Variante doch im ursächlichen Zusammenhang stehen.

Die Analyse in drei Stufen hat es ermöglicht, schnell die besten Varianten zu finden. Durch die Gen-Auswahl und die Filtereinstellungen enthielt die erste Stufe die wenigsten Varianten, damit war sie die effektivste. Insgesamt 40 % der vermutlich ursächlichen Varianten wurden in dieser Stufe entdeckt. Die meisten wahrscheinlich kausalen Varianten (50 %) wurden in S3 entdeckt, diese Stufe enthielt aber auch insgesamt die meisten Varianten. Die wenigsten auffälligen Varianten (10 %) wurden in S2 gefunden. Da hier bekannte MFM-Gene untersucht wurden und die Patienten zum Teil schon auf diese Gene getestet waren, überrascht dies nicht. Die in den drei Stufen untersuchten Gene überlappen sich zum Teil (Abbildung 30), da aber in jeder Stufe unterschiedlich strenge Filtereinstellungen verwendet wurden, produzierte jede Stufe neue Varianten.

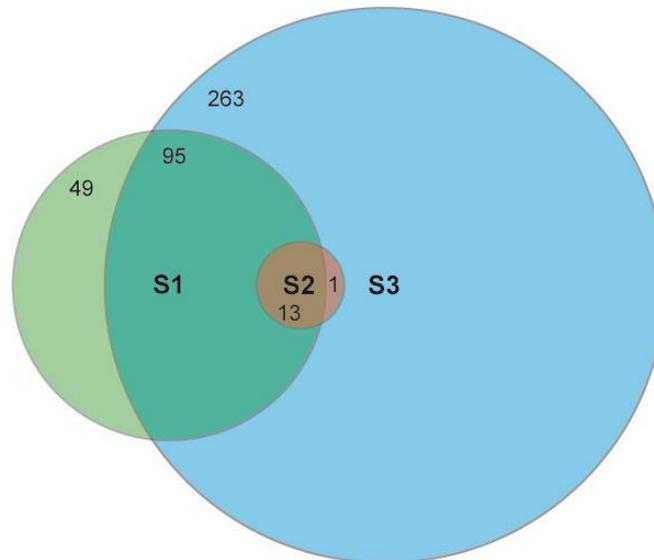


Abbildung 30: Mengendiagramm der untersuchten Gene in den drei Stufen. Die Zahlen in den Kreisen zeigen die Anzahl der in der Stufe enthaltenen Gene.

Mit dem aufkommenden WES wäre es notwendig, die Stufenanalyse an diese Methode anzupassen. Dafür ist es sinnvoll, bei allen Patienten mit einem Verdacht auf MFM zuerst in S2 alle MFM-assoziierten Gene zu überprüfen, hier sollte auch das jüngste MFM-Gen *LMNA* (Dhawan et al. 2017) aufgenommen werden. Auf diese Weise werden zunächst schnell die wahrscheinlichsten Gene überprüft. Kann keine ursächliche Variante gefunden werden, sollte in der nächsten Stufe mit den Filtereinstellungen aus S1 eine Kombination der Gene aus S1 und S3 überprüft werden. So werden die pathogensten Varianten (Frameshift, Nonsense, Spleißmutationen) aus einer großen Anzahl an Genen untersucht und es können eventuell pathogene Varianten in Genen entdeckt werden, die noch nicht mit MFM in Verbindung

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

stehen. Es ist nicht sinnvoll, ohne eine Beschränkung der Gene im gesamten WES nach trunkierenden Varianten zu suchen, dadurch würden zu viele Varianten in Genen gefunden, die nicht in Zusammenhang mit der Erkrankung des Patienten stehen. Wird auch in dieser Stufe keine Variante gefunden kann in der letzten Stufe in allen Genen gesucht werden, dafür müssen die Filter jedoch angepasst werden. Es sollten strengere Filter für die Qualität der Varianten gesetzt werden, wie zum Beispiel die Frequenz der Variante. Darüber hinaus wäre es sinnvoll, mit einem individuellen Phänotyp des Patienten zu suchen, sodass die Anzahl der zu analysierenden Varianten praktikabel bleibt.

## 5 Fazit und Ausblick

Neuromuskuläre Erkrankungen sind eine umfangreiche und komplexe Erkrankungs-Gruppe, die die humangenetische Diagnostik vor große Herausforderungen stellt. Aufgrund der phänotypischen Überlagerung sowohl der neurodegenerativen und muskulären Erkrankungen sowie auch innerhalb der Erkrankungen ist eine möglichst genaue klinische Diagnostik wichtig für den Erfolg der genetischen Diagnostik. Im Zeitraum der vorliegenden Arbeit wurden mehr Fälle untersucht als die beschriebenen, dabei wurde eine Aufklärungsquote von etwa 50 % erreicht. Es zeigte sich auch, dass nicht immer eine genetische Mutation ursächlich sein muss. Generell sind für die humangenetische Diagnostik die Wirtschaftlichkeit, das Einverständnis und die Aufklärung des Patienten und die Verfügbarkeit von zu untersuchendem Material zu berücksichtigen. Es wäre zwar wünschenswert, einen möglichst großen Teil des Genoms zu sequenzieren und diesen mit Daten von Verwandten (Trio und Segregationsanalyse) und anderem Gewebe (RNA aus Muskelgewebe) zu komplementieren, jedoch ist dies in der genetischen Standard-Diagnostik aufgrund von ökonomischen Aspekten selten praktikabel. Die heutige Standard-Diagnostik besteht mittlerweile meist aus der Sequenzierung kleiner Panels oder der gesamten kodierenden Sequenz des Genoms (WES). Für Letzteres haben Metaanalysen eine genetische Aufklärungsquote von 36 % beschrieben. Die Erfolgsquote der Sequenzierung des gesamten Genoms (WGS), inklusive intronischer und regulatorischer Sequenzen, liegt mit 41 % nur knapp darüber (Clark et al. 2018). Eine größere Menge an sequenzierten Daten ist daher nicht unbedingt mit einer deutlich höheren Detektionsrate verbunden.

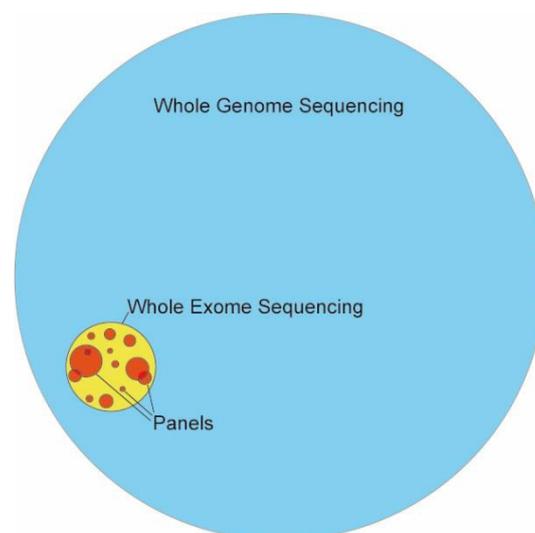


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Datenmenge bei Whole Genome Sequencing, Whole Exome Sequencing und Panel-Sequenzierung. Die Abbildung ist nicht proportional.

## 5 Fazit und Ausblick

Wie diese Arbeit gezeigt hat, kann es für eine erfolgreiche Diagnostik ausreichend sein, nur ein Genpanel oder sogar nur ein Gen zu sequenzieren, wenn der Phänotyp gut untersucht und genetisch eindeutig ist.

Für eine möglichst hohe Erfolgsquote ist ein strukturiertes Vorgehen wichtig, bei dem, aufgrund der Gefahr für das Krankheitsgeschehen nicht relevante Zufallsbefunde zu detektieren, keine inadäquat große Datenmenge generiert werden sollte. Elementarer Bestandteil einer strukturierten Analyse ist auch die Speicherung aller eingestuft Varianten in einer internen Datenbank. Im Laufe dieser Arbeit wurden über 11000 unterschiedliche Varianten eingestuft (Abbildung 32). Die im Laufe der Zeit stetig erweiterte Datenbank war beim Einstufen von nachfolgenden Fällen von großem Nutzen. Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, sind ein Großteil der gefundenen Varianten als „artefact“, „undefined“ oder „false reference“ eingestuft. Bei diesen handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um echte Varianten, die daher bei der Analyse nicht berücksichtigt werden müssen.

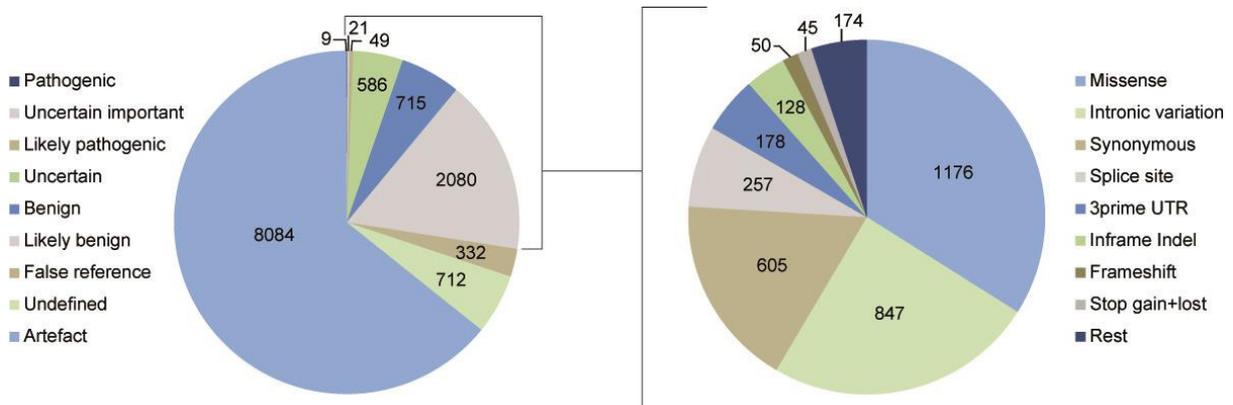


Abbildung 32: Anteil der eingestuften Varianten. Links sind alle eingestuften Varianten mit den entsprechenden Klassen dargestellt. Rechts sind die Mutationsarten aller Varianten dargestellt, die nicht „artefact“, „false reference“ oder „undefined“ sind. Für beide Grafiken sind die absoluten Zahlen der Varianten in dieser Kategorie dargestellt.

Zur Steigerung der Detektionsrate ist es nötig, sich die Grenzen der verwendeten Methoden vor Augen zu setzen, dabei muss zwischen der Diagnostik von SNVs und CNVs unterschieden werden. Die Detektion von SNVs ist mit den genannten Sequenzier-Methoden gut möglich. Ungeklärte Fälle können Varianten in intronischen oder regulatorischen Bereichen aufweisen, die nicht untersucht wurden. Eine Erweiterung des sequenzierten Bereiches kann möglicherweise pathogene Varianten aufdecken. Dabei ist zu bedenken, dass zu Varianten in intronischen und regulatorischen Bereichen oft noch nicht ausreichend Informationen für eine eindeutig pathogene Einstufung vorliegen, da erst wenige pathogene Varianten in diesen Bereichen beschrieben sind. Ein Teil der genetisch ungeklärten Fälle lässt sich wohl durch CNVs erklären. Die gängigen NGS-Daten, wie sie zum Beispiel beim WES entstehen, sind aufgrund der niedrigen Coverage nicht einheitlich genug zur verlässlichen Detektion von CNVs. Bei kleineren Panels und damit höherer Coverage werden verlässlichere Ergebnisse

## 5 Fazit und Ausblick

erzielt. Jedoch kommt hinzu, dass bei den meisten verwendeten NGS-Methoden kurze Reads sequenziert werden. Große Strukturveränderungen können folglich von diesen Reads schwer oder gar nicht dargestellt werden.

Ein weiterer Faktor, der ungeklärte Fälle erklären könnte, sind Spleißmutationen. Es wird vermutet, dass bis zu 60 % aller Mutationen einen Einfluss auf das Spleißverhalten haben (Wang and Cooper 2007; Lopez-Bigas et al. 2005). Diese Mutationen können leicht unentdeckt bleiben, da ein Einfluss auf das Spleißen nur selten getestet wird. In der HGMD (Human Gene Mutation Database, Qiagen, Hilden, Deutschland) sind nur knapp 9 % der Varianten als Spleißvarianten dokumentiert (Abbildung 33), wobei 5,56 % im Bereich der Spleißstellen liegen. Von den im Laufe dieser Arbeit gefundenen Varianten waren 7,42 % der Varianten in Bereichen der Spleißstellen eingestuft worden (Abbildung 32), diese Zahlen sind somit vergleichbar. Dabei ist zu beachten, dass die in dieser Arbeit eingestuften Varianten alle Varianten betreffen und nicht nur pathogene publizierte Mutationen, wie in der HGMD. Die große Diskrepanz zwischen angenommenen Spleißmutationen und den dokumentierten lässt vermuten, dass es noch viele unbekannte Spleißmutationen gibt.

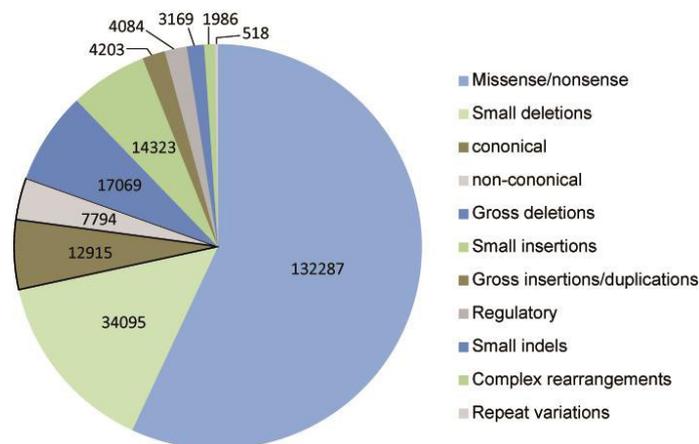


Abbildung 33: Alle Varianten aus der HGMD Version 2018.2. Abgebildet sind die Mutationsarten für alle in der Datenbank enthaltenen Einträge. Die absoluten Zahlen der Mutationen sind angezeigt, die Varianten in kanonischen Spleißstellen und außerhalb sind schwarz umrandet.

Wie diese Arbeit gezeigt hat, gehören zu den möglichen unentdeckten Spleißvarianten nicht nur Varianten, die in den Bereichen der kanonischen Spleißstellen liegen, sondern auch tief-intronische Varianten. Diese Art der Varianten machen in der HGMD nur knapp über 3 % der Varianten aus. Diese intronischen Varianten können zum einen auch das Spleißen an einer kanonischen Spleißstelle beeinflussen, bestehende Exons zum Beispiel verlängern oder verkürzen, zum anderen ganze Pseudoexons in die mRNA hineinspleißen. Die Vorhersagen für diese Varianten sind noch ungenau und nicht verlässlich, werden sich aber mit der Zeit verbessern. Die Analyse bekannter Pseudoexons in *DMD* zeigt, dass auch bei diesen publizierten Mutationen nicht alle Varianten die erwarteten hohen Vorhersage-Werte erhalten

## 5 Fazit und Ausblick

(Abbildung 34). Zwar wird bei vielen Mutationen ein großer Einfluss auf das Spleißen vorhergesagt, aber bei vielen ist der Einfluss auch gering oder es wird ein Verlust einer Spleißstelle vorhergesagt. Deshalb ist in diesen Fällen eine Analyse der mRNA weiterhin nötig. Als Besonderheit bei den Spleißmutationen hat sich gezeigt, dass in allen beschriebenen Fällen ein Rest des Wildtyp-Transkripts vorhanden war. Dieser Rest an Wildtyp-Transkript kann Patienten vor einem schweren Phänotyp bewahren und ist möglicherweise eine Erklärung für die häufig beobachtete Pleiotropie.

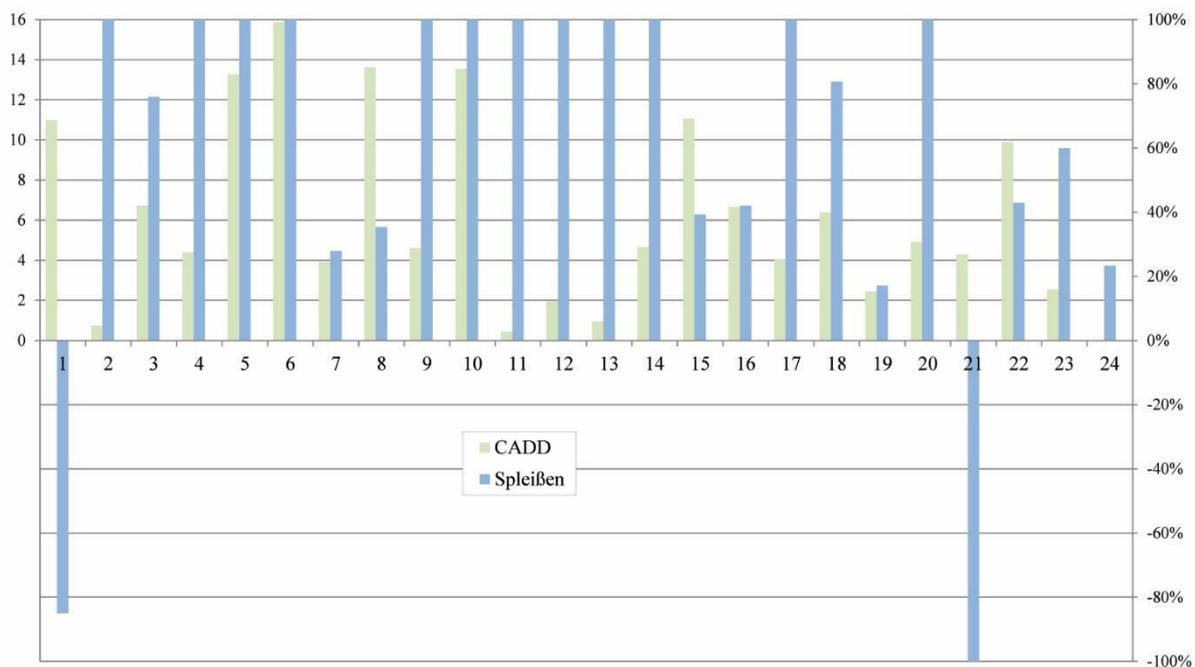


Abbildung 34: CADD-Scores und Einfluss auf das Spleißen für alle DMD-Pseudoexons. Abgebildet sind die Scores für alle DMD-Pseudoexons, die in der HGMD dokumentiert sind, mit der Ausnahme der in dieser Arbeit beschriebenen (siehe auch Abbildung 18). Abgebildet sind nur Varianten, deren Einfluss auf das Spleißverhalten mit mRNA-Analyse nachgewiesen wurde.

Für eine gute humangenetische Diagnostik sollte daher ein so großer Genomanteil, wie finanziell und zeitlich möglich, und ein so kleiner, wie aufgrund der vorangegangenen klinischen Diagnostik nötig, sequenziert werden. Dies entspricht in der aktuellen Praxis dem WES. Diese Diagnostik sollte bei Bedarf durch RNA-Analysen oder MLPAs zur Erhöhung der Detektionsrate ergänzt werden. Dabei sollten mehr Spleißmutationen berücksichtigt werden und diese, falls möglich, häufiger durch RNA-Analysen auf ihre Pathogenität überprüft werden, da diese Mutationsart häufiger ist als gedacht. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Spleißmutationen in bekannten Krankheiten zum Teil noch nicht beschrieben, aber ursächlich sind.

In der Zukunft wird die humangenetische Standard-Diagnostik sehr wahrscheinlich aus WGS bestehen, die durch funktionelle Testung wie RNAseq ergänzt wird. Durch die zusätzlich

## 5 Fazit und Ausblick

gewonnenen Erkenntnisse und genügend beschriebenen Varianten, werden zukünftig die Vorhersagen so genau sein, dass WGS für eine vollständige Diagnostik ausreichend ist.

Tabelle 12: Informationen zu den in Abbildung 34 abgebildeten Pseudoexons.

Nr	Position	Intron	veröffentlicht in	CADD	Splicing
1	c.9225-648A>G	Intron 62	(Beroud et al. 2004)	10,99	-85,02%
2	c.9085-15519G>T	Intron 60		0,744	100,00%
3	c.961-5831C>T	Intron 9		6,715	75,92%
4	c.31+36947G>A	Intron 1		4,391	100,00%
5	c.8217+18052A>G	Intron 55	(Bovolenta et al. 2008)	13,27	100,00%
6	c.8217+32103G>T	Intron 55	(Cummings et al. 2017)	15,88	100,00%
7	c.9362-1215A>G	Intron 64	(Daoud et al. 2009)	3,897	27,94%
8	c.9225-160A>G	Intron 62		13,62	35,37%
9	c.9563+1215A>G	Intron 65	(Deburgrave et al. 2007)	4,61	100,00%
10	c.5326-215T>G	Intron 37	(Gonorazky et al. 2016)	13,54	100,00%
11	c.6913-4037T>G	Intron 47	(Gurvich et al. 2008)	0,442	100,00%
12	c.6614+3310G>T	Intron 45		1,945	100,00%
13	c.1332-11909C>G	Intron 11		0,954	100,00%
14	c.3432+2240A>G	Intron 25	(Ikezawa et al. 1999)	4,653	100,00%
15	c.9224+9192C>A	Intron 62	(Santos et al. 2014)	11,07	39,23%
16	c.9564-427T>G	Intron 65	(Sedlackova et al. 2009)	6,663	41,97%
17	c.265-463A>G	Intron 4		4,023	100,00%
18	c.9807+2714C>T	Intron 67	(Takeshima et al. 2010)	6,374	80,64%
19	c.3787-843C>A	Intron 27		2,443	17,10%
20	c.93+5590T>A	Intron 2		4,905	100,00%
21	c.3603+2053G>C	Intron 26	(Trabelsi et al. 2014)	4,293	-100,00%
22	c.9225-285A>G	Intron 62	(Tuffery-Giraud et al. 2003)	9,897	42,89%
23	c.3432+2036A>G	Intron 25		2,548	59,89%
24	c.961-5925A>C	Intron 9	(Tuffery-Giraud et al. 2005)	0,001	23,36%

## 6 Literaturverzeichnis

- Aartsma-Rus, A., J. C. Van Deutekom, I. F. Fokkema, G. J. Van Ommen, and J. T. Den Dunnen. 2006. 'Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule', *Muscle Nerve*, 34: 135-44.
- Adzhubei, I. A., S. Schmidt, L. Peshkin, V. E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A. S. Kondrashov, and S. R. Sunyaev. 2010. 'A method and server for predicting damaging missense mutations', *Nat Methods*, 7: 248-9.
- Antonellis, A., and E. D. Green. 2008. 'The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases', *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9: 87-107.
- Arber, S., J. J. Hunter, J. Ross, Jr., M. Hongo, G. Sansig, J. Borg, J. C. Perriard, K. R. Chien, and P. Caroni. 1997. 'MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure', *Cell*, 88: 393-403.
- Baskin, B., D. J. Stavropoulos, P. A. Rebeiro, J. Orr, M. Li, L. Steele, C. R. Marshall, E. G. Lemire, K. M. Boycott, W. Gibson, and P. N. Ray. 2014. 'Complex genomic rearrangements in the dystrophin gene due to replication-based mechanisms', *Mol Genet Genomic Med*, 2: 539-47.
- Becker, P. E., and F. Kiener. 1955. '[A new x-chromosomal muscular dystrophy]', *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr*, 193: 427-48.
- Beetz, C., A. O. Nygren, J. Schickel, M. Auer-Grumbach, K. Burk, G. Heide, J. Kassubek, S. Klimpe, T. Klopstock, F. Kreuz, S. Otto, R. Schule, L. Schols, A. D. Sperfeld, O. W. Witte, and T. Deufel. 2006. 'High frequency of partial SPAST deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia', *Neurology*, 67: 1926-30.
- Bentley, D. R., S. Balasubramanian, H. P. Swerdlow, G. P. Smith, J. Milton, C. G. Brown, K. P. Hall, D. J. Evers, C. L. Barnes, H. R. Bignell, J. M. Boutell, J. Bryant, R. J. Carter, R. Keira Cheatham, A. J. Cox, D. J. Ellis, M. R. Flatbush, N. A. Gormley, S. J. Humphray, L. J. Irving, M. S. Karbelashvili, S. M. Kirk, H. Li, X. Liu, K. S. Maisinger, L. J. Murray, B. Obradovic, T. Ost, M. L. Parkinson, M. R. Pratt, I. M. Rasolonjatovo, M. T. Reed, R. Rigatti, C. Rodighiero, M. T. Ross, A. Sabot, S. V. Sankar, A. Scally, G. P. Schroth, M. E. Smith, V. P. Smith, A. Spiridou, P. E. Torrance, S. S. Tzonev, E. H. Vermaas, K. Walter, X. Wu, L. Zhang, M. D. Alam, C. Anastasi, I. C. Aniebo, D. M. Bailey, I. R. Bancarz, S. Banerjee, S. G. Barbour, P. A. Baybayan, V. A. Benoit, K. F. Benson, C. Bevis, P. J. Black, A. Boodhun, J. S. Brennan, J. A. Bridgham, R. C. Brown, A. A. Brown, D. H. Buermann, A. A. Bundu, J. C. Burrows, N. P. Carter, N. Castillo, E. Catenazzi M. Chiara, S. Chang, R. Neil Cooley, N. R. Crake, O. O. Dada, K. D. Diakoumakos, B. Dominguez-Fernandez, D. J. Earnshaw, U. C. Egbujor, D. W. Elmore, S. S. Etchin, M. R. Ewan, M. Fedurco, L. J. Fraser, K. V. Fuentes Fajardo, W. Scott Furey, D. George, K. J. Gietzen, C. P. Goddard, G. S. Golda, P. A. Granieri, D. E. Green, D. L. Gustafson, N. F. Hansen, K. Harnish, C. D. Haudenschild, N. I. Heyer, M. M. Hims, J. T. Ho, A. M. Horgan, K. Hoshler, S. Hurwitz, D. V. Ivanov, M. Q. Johnson, T. James, T. A. Huw Jones, G. D. Kang, T. H. Kerelska, A. D. Kersey, I. Khrebtukova, A. P. Kindwall, Z. Kingsbury, P. I. Kokko-Gonzales, A. Kumar, M. A. Laurent, C. T. Lawley, S. E. Lee, X. Lee, A. K. Liao, J. A. Loch, M. Lok, S. Luo, R. M. Mammen, J. W. Martin, P. G. McCauley, P. McNitt, P. Mehta, K. W. Moon, J. W. Mullens, T. Newington, Z. Ning, B. Ling Ng, S. M. Novo, M. J. O'Neill, M. A. Osborne, A. Osnowski, O. Ostadan, L. L. Paraschos, L. Pickering, A. C. Pike, A. C. Pike, D. Chris Pinkard, D. P. Pliskin, J. Podhasky, V. J. Quijano, C. Racz, V. H. Rae, S. R. Rawlings, A. Chiva Rodriguez, P. M. Roe, J. Rogers, M. C. Rogert Bacigalupo, N. Romanov, A. Romieu, R. K. Roth, N. J. Rourke, S. T. Ruediger, E. Rusman, R. M. Sanches-Kuiper, M. R. Schenker, J. M. Seoane, R. J. Shaw, M. K. Shiver, S. W. Short, N. L. Sizto, J. P. Sluis, M. A. Smith, J. Ernest Sohna Sohna, E. J. Spence, K. Stevens, N. Sutton, L. Szajkowski, C. L. Tregidgo, G. Turcatti, S. Vandevondele, Y. Verhovskiy, S. M. Virk, S. Wakelin, G. C. Walcott, J. Wang, G. J. Worsley, J. Yan, L. Yau, M. Zuerlein, J. Rogers, J. C. Mullikin, M. E. Hurler, N. J. McCooke, J. S. West, F. L. Oaks, P. L. Lundberg,

## 6 Literaturverzeichnis

- D. Klenerman, R. Durbin, and A. J. Smith. 2008. 'Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry', *Nature*, 456: 53-9.
- Berg, Jeremy M., John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto, Lubert Stryer, and Andreas Held. 2018. *Stryer Biochemie* (Springer Spektrum: Berlin [Heidelberg]).
- Beroud, C., A. Carrie, C. Beldjord, N. Deburgrave, S. Llense, N. Carelle, C. Peccate, J. M. Cuisset, F. Pandit, F. Carre-Pigeon, M. Mayer, R. Bellance, D. Recan, J. Chelly, J. C. Kaplan, and F. Leturcq. 2004. 'Dystrophinopathy caused by mid-intronic substitutions activating cryptic exons in the DMD gene', *Neuromuscul Disord*, 14: 10-8.
- Bi, J., W. Wang, Z. Liu, X. Huang, Q. Jiang, G. Liu, Y. Wang, and X. Huang. 2014. 'Seipin promotes adipose tissue fat storage through the ER Ca(2)(+)-ATPase SERCA', *Cell Metab*, 19: 861-71.
- Bienengraeber, M., T. M. Olson, V. A. Selivanov, E. C. Kathmann, F. O'Coilain, F. Gao, A. B. Karger, J. D. Ballew, D. M. Hodgson, L. V. Zingman, Y. P. Pang, A. E. Alekseev, and A. Terzic. 2004. 'ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating', *Nat Genet*, 36: 382-7.
- Boczonadi, V., M. J. Jennings, and R. Horvath. 2018. 'The role of tRNA synthetases in neurological and neuromuscular disorders', *FEBS Lett*, 592: 703-17.
- Bovolenta, M., M. Neri, S. Fini, M. Fabris, C. Trabaneli, A. Venturoli, E. Martoni, E. Bassi, P. Spitali, S. Brioschi, M. S. Falzarano, P. Rimessi, R. Ciccone, E. Ashton, J. McCauley, S. Yau, S. Abbs, F. Muntoni, L. Merlini, F. Gualandi, and A. Ferlini. 2008. 'A novel custom high density-comparative genomic hybridization array detects common rearrangements as well as deep intronic mutations in dystrophinopathies', *BMC Genomics*, 9: 572.
- Brenner, D., R. Yilmaz, K. Muller, T. Grehl, S. Petri, T. Meyer, J. Grosskreutz, P. Weydt, W. Ruf, C. Neuwirth, M. Weber, S. Pinto, K. G. Claeys, B. Schrank, B. Jordan, A. Knehr, K. Gunther, A. Hubers, D. Zeller, A. L. S. network M. N. D. N. E. T. German, C. Kubisch, S. Jablonka, M. Sendtner, T. Klopstock, M. de Carvalho, A. Sperfeld, G. Borck, A. E. Volk, J. Dorst, J. Weis, M. Otto, J. Schuster, K. Del Treddici, H. Braak, K. M. Danzer, A. Freischmidt, T. Meitinger, T. M. Strom, A. C. Ludolph, P. M. Andersen, and J. H. Weishaupt. 2018. 'Hot-spot KIF5A mutations cause familial ALS', *Brain*.
- Brooks, B. R. 1994. 'El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors', *J Neurol Sci*, 124 Suppl: 96-107.
- Brooks, B. R., R. G. Miller, M. Swash, T. L. Munsat, and Diseases World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron. 2000. 'El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis', *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 1: 293-9.
- Carmignac, V., M. A. Salih, S. Quijano-Roy, S. Marchand, M. M. Al Rayess, M. M. Mukhtar, J. A. Urtizbera, S. Labeit, P. Guicheney, F. Leturcq, M. Gautel, M. Fardeau, K. P. Campbell, I. Richard, B. Estournet, and A. Ferreira. 2007. 'C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy', *Ann Neurol*, 61: 340-51.
- Chelly, J., H. Gilgenkrantz, M. Lambert, G. Hamard, P. Chafey, D. Recan, P. Katz, A. de la Chapelle, M. Koenig, I. B. Ginjaar, and et al. 1990. 'Effect of dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker muscular dystrophies', *Cell*, 63: 1239-48.
- Chiba, A., K. Matsumura, H. Yamada, T. Inazu, T. Shimizu, S. Kusunoki, I. Kanazawa, A. Kobata, and T. Endo. 1997. 'Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin', *J Biol Chem*, 272: 2156-62.
- Choi, B. O., M. H. Park, K. W. Chung, H. M. Woo, H. Koo, H. K. Chung, K. G. Choi, K. D. Park, H. J. Lee, Y. S. Hyun, and S. K. Koo. 2013. 'Clinical and histopathological study of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with a novel S90W mutation in BSCL2', *Neurogenetics*, 14: 35-42.
- Clark, M. M., Z. Stark, L. Farnaes, T. Y. Tan, S. M. White, D. Dimmock, and S. F. Kingsmore. 2018. 'Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases', *NPJ Genom Med*, 3: 16.
- Crimella, C., C. Baschiroto, A. Arnoldi, A. Tonelli, E. Tenderini, G. Airoidi, A. Martinuzzi, A. Trabacca, L. Losito, M. Scarlato, S. Benedetti, E. Scarpini, G. Spinicci, N. Bresolin, and M. T.

## 6 Literaturverzeichnis

- Bassi. 2012. 'Mutations in the motor and stalk domains of KIF5A in spastic paraplegia type 10 and in axonal Charcot-Marie-Tooth type 2', *Clin Genet*, 82: 157-64.
- Cummings, B. B., J. L. Marshall, T. Tukiainen, M. Lek, S. Donkervoort, A. R. Foley, V. Bolduc, L. B. Waddell, S. A. Sandaradura, G. L. O'Grady, E. Estrella, H. M. Reddy, F. Zhao, B. Weisburd, K. J. Karczewski, A. H. O'Donnell-Luria, D. Birnbaum, A. Sarkozy, Y. Hu, H. Gonorazky, K. Claeys, H. Joshi, A. Bournazos, E. C. Oates, R. Ghaoui, M. R. Davis, N. G. Laing, A. Topf, Consortium Genotype-Tissue Expression, P. B. Kang, A. H. Beggs, K. N. North, V. Straub, J. J. Dowling, F. Muntoni, N. F. Clarke, S. T. Cooper, C. G. Bonnemann, and D. G. MacArthur. 2017. 'Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing', *Sci Transl Med*, 9.
- Daoud, F., N. Angeard, B. Demerre, I. Martie, R. Benyaou, F. Leturcq, M. Cossee, N. Deburgrave, Y. Saillour, S. Tuffery, A. Urtizberea, A. Toutain, B. Echenne, M. Frischman, M. Mayer, I. Desguerre, B. Estournet, C. Reveillere, Besnier Penisson, J. M. Cuisset, J. C. Kaplan, D. Heron, F. Rivier, and J. Chelly. 2009. 'Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression', *Hum Mol Genet*, 18: 3779-94.
- Davis-Taber, R., W. Choi, J. Feng, L. Hoogenboom, T. McNally, P. Kroeger, C. C. Shieh, R. Simmer, J. D. Brioni, J. P. Sullivan, M. Gopalakrishnan, and V. E. Scott. 2000. 'Molecular characterization of human SUR2-containing K(ATP) channels', *Gene*, 256: 261-70.
- de Souza, P. V. S., W. B. V. de Rezende Pinto, G. N. de Rezende Batistella, T. Bortholin, and A. S. B. Oliveira. 2017. 'Hereditary Spastic Paraplegia: Clinical and Genetic Hallmarks', *Cerebellum*, 16: 525-51.
- Deburgrave, N., F. Daoud, S. Llense, J. C. Barbot, D. Recan, C. Peccate, A. H. Burghes, C. Beroud, L. Garcia, J. C. Kaplan, J. Chelly, and F. Leturcq. 2007. 'Protein- and mRNA-based phenotype-genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene', *Hum Mutat*, 28: 183-95.
- Dent, K. M., D. M. Dunn, A. C. von Niederhausern, A. T. Aoyagi, L. Kerr, M. B. Bromberg, K. J. Hart, T. Tuohy, S. White, J. T. den Dunnen, R. B. Weiss, and K. M. Flanigan. 2005. 'Improved molecular diagnosis of dystrophinopathies in an unselected clinical cohort', *Am J Med Genet A*, 134: 295-8.
- Desmet, F. O., D. Hamroun, M. Lalande, G. Collod-Beroud, M. Claustres, and C. Beroud. 2009. 'Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals', *Nucleic Acids Res*, 37: e67.
- Dhawan, P. S., T. Liewluck, J. Knapik, and M. Milone. 2017. 'Myofibrillar myopathy due to dominant LMNA mutations: A report of two cases', *Muscle Nerve*.
- Ding, L., X. Yang, H. Tian, J. Liang, F. Zhang, G. Wang, Y. Wang, M. Ding, G. Shui, and X. Huang. 2018. 'Seipin regulates lipid homeostasis by ensuring calcium-dependent mitochondrial metabolism', *EMBO J*.
- Duchenne. 1867. 'The Pathology of Paralysis with Muscular Degeneration (Paralysie Myosclerotique), or Paralysis with Apparent Hypertrophy', *Br Med J*, 2: 541-2.
- Flanigan, K. M., D. Dunn, C. A. Larsen, L. Medne, C. B. Bonnemann, and R. B. Weiss. 2011. 'Becker muscular dystrophy due to an inversion of exons 23 and 24 of the DMD gene', *Muscle Nerve*, 44: 822-5.
- Fleming, J. C., E. Tartaglioni, M. P. Steinkamp, D. F. Schorderet, N. Cohen, and E. J. Neufeld. 1999. 'The gene mutated in thiamine-responsive anaemia with diabetes and deafness (TRMA) encodes a functional thiamine transporter', *Nat Genet*, 22: 305-8.
- Gekle, Michael. 2015. *Taschenlehrbuch Physiologie* (Thieme: Stuttgart [u.a.]).
- Goizet, C., A. Boukhris, E. Mundwiller, C. Tallaksen, S. Forlani, A. Toutain, N. Carriere, V. Paquis, C. Depienne, A. Durr, G. Stevanin, and A. Brice. 2009. 'Complicated forms of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia are frequent in SPG10', *Hum Mutat*, 30: E376-85.
- Goldfarb, L. G., K. Y. Park, L. Cervenakova, S. Gorokhova, H. S. Lee, O. Vasconcelos, J. W. Nagle, C. Semino-Mora, K. Sivakumar, and M. C. Dalakas. 1998. 'Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy', *Nat Genet*, 19: 402-3.
- Gonorazky, H., M. Liang, B. Cummings, M. Lek, J. Micallef, C. Hawkins, R. Basran, R. Cohn, M. D. Wilson, D. MacArthur, C. R. Marshall, P. N. Ray, and J. J. Dowling. 2016. 'RNAseq analysis for the diagnosis of muscular dystrophy', *Ann Clin Transl Neurol*, 3: 55-60.

## 6 Literaturverzeichnis

- Goodwin, S., J. D. McPherson, and W. R. McCombie. 2016. 'Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies', *Nat Rev Genet*, 17: 333-51.
- Grantham, R. 1974. 'Amino acid difference formula to help explain protein evolution', *Science*, 185: 862-4.
- Greer, K., K. Mizzi, E. Rice, L. Kuster, R. A. Barrero, M. I. Bellgard, B. J. Lynch, A. R. Foley, O. Rathallaigh E, S. D. Wilton, and S. Fletcher. 2015. 'Pseudoexon activation increases phenotype severity in a Becker muscular dystrophy patient', *Mol Genet Genomic Med*, 3: 320-6.
- Griffin, L. B., R. Sakaguchi, D. McGuigan, M. A. Gonzalez, C. Searby, S. Zuchner, Y. M. Hou, and A. Antonellis. 2014. 'Impaired function is a common feature of neuropathy-associated glycyl-tRNA synthetase mutations', *Hum Mutat*, 35: 1363-71.
- Guelly, C., P. P. Zhu, L. Leonardis, L. Papic, J. Zidar, M. Schabhtl, H. Strohmaier, J. Weis, T. M. Strom, J. Baets, J. Willems, P. De Jonghe, M. M. Reilly, E. Frohlich, M. Hatz, S. Trajanoski, T. R. Pieber, A. R. Janecke, C. Blackstone, and M. Auer-Grumbach. 2011. 'Targeted high-throughput sequencing identifies mutations in atlastin-1 as a cause of hereditary sensory neuropathy type I', *Am J Hum Genet*, 88: 99-105.
- Guiraud, S., A. Aartsma-Rus, N. M. Vieira, K. E. Davies, G. J. van Ommen, and L. M. Kunkel. 2015. 'The Pathogenesis and Therapy of Muscular Dystrophies', *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 16: 281-308.
- Gurvich, O. L., T. M. Tuohy, M. T. Howard, R. S. Finkel, L. Medne, C. B. Anderson, R. B. Weiss, S. D. Wilton, and K. M. Flanigan. 2008. 'DMD pseudoexon mutations: splicing efficiency, phenotype, and potential therapy', *Ann Neurol*, 63: 81-9.
- Hacke, Werner, Klaus Poeck, and Wolfgang Wick. 2016. *Neurologie* (Springer: Berlin Heidelberg).
- Halasz, K., A. Kassner, M. Morgelin, and D. Heinegard. 2007. 'COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis', *J Biol Chem*, 282: 31166-73.
- Hashimoto, Y., M. Shirane, F. Matsuzaki, S. Saita, T. Ohnishi, and K. I. Nakayama. 2014. 'Protrudin regulates endoplasmic reticulum morphology and function associated with the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia', *J Biol Chem*, 289: 12946-61.
- Hastings, P. J., G. Ira, and J. R. Lupski. 2009. 'A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation', *PLoS Genet*, 5: e1000327.
- Hazan, J., N. Fonknechten, D. Mavel, C. Paternotte, D. Samson, F. Artiguenave, C. S. Davoine, C. Cruaud, A. Durr, P. Wincker, P. Brottier, L. Cattolico, V. Barbe, J. M. Burgunder, J. F. Prud'homme, A. Brice, B. Fontaine, B. Heilig, and J. Weissenbach. 1999. 'Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia', *Nat Genet*, 23: 296-303.
- Helderman-van den Enden, A. T., K. Madan, M. H. Breuning, A. H. van der Hout, E. Bakker, C. E. de Die-Smulders, and H. B. Ginjaar. 2013. 'An urgent need for a change in policy revealed by a study on prenatal testing for Duchenne muscular dystrophy', *Eur J Hum Genet*, 21: 21-6.
- Henderson, C. A., C. G. Gomez, S. M. Novak, L. Mi-Mi, and C. C. Gregorio. 2017. 'Overview of the Muscle Cytoskeleton', *Compr Physiol*, 7: 891-944.
- Hoffman, E. P., R. H. Brown, Jr., and L. M. Kunkel. 1987. 'Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus', *Cell*, 51: 919-28.
- Hoffman, E. P., K. H. Fischbeck, R. H. Brown, M. Johnson, R. Medori, J. D. Loike, J. B. Harris, R. Waterston, M. Brooke, L. Specht, and et al. 1988. 'Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy', *N Engl J Med*, 318: 1363-8.
- Hsiao, C. T., P. C. Tsai, C. C. Lin, Y. T. Liu, Y. H. Huang, Y. C. Liao, H. W. Huang, K. P. Lin, B. W. Soong, and Y. C. Lee. 2016. 'Clinical and Molecular Characterization of BSCL2 Mutations in a Taiwanese Cohort with Hereditary Neuropathy', *PLoS One*, 11: e0147677.
- Ibraghimov-Beskrovnya, O., J. M. Ervasti, C. J. Leveille, C. A. Slaughter, S. W. Sernett, and K. P. Campbell. 1992. 'Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix', *Nature*, 355: 696-702.
- Ibraghimov-Beskrovnya, O., A. Milatovich, T. Ozcelik, B. Yang, K. Koepnick, U. Francke, and K. P. Campbell. 1993. 'Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization', *Hum Mol Genet*, 2: 1651-7.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ikezawa, M., I. Nishino, Y. Goto, T. Miike, and I. Nonaka. 1999. 'Newly recognized exons induced by a splicing abnormality from an intronic mutation of the dystrophin gene resulting in Duchenne muscular dystrophy. Mutations in brief no. 213. Online', *Hum Mutat*, 13: 170.
- International Human Genome Sequencing, Consortium. 2004. 'Finishing the euchromatic sequence of the human genome', *Nature*, 431: 931-45.
- Ishmukhametova, A., J. M. Chen, R. Bernard, B. de Massy, F. Baudat, A. Boyer, D. Mechin, D. Thorel, B. Chabrol, M. C. Vincent, P. Khau Van Kien, M. Claustres, and S. Tuffery-Giraud. 2013. 'Dissecting the structure and mechanism of a complex duplication-triplication rearrangement in the DMD gene', *Hum Mutat*, 34: 1080-4.
- Ito, D., and N. Suzuki. 2007. 'Molecular pathogenesis of seipin/BSCL2-related motor neuron diseases', *Ann Neurol*, 61: 237-50.
- . 2009. 'Seipinopathy: a novel endoplasmic reticulum stress-associated disease', *Brain*, 132: 8-15.
- Jae, L. T., M. Raaben, M. Riemersma, E. van Beusekom, V. A. Blomen, A. Velds, R. M. Kerkhoven, J. E. Carette, H. Topaloglu, P. Meinecke, M. W. Wessels, D. J. Lefeber, S. P. Whelan, H. van Bokhoven, and T. R. Brummelkamp. 2013. 'Deciphering the glycosylome of dystroglycanopathies using haploid screens for lassa virus entry', *Science*, 340: 479-83.
- Juan-Mateu, J., L. Gonzalez-Quereda, M. J. Rodriguez, E. Verdura, K. Lazaro, C. Jou, A. Nascimento, C. Jimenez-Mallebrera, J. Colomer, S. Monges, F. Lubieniecki, M. E. Foncuberta, S. I. Pascual-Pascual, J. Molano, M. Baiget, and P. Gallano. 2013. 'Interplay between DMD point mutations and splicing signals in Dystrophinopathy phenotypes', *PLoS One*, 8: e59916.
- Jung, D., B. Yang, J. Meyer, J. S. Chamberlain, and K. P. Campbell. 1995. 'Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan', *J Biol Chem*, 270: 27305-10.
- Kircher, M., D. M. Witten, P. Jain, B. J. O'Roak, G. M. Cooper, and J. Shendure. 2014. 'A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants', *Nat Genet*, 46: 310-5.
- Kley, R. A., M. Olive, and R. Schroder. 2016. 'New aspects of myofibrillar myopathies', *Curr Opin Neurol*, 29: 628-34.
- Klipcan, L., I. Levin, N. Kessler, N. Moor, I. Finarov, and M. Safro. 2008. 'The tRNA-induced conformational activation of human mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase', *Structure*, 16: 1095-104.
- Koenig, M., E. P. Hoffman, C. J. Bertelson, A. P. Monaco, C. Feener, and L. M. Kunkel. 1987. 'Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals', *Cell*, 50: 509-17.
- Kohler, S., N. A. Vasilevsky, M. Engelstad, E. Foster, J. McMurry, S. Ayme, G. Baynam, S. M. Bello, C. F. Boerkoel, K. M. Boycott, M. Brudno, O. J. Buske, P. F. Chinnery, V. Cipriani, L. E. Connell, H. J. Dawkins, L. E. DeMare, A. D. Devereau, B. B. de Vries, H. V. Firth, K. Freson, D. Greene, A. Hamosh, I. Helbig, C. Hum, J. A. Jahn, R. James, R. Krause, F. Laulederkind SJ, H. Lochmuller, G. J. Lyon, S. Ogishima, A. Olry, W. H. Ouweland, N. Pontikos, A. Rath, F. Schaefer, R. H. Scott, M. Segal, P. I. Sergouniotis, R. Sever, C. L. Smith, V. Straub, R. Thompson, C. Turner, E. Turro, M. W. Veltman, T. Vulliamy, J. Yu, J. von Ziegenweidt, A. Zankl, S. Zuchner, T. Zemojtel, J. O. Jacobsen, T. Groza, D. Smedley, C. J. Mungall, M. Haendel, and P. N. Robinson. 2017. 'The Human Phenotype Ontology in 2017', *Nucleic Acids Res*, 45: D865-D76.
- Krawczak, M., J. Reiss, and D. N. Cooper. 1992. 'The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences', *Hum Genet*, 90: 41-54.
- Kress, W., S. Rost, K. Kolokotronis, G. Meng, N. Pluta, and C. Muller-Reible. 2017. 'The Genetic Approach: Next-Generation Sequencing-Based Diagnosis of Congenital and Infantile Myopathies/Muscle Dystrophies', *Neuropediatrics*, 48: 242-46.
- Kumar, V., N. Sami, T. Kashav, A. Islam, F. Ahmad, and M. I. Hassan. 2016. 'Protein aggregation and neurodegenerative diseases: From theory to therapy', *Eur J Med Chem*, 124: 1105-20.
- Lacson, A. G., S. S. Seshia, H. B. Sarnat, J. Anderson, W. R. DeGroot, A. Chudley, C. Adams, H. Z. Darwish, R. B. Lowry, S. Kuhn, and et al. 1994. 'Autosomal recessive, fatal infantile hypertonic muscular dystrophy among Canadian Natives', *Can J Neurol Sci*, 21: 203-12.

## 6 Literaturverzeichnis

- Lassuthova, P., R. Beharka, M. Krutova, J. Neupauerova, and P. Seeman. 2016. 'COX6A1 mutation causes axonal hereditary motor and sensory neuropathy - the confirmation of the primary report', *Clin Genet*, 89: 512-14.
- Lee, J. A., C. M. Carvalho, and J. R. Lupski. 2007. 'A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders', *Cell*, 131: 1235-47.
- Lefter, S., O. Hardiman, and A. M. Ryan. 2017. 'A population-based epidemiologic study of adult neuromuscular disease in the Republic of Ireland', *Neurology*, 88: 304-13.
- Lek, M., K. J. Karczewski, E. V. Minikel, K. E. Samocha, E. Banks, T. Fennell, A. H. O'Donnell-Luria, J. S. Ware, A. J. Hill, B. B. Cummings, T. Tukiainen, D. P. Birnbaum, J. A. Kosmicki, L. E. Duncan, K. Estrada, F. Zhao, J. Zou, E. Pierce-Hoffman, J. Berghout, D. N. Cooper, N. Deflaux, M. DePristo, R. Do, J. Flannick, M. Fromer, L. Gauthier, J. Goldstein, N. Gupta, D. Howrigan, A. Kiezun, M. I. Kurki, A. L. Moonshine, P. Natarajan, L. Orozco, G. M. Peloso, R. Poplin, M. A. Rivas, V. Ruano-Rubio, S. A. Rose, D. M. Ruderfer, K. Shakir, P. D. Stenson, C. Stevens, B. P. Thomas, G. Tiao, M. T. Tusie-Luna, B. Weisburd, H. H. Won, D. Yu, D. M. Altshuler, D. Ardissino, M. Boehnke, J. Danesh, S. Donnelly, R. Elosua, J. C. Florez, S. B. Gabriel, G. Getz, S. J. Glatt, C. M. Hultman, S. Kathiresan, M. Laakso, S. McCarroll, M. I. McCarthy, D. McGovern, R. McPherson, B. M. Neale, A. Palotie, S. M. Purcell, D. Saleheen, J. M. Scharf, P. Sklar, P. F. Sullivan, J. Tuomilehto, M. T. Tsuang, H. C. Watkins, J. G. Wilson, M. J. Daly, D. G. MacArthur, and Consortium Exome Aggregation. 2016. 'Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans', *Nature*, 536: 285-91.
- Li, Q., and K. Wang. 2017. 'InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines', *Am J Hum Genet*, 100: 267-80.
- Lin, B. L., T. Song, and S. Sadayappan. 2017. 'Myofilaments: Movers and Rulers of the Sarcomere', *Compr Physiol*, 7: 675-92.
- Lind, T., F. Tufaro, C. McCormick, U. Lindahl, and K. Lidholt. 1998. 'The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate', *J Biol Chem*, 273: 26265-8.
- Liu, L., Y. Li, S. Li, N. Hu, Y. He, R. Pong, D. Lin, L. Lu, and M. Law. 2012. 'Comparison of next-generation sequencing systems', *J Biomed Biotechnol*, 2012: 251364.
- Lo Giudice, T., F. Lombardi, F. M. Santorelli, T. Kawarai, and A. Orlandi. 2014. 'Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms', *Exp Neurol*, 261: 518-39.
- Lopez-Bigas, N., B. Audit, C. Ouzounis, G. Parra, and R. Guigo. 2005. 'Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease?', *FEBS Lett*, 579: 1900-3.
- Lucioli, S., B. Giusti, E. Mercuri, O. C. Vanegas, L. Lucarini, V. Pietroni, A. Urtizbera, R. Ben Yaou, M. de Visser, A. J. van der Kooi, C. Bonnemant, S. T. Iannaccone, L. Merlini, K. Bushby, F. Muntoni, E. Bertini, M. L. Chu, and G. Pepe. 2005. 'Detection of common and private mutations in the COL6A1 gene of patients with Bethlem myopathy', *Neurology*, 64: 1931-7.
- Lundin, C., R. Nordstrom, K. Wagner, C. Windpassinger, H. Andersson, G. von Heijne, and I. Nilsson. 2006. 'Membrane topology of the human seipin protein', *FEBS Lett*, 580: 2281-4.
- Madden, H. R., S. Fletcher, M. R. Davis, and S. D. Wilton. 2009. 'Characterization of a complex Duchenne muscular dystrophy-causing dystrophin gene inversion and restoration of the reading frame by induced exon skipping', *Hum Mutat*, 30: 22-8.
- Magre, J., M. Delepine, E. Khallouf, T. Gedde-Dahl, Jr., L. Van Maldergem, E. Sobel, J. Papp, M. Meier, A. Megarbane, A. Bachy, A. Verloes, F. H. d'Abronzio, E. Seemanova, R. Assan, N. Baudic, C. Bourrut, P. Czernichow, F. Huet, F. Grigorescu, M. de Kerdanet, D. Lacombe, P. Labrune, M. Lanza, H. Loret, F. Matsuda, J. Navarro, A. Nivelon-Chevalier, M. Polak, J. J. Robert, P. Tric, N. Tubiana-Rufi, C. Vigouroux, J. Weissenbach, S. Savasta, J. A. Maassen, O. Trygstad, P. Bogalho, P. Freitas, J. L. Medina, F. Bonnici, B. I. Joffe, G. Loyson, V. R. Panz, F. J. Raal, S. O'Rahilly, T. Stephenson, C. R. Kahn, M. Lathrop, J. Capeau, and Bsl Working Group. 2001. 'Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13', *Nat Genet*, 28: 365-70.
- Mannan, A. U., P. Krawen, S. M. Sauter, J. Boehm, A. Chronowska, W. Paulus, J. Neesen, and W. Engel. 2006. 'ZFYVE27 (SPG33), a novel spastin-binding protein, is mutated in hereditary spastic paraplegia', *Am J Hum Genet*, 79: 351-7.

## 6 Literaturverzeichnis

- Manya, H., and T. Endo. 2017. 'Glycosylation with ribitol-phosphate in mammals: New insights into the O-mannosyl glycan', *Biochim Biophys Acta*, 1861: 2462-72.
- Manya, H., Y. Yamaguchi, M. Kanagawa, K. Kobayashi, M. Tajiri, K. Akasaka-Manya, H. Kawakami, M. Mizuno, Y. Wada, T. Toda, and T. Endo. 2016. 'The Muscular Dystrophy Gene TMEM5 Encodes a Ribitol beta1,4-Xylosyltransferase Required for the Functional Glycosylation of Dystroglycan', *J Biol Chem*, 291: 24618-27.
- Margulies, M., M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bemben, J. Berka, M. S. Braverman, Y. J. Chen, Z. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L. Alenquer, T. P. Jarvie, K. B. Jirage, J. B. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makhijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E. Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. Yu, R. F. Begley, and J. M. Rothberg. 2005. 'Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors', *Nature*, 437: 376-80.
- Martignoni, M., E. Riano, and E. I. Rugarli. 2008. 'The role of ZFYVE27/protrudin in hereditary spastic paraplegia', *Am J Hum Genet*, 83: 127-8; author reply 28-30.
- Mattle, Heinrich, and Marco Mumenthaler. 2015. *Kurzlehrbuch Neurologie* (Thieme: Stuttgart [u.a.]).
- Metzker, M. L. 2010. 'Sequencing technologies - the next generation', *Nat Rev Genet*, 11: 31-46.
- Meyer-Schuman, R., and A. Antonellis. 2017. 'Emerging mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetase mutations in recessive and dominant human disease', *Hum Mol Genet*, 26: R114-R27.
- Monaco, A. P., C. J. Bertelson, S. Liechti-Gallati, H. Moser, and L. M. Kunkel. 1988. 'An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus', *Genomics*, 2: 90-5.
- Moreland, J. L., A. Gramada, O. V. Buzko, Q. Zhang, and P. E. Bourne. 2005. 'The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications', *BMC Bioinformatics*, 6: 21.
- Murphy, S. M., M. Laura, K. Fawcett, A. Pandraud, Y. T. Liu, G. L. Davidson, A. M. Rossor, J. M. Polke, V. Castleman, H. Manji, M. P. Lunn, K. Bull, G. Ramdharry, M. Davis, J. C. Blake, H. Houlden, and M. M. Reilly. 2012. 'Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83: 706-10.
- Musacchio, T., A. K. Zaum, N. Uceyler, C. Sommer, N. Pfeifroth, K. Reiners, E. Kunstmann, J. Volkmann, S. Rost, and S. Klebe. 2017. 'ALS and MMN mimics in patients with BSCL2 mutations: the expanding clinical spectrum of SPG17 hereditary spastic paraplegia', *J Neurol*, 264: 11-20.
- Nakano, S., A. G. Engel, A. J. Waclawik, A. M. Emslie-Smith, and N. A. Busis. 1996. 'Myofibrillar myopathy with abnormal foci of desmin positivity. I. Light and electron microscopy analysis of 10 cases', *J Neuropathol Exp Neurol*, 55: 549-62.
- Ockeloen, C. W., H. J. Gilhuis, R. Pfundt, E. J. Kamsteeg, P. B. Agrawal, A. H. Beggs, A. Dara Hama-Amin, A. Diekstra, N. V. Knoers, M. Lammens, and N. van Alfen. 2012. 'Congenital myopathy caused by a novel missense mutation in the CFL2 gene', *Neuromuscul Disord*, 22: 632-9.
- Ohlsson, M., C. Hedberg, B. Bradvik, C. Lindberg, H. Tajsharghi, O. Danielsson, A. Melberg, B. Udd, T. Martinsson, and A. Oldfors. 2012. 'Hereditary myopathy with early respiratory failure associated with a mutation in A-band titin', *Brain*, 135: 1682-94.
- Okubo, M., N. Minami, K. Goto, Y. Goto, S. Noguchi, S. Mitsuhashi, and I. Nishino. 2016. 'Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing: validation analysis of DMD mutations', *J Hum Genet*, 61: 483-9.
- Oshima, J., D. B. Magner, J. A. Lee, A. M. Breman, E. S. Schmitt, L. D. White, C. A. Crowe, M. Merrill, P. Jayakar, A. Rajadhyaksha, C. M. Eng, and D. del Gaudio. 2009. 'Regional genomic instability predisposes to complex dystrophin gene rearrangements', *Hum Genet*, 126: 411-23.
- Pareyson, D., P. Saveri, and C. Pisciotta. 2017. 'New developments in Charcot-Marie-Tooth neuropathy and related diseases', *Curr Opin Neurol*, 30: 471-80.
- Patel, H., P. E. Hart, T. T. Warner, R. S. Houlston, M. A. Patton, S. Jeffery, and A. H. Crosby. 2001. 'The Silver syndrome variant of hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 11q12-

## 6 Literaturverzeichnis

- q14, with evidence for genetic heterogeneity within this subtype', *Am J Hum Genet*, 69: 209-15.
- Pertea, M., X. Lin, and S. L. Salzberg. 2001. 'GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction', *Nucleic Acids Res*, 29: 1185-90.
- Reese, M. G., F. H. Eeckman, D. Kulp, and D. Haussler. 1997. 'Improved splice site detection in Genie', *J Comput Biol*, 4: 311-23.
- Richard, P., P. Charron, L. Carrier, C. Ledeuil, T. Cheav, C. Pichereau, A. Benaiche, R. Isnard, O. Dubourg, M. Burban, J. P. Gueffet, A. Millaire, M. Desnos, K. Schwartz, B. Hainque, M. Komajda, and Eurogene Heart Failure Project. 2003. 'Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy', *Circulation*, 107: 2227-32.
- Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W. W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H. L. Rehm, and Acmg Laboratory Quality Assurance Committee. 2015. 'Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology', *Genet Med*, 17: 405-24.
- Rosen, D. R., T. Siddique, D. Patterson, D. A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J. P. O'Regan, H. X. Deng, and et al. 1993. 'Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis', *Nature*, 362: 59-62.
- Rossor, A. M., J. M. Polke, H. Houlden, and M. M. Reilly. 2013. 'Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease', *Nat Rev Neurol*, 9: 562-71.
- Saito-Ohara, F., Y. Fukuda, M. Ito, K. L. Agarwala, M. Hayashi, M. Matsuo, I. Imoto, K. Yamakawa, Y. Nakamura, and J. Inazawa. 2002. 'The Xq22 inversion breakpoint interrupted a novel Ras-like GTPase gene in a patient with Duchenne muscular dystrophy and profound mental retardation', *Am J Hum Genet*, 71: 637-45.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74: 5463-7.
- Santos, R., A. Goncalves, J. Oliveira, E. Vieira, J. P. Vieira, T. Evangelista, T. Moreno, M. Santos, I. Fineza, and E. Bronze-da-Rocha. 2014. 'New variants, challenges and pitfalls in DMD genotyping: implications in diagnosis, prognosis and therapy', *J Hum Genet*, 59: 454-64.
- Schara, Ulrike. 2015. *Klinik und Transition neuromuskulärer Erkrankungen Neuropädiatrie trifft Neurologie* (Springer-Medizin: Berlin Heidelberg).
- Schwarz, J. M., C. Rodelsperger, M. Schuelke, and D. Seelow. 2010. 'MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations', *Nat Methods*, 7: 575-6.
- Sedlackova, J., P. Vondracek, M. Hermanova, J. Zamecnik, Z. Hruby, J. Haberlova, J. Kraus, T. Marikova, P. Hedvicakova, S. Vohanka, and L. Fajkusova. 2009. 'Point mutations in Czech DMD/BMD patients and their phenotypic outcome', *Neuromuscul Disord*, 19: 749-53.
- Selcen, D. 2011. 'Myofibrillar myopathies', *Neuromuscul Disord*, 21: 161-71.
- Selcen, D., M. B. Bromberg, S. S. Chin, and A. G. Engel. 2011. 'Reducing bodies and myofibrillar myopathy features in FHL1 muscular dystrophy', *Neurology*, 77: 1951-9.
- Selcen, D., and A. G. Engel. 1993. 'Myofibrillar Myopathy.' in M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. Stephens and A. Amemiya (eds.), *GeneReviews((R))* (Seattle (WA)).
- Selcen, D., K. Ohno, and A. G. Engel. 2004. 'Myofibrillar myopathy: clinical, morphological and genetic studies in 63 patients', *Brain*, 127: 439-51.
- Semmler, A. L., S. Sacconi, J. E. Bach, C. Liebe, J. Burmann, R. A. Kley, A. Ferbert, R. Anderheiden, P. Van den Bergh, J. J. Martin, P. De Jonghe, E. Neuen-Jacob, O. Muller, M. Deschauer, M. Bergmann, J. M. Schroder, M. Vorgerd, J. B. Schulz, J. Weis, W. Kress, and K. G. Claeys. 2014. 'Unusual multisystemic involvement and a novel BAG3 mutation revealed by NGS screening in a large cohort of myofibrillar myopathies', *Orphanet J Rare Dis*, 9: 121.
- Shapiro, M. B., and P. Senapathy. 1987. 'RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression', *Nucleic Acids Res*, 15: 7155-74.
- Shashi, V., W. L. Golden, P. S. Allinson, S. H. Blanton, C. von Kap-Herr, and T. E. Kelly. 1996. 'Molecular analysis of recombination in a family with Duchenne muscular dystrophy and a large pericentric X chromosome inversion', *Am J Hum Genet*, 58: 1231-8.

## 6 Literaturverzeichnis

- Shirane, M., and K. I. Nakayama. 2006. 'Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking', *Science*, 314: 818-21.
- Shrimpton, A. E., E. M. Levinsohn, J. M. Yozawitz, D. S. Packard, Jr., R. B. Cady, F. A. Middleton, A. M. Persico, and D. R. Hootnick. 2004. 'A HOX gene mutation in a family with isolated congenital vertical talus and Charcot-Marie-Tooth disease', *Am J Hum Genet*, 75: 92-6.
- Silver, J. R. 1966. 'Familial spastic paraplegia with amyotrophy of the hands', *Ann Hum Genet*, 30: 69-75.
- Spuler, Simone. 2004. *Muskelkrankheiten Grundlagen, Diagnostik und Therapie; 45 Tab* (Schattauer: Stuttgart [u.a.]).
- Szklarczyk, D., J. H. Morris, H. Cook, M. Kuhn, S. Wyder, M. Simonovic, A. Santos, N. T. Doncheva, A. Roth, P. Bork, L. J. Jensen, and C. von Mering. 2017. 'The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible', *Nucleic Acids Res*, 45: D362-D68.
- Tajsharghi, H., and A. Oldfors. 2013. 'Myosinopathies: pathology and mechanisms', *Acta Neuropathol*, 125: 3-18.
- Takehima, Y., M. Yagi, Y. Okizuka, H. Awano, Z. Zhang, Y. Yamauchi, H. Nishio, and M. Matsuo. 2010. 'Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center', *J Hum Genet*, 55: 379-88.
- Tamiya, G., S. Makino, M. Hayashi, A. Abe, C. Numakura, M. Ueki, A. Tanaka, C. Ito, K. Toshimori, N. Ogawa, T. Terashima, H. Maegawa, D. Yanagisawa, I. Tooyama, M. Tada, O. Onodera, and K. Hayasaka. 2014. 'A mutation of COX6A1 causes a recessive axonal or mixed form of Charcot-Marie-Tooth disease', *Am J Hum Genet*, 95: 294-300.
- Tasca, G., E. Ricci, S. Penttila, M. Monforte, V. Giglio, P. Ottaviani, G. Camastra, G. Silvestri, and B. Udd. 2012. 'New phenotype and pathology features in MYH7-related distal myopathy', *Neuromuscul Disord*, 22: 640-7.
- Tavtigian, S. V., A. M. Deffenbaugh, L. Yin, T. Judkins, T. Scholl, P. B. Samollow, D. de Silva, A. Zharkikh, and A. Thomas. 2006. 'Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral', *J Med Genet*, 43: 295-305.
- Tessa, A., C. Casali, M. Damiano, C. Bruno, D. Fortini, C. Patrono, F. Cricchi, M. Valoppi, G. Nappi, G. A. Amabile, E. Bertini, and F. M. Santorelli. 2002. 'SPG3A: An additional family carrying a new atlastin mutation', *Neurology*, 59: 2002-5.
- Theile, Ursel. 1976. 'Humangenetik in Klinik und Praxis: I. Teil', *Dtsch Arztebl International*, 73: 2723-8.
- Toda, T., K. Kobayashi, S. Takeda, J. Sasaki, H. Kurahashi, H. Kano, M. Tachikawa, F. Wang, Y. Nagai, K. Taniguchi, M. Taniguchi, Y. Sunada, T. Terashima, T. Endo, and K. Matsumura. 2003. 'Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) and alpha-dystroglycanopathy', *Congenit Anom (Kyoto)*, 43: 97-104.
- Trabelsi, M., C. Beugnet, N. Deburgrave, V. Commere, L. Orhant, F. Leturcq, and J. Chelly. 2014. 'When a mid-intronic variation of DMD gene creates an ESE site', *Neuromuscul Disord*, 24: 1111-7.
- Tran, T. H., Z. Zhang, M. Yagi, T. Lee, H. Awano, A. Nishida, T. Okinaga, Y. Takehima, and M. Matsuo. 2013. 'Molecular characterization of an X(p21.2;q28) chromosomal inversion in a Duchenne muscular dystrophy patient with mental retardation reveals a novel long non-coding gene on Xq28', *J Hum Genet*, 58: 33-9.
- Tuffery-Giraud, S., C. Saquet, S. Chambert, and M. Claustres. 2003. 'Pseudoexon activation in the DMD gene as a novel mechanism for Becker muscular dystrophy', *Hum Mutat*, 21: 608-14.
- Tuffery-Giraud, S., C. Saquet, D. Thorel, A. Disset, F. Rivier, S. Malcolm, and M. Claustres. 2005. 'Mutation spectrum leading to an attenuated phenotype in dystrophinopathies', *Eur J Hum Genet*, 13: 1254-60.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, and S. G. Rozen. 2012. 'Primer3--new capabilities and interfaces', *Nucleic Acids Res*, 40: e115.
- Vantroys, E., A. Larson, M. Friederich, K. Knight, M. A. Swanson, C. A. Powell, J. Smet, S. Vergult, B. De Paepe, S. Seneca, H. Roeyers, B. Menten, M. Minczuk, A. Vanlander, J. Van Hove, and R. Van Coster. 2017. 'New insights into the phenotype of FARS2 deficiency', *Mol Genet Metab*, 122: 172-81.

## 6 Literaturverzeichnis

- Vaser, R., S. Adusumalli, S. N. Leng, M. Sikic, and P. C. Ng. 2016. 'SIFT missense predictions for genomes', *Nat Protoc*, 11: 1-9.
- Vaz-Drago, R., N. Custodio, and M. Carmo-Fonseca. 2017. 'Deep intronic mutations and human disease', *Hum Genet*, 136: 1093-111.
- Vernon, H. J., R. McClellan, D. A. Batista, and S. Naidu. 2015. 'Mutations in FARS2 and non-fatal mitochondrial dysfunction in two siblings', *Am J Med Genet A*, 167A: 1147-51.
- Vuillaumier-Barrot, S., C. Bouchet-Seraphin, M. Chelbi, L. Devisme, S. Quentin, S. Gazal, A. Laquerriere, C. Fallet-Bianco, P. Loget, S. Odent, D. Carles, A. Bazin, J. Aziza, A. Clemenson, F. Guimiot, M. Bonniere, S. Monnot, C. Bole-Feysot, J. P. Bernard, L. Loeuillet, M. Gonzales, K. Socha, B. Grandchamp, T. Attie-Bitach, F. Encha-Razavi, and N. Seta. 2012. 'Identification of mutations in TMEM5 and ISPD as a cause of severe cobblestone lissencephaly', *Am J Hum Genet*, 91: 1135-43.
- Wang, G. S., and T. A. Cooper. 2007. 'Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery', *Nat Rev Genet*, 8: 749-61.
- Windpassinger, C., M. Auer-Grumbach, J. Irobi, H. Patel, E. Petek, G. Horl, R. Malli, J. A. Reed, I. Dierick, N. Verpoorten, T. T. Warner, C. Proukakis, P. Van den Bergh, C. Verellen, L. Van Maldergem, L. Merlini, P. De Jonghe, V. Timmerman, A. H. Crosby, and K. Wagner. 2004. 'Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome', *Nat Genet*, 36: 271-6.
- Windpassinger, C., K. Wagner, E. Petek, R. Fischer, and M. Auer-Grumbach. 2003. 'Refinement of the Silver syndrome locus on chromosome 11q12-q14 in four families and exclusion of eight candidate genes', *Hum Genet*, 114: 99-109.
- Winter, L., M. Turk, P. N. Harter, M. Mittelbronn, C. Kornblum, F. Norwood, H. Jungbluth, C. T. Thiel, U. Schlotzer-Schrehardt, and R. Schroder. 2016. 'Downstream effects of plectin mutations in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy', *Acta Neuropathol Commun*, 4: 44.
- Xu, D., and Y. Zhang. 2009. 'Generating triangulated macromolecular surfaces by Euclidean Distance Transform', *PLoS One*, 4: e8140.
- Xu, Y., H. Wang, B. Xiao, W. Wei, Y. Liu, H. Ye, X. Ying, Y. Chen, X. Liu, X. Ji, and Y. Sun. 2018. 'Novel noncontiguous duplications identified with a comprehensive mutation analysis in the DMD gene by DMD gene-targeted sequencing', *Gene*, 645: 113-18.
- Yang, Y., W. Liu, Z. Fang, J. Shi, F. Che, C. He, L. Yao, E. Wang, and Y. Wu. 2016. 'A Newly Identified Missense Mutation in FARS2 Causes Autosomal-Recessive Spastic Paraplegia', *Hum Mutat*, 37: 165-9.
- Yeo, G., and C. B. Burge. 2004. 'Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals', *J Comput Biol*, 11: 377-94.
- Yokoyama-Kobayashi, M., T. Yamaguchi, S. Sekine, and S. Kato. 1999. 'Selection of cDNAs encoding putative type II membrane proteins on the cell surface from a human full-length cDNA bank', *Gene*, 228: 161-7.
- Zaum, A. K., K. Kolokotronis, W. Kress, H. H. Goebel, S. Rost, and J. Seeger. 2018. 'A new case expanding the mutation and phenotype spectrum of TMEM5-related alpha-dystroglycanopathy', *Neuromuscul Disord*, 28: 671-74.
- Zaum, A. K., B. Stuve, A. Gehrig, H. Kolbel, U. Schara, W. Kress, and S. Rost. 2017. 'Deep intronic variants introduce DMD pseudoexon in patient with muscular dystrophy', *Neuromuscul Disord*, 27: 631-34.
- Zerbino, D. R., P. Achuthan, W. Akanni, M. R. Amode, D. Barrell, J. Bhai, K. Billis, C. Cummins, A. Gall, C. G. Giron, L. Gil, L. Gordon, L. Haggerty, E. Haskell, T. Hourlier, O. G. Izuogu, S. H. Janacek, T. Juettemann, J. K. To, M. R. Laird, I. Lavidas, Z. Liu, J. E. Loveland, T. Maurel, W. McLaren, B. Moore, J. Mudge, D. N. Murphy, V. Newman, M. Nuhn, D. Ogeh, C. K. Ong, A. Parker, M. Patricio, H. S. Riat, H. Schuilenburg, D. Sheppard, H. Sparrow, K. Taylor, A. Thormann, A. Vullo, B. Walts, A. Zadissa, A. Frankish, S. E. Hunt, M. Kostadima, N. Langridge, F. J. Martin, M. Muffato, E. Perry, M. Ruffier, D. M. Staines, S. J. Trevanion, B. L. Aken, F. Cunningham, A. Yates, and P. Flicek. 2018. 'Ensembl 2018', *Nucleic Acids Res*, 46: D754-D61.
- Zhang, M. Q. 1998. 'Statistical features of human exons and their flanking regions', *Hum Mol Genet*, 7: 919-32.

## 6 Literaturverzeichnis

Zhou, H., X. Lei, T. Benson, J. Mintz, X. Xu, R. B. Harris, N. L. Weintraub, X. Wang, and W. Chen. 2015. 'Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 regulates adipocyte lipolysis, browning, and energy balance in adult animals', *J Lipid Res*, 56: 1912-25.

## 7 Internet-Quellen und Datenbanken

### 7.1 Internet-Quellen

#### ILLUMINA (San Diego, CA, USA)

##### Nextera DNA Library Prep Reference Guide

[https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/samplepreps\\_nextera/nexteradna/nextera-dna-library-prep-reference-guide-15027987-01.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nexteradna/nextera-dna-library-prep-reference-guide-15027987-01.pdf)

Zugriff am: 12. Juli 2018

##### TruSight Exome, Data Sheet

[https://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet\\_trusight\\_exome.pdf](https://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_trusight_exome.pdf)

Zugriff am 16. Juli 2018

##### TruSight One, Data Sheet

[https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet\\_trusight\\_one\\_panel.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_trusight_one_panel.pdf)

Zugriff am 16. Juli 2018

##### TruSight One Sequencing Panel Reference Guide

[https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/trusight\\_one/trusight-one-sequencing-panel-reference-guide-15046431-03.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/trusight_one/trusight-one-sequencing-panel-reference-guide-15046431-03.pdf)

Zugriff am 16. Juli 2018

##### Nextera Rapid Capture Enrichment Reference Guide

[https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/samplepreps\\_nextera/nexterarapidcapture/nextera-rapid-capture-enrichment-guide-15037436-01.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nexterarapidcapture/nextera-rapid-capture-enrichment-guide-15037436-01.pdf)

Zugriff am 16. Juli 2018

#### ALAMUT VISUAL (Interactive Biosoftware, Rouen, Frankreich)

##### Alamut Visual 2.10 User Manual

##### *In-silico* predictions, Splicing Module

[https://www.interactive-biosoftware.com/doc/alamut-visual/2.10/splicing.html#exon\\_set](https://www.interactive-biosoftware.com/doc/alamut-visual/2.10/splicing.html#exon_set)

Zugriff am 21.09.2018

## 7 Internet-Quellen und Datenbanken

*In-silico* predictions, Missense-predictions

<https://www.interactive-biosoftware.com/doc/alamut-visual/2.10/missense-pred.html>

Zugriff am 21.09.2018

## 7.2 Datenbanken

gnomAD browser beta

<http://gnomad.broadinstitute.org>

Muscle gene table

<http://www.muscle.genetable.fr>

HGMD (Human Gene Mutation Database)

<https://portal.biobase-international.com>

HPO (Human Phenotype Ontology)

<http://www.human-phenotype-ontology.org>

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)

<https://omim.org>

CADD (Combined Annotation Dependent Depletion)

<https://cadd.gs.washington.edu>

InterVar

<http://wintervar.wglab.org>

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Ensembl

<http://www.ensembl.org/index.html>

Uniprot

<https://www.uniprot.org/>

Cardiovascular Genetics and Genomic Group, Royal Brompton & Harefield NHS Trust

<https://www.cardiodb.org/titin/>

## 8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMP	Association for Molecular Pathology
Array-CGH	Array-based Comparative Genomic Hybridisation
ARs	Aminoacyl-tRNA-Synthetasen
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMD	Becker-Muskeldystrophie
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CADD	Combined Annotation Dependent Depletion
CK	Creatin-Kinase
CMT	Charcot-Marie Tooth Erkrankungen
CNV	Kopienzahl-Variation (copy number variation)
DGC	Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes
dHMN	Distale hereditäre motorische Neuropathie
DMD	Duchenne-Muskeldystrophie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre (complementary) DNA
gDNA	genomische DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FTDALS1	Frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis
G	Guanin
GRCh37/38	Genome Reference Consortium Human Build 37/38
H <sub>2</sub> O	Wasser
HGMD	Human Gene Mutation Database
HMERF	Hereditary myopathy with early respiratory failure
HMN	Hereditäre motorische Neuropathie
HMSN	Hereditäre motorisch-sensorische Neuropathie
HNPP	Hereditäre Neuropathie mit Druckparese

## 8 Abkürzungsverzeichnis

HPO	Human Phenotype Ontology
HSAN	Hereditäre sensorische und autonome Neuropathie
IQ	Intelligenzquotient
MAF	Minor Allele Frequency
MFM	Myofibrilläre Myopathien
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
MMN	Multifokalen motorischen Neuropathie
MN	Motoneuron
MRT	Magnetresonanztomographie
NFE	Nicht-Finnische Europäer
NGS	Next-Generation Sequencing
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNP	Polyneuropathien
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger-RNA
tRNA	Transfer-RNA
SNV	Einzelnukleotid-Variation (Single Nucleotide Variation)
SPG	Spastische Paraplegien
T	Thymin
UTR	Untranslatierte Region
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der vier NGS-Sequenzier-Schritte.....	3
Abbildung 2: Skizzierte Darstellung einer Nervenzelle.....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines quergestreiften Muskels..	6
Abbildung 4: Skizzierte Darstellung des Verlaufes des ersten und zweiten Motoneurons. ....	7
Abbildung 5: Mutationsspektrum in <i>DMD</i> . ....	11
Abbildung 6: Schema zum systematischen Einstufen von Varianten.....	21
Abbildung 7: Stammbäume der untersuchten Neuropathie-Familien.....	22
Abbildung 8: NGS-Daten aus GensearchNGS für <i>BSCL2</i> .....	24
Abbildung 9: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung von <i>BSCL2</i> . ....	25
Abbildung 10: Proteinstruktur von <i>FARS2</i> .....	33
Abbildung 11: <i>In-Silico</i> Vorhersagen aus Alamut Visual für die Variante <i>COX6A1:c.103+1G&gt;C</i> in <i>SPG_13</i> . ....	35
Abbildung 12: Einteilung der kompletten mRNA des <i>DMD</i> -Gens in 15 überlappende Fragmente.....	38
Abbildung 13: RT-PCR-Produkt des Fragments der Exons 6 – 12 in <i>DMD</i> . ....	39
Abbildung 14: Elektropherogramme der cDNA-Sequenzierung des vergrößerten Fragments der Exons 6 – 12 in <i>DMD</i> .....	39
Abbildung 15: Spleißstellen-Vorhersagen und Spleißverhalten im Intron 7 in <i>DMD</i> .....	40
Abbildung 16: Elektropherogramme der cDNA-Sequenzierung des vergrößerten Fragments der Exons 60 – 66 in <i>DMD</i> .....	42
Abbildung 17: Spleißstellen-Vorhersagen und Spleißverhalten im Intron 62 in <i>DMD</i> .....	43
Abbildung 18: Grafische Darstellung der untersuchten tief-intronischen Varianten in <i>DMD</i>	45
Abbildung 19: Spleißstellen-Vorhersageprogramme aus Alamut Visual für die tief-intronischen <i>DMD</i> -Varianten. ....	46
Abbildung 20: Abdeckung des <i>DMD</i> -Gens..	46
Abbildung 21: Alignment an Beginn und Ende der Deletion im Intron 44 in <i>DMD</i> .....	47
Abbildung 22: Schematische Darstellung der perizentrischen Inversion. ....	48
Abbildung 23: Sanger-Sequenzierung der Inversionsbruchpunkte.....	49
Abbildung 24: Alignment der Bruchpunkte der perizentrischen Inversion..	50
Abbildung 25: <i>In-silico</i> Spleißstellen-Vorhersageprogramme aus Alamut Visual für die <i>TMEM5</i> -Variante..	53
Abbildung 26: Ergebnisse der <i>TMEM5</i> -mRNA des Patienten und einer gesunden Kontrolle.	53

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 27: Verteilung der Mutationen in <i>TMEM5</i> und funktionelle Domänen.....	55
Abbildung 28: Übersicht über untersuchte Spleißvariationen. ....	59
Abbildung 29:Stufenschema zur Identifizierung von kausalen Varianten in MFM-Patienten	60
Abbildung 30: Mengendiagramm der untersuchten Gene in den drei Stufen.....	64
Abbildung 31: Schematische Darstellung der Datenmenge bei Whole Genome Sequencing, Whole Exome Sequencing und Panel-Sequenzierung.. ....	66
Abbildung 32: Anteil der eingestuften Varianten. ....	67
Abbildung 33: Alle Varianten aus der HGMD Version 2018.2.....	68
Abbildung 34: CADD-Scores und Einfluss auf das Spleißen für alle DMD-Pseudoexons.....	69

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Nextera Anreicherungen .....	17
Tabelle 2: Unterschiede zwischen TruSight One Protokoll und Nextera Rapid Capture Protokoll.....	18
Tabelle 3: 54 untersuchte Gene, die mit dHMN, ALS und CMT assoziiert sind und im TruSight Exome enthalten sind. ....	24
Tabelle 4: Übersicht über die gefundenen Varianten in verschiedenen Modifier-Suchläufen und die zugehörigen Filtereinstellungen. ....	28
Tabelle 5: Die vier unterschiedlichen Varianten aus den fünf Modifier-Suchläufen. ....	29
Tabelle 6: Untersuchte SPG-Fälle.....	31
Tabelle 7: Variantenübersicht der untersuchten SPG-Fälle .....	36
Tabelle 8: Untersuchte DMD-Fälle ohne Kontrollen.....	42
Tabelle 9: Bisher veröffentlichte Mutationen in <i>TMEM5</i> . ....	54
Tabelle 10: Übersicht über analysierte Spleißvarianten.....	56
Tabelle 11: Varianten der 10 MFM-Patienten. ....	61
Tabelle 12: Informationen zu den in Abbildung 34 abgebildeten Pseudoexons.....	70

## 11 Liste der Publikationen

### 11.1 Anlage 1

ALS and MMN mimics in patients with *BSCL2* mutations: the expanding clinical spectrum of SPG17 hereditary spastic paraplegia

*Thomas Musacchio\**, ***Ann-Kathrin Zaum\****, *Nurcan Üçeyler, Claudia Sommer, Nora Pfeifroth, Karlheinz Reiners, Erdmute Kunstmann, Jens Volkmann, Simone Rost\**, *Stephan Klebe\**

\* These authors contributed equally to this work

Journal of Neurology, January 2017, Volume 264, Issue 1, pp 11–20  
DOI: 10.1007/s00415-016-8301-2

### 11.2 Anlage 2

Deep intronic variants introduce *DMD* pseudoexon in patient with muscular dystrophy

***Ann-Kathrin Zaum***, *Burkhard Stüve, Andrea Gehrig, Heike Kölbl, Ulrike Schara, Wolfram Kress, Simone Rost*

Neuromuscular Disorders, July 2017, Volume 27, Issue 7, Pages 631-634  
DOI: 10.1016/j.nmd.2017.04.003

### 11.3 Anlage 3

A new case expanding the mutation and phenotype spectrum of *TMEM5*-related alpha-dystroglycanopathy

***Ann-Kathrin Zaum***, *Konstantinos Kolokotronis, Wolfram Kress, Hans-Hilmar Goebel, Simone Rost, Jürgen Seeger*

Neuromuscular Disorders, August 2018, Volume 28, Issue 8, Pages 671-674  
DOI: 10.1016/j.nmd.2018.06.006

## 11.4 Anlage 4

A wider spectrum of candidate genes and expanded phenotype for myofibrillar myopathies

*Ann-Kathrin Zaum, Simone Rost, Sabrina Sacconi, Roland Anderheiden, Anna-Lena Semmler, Kristl G. Claeys, Wolfram Kress*

BMC Musculoskeletal Disorders 2018 [Submitted]

## 12 Sonderdrucke der Publikationen

### 12.1 Anlage 1

ALS and MMN mimics in patients with BSCL2 mutations: the expanding clinical spectrum of SPG17 hereditary spastic paraplegia

Thomas Musacchio\*, **Ann-Kathrin Zaum\***, Nurcan Üçeyler, Claudia Sommer, Nora Pfeifroth, Karlheinz Reiners, Erdmute Kunstmann, Jens Volkmann, Simone Rost\*, Stephan Klebe\*

\* These authors contributed equally to this work

DOI: 10.1007/s00415-016-8301-2

## 12.2 Anlage 2

Deep intronic variants introduce DMD pseudoexon in patient with muscular dystrophy

**Ann-Kathrin Zaum**, Burkhard Stüve, Andrea Gehrig, Heike Kölbel, Ulrike Schara, Wolfram Kress, Simone Rost

DOI: 10.1016/j.nmd.2017.04.003

## 12.3 Anlage 3

A new case expanding the mutation and phenotype spectrum of TMEM5-related alpha-dystroglycanopathy

**Ann-Kathrin Zaum**, Konstantinos Kolokotronis, Wolfram Kress, Hans-Hilmar Goebel, Simone Rost, Jürgen Seeger

DOI: 10.1016/j.nmd.2018.06.006

## 12.4 Anlage 4

A wider spectrum of candidate genes and expanded phenotype for myofibrillar myopathies

**Ann-Kathrin Zaum**, Simone Rost, Sabrina Sacconi, Roland Anderheiden, Anna-Lena Semmler, Kristl G. Claeys, Wolfram Kress

BMC Musculoskeletal Disorders 2018 [Submitted]

1 **A wider spectrum of candidate genes and expanded phenotype of**  
2 **myofibrillar myopathies**

3 Ann-Kathrin Zaum, Simone Rost, Sabrina Sacconi, Roland Anderheiden, Anna-Lena  
4 Semmler, Kristl G. Claeys, Wolfram Kress

5

6 Ann-Kathrin Zaum: ann-kathrin.zaum@uni-wuerzburg.de, corresponding author

7 Department of Human Genetics, University of Würzburg, Würzburg, Germany

8

9 Simone Rost: simone.rost@biozentrum.uni-wuerzburg.de

10 Department of Human Genetics, University of Würzburg, Würzburg, Germany

11

12 Sabrina Sacconi: SACCONI.S@chu-nice.fr

13 Peripheral Nervous System, Muscle and ALS Department, Nice University Hospital,

14 Université Côte d'Azur, Nice, France

15 Faculty of Medicine, Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), INSERM

16 U1081, CNRS UMR 7284, Université Côte d'Azur (UCA), Nice, France

17

18 Roland Anderheiden: roland.anderheiden@klinikum-bayreuth.de

19 Department of Neurology, Klinik Hohe Warte Bayreuth, Bayreuth, Germany

20 Department of Neurology, Klinikum Merzig, Merzig, Germany

21

22 Anna-Lena Semmler: anna.semmler@rwth-aachen.de

23 Institute of Neuropathology, RWTH University Aachen, Aachen, Germany

24

25 Kristl G. Claeys: kristl.claeys@uzleuven.be

26 Department of Neurology, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium

27 Laboratory for Muscle Diseases and Neuropathies, KU Leuven, Leuven, Belgium

28

29 Wolfram Kress: wkress@biozentrum.uni-wuerzburg.de

30 Department of Human Genetics, University of Würzburg, Würzburg, Germany

31

## 32 **Abstract**

### 33 **Background:**

34 Myofibrillar myopathies are a group of rare inherited myopathies that show characteristic  
35 pathological features of disintegration of myofibrillar structures. Although 13 genes are  
36 known to cause myofibrillar myopathy, in 50 % of patients no mutation is discovered. As  
37 myofibrillar myopathies are heterogeneous diseases, we aimed to find new candidate genes  
38 for myofibrillar myopathies in known muscle genes to expand the phenotypic and genetic  
39 spectrum.

### 40 **Methods:**

41 We performed next-generation sequencing of 4811 disease-causing genes in ten patients with  
42 clinical diagnosis of myofibrillar myopathy. Variants in genes associated with muscle  
43 disorders were analysed in three successive steps.

### 44 **Results:**

45 We identified several likely disease-causing mutations. Three variants were known  
46 pathogenic mutations in other diseases: variants in *ABCC9* and *MYH7* are known to cause  
47 cardiomyopathy and a variant in *COL6A1* was found at the same position as a known  
48 mutation causative of Bethlem myopathy. Additionally, we found variants in genes associated  
49 with neurological disorders that are likely disease-causing. The analysis in three consecutive  
50 steps proved to be most effective and produced fast and thorough results.

### 51 **Conclusion:**

52 The data suggest that known disease-causing genes might contribute to the myofibrillar  
53 myopathy phenotype that have not been connected to the disease before. There is evidence  
54 that mutations in other genes, causing cardiomyopathy and neuropathy might contribute to the  
55 myofibrillar myopathy phenotype, as known variants for cardiomyopathies and collagen-VI-  
56 myopathies were found in patients suffering from myofibrillar myopathy. Therefore,  
57 clinicians should consider testing for other myopathy or even neuropathy related genes in  
58 patients without genetic mutations in myofibrillar myopathy genes.

### 59 **Keywords**

60 Myofibrillar myopathy, candidate genes, next-generation sequencing, cardiomyopathy,  
61 myopathy, neuropathy

### 62 **Background**

63 Myofibrillar myopathies (MFM) are a heterogeneous group of rare inherited myopathies. In  
64 1996, Nakano et al. established the term “myofibrillar myopathy”, for a group of diseases  
65 displaying disintegration of myofibrillar structures and aggregates of myofibrillar proteins  
66 originating from the Z-disc that can be detected by electron microscopy (1-3). These  
67 morphological abnormalities are characteristic for MFM.

68 The most common clinical feature is slowly progressive muscle weakness, which can be  
69 predominantly proximal or distal. Distal muscle weakness is often more pronounced.  
70 Furthermore, some patients suffer additionally from respiratory insufficiency, cardiac  
71 involvement or peripheral neuropathy (4). The onset of disease is variable and ranges from  
72 seven to 77 years of age, with most disease cases starting in adulthood (5).

73 The most prominent mode of inheritance in MFM is autosomal dominant transmission. The  
74 only exceptions are *PLEC* mutations causing epidermolysis bullosa simplex with muscular  
75 dystrophy, which are inherited autosomal recessively, and *FHL1* mutations that are associated  
76 with different types of X-linked myopathies. For some genes (*CRYAB*, *DES*, *MYOT*)

77 autosomal dominant as well as recessive inheritance is described (6-9). Until today, 13  
78 different disease-causing genes have been described (Table 1).

79 **Table 1: Disease causing genes for MFM.**

Gene	OMIM	Reference
<i>ACTA1</i>	* 102610	(10)
<i>BAG3</i>	* 603883	(11)
<i>CRYAB</i>	* 123590	(12)
<i>DES</i>	* 125660	(7)
<i>DNAJB6</i>	* 611332	(13)
<i>FHL1</i>	* 300163	(14)
<i>FLNC</i>	* 102565	(15)
<i>HSPB8</i>	* 608014	(16)
<i>LMNA</i>	* 150330	(17)
<i>LDB3</i>	* 605906	(18)
<i>MYOT</i>	* 604103	(19)
<i>PLEC</i>	* 601282	(20)
<i>TTN</i>	* 188840	(21)

80 However, still around 50 % of MFM patients remain without genetic diagnosis (4, 6).

81 In the present study, we analysed ten patients who were referred to us with the clinico-  
82 pathological diagnosis of MFM without genetic diagnosis thus far. Most patients were  
83 previously analysed using Sanger sequencing and next-generation sequencing (NGS) but no  
84 causative mutation could be identified (4). The aim was to follow up the previous study  
85 results using latest sequencing techniques and to expand the genetic spectrum of MFM to  
86 disease-causing genes not yet connected to the MFM phenotype.

## 87 **Methods**

88 For molecular diagnosis, DNA of ten MFM patients was isolated from whole blood. All of  
89 them were previously analysed for different MFM genes (*BAG3*, *CRYAB*, *DES*, *DNAJB6*,  
90 *FHL1*, *FLNC*, *LDB3*, *MYOT*) using target enrichment and emulsion PCR (4), but no causative  
91 mutation could be identified. We now enriched genomic DNA using the TruSight One panel

92 (Illumina, San Diego, California) consisting of 4811 disease associated genes and sequenced  
93 the prepared libraries on a NextSeq500 sequencer (Illumina).

94 We electronically analysed all patients in three stages (Figure 1) using GensearchNGS  
95 (PhenoSystems SA, Wallonia, Belgium):

96 First (S1) we only considered severe variants (canonical splice site, nonsense or frameshift  
97 mutations) in 144 genes related to “myopathy” in the human phenotype ontology (HPO) (22)  
98 which presented with a minor allele frequency (MAF) below 2 % in the general population. In  
99 the second stage (S2) we filtered for all variants with a MAF < 2 % in genes that have been  
100 reported to be associated with MFM thus far (*ACTA1*, *BAG3*, *CRYAB*, *DES*, *DNAJB6*, *FHL1*,  
101 *FLNC*, *HSPB8*, *LDB3*, *MYOT*, *PLEC*, *TTN*) and two candidate genes (*CFL2*, *CSRP3*). *CFL2*  
102 has been associated with myofibrillar symptoms (23) and *CSRP3* showed myofibrillar  
103 disorganisation in mice (24). In the final stage (S3) all variants in more than 350 genes related  
104 to muscle disorders (muscle.genetable.fr) with a MAF < 2 % and excluding untranslated  
105 regions were analysed. Only 20 bp of the adjacent intronic sequences of exons were  
106 considered.

107 All variants were evaluated using the Alamut Visual software (Interactive Biosoftware,  
108 Rouen, France) and incorporated tools.

## 109 **Results**

110 The most convincing variants for each patient regarding pathogenicity and phenotype are  
111 summarised in Table 2. All variants were classified based on the ACMG criteria (25) using  
112 InterVar (26).

### 113 **Patient 01**

114 The most promising variant of patient 01 is a heterozygous missense variation in *FLNC*  
115 (NM\_001458.4(FLNC):c.6595G>A, p.(Gly2199Arg)). This variant was already reported in  
116 Semmler et al. (F20.1) (4). *In-silico* prediction tools are inconsistent concerning the  
117 pathogenicity of the variant: PolyPhen2 (27) and AlignGVGD (28) predict a low or no impact

118 on protein function, whereas SIFT (29) and MutationTaster (30) calculate a deleterious effect  
119 with high likelihoods. The variation has a low allele frequency in the general population  
120 (MAF < 0.004 %) and occurs in a highly conserved region of an intradomain insert that  
121 mediates the connection to the Z-disc (31).

#### 122 **Patient 02**

123 A noticeable and frequently published variant found in patient 02 is a frameshift variant in  
124 *ABCC9* (NM\_005691.3(*ABCC9*):c.4570\_4572delinsAAAT, p.(Leu1524Lysfs\*5)). *ABCC9* is  
125 an ATP-sensitive potassium channel and this rare variant changes the structure of the  
126 nucleotide-binding domain, inhibiting the regulation of the pore. The mutation was described  
127 in patients with dilated cardiomyopathy, without skeletal muscle involvement (32, 33).

#### 128 **Patient 03**

129 Patient 03 has a heterozygous *GNE* variation (NM\_001128227.2(*GNE*):c.1691G>A,  
130 p.(Gly564Glu)), but no additional variation in *GNE*. The *GNE* variation is predicted to be  
131 pathogenic by *in-silico* prediction tools (AlignGVGD, SIFT, MutationTaster, PolyPhen) and  
132 occurs rarely in the general population (MAF < 0.009 %). The *GNE* gene is involved in the  
133 pathology of Nonaka myopathy (OMIM: # 605820) an autosomal recessive disease that is a  
134 known differential diagnosis to MFM (34).

#### 135 **Patient 04**

136 Patient 04 has a heterozygous frameshift mutation in *ATL1* (NM\_015915.4(*ATL1*):c.292del,  
137 p.(Asp98Ilefs\*10)). Mutations in *ATL1* are associated with hereditary sensory neuropathy  
138 type ID and spastic paraplegia 3A (OMIM: # 613708 and # 182600), both autosomal  
139 dominant diseases. For both diseases frameshift mutations are described as disease causing  
140 (35, 36) along with missense mutations. *ATL1* encodes atlastin-1 a GTPase that is important  
141 for the elongation of axons in neurons (37).

142 **Patient 05**

143 The most promising variation of patient 05 is a heterozygous insertion-deletion in *TTN*  
144 (NM\_001267550.2(TTN):c.86413\_86417delinsATGG, p.(Asp28805Metfs\*6)) resulting in a  
145 frameshift in the A-band region which was not described before neither in literature nor in  
146 population databases. The patient showed additional missense *TTN* variations, one of which  
147 was classified with uncertain significance (NM\_001267550.2(TTN): c.4147C>G,  
148 p.(Pro1383Ala)). Due to the huge size of *TTN*, less *in-silico* prediction tools are available for  
149 the variants, however the mentioned missense variant is rare in the normal population (MAF  
150 < 0.002 %). Additionally, the patient had a previously published *FLNC* variant of unknown  
151 significance (4) (F17.1), that is a likely candidate but with a higher allele frequency  
152 (MAF: 0.1 %) and even a homozygous proband reported in population databases.

153 **Patient 06**

154 Patient 06 carries a heterozygous variant in *COL6A1* (NM\_001848.2(COL6A1):c.739-1G>T),  
155 at the same location as a previously reported mutation (38). Luciola et al. sequenced the entire  
156 cDNA sequence of *COL6A1*, *COL6A2* and *COL6A3* and reported a skipping of exon 7 in  
157 *COL6A1* due to the splice site mutation (c.739-1G>A). The variation of patient 06 is located  
158 at the same position but shows a nucleotide change from G to T. *In-silico* prediction tools  
159 calculate a complete loss of the acceptor splice site of exon 7 for both mutated nucleotides.

160 **Patient 07**

161 Patient 07 also has a heterozygous collagen VI variation. The missense variation in *COL6A3*  
162 (NM\_004369.3(COL6A3):c.1688A>G, p.(Asp563Gly)) was described in Butterfield et al. in  
163 a patient harbouring an additional missense mutation in the *COL6A1* gene destroying the Gly-  
164 X-Y motif of the triple helical domain with an intermediate phenotype (39). Patient 07 has no  
165 further mutation in any collagen VI gene.

166 **Patient 08**

167 Patient 08 has a heterozygous variation in *HOXD10* (NM\_002148.3(HOXD10):c.311C>T,  
168 p.(Thr104Ile)). *HOXD10* encodes for a transcription factor of the HOX gene family and  
169 regulates genes in spinal cord development (40). Until today only one mutation  
170 (p.(Met319Lys)) is reported in *HOXD10* (41) causing autosomal dominant Charcot-Marie-  
171 Tooth disease (OMIM: # 192950). The variant of patient 08 is not present in the general  
172 population and both, the affected nucleotide and the amino acid are highly conserved.

173 **Patient 09**

174 Patient 09 has a heterozygous variation in *MYH7* (NM\_000257.2(MYH7):c.1063G>A,  
175 p.(Ala355Thr)), that was first published in 2003 by Richard et al. in patients with  
176 hypertrophic cardiomyopathy (42). The mutation is in the head region of *MYH7* and was  
177 never found in controls. Mutations in *MYH7* are associated with cardiomyopathy, skeletal  
178 muscle myopathies and combinations of both. Liang-distal myopathy (OMIM: # 160500) is a  
179 form of myopathy that can include cardiac disease. Mutations in Liang-distal myopathy are  
180 located mostly in the mid region of MYH7, however three mutations were found in the head  
181 region of *MYH7* (43). In all three cases, the patients displayed a combined muscle and cardiac  
182 phenotype (44-46). Liang-distal myopathy is a differential diagnosis to MFM (34) and a  
183 patient with Liang-distal myopathy was reported to show a MFM-like pattern in muscle  
184 biopsy (47).

185 **Patient 10**

186 In patient 10 we found a very rare heterozygous splice site variant in *TTN*  
187 (NM\_001267550.2(TTN):c.51436+1G>A). It was only detected once in the population  
188 databases (MAF < 0.0005 %) and has not been described in literature. Splice site *in-silico*  
189 prediction tools anticipate a complete loss of the donor splice site of intron 271, hence leading  
190 to an in-frame deletion in the A-band region of *TTN*. The patient has an additional missense  
191 *TTN* variation (NM\_001267550.2(TTN):c.54710T>C, p.(Leu18237Pro)) with a low allele

192 frequency (MAF: 0.06 %) in the population. Both nucleotide residues (of splice site and  
193 missense exchange) are highly conserved.

## 194 **Discussion**

195 The set of ten patients displayed a wide variety of genetic variations in known disease-causing  
196 genes. We could identify several likely disease-causing mutations in new candidate genes,  
197 some published pathogenic mutations.

198 Dividing the analysis into three stages allowed us to scan all patients quickly for the most  
199 likely variant and search for further possible variants, when no convincing variant was found  
200 in the previous step. The step with the most detected candidate variants was S3 with 50 % of  
201 candidates, which is not surprising as this step included the most variants. The most effected  
202 was S1, this step revealed 40 % of variants also it included the least number of variants. S2  
203 revealed the fewest causative variants. This was as expected as it analysed mainly known  
204 MFM genes that had been analysed in part before. Unfortunately, we could not find any  
205 variants in the two candidate genes (*CFL2*, *CSRP3*) included in stage 2.

206

207 Good evidence suggests that the previously reported *FLNC* variant of patient 01  
208 (p.(Gly2199Arg)) is the most likely cause of the patient's disease, except for the presence of  
209 nine heterozygous carriers in population databases. Considering *FLNC*-associated MFM is an  
210 autosomal dominant disease, those carriers may suffer from myopathy as well. As *FLNC*-  
211 associated MFM is an adult-onset disease, it may be possible that younger healthy participants  
212 contributed to these databases.

213

214 Two more patients showed variants in a known MFM gene: patient 05 and 10 both had  
215 variations in *TTN*. Hereditary myopathy with early respiratory failure (HMERF) is a subtype  
216 of MFM that is caused by mutations in *TTN* (OMIM: # 603689). Until today only  
217 heterozygous missense mutations have been reported for HMERF and all but one were

218 detected in exon 344 (48). Patients 05 and 10 have heterozygous frameshift  
219 (p.(Asp28805Metfs\*6)) and splice site mutations (c.51436+1G>A), respectively. Both  
220 mutation types are described in different *TTN*-related myopathies. Despite these discrepancies  
221 in location and category of mutation, both variants are likely pathogenic candidates for MFMM.  
222 Titin is closely related to the Z-discs and an involvement in MFMM pathogenesis beyond the  
223 exon 344 is likely. Moreover, both patients have additional missense *TTN* variants of  
224 uncertain significance that could contribute to the phenotype as potential modifiers or in terms  
225 of recessive inheritance of *TTN*-associated MFMM.

226

227 In patients 03 and 09, we detected variations in genes reported to be associated with  
228 myopathies showing an overlapping phenotype compared with MFMM. Although, in patient 03  
229 no second variation could be detected in *GNE*, this does not exclude the *GNE* gene to be  
230 causal. A second variant could be present, but not detectable with the used techniques, for  
231 instances deep intronic variations or mutations in regulatory regions of *GNE*. The *GNE*  
232 variant is rare and affects a highly conserved amino acid, stressing its pathogenicity and no  
233 other striking variant could be detected in more than 350 myopathy-associated genes  
234 analysed.

235 For patient 09 the variant in *MYH7* (p.(Ala355Thr)) is very likely disease causing. Although  
236 mutations in the same region are not common to cause Liang-distal myopathy, they have been  
237 published (43). Liang-distal myopathy is not only a differential diagnosis to MFMM but also  
238 MFMM-like muscle biopsy results were reported (34, 47). Moreover, patient 09 was diagnosed  
239 with cardiomyopathy that is consistent with the phenotype of Liang-distal myopathy.

240 Patient 02 also carried a mutation reported to cause cardiomyopathy  
241 (NM\_005691.3(ABCC9):c.4570\_4572delinsAAAT), however for this patient no cardiac  
242 involvement is known to old age. The clustering of cardiac diseases raises the question, if  
243 there are diseases that have an additional skeletal muscular phenotype apart from their cardiac

244 phenotype. For instance, more than 40 mutations in *ABCC9* are in the HGMD (49) and none  
245 is directly connected to a skeletal muscle disease, although the gene additionally encodes for  
246 channels that are found in skeletal muscle (50); therefore a muscle phenotype may be  
247 possible.

248

249 Patient 04 and 08 have variants in genes associated with neuropathy (*ATL1* and *HOXD10*). As  
250 well as cardiomyopathy, neuropathy is a common symptom in some MFM. The *ATL1*  
251 variation (p.(Asp98Ilefs\*10)) of patient 04 is most likely a disease-causing mutation.  
252 Heterozygous frameshift mutations are a known cause of disease and the *ATL1* gene is very  
253 intolerant concerning loss of function mutations (51). Moreover, a sensory and motoric  
254 polyneuropathy was electrophysiologically diagnosed in the patient, which further supports  
255 this variant's causality. The variant of patient 08 in *HOXD10* (p.(Thr104Ile)) is likely disease  
256 causing, because it is not present in population databases and located in a conserved region.  
257 Moreover, missense mutations are reported for that type of autosomal-dominant Charcot-  
258 Marie-Tooth disease. However, only one mutation is published for *HOXD10* so far (41) and  
259 only few functional domains are known, which makes the classification of the variant  
260 uncertain.

261

262 Furthermore, patients 06 and 07 have known collagen VI mutations. The mutation of patient  
263 07 is less likely the disease-causing one (NM\_004369.3(COL6A3):c.1688A>G), as the  
264 published case had an additional more convincing mutation, our patient had not. Moreover,  
265 the variant is too frequent in the population (MAF > 0.2 %) for an autosomal dominant  
266 mutation. However, the *COL6A1* splice site mutation of patient 06  
267 (NM\_001848.2(COL6A1):c.739-1G>T) is very likely disease causing. Exon 7 of *COL6A1*  
268 encodes a cysteine rich region next to the triple-helical region; its skipping would most likely  
269 obstruct the assembly of COL6A1-dimers and the stabilization of the helix region (38). The

270 mutation published in Luciola et al. was found to segregate in a family, displaying a  
271 phenotype of Bethlem myopathy (Dutch type), and some family members had contractures.  
272 Patient 06 is displaying contractures as well. The clinical symptoms of collagen VI-associated  
273 myopathies and MFM have overlapping features and even contractures were described in a  
274 patient with *FHLLI*-dystrophies (14). These results suggest a possible connection between  
275 collagen VI and MFM.

## 276 **Conclusion**

277 We conclude that MFM displays new and hitherto undescribed features and genes.  
278 Furthermore, we would like to propose that known disease-causing genes might contribute to  
279 the MFM phenotype that have not been connected to the disease before. Myofibrillar  
280 disintegration exists in skeletal muscle in collagen VI-associated myopathies and might be  
281 present in other myopathies that until now only displayed a cardiac muscle phenotype.  
282 Moreover, additional *TTN* mutations are likely responsible for MFM, apart from the  
283 previously published missense mutations in exon 344.

284 In our small cohort, we could detect a likely disease-causing mutation for six patients (02, 04,  
285 05, 06, 09 and 10). For the remaining four patients (01, 03 07, and 08) the reported variants  
286 might contribute to the phenotype, however too much remains indistinct.

287 Our results indicate that the complex clinical and cellular MFM phenotype is caused by an  
288 interaction of many and still unknown genes. Therefore, clinicians should consider analysing  
289 other myopathy related genes in MFM patients that showed no mutations in known MFM  
290 genes.

291

## 292 **List of abbreviations:**

293 HMERF: Hereditary myopathy with early respiratory failure, MAF: minor allele frequency,

294 MFM: Myofibrillar myopathies, NGS: next-generation sequencing, UTR: untranslated region

295

296 **Declarations**

297 **Ethics approval and consent to participate**

298 This research was approved by the ethical committee of the RWTH Aachen and written  
299 informed consent was obtained from patients.

300 **Consent for publication**

301 Not applicable.

302 **Availability of data and material**

303 All data generated and analysed in the published study, regarding analysed variants lists, are  
304 included in the article or supplements. Raw sequencing data of patients is not shared, as the  
305 patients did not consent to this.

306 **Competing interests**

307 The authors declare that there is no conflict of interest.

308 **Funding**

309 This study was supported by the German Society for Muscular Disorders (Deutsche  
310 Gesellschaft für Muskelkranke, DGM).

311 **Authors' contributions**

312 AZ performed molecular analysis of all patients, analysed and interpreted the data and wrote  
313 the manuscript. CK obtained research funding and conceived the study. SS, RA and ALS  
314 acquired patient information. WK, SR and CK made substantial contribution to data  
315 interpretation and revised the manuscript.

316

Table 2: The most likely variants of each patient.

Pat	cDNA	amino acids	zygosity	Domain <sup>1</sup>	HGMD	gnomAD total (homozygous)	Align GVG D	SIFT	Mutation Taster	PolyPhen2	InterVar
Pat 01	NM_001458.4(FLNC): c.6595G>A	p.(Gly2199Arg)	het	2162-2243: Intradomain insert; immediate targeting to Z lines	-	0.003683 % 0	C15	deleterious	disease causing	benign	uncertain
Pat 02	NM_005691.3(ABCC9): c.4570_4572delinsAAAT	p.(Leu1524Lysfs*5)	het	1312-1546: ABC transporter 2	CX041212: Cardiomyopathy, dilated	-	-	-	-	-	pathogenic
Pat 03	NM_001128227.2(GNE): c.1691G>A	p.(Gly564Glu)	het	406-722: N-acetyl-mannosamine kinase	-	0.008657 % 0	C65	deleterious	disease causing	probably damaging	uncertain
Pat 04	NM_015915.4(ATL1): c.292del	p.(Asp98Ilefs*10)	het	-	-	-	-	-	-	-	likely pathogenic
Pat 05	NM_001267550.2(TTN): c.4147C>G	p.(Pro1383Ala)	het	near Z-disk region, Ig-like 5	-	0.001222 % 0	-	-	disease causing	-	uncertain
	NM_001267550.2(TTN): c.86413_86417delinsATG	p.(Asp28805Metfs*6)	het	A-band region	-	-	-	-	-	-	likely pathogenic
Pat 06	NM_001848.2(COL6A1): c.739-1G>T	-	het	257-592: Triple-helical region	-	-	acceptor splice site of intron 6, skipping of exon 7 is likely	-	-	-	pathogenic
Pat 07	NM_004369.3(COL6A3): c.1688A>G	p.(Asp563Gly)	het	445-620: VWFA 3	CM1310911: UCMD, intermediate	0.2085 % 0	C65	deleterious	disease causing	probably damaging	uncertain
Pat 08	NM_002148.3(HOXD10): c.311C>T	p.(Thr104Ile)	het	-	-	-	C15	deleterious	disease causing	benign	uncertain
Pat 09	NM_000257.2(MYH7): c.1063G>A	p.(Ala355Thr)	het	85-778: Myosin motor	CM031268: Cardiomyopathy, hypertrophic	-	C0	deleterious	disease causing	probably damaging	likely pathogenic
Pat 10	NM_001267550.2(TTN): c.51436+1G>A	-	het	A-band region, Fibronectin type-III	-	0.0004088 % 0	donor splice site of intron 271, skipping of exon 271 is very likely	-	-	-	pathogenic
	NM_001267550.2(TTN): c.54710T>C	p.(Leu18237Pro)	het	A-band region, Fibronectin type-III	-	0.06332 % 0	-	-	disease causing	-	uncertain

318 <sup>1</sup> Protein domain information is derived from Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), except for TTN  
319 variants where information is from the Cardiovascular Genetics and Genomic Group, Royal Brompton  
320 & Harefield NHS Trust website (<https://www.cardiodb.org/titin/>). Italic spelling indicates the depicted  
321 domain does not contain the variant but is next to it.

## 322 **References**

- 323 1. Nakano S, Engel AG, Waclawik AJ, Emslie-Smith AM, Busis NA. Myofibrillar myopathy  
324 with abnormal foci of desmin positivity. I. Light and electron microscopy analysis of 10 cases. *J*  
325 *Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55(5):549-62.
- 326 2. De Bleecker JL, Engel AG, Ertl BB. Myofibrillar myopathy with abnormal foci of desmin  
327 positivity. II. Immunocytochemical analysis reveals accumulation of multiple other proteins. *J*  
328 *Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55(5):563-77.
- 329 3. Claeys KG, Fardeau M, Schroder R, Suominen T, Tolksdorf K, Behin A, et al. Electron  
330 microscopy in myofibrillar myopathies reveals clues to the mutated gene. *Neuromuscul Disord.*  
331 2008;18(8):656-66.
- 332 4. Semmler AL, Sacconi S, Bach JE, Liebe C, Burmann J, Kley RA, et al. Unusual multisystemic  
333 involvement and a novel BAG3 mutation revealed by NGS screening in a large cohort of myofibrillar  
334 myopathies. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:121.
- 335 5. Selcen D, Ohno K, Engel AG. Myofibrillar myopathy: clinical, morphological and genetic  
336 studies in 63 patients. *Brain.* 2004;127(Pt 2):439-51.
- 337 6. Kley RA, Olive M, Schroder R. New aspects of myofibrillar myopathies. *Curr Opin Neurol.*  
338 2016;29(5):628-34.
- 339 7. Goldfarb LG, Park KY, Cervenakova L, Gorokhova S, Lee HS, Vasconcelos O, et al.  
340 Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet.*  
341 1998;19(4):402-3.
- 342 8. Lacson AG, Seshia SS, Sarnat HB, Anderson J, DeGroot WR, Chudley A, et al. Autosomal  
343 recessive, fatal infantile hypertonic muscular dystrophy among Canadian Natives. *Can J Neurol Sci.*  
344 1994;21(3):203-12.

- 345 9. Schessl J, Bach E, Rost S, Feldkirchner S, Kubny C, Muller S, et al. Novel recessive myotilin  
346 mutation causes severe myofibrillar myopathy. *Neurogenetics*. 2014;15(3):151-6.
- 347 10. Selcen D. Severe congenital actin related myopathy with myofibrillar myopathy features.  
348 *Neuromuscul Disord*. 2015;25(6):488-92.
- 349 11. Selcen D, Muntoni F, Burton BK, Pegoraro E, Sewry C, Bite AV, et al. Mutation in BAG3  
350 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2009;65(1):83-9.
- 351 12. Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, et al. A missense mutation in the  
352 alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet*. 1998;20(1):92-5.
- 353 13. Sarparanta J, Jonson PH, Golzio C, Sandell S, Luque H, Screen M, et al. Mutations affecting  
354 the cytoplasmic functions of the co-chaperone DNAJB6 cause limb-girdle muscular dystrophy. *Nat*  
355 *Genet*. 2012;44(4):450-5, S1-2.
- 356 14. Selcen D, Bromberg MB, Chin SS, Engel AG. Reducing bodies and myofibrillar myopathy  
357 features in FHL1 muscular dystrophy. *Neurology*. 2011;77(22):1951-9.
- 358 15. Vorgerd M, van der Ven PF, Bruchertseifer V, Lowe T, Kley RA, Schroder R, et al. A  
359 mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant  
360 myofibrillar myopathy. *Am J Hum Genet*. 2005;77(2):297-304.
- 361 16. Ghaoui R, Palmio J, Brewer J, Lek M, Needham M, Evila A, et al. Mutations in HSPB8  
362 causing a new phenotype of distal myopathy and motor neuropathy. *Neurology*. 2016;86(4):391-8.
- 363 17. Dhawan PS, Liewluck T, Knapik J, Milone M. Myofibrillar myopathy due to dominant  
364 LMNA mutations: A report of two cases. *Muscle Nerve*. 2017.
- 365 18. Selcen D, Engel AG. Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in  
366 humans. *Ann Neurol*. 2005;57(2):269-76.
- 367 19. Selcen D, Engel AG. Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy. *Neurology*.  
368 2004;62(8):1363-71.
- 369 20. Winter L, Turk M, Harter PN, Mittelbronn M, Kornblum C, Norwood F, et al. Downstream  
370 effects of plectin mutations in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *Acta*  
371 *Neuropathol Commun*. 2016;4(1):44.

- 372 21. Ohlsson M, Hedberg C, Bradvik B, Lindberg C, Tajsharghi H, Danielsson O, et al. Hereditary  
373 myopathy with early respiratory failure associated with a mutation in A-band titin. *Brain*. 2012;135(Pt  
374 6):1682-94.
- 375 22. Kohler S, Vasilevsky NA, Engelstad M, Foster E, McMurry J, Ayme S, et al. The Human  
376 Phenotype Ontology in 2017. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D865-D76.
- 377 23. Ockeloen CW, Gilhuis HJ, Pfundt R, Kamsteeg EJ, Agrawal PB, Beggs AH, et al. Congenital  
378 myopathy caused by a novel missense mutation in the CFL2 gene. *Neuromuscul Disord*.  
379 2012;22(7):632-9.
- 380 24. Arber S, Hunter JJ, Ross J, Jr., Hongo M, Sansig G, Borg J, et al. MLP-deficient mice exhibit  
381 a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*.  
382 1997;88(3):393-403.
- 383 25. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines  
384 for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College  
385 of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*.  
386 2015;17(5):405-24.
- 387 26. Li Q, Wang K. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP  
388 Guidelines. *Am J Hum Genet*. 2017;100(2):267-80.
- 389 27. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method  
390 and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.
- 391 28. Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, Judkins T, Scholl T, Samollow PB, et al.  
392 Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight  
393 recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet*. 2006;43(4):295-305.
- 394 29. Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, Sikic M, Ng PC. SIFT missense predictions for genomes.  
395 *Nat Protoc*. 2016;11(1):1-9.
- 396 30. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for  
397 the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11(4):361-2.
- 398 31. The UniProt C. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*.  
399 2017;45(D1):D158-D69.

- 400 32. Hu D, Barajas-Martinez H, Terzic A, Park S, Pfeiffer R, Burashnikov E, et al. ABCC9 is a  
401 novel Brugada and early repolarization syndrome susceptibility gene. *Int J Cardiol.* 2014;171(3):431-  
402 42.
- 403 33. Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, Kathmann EC, O'Coilain F, Gao F, et al.  
404 ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating.  
405 *Nat Genet.* 2004;36(4):382-7.
- 406 34. Selcen D. Myofibrillar Myopathy. 2005;In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al.,  
407 editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.
- 408 35. Tessa A, Casali C, Damiano M, Bruno C, Fortini D, Patrono C, et al. SPG3A: An additional  
409 family carrying a new atlastin mutation. *Neurology.* 2002;59(12):2002-5.
- 410 36. Guelly C, Zhu PP, Leonardis L, Papic L, Zidar J, Schabhuatl M, et al. Targeted high-  
411 throughput sequencing identifies mutations in atlastin-1 as a cause of hereditary sensory neuropathy  
412 type I. *Am J Hum Genet.* 2011;88(1):99-105.
- 413 37. Zhu PP, Soderblom C, Tao-Cheng JH, Stadler J, Blackstone C. SPG3A protein atlastin-1 is  
414 enriched in growth cones and promotes axon elongation during neuronal development. *Hum Mol*  
415 *Genet.* 2006;15(8):1343-53.
- 416 38. Luciola S, Giusti B, Mercuri E, Vanegas OC, Lucarini L, Pietroni V, et al. Detection of  
417 common and private mutations in the COL6A1 gene of patients with Bethlem myopathy. *Neurology.*  
418 2005;64(11):1931-7.
- 419 39. Butterfield RJ, Foley AR, Dastgir J, Asman S, Dunn DM, Zou Y, et al. Position of glycine  
420 substitutions in the triple helix of COL6A1, COL6A2, and COL6A3 is correlated with severity and  
421 mode of inheritance in collagen VI myopathies. *Hum Mutat.* 2013;34(11):1558-67.
- 422 40. Hedlund E, Karsten SL, Kudo L, Geschwind DH, Carpenter EM. Identification of a Hoxd10-  
423 regulated transcriptional network and combinatorial interactions with Hoxa10 during spinal cord  
424 development. *J Neurosci Res.* 2004;75(3):307-19.
- 425 41. Shrimpton AE, Levinsohn EM, Yozawitz JM, Packard DS, Jr., Cady RB, Middleton FA, et al.  
426 A HOX gene mutation in a family with isolated congenital vertical talus and Charcot-Marie-Tooth  
427 disease. *Am J Hum Genet.* 2004;75(1):92-6.

- 428 42. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Hypertrophic  
429 cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a  
430 molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 2003;107(17):2227-32.
- 431 43. Tajsharghi H, Oldfors A. Myosinopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol*.  
432 2013;125(1):3-18.
- 433 44. Darin N, Tajsharghi H, Ostman-Smith I, Gilljam T, Oldfors A. New skeletal myopathy and  
434 cardiomyopathy associated with a missense mutation in MYH7. *Neurology*. 2007;68(23):2041-2.
- 435 45. Homayoun H, Khavandgar S, Hoover JM, Mohsen AW, Vockley J, Lacomis D, et al. Novel  
436 mutation in MYH7 gene associated with distal myopathy and cardiomyopathy. *Neuromuscular  
437 disorders : NMD*. 2011;21(3):219-22.
- 438 46. Overeem S, Schelhaas HJ, Blijham PJ, Grootsholten MI, ter Laak HJ, Timmermans J, et al.  
439 Symptomatic distal myopathy with cardiomyopathy due to a MYH7 mutation. *Neuromuscular  
440 disorders : NMD*. 2007;17(6):490-3.
- 441 47. Tasca G, Ricci E, Penttila S, Monforte M, Giglio V, Ottaviani P, et al. New phenotype and  
442 pathology features in MYH7-related distal myopathy. *Neuromuscular disorders : NMD*.  
443 2012;22(7):640-7.
- 444 48. Savarese M, Sarparanta J, Vihola A, Udd B, Hackman P. Increasing Role of Titin Mutations in  
445 Neuromuscular Disorders. *J Neuromuscul Dis*. 2016;3(3):293-308.
- 446 49. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips A, Cooper DN. The Human Gene Mutation  
447 Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics,  
448 diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet*. 2014;133(1):1-9.
- 449 50. Davis-Taber R, Choi W, Feng J, Hoogenboom L, McNally T, Kroeger P, et al. Molecular  
450 characterization of human SUR2-containing K(ATP) channels. *Gene*. 2000;256(1-2):261-70.
- 451 51. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of  
452 protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285-91.

453

454 Figure 1: The three analysed stages including the stage description.

S1	canonical splice site, nonsense or frameshift mutations, MAF < 2 %, 144 HPO „myopathy“ genes
S2	variants in MFM associated genes and MAF < 2 %
S3	variants related to muscle disorders (muscle.genetable.fr), MAF < 2 %, exon distance < 20 bp, no UTRs

455

## 13 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau PD Dr. Simone Rost sehr herzlich dafür danken, dass Sie mir ermöglicht hat, mein Promotion zu schreiben und diese selbständig zu bearbeiten. Außerdem bin ich ihr sehr dankbar für ihre wertvolle Betreuung, in der sie sich immer sehr viel Zeit genommen hat mich, mit Rat und Tat zu unterstützen.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Thomas Dandekar für sein Interesse an dieser Arbeit und die unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtes.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Kress meinen Dank aussprechen, für seinen fachlichen Rat und die unermüdliche Unterstützung bei der Kommunikation mit Kooperationspartnern und Patienten.

Der ganzen Arbeitsgruppe, auch allen ehemaligen Mitgliedern, möchte ich danken für die gute Arbeitsatmosphäre, die für mich eine große Motivation war, die vielen netten und anregenden Gespräche und natürlich die umfangreiche und kompetente Hilfe in praktischer und theoretischer Form. Meiner Mit-Doktorandin Jule, möchte ich dafür danken, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und viele gute Ratschläge.

Meiner Familie und meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich immer unterstützt haben und mir den Weg in ein Studium ermöglicht haben.

Vor allem möchte ich Sebastian danken, dafür dass er mir stets aufmunternd und unterstützend zur Seite stand, so viel Zeit in das Korrekturlesen dieser Arbeit gesteckt hat und immer an mich geglaubt hat, auch wenn ich es nicht getan habe.